

副溶血弧菌养殖对虾分离株耐药性及耐药基因分析

魏文娟^{1,2}, 赵 姝², 王 元², 周俊芳², 李新苍², 房文红²

(1. 上海海洋大学/水产科学国家级实验教学示范中心/国家水生动物病原库, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所/农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090)

摘要: 文章采用琼脂稀释法检测从养殖患病对虾中分离的 36 株副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 对 16 种药物的耐药性, 并用 PCR 法检测喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 和 *qnrVC*, 酰胺醇类耐药基因 *cat*、*optrA*、*floR* 和 *cfr*, 四环霉素类耐药基因 *tetA*、*tetB* 和 *tetM*, 磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3*, 氨基糖苷类耐药基因 *strA*、*strB*、*aadA* 和 *aacA*, 利福霉素类耐药基因 *arr*, β -内酰胺类耐药基因 *bla_{CARB}* 和大环内酯类耐药基因 *erm* 的携带状况, 分析其耐药表型和基因型之间的相关性。结果显示, 36 株副溶血弧菌对 β -内酰胺类药物氨苄西林耐药率最高 (88.9%), 其次为磺胺类药物磺胺甲噁唑 (66.7%), 硫酸新霉素、庆大霉素、头孢曲松和美罗培南呈现 100% 敏感。多重耐药副溶血弧菌比例高达 61.1% (22/36), 其中 1 株对 6 类抗菌药耐药。喹诺酮类耐药基因 *qnrVC* 检出率最高达 72.2% (26/36); 其次为氨基糖苷类耐药基因 *strB*, 检出率 58.3% (21/36); 大环内酯类、利福霉素类耐药基因均未检测到。耐药基因检出率与耐药表型没有表现出一一对应的关系, 提示副溶血弧菌耐药的复杂性。

关键词: 副溶血弧菌; 耐药性; 琼脂稀释法; 多重耐药; 耐药基因

中图分类号: S 948

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Detection of antibiotics resistance and distribution of resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* from cultured shrimp

WEI Wenjuan^{1,2}, ZHAO Shu², WANG Yuan², ZHOU Junfang², LI Xincang², FANG Wenhong²

(1. Shanghai Ocean University/National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education/National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Development and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China)

Abstract: We used agar dilution method to detect the resistance of 36 strains of *Vibrio parahaemolyticus* to 16 drugs. And used PCR amplification and DNA sequencing to detect the antimicrobial resistance to quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrVC*), phenicol (*cat*, *optrA*, *floR*, *cfr*), tetracyclines (*tetA*, *tetB*, *tetM*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*, *sul3*), aminoglycosides (*strA*, *strB*, *aadA*, *aacA*), rifampicin (*arr*), β -lactams (*carB*) and macrolides (*erm*). The results indicate that the isolates exhibited high resistance to ampicillin (88.9%) and sulfamethoxazole (SMZ, 66.7%), all susceptible to neomycin sulfate, gentamicin, ceftriaxone and meropenem. In general, multi-drug resistance (MDR) was highly prevalent (61.1%), and one isolate was resistant to six antimicrobials. Furthermore, 72.2% and 58.3% of the isolates were primarily mediated by *qnrVC* and *strB*, respectively; and the macrolides and rifampicin resist-

收稿日期: 2019-08-22; 修回日期: 2019-11-22

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费项目 (2017HY-ZD1006); 上海市科委科研项目 (17391902400)

作者简介: 魏文娟 (1994—), 女, 硕士研究生, 从事水生细菌耐药研究。E-mail: wwj07067@126.com

通信作者: 房文红 (1968—), 男, 博士, 研究员, 从事水产动物药理学与病害防治研究。E-mail: fwenhong@163.com

ant genes were not detected in all the isolates. Obvious mismatch was found between the antimicrobial resistance phenotypes and genotypes, revealing the complexity of resistance to *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Antibiotics resistance; Agar dilution method; Multi-antibiotic resistance; Resistance genes

