

引起凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病的副溶血弧菌 MLST新序列型

孙明玉¹, 冯博¹, 张昭寰¹, 徐马俊坤¹, 刘伟奇¹,
刘海泉^{1,2,3,4}, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海海洋大学, 上海 201306;

4. 上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 针对12株引起凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)的致病性副溶血弧菌, 运用多位点测序技术, 分析致病菌株的遗传特征。实验选择副溶血弧菌的7个管家基因*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*及*tnaA*, 对12株AHPND致病菌扩增测序。将核酸序列上传至PubMLST数据库进行比对后获得每株菌的序列型。收集其他地区AHPND致病性副溶血弧菌的多位点序列分型(MLST)数据, 采用eBURST V3及MEGA 5.0软件进行遗传进化分析。结果显示, 2014年中国广东分离的AHPND致病株属于一个新序列型ST1710(42、134、99、79、141、41、51), 仅与库中ST415及ST975同源性较高。目前, 急性肝胰腺坏死致病株的9种ST型可归为2个克隆组和5个单体。经系统发育树进一步分析可知新序列型ST1710与单体ST975遗传关系相近。本研究首次报道中国AHPND分离株的序列型, 丰富了PubMLST数据库, 并为其遗传进化研究奠定了理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 急性肝胰腺坏死病; 副溶血弧菌; 多位点序列分型(MLST)

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

2009年中国的对虾养殖业首次暴发急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND), 这是一种新型非病毒性疾病, 死亡率高达100%, 危害十分严重^[1]。之后, 在越南(2010年), 马来西亚(2011年), 泰国(2012年), 墨西哥(2013年)和菲律宾(2015年)等地相继暴发^[2-6]。患病对虾肝胰腺肿大, 质地松软, 颜色呈淡白或淡黄色, 亦有部分患病对虾的肝胰腺明显萎缩, 质地变硬。截止到2013年, AHPND给亚洲的对虾养殖产业造成了前所未有的危害, 致使每年经济损失超过10亿美元^[7], 而且该病的影响范围仍有进一步扩大的趋势^[8]。Tran等^[9]研

究发现其致病源是一种特异性的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 这种变异的副溶血弧菌因获得表达致命毒素(PirA和PirB)的质粒而具有高致病性^[10]。这种能够引起对虾急性肝胰腺坏死病的副溶血弧菌简称为VP_{AHPND}^[11]。但迄今为止, 全球VP_{AHPND}相关的流行病学调查及遗传进化研究较少。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是高通量测序技术与成熟的群体遗传学相结合的产物^[12], 它通过等位基因图谱来定义菌株类型, 其信息清晰并且很容易通过电子媒介在全球传达, 从而推动全球的流行病学数据标准

收稿日期: 2017-05-23 修回日期: 2017-08-23

资助项目: 国家自然科学基金(31571917, 31671779); 上海市科委计划项目(14320502100); 上海市科技兴农项目(沪农科攻字2015第4-8号, 沪农科攻字2016第1-1号, 沪农科推字2017第4-4号); 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056); 上海市教委曙光计划(15SG48)

通信作者: 赵勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

化^[13]。MLST通常有6~10个管家基因,不同菌株中的管家基因序列存在差异,具有变化相对缓慢的突变累积效应,可以长期追踪菌株间遗传关系和宏观进化过程^[14]。利用MLST对不同时间、不同地区分离的菌株之间的亲缘关系进行评估,在分析菌株进化关系以及在判断分离株是否属于高致病性克隆系等方面,可以弥补传统方法分型的不足。近年来研发的高分辨率MLST陆续被应用于病原菌的流行病学研究^[15]。

AHPND的暴发出现较晚,已有的VP_{AHPND}序列型仅有8种,目前尚未找到VP_{AHPND}的高致病性克隆系。中国的对虾养殖业AHPND的疫情早有报道,但PubMLST数据库缺少中国VP_{AHPND}分离株的MLST数据。因此,本研究运用多位点序列分型的方法对中国广东分离的12株VP_{AHPND}进行研究,并与PubMLST数据库中其他地区AHPND分离株的分型信息进行对比,分析其遗传进化关系,为更有效地预防和控制AHPND的暴发流行提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

