

张鹏, 吉星, 孙利厂, 等. 江苏省南通地区虾源弧菌的分子流行病学分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(9): 1791-1802.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.09.014

江苏省南通地区虾源弧菌的分子流行病学分析

张鹏^{1,2}, 吉星², 孙利厂², 朱树娇², 何涛², 王冉²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探明南通地区虾源弧菌的分子流行病学特征, 本研究对在南通地区规模化虾养殖场中采集的 560 份病虾样本进行弧菌分离和鉴定, 使用微量肉汤稀释法对分离株进行抗菌药物敏感性测试, 基于全基因组测序技术分析分离株的耐药基因、毒力基因携带情况, 并通过多位点序列分型 (MLST) 和系统发育树分析南通地区虾源弧菌的流行病学特征。结果表明, 560 份病虾样本中共分离出 119 株弧菌, 检出率为 21.25%, 其中, 溶藻弧菌为优势亚型, 占比达 73.95%。弧菌分离株对氨苄西林、头孢氨苄和多西环素的耐药率较高, 分别为 73.11%、58.82%、45.38%。弧菌分离株中共检测到 47 种耐药基因, 其中 *tet(34)*、*tet(35)*、*bla_{ampC}* 检出率较高, 分别为 97.48%、88.24%、61.34%。分离株平均携带 33 个毒力基因, 携带可编码细胞毒性的关键外毒素基因 *hlyA* 和 *rtxA* 的分离株分别为 1 株和 7 株。分离株 ST 型具有多样性, 其中 ST388 为相对流行的 ST 型。溶藻弧菌分离株划分为 1 个进化分支, 不同来源菌株之间的遗传进化关系较近; 分离株 85 和分离株 4 与人类医疗临床来源的溶藻弧菌菌株有着高度同源性。本研究结果可为南通地区水产弧菌的有效防治提供科学依据。

关键词: 弧菌; 虾; 耐药基因; 毒力基因; 进化分型

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)09-1791-12

Molecular epidemiological analysis of *Vibrio* from shrimp in Nantong, Jiangsu province, China

ZHANG Peng^{1,2}, JI Xing², SUN Lichang², ZHU Shujiao², HE Tao², WANG Ran²

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Food, Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: To elucidate the molecular epidemiological characteristics of shrimp-derived *Vibrios* in Nantong area, *Vibrio* strains isolated from 560 diseased shrimp samples collected from large-scale shrimp farms in Nantong area were identified, and the antimicrobial susceptibility of the isolates was tested by micro-broth dilution method. Based on the whole genome sequencing technology, the drug resistance genes and virulence genes of the isolates were analyzed, and the epidemiological characteristics of shrimp-derived *Vibrios* in Nantong area were analyzed by multilocus sequence typing (MLST) and phylogenetic tree. The results showed that 119 strains of *Vibrio* were isolated from 560 diseased shrimp samples, with a detection rate of 21.25%. Among them, *Vibrio alginolyticus* was the dominant subtype, accounting for 73.95%. The resistance rates of the isolates to ampicillin, cephalexin and doxycycline were 73.11%,

收稿日期: 2024-12-11

基金项目: “十四五”国家重点研发计划课题(2023YFD1800303)

作者简介: 张鹏(1997-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事细菌与噬菌体相互作用研究。(E-mail) zpeng1120805610@163.com

通讯作者: 何涛, (E-mail) vethetao@163.com; 王冉, (E-mail) ranwang@jaas.ac.cn

ological characteristics of shrimp-derived *Vibrios* in Nantong area were analyzed by multilocus sequence typing (MLST) and phylogenetic tree. The results showed that 119 strains of *Vibrio* were isolated from 560 diseased shrimp samples, with a detection rate of 21.25%. Among them, *Vibrio alginolyticus* was the dominant subtype, accounting for 73.95%. The resistance rates of the isolates to ampicillin, cephalexin and doxycycline were 73.11%,

58.82% and 45.38%, respectively. A total of 47 drug resistance genes were detected in the isolates, among which *tet(34)*, *tet(35)* and *bla_{ampC}* had higher detection rates of 97.48%, 88.24% and 61.34%, respectively. The isolates carried an average of 33 virulence genes, and the numbers of isolates carrying the key cytotoxin-encoding genes *hlyA* and *rtxA* were one and seven, respectively. The ST types of the isolates were diverse, and ST388 was a relatively popular ST type. The isolates of *V. alginolyticus* were divided into one evolutionary branch, and the genetic evolution relationship between the strains from different sources was close. The isolate 85 and isolate 4 were highly homologous to the *V. alginolyticus* strains from human clinical sources. The results of this study can provide a scientific basis for the effective prevention and control of *Vibrio* infections in aquaculture in Nantong area.

