

淮安地区小龙虾及其外环境中致病菌分布规律和耐药性分析

李兵兵, 刘纯成, 侯海燕, 李双姝, 刘 靛*

(淮安市疾病预防控制中心, 淮安 223001)

摘要: **目的** 了解淮安地区生鲜小龙虾及其外环境中致病菌的分布规律以及相关菌株的耐药性, 为食源性疾病的防控提供依据。 **方法** 根据食品微生物检测国家标准, 检测 70 份小龙虾样品(养殖环节 30 份、销售环节 40 份)和 40 份外环境水体样本(养殖环节 15 份、销售环节 25 份)中的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希菌 O157 和副溶血性弧菌, 并对沙门氏菌进行血清型鉴定, 然后用纸片扩散法测定沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的耐药性。 **结果** 小龙虾中致病菌的总检出率为 41.43%, 致病菌类型包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特菌。外环境水体中致病菌的总检出率为 22.50%, 致病菌类型包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌。沙门氏菌分离株主要对萘啶酸和氨苄西林具有较强的耐药性; 金黄色葡萄球菌分离株则对红霉素、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑和克林霉素具有较强的耐药性。 **结论** 淮安地区小龙虾及其外环境水体中存在致病菌污染, 并且沙门氏菌和金黄色葡萄球菌分离菌株的耐药情况严重。

关键词: 小龙虾; 外环境水体; 致病菌; 耐药性

Distributing disciplinarian and drug resistance of pathogenic bacteria in *Procambarus clarkii* and its external environment in Huai'an

LI Bing-Bing, LIU Chun-Cheng, HOU Hai-Yan, LI Shuang-Shu, LIU Liang*

(Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an 223001, China)

ABSTRACT: Objective To analyzed the distributing disciplinarian and drug resistance of pathogenic bacteria in *Procambarus clarkii* and its external environment in Huai'an, so as to provide basis for prevention and control of foodborne disease. **Methods** The *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 and *Vibrio parahaemolyticus* in 70 samples of *Procambarus clarkii* and 40 samples of external environmental water were tested according to the national standards of food microbiological examination. Then the serotype distribution of *Salmonella* were identified, and the drug resistances of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* were determined by Kindy-Bauer (KB) method. **Results** The total detection rate of pathogenic bacteria in *Procambarus clarkii* was 41.43%. The pathogenic bacteria included *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. The total detection rate of pathogenic bacteria in external environmental water was

基金项目: 淮安市自然科学软课题

Fund: Supported by the Soft Subject of Natural Science in Huai'an City.

*通讯作者: 刘靛, 主管技师, 主要研究方向为微生物学检验。E-mail: 546650546@qq.com

*Corresponding author: LIU Liang, Supervising Technician, Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an 223001, China. E-mail: 546650546@qq.com

22.50%, and the pathogenic bacteria included *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Salmonella* isolates showed high resistance to nalidixic acid and ampicillin, and *Staphylococcus aureus* isolates showed high resistance to erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and clindamycin. **Conclusion** There is pollution of pathogenic bacteria in *Procambarus clarkii* and its external environment water in Huai'an, and the drug resistance of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* was serious.

KEY WORDS: *Procambarus clarkii*; external environment water; pathogenic bacteria; drug resistance

1 引言

小龙虾是淮安地区的特色水产品,盱眙龙虾已经成功注册地理标志商标,居民日常消费量巨大。小龙虾养殖的场所一般为湖泊和池塘等,这些地方的水流动性较小,并且生产、生活行为频繁,容易导致水体被微生物污染。已有研究表明,我国各大水系均已受到不同程度的病原微生物污染,主要的细菌性病原微生物有霍乱弧菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、肠道病原性大肠杆菌和志贺氏菌等^[1]。而小龙虾富含蛋白质等营养成分,容易成为水中微生物的寄生场所,人食用了被致病菌污染的小龙虾产品后,就会引发食源性疾病^[2,3]。据统计,2001~2010年我国共发生食源性疾病事件5021起,累计发病140101人,死亡1427人,在已查明引发因素的食源性疾病暴发事件中,微生物为最常见因素,共2055起,占总数的40.93%^[4]。