本实验保存的12株AHPND致病性副溶血弧菌分离自中国广东某规模化凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场。具体分离步骤:根据GB 4789.7-2013《食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验》方法分离养殖场中的副溶血弧菌。菌株致病性按照Lee等^[10]的实验方法进行鉴定。筛选出的AHPND致病株方可进行本实验研究。

1.2 培养基与主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基(TCBS)购自北京陆桥技术有限责任公司;革兰氏染色液试剂盒购自温州市康泰生物科技有限公司;TIANamp Bacteria DNA Kit(离心柱型)试剂盒,Agarose LE, GeneGreen Nucleic Acid Dye, Marker D2000购自天根生化科技(北京)有限公司;2×Taq PCR Master Mix购自上海莱枫生物科技有限公司。苏木精、伊红染色液、中性树脂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 细菌培养与核酸提取

将副溶血弧菌接种于TCBS培养基上,37℃

培养16~24 h,挑取单菌落接种到TSB+(3% NaCl)液体培养基中,37℃培养过夜。取1~5 mL菌液,用TIANamp Bacteria DNA Kit(离心柱型)试剂盒,按说明书提取细菌的基因组DNA,琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA的完整性,使用Synergy多功能酶标仪检测其浓度,并于-20℃保存。

1.4 革兰氏染色

取一滴无菌蒸馏水滴于载玻片上,用接种环取TCBS培养板中少量待染色菌于蒸馏水中,均匀涂布后在火焰上固定。滴加结晶紫染色液初染1 min,清水冲洗后滴加革兰氏碘液媒染1 min,水洗后用95%乙醇脱色至无紫色脱落,番红染色液复染10 s后水洗。待干,油镜观察。

1.5 组织病理学检查

采用Bouin固定液对凡纳滨对虾肝胰腺进行固定。固定后的组织经酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后通过LEICA RM2245型切片机进行切片,厚度为5.0~7.0 μm。切片经H.E染色后滴加中性树胶封片。采用Zeiss Axio Scope A1型显微镜观察拍照,每组重复3~5个样品。

1.6 MLST管家基因引物的选择与合成

选择副溶血弧菌*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*及*tnaA* 7个管家基因作为MLST分析基因。PCR扩增引物为PubMLST网站(<https://pubmlst.org/vparahaemolyticus/info/protocol.shtm>)副溶血弧菌推荐引物(表1),由上海生工生物工程有限公司合成。

1.7 管家基因的扩增体系及条件

PCR反应体系(50 μL): 2×Taq PCR Master Mix(0.1 U/μL Taq DNA polymerase, 0.4 mmol/L each dNTPs, 2×Taq Buffer, 红色和黄色2种指示染料, PCR增强剂和蛋白稳定剂)25 μL, 上、下游引物各2 μL, DNA模板2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 96℃变性1 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30次循环后72℃延伸10 min。取5 μL PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳,电泳条件: 120 V, 30 min。Gel Doc™XR型凝胶成像系统中观察扩增效果。

