

## 研究报告

## 2018年贝类来源副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析

李丽倩<sup>1</sup>, 姚琳<sup>1</sup>, 林才云<sup>1,2</sup>, 李凤铃<sup>1</sup>, 曲梦<sup>1</sup>, 王联珠<sup>1</sup>, 翟毓秀<sup>1</sup>, 牟海津<sup>2</sup>, 江艳华<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**目的 对2018年从产地和市售贝类样品中分离的140株副溶血性弧菌的毒力基因和耐药性进行分析。方法 采用聚合酶链式反应(PCR)扩增法检测毒力基因和耐药基因,采用药敏纸片法测试菌株的耐药性。结果 140株副溶血性弧菌均不含有 $tdh$ 基因,1株菌含有 $trh$ 基因;所有菌株对氨苄西林耐药,部分菌株对头孢唑啉、头孢吡肟、链霉素、阿米卡星、复方新诺明、四环素和氟苯尼考耐药,所有菌株对头孢吡肟、庆大霉素、亚胺培南、美罗培南、氧氟沙星和强力霉素敏感,6株菌呈现耐受2类及以上抗菌药的多重耐药性;耐链霉素菌株检出耐药基因 $strA$ 、 $strB$ ,耐四环素菌株检出耐药基因 $tetA$ ,耐复方新诺明菌株检出耐药基因 $sul2$ ,耐氟苯尼考菌株检出耐药基因 $floR$ 。结论 大多数副溶血性弧菌不含有毒力基因,菌株呈现不同程度的耐药性,少量菌株含有多个耐药基因,表现出多重耐药性,提示应继续加强水产品中副溶血性弧菌的致病性和耐药性监测。

**关键词:** 副溶血性弧菌;毒力基因;耐药性;耐药基因

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)04-0364-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.003

**Analysis of virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish in 2018**LI Liqian<sup>1</sup>, YAO Lin<sup>1</sup>, LIN Caiyun<sup>1,2</sup>, LI Fengling<sup>1</sup>, QU Meng<sup>1</sup>,  
WANG Lianzhu<sup>1</sup>, ZHAI Yuxiu<sup>1</sup>, MU Haijin<sup>2</sup>, JIANG Yanhua<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shandong Qingdao 266071, China; 2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Shandong Qingdao 266003, China)

**Abstract: Objective** To analyze the virulence genes and antimicrobial resistance of 140 *Vibrio parahaemolyticus* strains from shellfish collected from farms and markets. **Methods** Virulence genes and antimicrobial resistance genes were detected by PCR amplification method, and antimicrobial resistance was determined by disk diffusion test. **Results** None of the 140 strains carried  $tdh$  gene, and  $trh$  gene was detected in one strain. All strains were resistant to ampicillin, some strains were resistant to cefazolin, cefuroxime sodium, streptomycin, amikacin, sulphamethoxazole/trimethoprim, tetracycline and florfenicol. All strains were sensitive to cefepime, gentamicin, imipenem, meropenem, ofloxacin and doxycycline. Six strains showed multi-antimicrobial resistance to two or more categories of antimicrobials. The resistance genes  $strA$  and  $strB$  were detected in streptomycin resistant strains,  $tetA$  was detected in tetracycline resistant strains,  $sul2$  was detected in sulphamethoxazole/trimethoprim resistant strains, and  $floR$  was detected in florfenicol resistant strain. **Conclusion** Most of *Vibrio parahaemolyticus* strains didn't carry virulence genes and showed antimicrobial resistance to a certain extent. Some strains had more than one antimicrobial resistance gene, which exhibited multi-antimicrobial resistance. These results indicated that enhancing the monitoring of pathogenicity and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products should be continued.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; virulence gene; antimicrobial resistance; antimicrobial resistance gene

收稿日期:2020-03-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31601566);国家重点研发计划课题(2017YFC1600703);现代农业产业技术体系专项(CARS-47)

作者简介:李丽倩 女 助理工程师 研究方向为水产品生物危害物检测与控制 E-mail: 1004374284@qq.com

通信作者:江艳华 女 高级工程师 研究方向为水产品生物危害物检测与控制 E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