目前,针对淮安地区小龙虾及其外环境中致病菌监测的研究尚未见报道,小龙虾及其外环境中致病菌的污染状况还不清晰。本研究旨在通过分析小龙虾及其外环境中致病菌的污染状况和耐药特性,为淮安地区食源性疾病的防控提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 样品采集

以随机采样的原则从淮安市的养殖场、农贸市场、超市及零售店采集70份生鲜小龙虾样品(养殖环节30份、销售环节40份)和40份外环境水体样本(养殖环节15份、销售环节25份)。样品采集后于2h内运送回实验室进行检测。

2.2 仪器与试剂

VITEK Compact II全自动细菌生化鉴定仪(法国梅里埃公司);PYX-DHS隔水式电热恒温培养箱(上海博泰公司);BHC-1300A/B2生物安全柜(苏洁净化设备有限公司)。

四硫磺酸钠亮绿培养基(TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、7.5%氯化钠肉汤、LB增菌液、改良EC肉汤、3%氯化钠碱性蛋白胨水和MH琼脂均购自广东环凯微生物科技有限公司;沙门氏菌显色培养基、金黄色葡萄球菌显色培养基、大肠杆菌O157显色培养基、李斯特显色培养基

和改良弧菌显色培养基均购自郑州博赛生物技术有限公司;沙门氏菌诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司;GP菌鉴定卡和GN菌鉴定卡购自美国Biomérieux公司;药敏纸片:头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、四环素(TET)、头孢西丁(CFX)、庆大霉素(GEN)、氨苄西林(AMP)、环丙沙星(CIP)、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(TMP/SMZ)、萘啶酸(NAL)、氯霉素(CHL)、克林霉素(DA)、红霉素(E)、苯唑西林(OX)和环丙沙星(CIP)均购自杭州天和试剂有限公司。

2.3 实验方法

2.3.1 致病菌的分离与鉴定

5种致病菌的检测方法如下:沙门氏菌,根据GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行检测^[5];金黄色葡萄球菌,根据GB4789.10-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》进行检测^[6];单核细胞增生李斯特氏菌,根据GB4789.30-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》进行检测^[7];大肠埃希菌O157,根据GB/T4789.36-2008《食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌O157:H7/NM检验》进行检测^[8];副溶血性弧菌,根据GB4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》进行检测^[9]。

按照GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[5]中的方法进行沙门氏菌血清型鉴定。

2.3.2 药敏实验

用Kirby-Bauer纸片扩散法^[10]测定沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的耐药性,以大肠埃希氏菌ATCC25922和金黄色葡萄球菌ATCC25923为质控菌株,参照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制订的标准^[11]判读实验结果。

3 结果与分析

3.1 致病菌的分离与鉴定

3.1.1 致病菌检出情况

实验选取的样品中,检出致病菌的小龙虾样品共计29份,总体阳性率为41.43%。在养殖环节,小龙虾中沙门氏菌的检出率最高,为26.67%,其余依次为金黄色葡萄球菌(20.00%)、副溶血性弧菌(10.00%)和单核细胞增生李斯特

氏菌(2.86%), 大肠埃希氏菌 O157 未检出; 在销售环节, 小龙虾中致病菌的检出率由高到低依次为沙门氏菌(30.00%)、金黄色葡萄球菌(25.00%)和副溶血性弧菌(15.00%), 单核细胞增生李斯特氏菌和大肠埃希氏菌 O157 未检出。

外环境水体样本中, 致病菌的总体阳性率为 22.50%。养殖水体中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的最高检出率同为 13.33%, 副溶血性弧菌检出率为 6.67%, 未检出单核细胞增生李斯特氏菌和大肠埃希氏菌 O157; 销售水体中仅检出金黄色葡萄球菌(8.00%)和沙门氏菌(4.00%)。小龙虾样品和外环境水体样本中致病菌的检出情况见表 1。

3.1.2 沙门氏菌的血清型鉴定

对分离得到的 23 株沙门氏菌进行血清型鉴定, 结果如表 2 所示。分离到的 23 株沙门氏菌分属于 B 群、D 群、E1 群和 E4 群 4 个群别, 其中, 优势血清型为肠炎沙门氏菌, 其它血清型还包括鼠伤寒沙门氏菌、鸭沙门氏菌、伦敦沙门氏菌和山夫登堡沙门氏菌。分离自小龙虾的沙门氏菌的血清型有肠炎沙门氏菌(8 株)、山夫登堡沙门氏菌(4 株)、鼠伤寒沙门氏菌(2 株)、伦敦沙门氏菌(2 株)和鸭沙门氏菌(1 株)。分离自水环境的沙门氏菌的血清型有肠炎沙门氏菌

