

市售水产品中副溶血性弧菌的毒力及药敏性分析

黄志深^{1,2}, 许喜林¹, 张明明², 肖剑², 雷燕²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 为了解市售水产品中副溶血性弧菌毒力基因携带情况及药敏性情况, 本文采用《GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》分离培养方法, 利用 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定系统及荧光 PCR 从市售水产品中分离鉴定出 60 株副溶血性弧菌分离株, 通过常规 PCR 对 60 株分离株中四种毒力基因的分布进行筛查, 并用 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定系统对副溶血性弧菌分离株进行药敏性试验。结果显示, 市售水产样品的 60 株副溶血性弧菌分离株中 *tlh* 基因携带率为 100.00%, *toxR/S* 基因携带率为 100.00%, *tdh* 基因携带率为 95.00%, *trh* 基因携带率为 65.00%, 多重毒力基因携带率高, 其中四重毒力基因携带率为 61.67%; 分析 60 株分离株对 19 种抗菌药物的药敏情况发现对氨苄西林有极高的耐药性, 耐药率为 96.67%, 多重耐药现象不突出, 仅有 4 株分离株对 2 种药物耐药。结果表明, 市售水产样品中副溶血性弧菌分离株毒力基因携带率较高, 且多数携带多重毒力基因; 分离株耐药情况不突出, 但对抗菌类药物氨苄西林的耐药率较高, 需警惕水产食品中副溶血性弧菌的潜在威胁。

关键词: 水产品; 副溶血性弧菌; 分离鉴定; 毒力基因; 药敏性

文章编号: 1673-9078(2021)08-308-316

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0144

Analysis of Virulence and Drug Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* in Aquatic Products

HUANG Zhi-shen^{1,2}, XU Xi-lin¹, ZHANG Ming-ming², XIAO Jian², LEI Yan²

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Institute for Food Inspection, Guangzhou 511400, China)

Abstract: In order to investigate the virulence gene carrying status and drug sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products, 60 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were isolated and identified from aquatic products by the isolated cultivation method from GB 4789.7-2013, VITEK 2 compact automatic bacteria identification system and real-time PCR. The distribution of 4 virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolates was detected by conventional PCR. Meanwhile, drug susceptibility of the isolates was tested by using VITEK 2 compact automatic bacteria identification system. Results showed that in 60 strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from commercial aquatic samples, the gene carrying rates of *tlh*, *toxR/S*, *tdh*, *trh* were 100.00%, 100.00%, 95.00%, and 65.00%, respectively, and quad-virulence genes carrying rate was 61.67%. Results of drug susceptibility test using 19 types of antibacterial agents indicated that all of the 60 isolates were highly resistant to ampicillin, and the resistance rate was 96.67%. The phenomenon of multiple drug resistance was not prominent, for just only 4 isolates were resistant to 2 drugs. The results indicated that the virulence gene carrying rate of *Vibrio parahaemolyticus* from the commercial aquatic samples was high, and most of the isolates carried multiple virulence genes. The drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from the commercial aquatic samples was not outstanding, but the resistance rate to ampicillin was high, so we should be alert to the potential threat of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic food.

Key words: aquatic products; *Vibrio parahaemolyticus*; isolation and identification; virulence genes; drug sensitivity

引文格式:

黄志深, 许喜林, 张明明, 等. 市售水产品中副溶血性弧菌的毒力及药敏性分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 308-316

HUANG Zhi-shen, XU Xi-lin, ZHANG Ming-ming, et al. Analysis of virulence and drug sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 308-316

收稿日期: 2021-02-07

基金项目: 广州市市场监督管理局科技项目 (2020kj53)

作者简介: 黄志深 (1986-), 男, 助理工程师, 研究方向: 食品微生物与食品安全

通讯作者: 雷燕 (1978-), 女, 公共卫生硕士, 副主任技师, 研究方向: 公共卫生

副溶血性弧菌是引起水产品食源性疾病的主要致病菌。我国海岸线较长,且沿海城镇往往是人员居住密集的地方,水产品是沿海居民钟爱的食品,居民不慎食用受到副溶血性弧菌污染的水产品造成集体食物中毒是沿海人民细菌性食物中毒主要原因,而副溶血性弧菌食物中毒通常表现为出现中毒症状人数多,但较少死亡。金连梅等^[1]对2004年至2007年全国食物中毒事件分析,及何洁仪等^[2]对1997年至2007年广州市发生的副溶血性弧菌食物中毒事件和中毒样品进行统计分析,均表明副溶血性弧菌在各食源性致病菌食物中毒事件中居首位,故对水产品中的副溶血性弧菌的毒力及药敏性研究具有重要意义。

