

2010–2013 年湖南省市售水产品中副溶血性弧菌污染状况及病原特征分析

贾华云, 王岚, 陈帅, 张红, 梁进军, 刘晓革, 李俊华

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解湖南省市售水产品中副溶血性弧菌污染状况和病原特征。 **方法** 2010–2013 年在湖南省 14 个市的集贸市场和超市, 按照无菌采样原则采集动物性水产品 1 263 份, 分离副溶血性弧菌, 进行毒力基因、耐药表型和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型。 **结果** 1 263 份水产品中, 221 份样品检出副溶血性弧菌, 检出率为 17.50%。3 株副溶血性弧菌检出 *trh* 基因, 1 株检出 *tdh* 基因, 毒力基因携带率为 1.81%。分离菌株对氨苄青霉素耐药率最高, 达 30.32%。其次为对氯霉素(1.81%)、复方新诺明(1.36%)和四环素(0.45%), 未发现多重耐药菌株。分离菌株经 Not I 酶切后, 脉冲场凝胶电泳带型相对分散。 **结论** 2010–2013 年湖南省市售水产品中副溶血性弧菌污染率高, 部分菌株携带毒力基因, 并具有一定的耐药性。

关键词: 副溶血性弧菌; 水产品; 毒力基因; 耐药性

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2016)12–1433–03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2016.12.007

Contamination status and pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products sold in cities of Hunan Province, 2010–2013

JIA Hua-yun, WANG Lan, CHEN Shuai, ZHANG Hong, LIANG Jin-jun, LIU Xiao-ge, LI Jun-hua

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: LI Jun-hua, E-mail: hncdc_ljh@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the contamination status and pathogenic features of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products sold in cities of Hunan Province. **Methods** According to the aseptic sampling principle, 1,263 aquatic products of animal origin were collected from fair markets and supermarkets in 14 cities of Hunan Province. *Vibrio parahaemolyticus* was isolated and subjected to virulence gene detection, antimicrobial susceptibility testing and molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** *Vibrio parahaemolyticus* was detected in 221 of 1,263 aquatic products, with the detection rate of 17.50%. The *trh* gene was positive in 3 isolates and *tdh* gene in 1 isolate, with the virulence gene carrying rate of 1.81%. The isolates were the most resistant to ampicillin (30.32%), then to chloramphenicol (1.81%), sulfamethoxazole compound (1.36%) and tetracycline (0.45%). No multidrug resistance strain was detected. PFGE indicated that the bands of the isolates digested by Not I were relatively dispersed. **Conclusions** The contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products sold in cities of Hunan Province is severe, and some isolates carry virulence gene and express resistance to antibiotics.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Aquatic product; Virulence gene; Drug resistance

副溶血性弧菌是一种嗜盐革兰阴性食源性致病菌, 常存在于近海岸的海水、海底沉积物、鱼、虾、贝壳类海产品中。近期的研究认为, 副溶血性弧菌在淡水产品中也有较高的污染率, 而且它还存在于淡水养殖场环境中, 副溶血性弧菌的污染逐步从海产品向淡水产品蔓延^[1]。副溶血性弧菌作为细菌性食源性疾病

的最主要病原体, 是不可忽视的食品安全风险因素^[2]。湖南省河流湖泊众多, 水产品丰富, 近年来全省陆续发生多起副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发^[3], 因此本研究对湖南省市售水产品中的副溶血性弧菌的污染状况进行调查, 并进行分离菌株的脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型、毒力基因和耐药性检测等研究, 以了解湖南地区副溶血性弧菌的病原学特征。

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2014–132)

作者简介: 贾华云, 男, 硕士, 主要从事微生物检验工作。贾华云和王岚并列第一作者。

通讯作者: 李俊华, 主任医师。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2010-2013 年在 14 个地州市的农贸市场、超市和水产批发市场共采集 1 263 份市售动物性水产品,包括淡水产品 1 026 份,海产品 237 份。其中鲜活水产品 800 份、冰鲜水产品 19 份,冷冻水产品 144 份,预制水产品 150 份,熟制水产品 150 份。