(3 株)、鸭沙门氏菌(1 株)、伦敦沙门氏菌(1 株)和山夫登堡沙门氏菌(1 株)。

3.2 药敏实验结果

3.2.1 沙门氏菌的耐药性

如图 1 所示, 所测试的 10 种抗生素均存在沙门氏菌耐药菌株, 耐药率由高到低依次为萘啶酸(86.96%)、氨苄西林(78.26%)、庆大霉素(43.48%)、四环素(34.78%)、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(34.78%)、头孢噻吩(21.74%)、环丙沙星(17.39%)、头孢他啶(17.39%)、氯霉素(13.04%)和头孢西丁(8.70%), 不同来源菌株的耐药表型基本相似。23 株沙门氏菌中, 耐一种抗生素的菌株有 3 株、耐 2 种抗生素的菌株有 5 株、耐 3 种及以上抗生素的多重耐药沙门氏菌有 13 株。

3.2.2 金黄色葡萄球菌的耐药性

本研究中, 金黄色葡萄球菌对红霉素的耐药率最高(95.00%), 其余依次为甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(75.00%)、克林霉素(65.00%)、头孢西丁(25.00%)、苯唑西林(15.00%)和四环素(15.00%), 而庆大霉素、氯霉素和环丙沙星无耐药菌株存在(图 2)。有 3 株金黄色葡萄球菌对 2 种抗生素耐药, 9 株对 3 种抗生素耐药, 4 株对 4 种抗生素耐药。

表 1 致病菌检出情况
Table 1 Detection results of pathogenic bacteria

样品类别	样品数量/份	沙门氏菌		金黄色葡萄球菌		单核细胞增生李斯特氏菌		大肠埃希菌 O157		副溶血性弧菌	
		检出数/份	检出率/%	检出数/份	检出率/%	检出数/份	检出率/%	检出数/份	检出率/%	检出数/份	检出率/%
养殖厂虾	30	8	26.67	6	20.00	2	2.86	0	0.00	3	10.00
销售点虾	40	12	30.00	10	25.00	0	0.00	0	0.00	6	15.00
养殖水体	15	2	13.33	2	13.33	0	0.00	0	0.00	1	6.67
销售水体	25	1	4.00	2	8.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
合计	110	23	20.91	20	18.18	2	1.82	0	0.00	10	9.09

表 2 沙门氏菌的血清型分布
Table 2 Serotype distribution of *Salmonella*

血清型	群别	不同种类样本中的菌株数/株		合计	构成比%
		小龙虾	水体		
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. typhimurium</i>)	B 群	2	0	2	8.70
肠炎沙门氏菌(<i>S. enteritidis</i>)	D 群	8	3	11	47.83
鸭沙门氏菌(<i>S. anatum</i>)	E1 群	1	1	2	8.70
伦敦沙门氏菌(<i>S. london</i>)	E1 群	2	1	3	13.04
山夫登堡沙门氏菌(<i>S. senftenberg</i>)	E4 群	4	1	5	21.73

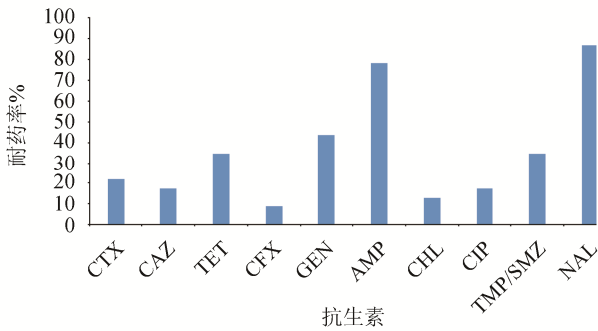


图 1 沙门氏菌耐药情况

Fig. 1 Drug resistance of *Salmonella*

注: 头孢噻肟(CTX); 头孢他啶(CAZ); 四环素(TET); 头孢西丁(CFX); 庆大霉素(GEN); 氨苄西林(AMP); 氯霉素(CHL); 环丙沙星(CIP); 甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(TMP/SMZ); 萘啶酸(NAL)

