

文章编号: 1000-0615(2019)05-1369-09

DOI: 10.11964/jfc.20180211180

水生动物源嗜芳香环弧菌的鉴定及耐药性分析

赵 姝¹, 姜 兰², 周俊芳¹, 王 元¹, 房文红^{1*}

(1. 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;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 本研究从患病的半滑舌鳎分离得到5株弧菌, 对其进行种属鉴定, 并研究其耐药性及分子水平耐药机制。采用生化检测方法和分子生物学方法(基因16S *rRNA*、*HSP60*和*mreB*)进行鉴定, 结果显示, 5株弧菌均为嗜芳香环弧菌。通过肉汤稀释法检测菌株对抗菌药物的耐药性, 通过PCR扩增和测序技术检测菌株中耐药基因和4类整合子并对其携带基因盒进行分析。结果显示, 5株嗜芳香环弧菌均对环丙沙星、链霉素、红霉素、氟苯尼考、氨苄西林、磺胺甲恶唑、复方新诺明和利福平耐药, 且均携带*qnr VC*、*bla_{CARB-17}*、*strA*、*strB*和*sul*耐药基因。此外, 菌株JS291和JS295携带I类整合子、*qacEΔ1*和*sul1*耐药基因; 可变区携带基因盒分别为*dfr16-aadA2*和*arr-3-dfrA27*。5株嗜芳香环弧菌为多重耐药菌株, 且多重耐药表型与耐药基因密切相关。

关键词: 半滑舌鳎; 嗜芳香环弧菌; 耐药性; 整合子

中图分类号: Q 786; S 941.42

文献标志码: A

弧菌(*Vibrio*)是海水养殖中常见的条件致病菌, 可感染海水养殖动物发生细菌性疾病, 给水产养殖业造成巨大的经济损失。目前, 使用抗菌药物仍然是治疗细菌性疾病的主要方法, 然而抗菌药物的频繁使用导致海水养殖源弧菌产生严重的耐药性^[1-2]。弧菌的耐药性及多重耐药性与耐药基因的存在密切相关, 耐药基因的水平转移是耐药问题不断发展的最重要的遗传机制^[3]。多种与临床上重要抗菌药物(如氟喹诺酮类、大环内酯类、头孢菌素类、氨基糖苷类和四环素类等)相关的耐药基因与耐药遗传元件(如整合子等)在养殖源弧菌中不断被报道^[4]。因此, 开展弧菌耐药表型与耐药机制之间关系的研究, 对防治弧菌多重耐药性的产生及其耐药性的传播扩散具有重要的意义。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎

属(*Cynoglossus*), 具有肉质鲜美、营养价值高、经济价值高等特点, 已成为我国北方沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一^[5]。近年来, 随着半滑舌鳎人工养殖规模的逐渐扩大, 病害成为制约其产业发展的主要问题。除常见的寄生虫疾病外, 由病原菌引起的半滑舌鳎烂鳍烂尾病、体表溃疡病、腹水病也尤为常见^[6]。2013年江苏赣榆某养殖厂工厂化养殖的半滑舌鳎发生大面积死亡现象, 病鱼特征: 鳍条和鳃盖有明显的出血, 严重者肌肉发生溃烂, 解剖发现有腹水, 肠道内无食物, 肝脏白化。本实验室从具有典型症状的患病半滑舌鳎分离到5株弧菌, 对其分类地位、耐药性、耐药基因和整合子——基因盒系统开展研究, 以期了解上述5株弧菌的耐药程度和耐药分子机制, 为防治弧菌耐药性的传播扩散和半滑舌鳎类疾病提供一定的科学理论依据。

收稿日期: 2018-02-09 修回日期: 2018-05-04

资助项目: 农业农村部渔用药物创制重点实验室开放基金(201410); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2013A0603)

通信作者: 房文红, E-mail: fwenhong@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 菌株来源

5株弧菌(JS291、JS295、JS299、JS354和JS360)分离自江苏赣榆某养殖场发病的半滑舌鳎,经回感实验确定其对半滑舌鳎具有较强的致病性,于本实验室保存。抗菌药物敏感性实验质控菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC25922购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。

