

凡纳滨对虾细菌性红体病病原的分子特征与耐药性

陈健舜, 朱凝瑜, 孔 蕾, 丁雪燕*, 郑天伦, 杜建明

(浙江省水产技术推广总站, 浙江省水生动物防疫检疫中心, 浙江 杭州 310012)

摘要: 为探明引起凡纳滨对虾细菌性红体病的病原, 从病虾肝胰脏分离得到 10 株优势菌, 经回归感染实验证实其为引起此次红体病的病原菌。Vitek 与 16S rRNA 序列分析显示, 分离株均为副溶血弧菌。基于 *dnaE-gyrB-recA-dtdS-pntA-pyrC-tnaA* 的多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)表明, 这些菌株形成 3 个新序列型(ST), 其中 1 株为 ST413, 7 株为 ST414, 2 株为 ST415; ST413 包含新等位基因型 *recA-166* 与 *tnaA-121*, ST414 则含有新等位基因型 *gyrB-219*。MLST 结果提示, 这些副溶血弧菌分离株并非来自单一克隆, 呈现出一定水平的分子多样性。但这些菌株均含有大流行群(PG)的分子标记 *toxRS* 与 *VPA1168*, 并具有相同的毒力基因构成(*tlh⁺tdh⁺trh⁺T3SS1⁺T3SS2⁺*)与耐药谱, 其 *tdh* 与 *trh* 的缺失并未影响细菌对凡纳滨对虾的致病力。综上所述, 引起此次凡纳滨对虾红体病的 10 株副溶血弧菌可能为 PG 的不同变异株。

关键词: 凡纳滨对虾; 副溶血弧菌; 分子特征; 耐药性

中图分类号: S 945.4⁺1

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有生长速度快、适盐范围广、抗逆能力强、出肉率高等特点, 是世界三大优良养殖经济对虾之一。我国自 1988 年引进后, 在全国沿海各地大规模养殖, 产生了良好的经济和社会效益。近年来, 随着凡纳滨对虾养殖业的不断扩大, 集约化程度不断提高, 养殖生态环境不断恶化, 病害发生频率急剧上升, 包括红体病、白斑病、烂尾病、黑鳃病、肠炎病等^[1-2]。其中红体病在全国各养虾地区均广泛流行, 且传播快、死亡率高, 已成为凡纳滨对虾养殖过程中最常见也是造成经济损失最严重的疾病之一^[2-3]。

“红体病”是根据患病对虾出现红体症状而命名的一类疾病。在对虾养殖过程中, 使其产生红体症状的原因很多, 主要包括: (1) 病毒性因素, 如感染桃拉综合征病毒(taura syndrome virus, TSV)或白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV); (2) 细菌性因素, 如感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)或副溶血弧菌(*V.parahaemolyticus*)等; (3) 环境应激性因素, 包括水温、盐度、pH、氨氮

和亚硝酸盐等^[3-4]。红体病通常是多种致病因子共同作用的结果, 其主要病原菌多为条件性致病菌, 生活环境或营养条件的恶化可提高对虾对病原菌的敏感性, 使其易于感染而发病^[2,4]。

2011 年 9 月浙江某规模化养殖场出现大面积凡纳滨对虾红体现象。发病对虾养殖 80 d 左右, 平均体长 11~12 cm。病虾在水面慢游, 活动减弱, 摄食减少甚至停止, 5 d 内死亡 90%以上。各主要环境因子监测未见异常。取病虾剖检, 肝胰脏肿大, 肠胃空虚。经对虾 TSV RT-PCR 检测试剂盒与对虾 WSSV PCR 检测试剂盒检测, 未检出 TSV 与 WSSV; 从肝胰脏分离得到 10 株优势菌, 经回归感染试验证实其为引起此次凡纳滨对虾红体病的病原菌。本实验针对引起凡纳滨对虾红体病的细菌性病原, 进行分子特征与耐药性研究。

1 材料与amp;方法

1.1 细菌分离

6尾红体病凡纳滨对虾于发病高峰期采自浙江

收稿日期: 2012-04-08 修回日期: 2012-08-10

资助项目:农业部“浙江省水生动物疫病监控中心”重大建设项目; 浙江省水产技术推广总站站长基金资助项目(TGZ201101)