在副溶血性弧菌致病因子的研究方面,耐热性直接溶血毒素(TDH)、耐热性相关溶血毒素(TRH)、不耐热溶血毒素(TLH)是副溶血性弧菌的主要溶血毒素。耐热直接毒素TDH是Obara在KP试验(神奈川试验)呈现阳性的副溶血性弧菌液体培养基中分离得到的,化学成分主要为无糖、脂质的蛋白质,分子质量为42000 u,该毒素在100℃仍能保持10 min活性,属耐高温毒素,所以称为TDH^[3]。Nishibuchi等在食物中毒病例中分离出一批副溶血性弧菌为KP试验呈现阴性,但不产生TDH,认为除TDH外,副溶血性弧菌还有其他致病因子,研究发现这种因子同样可导致溶血现象、细胞致死现象、引起肠毒性、心脏毒性等与TDH相似的症状,但相比TDH,其在100℃10 min不能存活,呈现不耐热,且溶解牛红细胞、不溶解马红细胞,与TDH引起溶血作用的敏感动物红细胞种类不同,分子质量为48000 u,与KP阳性无关,命名为TRH^[4]。TLH^[5]需要卵磷脂的存在才具有溶血活性,由两种具有交叉免疫原性,分子质量为43000 u和45000 u的蛋白质组成,能溶解人和马的红细胞,是一种非典型的磷脂酶。而在副溶血性弧菌脲酶生化研究方面,有研究表明副溶血性弧菌脲酶阳性与致病性有相关性,脲酶阳性菌株能引起小鼠腹泻。也有发现表明副溶血性弧菌的脲酶与人的感染联系不大,但有试验表明脲酶阳性菌株与之间呈正相关^[3,4]。

在副溶血性弧菌毒力基因携带情况的研究方面,对副溶血性弧菌的毒力基因,认识比较清楚的是溶血素基因,包括编码TDH的基因,编码TRH的基因,以及编码TLH的基因 tlh 。研究发现III型分泌系统基因(type three secretion system, TTSS)及毒力基因等组成一个80 kb的毒力岛。 trh 基因分为和两种,研究发现镍转运系统操纵子、尿素酶基因簇及基因是紧密相连在染色体上,故检测尿素酶活性可判断该副溶血性弧菌菌株是否阳性

^[6]。陈伟伟等对1998年以来从福建省分离的48株副溶血性弧菌进行毒力基因检测,其中包括食物中毒临床病人样品中分离的21株,食品样品分离的27株,结果为食品和临床病人分离菌株均检出 tlh 基因,未检出基因;临床患者分离的21株均检出基因,而食品分离的27株中基因检出率为37.00%,表明副溶血性弧菌食物中毒与副溶血性弧菌的基因有关, tdh 基因可作为副溶血性弧菌致病性的特异性检测项目^[7]。 $ToxR/S$ 是大流行株相关毒力基因,大流行株指的是可在较短时间内在较大范围引起公共卫生事件的菌株。 $toxR/S$ 是膜整合蛋白,在弧菌毒力基因转运和表达中发挥重要作用,广泛存在于副溶血性弧菌无毒力和毒力菌株中^[8]。

在副溶血性弧菌对抗菌类药物敏感性的研究方面,其结果在不同菌株间常表现一定差异。通常表现对氯霉素、环丙沙星、庆大霉素、头孢噻肟、磺胺等药物敏感,对头孢唑啉、呋喃唑酮、红霉素、新生霉素、万古霉素、氨苄西林等耐药。朱敏等对来自门诊腹泻患者、肉类食品、食物中毒患者等不同来源的120株副溶血性弧菌进行耐药性监测,结果表明头孢呋辛酯、头孢呋辛、头孢唑啉、头孢噻吩的耐药率均在50.00%以上,对氨苄西林耐药率为49.17%、羧苄西林耐药率为43.33%、阿莫西林/克拉维酸耐药率为32.50%,对头孢曲松、环丙沙星、氧氟沙星、庆大霉素、米诺环素、替卡西林/棒酸等11种抗生素均敏感;同时耐3种或3种以上抗生素的占总数80.00%,食物中毒菌株耐3种或3种以上抗生素的多重耐药现象较严重,有6.70%副溶血性弧菌同时耐7种抗生素的耐药株,研究表明要警惕由多重耐药副溶血性弧菌引起的食源性疾病或食物中毒^[9]。

1 材料与方法

1.1 样品及菌株

样品来自几处水产市场的鱼类、虾类、蟹类、贝类等水产食品样品,菌株有来自上述水产样品中的副溶血性弧菌分离株及副溶血性弧菌标准菌株ATCC 17802。

1.2 主要试剂

副溶血性弧菌荧光PCR检测试剂盒(Reaction Mix、Taq polymerase)、裂解液lysis buffer,德国拜发有限公司;2×Taq PCR MasterMix、ddH₂O、SYBY GREEN I染料、VITEK2革兰氏阴性细菌药敏卡AST-GN04,天根生化科技(北京)有限公司;3%氯

化钠碱性蛋白胨水 (3% APW)、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、氯化钠, 广东环凯微生物科技有限公司; VITEK2 革兰氏阴性鉴定卡 (GN 鉴定卡), 生物梅里