1.2 主要试剂

细菌生化微量鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司;硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、2216E固体培养基和MH肉汤购自青岛海博生物技术有限公司;PremixEx Taq™ (Version 2.0 plus dye)、DNA Marker DL2000、琼脂糖购于宝生物工程(大连)有限公司;DuRed核酸染料(10 000×水溶液)购于上海翊圣生物科技有限公司;细菌DNA提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;pMDTM18-T Vector Cloning Kit、Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit和PCR相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;其他相关试剂购自国药集团上海化学试剂有限公司。

1.3 实验仪器

恒温培养箱(MIR-254, Sanyo),恒温摇床(SHKE5000-8CE, Thermo),PCR仪(6325, Eppendorf),高速冷冻离心机(CF16RX II, HITACHI),电泳仪(DYY-7C, 北京六一仪器厂),凝胶成像仪(G05-7500, BIO-RAD),微量移液器(Eppendorf, 德国),电子天平(PL3002, 上海梅特勒-托利多)。

1.4 实验方法

菌株的分离、纯化和保存 在无菌环境下,用接种环挑取少许发病半滑舌鳎的溃烂组织接种至TCBS培养基(盐度为25),28℃培养16~18 h;之后分别挑取形态特征一致的优势单菌落至TCBS培养基和2216E培养基上分别纯化一次,直至所分离的菌株形态、颜色、大小一致为止;再挑取单菌落接种于TSB肉汤中,28℃摇床中200 r/min培养16~18 h。菌液中加入终浓度为20%的甘油,置于-80℃冰箱中保存^[7-8]。

菌株的鉴定 理化特征鉴定。菌株各项生化指标的测定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9]。

分子生物学鉴定。将5株菌株(JS291、JS295、JS299、JS354和JS360)分别接种于含3%NaCl的TSB肉汤中,28℃摇床中200 r/min过夜培养,再使用细菌基因组提取试剂盒提取总DNA。使用针对弧菌的HSP60、mreB基因引物以及16S rRNA基因通用引物(表1)进行PCR扩增并测序,将测序结果与GenBank中的序列比对分析。

药物敏感性实验 采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[10]描述的微量肉汤稀释法测定了5株弧菌对14种抗菌药物的敏感性,即环丙沙星、氯霉素、氟苯尼考、红霉素、新霉素、链霉素、多西环素、利福平、磺胺甲恶唑、复方新诺明、头孢吡肟、氨苄西林、美罗培南和呋喃妥因。同时,以大肠杆菌ATCC 25922作为质控菌株。将甘油保存的5株弧菌分别接种于TSB肉汤中,28℃,200 r/min摇床中培养16~18 h,随后用MH肉汤稀释菌液至0.5麦氏比浊度。在96孔板(100 μL/孔)中采用倍比稀释法将药物稀释成10个浓度梯度,然后向各孔中加入100 μL稀释后的菌悬液。同时设置阴

表1 弧菌鉴定所用引物

Tab. 1 The primers used in the detection of *Vibrio* spp.

基因 genes	引物 primers	序列(5'-3') primers sequence (5'-3')	产物长度/bp product	来源 reference
16S rRNA	16S rRNA F	GATCATGGCTCAGATTGAACG	1 536	[11]
	16S rRNA R	GTGATCCAGCGCCAGGTTC		
HSP60	HSP60 F	ACAACAGCAACGGTACTAGC	550	[12]
	HSP60 R	CAACTTTCACGATGCCAC		
mreB	mreB F	ACTTCGTGGCATGTTTTTC	1 000	[13]
	mreB R	CCGTGCATATCGATCATTTTC		

性(200 μL菌液)和阳性(200 μL MH肉汤)对照, 每种药物做3个平行。将96孔板置于(28±2) °C恒温培养箱中培养16~18 h, 观察结果。将无菌生长的最低药物溶液浓度视为最小抑菌浓度(MIC)。

整合子和耐药基因的检测 依据药敏实验结果, 本研究采用PCR方法检测了氨基糖苷类、β-内酰胺类、氟喹诺酮类、酰胺醇类等抗菌药物耐药基因, 包括 bla_{OXA} 、 bla_{TEM} 、 bla_{SHV} 、 bla_{CTX-M} 、 $bla_{CARB-17}$ 、 $strA$ 、 $strB$ 、 $cat1$ 、 $floR$ 、 $fexA$ 、 cfr 、 $gyrA$ 、 $parC$ 、 $qnrVC$ 、 $ermA$ 、 $ermB$ 和 $ermC$ 等。将琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的基因送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 之后将测序结果与NCBI数据库中的序列进行比对验证。