通讯作者: 丁雪燕, E-mail: allan_523@163.com

某规模化养殖场。无菌剖取肝胰脏,在脑心浸液培养基(BHI)上划线分离,37℃培养24 h后,挑取优势生长的单菌落进行纯化培养,共获得10株细菌S1-m、S2-s1、S2-s3、S3-m2、S4-m1、S5-m1、S5-m2、S5-s2、S6-b、S6-m2。

1.2 基因组DNA的制备

采用Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒[生物工程(上海)有限公司]提取细菌基因组DNA,保存于-20℃备用。

1.3 PCR及其产物测序

采用25 μL反应体系:10×Taq Buffer(含Mg²⁺) 3 μL,10 mmol/L dNTP Mix 0.6 μL,50 μmol/L上下游引物各0.5 μL,DNA模板2 μL,Taq DNA polymerase 0.3 μL,加双蒸水补足体积。反应条件为94℃预变性3 min;94℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸时间按1 000 bp/min计算,30个循环;72℃ 5 min。选择的目基因、引物序列及退火温度参见表1。PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳,经Goldview染色后用凝胶成像系统分析。产物回收纯化后送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 菌种鉴定

16S rRNA序列分析 采用16S rRNA通用引物(表1),扩增并测得16S rRNA序列。通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析,并使用Clustal X软件与GenBank数据库中相似性较高的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments)。

Vitek分析 细菌纯培养后革兰氏染色并在油镜下判定其为革兰氏阳性或阴性,氧化酶、触酶试验判定其为阳性或阴性,据此选择相应的测定卡(Biomérieux, France)。应用VITEK32全自动微生物分析仪测定细菌的31个生化指标。

1.5 多位点序列分型

参照Gonzalez-Escalona等^[5]方法,选取副溶血弧菌7个看家基因*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*,在目的片段两端大于80 bp处设计引物(表1)。登录国际MLST数据库(<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>),将本研究获得的7个看家基因测序结果与数据库已知信息进行比较,以获取菌株的等位基因编号(allelic profile)。使用START v 2.0软件将7段基因序列进行拼接,与数据库已知信息进行比较,获取菌株的序列型(sequence typ-

ing,ST)。若为新等位基因型或新ST,则注册获取新等位基因编号与ST编号。

从MLST数据库获得所有ST的*dnaE-gyrB-recA-dtdS-pntA-pyrC-tnaA*串联序列,应用MAGE 4.0软件对其进行比对,选用Neighbor-Joining法构建系统进化树,经重复取样1 000次,进行Bootstrap值分析^[6]。

1.6 大流行群分子标记测定

基于Matsumoto等^[7]与Okura等^[8]对副溶血弧菌大流行群基因组的分析,筛选出两段大流行群(pandemic group)特异性序列*toxRS*与VPA1168,分别位于*toxRS*操纵子与16 kb插入序列中。据此设计引物(表1),进行PCR扩增。

1.7 毒力相关基因测定

对副溶血弧菌5个毒力相关基因进行PCR扩增,主要分为两类:(1)溶血素类基因*tlh*(不耐热溶血素)、*tdh*(耐热直接溶血素)、*trh*(TDH-相关溶血素);(2)两套Ⅲ型分泌系统(T3SS)的功能基因*icmFI*(T3SS1)与*vcrD2*(T3SS2)(表1)。

1.8 药物敏感性测定

采用常规琼脂扩散(K-B)法进行8类14种常用抗菌药物的抗菌敏感性测定,

培养24 h后测量各药物的抑菌圈直径大小。每种药物对每株细菌均设3个平行试验组,根据其抑菌圈直径大小的平均值,以判定各药物对细菌的药效。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

10株凡纳滨对虾红体病分离株的16S rRNA序列上传至GenBank数据库(表2)。通过NCBI的Blast同源性检索,这10株分离株的16S rRNA序列与弧菌属细菌同源性最高(核苷酸同源性>99%),主要包括溶藻弧菌、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、费氏弧菌(*V. fischeri*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)、副溶血弧菌;但不能准确判定至种。

Vitek生化分析中,10株分离株的葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蛋白胨、氧化酶5个生化指标均为阳性,乳糖、木糖、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇等23个生化指标均为阴性;S1-m与S5-m1的阿拉伯