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰阴性菌, 具有嗜盐性, 常存在于河海交汇处、沿海地区及海底和海产品中^[1-2]。副溶血性弧菌作为一种重要的人、畜、渔共患病原菌, 已成为全世界重要的公共卫生问题, 既能引起食源性中毒和急性腹泻^[3], 同时也是海水养殖重要的条件致病菌, 给水产养殖业造成重大经济损失^[4]。为了预防及治疗弧菌病, 一些抗生素被应用于水产养殖此类疾病的防治, 但滥用抗菌药物导致副溶血弧菌产生耐药性, 不仅增大了海水养殖中弧菌病的防控难度, 而且给水产动物源食品的质量安全和生态安全带来隐患^[5-6]。抗菌药的长期使用导致耐药菌大量出现的同时, 也加速了多重耐药 (Multi-drug resistance, MDR) 细菌的产生, 及其耐药基因的扩散和通过接合性转移在细菌间传播的风险^[7]。对副溶血弧菌耐药性研究的报道主要集中在沿海地区, 不同地区副溶血弧菌的耐药程度存在差别^[8]。据报道, 副溶血弧菌对阿莫西林、磺胺甲噁唑、氨苄西林、青霉素、利福平、万古霉素等耐药, 有些在水环境中分离的副溶血弧菌对不属于水产养殖中的常用药的红霉素产生了抗药性。并且各地区分离株均存在不同程度的多重耐药性^[9-12]。甚至在一些研究中发现的副溶血弧菌对氯霉素产生了抗药性, 而氯霉素已被禁用多年, 这将影响临床治疗, 对人类健康构成重大威胁^[13]; 我国研究者也对分离自水产养殖中、水产品不同病症的医院病人的副溶血弧菌耐药性进行了报道^[14-17], 分离菌普遍对氨苄西林耐药, 部分菌株对氟苯尼考、链霉素、头孢曲松耐药率较高, 并在一定程度上也具有多重耐药性。由此发现, 大多数分离菌株因地域、环境以及宿主情况, 耐药谱存在差别, 但多重耐药性愈发严重。

细菌产生耐药性一般是由于染色体介导、整合子或质粒介导产生, 大部分都是将整合子或质粒作为载体通过接合转移产生耐药性^[18]。副溶血弧菌耐药也是通过染色体基因突变或者通过移动元件携带外源性的耐药基因编码产生药物水解酶。研究发现, 副溶血弧菌 *VPA0095* 基因与喹诺酮耐药基因 *qnrA* 基因相关, 其可降低副溶血弧菌对喹诺酮类药物的敏感性^[19]。并且副溶血弧菌携带多种接合转

移的元件, 可以水平转移耐药基因^[8]。此外, 外排泵的过度表达也是研究较多的耐药机制^[20-21]。

本文测定了从养殖患病对虾临床分离的副溶血弧菌对 16 种抗菌药的耐药性, 检测了其耐药基因的携带情况, 分析了耐药表型与基因型相关性, 旨在掌握对虾源副溶血弧菌的耐药现状, 为后续其耐药机制的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

36 株副溶血弧菌为 2017—2018 年从上海郊区、江苏、福建及海南等 4 个地区的不同养殖场患病对虾中分离所得, 经鉴定后 -80 ℃ 保存于 80% 甘油中。药敏试验质控菌株为 *Escherichia coli* ATCC 25922。

1.2 试剂和药品

2216E 培养基和 MH 培养基购自青岛海博生物技术有限公司, LB 培养基由本实验室配制; PCR 相关试剂 (Premix Ex Taq™)、DNA Maker DL2000 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 扩增引物及基因测序由上海生工生物有限公司进行。16 种抗菌药物: 环丙沙星 (Ciprofloxacin)、诺氟沙星 (Norfloxacin)、恩诺沙星 (Enrofloxacin)、氟苯尼考 (Florfenicol)、氯霉素 (Chloramphenicol)、土霉素 (Oxytetracycline)、多西环素 (Doxycycline)、磺胺甲噁唑 (Sulfamethoxazole)、复方新诺明 (Compound Sulfamethoxazol)、庆大霉素 (Gentamicin)、硫酸新霉素 (Neomycin sulphate)、红霉素 (Erythromycin)、氨苄西林 (Ampicillin)、头孢曲松 (Ceftriaxone)、美罗培南 (Meropenem)、利福平 (Rifampicin) 均购自生工生物 (上海) 工程有限公司。

1.3 药敏试验

副溶血弧菌对 9 类 16 种药物的药敏试验采用 CLSI 推荐的琼脂稀释法^[22]。

1.3.1 抗菌药物溶液配制 参照 CLSI 中抗菌药物的配制方法, 先将抗菌药物配制成高浓度的母液, 并用 0.22 μm 滤膜过滤除菌 200 μL 分装洁净的离心管中, -20 ℃ 保存。