埃美国股份有限公司; 弧菌显色培养基, 法国科玛嘉有限公司; 琼脂糖, Sigma-Aldrich; DS 2000 Marker, 东盛生物科技有限公司。

表 1 副溶血性弧菌相关毒力基因的引物

Table 1 List of *Vibrio parahaemolyticus* genes and primers

基因	引物	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃	片段大小/bp	参考文献
<i>tdh</i>	VPTDH-F	ATAAAGACTATACAATGGCAGCGG	47	138	[10]
	VPTDH-R	GAATAGAACCCTTCATCTTCACCAAC			
<i>trh</i>	VPTRH-F	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	52	500	[6]
	VPTRH-R	CATAACAAA CATATGCCCATTTCCG			
<i>tlh</i>	VPTDH-F	CGAACGAGAACGCAGACATT	50	108	[10]
	VPTRH-R	CTTTGTTGATTTGATCTGGCTG			
<i>ToxR/S</i>	VPToxR/S-F	CGTAGAGCCGCTTTAGC	50	679	[8]
	VPToxR/S-R	AATCGCCATTCGGTAGGT			

1.3 引物

参考相关文献中副溶血性弧菌的 *tdh*、*trh*、*tlh*、*toxR/S* 毒力基因引物, 引物委托华大基因 (深圳) 有限公司进行合成, 详见表 1。

1.4 仪器与设备

PCR 仪, ABI, Thermo Fisher 赛默飞世尔 (上海) 有限公司; 水平电泳系统、凝胶成像仪 Geldoc XR+、荧光 PCR 仪 CFX96 Touch, Bio-Rad Laboratories, inc; VITEK 2 Compact 自动生化鉴定仪, 法国梅里埃生物有限公司; 超低温冷冻柜, 松下电器 (中国) 有限公司; 生物安全柜 II 级 A2 型, Thermo Fisher 赛默飞世尔 (上海) 有限公司; 微型离心机 Mini-10K, 杭州奥盛仪器有限公司; 微型离心机 C1301-230v, 美国 Labnet 公司; 生化培养箱 KB240, 宾德环境试验设备 (上海) 有限公司; 高压灭菌锅 GR85DR, 致微 (厦门) 仪器有限公司。

1.5 方法

1.5.1 样品采集

样品来自 2016 年至 2019 年在南方某市几处水产市场采集的鱼类、虾类、蟹类、贝类等 152 份市售水产食品样品。

1.5.2 副溶血性弧菌分离鉴定

副溶血性弧菌分离具体方法参考《GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》。鉴定部分如下:

生化鉴定: 从 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板挑取适量菌落至 3%无菌盐水中, 制成 0.5~0.63 麦氏浊度的菌悬液, 放入革兰氏阴性鉴定卡后, 利用

VITEK2 全自动微生物生化鉴定仪进行孵育检测分析, 待其完成检测后, 打印报告及分析结果。

荧光 PCR 鉴定: 从 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板挑取适量菌落至装有 500 μ L 生理盐水的 EP 管中, 加入 500 μ L lysis buffer 裂解液, 再将 EP 管放至金属浴中 95 $^{\circ}$ C 裂解 10 min 后制成样品 DNA 模板冷却备用。PCR 反应体系: 取 5 μ L 样品 DNA 模板, 加入副溶血性弧菌荧光 PCR 检测试剂盒中 19.9 μ L Reaction Mix 和 0.1 μ L Taq polymerase, 涡旋混匀并离心, 总体积为 25 μ L。PCR 反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 45 个循环。待其完成检测后, 打印报告及分析结果。将上述副溶血性弧菌分离株从 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板挑取并转入磁珠, 放于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.3 副溶血性弧菌毒力基因鉴定

DNA 模板的制备: 取出 -70 $^{\circ}$ C 保存的样品副溶血性弧菌分离株, 在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上划线, 36 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取适量菌落至装有 500 μ L 生理盐水的 EP 管中, 加入 500 μ L 裂解液 lysis buffer, 再将 EP 管放至恒温金属浴中 95 $^{\circ}$ C 裂解 10 min 后冷却备用。PCR 反应体系: 取 DNA 模板 5 μ L、上下游引物各 1 μ L、12.5 μ L 的 2 \times Taq PCR MasterMix、5.5 μ L ddH₂O, 总体积 25 μ L。PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 3), 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物电泳: 称取相应质量的琼脂糖至三角瓶中, 加入适量的 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 用微波炉加热溶解琼脂糖, 配制成 2%的凝胶, 凝胶取出后加入万分之一 GeneGreen 核酸染料, 并摇匀。将胶槽放入制胶板中, 插入适当的梳子, 倒入溶解的琼脂糖凝胶, 待凝胶完全冷却凝固后, 垂直拔出梳子, 将凝胶

取出, 放至电泳槽。电泳槽中 0.5×TBE 电泳缓冲液应高于凝胶 2 mm 左右。吸取 5 μL DNA 模板加入点样孔, 及加入 DS 2000 Marker (小孔上样量为 3 μL 左右)。打开电泳仪电源开关, 调节电压至 80~100 V 及合适的电泳时间 (约 60~90 min), 开始电泳。打开电脑开启凝胶成像软件 Image Lab, 待电泳结束后取出凝胶置于凝胶成像仪检测板进行拍照检测。