糖、葡萄糖与赖氨酸生化指标均为阳性；S2-s1、S2-s3、S3-m2与S4-m1的阿拉伯糖与赖氨酸生化指标阳性，葡萄糖指标阴性；S5-m2与S5-s2的赖氨酸生化指标阳性，阿拉伯糖与葡萄糖指标阴性；S6-b的阿拉伯糖与葡萄糖生化指标阳性，赖氨酸指标阴性；S6-m2的葡萄糖与赖氨酸生化指标阳性，阿拉伯糖指标阴性。通过Vitek分析，10株分离株均被判为副溶血弧菌，其中S5-m2与S5-s2的置信度为93%、S6-m2为83%，其余均为99%。结合Vitek与16S rRNA序列测定结果，判定这10株分离株均为副溶血弧菌。

2.2 进化地位分析

将10株副溶血弧菌分离株的看家基因测序结果与MLST数据库等位基因信息进行比较，S1-m的*recA*、*tmaA*与S2-s1等7个菌株的*gyrB*均为未知等位基因型。将未知基因型及菌株信息递交至MLST数据库，被收录并确认为新等位基因型，其编号分别为*recA*-166、*tmaA*-121与*gyrB*-219(表2)。两组菌株均形成新ST，其ST号分别为ST413与ST414(表2)。S6-b与S6-m2虽不含新等位基因型，但其等位基因组合亦形成新ST，为ST415(表2)。

基于*dnaE-gyrB-recA-dtdS-pntA-pyrC-tmaA*串联序列，ST413、ST414、ST415与其他412个ST构建系统进化树。415个序列型共形成3个主分支，98.1%的ST(407/415)位于主枝I，该枝又可分为IA与IB。ST413与ST415位于IA枝，ST414则位于IB枝(图1)。ST413与泰国环境分离株所代表的ST277亲缘关系最近(遗传距离为20)，并与其他7个ST亲缘关系亦较近(遗传距离为25~31)，其中包括浙江象山(2007年)与玉环(2008年)水产品分离株所代表的ST167与ST172(遗传距离分别为27与28，表3)。ST415与中国环境分离株代表的ST295形成姐妹分枝，亲缘关系最近(遗传距离为31)；并与其他7个ST亲缘关系亦较近(遗传距离为32~41)，其中包括美国引起胃肠炎暴发的临床分离株所代表的ST36与ST37(遗传距离分别为40与41，表3)。ST414与浙江玉环水产品分离株所代表的ST170亲缘关系最近(遗传距离为20)，并与其他3个ST亲缘关系亦较近(遗传距离为29~35)(表3)。

2.3 大流行性群分子标记测定

已知参考菌株F22与Hm1属于大流行群(pandemic group, PG)，而另一参考株ZS99则不属于PG。基于PG分子标记*toxRS*与*VPA1168*，F22与

Hm1均扩增得到目的条带，而ZS99无扩增(表1)，以此作为PCR阳性与阴性对照。10株引起凡纳滨对虾红体病的副溶血弧菌分离株在*toxRS*与*VPA1168*反应中均为阳性(表1)，提示这些菌株可能属于PG。

2.4 毒力相关基因分析

已知参考菌株BJ1997的毒力基因谱为*tlh⁺tdh⁺trh⁺T3SS1⁺T3SS2⁺*，F22为*tlh⁺tdh⁺trh⁺T3SS1⁺T3SS2⁻*，ZS99为*tlh⁺tdh⁻trh⁻T3SS1⁺T3SS2⁺*，Hm1为*tlh⁺tdh⁺trh⁻T3SS1⁺T3SS2⁺*^[9]。选用表2中的5对引物，4个参考株得到的毒力基因谱均与已知相符(表1)，以此作为各毒力基因PCR的阳性或阴性对照。10株引起凡纳滨对虾红体病的副溶血弧菌分离株的毒力基因构成相同，均含有*tlh*与*T3SS1*，但缺失*tdh*、*trh*与*T3SS2*(表1)，提示这些菌株并非典型的致病型副溶血弧菌(*tdh⁺*和/或*trh⁺*)。

2.5 药物敏感性

基于8类14种药物，10株副溶血弧菌呈现相同的耐药谱：对青霉素、林可霉素、万古霉素耐药，对阿米卡星、新霉素、氨基糖苷、恩诺沙星中毒敏感，对庆大霉素、头孢哌酮、氟苯尼考、四环素、多西环素、诺氟沙星、复方新诺明则高度敏感(表4)。