贝类具有味道鲜美和营养价值高等特点,深受消费者的青睐,是我国重要的经济水产品。我国既是贝类养殖大国,同时也是消费大国,据统计,2018年我国养殖贝类产量达到1 463.5万吨<sup>[1]</sup>。由于贝类的生活环境及滤食特性,贝类成为多种食源性致病菌的传播载体,特别是副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的污染率较高<sup>[2]</sup>。因生食或食用未煮熟的贝类产品造成副溶血性弧菌感染的中毒事件时有发生,因此,对贝类中副溶血性弧菌的监测有助于了解该菌的流行特征及提高贝类的食用安全。

副溶血性弧菌为革兰阴性菌,呈弧状、杆状等多种形状,无芽胞,是一种海洋性嗜盐菌,广泛存在于鱼、虾、贝、蟹等海产品中。副溶血性弧菌分为致病性和非致病性菌株,致病性菌株中最主要的毒力因子是耐热直接溶血素(TDH)和耐热直接相关溶血素(TRH),分别由*tdh*和*trh*基因编码,可引起食物中毒,临床上主要表现为急性起病、腹痛、呕吐、腹泻及水样便等<sup>[3]</sup>。副溶血性弧菌被认定为全球范围内由海产品引起食源性疾病的重要病原菌,在我国是引起食源性疾病的首要病原微生物<sup>[4]</sup>。随着抗菌药物的使用越来越广泛,细菌耐药性呈现日益严重的趋势,已有研究表明海产品中的副溶血性弧菌也具有不同程度的耐药性,给海产品带来潜在安全隐患<sup>[5-6]</sup>。如果感染了耐药性菌株,会造成临床用药失效,严重威胁人类健康。

为了持续跟踪我国贝类产品中副溶血性弧菌的致病性和耐药性状况,本研究对2018年分离自产地和市售贝类样品中的140株副溶血性弧菌进行致病性和耐药性分析,为进一步评估贝类产品的食用安全及防范食源性疾病暴发奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株来源

140株副溶血性弧菌菌株分离自产地(辽宁、山东、河北和广东)和市售(山东、广东)贝类(牡蛎、扇贝、毛蚶、菲律宾蛤仔、四角蛤蜊和青蛤)中,经鉴定后保存于本实验室,编号为Vp2018001~Vp2018140,其中94株来自产地样品,46株来自市售样品。副溶血性弧菌标准菌株(ATCC 17802和GCMCC 1.1615)分别购自美国典型微生物保藏中心(ATCC)和中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC);抗菌药敏感试验质控标准菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)购自ATCC。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

EDC-810 温度梯度聚合酶链式反应(PCR)仪(北京东胜创新生物科技有限公司)、PowerPac 电泳

仪(美国 Bio-Rad)、Infinity 3000 凝胶成像系统(法国 Vilber)、NU-425-600E Class II 生物安全柜(美国 Nuair)、MF2 菌落/显微多功能分析仪(杭州迅数科技有限公司)。

LBS 液体培养基(含 5 g/L 酵母粉,10 g/L 胰蛋白胍,30 g/L NaCl),Muller-Hinton 琼脂(MHA,北京陆桥技术股份有限公司)。细菌基因组提取试剂盒与 PCR 产物纯化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,PCR 扩增用试剂[宝生物工程(大连)有限公司],PCR 扩增用引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],琼脂糖(西班牙 Biowest),21 种抗菌药敏纸片(英国 OXOID)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 毒力基因检测

将副溶血性弧菌分离菌株接种至 LBS 液体培养基中,36 ℃ 振荡培养过夜,离心,收集菌体,采用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA 并保存,采用 PCR 法扩增毒力基因 *tdh* 和 *trh*。PCR 扩增用引物序列见表 1。PCR 反应体系(20 μL)包括:1×缓冲液(含 MgCl<sub>2</sub>)、0.5 mmol/L dNTPs、0.25 μmol/L 正向引物和反向引物、1.0 U rTaq 酶、约 50 ng 基因组 DNA。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 60 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,进行 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。所得扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中检测,并经 PCR 产物纯化试剂盒回收后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,序列通过 BLAST 与 NCBI 数据库中的核酸序列进行比对分析。以标准菌株 CGMCC 1.1615 为 *tdh* 阳性对照,以 ATCC 17802 为 *trh* 阳性对照。