1.8 管家基因位点的测序及数据分析

将PCR扩增产物送往上海生工生物工程有限公司,使用7对测序引物进行测序。测序结果经

表 1 用于MLST分析的7对引物实验参数
Tab. 1 Parameters of seven primers used for MLST analysis

基因 genes	引物 primers	引物序列(5'~3') sequence of primers	扩增长度/bp amplification length	退火温度/°C annealing temperature
<i>dnaE</i>	<i>dnaE-F</i>	CGRATMACCGCTTTCGCCG	596	58
	<i>dnaE-R</i>	GAKATGTGTGAGCTGTTTGC		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB-F</i>	GAAGGBGGTATTCAAGC	629	58
	<i>gyrB-R</i>	GAGTCACCCCTCCACWATGTA		
<i>recA</i>	<i>recA-F</i>	GAAACCATTTCACCGGGTTC	773	58
	<i>recA-R</i>	CCATTGTAGCTGTACCAAGCACCC		
<i>dtdS</i>	<i>dtdS-F</i>	TGGCCATAACGACATTCTGA	497	58
	<i>dtdS-R</i>	GAGCACCAACGTGTTTAGC		
<i>pntA</i>	<i>pntA-F</i>	ACGGCTACGAAAAGAAATG	470	58
	<i>pntA-R</i>	TTGAGGCTGAGCCGATACTT		
<i>pyrC</i>	<i>pyrC-F</i>	AGCAACCGGTAAAATTGTCCG	553	58
	<i>pyrC-R</i>	CAGTGTAAGAACCGGCACAA		
<i>tnaA</i>	<i>tnaA-F</i>	TGTACGAAATTGCCACCAAA	463	58
	<i>tnaA-R</i>	AATATTTTCGCCGCATCAAC		

BioEdit软件去除两端无效的错误序列后由DNAMAN软件进行拼接, 拼接结果上传至PubMLST副溶血弧菌数据库(<https://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>)比对, 由此获得各管家基因位点的等位基因数值, 并将以*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*为顺序形成的等位基因谱提交至MLST网站, 确定副溶血弧菌菌株的序列型(sequence type, ST)。

1.9 序列型特征分析

在PubMLST副溶血弧菌数据库等位基因检索项(https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_vparahaemolyticus_seqdef&page=profiles)中检索统计新序列型ST1710相近序列型。通过DNAMAN软件比对分析各管家基因突变率, 并以*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*为顺序拼接序列, 比对分析不同序列型之间的相似性。

1.10 MLST

在PubMLST数据库中下载已知AHPND致病株的各等位基因型及序列型, 将下载结果输入至eBURST V3程序(<http://eburst.mlst.net/>)进行聚类分析以确定不同的克隆群(clonal complex, CC)、组(doublets, D)和单体(singletons, S)。用最严格的

分组定义同源复合体, 即7个等位基因中至少有6个是相同的, 则被认为是同分型组^[16], 若该组中含4个及以上的序列型, 即为一个克隆群; 不属于任何一个同源复合体的序列型为单体。

1.11 系统发育分析

比对每个ST型所对应的7个等位基因的连锁序列, 采用Mega 5.0软件构建所有AHPND致病株序列型的最小进化(ME)树, 以分析不同序列型菌株间的亲缘关系。使用Kimura双参数模型估计进化距离, 并采用1000次重复的自展检验(Bootstrap)。

2 结果

2.1 VP_{AHPND}的鉴定与各管家基因扩增结果

经鉴定, 12株筛选出的VP_{AHPND}生理生化特征一致, 在TCBS上呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落(图1-a), 革兰氏染色结果为阴性(图1-b), 被致病株感染的对虾产生明显的病理特征: 胰腺细胞间隙变大, 细胞核变小, 腺细胞有不同程度的自溶现象(图1-c)。致病株的7个管家基因均可扩增, 并且有很好的稳定性和重复性, 其基因大小如图2所示。经检验各扩增产物的核