1.3.2 菌悬液的制备 将 -80 ℃ 冻存的副溶血弧

菌菌株用 2216E 固体培养基在 28 ℃ 恒温复苏培养 18 h。同时, 用 LB 固体培养基, 37 ℃ 恒温培养大肠杆菌质控菌株 (ATCC25922) 18 h。挑取单菌落接种于 MH 液体培养基中, 28 ℃ (大肠杆菌 37 ℃) 恒温摇床中, 200 r·min⁻¹ 增菌至浓度约为 0.5 麦氏比浊度 (相当于 10⁵ CFU·mL⁻¹) 备用。

1.3.3 琼脂药敏板制备 根据表 1 中各药物的稀释范围, 倍比稀释法稀释抗菌药, 并用移液枪快速加入到约 60 ℃ 的 MH 琼脂培养基, 迅速混匀, 即配成相应浓度的琼脂药敏平板, 同时准备不添加抗菌药的 MH 培养基作为空白对照。

1.3.4 接种与培养 将已稀释好的菌液按编号顺次加入 96 孔板中, 用自制钉板蘸取菌液, 按在已凝固的药敏平板上, 正面向上放置, 每种药物做 3 个平行, 置于 28 ℃ 培养箱培养 16~20 h^[23]。

1.3.5 结果的判定及统计 按照表 1 中 CLSI 中质控菌株的药敏测试范围, 读取试验中测试的最小抑

菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 结果, 观察结果是否符合范围则再读取其他测试菌株的 MIC 结果, 若有偏差则需要重新进行测试。在 Excel 2010 表格中记录药敏结果 MIC 值。

1.4 耐药基因的检测

DNA 提取采用 TIANGEN 细菌基因组试剂盒进行提取后对耐药基因进行 PCR 扩增。扩增体系一致, 即 DNA 模板、正向引物 (F)、反向引物 (R) 各 1 μL, *Taq* 聚合酶 12.5 μL, 无菌水定容至 25 μL。耐药基因引物参照文献, 具体见表 1。反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 1 min、退火 40 s (退火温度见表 2), 72 ℃ 延伸 (延伸时间视产物长度而定), 35 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min 后, 用凝胶成像仪器观察结果, 并将目的产物送上海生工生物工程有限公司进行测序, 测序结果经 BLAST 与已知序列比对以验证其基因型。

表1 抗菌药物稀释范围、质控菌株质控范围及药敏试验结果判定标准

Table 1 Dilution range of antibacterial drugs, quality control range of quality control strains and criteria for determination of drug susceptibility test results

抗菌药物 Antimicrobial	稀释范围 Dilution range/(μg·mL ⁻¹)	MIC判定标准 Judgment standard/(μg·mL ⁻¹)			ATCC25922质控范围 Quality control range/(μg·mL ⁻¹)
		S	I	R	
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.12~64	≤1	2	≥4	0.004~0.015
诺氟沙星 Norfloxacin	0.06~32	≤4	8	≥16	0.03~0.12
恩诺沙星 Enrofloxacin	0.06~32	≤0.5	1~2	≥4	0.03~0.12
氟苯尼考 Florfenicol	0.25~128	≤2	4	≥8	2~8
氯霉素 Chloramphenicol	0.25~128	≤8	16	≥32	2~8
土霉素 Oxytetracycline	0.12~64	≤4	8	≥16	0.5~4
多西环素 Doxycycline	0.12~64	≤4	8	≥16	0.5~2
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	5~2 560	≤256	—	≥512	4~32
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	0.125/2.375~64/1 216	≤2/38	—	≥4/76	≤0.5/9.5
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	0.06~32	≤2	4	≥8	0.5~4
庆大霉素 Gentamicin	0.06~32	≤4	8	≥16	0.25~1
红霉素 Ergomycin	0.5~512	≤0.5	1~4	≥8	2~8
头孢曲松 Ceftriaxone	0.12~64	≤1	2	≥4	0.03~0.12
氨苄西林 Ampicillin	0.25~128	≤8	16	≥32	2~8
美罗培南 Meropenem	0.125~64	≤4	8	≥16	0.008~0.06
利福平 Rifampin	1~512	≤1	2	≥4	4~16