1.1.2 培养基与试剂 TCBS、营养琼脂、碱性蛋白胨水等培养基由北京陆桥技术有限责任公司生产,API 20E 生化鉴定条由法国生物梅里埃公司生产,药敏检测板由美国 Thermo Fisher 生产,副溶血性弧菌毒力基因 *tdh* 和 *trh* 引物(*tdh*-F:5'-AGCTTCCATCTGTC-CCTTTT-3',*tdh*-R:5'-ATTACCACTACCACTCTCATA-3';*trh*-F:5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3',*trh*-R:5'-CATTTCCGCTCTCATATGC-3')由 Invitrogen 合成,SeaKem Gold 琼脂糖由美国 LONZA 公司生产,蛋白酶 K 由美国 Sigma 公司生产;限制性内切酶 Not I 由宝生物工程(大连)有限公司生产,所有试剂均在有效期内使用。药敏实验用质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922,PFGE 相对分子量标准用沙门菌 H9812,均由国家食品安全风险评估中心赠送。

1.2 方法

1.2.1 样品检测 按照《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》(GB 4789.7-2013)对样品进行副溶血性弧菌检测,使用 API 20E 生化试剂条进行菌株鉴定。

1.2.2 毒力基因检测 毒力基因 *tdh* 和 *trh* 的 PCR 体系为 25 μl,含 dNTP Mixture 2 μl,Primer 各 0.5 μl,TaKaRa Taq 0.25 μl,DNA 模板 2 μl,dH₂O 19.25 μl。PCR 扩增条件:94 ℃,预变性 5 min;94 ℃,变性 1 min,55 ℃,退火 1 min,72 ℃,延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃,延伸 5 min。扩增产物使用 QIAxcel system 毛细管电泳系统进行分析,分析使用 QIAxcel DNA Screening Kit, QX DNASize Marker 100 bp-2.5 kb 及 QX Alignment Marker15 bp/3 kb。

1.2.3 药敏试验 采用微量肉汤稀释法测定抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),包括下列抗菌药物:氨苄青霉素(AMP),四环素(TET),环丙沙星(CIP),头孢西丁(CFX),头孢噻肟(CTX),庆大霉素(GEN),复方新诺明(TMP/SMZ),氯霉素(CHL),结果判断参照美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)出版的药物敏感试验指南(2014 版)。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳 副溶血性弧菌经琼脂糖固定、蛋白酶 K 裂解、洗涤后,包埋的 DNA 在 37 ℃水浴中使用 40 U 的 Not I 酶切至少 4 h。得到的 DNA 片段使用 Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳分型,电泳缓冲液

为 0.5×TBE,电泳时间为 19 h,电泳温度为 14 ℃,脉冲时间为 10~35 s。凝胶使用 GelRed 染色后成像。使用 BioNumerics 6.6 软件处理 PFGE 成像结果,采用组间非加权的几何平均数(unweighted pair group method using arithmetic averages, UPGMA)方法进行聚类分析,采用基于条带比较的 Dice 系数衡量 PFGE 带型之间的相似度,相似度为 100%被视为同一 PFGE 型。

2 结果

2.1 水产品中副溶血性弧菌污染情况 对 1 263 份水产品进行副溶血性弧菌的分离鉴定,共 221 份样品检出副溶血性弧菌,检出率为 17.50%。淡水产品与海产品中副溶血性弧菌的污染程度不同,淡水产品中副溶血性弧菌检出率为 15.40%,海产品中副溶血性弧菌检出率为 26.58%。不同状态的水产品中副溶血性弧菌污染程度不同,其中活的水产品和冰鲜水产品中副溶血性弧菌检出率较高,分别为 25.50% 和 42.11%,见表 1。