为了解5株弧菌中整合子的携带情况, 本研究采用PCR方法检测了I、II、III整合子^[14]和4类整合子SXT^[14]整合酶基因。另外, 还对I类整合子3'CS保守区的 $sul1$ 和 $qacEΔ1$ 基因^[15]及5'保守区的 $int1$ 基因进行了检测。依据I类整合子5'CS和3'CS保守区的检测结果, 利用Hep58/ Hep59引物^[14]检测了I类整合子可变区。PCR产物经电泳检测及纯化后送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 之后进行BLAST比对分析。

2 结果

2.1 弧菌的分离与鉴定

5株菌株在TCBS上生长良好, 形成表面粗糙、淡黄色的圆形隆起的菌落。革兰氏染色呈阴性, 氧化酶反应呈阳性, 其他生理生化特征见表2。常规鉴定结果显示, 所分离的菌株JS291、JS295、JS299、JS354和JS360的理化特征与已有文献^[16]中标准菌株P-2P44T一致, 说明所分离的这5株菌株符合嗜嗜芳香环弧菌(*V. cyclotrophicus*)的特征。

分别从菌株JS291、JS295、JS299、JS354和JS360扩增HSP60、16S rRNA和mreB基因, 结果分别得到大小为550、1 465和1 000 bp的目的片段, BLAST比对结果显示, 上述5株弧菌序列与嗜嗜芳香环弧菌相似性最高(相似性达99%)。综上所述, 菌株JS291、JS295、JS299、JS354和JS360鉴定为嗜嗜芳香环弧菌。

2.2 药敏实验

5株嗜嗜芳香环弧菌对14种抗菌药物的药敏实验结果显示, 5株嗜嗜芳香环弧菌均对环丙沙星、

表 2 5株菌株的生理生化特征

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of five strains

生理生化特征 characteristics	JS291	JS295	JS299	JS354	JS360	P-2P44T
发光 luminescence	-	-	-	-	-	-
VP反应 VP reaction	-	-	-	-	-	-
氧化酶 oxidase	+	+	+	+	+	+
脲酶 urease	-	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
精氨酸 arginine	+	+	+	+	+	+
明胶 gelatin	-	-	-	-	-	+
吲哚 indole	-	-	-	-	-	-
3%氯化钠胨水 peptone salt water (3%)	+	+	+	+	+	+
丙酮酸 pyruvic acid	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 nitrate reduction	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气 gas production from glucose	-	-	-	-	-	-
葡萄糖 glucose	+	+	+	+	+	+
木糖 xylose	+	+	+	+	+	+
纤维二糖 cellobiose	-	-	-	-	-	+
蔗糖 sucrose	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	-	-	-
麦芽糖 maltose	+	+	+	+	+	V
甘露糖 mannose	-	-	-	-	-	-
半乳糖 galactose	+	+	+	+	+	+
水杨苷 salicin	-	-	-	-	-	-
山梨醇 sorbitol	-	-	-	-	-	-
肌醇 inositol	-	-	-	-	-	-
枸橼酸盐 citrate	+	+	+	+	+	N

注: “+”为阳性, “-”为阴性, “V”表示结果有变化, “N”表示未进行该指标测定; P-2P44T理化特征参考文献Hedlund & Staley 2001^[16]
Notes: “+”means positive, “-”means negative, “V”means variable, “N” means not done; the physiological and biochemical characteristics of P-2P44T were referred to Hedlund & Staley 2001^[16]

链霉素、红霉素、氟苯尼考、氨苄西林、磺胺甲恶唑、复方新诺明和利福平表现出耐药，其中磺胺甲恶唑和复方新诺明表现出较高的耐药水平(表3)。

表3 5株嗜芳香环弧菌对14种抗菌药物的MIC结果
Tab.3 MICs of five *V. cyclotrophicus* strains to 14 antimicrobial agents