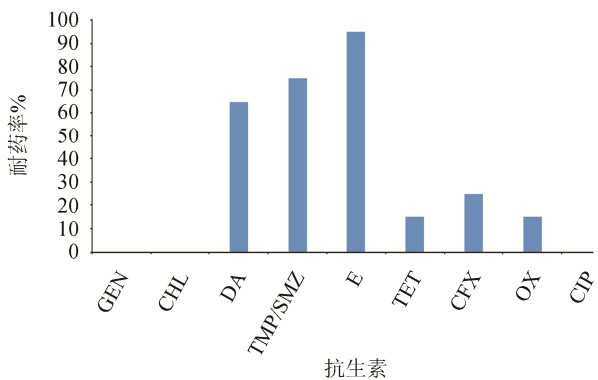


图 2 金黄色葡萄球菌耐药情况

Fig. 2 Drug resistance of *Staphylococcus aureus*

注: 庆大霉素(GEN); 氯霉素(CHL); 克林霉素(DA); 甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(TMP/SMZ); 红霉素(E); 四环素(TET); 头孢西丁(CFX); 苯唑西林(OX); 环丙沙星(CIP)

4 讨论与结论

调查结果显示, 小龙虾中致病菌的总检出率为 41.43%, 高于江苏省生鲜水产品中致病菌检出率的平均值^[12], 分离到的致病菌包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌和副溶血性弧菌, 与李迎月等^[13]报道的广州市水产品中污染的致病菌类型相似。这 4 种细菌均具有较强的致病性, 可引发食物中毒、胃肠炎和败血症等疾病, 严重者可导致死亡^[14-16]。因此, 采取有效措施控制由致病菌污染的小龙虾产品引起的食物中毒非常必要。首先, 应进一步加强养殖及流通环节的卫生管理; 其次, 消费者应食用经充分加热的小龙虾产品, 避免病从口入。小龙虾的外环境水体中的致病菌阳性率为 22.50%, 检出的致病菌类型与小龙虾中的致病菌基本相同, 这进一步证实了水产品中

的致病菌来源于被污染的水环境的推测。本研究还发现, 销售环节小龙虾的致病菌污染率要高于养殖环节, 这可能与销售环节小龙虾一般被放置于空间较小的容器中, 存在交叉污染有关。

抗生素的发现和使用在很大程度上缓解了人类的病痛, 但是抗生素的大规模滥用使越来越多的病原菌产生了耐药性, 耐药性病原菌的出现对人类的饮食安全造成了很大的危害^[17,18]。本研究中的药敏实验结果显示, 分离出的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的耐药情况严重, 尤其是沙门氏菌对氨苄西林和萘啶酸, 金黄色葡萄球菌对红霉素、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑和克林霉素等的耐药性很强。沙门氏菌中耐 3 种及以上抗生素^[19]的多重耐药菌占 56.52%, 在金黄色葡萄球菌中这一比例为 65%。因此, 渔业和环境相关监管部门应加强鱼虾养殖过程中抗生素的使用管理^[20]。

综上, 应加强淮安地区小龙虾产品的安全生产监管力度, 提高生产和经营等环节相关人员对食品安全的认知和卫生管理水平。同时, 疾控部门应持续开展小龙虾中致病菌的监测工作, 掌握致病菌污染水平, 了解致病菌的耐药现状及趋势, 从而有效减少食源性疾病的发生。