Key words: *Vibrio*; shrimp; drug resistance genes; virulence genes; evolutionary typing

弧菌为革兰氏阴性菌,广泛分布于海洋、河海交汇处及鱼虾贝类等水生动物体内。其中副溶血弧菌、溶藻弧菌和霍乱弧菌是多种水生动物的重要致病菌,同时也是重要的人兽共患病原体^[1-4]。目前水产品中弧菌耐药性和毒力分析主要是通过药敏试验以及聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术鉴别耐药和毒力基因。弧菌的流行分析常通过肠杆菌基因间重复序列-聚合酶链式反应(Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR)和脉冲场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)进行聚类分析^[5]。ERIC-PCR操作简便快捷、成本低廉,但仅反映局部基因组变异,对远缘菌株或复杂进化关系的菌株解析能力有限。PFGE虽是传统分型的“金标准”,但操作繁琐、标准化要求严格。ERIC-PCR和PFGE均基于表型(条带模式)进行分析。近年来,随着高通量测序技术的发展,基于全基因组测序技术(Whole genome sequencing, WGS)的病原菌流行病学研究得到了快速发展。通过WGS可一次性得到细菌病原体的种属分类、耐药基因和毒力基因,进而可以推测病原菌传播动力学,为研究致病菌分子流行病学提供了全新的视角^[6-9]。研究表明,上海和广东地区虾源弧菌耐药性严重,且存在多重耐药状况,虾源弧菌中主要流行的亚型为副溶血弧菌、霍乱弧菌和溶藻弧菌,且序列分型(ST)呈现多样性^[10-13]。魏文娟等^[14]对上海、江苏、福建和海南病虾中弧菌的耐药基因进行检测,结果发现喹诺酮类耐药基因 $qnrVC$ 和氨基糖苷类耐药基因 $srtB$ 的检出率分别高达72.2%和58.3%。

南通市滨江临海,水资源充沛,对虾的生产和消费量逐年递增,但随着集约化养殖的快速发展,弧菌感染严重,且该地区虾源弧菌的流行情况尚不明确,

因此开展虾源弧菌的分子流行病学调查对该地区虾产业的健康发展具有重要意义。本研究基于WGS技术,对江苏南通地区虾源弧菌进行耐药基因、毒力基因及进化关系分析,为该地区虾源弧菌感染的防治提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 弧菌的分离与纯化

2022年9月至2023年4月,从江苏省南通市临江新区、海门港新区的10多个对虾养殖基地,采集患病凡纳滨对虾样本(平均体长9.7 cm,体重11.7 g)560份,0℃保存,运至实验室进行菌株分离培养。具体步骤为:用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)多次冲洗病虾体表,无菌条件下剖取病虾肝脏和胰脏,取1 g组织混合样品放入3%氯化钠碱性蛋白胨水中,30℃培养12 h,将组织样本取出,于硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂平板上划线继续培养12 h,挑取圆形微凸、表面光滑湿润、边缘整齐、黄色或绿色单菌落;多次划线纯化后,直至培养基中的单菌落形态一致。挑取单菌落至1 mL TCBS肉汤中30℃培养12 h,随后利用16S RNA引物(正向引物5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和反向引物5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')进行聚合酶链式反应(PCR),并对PCR产物进行16S RNA测序,将测序结果与NCBI数据库中弧菌16S rRNA参考序列进行相似性比对和细菌种属鉴定。

1.2 抗菌药物敏感性试验

参考美国临床与实验室标准委员会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)药敏试验判定标准^[15],以大肠埃希氏菌ATCC 25922为质量控制菌株,采用微量肉汤稀释法检测弧菌分离株对β-内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类、喹诺酮类、酰胺类、磺胺类等6大类抗菌药的敏感性。抗菌药测试