注: —, 缺少相应的参考数据

Note: —, Lack of corresponding reference data

表2 耐药基因引物序列

Table 2 Primers sequences of drug resistance genes

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	产物长度 Length of product/bp	参考文献 Reference
<i>qnrVC</i> ₁₃₆	TTCTCACATCAGGACTTGC GGAACAATGATTACCCCT	55	615	[23]
<i>qnrVC</i> ₄₅₇	ATAAAACAGACCAGTTATATGT ACTATTAAACVCTAATTGCTCTA	55	630	[23]
<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	55	516	[24]
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAACGCAGAAAGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	50	469	[25]
<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCTGTAGGC	52	417	[26]
<i>tetA</i>	TTTCGGGTTCTGGGATGGT CAGGCAGAGCAAGTAGAGG	55	696	[23]
<i>tetM</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	55	405	[23]
<i>tetB</i>	GTCGCGGCATCGGTCAT TTTTTCGCCCCATTTAGTG	55	489	[23]
<i>Sul1</i>	GTGACGGTGTTTCGCAATTCT TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	63	779	[23]
<i>Sul2</i>	GCGCAGGCGCGTAAGCTGAT CGAAGCGCAGCCGCAATTC	65	793	[27]
<i>Sul3</i>	GCAACAGTTGGTGCTAAACGAGA AGCAGATGTGATTGATTGGGAG	56	578	[23]
<i>strA</i>	TGGCAGGAGGAACAGGAGG AGGTCGATCAGACCCGTGC	54	546	[27]
<i>strB</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAACC GGATCGTAGAACATATTGGC	52	509	[23]
<i>aadA</i>	GGAGAATGGCAGCGCAAT GTTACTGCGCTGTACCAAT	55	269	[23]
<i>aacA</i>	CTTGGRTGACCTCGGGATC CGATGCTCTATGAGTGGCTAA	54	344	[23]
<i>erm</i>	CCCGAAAAATACGAAAAATTCAT CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	55	589	[23]
<i>cat</i>	ACAACAGCAACGGTACTAGC CAACTTTCACCGATGCCAC	52	550	[28]
<i>optrA</i>	TTCTCACCCAGATATGCC CGGGATCCCGGCAAACCT	60	1395	[29]
<i>floR</i>	CTGCTGATGGCTCCTTTC GCCGTGGCGTAACAGAT	57	650	[30]
<i>cfi</i>	GTGAAGCTCTAGCCAACCGTC GCAGCGTCAATATCAATCCC	55	746	[31]
<i>bla</i> _{CARB}	GCTGAGAGCTCATGAAAAAGTTA CGTAGGATCCTTAACTTTATTGTAGTGC	55	852	[32]

2 结果

2.1 药敏试验结果

临床分离的 36 株副溶血弧菌对 16 种常见抗菌药物的耐药性见表 3。36 株副溶血弧菌对氨苄西林的耐药率最高 (88.9%)，其次为磺胺甲噁唑 (66.7%) 和红霉素 (63.9%)，土霉素的耐药率也较高 (47.2%)。此外，其他抗菌药耐药率多数低于 30%，其中对硫酸新霉素、庆大霉素、头孢曲松和美罗培南等均不耐药。我国允许在水产养殖中使用的抗菌药中，除磺胺甲噁唑的耐药率较高外，其他的耐药率均较

低。在水产上禁止使用的药物中，诺氟沙星、环丙沙星和氯霉素的耐药率均较低。

图 1 为 36 株副溶血弧菌对 9 类 (16 种) 抗菌药物的耐药类型分布。结果显示有 22 株菌表现出多重耐药性 (即对 3 类或 3 类以上抗菌药物耐药) 占 61.1% (22/36)，其中对 4 类药物耐药的弧菌数占 30.6% (11/36)，有 1 株弧菌对 6 类抗菌药物耐药。

2.2 耐药基因的检测结果

本试验检测了 9 大类抗生素相关的部分耐药基因。喹诺酮类耐药基因检出率分别为 *qnrVC* 72.2% (26/36)、*qnrA* 41.7% (15/36) 和 *qnrS* 36.1%

表3 36株副溶血弧菌耐药状况

Table 3 Antibiotics resistance status of 36 strains of *V. parahaemolyticus*

抗菌药物 Antimicrobial	耐药菌株数 Number of resistant strains	抗菌药物 Antimicrobial	耐药菌株数 Number of resistant strains
恩诺沙星 Enrofloxacin	2 (5.6%)	复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	8 (22.2%)
诺氟沙星 Norfloxacin	6 (16.7%)	硫酸新霉素 Neomycin sulfate	0 (0)
环丙沙星 Ciprofloxacin	6 (16.7%)	庆大霉素 Gentamicin	0 (0)
氟苯尼考 Florfenicol	4 (11.1%)	红霉素 Erythromycin	23 (63.9%)
氯霉素 Chloramphenicol	2 (5.6%)	头孢曲松 Ceftriaxone	0 (0)
土霉素 Oxytetracycline	17 (47.2%)	氨苄西林 Ampicillin	32 (88.9%)
多西环素 Doxycycline	4 (11.1%)	美罗培南 Meropenem	0 (0)
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	24 (66.7%)	利福平 Rifampin	9 (25%)