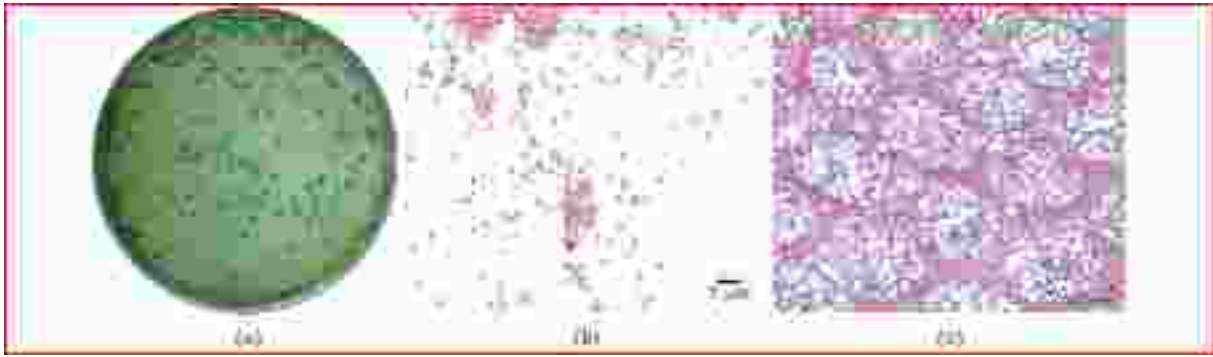


图1 AHPND致病株F2的形态与病理特征

(a)菌落形态; (b)革兰氏染色结果; (c)经AHPND致病株感染后的对虾肝胰腺组织切片

Fig. 1 Morphological and pathological features of VP_{AHPND}-F2

(a) colonial morphology of VP_{AHPND}-F2; (b) Gram staining of VP_{AHPND}-F2; (c) histological sections of hepatopancreas from the shrimps challenged with VP_{AHPND}-F2

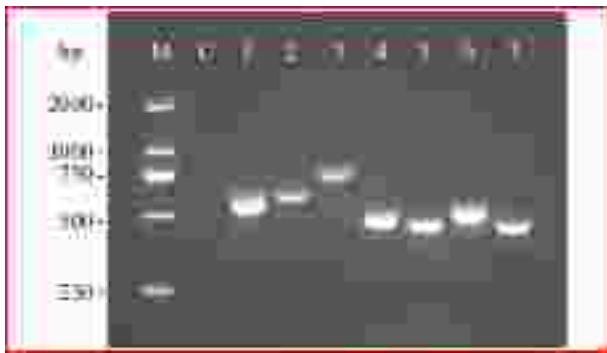


图2 7个管家基因PCR扩增结果

Fig. 2 The PCR products of seven housekeeping genes

M. 2000 bp Marker; C. control; 1. *dnaE*; 2. *gyrB*; 3. *recA*; 4. *dtdS*; 5. *pntA*; 6. *pyrC*; 7. *tnaA*

酸浓度均高于50 ng/μL, 且扩增产物条带单一无杂带, 可用于MLST分型研究。

2.2 序列型特征分析

2014年中国广东分离的12株VP_{AHPND}属于同一个ST(42、134、99、79、141、41、51), 各管家基因均为已知等位基因型, 但其等位基因组合并没有相对的序列型。将菌株信息及基因型上传多位点序列分型数据库后, 现已被收录并确认其序列型为ST1710。

截止到2017年7月, PubMLST副溶血弧菌数据库中序列型已经更新至ST1738, 仅有ST265检索不到, 因此本研究在1737个序列型中检索与ST1710相近的序列型。经统计, 与ST1710有2个或2个以上相同等位基因位点的序列型共有5个(表2), 有任意1个等位基因位点相同的有112个, 其余均无相同等位基因。

为进一步分析其序列特征, 本研究以接近ST1710的2个序列型作为参比进行分析。在

表2 与新序列型ST1710相近序列型的特征分析

Tab. 2 Analysis of characteristics of ST1710 similar sequence type

序列型 ST	分离株 isolate	年份 year	国家 country	来源 source	MLST						
					<i>dnaE</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>dtdS</i>	<i>pntA</i>	<i>pyrC</i>	<i>tnaA</i>
415	S6-b	2011	中国 China	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	42	134	99	79	26	41	51
975	E74	2013	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	42	134	99	164	26	41	26
1394	yuke4	2012	中国 China	环境 environment	42	84	31	17	104	129	51
1427	LouY18	2014	中国 China	环境 environment	31	82	236	35	141	26	51
1476	VPD58	2012	中国 China	环境 environment	104	349	25	282	141	141	51
1710	F2	2014	中国 China	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	42	134	99	79	141	41	51

注: 新序列型ST1710等位基因型加粗, 其他与其相近序列型中相同的等位基因型用灰色阴影表示
Notes: bold font represents the seven loci of ST1710; Gray shading represents the same allele as ST1710