表 1 市售不同类别水产品中副溶血性弧菌检出情况

样品类别	阳性样品数	样品数	阳性率(%)
鲜活	204	800	25.50
冰鲜	8	19	42.11
冷冻	3	144	2.08
预制	5	150	3.33
熟制	1	150	0.67
合计	221	1 263	17.50

2.2 副溶血性弧菌毒力基因检出情况 提取 221 株副溶血性弧菌基因组 DNA,通过 PCR 方法检测 *tdh* 和 *trh* 基因,其中 3 株检出 *trh* 基因,1 株检出 *tdh* 基因,毒力基因携带率为 1.81%。

2.3 药敏试验结果 对 221 株副溶血性弧菌进行了 8 种抗菌药物敏感试验,结果显示分离株对氨苄青霉素的耐药性最高,耐药率达 30.32%。其次,菌株还对氯霉素、复方新诺明和四环素耐药,耐药率分别为 1.81%、1.36%和 0.45%,未发现环丙沙星、头孢西丁、头孢噻肟、庆大霉素的耐药菌株。而且,耐药菌株仅耐 1 或 2 种抗生素,未发现多重耐药菌株,见表 2。

表 2 副溶血性弧菌分离株耐药情况

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	百分率(%)	菌株数	百分率(%)	菌株数	百分率(%)
氨苄青霉素(AMP)	67	30.32	78	35.29	76	34.39
四环素(TET)	1	0.45	4	1.81	216	97.74
环丙沙星(CIP)	0	0.00	0	0.00	221	100.00
头孢西丁(CFX)	0	0.00	0	0.00	221	100.00
头孢噻肟(CTX)	0	0.00	0	0.00	221	100.00
庆大霉素(GEN)	0	0.00	0	0.00	221	100.00
复方新诺明(TMP/SMZ)	3	1.36	0	0.00	218	98.64
氯霉素(CHL)	4	1.81	1	0.45	216	97.74

2.4 分子分型 经 Not I 酶切,水产品中副溶血性弧菌的 PFGE 带型相对分散,仅少数菌株具有相同的 PFGE 型别。从图 1 甲鱼中分离的 72 株副溶血性弧菌 PFGE 聚类图来看,相同采样点的甲鱼中分离的副溶血性弧菌可能具有相同或相似的带型,不同采样点分离的菌株型别基本不一致,仅 1 个 PFGE 型别的副溶血性弧菌在不同时间不同地点采集的甲鱼中被分离。