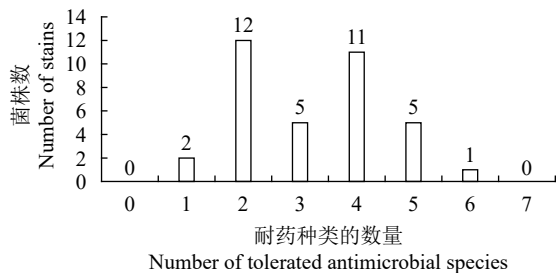


图1 多重耐药菌株统计

Figure 1 Strain distribution of multi-drug resistance

(13/36), *qnrB* 基因未检测到; 酰胺醇类耐药基因仅有 *floR* 和 *cfr* 检出, 检出率分别为 11.1% (4/36)、22.2 (8/36), 其他该类基因未检测到; 四环素耐药基因中 *tetA*、*tetB* 和 *tetM* 的检出率分别是 16.7% (6/36)、47.2% (17/36) 和 13.9% (5/36); 磺胺类基因仅检出 *sul2*, 检出率为 13.9% (5/36); 氨基糖苷类耐药基因检出率分别是 *strA* 44.4% (16/36)、*srtB* 58.3% (21/36)、*aadA* 33.3% (12/36)、*aacA* 16.7%

(6/36); 利福霉素类耐药基因 *arr* 未检出; β -内酰胺类耐药基因 *bla_{CARB}* 检出率 47.2% (17/36); 大环内酯类、利福霉素类耐药基因均未检测到 (表 4)。

2.3 耐药表型与耐药基因型关系

36 株副溶血弧菌耐药表型与其携带基因型的关系 (表 5) 结果说明, 部分菌株表现出了耐药性, 但并没有携带相应的耐药基因。同时, 部分菌株携带耐药基因, 但没有表现出耐药性。耐药表型与耐药基因型没有表现出一一对应的关系。

3 讨论

3.1 副溶血弧菌对 16 种抗菌药物的敏感性及多重耐药性分析

本研究选择了部分人医临床常用药、国标渔药、兽药和个别禁用药等 16 种抗菌药物进行药敏试验。副溶血弧菌不仅可感染水生动物, 还会通过食物链或者环境感染人、畜, 是一种人、畜、渔共

表4 副溶血弧菌耐药基因携带率

Table 4 Drug resistance gene carrier rate of *V. parahaemolyticus*

耐药基因 Resistance gene	检出率 Detection rate/%	耐药基因 Resistance gene	检出率 Detection rate/%	耐药基因 Resistance gene	检出率 Detection rate/%
<i>qnrVC</i>	72.2	<i>cfr</i>	22.2	<i>strA</i>	44.4
<i>qnrA</i>	41.7	<i>tetA</i>	16.7	<i>strB</i>	58.3
<i>qnrB</i>	0	<i>terB</i>	47.2	<i>aadA</i>	33.3
<i>qnrS</i>	36.1	<i>tetM</i>	13.9	<i>aacA</i>	16.7
<i>cat</i>	0	<i>sul1</i>	0	<i>erm</i>	0
<i>optrA</i>	0	<i>sul2</i>	13.9	<i>bla_{CARB}</i>	47.2
<i>floR</i>	11.1	<i>sul3</i>	0	<i>arr</i>	0

表5 36株副溶血弧菌耐药表型与其携带基因型关系

Table 5 Relationship between resistant phenotype of 36 *V. parahaemolyticus* strains and their carrying genotypes