表 1 毒力基因扩增引物信息<sup>[7]</sup>

Table 1 Information of primers for virulence genes		
扩增基因	序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>tdh</i>	F:CCACTACCACTCTCATATGC	251
	R:GGTACTAAATGGCTGACATC	
<i>trh</i>	F:GGCTCAAATGGTTAAGCG	250
	R:CATTTCGGCTCTCATATGC	

#### 1.2.2 药敏试验

采用药敏纸片法,以美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)微生物敏感试验执行标准<sup>[8]</sup>作为药敏试验质控和结果的判定依据,以大肠埃希菌(ATCC 25922)为质控菌株。将菌株接种至 LBS 液体培养基中,36 ℃ 培养过夜,用 0.85% NaCl 溶液稀释至麦氏浓度 0.5,取 0.3 mL 菌悬液涂布于含 0.85% NaCl 的 MHA 平板上,待水分吸收后将药敏纸片贴在琼脂表面,于 36 ℃ 培养 18~24 h,采用菌落/显微多功能分

析仪测量抑菌圈直径。多重耐药(multiple antibiotic resistance, MAR)系数以菌株耐受抗菌药物数量与受试抗菌药物数量的比值表示<sup>[9]</sup>。

### 1.2.3 耐药基因检测

根据药敏试验结果,采用PCR扩增法对MAR菌株的耐药基因进行筛选,筛选的耐药基因、PCR

扩增用引物及退火温度见表2。PCR反应体系及PCR反应条件参考1.2.1。所得扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中检测,并经PCR产物纯化试剂盒回收后,送上海生工生物工程有限公司测序,序列通过BLAST与NCBI数据库中的核酸序列进行比对分析。

表2 耐药基因检测用引物信息

Table 2 Information of primers for antimicrobial resistance genes

编码耐受抗菌药	目的基因	引物序列(5'-3')	片段大小 /bp	退火温度 /℃	参考文献
氨基糖苷类	<i>strA</i>	F: CCTGGTGATAACGGCAATTC R: CCAATCGCAGATAGAAGGC	546	54	[10]
	<i>strB</i>	F: ATCGTCAAGGGATTGAAACC R: GGATCGTAGAACATATTGGC	509		
四环素类	<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	54	[11]
	<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCAATAACACCG	659		
	<i>tetM</i>	F: GTRAYGAACTTTACCGAATC R: ATCGYAGAAGCGGRTAC	633		[12]
	<i>tetQ</i>	F: TTATACTTCCTCCGGCATCG R: ATCGGTTGAGAAATGTCCAC	904		[11]
磺胺类	<i>sul1</i>	F: GTGACGGTGTTCGGCATTCT R: FCCGAGAAGGTGATTGCGCT	779	60	[13]
	<i>sul2</i>	F: CGGCATCGTCAACATAACCT R: TGTGCCGATGAAGTCAGCTC	721		
	<i>sul3</i>	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	880		
氯霉素类	<i>cat I</i>	1: GGTGATATGGGATAGTGTT	349	52	[14]
	<i>cat II</i>	2: GATTGACCTGAATACCTGGAA	567		
	<i>cat III</i>	3: CCATACTCATCCGATATTGA	275		
	<i>cat IV</i>	4: CCGGTAAAGCGAAAATTGTAT	451		
	<i>cat</i> 反向通用引物	R: CCATCACATACTGCATGATG	/		
	<i>floR</i>	F: AATCACGGGCCACGCTGTATC R: CGCCGTCATTCTTACCTTC	215		[15]

注:/表示该引物分别与其他*cat*正向引物1、2、3、4组合

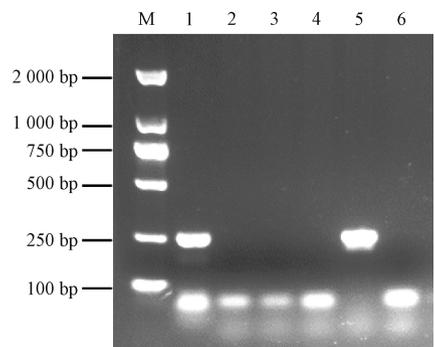
## 2 结果与分析

### 2.1 毒力基因检测

PCR扩增和电泳检测结果显示,140株副溶血性弧菌均未检出*tdh*基因,1株菌检出*trh*基因(电泳结果见图1),*trh*阳性菌株来自山东产地的青蛤样品。

### 2.2 药敏试验

对140株副溶血性弧菌进行21种抗菌药的耐药试验,结果见表3。可以看出,所有菌株对氨苄西林耐药;部分菌株对头孢唑啉和头孢呋辛钠耐药,耐药率分别为36.4%(51/140)和33.6%(47/140);少量菌株耐受其他类抗菌药,包括1株菌耐受链霉素,2株菌耐受阿米卡星,3株菌耐受复方新诺明,3株菌耐受四环素,1株菌耐受氟苯尼考。超过60%菌株对头孢唑啉和头孢呋辛钠中介耐药,39.3%(55/140)菌株对链霉素中介耐药,25.0%