浓度范围及结果判定标准如表 1 所示。

表 1 药敏试验判定标准

Table 1 Antimicrobial susceptibility test standard

抗菌药种类	药物名称	药物浓度范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	判定标准 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
			敏感	中度敏感	耐药	
β -内酰胺类	青霉素类	氨苄西林	1.0~256.0	≤ 8	16	≥ 32
	头孢菌素类	头孢氨苄	1.0~256.0	≤ 8	16	≥ 32
		头孢噻吩	0.5~128.0	≤ 1	2	≥ 4
	单环 β -内酰胺类	氨曲南	1.0~256.0	≤ 8	16	≥ 32
	碳青霉烯类	美罗培南	1.0~256.0	≤ 1	2	≥ 4
四环素类	多西环素	多西环素	1.0~256.0	≤ 4	8	≥ 16
		替加环素	1.0~256.0	≤ 4	8	≥ 16
氨基糖苷类	硫酸新霉素	1.0~256.0	≤ 4	8	≥ 16	
喹诺酮类	盐酸环丙沙星	1.0~256.0	≤ 2	4	≥ 8	
酰氨基醇类	氟苯尼考	1.0~256.0	≤ 2	4	≥ 8	
磺胺类	磺胺异噁唑	16.0~1 024.0	≤ 256		≥ 512	

1.3 弧菌的全基因组提取与测序

参照吉星等^[16]的方法,利用 TGuide S32 全自动核酸提取纯化仪[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取弧菌 DNA,具体方法如下:从天根核酸提取试剂盒中取出预封装的 96 深孔板,取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液加入 400 μL 组织消化液 GHA(Buffer GHA)和 20 μL 蛋白酶 K,匀浆混匀,在 96 深孔板的第 1 列和第 7 列孔中加入 300 μL 上述样本处理后溶液,将 96 孔板安置于仪器配套的深孔板底座上,将磁棒套插入磁棒套架中的指定位置,执行细菌自动化提取程序,自动化提取程序结束后,将 96 深孔板第 5 列和第 11 列的 DNA 吸出,采用 NanoDrop 超微量分光光度计测定 DNA 洗脱液浓度与纯度。

质检合格的细菌基因组 DNA 委托安诺优达生物科技有限公司,基于 Illumina HiSeq 2500 平台进行二代全基因组测序,原始测序数据经质量控制过滤获得有效序列,二代测序数据在 SPAdes 软件中进行组装。

1.4 全基因组分析

使用 Biostack 软件将测序得到的原始序列转换成细菌二代全基因组序列 Fasta 文件,并进行进一步组装拼接,利用 Prokka 软件对拼接后的基因组序

列进行注释。利用 Mash v2.1 软件构建弧菌的系统发育树,通过 iTOL 在线软件(<https://itol.embl.de/>)进行弧菌系统发育树分支网络编辑^[17]。根据法国巴斯德研究所(Institut Pasteur) MLST 数据库(<https://bigsd.b.pasteur.fr/>)的 4 个高度保守的基因(*atpA*、*gyrB*、*pyrH*、*recA*)序列分析分离得到的弧菌基因序列分型(ST)^[18]。最后,结合 Res Finder 数据库和 VFDB Finder 数据库分析弧菌携带的耐药基因和毒力基因。

2 结果与分析

2.1 南通市虾源弧菌的流行情况

560 份水产养殖基地病虾样本中共分离鉴定出 119 株弧菌菌株,检出率为 21.25%,其中溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)88 株、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)9 株、欧文氏弧菌(*Vibrio owensii*)7 株、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)5 株、溶蛋白弧菌(*Vibrio proteolyticus*)5 株、坎贝氏弧菌(*Vibrio campbellii*)3 株、麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*)1 株、河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)1 株。

2.2 药敏试验结果

119 株弧菌分离株的药物敏感性如表 2 所示。分离株对青霉素类、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类