抗菌药物 antimicrobial agents	MIC判定折点			MIC				
	S(敏感)	I(中介)	R(耐药)	JS291	JS295	JS299	JS354	JS360
环丙沙星 ^a ciprofloxacin	≤1	2	≥4	8	8	4	4	8
氯霉素 ^a chloramphenicol	≤8	16	≥32	16	8	4	4	8
氟苯尼考 ^b florfenicol	≤2	4	≥8	32	16	8	16	8
多西环素 ^a doxycycline	≤4	8	≥16	1	2	1	32	16
新霉素 neomycin	-	-	-	8	8	4	4	8
链霉素 ^c streptomycin	-	-	≥16	64	32	16	16	32
红霉素 ^d erythromycin	≤0.5	1-4	≥8	16	16	8	8	16
磺胺甲恶唑 ^a SMZ	≤256	-	≥512	>2 048	>2 048	>2 048	>2 048	>2 048
复方新诺明 ^a TMP/SMZ	≤2/38	-	≥4/76	>128/2 432	>128/2 432	>128/2 432	>128/2 432	>128/2 432
头孢吡肟 ^a cefepime	≤8	16	≥32	1	1	0.5	1	0.5
氨苄西林 ^a ampicillin	≤8	16	≥32	256	64	64	32	64
美罗培南 ^a meropenem	≤4	8	≥16	8	4	4	2	4
利福平 ^d rifampicin	≤1	2	≥4	16	16	8	8	8
呋喃妥因 ^d furantoin	≤32	64	≥128	64	32	32	64	32

注: a.环丙沙星、复方新诺明、头孢吡肟、氨苄西林和美罗培南参考的是CLSI (2010)中针对弧菌属药敏判定标准,多西环素、氯霉素和磺胺甲恶唑参考的霍乱弧菌药敏判定标准; b.氟苯尼考参考的是兽医版本的CLSI (2008); c.链霉素参考的是已报道的文献中副溶血弧菌(*V. parahemolyticus*)的耐药折点; d.红霉素、利福平和呋喃妥因的参考的CLSI中肠球菌的判定标准;“-”无对应的参考标准

Notes: a. breakpoints for ciprofloxacin, TMP/SMZ, cefepime, ampicillin, meropenem, doxycycline, chloramphenicol and SMZ were described by CLSI (2010), and the breakpoints for the latter three agents were usually used for *V. cholera* only; b. breakpoint for florfenicol was referred to the CLSI (2008) used for bacteria isolated from animals; c. breakpoint for streptomycin was referred to the previous report concerning *V. parahemolyticus*; d. MIC breakpoints for *Enterobacteriaceae* for erythromycin, rifampicin, and furantoin were recommended by CLSI (2008);“-”no criteria available

2.3 耐药基因和整合子分析

耐药基因的检测 5株嗜芳香环弧菌的耐药基因检测结果发现,5株菌株携带的耐药基因包括氟喹诺酮类耐药基因*qnrVC*、氨苄西林耐药基因*bla_{CARB-17}*、链霉素耐药基因*strA*和*strB*及磺胺类耐药基因*sul*。此外,菌株JS291携带氟喹诺酮类耐药基因*qnrS*、氨苄西林耐药基因*bla_{TEM}*和*bla_{SHV}*,氟苯尼考耐药基因*floR*及利福平耐药基因*arr*;菌株JS295携带氟苯尼考耐药基因*cat1*和利福平耐药基因*arr*;菌株JS299携带氟苯尼考耐药基因*floR*和利福平耐药基因*arr*;菌株JS354携带氟苯尼考耐药基因*floR*(表4)。另外,5株菌株的氟喹诺酮类耐药基因*gyrA*和*partC*对应的氨基酸序列分别与NCBI数据库中登录号为gb|ABB73196.1|和gb|EEZ82274.1|的氨基酸序列相似度均为100%,