注:M: DL2000;1: Vp2018023;2: Vp20180024;3: Vp2018025;4: Vp2018026;5: ATCC 17802;6: 阴性对照

图1 部分副溶血性弧菌菌株毒力基因*trh*电泳结果

Figure 1 PCR amplification of virulent gene *trh* in some *V. parahaemolyticus* strains

(35/140)和16.4%(23/140)的菌株分别对卡那霉素和呋喃妥因中介耐药。所有菌株对头孢吡肟、庆大霉素、亚胺培南、美罗培南、氧氟沙星和强力霉素

敏感。通过对菌株耐药谱进行统计(见表4),部分菌株耐受2种以上抗菌药,仅有6株菌耐受2类及以上抗菌药,耐药谱分别为AMP-AK、AMP-SXT、AMP-SXT-TE、AMP-KZ-CXM-AK和AMP-S-TE-FFC。

这6株MAR菌均来自产地贝类样品,包括辽宁的菲律宾蛤仔、四角蛤蜊和山东的菲律宾蛤仔、青蛤。所有菌株的MAR系数均小于0.2,其中阳性菌株对氨基苄西林和头孢吡肟耐药。

表3 贝类样品中副溶血性弧菌药敏试验结果( $n=140$ )Table 3 Antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus* strains in shellfish samples

抗菌药	浓度/ $\mu\text{g}$	敏感菌株数	中介菌株数	耐药菌株数	耐药率/%	
氨基糖苷类	氨基苄西林	10	0	0	140	100.0
	阿莫西林/克拉维酸	20/10	131	9	0	0.0
$\beta$ -内酰胺类	头孢唑啉	30	2	87	51	36.4
	头孢吡肟	30	7	86	47	33.6
	头孢曲松	30	134	6	0	0.0
	头孢吡肟	30	140	0	0	0.0
	阿米卡星	30	132	6	2	1.4
氨基糖苷类	链霉素	10	84	55	1	0.7
	庆大霉素	10	140	0	0	0.0
	卡那霉素	30	105	35	0	0.0
碳青霉烯类	亚胺培南	10	140	0	0	0.0
	美罗培南	10	140	0	0	0.0
喹诺酮类	萘啶酸	30	139	1	0	0.0
	环丙沙星	5	131	9	0	0.0
	氧氟沙星	5	140	0	0	0.0
四环素类	四环素	30	137	0	3	2.1
	强力霉素	10	140	0	0	0.0
磺胺类	复方新诺明	25	136	1	3	2.1
氯霉素类	氯霉素	30	139	1	0	0.0
	氟苯尼考	30	139	0	1	0.7
硝基呋喃类	呋喃妥因	300	117	23	0	0.0

表4 贝类样品中副溶血性弧菌耐药谱( $n=140$ )Table 4 Resistance pattern of *V. parahaemolyticus* strains in shellfish samples

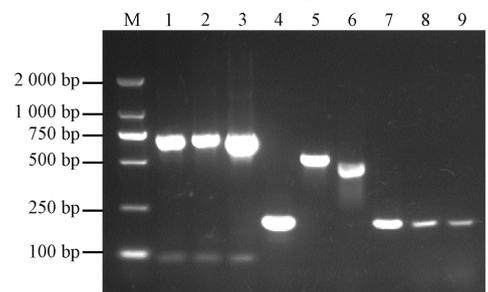
耐药谱	耐药菌株数	占比/%	MAR系数
AMP	67	47.9	0.05
AMP-KZ	21	15.0	0.10
AMP-CXM	17	12.1	0.10
AMP-AK	1	0.7	0.10
AMP-SXT	1	0.7	0.10
AMP-KZ-CXM	29	20.7	0.14
AMP-SXT-TE	2	1.4	0.14
AMP-KZ-CXM-AK	1	0.7	0.19
AMP-S-TE-FFC	1	0.7	0.19