3 讨论

凡纳滨对虾红体病又称为“毁灭性红体症”，其危害严重性可见一斑^[1-2]。2011年9月浙江某规模化养殖场的对虾红体病主要由副溶血弧菌引起。副溶血弧菌是威胁水产养殖业的重要病原菌之一，能够感染多种水生动物^[10]。人们食用这些未煮熟的水产品，可发生胃肠炎、关节炎、败血症等^[11]。据世界卫生组织报道，各国副溶血弧菌引起的病例在细菌性食物中毒事件中均名列榜首，对公共卫生造成极大的危害^[11]。副溶血弧菌菌株间常呈现较大的分子多样性^[9,12]，探明流行菌株的分子特征，对研究副溶血弧菌的遗传与变异以及建立分子溯源体系具有重要意义。

16S rRNA基因序列测定已被作为细菌分类和鉴定的“金标准”^[13]，但由于16S rRNA序列的高度保守性，常难以区分同一属内的相近种，如本研究中16S rRNA序列难以将副溶血弧菌与其他5种弧菌(溶藻弧菌、坎氏弧菌、费氏弧菌、哈维氏弧菌、需钠弧菌)区分。因此，在16S rRNA序列分析的基础上，结合生化表型(VITEK)分析，得到的结果具有较高的准确度。



图 1 基于 7 个管家基因的副溶血弧菌序列型系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *V. parahaemolyticus* STs based on analysis of seven housekeeping genes

表 3 与新 ST 进化关系相近的 ST 分析
Tab. 3 Characteristics of STs having close phylogenetic relationships with new STs identified in this study

新 ST new ST	相近 ST close ST	遗传距离 genetic distance	代表性菌株 representative strain	时间 year	国家 country	来源 source
ST413	ST167	27	XS86	2007	中国(象山) China (Xiangshan)	环境 environment
	ST277	20	VP226	2003	泰国 Thailand	环境 environment
	ST254	25	VP130A/ VP130B	2003	泰国 Thailand	环境 environment
	ST137	28	31/49/55	2007	美国 U.S.	环境 environment
	ST198	31	V477	2009	中国 China	环境 environment
	ST172	28	YH27	2008	中国(玉环) China (Yuhuan)	环境 environment
	ST297	27	F45	2007	中国 China	环境 environment
ST415	ST295	31	F32	2007	中国 China	环境 environment
	ST185	32	V70	2007	中国 China	环境 environment
	ST21	41	W90A	1982	美国 U.S.	环境 environment
	ST59	39	K1203/1198	2004	美国 U.S.	环境 environment
			S038_1390	1982	美国 U.S.	环境 environment
	ST39	39	VP43-1A	1992	美国 U.S.	环境 environment
	ST37	41	10290	1997	美国 U.S.	临床 clinical
	ST36	40	multiple		美国 U.S.	临床 clinical
	ST38	41	JJ21-1C	1990	美国 U.S.	环境 environment
ST414	ST400	35	23-i-v	2011	斯里兰卡 Sri Lanka	环境 environment
	ST363	25	20040474	2004	中国 China	环境 environment
	ST170	29	YH21	2008	中国(玉环) China (Yuhuan)	环境 environment
	ST258	34	VP146	2003	泰国 Thailand	环境 environment

表 4 副溶血弧菌凡纳滨对虾红体病分离株的药物敏感性
Tab. 4 Antimicrobial susceptibility of *V. parahaemolyticus* isolates from red-body disease in *L. vannamei*