未发现位点突变。

整合子的检测 整合子检测结果发现,菌株JS291和JS295包括完整的I类整合子结构:5'保守区的*int1*基因,3'保守区的磺胺类耐药基因*sul1*、季铵盐与溴化乙锭耐药基因*qacEΔ1*。对菌株JS291和JS295使用Hep58和Hep59引物扩增其整合子可变区(图1),并将PCR产物纯化后送测序。检测结果显示,JS291菌株扩增出1 627 bp片段,经测序为*dfr16-aadA2*,与GenBank中登录号为KC414000.1的序列一致,其编码的氨基酸分别介导对甲氧苄啶和氨基糖苷类耐药;JS295菌株扩增出1 332 bp片段,经测序为*arr-3-dfrA27*,与GenBank中登录号为HQ386839.1的序列一致,其编码的氨基酸分别介导对利福平和甲氧苄啶耐药。其他菌株未发现相应的整合子结构。

表 4 五株嗜芳香环弧菌的耐药基因检测结果

Tab. 4 Prevalence of antimicrobial resistance genes among five *V. cyclotrophicus* strains

耐药表型 phenotypic antimicrobial resistance	耐药基因 resistance genes				
	JS291	JS295	JS299	JS354	JS360
环丙沙星 ciprofloxacin	<i>qnrVC, qnrS</i>	<i>qnrVC</i>	<i>qnrVC</i>	<i>qnrVC</i>	<i>qnrVC</i>
氨苄西林 ampicillin	<i>bla_{CARB-17}, bla_{TEM}, bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CARB-17}</i>	<i>bla_{CARB-17}</i>	<i>bla_{CARB-17}</i>	<i>bla_{CARB-17}</i>
氟苯尼考 florfenicol	<i>floR</i>	<i>cat1</i>	<i>floR</i>	<i>floR</i>	-
链霉素 streptomycin	<i>strA, strB</i>	<i>strA, strB</i>	<i>strA, strB</i>	<i>strA, strB</i>	<i>strA, strB</i>
红霉素 erythromycin	-	-	-	-	-
利福平 rifampicin	<i>arr</i>	<i>arr</i>	<i>arr</i>	-	-
复方新诺明 TMP/SMZ	<i>sul1, sul2</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>

注: “-”未检出

Notes: “-”not detected

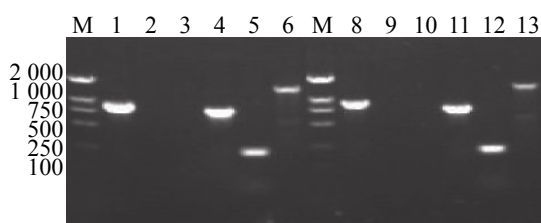


图 1 菌株JS291和JS295的整合子电泳图谱

M. DL2000 DNA Marker; 1-6. 菌株JS291的整合子电泳图谱; 8-13. 菌株JS295的整合子电泳图谱; 1、8. *int 1*; 2、9. *int 2*; 3、10. *int 3*; 4、11. *sul1*; 5、12. *qacEΔ1*; 6、13. *VR*

Fig. 1 Electrophoresis profile of integron of JS291 and JS295 strains

M. DL2000 DNA Marker; 1-6. electrophoresis profile of integrons of JS291; 8-13. electrophoresis profile of integrons of JS295; 1 and 8. *int 1*; 2 and 9. *int 2*; 3 and 10. *int 3*; 4 and 11. *sul1*; 5 and 12. *qacEΔ1*; 6 and 13. *VR*

3 讨论

嗜芳香环弧菌是20世纪90年代后被发现的弧菌, 由灿烂弧菌(*V. splendidus*)突变进化而来^[17]。研究发现, 嗜芳香环弧菌可导致大连虾夷中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)^[18]、大连地区和黄海地区的仿刺参(*Apostichopus japonicus*)^[19-20]、沟纹蛤仔(*Ruditapes decussatus*)^[21]、欧洲地区的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和幼虾^[22]患病。本研究通过理化特征和16S *rRNA*、*HSP60*、*mreB*基因的检测分析发现, 从患病半滑舌鳎分离得到的5株弧菌为嗜芳香环弧菌。