以及氨基糖苷类抗菌药表现出较强耐药性,其中分离株对氨苄西林、头孢氨苄、多西环素的总耐药率较高,分别为 73.11%、58.82%、45.38%;分离株对硫酸新霉素、氟苯尼考、磺胺异噁唑的总耐药率中等,分别为 34.45%、24.37%、26.89%;分离株对美罗培

南、盐酸环丙沙星的总耐药率较低,分别为 5.04% 和 6.72%;所有分离株均对替加环素敏感;耐 3 类及以上抗菌药物的分离株(多重耐药菌株)占比为 26.89%,未发现全耐药菌株。

表 2 弧菌耐药水平

Table 2 Antimicrobial resistance levels of *Vibrio*

抗菌药	不同菌属的耐药率(%)								总耐药率 (%)
	溶藻弧菌	副溶血弧菌	欧文氏弧菌	溶蛋白弧菌	鳗弧菌	坎贝氏弧菌	麦氏弧菌	河流弧菌	
氨苄西林	73.86	77.78	71.43	60.00	60.00	100.00	100.00	0	73.11
头孢氨苄	61.36	33.33	57.14	40.00	60.00	100.00	100.00	0	58.82
头孢噻唑	34.10	33.33	42.86	0	0	0	0	0	30.25
氨曲南	51.14	33.33	28.57	20.00	20.00	0	0	0	43.70
美罗培南	5.61	11.11	0	0	0	0	0	0	5.04
多西环素	48.86	33.33	42.86	40.00	20.00	100.00	100.00	0	45.38
替加环素	0	0	0	0	0	0	0	0	0
硫酸新霉素	36.36	77.78	14.29	0	0	0	100.00	0	34.45
盐酸环丙沙星	7.96	11.11	0	0	0	0	0	0	6.72
氟苯尼考	26.14	22.22	14.29	20.00	20.00	0	0	100.00	24.37
磺胺异噁唑	27.27	22.22	28.57	20.00	20.00	33.33	100.00	0	26.89

2.3 耐药基因分析

利用 Res Finder 软件在 119 株分离株中共鉴定出 47 种耐药基因,分属 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、酰胺醇类、磺胺类、四环素类(表 3)。携带四环素类耐药基因 *tet*(34) 的分离株 116 株,占总分离株的 97.48%;分离株携带 β -内酰胺类耐药基因的种类高达 16 种,其中含 *bla_{ampC}* 基因菌株的检出率为 61.34%;氨基糖苷类耐药基因主要为 *aph*(6)-*Id* 和 *aph*(3'')-*Ib*,含 *aph*(6)-*Id* 和 *aph*(3'')-*Ib* 基因菌株的检出率均为 29.41%;喹诺酮类耐药基因主要为 *qnrVC*,含 *qnrVC* 基因菌株的检出率为 4.20%;酰胺醇类耐药基因主要为 *floR*,含 *floR* 基因菌株的检出率为 26.05%;磺胺类耐药基因主要为 *sul2*,含 *sul2* 基因菌株的检出率为 36.97%。本试验发现 2 株分离株携带耐药基因 *bla_{IMP-15}*,介导碳青霉烯类药物美罗培南的耐药性。

2.4 毒力基因分析

基于 VFDB Finder 数据库,119 株分离株中共预测出 6 大类、117 种毒力基因,分离株平均携带毒力

基因 33 种(表 4)。鞭毛相关的毒力基因 43 种,主要包括鞭毛结构、组装、趋化感应相关基因 *fla*、*flg*、*fli* 和 *che* 等;黏附性相关基因主要包括多价黏附因子基因 *mam7*、弧菌外膜蛋白 U 编码基因 *ompU*、免疫原性脂蛋白 A 编码基因 *IlpA*;生物膜相关毒力基因主要包括弧菌多糖类编码基因 *vps*、生物膜调节因子 C 编码基因 *VC_RS04620*;分泌系统相关毒力因子包括 III 型分泌系统(T3SS)、细胞外蛋白分泌系统(T2SS)和 VI 型分泌系统(T6SS),其中 T3SS1 相关毒力基因种类较多,共 33 种,其中, *vcrH*、*vopB*、*uscP* 等毒力基因的检出率 > 80%, T2SS 毒力基因主要为 *epsK* 和 *epsE*, T6SS 相关毒力基因检出率较低,检出率较高的毒力基因为 *hcp-1*、*hcp-2*;外毒素基因包括重复毒素基因 *rtxA*、霍乱弧菌溶血毒素毒力基因 *hlyA* 和不耐热溶血毒素基因 *tlh*,其中 *rtxA*、*hlyA* 所编码的毒力因子具有细胞毒性,毒素的表达可以调节肠道上皮细胞免疫反应,加剧感染传播^[19-21]。