注:AMP:氨基苄西林;KZ:头孢唑啉;CXM:头孢吡肟;AK:阿米卡星;SXT:复方新诺明;TE:四环素;S:链霉素;TE:四环素;FFC:氟苯尼考

### 2.3 耐药基因检测

根据药敏试验结果,选择耐药菌株Vp2018002(耐受链霉素、四环素、氟苯尼考)、Vp2018008(耐受复方新诺明、四环素)、Vp2018039(耐受复方新诺明、四环素)、Vp2018069(耐受复方新诺明)进行氨基糖苷类、四环素类、磺胺类、氯霉素类相关耐药基因的筛选。耐药基因PCR结果如图2所示,耐受不同抗菌药的菌株均扩增出相应的耐药基因,其中Vp2018002含有*strA*、*strB*、*tetA*和*floR*,Vp2018008和

Vp2018039含有*sul2*和*tetA*,Vp2018069含有*sul2*。



注:M:DL2000;1~3:Vp2018008(*sul2*),Vp2018039(*sul2*),Vp2018069(*sul2*);4~6:Vp2018002(*floR*、*strA*、*strB*);7~9:Vp2018002(*tetA*),Vp2018008(*tetA*),Vp2018039(*tetA*)

图2 耐药菌株的耐药基因PCR检测结果

Figure 2 PCR amplification of antimicrobial resistance genes in antimicrobial resistant strains

### 3 讨论

副溶血性弧菌的致病性相关因子有黏附因子、侵袭因子、溶血素、胞外酶、脂多糖、Ⅲ型分泌系统和摄铁系统等。副溶血性弧菌引起的疾病与耐热直接溶血素和耐热直接相关溶血素密切相关,因此普遍认为编码这两种溶血素的*tdh*和*trh*基因是最主要的毒力基因<sup>[16]</sup>。本研究测定了140株副溶血

性弧菌的 *tdh* 和 *trh* 基因,结果显示,所有的菌株都不含有 *tdh*,只有 1 株菌含有 *trh*,*trh* 阳性菌株来自山东产地的青蛤样品。以往的研究表明,环境或食品中分离的副溶血性弧菌大多为非致病菌株,即不含有 *tdh* 和 *trh* 基因,而临床上分离菌株大多含有 *tdh* 基因,含 *trh* 基因的菌株相对较少,因此 *tdh* 阳性菌株与流行病学相关<sup>[16]</sup>。前期对贝类样品分离的 *tdh* 和 *trh* 阳性菌株进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST),其中 *tdh* 阳性菌株为流行的序列型 ST3,而 *trh* 的序列型多样、与流行病学无关,也证实了这一点<sup>[17]</sup>。至于 *trh* 阳性菌株的致病性如何,有待进一步的试验验证。尽管环境或食品中分离的菌株大多不含有 *tdh* 和 *trh* 基因,但仍不容忽视,因为有研究发现 *tdh* 和 *trh* 阴性菌株也具有潜在毒力,能导致实验动物的死亡<sup>[16]</sup>。

本研究测定了 140 株副溶血性弧菌对 21 种抗菌药,包括  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、碳青霉索类、喹诺酮类、四环素类、磺胺类、氯霉素类和硝基咪唑类药物的耐药性。测定的所有菌株对氨苄西林具有强耐药性,与以往的结果<sup>[18-20]</sup>基本相符,表明大部分副溶血性弧菌耐受氨苄西林。但也有报道显示,一些临床分离的菌株对氨苄西林的耐药率较低<sup>[21]</sup>,表明不同来源的菌株对氨苄西林的耐药性呈现差异性。本研究中,副溶血性弧菌对第一代头孢(头孢唑啉)和第二代头孢类(头孢呋辛钠)抗菌药耐药率较高,对第一代头孢(头孢唑啉)、第二代头孢类(头孢呋辛钠)、链霉素、卡那霉素和呋喃妥因的中介耐药率较高,而对一些新型的药物或使用时间较短的药物则呈现较高的敏感率,例如所有菌株对第四代头孢类的头孢吡肟和碳青霉烯类敏感,对四环素耐药的菌株却对强力霉素敏感。分析近 5 年来不同地区不同水产品中副溶血性弧菌的耐药情况可以看出,水产来源的副溶血性弧菌对  $\beta$ -内酰胺类中的氨苄西林、阿莫西林、第一代头孢类耐药率较高,超过 50%;对链霉素、卡那霉素、阿米卡星等氨基糖苷类耐药率也较高,一般在 10%~50%;对四环素类、磺胺类、氯霉素类等药物的耐药率一般低于 10%;而对喹诺酮类和碳青霉索类则高度敏感,有的敏感率为 100%<sup>[2,22-23]</sup>。结合本研究结果看,对一些应用时间较长的药物,副溶血性弧菌的耐药率较高,表明细菌在药物的长期胁迫下产生了耐药性。不同来源样品分离的菌株耐药率有所不同,可能是水产品的产地环境及养殖模式不同造成。本研究测定菌株分离自贝类,由于贝类尤其是双壳贝类的养殖环境为开放式,在养殖过程中一般不使用药物,因此菌株的耐药程度较低,与文献<sup>[23]</sup>报道的