菌株 Strain	耐药谱型 Resistance profile	携带耐药基因 Resistance gene
301	NOR-CIP-SXT-CFR-MER-SMZ-E-AMP	<i>bla</i> _{CARB}
302	NOR-CIP-SMZ-E-AMP	<i>qnrVC-bla</i> _{CARB}
331	NOR-CIP-SMZ-E-AMP	<i>bla</i> _{CARB}
333	SMZ-E-AMP	<i>bla</i> _{CARB}
335	SMZ-E-AMP	<i>qnrVC-tetM-bla</i> _{CARB}
337	OTC-SMZ-E-AMP	<i>qnrVC-bla</i> _{CARB}
338	OTC-SMZ-E-AMP	<i>qnrVC-bla</i> _{CARB}
340	OTC-DOX-SMZ-AMP-RA	<i>qnrVC-bla</i> _{CARB}
361	ENR-NOR-CIP-SMZ-AMP	<i>qnrVC-aadA-bla</i> _{CARB}
362	ENR-NOR-CIP-SMZ-E-AMP	<i>aadA-bla</i> _{CARB}
365	NOR-CIP-OTC-SMZ-E-AMP	<i>bla</i> _{CARB}
371	OTC-SMZ-SXT-E-AMP	<i>qnrVC-sul2-strA-strB-aadA-bla</i> _{CARB}
372	OTC-SMZ-SXT-E-AMP	<i>qnrVC-sul2-strA-strB-aadA-bla</i> _{CARB}
383	OTC-SMZ-SXT-E-AMP	<i>floR-sul2-strA-strB-bla</i> _{CARB}
384	OTC-SMZ-SXT-E-AMP	<i>sul2-strA-strB-bla</i> _{CARB}
388	FFC-OTC-DOX-SMZ-SXT-AMP-RA	<i>qnrVC-tetB-tetM-sul2-bla</i> _{CARB}
389	SMZ-AMP	<i>aadA-aacA-bla</i> _{CARB}
391	SMZ-E	<i>qnrS-strB</i>
392	SMZ-E-AMP	<i>qnrVC-tetB-strB</i>
393	OTC-SMZ-SXT-AMP	<i>qnrVC-tetB-tetM-strB</i>
394	OTC	<i>qnrVC-cfr-tetB-strA-strB</i>
395	AMP	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-tetB-strB-aadA</i>
396	OTC-E-AMP-RA	<i>tetB-strA-strB</i>
397	AMP-RA	<i>qnrVC-qnrA-tetB-strA</i>
398	E-AMP	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-tetA-strA</i>
399	E	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-strB-aadA-aacA</i>
400	E-AMP	<i>qnrA-qnrS-tetA-tetB-strA-strB-aadA-aacA</i>
401	E-AMP	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-tetA-tetB-strA-strB-aadA</i>
402	AMP	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-tetB-strA-strB-aadA-aacA</i>
403	OTC-AMP	<i>qnrVCqnrA-qnrS-cfr-tetA-tetB-strA-strB-aadA-aacA</i>
404	AMP-RA	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-tetA-tetB-strA-strB-aadA</i>
405	AMP	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-cfr-tetA-tetB-strA-strB-aacA</i>
406	OTC-SMZ-SXT-E-AMP-RA	<i>qnrVC-qnrA-floR-tetB-strA</i>
407	FFC-C-OTC-DOX-SMZ-SXT-E-AMP-RA	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-floR-tetB-tetM-strB</i>
408	FFC-OTC-SMZ-RA	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-tetB-strA-strB</i>
409	FFC-C-OTC-DOX-SMZ-E-RA	<i>qnrVC-qnrA-qnrS-floR-tetB-tetM-strB</i>

注: ENR. 恩诺沙星; NOR. 诺氟沙星; CIP. 环丙沙星; FFC. 氟苯尼考; C. 氯霉素; OTC. 土霉素; DOX. 多西环素; SMZ. 磺胺甲噁唑; SXT. 复方新诺明; E. 红霉素; AMP. 氨苄西林; RA. 利福平

Note: ENR. Enrofloxacin; NOR. Norfloxacin; CIP. Ciprofloxacin; FFC. Florfenicol; C. Chloramphenicol; OTC. Oxytetracycline; DOX. Doxycycline; SMZ. Sulfamethoxazole; SXT. Compound Sulfoxime; E. Erythromycin; AMP. Ampicillin; RA. Rifampicin

患病原。本试验中分离自对虾中的 36 株副溶血弧菌对 16 种抗菌药物的敏感性检测结果显示, 分离株对土霉素、磺胺甲噁唑、红霉素、氨苄西林表现出了明显的耐药性, 而对硫酸新霉素、庆大霉素、美罗培南和头孢曲松则表现出 100% 敏感, 对其他药物的耐药率维持在 30% 以内。