2.5 MLST 和系统发育分析

本研究鉴定得到的 119 株弧菌分离株系统发育

树如图 1 所示。从图中可以看出,119 株弧菌分离株中有 53 株为已知的 ST 型,可划分为 34 种,另外 66 株为未知的 ST 型。已知 ST 型的分离株中,ST388 型、ST421 型和 ST423 型分离株分别为 7 株、6 株和 5 株,占总菌株数的 5.88%、5.04%、4.20%,占

比相对较高。88 株溶藻弧菌分离株中未知 ST 型有 50 株,已知 ST 型分离株可分为 20 种不同的 ST 型,其中,主要流行 ST 型为 ST388,占溶藻弧菌分离株的 5.68%。

表 3 耐药基因分布表

Table 3 Distribution of antimicrobial resistance genes

抗菌药物类别	耐药基因	含基因菌株数	检出率(%)	抗菌药物类别	耐药基因	含基因菌株数	检出率(%)	
β-内酰胺类	<i>bla_{CARB}</i>	13	10.92	四环素类	<i>aac(3')-IVa</i>	1	0.84	
	<i>bla_{CARB-18}</i>	8	6.72		<i>aph(6)-Id</i>	35	29.41	
	<i>bla_{CARB-32}</i>	2	1.68		<i>aph(3'')-Ib</i>	35	29.41	
	<i>bla₂</i>	2	1.68		<i>aph(3')-Ia</i>	1	0.84	
	<i>bla_{CARB-42}</i>	69	57.98		<i>aadA1</i>	1	0.84	
	<i>bla_{CARB-56}</i>	5	4.20		<i>aadA16</i>	4	3.36	
	<i>bla_{CTX-M}</i>	1	0.84		<i>tet(34)</i>	116	97.48	
	<i>bla_{EC}</i>	1	0.84		<i>tet(35)</i>	105	88.24	
	<i>bla_{IMP-15}</i>	2	1.68		<i>tet(A)</i>	24	20.17	
	<i>bla_{OXA}</i>	2	1.68		<i>tet(B)</i>	15	12.61	
	<i>bla_{PSE}</i>	1	0.84		<i>tet(M)</i>	1	0.84	
	<i>bla_{TEM}</i>	1	0.84		<i>tetA(D)</i>	16	13.45	
	<i>bla_{TEM-1}</i>	1	0.84		喹诺酮类	<i>oqxA</i>	1	0.84
	<i>bla_{VHH}</i>	3	2.52			<i>qnrA3</i>	1	0.84
	<i>bla_{VHW}</i>	9	7.56			<i>qnrA7</i>	1	0.84
	<i>bla_{ampC}</i>	73	61.34			<i>qnrS</i>	1	0.84
	酰氨醇类	<i>catA</i>	2			1.68	<i>qnrS2</i>	1
<i>catA2</i>		1	0.84	<i>qnrVC</i>	5	4.20		
<i>catA3</i>		3	2.52	<i>qnrVC5</i>	2	1.68		
<i>catB</i>		7	5.88	磺胺类	<i>dfrA27</i>	4	3.36	
<i>catC</i>		25	21.01		<i>dfrA31</i>	1	0.84	
<i>floR</i>		31	26.05		<i>sul1</i>	4	3.36	
氨基糖苷类		<i>aph(4)-Ia</i>	1	0.84	<i>sul2</i>	44	36.97	
	<i>aac(3)-III d</i>	2	1.68					

利用 NCBI 数据库下载的 23 株溶藻弧菌的全基因组序列和本研究得到的 46 株溶藻弧菌全基因组序列构建的系统发育树如图 2 所示。69 株溶藻弧菌形成 1 个大的进化分支,根据亲缘关系又可划分为 38 个不同克隆群。本研究鉴定得到的溶藻弧