1.5.4 副溶血性弧菌药敏试验

取出-70 °C 保存的副溶血性弧菌分离株, 在 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上划线, 36 °C 培养过夜, 从 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板挑取适量菌落至无菌生理盐水中, 制成 0.5~0.63 麦氏浊度的菌悬液, 再吸取 145 μL 至 3 mL 无菌生理盐水制成样液, 放入革兰氏阴性细菌药敏卡 AST-GN04, 然后按相关操作至 VITEK2 全自动微生物生化鉴定仪进行孵育, 待其完成检测后, 打印报告及分析结果。

VITEK2 系统将参照对照反应孔内的生长情况, 评估每种细菌在存在抗菌药物时的生长模式。根据观察到的多个生长特征参数计算 MIC 值, 根据鉴别性分析制订算法, 以便确定系统上针对所有抗菌药物的敏感性结果。MIC 结果必须与某种细菌鉴定相关联, 以便确定敏感性判读。结果分为敏感 (S), 中介 (I) 和耐药 (R) 来表示。敏感 susceptible (S) 是指使用常规剂量时, 细菌能生长繁殖可达到的抗菌药物抑制浓度水平。中介 intermediate (I) 是指常规剂量的抗菌药物对细菌疗效低于敏感菌株, 药物在浓度较大的部位有效或可使用高于正常剂量进行治疗。耐药 resistant

(R) 细菌不能被常规剂量的抗菌药物所抑制, 或能够证明抑菌药物浓度在某些特定细菌耐药机制范围内。

1.5.5 数据处理

本文数据结果统计及表格是用 Excel 软件进行处理制作, 凝胶电泳图是用凝胶成像仪 Geldoc XR+ 软件生成, 显著性差异计算是用 SPSS 软件进行数据处理制作。

2 结果与讨论

2.1 水产品中副溶血性弧菌的检出结果分析

对 152 份水产样品进行副溶血性弧菌分离鉴定, 其中有 21 份样品检出副溶血性弧菌, 检出率为 13.82%, 并从中分离出以 VITEK 2 Compact 自动生化鉴定仪及荧光 PCR 两种方法均鉴定为副溶血性弧菌的分离株 60 株。与其他研究对比分析, 张健等对市售水产品致病菌进行检测发现, 副溶血性弧菌检出率高于本研究中的检出率, 为 56.36%^[11]。而林晓华等在 2014 年~2015 年对生食水产品致病菌进行检测, 其中副溶血性弧菌检出率为 7.56%^[12], 本文副溶血性弧菌及其他致病菌检出率较高的原因一是由于在研究过程中对水产样品各部位均有采样, 未针对主要食用部分进行采样; 二是由于本文实验样品大多为需熟制烹饪加工才能食用的生鲜或冷冻水产品。

2.2 副溶血性弧菌生化鉴定结果分析

表 2 60 株副溶血性弧菌相关生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of 60 *Vibrio parahaemolyticus*

序号	生化项目	阴性		阳性		弱阴性		弱阳性	
		株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
1	β-半乳糖苷酶	52	86.67	3	5.00	4	6.67	1	1.67
2	γ-谷氨酰转移酶	36	60.00	22	36.67	2	3.33	0	0.00
3	尿素酶	60	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
4	α-半乳糖苷酶	57	95.00	2	3.33	1	1.67	0	0.00
5	鸟氨酸脱羧酶	51	85.00	7	11.67	1	1.67	1	1.67
6	赖氨酸脱羧酶	25	41.67	34	56.67	0	0.00	1	1.67

本节试验结果是通过 VITEK2 全自动生化鉴定仪进行孵育鉴定的, 自动生化仪中鉴定的每种细菌或某细菌群的试验反应会和期望反应作对比, 系统用鉴定准确率表示待测菌试验反应会和期望反应的相关程度^[13]。通过本次研究, 发现此 60 株副溶血性弧菌生化反应结果是多样化的, 发现与常规生化试验概率有所不同的项目有: 甘露醇试验结果阳性率为 93.33%, 其中有 1 株阴性及 2 株弱阴性; β-半乳糖苷酶阴性率为

93.33%, 其中 3 株为阳性, 1 株为弱阳性; α-半乳糖苷酶阴性率为 96.67%, 其余 2 株为阳性; 尿素酶试验结果阴性率为 100%; 赖氨酸脱羧酶试验结果阴性率为 41.67%, 阳性率为 58.33%。结果的差异化反映了副溶血性弧菌属在生长繁殖代谢过程中存在种或亚种的区别, 有可能获得一些特殊的生化类型。而对副溶血性弧菌的生化项目进行整理, 有助于下一步毒力基因分布情况及耐药性的分析。各副溶血性弧菌分离株