本试验中磺胺甲噁唑因其抗菌谱广、价格低、药效好等特点, 国标渔药药典里指导渔药中使用磺胺类药物居多, 已有 70 年的使用历史, 被广泛地应用于水产养殖业中, 是抗感染治疗中的重要药物之一^[33]。磺胺类药物在一定程度上有效抑制了副溶血弧菌引起的病害, 但同时也造成了弧菌对磺胺类的耐药趋势逐年增加。弧菌对磺胺类的高耐药率在国际国内的研究报道中很常见, 目前在我国环境中磺胺类药物的浓度与检出率远高于其他国家, 推测副溶血弧菌对磺胺类药物的耐药程度可能与环境中磺胺类药高浓度的残留量有关^[34]。这说明磺胺类药物的使用对于副溶血弧菌病的防控已经不再有良好的治疗效果。土霉素和红霉素耐药率较高, 这两种非国标渔药很可能仍在使用或者存在药物或者耐药基因的污染。采集的菌株对氨苄西林耐药率极高 (88.9%), 这与从 1978 年 Joseph 等^[35] 在印度分离的及近年来我国刘英超等^[16] 从急性肠炎病人粪便标本中分离出的副溶血弧菌对氨苄西林的耐药情况一致, 在很长时间并没有变化, 均表现出高度耐药, 根据 Chiou 等^[32] 和 Joseph 等^[35] 的研究发现, 大多数菌株因为 *bla_{CARB}* 基因编码产生 β -内酰胺酶对氨苄西林耐药, 在水产养殖中氨苄西林对治疗弧菌病效果不理想。本试验中多重耐药性弧菌的比重为 61.1% (22/36), 耐药种类最多达 6 种, 表明采样地区多重耐药的情况相对较严重。研究表明, 水产养殖环境中的细菌能够充当抗性基因的贮藏库, 并且可能有助于耐药基因的传播^[36]。

3.2 副溶血弧菌耐药表型与基因型关系

检测的喹诺酮类耐药基因检出率分别为 *qnrVC* 72.2% (26/36)、*qnrA* 41.7% (15/36) 和 *qnrS* 36.1% (13/36), 其耐药率分别为恩诺沙星 5.6% (2/36)、环丙沙星 16.7% (6/36)、诺氟沙星 16.7% (6/36), 表明喹诺酮类药物的耐药基因检出率比较高, 而耐药率较低。磺胺类耐药基因检出率为 *su12* 13.9% (5/36), 而其耐药率则高达 66.7%, 说明磺胺类药物具有较高的耐药性, 但是耐药基因的携带率不

高。本试验结果表明耐药基因的检出率与耐药表型之间不是完全一一对应的关系。这可能与耐药基因种类的多样性及变体多样性有关, 并且副溶血弧菌种存在不同的耐药机制, 导致耐药表型与耐药基因型之间的关联性不同^[22]。本试验结果与 Jiang 等^[37] 及 Kitiyodom 等^[27] 的研究结果具有相似性, 其在耐喹诺酮类药物菌株的 *gyrA* 和 *parC* 基因发现了点突变, 并且所有的分离株携带介导抗菌药物产生耐药性的 1 类整合子。携带耐药基因的菌株不表现出耐药性, 可能与环境等的选择压力有关, 也可能是因为这些基因是沉默基因, 而一些耐药菌株不携带耐药基因可能是存在其他耐药机制导致的结果。耐药性高的菌可能携带大量耐药基因和质粒, 会导致耐药性在养殖区域内扩散, 危害水产养殖业的健康发展^[38]。抗菌药物耐药性的程度、耐药细菌的传播在水产病害防控以及人、畜疾病治疗都是需要关注的问题。

参考文献:

- [1] DARAMOLA B A, WILLIAMS R, DIXON R A. *In vitro* antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in northern England[J]. Int J Antimicrob Ag, 2009, 34(5): 499-500.
- [2] 张德福, 付绍磊, 张明, 等. 副溶血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.
- [3] HU Q, CHEN L. Virulence and antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from crustaceans and shellfish in Shanghai, China[J]. J Food Protect, 2016, 79(8): 1371-1377.
- [4] CHEN Y, CHEN X, YU F, et al. Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013[J]. Clin Microbiol Infec, 2016, 22(3): 258.e9-258.16.
- [5] 陈旭凌, 黄志坚. 水生细菌耐药性的遗传机制 [J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(8): 573-578.
- [6] 曾德乾, 冯娟, 徐力文, 等. 海水养殖鱼哈维弧菌分离株的耐药谱型分析 [J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 129-138.
- [7] RODRIGUEZ-BLANCO A, LEMOS M L, OSORIO C R. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments[J]. Antimicrob Agents Ch, 2012, 56(5): 2619-2626.
- [8] 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.
- [9] SILVESTER R, ALEXANDER D, AMMANAMVEETIL M A. Prevalence, antibiotic resistance, virulence and plasmid profiles of