菌分离株 85 和分离株 4 与广东地区临床来源的溶藻弧菌 VAM06、VAM02 位于同一进化分支,具有相同 ST 型(ST223),且耐药基因与毒力基因高度相似。综上,水产养殖环境具有高度的遗传多样性,不同区域的弧菌具有克隆传播的可能。

表 4 毒力基因分布表

Table 4 Distribution of virulence genes

毒力基因类别		毒力基因	检出菌株数	检出率 (%)
一级结构	二级结构			
黏附	多价黏附因子	<i>mam7</i>	86	72.27
	几丁质调节菌毛	<i>pilA</i>	5	4.20
		<i>pilC</i>	4	3.36
	甘露糖敏感性血凝素菌毛	<i>mshE</i>	8	6.72
	弧菌外膜蛋白 U	<i>ompU</i>	92	77.31
	副溶血弧菌黏附因子	<i>vpadF</i>	12	10.08
生物膜	免疫原性脂蛋白 A	<i>IlpA</i>	35	29.41
	生物膜调节因子 A	<i>VC_RS04610</i>	6	5.04
	生物膜调节因子 C	<i>VC_RS04620</i>	7	5.88
	自诱导剂-2	<i>luxS</i>	7	5.88
	弧菌多糖	<i>vpsD</i>	3	2.52
		<i>vpsE</i>	5	4.20
		<i>vpsF</i>	5	4.20
		<i>vpsG</i>	4	3.36
		<i>vpsH</i>	6	5.04
		<i>vpsI</i>	4	3.36
鞭毛		<i>vpsJ</i>	6	5.04
		<i>cheA</i>	99	83.19
		<i>cheB</i>	108	90.76
		<i>cheR</i>	88	73.95
		<i>cheV</i>	103	86.55
		<i>cheW</i>	102	85.71
		<i>cheY</i>	5	4.20
		<i>cheZ</i>	1	0.84
		<i>flaA</i>	97	81.51
		<i>flaB</i>	14	11.76
		<i>flaC</i>	9	7.56
		<i>flaD</i>	10	8.40
		<i>flaE</i>	2	1.68
		<i>flaG</i>	5	4.20
		<i>flaI</i>	1	0.84
		<i>flgA</i>	1	0.84
		<i>flgB</i>	97	81.51
		<i>flgC</i>	113	94.96
	<i>flgD</i>	103	86.55	
	<i>flgE</i>	107	89.92	
	<i>flgF</i>	87	73.11	
	<i>flgG</i>	55	46.22	
	<i>flgH</i>	7	5.88	
	<i>flgI</i>	8	6.72	
	<i>flgK</i>	96	80.67	
	<i>flgM</i>	4	3.36	
	<i>flgO</i>	8	6.72	
	<i>flgT</i>	1	0.84	
	<i>flhA</i>	1	0.84	

续表4 Continued4

毒力基因类别		毒力基因	检出菌株数	检出率 (%)
一级结构	二级结构			
		<i>flhB</i>	3	2.52
		<i>flhF</i>	12	10.08
		<i>flhG</i>	1	0.84
		<i>fliA</i>	8	6.72
		<i>fliD</i>	7	5.88
		<i>fliE</i>	1	0.84
		<i>fliF</i>	22	18.49
		<i>fliG</i>	96	80.67
		<i>fliI</i>	1	0.84
		<i>fliK</i>	8	6.72
		<i>fliM</i>	105	88.24
		<i>fliN</i>	4	3.36
		<i>fliS</i>	2	1.68
		<i>flrA</i>	8	6.72
		<i>flrC</i>	37	31.09
		<i>motB</i>	1	0.84
效应传递系统	T3SS1	<i>exsC</i>	97	81.51
		<i>vcrD</i>	96	80.67
		<i>vcrG</i>	12	10.08
		<i>vcrH</i>	99	83.19
		<i>vcrR</i>	12	10.08
		<i>vcrV</i>	99	83.19
		<i>vecA</i>	12	10.08
		<i>virG</i>	12	10.08
		<i>exsA</i>	98	82.35
		<i>exsD</i>	100	84.03
		<i>vscB</i>	12	10.08
		<i>vscC</i>	12	10.08
		<i>vscD</i>	97	81.51
		<i>vscF</i>	12	10.08
		<i>vscG</i>	12	10.08
		<i>vscH</i>	11	9.24
		<i>vscI</i>	99	83.19
		<i>vscJ</i>	12	10.08
		<i>vscK</i>	12	10.08
		<i>vscL</i>	15	12.61
		<i>vscN</i>	15	12.61
		<i>vscO</i>	94	78.99
		<i>vscP</i>	97	81.51
		<i>vscQ</i>	82	68.91
		<i>vscR</i>	12	10.08
		<i>vscS</i>	12	10.08
		<i>vscT</i>	12	10.08
		<i>vscU</i>	97	81.51
		<i>vscX</i>	2	1.68
		<i>vscY</i>	3	2.52