的相关生化项目结果详见表2。

2.3 副溶血性弧菌毒力基因鉴定结果

2.3.1 部分副溶血性弧菌毒力基因 PCR 鉴定图谱

如 *toxR/S* 毒力基因 (扩增片段长度为 679 bp)。*toxR/S* 毒力基因与其他毒力基因转运和表达相关,对 60 株副溶血性弧菌进行 *toxR/S* 毒力基因筛查,发现均检出 *toxR/S* 毒力基因,详见图 1。

2.3.2 60 株副溶血性弧菌的 4 种毒力基因鉴定结果

60 株副溶血性弧菌的毒力基因分布情况详见表 3。由表 3 可知:*tdh* 基因阳性有 57 株 (携带率为 95.00%),*trh* 基因阳性有 39 株 (携带率为 65.00%),*tlh* 基因携带率为 100.00%,*toxR/S* 基因携带率为 100.00%,其中携带四重毒力基因的菌株有 37 株 (携带率为 61.67%), 娄阳^[14]对上海市不同来源副溶血性弧菌 *tdh* 基因和 *trh* 基因进行检测,其 *tdh* 基因携带率

为 88.10%,*trh* 基因携带率为 28.57%, 较低于本文的携带率。

从不同水产品类分析,此 60 株副溶血性弧菌在 *tdh* 基因携带率方面,鱼类分离株携带率为 93.33% (28/30),蟹类分离株携带率为 100.00% (15/15),贝类分离株携带率为 91.67% (11/12);在 *trh* 基因携带率方面,鱼类分离株携带率为 96.67% (29/30),蟹类分离株携带率为 46.67% (7/15),贝类分离株携带率为 16.67% (2/12),鱼类与蟹类、贝类携带率均有显著性差异 (鱼类与蟹类携带率 $\chi^2=12.66$, $p<0.05$,鱼类与贝类携带率 $\chi^2=22.80$, $p<0.05$ 。)

结合生化鉴定结果分析,有研究发现副溶血性弧菌的脲酶与人的感染联系不大,但也有试验表明脲酶阳性菌株与 *trh* 之间呈正相关^[3,4]。本文检出携带 *trh* 毒力基因的菌株有 39 株,而尿素酶试验中 60 株菌株均为阴性,未发现尿素酶阳性的菌株,未能对尿素酶与其致病性存在的关系进行判断分析。

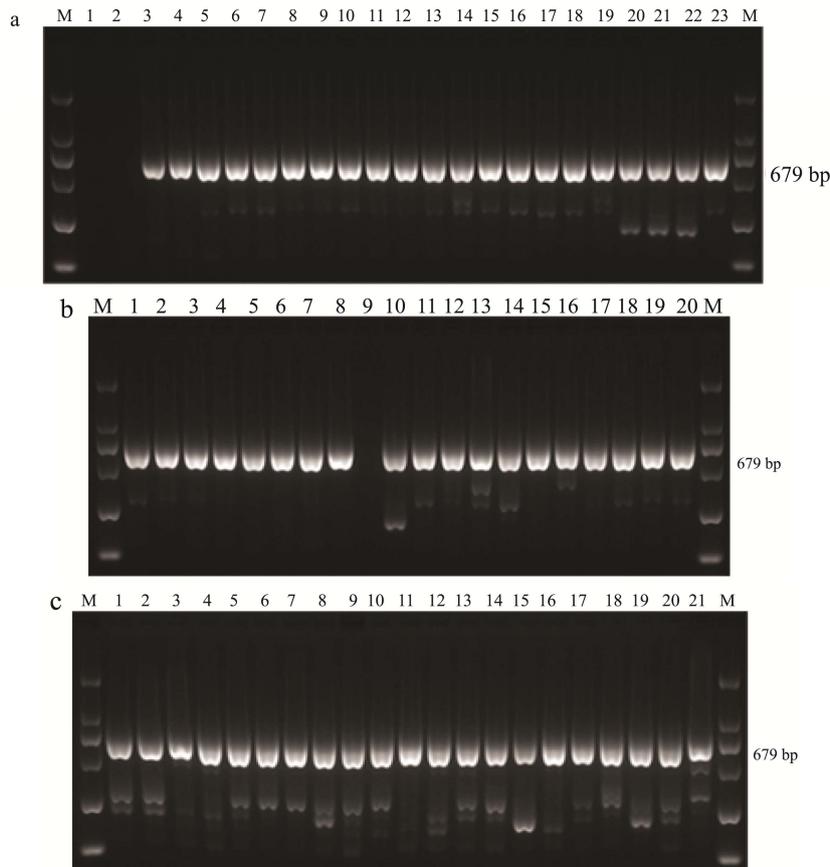


图 1 水产品副溶血性弧菌分离菌株的 *ToxR/S* 毒力基因 PCR 扩增图谱

Fig.1 PCR amplification of *ToxR/S* gene of *vibrio parahaemolyticus* isolated from aquatic products