PubMLST副溶血弧菌数据库序列型中, ST1710与ST415最为相近, 仅有1个等位基因 $pntA$ 不同: 有1个突变点; 其次与ST975有3个等位基因不同: $dtdS$ 有11个突变点, $pntA$ 有1个突变点, $tnaA$ 有3个突变点(表3)。其余仅有2个及以下相同的等位基因。ST415与ST975也较为相近, 仅相差2个等位基因位点($dtdS$ 和 $tnaA$)。新序列型ST1710, 与ST415及ST975相似性均高于99%, 由此可推测它们源自同一祖先菌株。

表3 MLST等位基因核苷酸突变位点信息

Tab. 3 Genetic diversity at the seven loci examined in the study

序列型 ST	等位基因 locus	突变数/碱基数(核酸突变率/%) variable nucleotide site	
		ST415	ST975
ST1710	$dnaE$	0/557(0)	0/557(0)
	$gyrB$	0/592(0)	0/592(0)
	$recA$	0/729(0)	0/729(0)
	$dtdS$	0/458(0)	11/458(2.4)
	$pntA$	1/430(0.2)	1/430(0.2)
	$pyrC$	0/493(0)	0/493(0)
	$tnaA$	0/423(0)	3/423(0.7)
	相似性 similarity	99.9	99.6

2.3 MLST分型结果

目前VP_{AHPND}分离株MLST信息共计已发表12株, 其中11株泰国分离株中4株属于ST970, 2株为ST975, 其余分别为ST971、ST982、ST983、ST114和ST413, 1株墨西哥分离株属于ST539型^[17]。中国VP_{AHPND}分离株属于一个新ST型, 与墨西哥及泰国致病株ST型均不相同。中国出现的ST1710以及泰国的ST970、ST971、ST975、ST982、ST983均为近期发现的新序列型, 仅有ST114、ST413、ST539是PubMLST数据库中已有的副溶血弧菌多位点序列分型数据。

VP_{AHPND}相关的9个序列型经eBURST V3在线软件分析并没有形成明显的克隆群, 仅有2个克隆组和5个单体, 其中克隆组包含D1(ST970、ST983)和D2(ST413、ST971)(图3)。通常情况下eBURST聚类分析与ME最小进化树分析结果一致, 但ME树能更好地分析eBURST中单体与其他序列型之间的亲缘关系^[18]。本研究中VP_{AHPND}无



图3 急性肝胰腺坏死致病性副溶血弧菌的eBURST分析结果

数字表示ST。圆圈大小与ST中菌株数量相关

Fig. 3 Cluster analysis of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* by eBURST v3.0

STs are shown by figures. The sizes of the circles are relative to the number of strains in the ST

克隆群并且多为单体, 为进一步分析各序列型之间的关系, 需进行系统发育分析。

将AHPND致病株的9个序列型的7个管家基因连接序列生成ME最小进化树(图4)。VP_{AHPND}序列型主要分为两个集群(I和II), 基于eBURST分析中的D2与已发现的单体属于同一个集群。ST1710为单体, 未包含在克隆群中, 但与致病株序列型ST975遗传关系最近, 属于同一进化支, 这与“序列型特征分析”中序列相似性分析结果一致。

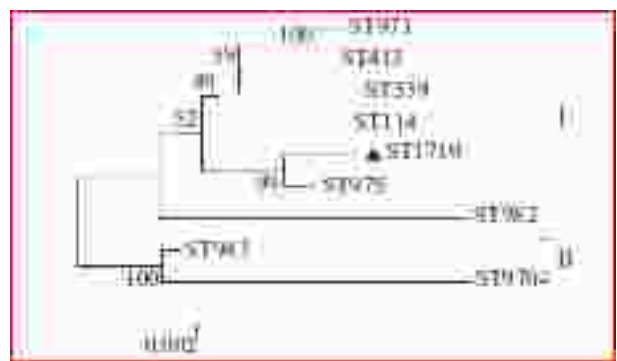


图4 不同ST型之间的进化关系

Fig. 4 The evolutionary relationship among the different STs

为比较AHPND致病株与非致病株之间的遗传关系, 对数据库中1737个序列型进行聚类分析。研究发现, 目前全球收集到的副溶血弧菌序列型中与AHPND致病株密切相关序列型有