续表4 Continued4

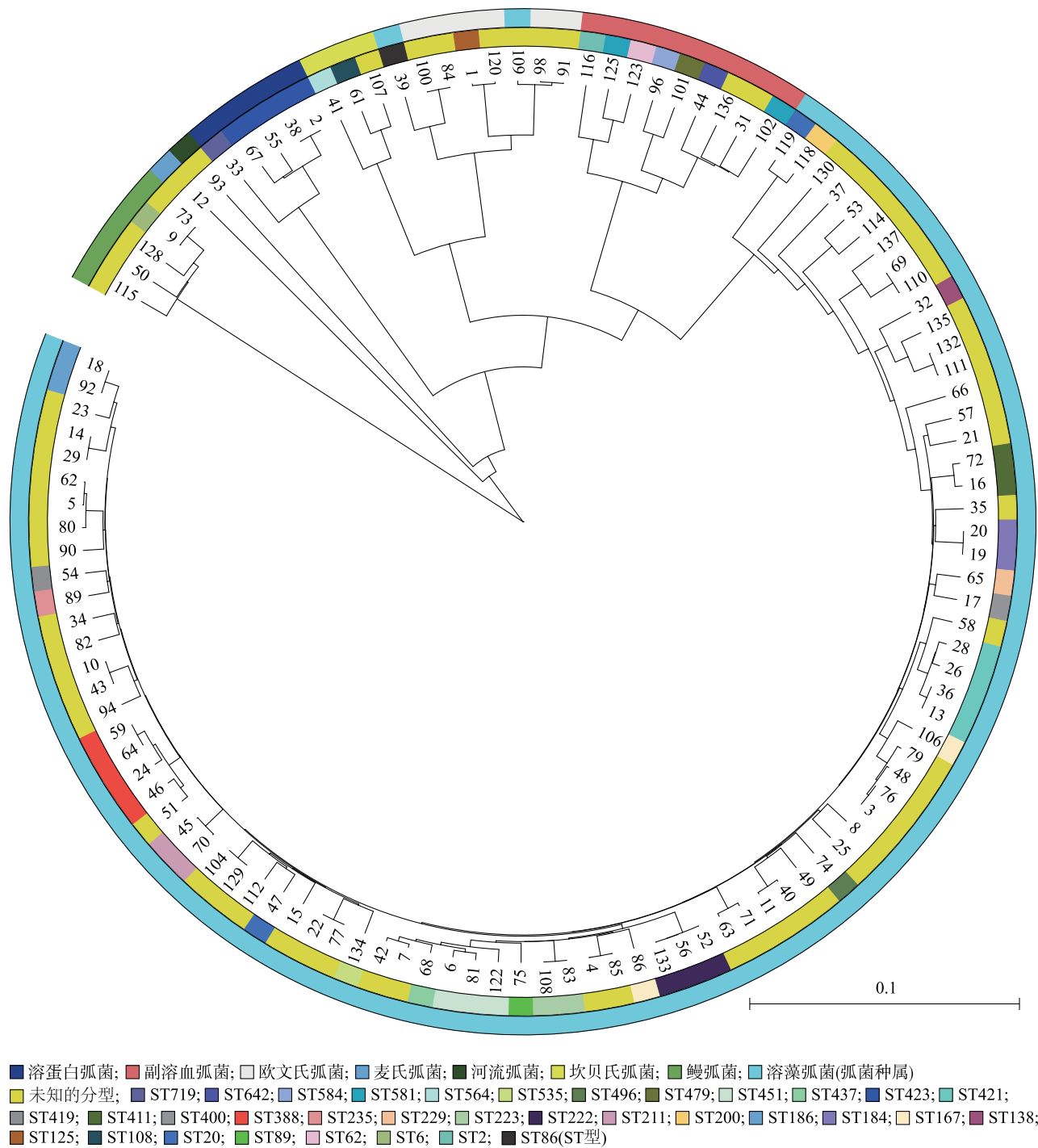
毒力基因类别		毒力基因	检出菌株数	检出率 (%)
一级结构	二级结构			
		<i>vopB</i>	98	82.35
		<i>vopD</i>	67	56.30
		<i>vopN</i>	15	12.61
	T3SS1 效应蛋白	<i>vopQ</i>	97	81.51
		<i>vopR</i>	12	10.08
		<i>vopS</i>	12	10.08
		VPA0450	12	10.08
	T6SS	<i>vasA</i>	1	0.84
		<i>vasD</i>	1	0.84
		<i>vasE</i>	8	6.72
		<i>vasG</i>	8	6.72
		<i>vasK</i>	1	0.84
		<i>hcp-1</i>	11	9.24
		<i>hcp-2</i>	11	9.24
		VCA0109	2	1.68
		<i>vgrG-2</i>	1	0.84
	T6SS 效应物	<i>vgrG-1</i>	7	5.88
		<i>vgrG-3</i>	2	1.68
	T2SS	<i>epsE</i>	69	57.98
		<i>epsF</i>	1	0.84
		<i>epsI</i>	2	1.68
		<i>epsK</i>	97	81.51
外毒素	霍乱弧菌溶血毒素	<i>hlyA</i>	1	0.84
	重复毒素	<i>rtxA</i>	7	5.88
	不耐热溶血毒素	<i>tlh</i>	108	90.76
其他	附属定植因子	<i>acfB</i>	1	0.84