注: M: DS 2000 DNA Marker (条带从上到下分别为: 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp); a1 为提取空白对照; a2 为试剂空白对照; a3 为副溶标准菌株 ATCC 17802; a4~a23 为菌株 VP1601~VP1620; b1~b8 为菌株 VP1621~VP1628; b10~b20 为菌株 VP2001~VP2011; c1~c21 为菌株 VP1901~VP1921。

表3 60株副溶血性弧菌的4种毒力基因鉴定结果

Table 3 Identification results of 4 virulence genes of 60 *Vibrio parahaemolyticus*

菌株号	菌株来源	基因名称				合计
		<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>toxR/S</i>	
ATCC17802	副溶标准菌株	-	+	+	+	3
VP1601	三文鱼	-	+	+	+	3
VP1602	三文鱼	+	+	+	+	4
VP1603	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1604	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1605	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1606	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1607	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1608	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1609	东星斑鱼	+	+	+	+	4
VP1610	东星斑鱼	+	+	+	+	4
VP1611	东星斑鱼	+	+	+	+	4
VP1612	花金古鱼	+	+	+	+	4
VP1613	花金古鱼	+	+	+	+	4
VP1614	花金古鱼	-	+	+	+	3
VP1615	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1616	珍珠斑鱼	+	+	+	+	4
VP1617	鲩鱼	+	+	+	+	4
VP1618	鲩鱼	+	+	+	+	4
VP1619	鲩鱼	+	+	+	+	4
VP1620	多宝鱼	+	+	+	+	4
VP1621	多宝鱼	+	+	+	+	4
VP1622	多宝鱼	+	+	+	+	4
VP1623	花斑鱼	+	+	+	+	4
VP1624	花斑鱼	+	+	+	+	4
VP1625	花斑鱼	+	+	+	+	4
VP1626	花斑鱼	+	-	+	+	3
VP1627	花斑鱼	+	+	+	+	4
VP1628	花斑鱼	+	+	+	+	4
VP1901	花虾	+	-	+	+	3
VP1902	花虾	+	-	+	+	3
VP1903	老虎斑鱼	+	+	+	+	4
VP1904	老虎斑鱼	+	+	+	+	4
VP1905	花蟹	+	-	+	+	3
VP1906	花甲王	+	-	+	+	3
VP1907	花甲王	+	-	+	+	3
VP1908	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1909	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1910	帝皇蟹	+	-	+	+	3
VP1911	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1912	鲍鱼	-	-	+	+	2

转下页

接上页

VP1913	鲍鱼	+	+	+	+	4
VP1914	红蟹	+	-	+	+	3
VP1915	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1916	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1917	花螺	+	-	+	+	3
VP1918	鲍鱼	+	-	+	+	3
VP1919	蟹	+	+	+	+	4
VP1920	蟹	+	-	+	+	3
VP1921	蟹	+	-	+	+	3
VP2001	蟹	+	+	+	+	4
VP2002	蟹	+	-	+	+	3
VP2003	蟹	+	+	+	+	4
VP2004	蟹	+	+	+	+	4
VP2005	蟹	+	-	+	+	3
VP2006	蟹	+	+	+	+	4
VP2007	蟹	+	-	+	+	3
VP2008	蟹	+	+	+	+	4
VP2009	龙虾	+	+	+	+	4
VP2010	鲍鱼	+	+	+	+	4
VP2011	蟹	+	+	+	+	4
合计		57	39	60	60	
检出率/%		95.00	65.00	100.00	100.00	

表4 60株副溶血性弧菌对19种抗菌药物敏感试验的结果

Table 4 60 strains of *Vibrio parahaemolyticus* exposed to 19 kinds of antibiotics sensitivity test results

抗菌药物种类	抗菌药物名称	敏感S		中介I		耐药R	
		株数	百分比/%	株数	百分比/%	株数	百分比/%
β-内酰胺类	氨苄西林	1	1.67	1	1.67	58	96.67
	氨苄西林/舒巴坦	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	哌拉西林	56	93.33	4	6.67	0	0.00
	哌拉西林/他唑巴坦	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	头孢唑林	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	头孢呋辛	1	1.67	59	98.33	0	0.00
	头孢呋辛酯	0	0.00	60	100.00	0	0.00
	头孢替坦	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	头孢他啶	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	头孢曲松	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	氨曲南	60	0.00	0	0.00	0	0.00
氨基糖苷类	亚胺培南	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	阿米卡星	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	庆大霉素	60	0.00	0	0.00	0	0.00
喹诺酮类	妥布霉素	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	环丙沙星	60	0.00	0	0.00	0	0.00
喹诺酮类	左旋氧氟沙星	60	0.00	0	0.00	0	0.00
	呋喃妥因	60	0.00	0	0.00	0	0.00
磺胺类	甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	56	93.33	0	0.00	4	6.67