国内文献报道中将*V. cyclotrophicus*称为“嗜环弧菌”^[23]。根据Hedlund等^[16]的报道, 我们将

“*Vibrio cyclotrophicus*”首次命名为“嗜芳香环弧菌”。

细菌鉴定的分子生物学方法一般通过检测16S *rRNA*和*HSP60*基因。研究发现, 基于16S *rDNA*基因序列构建的系统发育树中, 嗜芳香环弧菌与灿烂弧菌属于同一分支, 序列间相似性高达97.8%~98.2%^[16]。本研究发现, 检测弧菌中的16S *rRNA*和*HSP60*基因, 均不能有效区分嗜芳香环弧菌与灿烂弧菌。Sawabe等^[12]研究发现, 嗜芳香环弧菌和灿烂弧菌之间可以通过检测类肌动蛋白编码基因*mreB*进行有效区分。本研究测定了5株菌株的*mreB*基因部分序列, BLAST比对分析发现, 菌株JS291、JS295、JS299、JS354和JS360与嗜芳香环弧菌相应基因序列(登录号为DQ481641.1)的同源性高达99%, 与灿烂弧菌相应基因序列的同源性为93%。综上所述, *mreB*基因分析较16S *rRNA*、*HSP60*基因更适合于水生动物源嗜芳香环弧菌的分析和鉴定。

抗菌药物的广泛使用导致水产动物弧菌耐药性及多重耐药性日渐严重, 这在哈氏弧菌(*V. harveyi*)^[24]、副溶血弧菌^[25]、创伤弧菌(*V. vulnificus*)^[26]等上均有大量报道。目前为止, 关于嗜芳香环弧菌耐药方面的研究很少, Shah等^[27]研究发现, 从陆地环境中分离的76株细菌中检测到嗜芳香环弧菌, 且对4种抗菌药物耐受。本研究发现, 5株菌株均呈现多重耐药性, 对常用的抗菌药物如喹诺酮类、氨基糖苷类、磺胺类、利福霉素类、β-内酰胺类和四环素药物具有耐受性, 推测可能与这些药物在半滑舌鳎养殖过程中滥用有关。因此, 对半滑舌鳎类细菌性疾病的防治要选择合

适的抗菌药物种类,严格控制用药剂量和方式,并加强对耐药病原菌的监测。

耐药基因的存在与弧菌的耐药性及多重耐药性密切相关。本研究中,5株嗜芳香环弧菌携带的耐药基因 $bla_{CARB-17}$ 可能与其介导的氨苄西林耐药性相关,这与Chiou等^[28]的研究结果一致,副溶血弧菌携带的耐药基因 $bla_{CARB-17}$ 介导其对氨苄西林的固有耐药。5株嗜芳香环弧菌携带的耐药基因 $strA$ 、 $strB$ 可能与其介导的链霉素耐药性相关。氟喹诺酮类耐药通常与DNA旋转酶基因 $gyrA$ 和拓扑异构酶基因 $partC$ 上的位点有关,但5株嗜芳香环弧菌中并未发现相关的突变位点,而检测到了 $qnrVC$ 基因,该耐药基因在耐环丙沙星的副溶血弧菌中已有报道^[29]。此外,该菌中还检测到多种其他的耐药基因,如链霉素耐药基因 $strA$ 和 $strB$ 、利福平耐药基因 arr 、磺胺类耐药基因 sul 及氯霉素耐药基因 $floR$ 和 $cat1$ 等。综上所述,本研究中5株嗜芳香环弧菌对氟喹诺酮类、磺胺类、氨基糖苷类等药物的耐药表型和携带的相应耐药基因之间存在一致性。

整合子是一类可移动遗传元件,一个整合子可携带多个不同的耐药基因盒在不同细菌间进行传递,从而使细菌具有多重耐药性并导致多重耐药性的传播扩散^[30]。目前,关于整合子介导的水生动物源病原菌耐药机制的研究主要集中在气单胞菌。Lukkana等^[31]发现,从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)上分离得到的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)中I类整合子的携带率高达46%,但未检测到II类和III类整合子。李邵戊等^[32]研究发现,从东北三省患病的鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius carassius*)分离得到的28株嗜水气单胞菌,I类和II类整合子的检出率分别为53.6%和21.4%。本研究首次在半滑舌鲷分离得到的嗜芳香环弧菌上检测整合子,结果发现,菌株JS291和JS295均携带I类整合子,但未检测到II类和III类整合子;且I类整合子的3'端均发现有 $sul1$ (编码磺胺类耐药基因)和 $qacE\Delta 1$ (编码季胺类消毒剂基因)的存在,可变区均检测到耐药基因盒,这表明这2株病原弧菌可能向其他菌株转移耐药基因盒,进而导致多重耐药性的传播扩散。