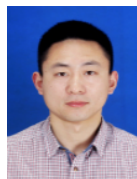
参考文献

- [1] 陈亚楠, 王亚炜, 魏源送, 等. 不同功能地表水体中病原微生物指示物的标准比较[J]. 环境科学学报, 2015, 35(2): 337-351.
CHEN YN, WANG YW, WEI YS, et al. Evolution and standard comparison of indicator microorganisms for different surface waters [J]. Acta Sci Circum, 2015, 35(2): 337-351.
- [2] 周斌. 全国肉类及水产品食源性致病菌污染现状[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(3): 402-406.
ZHOU H. Contamination status of foodborne pathogens in meat and aquatic products in China [J]. J Trop Med, 2014, 14(3): 402-406.
- [3] 黄兆勇. 食源性疾病的流行和监测现状[J]. 应用预防医学, 2012, 18(2): 125-128.
HUANG ZY. Epidemic and monitoring status of foodborne diseases [J]. Appl Prev Med, 2012, 18(02): 125-128.
- [4] 徐君飞, 张居作. 2001-2010 年中国食源性疾病暴发情况分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 313-316.
Xu JF, Zhang JZ. Analysis of foodborne disease outbreaks in China from 2001 to 2010 [J]. Chin Agric Sci Bull, 2012, 28(27): 313-316.
- [5] GB 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [6] GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [7] GB 4789.30-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
GB 4789.30-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes* [S].

- [8] GB/T 4789.36-2008 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验[S].
GB/T 4789.36-2008 National food safety standard Microbiological examination of food hygiene Examination of *Escherichia coli* O 157: H7/NM [S].
- [9] 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[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standard Food microbiological examination: *Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [10] Udo EE, Al-Mufti S, John AM. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6): 2119-2125.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty informational supplement [S]. 2010.
- [12] 王燕梅, 乔昕, 符晓梅, 等. 江苏省 2008-2009 年肉类和水产品食源性致病菌监测[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(3): 539-541.
WANG YM, QIAO X, FU XM, *et al.* Food-borne pathogens in meat and aquatic products in Jiangsu province, 2008-2009 [J]. *Chin J Public Health*, 2011, 27(3): 539-541.
- [13] 李迎月, 何洁仪, 张维蔚, 等. 广州市市售水产品食源性致病菌污染状况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 33(4): 55-58.
LI YY, HE JY, ZHANG WW, *et al.* Analysis on foodborne pathogenic bacteria contamination in retailed aquatic products in Guangzhou [J]. *Chin J Food Hyg*, 2013, 33(4): 55-58.
- [14] 苏春丽, 沈亮, 杨柳. 2012 年成都市食源性致病菌污染状况调查分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(5): 817-818.
SU CL, SHEN L, YANG L. Analysis on detection of food-borne pathogens in Chengdu, 2012 [J]. *Mod Prev Med*, 2015, 42(5): 817-818.
- [15] Newton A, Kendall M, Vugia DJ, *et al.* Increasing rate of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(Suppl 5): S391-395.
- [16] 吕国平, 李丽婕, 芦飞, 等. 食源性金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分型分析[J]. 微生物学杂志, 2015, 27(5): 294-297.
LV GP, LI LJ, LU F, *et al.* Molecular typing of foodborne *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis [J]. *J Microb*, 2015, 27(5): 294-297.
- [17] 杨保伟, 曲东, 申进玲, 等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 788-796.
YANG BW, QU D, SHEN JL, *et al.* Antimicrobial susceptibility and related genes of *Salmonella* serovars from retail food in Shaanxi Province [J]. *Acta Microb Sin*, 2010, 50(6): 788-796.
- [18] 马妮, 孙葳, 郑洪, 等. 辽宁省食源性沙门菌血清分布及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3144-3146.
MA N, SUN W, ZHENG H, *et al.* Analysis of serotype distribution and drug resistance of foodborne *Salmonella* in Liaoning Province [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, 23(15): 3144-3146.
- [19] 徐本锦, 张伟松, 王新, 等. 陕西省市售鸡肉中金黄色葡萄球菌的毒力基因及其药敏检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(11): 1076-1080.
XU BJ, ZHANG WS, WANG X, *et al.* Toxin genes detection and antimicrobial susceptibility test of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken in Shaanxi Province [J]. *Chin J Zoono*, 2012, 28(11): 1076-1080.
- [20] 陈玉贞, 邵坤, 关冰, 等. 2003-2010 年山东省食源性沙门菌血清分型及药敏分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 9-13.
CHEN YZ, SHAO K, GUAN B, *et al.* An analysis on the serotypes and antibiotic sensitivities of foodborne *Salmonella* in Shandong Province from 2003 to 2010 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2012, 24(1): 9-13.

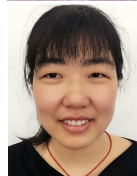
(责任编辑: 刘 丹)

作者简介



李兵兵, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: leeb1002@163.com



刘 靓, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: 546650546@qq.com