药物类别 category	药物名称 drug	含药量/ μg concentration	抑菌圈直径/mm (药物敏感性) inhibition-zone diameter (antimicrobial susceptibility)			
			S1-m (ST413)	S2-s1 (ST414)	S3-m2 (ST414)	S6-b (ST415)
氨基糖苷类 Aminoglyco- side	庆大霉素 Gentamicin	10	16 (S)	16 (S)	16 (S)	16 (S)
	阿米卡星 Amikacin	30	15 (I)	16 (I)	15 (I)	16 (I)
	新霉素 Neomycin	30	18 (I)	18 (I)	18 (I)	17 (I)
β -内酰胺类 β -Lactam	青霉素 G Benzylpenicillin G	10	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
	头孢哌酮 Cefoperazone	75	22 (S)	23 (S)	22 (S)	22 (S)
	氨曲南 Aztreonam	30	19 (I)	20 (I)	19 (I)	19 (I)
氯霉素类 Chloramphenicol	氟本尼考 Florfenicol	30	24 (S)	25 (S)	24 (S)	25 (S)
	四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	30	22 (S)	23 (S)	22 (S)
多西环素 Doxycycline		30	20 (S)	21 (S)	20 (S)	22 (S)
林可酰胺类 Lincosamides	林可霉素 Lincomycin	2	11 (R)	11 (R)	11 (R)	10 (R)
多肽类 Polypeptide	万古霉素 Vancomycin	30	9 (R)	9 (R)	9 (R)	11 (R)
喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	10	22 (S)	24 (S)	22 (S)	24 (S)
	恩诺沙星 Enrofloxacin	10	22 (I)	23 (I)	22 (I)	24 (I)
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Paediatric compound Sulfamethoxazole	25 ^a	23 (S)	23 (S)	23 (S)	21 (S)

注: S.敏感; I.中敏; R.耐药。a. 23.75 SMZ+1.25 TMP,下同。
 Notes: S. sensitive; I.intermediate sensitive; R. resistant. The same as below.

基于7个看家基因(*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtbS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*)的序列分析发现,本次引起凡纳滨对虾红体病的10株分离株中,1株(S1-m)含有2个新等位基因型(*recA*-166与*tnaA*-121),形成新序列型ST413;7株(S2-s1等)含有1个新等位基因型(*gyrB*-219),形成新序列型ST414;另2株虽不含有新等位基因型,但其等位基因组合形成新序列型ST415。这3种ST均为首次报道,已被MLST数据库(<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>)收录。基于7个看家基因串联序列的系统进化树表明,ST413与ST415位于分歧IA,ST414则位于IB。ST413与ST414分别与本省水产品分离株ST167象山株、ST172玉环株以及ST170玉环株具有较高的亲缘关系,而ST415则与美国引起胃肠炎暴发的临床分离株(ST36、ST37)进化关系较近(表3),提示本次引起凡纳滨对虾红体病的副溶血弧菌菌株并非来自单一克隆,呈现出一定水平的分子多样性。

副溶血弧菌不仅存在较高的分子多样性,其菌株间亦表现较大的致病力差异。自1996年以来,大流行群(PG)菌株引起了全世界绝大多数的临床病例^[14]。比较基因组学研究揭示,PG菌株含有某些群特异性(group specific, GS)基因片段,即PG分子标记,如*toxRS*操纵子^[7]、16 kb插入序列^[8]、*orf8*^[15]等。在先前的报道中,以*toxRS*为靶标的PCR被称为GS-PCR,而以16 kb插入序列中*VPA1168*为靶基因的PCR被称为PGS-PCR(pandemic GS-PCR)^[7-8,14]。*toxRS*存在于所有PG菌株但亦存在于部分非PG菌株,*orf8*仅存在于PG菌株但部分PG菌株缺失该基因,而*VPA1168*则可在几乎所有PG菌株中检出且不能从非PG菌株检出^[14-15]。因此,本研究选用*toxRS*与*VPA1168*为靶标,以此提高PG判定的准确度。GS-PCR与PGS-PCR结果显示,代表3种新ST的副溶血弧菌分离株均含有PG分子标记,可能属于PG的不同变异株。

溶血素曾一度被认为是介导副溶血弧菌致病力的主要毒力因子,包括*tlh*(不耐热溶血素)、*tdh*(耐热直接溶血素)、*trh*(TDH-相关溶血素)^[16]。

据统计,PG菌株常含有*tlh*与*tdh*,而不含有*trh*^[14,17]。本研究的PCR结果显示,10株分离株仅含有*tlh*,均缺失*tdh*与*trh*。但这些*tlh*⁺*tdh*⁻*trh*⁻菌株仍对凡纳滨对虾表现较高的致病力,提示*tdh*和/或*trh*的存在与否不足以判定细菌的致病力。该结论与之前的研究结果相仿,Nishibuchi等^[18]、Park等^[19]与Xu等^[20]相继发现缺失*tdh*或/和*trh*后,细菌依然保持毒力;Garcia等^[21]报道2009年智利的副溶血弧菌病暴发便是由*tdh*⁻*trh*⁻菌株引起。由此可见,副溶血弧菌还存在其他毒力因子与调控因子介导副溶血弧菌的致病性,如T3SS1与T3SS2分别介导细菌对机体的细胞毒性和肠毒性^[22]。对致病力差异菌株的毒力基因谱分析,为系统阐明副溶血弧菌不同毒力基因构成与致病力的关系奠定重要的基础。