综上所述,本实验室分离的5株嗜芳香环弧菌呈现多重耐药性,表明半滑舌鲷养殖环境中抗生素的污染程度较为严重,这可能与抗生素滥用有关,提示应加强弧菌耐药性的监控及渔

用药物的使用管理,指导水产养殖合理用药。另外,5株嗜芳香环弧菌对多种药物的耐药表型和耐药基因型之间存在着一致性,且其中2株携带整合子和耐药基因盒可能造成多重耐药性向其他细菌的传播扩散,因此,有必要深入研究水产病原弧菌的耐药机制,从分子层面探索消除耐药表型的规律。

参考文献:

- [1] Jiang Y, Yao L, Li F, et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(2): 147-154.
- [2] Letchumanan V, Yin W F, Lee L H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 33.
- [3] Bennett P M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(S1): S347-S357.
- [4] Liu M, Wong M H Y, Chen S. Molecular characterisation of a multidrug resistance conjugative plasmid from *Vibrio Parahaemolyticus*[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 42(6): 575-579.
- [5] 刘彦, 窦海鸽. 半滑舌鲷生物学特征及其增殖发展前景[J]. *中国水产*, 2005(3): 63-64.
Liu Y, Dou H G. The biology characteristics and enhancement foreground of *Cynoglossus semilaevis*[J]. *China Fisheries*, 2005(3): 63-64(in Chinese).
- [6] 陈君. 工厂化循环水养殖半滑舌鲷主要细菌性疾病及其控制[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Chen J. Bacterial diseases and control of tongue fish (*Cynoglossus semilaevis*) in recirculating aquaculture system[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese).
- [7] 徐先栋, 谢珍玉, 欧阳吉隆, 等. 褐点石斑鱼脱鳞病原菌的分离与鉴定[J]. *海洋科学*, 2012, 36(2): 67-74.
Xu X D, Xie Z Y, Ouyang J L, et al. Isolation and identification of bacterial pathogens from *Epinephelus fuscoguttatus* with scale-peeled syndrome disease[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(2): 67-74(in Chinese).
- [8] 陈晓燕, 胡超群, 陈岱, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌

- 病病原菌的分离及鉴定[J]. *海洋科学*, 2003, 27(6): 68-72.
- Chen X Y, Hu C Q, Chen C, *et al.* Characteristics of pathogenic bacteria of Vibriosis in caged Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(6): 68-72(in Chinese).
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual of Determinative common bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001(in Chinese).
- [10] CLSI. M45-A2 Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2010.
- [11] Nilsson W B, Paranjypte R N, Depaola A, *et al.* Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(1): 442-446.
- [12] 李林桂, 周俊芳, 李新苍, 等. 对虾源副溶血弧菌强毒株HNBX-1的分离鉴定与毒性分析[J]. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 479-484.
- Li L G, Zhou J F, Li X C, *et al.* Identification and toxicity analysis of a virulent *Vibrio parahaemolyticus* strain isolated from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 479-484(in Chinese).
- [13] Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson F L. Inferring the evolutionary history of *Vibriosis* by means of multilocus sequence analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21): 7962-7936.
- [14] 国宪虎. 耐药整合子细菌在水环境中的散播调查及其多样性分析[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- Guo X H. Investigation and diversity analysis of the antibiotic resistant integron-bearing bacteria in aquatic environment[D]. Ji'nan: Shandong University, 2011(in Chinese).
- [15] Sandvang D, Aarestrup F M, Jensen L B. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DTI-04[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160(1): 37-41.
- [16] Hedlund B P, Staley J T. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PHA)-degrading marine bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 61-66.
- [17] Sawabe T, Koizumi S, Fukui Y, *et al.* Mutation is the main driving force in the diversification of the *Vibrio Splendidus* clade[J]. *Microbes and Environments*, 2009, 24(4): 281-285.
- [18] 王轶南, 刘艳萍, 常亚青. 患病与健康虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液菌群的PCR-DGGE分析比较[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(1): 111-116.
- Wang Y N, Liu Y P, Chang Y Q. Comparative analysis of bacterial community composition in coelomic fluid between sick and healthy *Strongylocentrotus intermedius* by PCR-DGGE[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(1): 111-116(in Chinese).
- [19] 杨扬. 应用噬菌体防治弧菌引发的刺参腐皮综合征[D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
- Yang Y. Using bacteriophages to control skin ulceration syndrome of the Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) caused by *Vibrio* spp. [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013(in Chinese).
- [20] Deng H, He C B, Zhou Z C, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 18-27.
- [21] Hidalgo R B, Cleenwerck I, Balboa S, *et al.* Diversity of *Vibriosis* associated with reared clams in Galicia (NW Spain)[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(3): 215-222.
- [22] Austin B, Austin D, Sutherland R, *et al.* Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1488-1495(in Chinese).
- [23] 杨求华, 葛辉, 方旅平, 等. 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定[J]. *南方水产科学*, 2014, 10(4): 45-51.
- Yang Q H, Ge H, Fang L P, *et al.* Identification of *Vibrio tubiashii* isolated from diseased pond-cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(4): 45-51(in Chinese).
- [24] 王春艳, 阎斌伦. 连云港市赣榆县水产养殖环境中哈氏弧菌耐药性研究[J]. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2013, 22(1): 88-91.
- Wang C Y, Yan B L. Study on the antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolates from aquaculture environment

