

• 临床检验研究论著 •

珠海地区海产品中创伤弧菌污染状况和药敏分析*

曹敏华, 邝琳, 黄琳, 许文
(珠海市人民医院检验科, 广东珠海 519000)

摘要:目的 了解珠海地区海产品创伤弧菌污染状况和耐药情况,对创伤弧菌的进一步研究和临床用药提供依据。方法 从珠海地区的海产品批发市场、集贸市场和超市共采集 89 份样本,采用美国食品药品监督管理局(FDA)公布的方法进行创伤弧菌的定性检测,用 ATB 细菌鉴定仪进行鉴定和药敏试验。结果 在 89 份海产品中,39 份检出创伤弧菌,总阳性率为 43.82%。其中牡蛎中检出率高达 60.87%(28/46),其次为海鱼 39.13%(9/23)、海虾 20.00%(2/10)。药敏试验显示,该菌对头孢菌素类和氨基糖苷类药物有耐药株。结论 珠海地区海产品的创伤弧菌污染情况不容忽视,应加强对海产品中创伤弧菌的监测和耐药分析,有效预防创伤弧菌的暴发流行。

关键词:创伤弧菌; 药敏试验; 抗药性; 微生物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-2011-03

Vibrio vulnificus pollution condition in marine products in Zhuhai region and drug susceptibility analysis*

Cao Minhua, Kuang Lin, Huang Lin, Xu Wen

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal People's Hospital, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: Objective To understand the vibrio vulnificus pollution condition in marine products in Zhuhai region and the drug resistance situation to provide the basis for further study of vibrio vulnificus and clinical medication. **Methods** 89 samples were collected from the marine products wholesale market, pedlars' market and supermarkets in Zhuhai region and the method published by the US Food and Drug Administration (FDA) was adopted to perform the qualitative detection of vibrio vulnificus. The identification of bacteria and the drug sensitivity test were performed by using the ATB instrument. **Results** In 89 samples of marine products, vibrio vulnificus was detected in 39 samples, the total positive rate was 43.82%. The detection rate of oyster was as high as 60.87%(28/46), followed by marine fish (39.13%, 9/23) and marine shrimp (20.00%, 2/10). The drug sensitive test showed that vibrio vulnificus had the resistant strains to cephalosporins and aminoglycoside drugs. **Conclusion** The seafood vibrio vulnificus pollution in Zhuhai region can not be ignored. The monitoring of vibrio vulnificus in the marine products and the drug resistance analysis should be strengthened for effectively preventing the outbreak of vibrio vulnificus.

Key words: *Vibrio vulnificus*; drug sensitive test; drug resistance, microbial

创伤弧菌,1976 年首次被美国疾病预防控制中心(CDC)鉴定并命名,是一种嗜盐的革兰阴性杆菌,隶属弧菌属。研究表明,海水、牡蛎等贝壳类动物是创伤弧菌感染性疾病的主要媒介^[1]。2006 年 8 月“Emerging infectious diseases”杂志将创伤弧菌列入最危险的细菌之列^[2]。至 2007 年底,中国大陆共报道了 56 例创伤弧菌感染病例,其中死亡 33 例(占 58.9%),在 23 例痊愈者中有 5 例患者被截肢^[3-4],是一种极具致命性及致残性的疾病,已引起卫生行政管理部门及国内学者的高度重视。中国东南沿海是创伤弧菌自然生长的栖息地,随着社会经济和交通的发展、沿海旅游人数的增多及新鲜海产品的远距离销售,内陆地区的创伤弧菌感染率也呈逐年上升趋势。鉴于珠海是发生创伤弧菌感染高风险地区,本研究分别采集海产品批发市场、集贸市场和超市上出售的海产品进行系统的培养、鉴定、药敏分析有效控制感染源头,预防创伤弧菌感染的爆发流行。

1 材料与方法

1.1 样品 采集珠海地区海产品批发市场、集贸市场和超市上出售的海产品,品种以牡蛎为主,还采集海鱼、海虾、海蟹。

1.2 仪器与试剂 相关培养基购于青岛海博生物技术有限公司,ATB 细菌鉴定和药敏试剂为法国梅里埃公司产品。

1.3 方法

1.3.1 样品采集 现场采集完整个体,置 4℃保存,3~8 h 内送实验室检测。

1.3.2 创伤弧菌分离培养 取 25 g 样品加入 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水,36℃增菌 12~16 h 转种改良纤维二糖-多黏菌素 B-多黏菌素 E(mCPC)琼脂 36℃培养 18~24 h 挑取可疑菌落,接种 3%氯化钠胰蛋白胨大豆(TSA)琼脂,36℃纯培养 18~24 h。