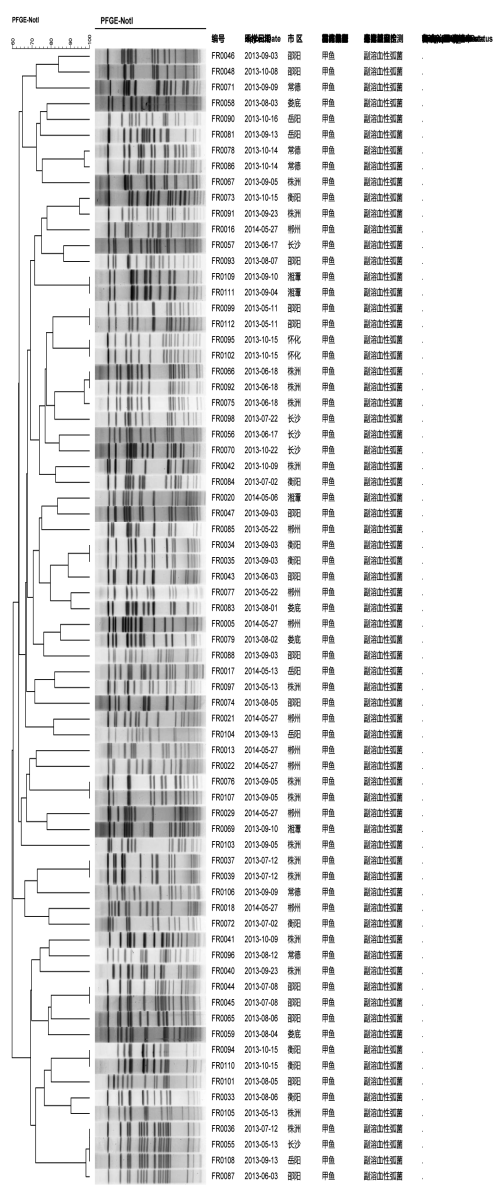


图 1 甲鱼中分离的 72 株副溶血性弧菌 Not I 酶切图谱聚类分析图

3 讨论

副溶血性弧菌的致病性主要包括溶血素、脂多糖和侵袭素等。其中溶血素是得到公认且研究较多的致病因素,由 *tdh* 基因编码的耐热直接溶血素 (TDH) 和 *trh* 基因编码的相关耐溶解血素 (TRH) 是主要毒力因子。通常认为分离的副溶血性弧菌是否具有毒力,取

决于是否携带 *tdh* 或者 *trh* 基因^[4]。本研究水产品中分离的副溶血性弧菌有 1 株携带 *tdh* 基因,3 株携带 *trh* 基因,占分离菌株的 1.81%,与国外报道的基本一致^[5]。

水产品尤其甲鱼是 O139 霍乱弧菌的一个重要污染源,也是湖南省霍乱疫情的主要传染源^[6]。本研究对甲鱼中的副溶血性弧菌进行分离鉴定并进行 PFGE 分型,结果表明,在养殖或销售过程中,由于水体的污染导致相同采样点分离的不同菌株 PFGE 型别可能一致。同时研究也发现不同地区的采样点分离的副溶血性弧菌 PFGE 分型也可能一致,该甲鱼是否来源于同一个养殖场有待进一步的调查溯源。

细菌耐药性的逐渐增强,是近年来公共卫生关注的一个重要内容。与沙门菌、金黄色葡萄球菌和致泻性大肠埃希菌等食源性致病菌相比,副溶血性弧菌对抗生素的耐药率较低,耐药种类较少。但国内也陆续出现了多重耐药菌株,耐药形势不容小觑^[7]。四环素类药物被美国 CDC 推荐^[8]为弧菌严重感染时首选抗菌药物,其替代治疗方案是联合使用广谱头孢菌素类药物和多西环素或单独使用氟喹诺酮类药物,不允许使用多西环素及氟喹诺酮类药物的儿童可使用复方新诺明及氨基糖苷类药物。本研究中检出对四环素和复方新诺明耐药的菌株,为副溶血性弧菌感染的治疗可能带来困难,对人类健康造成影响。

参考文献

[1] 裴晓燕,余波,张秀丽,等. 中国内陆 6 省(自治区)淡水鱼养殖、销售和餐饮环节常见嗜盐性弧菌污染调查[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(1):79-83.

[2] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅. 2003-2007 年中国 1060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(3):224-228.

[3] 李建国,石新时. 邵阳市首次发现副溶血性弧菌食物中毒的调查报告[J]. 实用预防医学,2003,10(4):581-582.

[4] Hirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermo stable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis[J]. Infect Immun, 1990, 58(11):3568-3573.

[5] Raghunath P, Acharya S, Bhanumathi A, et al. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India[J]. Food Microbiol, 2008, 25(6):824-830.

[6] 胡世雄,邓志红,高立冬,等. 湖南省 O139 霍乱流行因素及预防控制措施研究报告[J]. 实用预防医学,2010,17(4):651-653.

[7] 吴蓓蓓,俞盈,金培婧,等. 宁波地区海产品及环境中副溶血弧菌主要毒力及耐药性分析[J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(5):381-385.

[8] Han FF, Walker RD, Tanes ME, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from louisiana gulf and retail raw oysters[J]. App Environ Microb, 2007, 73:7096-7098.