- Vibrio parahaemolyticus* from a tropical estuary and adjoining traditional prawn farm along the southwest coast of India[J]. *Annal Microbiol*, 2015, 65(4): 2141-2149.
- [10] YOU K G, BONG C W, LEE C W. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio* spp. in tropical waters of Peninsular Malaysia[J]. *Environ Monit Assess*, 2016, 188(3): 171-171.
- [11] KANG C H, SHIN Y, KIM W, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea[J]. *Environ Sci Poll Res Int*, 2016, 23(1): 918-926.
- [12] SHAH S Q, CABELLO F C, L'ABEE-LUND T M, et al. Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites[J]. *Environ Microbiol*, 2014, 16(5): 1310-1320.
- [13] LETCHUMANAN V, YIN W F, LEE L H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6(1): 33-33.
- [14] 黄伟德, 肖双燕, 黎姗姗, 等. 广西凡纳滨对虾源副溶血弧菌耐药性和耐药基因的检测 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(9): 1979-1988.
- [15] XIE T F, XU X K, WU Q P, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from ready-to-eat foods in China[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(97): 549.
- [16] 刘英超, 孙静, 钟继红. 急性炎症性肠炎的病原菌分布与耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015(9): 1987-1988, 1996.
- [17] 谢红意, 叶鸿雁, 周方满, 等. 宁波地区腹泻患者副溶血弧菌毒力基因及耐药性分析 [J]. 检验医学, 2019, 34(2): 136-139.
- [18] 罗鹏, 何香燕, 胡超群. 细菌整合性接合元件 SXT/R391 研究进展 [J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 471-479.
- [19] AEDO S, IVANOVA L, TOMOVA A, et al. Plasmid-related quinolone resistance determinants in epidemic *Vibrio parahaemolyticus*, uropathogenic *Escherichia coli*, and marine bacteria from an aquaculture area in Chile[J]. *Microb Ecol*, 2014, 68(2): 324-328.
- [20] MATSUO T, NAKAMURA K, KODAMA T, et al. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiol Open*, 2013, 2(5): 725-742.
- [21] MORITA Y, KODAMA K, SHIOTA S, et al. Nor M, a putative multidrug efflux protein of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 1998, 42(7): 1778-1782.
- [22] CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline[M]. CLSI, 2010: 70-96.
- [23] 刘旭. 海水养殖源弧菌耐药性调查及 qnrVC 基因在弧菌中的流行情况研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 14-16.
- [24] ROBICSEK A, STRAHILEVITZ J, SAHM D F, et al. *Qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50(8): 2872-2874.
- [25] JACOBY G A, WALSH K E, MILLS D M, et al. *QnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50(4): 1178-1182.
- [26] HATA M, SUZUKI M, MATSUMOTO M, et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2005, 49(2): 801-803.
- [27] KITIYODOM S, KHEMTONG S, WONGTAVATCHAI J, et al. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2010, 72(2): 219-227.
- [28] YOO M H, HUH M D, KIM E H. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1/2/3/4): 1-21.
- [29] WANGY, LU Y. A novel gene, *optR A*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in enterococcus faecalis and enterococcus faecium of human and animal origin[J]. *J Antimicrob Ch*, 2015, 70(8): 2182-2190.
- [30] KIM E H, AOKI T. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*[J]. *Microbiol Immunol*, 1996, 40(9): 665-669.
- [31] KEBRENBORG C, SCHWARZ S. Distribution of florfenicol resistance genes *fex A* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50(4): 1156-1163.
- [32] CHIOU J C, LI R C, CHEN S. *CARB-17* family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2015, 59(6): 3593-3595.
- [33] 汪建国. 我国渔药研究与应用综述 (14)[J]. 渔业致富指南, 2013(14): 68-72.
- [34] 汪涛, 杨再福, 陈勇航, 等. 磺胺类抗性基因的产生及演变研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2017, 39(11): 1251-1255.
- [35] JOSEPH S W, DEBELL R M, BROWN W P. *In vitro* response to chloramphenicol, tetracycline, ampicillin, gentamicin, and beta-lactamase production by halophilic vibrios from human and environmental sources[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 1978, 13(2): 244-248.
- [36] CHARMAINE N G, CHEN H, GOH S G, et al. Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquaculture sites of Singapore[J]. *Mar Pollut Bull*, 2018, 135(7): 475-480.
- [37] JIANG Y, YAO L, LI F, et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*)[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2014, 59(2): 147-154.
- [38] 蒋魁, 徐力文, 苏友禄, 等. 2012 年~2014 年南海海水养殖鱼类病原菌哈维弧菌分离株的耐药性分析 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(6): 99-107.