- in Ganyu County, Lianyungang[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Sciences Edition)*, 2013, 22(1): 88-91(in Chinese).
- [25] Ceccarelli D, Salvia A M, Sami J, *et al.* New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(7): 2493-2499.
- [26] 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 等. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 442-446.
- Xie L Y, Hu L L, Fang W H, *et al.* Investigation and analysis of drug resistance of *Vibrios* from mariculture source[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 442-446(in Chinese).
- [27] Shah S Q A, Cabello F C, L'Abée-Lund T M, *et al.* Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(5): 1310-1320.
- [28] Chiou J, Li R C, Chen S. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to Penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(6): 3593-3595.
- [29] Liu M, Wong M H Y, Chen S. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 42(2): 187-188.
- [30] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(8): 608-620.
- [31] Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*)[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74(4): 435-440.
- [32] 李绍戊, 王荻, 刘红柏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 1015-1022.
- Li S W, Wang D, Liu H B, *et al.* Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1015-1022(in Chinese).

Identification and antimicrobial resistance of *Vibrio cyclotrophicus* isolated from aquatic animals

ZHAO Shu¹, JIANG Lan², ZHOU Junfang¹, WANG Yuan¹, FANG Wenhong^{1*}

(1. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: This paper studied the identification, drug resistance and the molecular resistance mechanism of five *Vibrio* strains isolated from diseased *Cynoglossus semilaevis*. The five strains were identified as *V. cyclotrophicus* by a biochemical test combined with a molecular method (16S *rRNA*, *HSP60* and *mreB* genes). The broth dilution method was used to determine the antimicrobial susceptibility of the strains to 14 antimicrobials. The PCR amplification and DNA sequencing were used to detect antimicrobial resistance genes, integrons and the gene cassettes. The results indicated that the five strains were resistant to ciprofloxacin, streptomycin, erythromycin, florfenicol, ampicillin, SMZ, TMP/SMZ and rifampicin, and carried *qnr VC*, *bla*_{CARB-17}, *strA*, *strB*, *sul* genes. Class I integron, *qacEΔ1* and *sul1* genes were present in JS291 and JS295 strains. The integron-gene cassettes of JS291 were encoding dihydrofolatereductase (*dfr16*), aminoglycoside-(3'')(9)-adenylyltransferase (*aadA2*), and the cassettes of JS295 were encoding rifampin ADP-ribosylating transferase (*arr-3*), dihydrofolate reductase (*dfrA27*), respectively. These findings suggested that the five strains exhibited multi-drug resistance and the multi-drug resistance phenotype may be closely related to the antimicrobial resistance genes.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio cyclotrophicus*; drug resistance; integrons

Corresponding author: FANG Wenhong. E-mail: fwenhong@163.com

Funding projects: Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (201401); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes of Chinese Academy of Fishery Sciences(2013A0603)