水生动物一旦发生由细菌性疾病,最常用的治疗方法是使用抗生素或其他合成抗菌药。本研究测定了这10株副溶血弧菌对8类14种药物的敏感性。结果显示,分离株对氨基糖苷类、 β -内酰胺类、氯霉素类、四环素类、喹诺酮类与磺胺类7种药物高度敏感。在高敏药物中,氟苯尼考与多西环素属于第一批国家标准渔药(农业部1435号公告),可推荐使用。经比较分析,海南(2003年)^[23]、辽宁(2006年)^[24]、江苏(2009年)^[3]与此次浙江(2011年)引起凡纳滨对虾红体病的副溶血弧菌菌株表现出一定差异的耐药谱,如海南分离株耐药情况最为严重,仅对庆大霉素敏感,对 β -内酰胺类、喹诺酮类等药物均具有耐药性^[23],而辽宁、江苏、浙江分离株对 β -内酰胺类中的头孢哌酮、氨曲南以及喹诺酮类中的诺氟沙星敏感^[3,24](表5)。由此可见,虽然本研究的副溶血弧菌分离株来自不同的克隆,但由于耐药性与环境压力关系密切,这些来自同一环境的菌株呈现出相同的耐药谱。

综上所述,引起2011年浙江地区凡纳滨对虾红体病暴发的副溶血弧菌分离株并非来自单一克隆,呈现出一定水平的分子多样性,形成3种新序列型;但这些菌株均属于大流行群,并具有相同的毒力基因构成与耐药谱。*tdh*与*trh*的缺失并未影响细菌对凡纳滨对虾的致病力。

表5 四次凡纳滨对虾红体病暴发中副溶血弧菌分离株的药物敏感性比较

Tab. 5 Comparison of antimicrobial susceptibility of *V. parahaemolyticus* isolates from 4 red-body disease outbreaks of *L. vannamei*

类别 category	抗生素 drug	含药量/ μg concentration	药物敏感性 antimicrobial susceptibility			
			BX01-04 ^[23] (2003-海南)	0107 ^[24] (2006-辽宁)	JGB080708-1 ^[3] (2009-江苏)	S1-m (2011-浙江)
氨基糖苷类 Aminoglycoside	庆大霉素 Gentamicin	10	S	S	S	S
	阿米卡星 Amikacin	30	ND	I	S	I
β -内酰胺类 β -Lactam	新霉素 Neomycin	30	ND	ND	S	I
	青霉素 G Benzylpenicillin G	10	R	R	R	R
氯霉素类 Chloramphenicol	头孢哌酮 Cefoperazone	75	R	S	S	S
	氨曲南 Aztreonam	30	R	S	S	I
四环素类 Tetracyclines	氟本尼考 Florfenicol	30	ND	ND	ND	S
	四环素 Tetracycline	30	R	ND	S	S
林可酰胺类 Lincosamides	多西环素 Doxycyline	30	ND	ND	S	S
	林可霉素 Lincomycin	2	ND	ND	R	R
多肽类 Polypeptide	万古霉素 Vancomycin	30	R	R	S	R
	喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	10	R	S	S
磺胺类 Sulfonamides	恩诺沙星 Enrofloxacin	10	ND	ND	ND	I
	复方新诺明 Paediatric compound sulfamethoxazole	25 ^a	ND	S	S	S

参考文献:

- [1] 沈文英, 阳会军, 尹军霞. 南美白对虾的病害及防治研究现状 [J]. 水利渔业, 2004, 24(1): 58-60.
- [2] 刘德建, 郑丽华. 南美白对虾红体病防治技术研究 [J]. 中国水产, 2008 (10): 61-62.
- [3] 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 病原副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的表型及分子特征 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 654-662.
- [4] 樊景凤, 李文哲, 臧红梅, 等. 凡纳滨对虾红体病病原 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(6): 742-746.
- [5] Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J, Romero J, et al. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2831-2840.
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [7] Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(2): 578-585.
- [8] Okura M, Osawa R, Arakawa E, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(7): 3533-3536.
- [9] Yu Y, Hu W, Wu B, et al. *Vibrio parahaemolyticus* isolates from southeastern Chinese coast were genetically diverse with circulation of clonal complex 3 strains since 2002 [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(11): 1169-1176.
- [10] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 204-212.
- [11] Su Y C, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [12] Chen W, Xie Y, Xu J, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 402-412.
- [13] Cohan F M. Bacterial species and speciation [J]. Systems Biology, 2001, 50(4): 513-524.
- [14] Chao G, Jiao X, Zhou X, et al. Systematic functional pandemic strain-specific genes, three genomic islands, two T3SSs in foodborne, and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(6): 689-698.
- [15] Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(6): 2156-2161.
- [16] DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, et al. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia [J]. Applied

- and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3999–4005.
- [17] Okura M, Osawa R, Iguchi A, *et al.* Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(10): 4676–4682.
- [18] Nishibuchi M, Fasano A, Russell R G, *et al.* Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(9): 3539–3545.
- [19] Park K S, Iida T, Yaaichi Y, *et al.* Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(10): 5742–5748.
- [20] Xu M, Yamamoto K, Honda T, *et al.* Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) [J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(15): 4757–4760.
- [21] Garcia K, Torres R, Uribe P, *et al.* Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7482–7487.
- [22] Mahoney J C, Gerding M J, Jones S H, *et al.* Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7459–65.
- [23] 周永灿, 张本, 陈雪芬, 等. 养殖对虾细菌性红体病的初步研究 [J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 61–65.
- [24] 樊景凤, 宋立超, 王斌, 等. 一株引起凡纳滨对虾红体病的病原菌-副溶血弧菌的初步研究 [J]. 海洋科学, 2006, 30(4): 40–44.

Molecular characteristics and antimicrobial sensitivity of bacterial pathogen from the outbreak of *Litopenaeus vannamei* red-body disease

CHEN Jian-shun, ZHU Ning-yu, KONG Lei, DING Xue-yan*, ZHENG Tian-lun, DU Jian-ming
(Zhejiang Fisheries Technical Extension Center, Zhejiang Aquatic Disease Prevention and Quarantine Center, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Red-body disease is one of the most severe diseases of *Litopenaeus vannamei*. An outbreak of *L. vannamei* red-body disease happened in a large-scale breeding farm in Zhejiang Province, 2011, with the mortality rate of >90%. A total of ten bacterial isolates were collected from the hepatopancreas of diseased shrimps, which were responsible for this outbreak. These isolates were identified as *Vibrio parahaemolyticus* by Vitek and 16S rRNA sequence analysis. Multilocus sequence typing (MLST) based on the concatenated genes *dnaE-gyrB-recA-dtdS-pntA-pyrC-tnaA* demonstrated that these isolates belonged to three novel sequence types (ST), with one isolate to ST413, seven to ST414 and two to ST415. ST413 contained two novel allelic profiles, *recA*-166 and *tnaA*-121, and ST414 harbored one novel allelic profile, *gyrB*-219. These novel allelic profiles and STs had been confirmed and deposited by the MLST website (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>). MLST results indicated these *V. parahaemolyticus* isolates did not originate from the same clone and exhibited remarkable genetic diversity. On the other hand, all of these isolates contained molecular markers for pandemic group, including a unique sequence within the *toxRS* operon, encoding transmembrane proteins involved in the regulation of virulence-associated genes, and *VPA1168* within an 16-kb insertion, which encodes a hypothetical protein with approximately 80% similarity to the Mn²⁺ and Fe²⁺ transporter in *V. vulnificus*. Also these isolates had the same virulence-associated gene composition (*tlh*⁺*tdh*⁺*trh*⁺*T3SSI*⁺*T3SS2*⁻) and antimicrobial sensitivity profiling. Absence of *tdh* and *trh*, which had traditionally been thought to be critical for the virulence of *V. parahaemolyticus*, did not lead to the reduction of bacterial pathogenicity in *L. vannamei*. Overall, these *V. parahaemolyticus* isolates might represent distinct variants within PG.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Vibrio parahaemolyticus*; molecular characteristics; antimicrobial sensitivity

Corresponding author: DING Xue-yan. E-mail: allan_523@163.com