耐药程度接近。

MAR 系数是由 KRUMPERMAN<sup>[9]</sup>首次提出,用于反映环境受抗菌药污染的程度及评价其对人类健康的风险,通常认为, MAR 系数大于 0.2 即表明产品受到较高等度的污染和对人类健康有较大的风险。目前 MAR 系数已用于评价肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、沙门菌(*Salmonella*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)等临床、环境及产品致病菌或指示菌的多重耐药性<sup>[24-26]</sup>,但在贝类产品相关食源性致病菌的多重耐药性和食用安全评价中的应用则较少。本研究中,所有测试菌株的 MAR 系数均小于 0.2,表明用于分离菌株的贝类产品受到抗菌药污染的程度较低、对人类健康的风险较小。在测定的 140 株副溶血性弧菌中,耐受 2 类及以上抗菌药的 MAR 菌株数量较少,6 株 MAR 菌株均来自产地样品,包括辽宁的菲律宾蛤仔、四角蛤蜊和山东的菲律宾蛤仔、青蛤。产地贝类样品分离菌株的耐药程度高于市售样品分离菌株,与研究报道的市售贝类中副溶血性弧菌 MAR 菌株较少的结论基本一致<sup>[19,27-28]</sup>。原因可能是养殖环境的污染或养殖过程使用抗菌药造成菌株耐药性的产生,而市售样品经过净化或者存放了一段时间,可能会使细菌的 MAR 程度较低。2015—2016 年产地贝类分离的菌株中,39 株菌耐受 2 类及以上抗菌药,16 株菌的 MAR 系数大于 0.2<sup>[18]</sup>,与之对比,2018 年产地贝类分离菌株的 MAR 程度较轻,可能是由于养殖环境不同造成。

细菌耐药性的产生主要是由于灭活酶或钝化酶作用、外排泵作用、结合位点改变、基因突变等<sup>[29]</sup>,副溶血性弧菌中相继发现多种耐药基因和耐药机制<sup>[30]</sup>。为了探讨耐药菌株的耐药分子机制,对耐受链霉素、四环素、复方新诺明和氟苯尼考的菌株进行相应耐药基因的筛选,结果均扩增出了耐受药物对应的耐药基因,且对于耐受同种抗菌药的不同菌株携带的耐药基因相同,表明耐药机制相同。通过这些耐药基因编码产物可以看出,菌株对链霉素的耐药机制主要通过 *strA* 和 *strB* 基因编码产生的氨基糖苷磷酸转移酶的灭活或钝化作用引起,对四环素的耐药机制主要由 *tetA* 基因编码产生的外排泵作用引起,对复方新诺明的耐药机制是由 *sul2* 基因编码产生的二氢蝶酸合酶 II 引起,对氟苯尼考的耐药机制则是由 *floR* 基因编码产生的外排泵作用引起。细菌对药物的耐药基因可能有多种,例如四环素耐药基因就有 10 多种,本研究仅对常见的耐药基因进行筛选,菌株中也可能还存在其他的耐药基因和耐药机制,需要