1.3.3 生化试验 经细菌形状、革兰染色、氧化酶检测、嗜盐性实验和氯化钠三糖铁琼脂(TSI)实验后,再采用法国梅里埃生物公司革兰阴性菌鉴定卡鉴定。

1.3.4 药敏试验 (1)菌液制备。取一个或多个纯培养菌落,加入到一支无菌的 3 mL 0.85% NaCl 生理盐水中,制备成 0.5 个麦氏单位浊度的菌悬液。(2)加样。取菌悬液 10 μL,加入到 ATB Medium 中,用 ATB 电子加样枪混匀后,以每孔 135 μL 的量加置 ATB G-5 试剂条中,置 37℃培养 18~24 h。(3)药敏结果采用 ATB 鉴定仪自动判读。共检测 21 种药物,同时提供最低抑菌浓度(MIC)值。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922,购于卫生部临床中心。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

* 基金项目:珠海市卫生局医学科研发资助项目(2014066)。 作者简介:曹敏华,女,主管技师,主要从事临床微生物研究。

2 结 果

2.1 创伤弧菌的污染率 在 89 份海产品中,39 份检出创伤弧菌,总阳性率为 43.82%。其中牡蛎中检出率高达 60.87% (28/46),其次为海鱼 39.13% (9/23)、海虾 20.00% (2/10)。见表 1。

表 1 各类海产品中创伤弧菌的污染率			
样品种类	样品数量(<i>n</i>)	检出数量(<i>n</i>)	检出率(%)
牡蛎	46	28	60.87
海鱼	23	9	39.13
海虾	10	2	20.00
海蟹	10	0	0.00
合计	89	39	43.82

2.2 牡蛎在不同月份创伤弧菌的污染情况 在不同月份月份采集的 46 份牡蛎,创伤弧菌的污染率在 4~6 月最高,为 85.71%。不同月份之间的污染率比较差异有统计学意义($\chi^2=11.9,P<0.01$)。见表 2。

表 2 不同月份牡蛎中创伤弧菌的污染率			
月份	检测数量(<i>n</i>)	检出数量(<i>n</i>)	污染率(%)
1~3	10	3	30.00
4~6	14	12	85.71*
7~9	13	10	76.92*
10~12	9	3	33.33*
合计	46	28	60.87

*: $P<0.01$,与 1~3 月污染率比较。

表 3 39 株创伤弧菌的药敏试验结果[<i>n</i> (%)]			
抗菌药物	敏感	中介	耐药
阿米卡星	36(92.31)	0(0.00)	3(7.69)
环丙沙星	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
奈替米星	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
庆大霉素	38(97.44)	0(0.00)	1(2.56)
妥布霉素	34(87.18)	0(0.00)	5(12.82)
亚胺培南	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
美罗培南	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
阿莫西林	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
哌拉西林	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
替卡西林	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢他啶	38(97.44)	0(0.00)	1(2.56)
头孢西丁	38(97.44)	0(0.00)	1(2.56)
头孢吡肟	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢呋辛	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢噻吩	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢噻肟	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢他啶	38(97.44)	0(0.00)	1(2.56)
阿莫西林/克拉维酸	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
哌拉西林/他唑巴坦	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
替卡西林/克拉维酸	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
复方磺胺甲噁唑	39(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

2.3 创伤弧菌体外药物敏感性 39 株创伤弧菌的药敏试验结果显示,共有 10 株耐药菌株。17 种常用抗菌药物 100.00% 敏感,其中阿米卡星的耐药率为 7.69%,妥布霉素的耐药率为 12.82%,庆大霉素、头孢西丁和头孢他啶的耐药率均为 2.56%。见表 3。

3 讨 论

创伤弧菌为海洋环境中正常的微植物丛,由于嗜盐性,自然存在于海水和海生物中,经常能从这些地区可食的牡蛎中分离出,已有研究表明,海水和牡蛎等贝壳类动物是创伤弧菌感染性疾病的主要媒介^[5]。沿海城市的创伤弧菌脓毒症病例,均分布于靠近海边的城镇。创伤弧菌脓毒症发病还具有明显的季节性,多出现在 3~11 月,夏季(海面水温在 23~29℃)是发病高峰。这一趋势与贝壳类海洋生物中生长的创伤弧菌数量平行。