5个: ST233、ST415、ST713、ST837和ST971, 均分离自环境(图5), 这些序列型菌株虽然不具有AHPND致病性, 但与AHPND致病株属于同一克隆群或组。ST415与中国发现的ST1710遗传关系最近, 它与致病株序列型ST413首次发现都是在中国浙江, 在患有红体病的对虾中分离出^[19]。ST971型菌株仍然是在AHPND病虾中分离, 但不具有致病性^[17]。除ST837无菌株分离信息外, ST233和ST713均分离自虾类。综上可知, AHPND序列型及其相关非AHPND序列型分离株均来自于环境, 并且与养殖虾类密切相关。

3 讨论

凡纳滨对虾肉质鲜美, 营养价值高, 与斑节对虾(*Penaeus monodon*), 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)并列为当今世界三大养殖虾类。然而2009年暴发的急性肝胰腺坏死病对亚洲的对虾养殖业造成了严重危害, 其中凡纳滨对虾与斑节对虾受损最为严重。据泰国渔业数据显示, 由于泰国湾西海岸暴发AHPND, 致使2013年的虾类总量减少30%^[20], 同期中国的养殖对虾产量下跌超过13%, 养殖业损失惨重^[21]。研

究发现, AHPND由细菌毒素引起, 携带*pirA/B*毒力基因的副溶血弧菌产生的可溶性毒素作用于肝胰腺, 从而导致上皮细胞脱落, 肝胰腺功能丧失^[10]。

目前发现的AHPND致病株分布于多个国家, 菌株材料难以集中。多位点序列分型是近年来发展很快的分子生物学分析方法, 能够将测序结果数字化, 有利于国际间不同地区数据的比较^[22], 既适用于流行病学研究, 也可用于分子进化学的研究^[23]。多位点序列分型数据库(<https://pubmlst.org/>)为国际公认的登载微生物分子分型信息的重要数据库。本研究中发现的中国VP_{AHPND}新序列型ST1710已被该数据库确认并收录。目前VP_{AHPND}的STs更新为9种, 分别为ST114、ST413、ST539、ST970、ST971、ST975、ST982、ST983和ST1710。中国发现的ST1710仅与PubMLST数据库中ST415同源性最高, 其次是ST975。AHPND致病株相关的9个STs还未形成克隆群, 仅有2个克隆组和5个单体, 其中ST1710与致病株ST975有较为密切的遗传关系。对ST975进行序列特征分析可知: 它同样仅与ST415同源性最高, 其次是致病株ST1710。由此可推测它们由同一菌株进化而来。