2.4 副溶血性弧菌药敏试验结果

通过 VITEK2 全自动生化鉴定仪对 60 株副溶血性弧菌的 19 种抗菌药物药敏实验结果详见表 4。从表 4 可知, 此 60 株分离自水产品的副溶血性弧菌对氨苄西林有极高的耐药性, 耐药率为 96.67%, 申进玲等对上海进口水产品中副溶血性弧菌耐药性研究中氨苄西林耐药率为 98.53%, 与本文结果相似^[15]。而分离株对由舒巴坦和氨苄西林共同组成的混合物氨苄西林/舒巴坦则均为敏感; 有 4 株对甲氧苄啉/磺胺甲恶唑呈现耐药, 其余均为敏感; 对头孢呋辛及头孢呋辛酯的测试结果大多为中介; 有 4 株对哌拉西林呈中介, 其余均为敏感。

60 株副溶血性弧菌的多重耐药情况详见表 5。从表 5 可知, 仅有 4 株菌株有 2 重耐药, 多重耐药现象不突出。耐 2 种药物的菌株主要来自鱼类; 耐 1 种药物及对 3 种药物呈中介的菌株则在鱼类、贝类及虾类均有检出。

表 5 60 株副溶血性弧菌中具有较多耐药的菌株一览表

Table 5 List of strains with more drug resistance in 60 *Vibrio*

<i>parahaemolyticus</i>			
菌株号	菌株来源	耐药R合计	中介I合计
VP1604	珍珠斑鱼	2	2
VP1606	珍珠斑鱼	2	2
VP1607	珍珠斑鱼	2	2
VP1609	东星斑鱼	2	2
VP1628	花斑鱼	1	3
VP1916	鲍鱼	1	3
VP2009	龙虾	1	3
VP2010	鲍鱼	1	3

结合生化结果分析, 耐 2 种药物的菌株 VP1604、VP1606、VP1607 均与副溶血性弧菌典型生化相符, 菌株 VP1609 的 D-甘露醇结果为阴性, 其余项目与副溶血性弧菌典型生化相符。耐 1 种药物及对 3 种药物呈中介的 4 株菌株均与副溶血性弧菌典型生化相符。

结合毒力基因结果分析, 耐 2 种药物的 4 株菌株均具有 4 重毒力; 耐 1 种药物及对 3 种药物呈中介的菌株 VP1628、VP2009、VP2010 具有 4 重毒力, VP1916 则具有 3 重毒力。不携带 *tdh* 及 *trh* 毒力基因的菌株 VP1912 对此 19 种药物不呈现耐药性, 对氨苄西林、头孢呋辛及头孢呋辛酯此 3 种药物呈中介。本研究中 60 株食源性副溶血性弧菌分离株大多具有临床菌株的特征基因, 谭海芳等在对肇庆市副溶血性弧菌耐药性研究时指出, 由于近年来抗生素的大量使用, 各食源性病原菌耐药株日益增多, 当出现耐 3 种或 3 种

以上药物时, 要警惕超级耐药株引起的副溶血性弧菌食源性疾病^[16]。随着对副溶血性弧菌的致病机制和药敏性的研究越来越多。

3 结论

3.1 对 60 株副溶血性弧菌的典型生化项目特征进行分析, 发现其生化反应结果是多样化的, 赖氨酸脱羧酶试验等项目结果与常规生化试验概率有所不同。

3.2 对 60 株副溶血性弧菌分离株的毒力基因进行鉴定分析, 发现毒力基因分布如下: *tdh* 基因携带率 95.00%, *trh* 基因携带率为 65.00%, *tlh* 基因携带率为 100.00%, *toxR/S* 基因携带率为 100.00%, 其中四重毒力基因携带率 61.67%, 结果表明分离株具有较高的毒力基因携带率, 且多数携带多重毒力基因。携带 *trh* 毒力基因的菌株有 39 株, 而尿素酶试验中 60 株菌株均为阴性, 未发现尿素酶阳性的菌株, 未能对尿素酶与其致病性存在的关系进行判断分析。

3.3 对 60 株副溶血性弧菌的耐药性进行鉴定分析, 发现 60 株菌株均对氨苄西林有极高的耐药性, 耐药率为 96.67%; 有 4 株对甲氧苄啉/磺胺甲恶唑呈现耐药; 但对由舒巴坦和氨苄西林共同组成的混合物氨苄西林/舒巴坦则均为敏感。多重耐药现象不突出, 仅有 4 株菌株对 2 种药物耐药, 主要来自鱼类; 耐 1 种药物及对 3 种药物呈中介的菌株则在鱼类、贝类及虾类均有检出。耐 2 种药物的 4 株菌株均具有 4 重毒力, 不携带 *tdh* 及 *trh* 毒力基因的菌株 VP1912 对此 19 种药物不呈现耐药性。结果表明分离株耐药情况不突出, 但对抗菌类药物氨苄西林的耐药率较高, 需警惕水产食品中副溶血性弧菌的潜在威胁。