Yano 等^[6]报道显示,我国零售海产品创伤弧菌污染率为 33%,东南沿海海产品创伤弧菌污染率约为 20%,舟山市售牡蛎中创伤弧菌的污染率为 50%^[7-8]。本次研究结果显示,珠海地区海产品创伤弧菌的污染率为 43.82%,其中牡蛎中检出率高达 60.87% (28/46),其次为海鱼 39.13% (9/23)、海虾 20.00% (2/10)。海蟹样品未检出创伤弧菌。创伤弧菌的污染率明显高于全国水平,尤其以牡蛎的污染最为严重。牡蛎是一种滤食性动物,容易在体内富集环境中的致病菌,能有效浓缩海水中的创伤弧菌,这可能是牡蛎污染率最高的主要原因。

1~3 月珠海的年均气温最低,4~9 月气温均在 20℃ 以上,10~12 月温度稍低。本研究结果显示,创伤弧菌的污染率有明显的季节性变化,以 4~6 月最高,1~3 月最低。与日本 Nakafusa 等^[9]和卢中秋等^[10]报道的结果相一致。

39 株创伤弧菌的药敏试验结果显示,该菌对头孢菌素类和氨基糖苷类抗菌药物有不同程度的耐药。有报道对从卵形鲳鲹“腐皮病”中分离的创伤弧菌药敏试验,结果显示该菌对青霉素类、头孢菌素类和磺胺类抗菌药物耐药。从患者身上分离的创伤弧菌药敏结果显示对头孢菌素类、氨基糖苷类和β-内酰胺类抗菌药物耐药^[11-12]。资料显示水产品 and 人身上分离的创伤弧菌耐药性相似。

我国水产养殖业滥用抗菌药物的现象日益严重,不仅导致了食品安全问题,还可能诱导病原菌产生耐药机制。长期服用含抗菌药物的食品,可以引起体内微生物菌群失调,破坏微生态平衡。对于感染高风险地区,采集海产品进行系统的培养、鉴定、药敏分析是很有必要的,也为创伤弧菌的后续研究提供依据。相关部门应引起重视,从感染源头抓起,有效预防创伤弧菌感染的暴发流行。

参考文献

[1] Wright AC, Simpson LM, Oliver JD, et al. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnifiem* [J]. Infect Immun, 1990, 58(6): 1769-1773.

[2] Chung PH, Chuang SK, Tsang T, et al. Cutaneous injury and vibrio vulnificus infection [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8): 1302-1303.

[3] 卢中秋,李秉熙,黄唯佳,等. 创伤弧菌败血症的临床和流行病学特点[J]. 中国急救医学, 2003, 23(7): 470-471.

[4] 高仲雷. 原发性创伤弧菌败血症 19 例分析[J]. 浙江临床医学, 2004, 6(2): 135-136.

[5] Jackson JK, Murphree RL, Tamplin ML. Evidence that mortality from *Vibrio vulnicus* infection results from single(下转第 2015 页)

续表 3 30 株大肠埃希菌株耐药率比较(%)

抗菌药物	A 型(n=17)			B2 型(n=13)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
美罗培南	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
阿莫西林+克拉维酸	50.0	35.1	14.9	8.8	10.0	81.2*
头孢噻肟/3 代	50.0	5.9	44.1	5.9	2.9	91.2*
阿米卡星	74.4	10.2	15.4	10.3	10.6	79.1*
复方磺胺甲噁唑	35.9	10.3	53.8	7.7	2.6	89.7
亚胺培南	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

* :P<0.05,与 A 型耐药比较。

3 讨 论

ICU 患者由于疾病本身或长期使用抗菌药物,导致机体免疫系统功能低下,容易受到病原微生物的侵袭,临床治疗难度大,特别侵入性的医疗行为更是增加引起血液方面感染的风险,是引起死亡的重要原因,在 ICU 患者常见感染的革兰阴性杆菌中,大肠埃希菌是最常见致病菌之一,主要有产生灭活抗菌药物的酶、改变药物的作用靶位、减少药物的摄取吸收及最新发现的质粒介导的耐药性等[3]。在众多的耐药机制中,以 β-内酰胺类抗菌药物耐药为主,其主要机制是通过产 β-内酰胺酶对该类抗菌药物产生水解作用,使产酶在 β-内酰胺类抗菌药物存在的条件下不能生存[4]。随着临床对抗菌药物的广泛使用,各个地区出现不同程度的耐药情况,特别是不同基因型的大肠埃希菌的多重耐药情况并不一样[5]。了解本院大肠埃希菌的多重耐药情况对临床抗菌药物的使用有指导意义,因此对本院 ICU 分离的 30 株阿莫西林耐药大肠埃希菌进行耐药分析及基因分型。