经过进一步挖掘确证。

综上所述,2018年从产地和市售贝类样品分离的140株副溶血性弧菌中检出1株阳性菌株,6株菌耐受2类及以上的抗菌药。虽然菌株耐药程度相比往年有所下降,但仍不能忽视,这些MAR菌株及其携带的耐药基因可能会在环境中传播,对产品食用安全和人类健康具有潜在的危害。本研究既是对我国贝类中副溶血性弧菌致病性及耐药性的连续监测,同时也丰富了副溶血性弧菌菌株库,为进一步研究副溶血性弧菌的致病和耐药机制提供菌株来源,也为进一步研究海产品中副溶血性弧菌的防控技术、防范致病菌株和耐药菌株的传播及食源性疾病的暴发奠定基础。

## 参考文献

- [ 1 ] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2019年中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2019.
- [ 2 ] YU Q Q, NIU M Y, YU M Q, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai[J]. Food Control, 2016, 60(8): 263-268.
- [ 3 ] FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: interpretative summary and technical report. Microbiological risk assessment series No. 16[S]. Rome: FAO/WHO, 2011: 5-6.
- [ 4 ] 付萍,王连森,陈江,等. 2015年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64-70.
- [ 5 ] 张德福,安慧,张健,等. 副溶血弧菌耐药及其机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 311-317, 324.
- [ 6 ] 江艳华,姚琳,李凤铃,等. 副溶血性弧菌的耐药状况及耐药机制研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 96-102.
- [ 7 ] TADA J, OHASHI T, NISHIMURA N, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction [J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(6): 477-487.
- [ 8 ] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved standard (M45-A) [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [ 9 ] KRUMPERMAN P H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(1): 165-170.
- [ 10 ] BOERLIN P, TRAVIS R, GYLES C L, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6753-6761.
- [ 11 ] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209-215.
- [ 12 ] GUARDABASSI L, DIJKSHOORN L, COLLARD J M, et al. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains [J]. Journal of Medical Microbiology, 2000, 49(10): 929-936.
- [ 13 ] GRAVES A K, LIWIMBI L, ISRAEL D W, et al. Distribution of ten antibiotic resistance genes in *E. coli* isolates from swine manure, lagoon effluent and soil collected from a lagoon waste application field [J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(2): 131-137.
- [ 14 ] YOO M H, HUH M D, KIM E H, et al. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments [J]. Aquaculture, 2003, 217(1/4): 11-21.
- [ 15 ] FERNÁNDEZ-ALARCÓN C, MIRANDA C D, SINGER R S, et al. Detection of the *floR* gene in a diversity of florfenicol resistant gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile [J]. Zoonoses Public Health, 2010, 57(3): 181-188.
- [ 16 ] 张德福,付绪磊,张明,等. 副溶血性弧菌毒力因子及致病机理的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 216-222.
- [ 17 ] JIANG Y H, CHU Y B, XIE G S, et al. Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290(10): 116-124.
- [ 18 ] 李欢,张昭寰,汤荣,等. 食品与临床分离的致病性副溶血性弧菌耐药性比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(11): 1006-1012.
- [ 19 ] 江艳华,初钰博,王联珠,等. 黄渤海区鲜活贝类中副溶血性弧菌的毒力基因及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(7): 769-773.
- [ 20 ] 江艳华,姚琳,李君,等. 养殖海水贝类中副溶血性弧菌的致病性及耐药性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3474-3479.
- [ 21 ] 季霄雷,许海燕,苏婧,等. 82株副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(1): 37-40.
- [ 22 ] 白瑶,赵洋洋,叶淑瑶,等. 中国水产品中副溶血性弧菌耐药性及遗传特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(3): 229-234.
- [ 23 ] 尤祯丹,蒋玉涵,陈传君,等. 成都市海产品中副溶血性弧菌耐药特征及多位点序列分型[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 15-19.
- [ 24 ] UMAR U, ANAGOR S, ALIYU A, et al. Hypermucoviscosity in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* correlates with high multiple antibiotic resistance (MAR) index [J]. Open Journal of Medical Microbiology, 2016, 6: 97-103.
- [ 25 ] WANG H H, YE K P, WEI X R, et al. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China [J]. Food Control, 2013, 33(2): 378-384.
- [ 26 ] ADENAIKE O, OLONITOLA O S, AMEH J B, et al. Multidrug resistance and multiple antibiotic resistance index of *Escherichia*

- coli* strains isolated from retailed smoked fish [J]. *Journal of Natural Sciences Research*, 2016, 6(9): 7-10.
- [27] 张致一, 刘军, 董杰, 等. 天津市市售贝类水产品中副溶血性弧菌污染和耐药状况的调查 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(14): 2413-2415.
- [28] 李平, 黄涵, 钟汶兵. 海口市市售贝类海产品副溶血性弧菌污染调查及耐药和毒力基因研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 366-370.
- [29] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 微生物耐药的基础与临床 (第2版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- [30] 郑林, 祝令伟, 郭学军, 等. 副溶血性弧菌耐药基因的研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(6): 80-85.