4 展望

随着人们对食品安全需求的日益增长及水产品市场的逐渐发展, 针对水产品中副溶血性弧菌的致病机制和药敏性的研究越来越多。因时间和条件所限, 本研究还有很多实验需要进一步开展, 如结合相关生化及毒理实验对副溶血性弧菌的毒力表达进行研究, 结合耐药基因筛查对药敏性进行深入研究等, 以挖掘更多潜在的毒力及耐药因子, 探索副溶血性弧菌致病机制和药敏性之间的关系, 为副溶血性弧菌的快速检测及防控提供实验依据和理论基础。

参考文献

- [1] 金连梅, 李群. 2004-2007 年全国食物中毒事件分析[J]. 疾病监测, 2009, 24(6): 459-461
JIN Lian-mei, LI Qun. Analysis of food-poisoning events in

- China, 2004-2007 [J]. Disease Surveillance, 2009, 24(6): 459-461
- [2] 何洁仪,李迎月,邓志爱,等.广州市副溶血性弧菌食物中毒特征性分析[J].中国食品卫生杂志,2011,23(5):464-468
HE Jie-yi, LI Ying-yue, DENG Zhi-ai. Characterization of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Guangzhou city [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2011, 23(5): 464-468
- [3] Terai A, Shirai H, Yoshida O, et al. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh* gene) of *Vibrio mimicus* and its evolutionary relationship with the *tdh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 71(3): 319-323
- [4] Nishibuchi M, Kaper J B. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Molecular Microbiology, 1990, 4(1): 60
- [5] 李志峰,聂军,戴迎春,等.副溶血弧菌 *tlh* 基因的克隆、表达及功能的研究[J].中国人兽共患病杂志,2004,3:193-195
LI Zhi-feng, NIE Jun, DAI Ying-chun, et al. Molecular cloning, expression and functions of the *tlh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2004, 3: 193-195
- [6] Asim K Bej, Donald P Patterson, Cynthia W Brasher, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 215-225
- [7] 陈伟伟,林志钦,谢雅真.福建不同来源副溶血性弧菌的毒力因子检测[J].海峡预防医学杂志,2011,17(3):54-56
CHEN Wei-wei, LIN Zhi-qin, XIE Ya-zhen. Virulence factor detection of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Fujian [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2011, 17(3): 54-56
- [8] 慕艳娟,许岫琼,潘子豪,等.以 *toxR-S* 为靶基因的副溶血性弧菌 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2015,45(10): 991-999
MU Yan-juan, XU Jue-qiong, PAN Zi-hao, et al. Development of a PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on *toxR-S* gene sequence [J]. Chinese Veterinary Science, 2015, 45(10): 991-999
- [9] 朱敏,梅玲玲,张俊彦,等.120 株副溶血性弧菌的血清群和耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2008,11:2292-2294
ZHU Min, MEI Ling-ling, ZHANG Jun-yan, et al. Analysis of serotype and drug resistance of 120 *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Zhejiang Province [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 11: 2292-2294
- [10] Sze Ki Wong, Xiao-Hua Zhang, Norman Y S Woo. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes [J]. Aquaculture, 2012, 330: 29-36
- [11] 张健,邓志爱,伍业健,等.2015年-2016年广州市食品中食源性致病菌监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2017,27(11): 1608-1609
ZHANG Jian, DENG Zhi-ai, WU Ye-jian, et al. Analysis of foodborne pathogen contamination in Guangzhou from 2015 to 2016 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(11): 1608-1609
- [12] 林晓华,余超,罗健梅,等.2014-2015年广州市4大类食品食源性致病菌污染状况[J].职业与健康,2018,34(3):332-335
LIN Xiao-hua, YU Chao, LUO Jian-mei, et al. Contamination status of foodborne pathogenic bacteria in four types of food in Guangzhou City from 2014-2015 [J]. Occupation and Health, 2018, 34(3): 332-335
- [13] 郭瑞军.VITEK 2 Compact 及其在食品微生物检测中的应用研究[J].现代食品,2020,12:192-193,201
GUO Rui-jun.VITEK 2 Compact system and its application in food microbiological detection [J]. Modern Food, 2020, 12: 192-193, 201
- [14] 娄阳.上海市不同来源副溶血性弧菌耐药性研究及潜在风险分析[D].上海:上海海洋大学,2016
LOU Yang. Study on antimicrobial resistance and risk analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Shanghai [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016
- [15] 申进玲,赵丽娜,韩伟,等.上海进口水产品中副溶血性弧菌耐药性、毒力基因和遗传特征研究[J].食品科学,2020: 1-10
SHEN Jin-ling, ZHAO Li-na, HAN Wei, et al. Antimicrobial resistance, virulence gene analysis and genetic characterization of *Vibrio Parahaemolyticus* isolates from aquatic products imported to Shanghai [J]. Food Science, 2020: 1-10
- [16] 谭海芳,丁丽娜,林凤,等.肇庆市副溶血性弧菌血清分型和耐药性研究[J].实用预防医学,2010,17(2):349-352
TAN Hai-fang, DING Li-na, LIN Feng, et al. Study on serotype and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in Zhaoqing [J]. Practical Preventive Medicine, 2010, 17(2): 349-352