分析结果显示,检出的 17 株 A 型大肠埃希菌对阿莫西林、头孢噻吩、庆大霉素、替卡西林、哌拉西林的耐药率达 70% 以上,对头孢西丁、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林+克拉维酸、阿米卡星等药物的敏感性高。13 株 B2 型大肠埃希菌对阿莫西林、头孢呋辛、哌拉西林、替卡西林的耐药率均达 90% 以上,对其他抗菌药物的耐药率普遍高,与文献相符[6]。检出的大肠埃希菌均未发现对亚胺培南及美罗培南耐药。在检出的 13 株致病性较强的 B2 型大肠埃希菌主要分布于血液,其引起的血液感染常常病情较重,治疗也较为困难,应该引起临床的足够重视。目前引起这种情况的是患者血液中复杂的抗菌药物种类及浓度使大肠埃希菌基因更容易发生突变,还是 ICU 病区 B2 型的大肠埃希菌通过侵入性医疗行为引起患者菌血症,需要进一步的调查研究。

大肠埃希菌出现多重耐药的表現不止是多种耐药机制共同作用的结果,更与细菌染色体基因发生突变,耐药基因水平

传播有着重要的联系[7-10],不同基因型的大肠埃希菌的泛耐药和多重耐药的情况不一致,给临床控制感染造成困难,因此为医生提供 ICU 患者感染多重耐药的大肠埃希菌的基因分型信息,能提供更加有价值的参考意见,避免抗菌药物的滥用,降低治疗经济成本,同时更加有效地控制感染。

参考文献

[1] Oxacelay C, Ergani A, Naas T, et al. Rapid detection of CTX-M-producing Enterobacteriaceae in urine samples[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(5): 986-989.

[2] Mine Y, Kovacs NJ. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infections disease[J]. J Med Food, 2002, 5(3): 159-169.

[3] 赵庆东. 大肠埃希菌耐药机制研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2010, 31(4): 191-192.

[4] 钮博, 王卫国, 王敏, 等. 320 株大肠埃希菌对常用抗生素耐药性分析[J]. 中国医药, 2008, 3(2): 96-97.

[5] 李彬, 黄心宏, 傅蕾, 等. 多重耐药大肠埃希菌基因分型及其耐药表型的关系[J]. 福建大学学报, 2010, 44(1): 59-61.

[6] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4555-4558.

[7] 冯美菊, 张燕, 罗予. 多药耐药肠杆菌科细菌产超广谱 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(12): 1651-1653.

[8] 李林, 赖小美, 郭有能, 等. 大肠埃希菌的耐药特点与产超广谱 β-内酰胺酶基因型分布[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(15): 3206-3208.

[9] 刘素玲, 侯铁英, 陈柳勤, 等. 大肠埃希菌表型及耐药趋势分析[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(7): 553-555.

[10] 何晓峰, 刘金禄, 邵端芳, 等. 产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌感染及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1239-1241.

(收稿日期: 2014-02-12)

(上接第 2012 页)

strains among heterogeneous populations in shellfish[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(8): 2098-2101.

[6] Yano Y, Yokoyama M, Satomi M, et al. Occurrence of Vibrio vulnificus in fish and shellfish available from markets in China[J]. J Food Prot, 2004, 67(8): 1617-1623.

[7] 陈艳, 梅玲玲, 李秀桂, 等. 东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(4): 344-347.

[8] 潘军航, 梅玲玲, 朱敏, 等. 舟山市售牡蛎中创伤弧菌污染的定量分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2760-2761, 2819.

[9] Nakafusa J, Misago N, Miura Y, et al. The importance of serum

creatinine phosphokinase level in the early diagnosis, and as a prognostic factor, of Vibrio vulnificus infection[J]. Br J Dermatol, 2001, 145(2): 280-284.

[10] 卢中秋, 邹长林, 李秉煦, 等. 12 例创伤弧菌败血症的流行病学特点[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 900.

[11] 赵典惠, 孙际佳, 王海芳, 等. 创伤弧菌的药物敏感性[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12): 1207-1211.

[12] 王志刚, 邵平扬, 吴晓燕. 创伤弧菌的培养鉴定及其对抗菌药物的敏感性[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(5): 293-296.

(收稿日期: 2014-03-06)