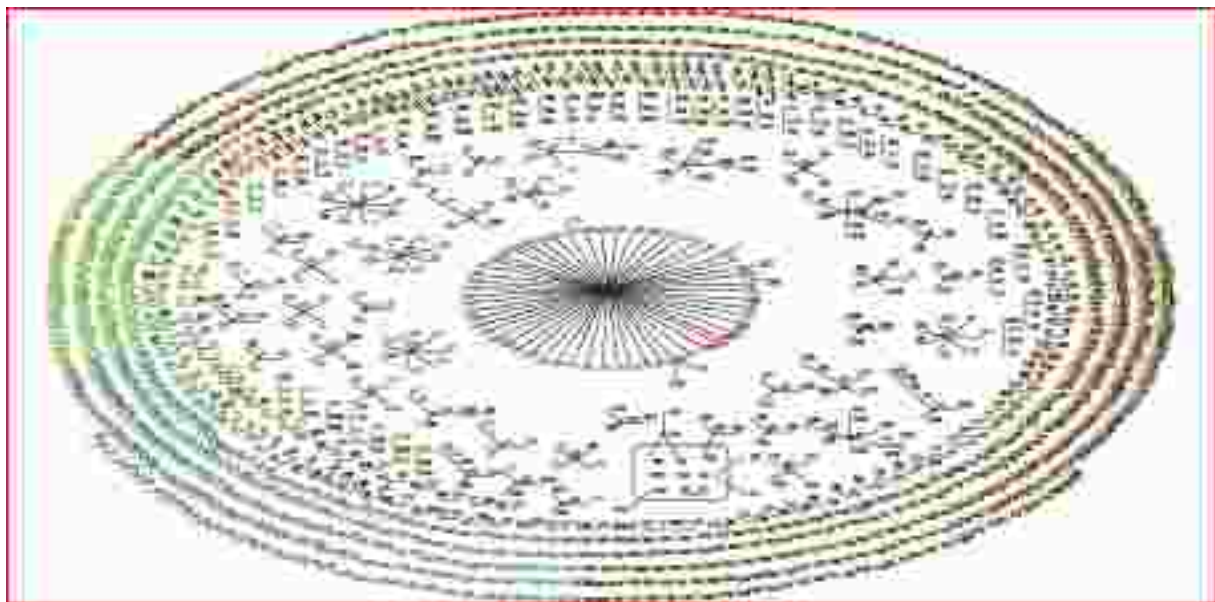


图 5 PubMLST数据库中1737个副溶血弧菌序列型的聚类分析

黑色数字代表环境中分离株序列型; 绿色数字代表临床分离株序列型; 红色数字的分离株序列型在环境和临床中均有发现; 蓝色数字的序列型无分离株具体信息。红框中是AHPND致病株序列型

Fig. 5 Cluster analysis of 1737 *V. parahaemolyticus* sequence types archived in PubMLST database

Black numbers indicate STs typed in environmental isolates; green numbers represent clinical STs; red numbers are STs that found in both clinical and environmental collections; blue numbers has no isolates information. In the red box is the AHPND STs

根据本研究的MLST聚类分析可知, VP_{AHPND}可被归为9个序列型, 遗传多样性较高, 但由于不同序列型的致病株均携带毒力基因*pirA/B*, 因此AHPND毒力基因可能通过基因水平转移获得^[7]。9种AHPND序列型以及与其相近的非AHPND序列型分离株均来自于水产养殖环境。不同的生长环境条件, 如海水、泥沙、鱼胃肠道、浮游动物外壳等, 其养分、温度等理化性质(如pH值)也会不同, 这些参数的变化往往需要细菌不断地适应; 另外, 环境中存在的噬菌体也可以促进弧菌和其他海洋细菌间的基因转移^[24]。由此推测水产养殖的环境可能会对不同菌株间的AHPND毒力基因的水平转移产生一定的影响。

近年来, 虾养殖业中AHPND的病例频发, 受到越来越多的关注。中国作为AHPND的始发地, 对于VP_{AHPND}的遗传研究尤为重要。本研究首次分析并获得了中国AHPND致病性副溶血弧菌分离株的新序列型, 丰富了PubMLST数据库, 为致病性副溶血弧菌的遗传进化研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Han J E, Tang K F J, Pantoja C R, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture*, 2015, 442: 12-15.
- [2] Lightner D V, Redman R M, Pantoja C R, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia[J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40.
- [3] Nunan L, Lightner D, Pantoja C, *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 81-86.
- [4] Soto-Rodriguez S A, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689-1699.
- [5] Joshi J, Srisala J, Truong V H, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. *Aquaculture*, 2014, 428-429: 297-302.
- [6] FAO. FAO Fisheries and Aquaculture Report[C]//FAO Second International Technical Seminar/Workshop on acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): There is A Way Forward (under TCP/INT/3502). Panama: FAO, 2016: 9.
- [7] 徐含颖, 张婉蓉, 张学舒, 等. 对虾早期死亡综合症的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2015(6): 166-167.
- Xu H Y, Zhang W R, Zhang X S, *et al.* Research advances in early mortality syndrome of shrimp[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015(6): 166-167(in Chinese).
- [8] 唐小千, 徐洪森, 战文斌. 对虾急性肝胰腺坏死综合症研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2016(2): 90-93.
- Tang X Q, Xu H S, Zhan W B. Advances in study of shrimp acute hepatopancreas necrosis syndrome[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(2): 90-93(in Chinese).
- [9] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [10] Lee C T, Chen I T, Yang Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798-10803.
- [11] Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, *et al.* Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126987.
- [12] Marri P R, Harris L K, Houmiel K, *et al.* The effect of chromosome geometry on genetic diversity[J]. *Genetics*, 2008, 179(1): 511-516.
- [13] Vázquez J A, Berrón S. Multilocus sequence typing: the molecular marker of the internet era[J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2004, 22(2): 113-120.
- [14] 黄东红, 范春梅, 朱炎, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的MLST分型及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(23): 5312-5314.
- Huang D H, Fan C M, Zhu Y, *et al.* MLST typing and

- drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2016, 26(23): 5312-5314(in Chinese).
- [15] Maiden M C J. Multilocus sequence typing of bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 561-588.
- [16] Feil E J, Li B C, Aanensen D M, *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1518-1530.
- [17] Chonsin K, Matsuda S, Theethakaew C, *et al.* Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(2): fnv222.
- [18] Chao G X, Wang F, Zhou X H, *et al.* Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 pandemic clone[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(2-3): 459-463.
- [19] 陈健舜, 朱凝瑜, 郑天伦, 等. 10株副溶血弧菌多位点序列分型新序列型[J]. 水产科学, 2012, 31(9): 540-543. Chen J S, Zhu N Y, Zheng T L, *et al.* Ten new sequence type isolates of *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(9): 540-543(in Chinese).
- [20] Hong X P, Lu L Q, Xu D. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 577-593.
- [21] 文国樑, 曹煜成, 徐煜, 等. 养殖对虾肝胰腺坏死综合症研究进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(11): 118-123. Wen G L, Cao Y C, Xu Y, *et al.* Review on hepatopancreas necrosis syndrome of shrimp[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(11): 118-123(in Chinese).
- [22] Hanage W P, Fraser C, Spratt B G. Sequences, sequence clusters and bacterial species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 361(1475): 1917-1927.
- [23] Maiden M C J, Bygraves J A, Feil E, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [24] Jiang S C, Paul J H. Gene transfer by transduction in the marine environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 2780-2787.

New sequence type isolates of AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus* from *Litopenaeus vannamei* by multilocus sequence typing

SUN Mingyu¹, FENG Bo¹, ZHANG Zhaohuan¹, XU Majunkun¹, LIU Weiqi¹,
LIU Haiquan^{1,2,3,4}, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai),
Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Twelve strains of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) were chosen, and their genetic characteristics were analyzed by the multilocus sequence typing method. Seven house-keeping genes (*dnaE*, *gyrB*, *recA*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* and *tnaA*) of *V. parahaemolyticus* were selected as target genes for PCR amplification and nucleic acid sequencing. The sequences of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* in this study were uploaded to the PubMLST database for multi-alignment to determine the sequence type of each strain. MLST data of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* from other areas were collected and the genetic evolution was analyzed by MEGA 5.0 and eBURST V3 software. AHPND-causing *V. parahaemolyticus* isolated from Guangdong province in 2014 belonged to the new sequence type ST1710(42, 134, 99, 79, 141, 41, 51). Compared with other sequence types in PubMLST database, it has the high homology with ST415 and ST975. The 9 STs of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* were separated by eBURST into two doublets and five singletons. Phylogenetic tree analysis showed that the new sequence type ST1710 was similar to the singletons ST975. Our study is the first report of molecular epidemiology of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* strains in China using multilocus sequence typing, and enriches the PubMLST database and provides an insight into their evolutionary mechanisms.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; AHPND(acute hepatopancreatic necrosis disease); *Vibrio parahaemolyticus*; MLST(multilocus sequence typing)

Corresponding author: ZHAO Yong. E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31571917, 31671779); The Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (14320502100); Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (G20150408, G20160101, T20170404); Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-10-E00056); The “Dawn” Program of Shanghai Education Commission (15SG48)