## 研究报告

# 牡蛎精氨酸激酶稳定性及同源性分析

赵晓涵, 刘文颖, 方磊, 谷瑞增, 凌空, 李国明, 鲁军

(中国食品发酵工业研究院, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

**摘要:**目的 鉴定从牡蛎中提取的天然蛋白精氨酸激酶(arginine kinase, AK), 并了解其基本性质及同源性。方法 利用硫酸铵盐析、阴离子交换从牡蛎中分离纯化出蛋白, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和圆二色(CD)光谱确定相对分子质量和二级结构, 并研究其稳定性; 用生物信息学软件对牡蛎 AK 和其他 11 种甲壳类、软体类动物过敏原的 AK 氨基酸序列进行比对, 分析它们之间的同源性。结果 分离纯化得到的相对分子量为 40 kDa 的天然蛋白为牡蛎 AK, AK 既不耐热也不耐强酸。牡蛎 AK 与软体类动物过敏原 AK 氨基酸序列的同源性较高, 与甲壳类动物氨基酸序列的同源性在 55%~60% 之间。结论 从牡蛎中提取得到天然 AK, 基本了解牡蛎 AK 的稳定性和同源性, 并为牡蛎 AK 致敏性和致敏机制的全面研究打下基础。

**关键词:**精氨酸激酶; 提取纯化; 稳定性; 圆二色光谱; 过敏原

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)04-0370-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.004

## Study on stability and homology analysis of arginine kinase from oyster

ZHAO Xiaohan, LIU Wenying, FANG Lei, GU Ruizeng, LING Kong, LI Guoming, LU Jun  
(China National Research Institute of Food & Fermentation Industry, Beijing Engineering  
Research Center of Protein and Functional Peptides, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To identify the natural protein arginine kinase (AK) extracted from oysters, and to understand its basic properties and homology. **Methods** AK was isolated and purified from oysters by ammonium sulfate salting out and anion exchange, and the relative molecular mass and secondary structure were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and circular dichroism (CD) spectroscopy. Its stability was also studied. The amino acid sequences of oyster AK and 11 other crustacean and mollusk allergens were compared by bioinformatics software, and their homology was analyzed. **Results** The natural protein with a relative molecular weight of 40 kDa was oyster AK. AK was neither heat-resistant nor acid-resistant. Oyster AK has high homology of mollusk allergen AK amino acid sequence, and homology of crustacean amino acid sequence is 55%-60%. **Conclusion** Natural AK is extracted from oysters, and the stability and homology are basically understood. It will lay the foundation for comprehensive research on sensitization and sensitization mechanism of oysters.

**Key words:** Arginine kinase; extraction and purification; stability; circular dichroism; allergen

随着人们生活水平的提高和全球化进程的加

快, 食物过敏已成为日益严重的世界性公共卫生问题之一, 患病率迅速增长。海鲜过敏是一种严重的食物过敏, 尤其是在饮食中常见海鲜的沿海地区和海鲜加工工厂中发生<sup>[1]</sup>。接触海鲜后立即发生的过敏反应主要是 IgE 介导的 I 型超敏反应, 其特征是胃肠道疾病以及皮肤性荨麻疹、血管性水肿、喉咙发痒, 有时甚至会危及生命<sup>[2]</sup>。食物过敏原是指能引起免疫反应的食物抗原分子, 水产

收稿日期: 2020-05-05

基金项目: 中国食品发酵工业研究院强院工程培育专项(院强院 20-功能肽-505); 国家自然科学基金项目(31671963)

作者简介: 赵晓涵 女 研究生 研究方向为功能食品与食品过敏原 E-mail: zhx08240026@163.com

通信作者: 李国明 男 高级工程师 研究方向为功能食品与生物技术 E-mail: gml\_1002@163.com