3 讨论

弧菌是重要的人畜共患病病原菌之一。其中,溶藻弧菌是水产养殖中最重要的病原菌之一,是造成对虾患病主要原因^[22],同时,溶藻弧菌还能引起食物中毒^[23-24]、伤口感染等致病事件^[25],因此研究弧菌的分子流行病学具有重要的意义。本研究结果表明,南通地区虾源弧菌总检出率为 21.25%,与同地区水产源弧菌检出率^[26-27]基本一致,高于秦思等报道的江苏省水产养殖环节弧菌平均检出率(4.2%)^[28]。南通地区虾源弧菌中溶藻弧菌占比 73.95%,为虾源弧菌优势亚型。多位点序列分型结果表明,南通地区虾源弧菌具有丰富的遗传多样性,其中溶藻弧菌分离株 85、分离株 4 与人类临床来源的菌株 VAM06、VAM02 在系统发育树上位于同一进化分支,且为相同的 ST 型(ST223),基因组有着

高度同源性,说明虾源弧菌具有克隆传播并导致人类感染的风险。

水产养殖中抗菌药的误用或滥用,导致病原菌对抗菌药耐药性的出现和传播,且随着养殖时间的延长,弧菌的耐药水平和耐药基因的携带数量呈上升趋势,养殖环境中耐药基因丰度亦随之增加,给水产养殖业带来巨大挑战^[29-30]。近年来,国内学者对不同地区水产源弧菌的耐药性开展了较多研究,发现弧菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药性较高,部分地区弧菌对青霉素的耐药率达到 100%,对阿莫西林和氨苄西林的耐药率超过 70%^[31-33]。本研究发现,73.11%菌株和 58.82%菌株分别对氨苄西林、头孢氨苄具有耐药性,可能与上述两类抗菌药物价格低廉且在水产养殖上广泛应用有关。南通地区虾源弧菌对盐酸环丙沙星的耐药率为 6.72%,与邓佩韦等^[34]报道的杭州地区水产源弧菌对盐酸环丙沙星



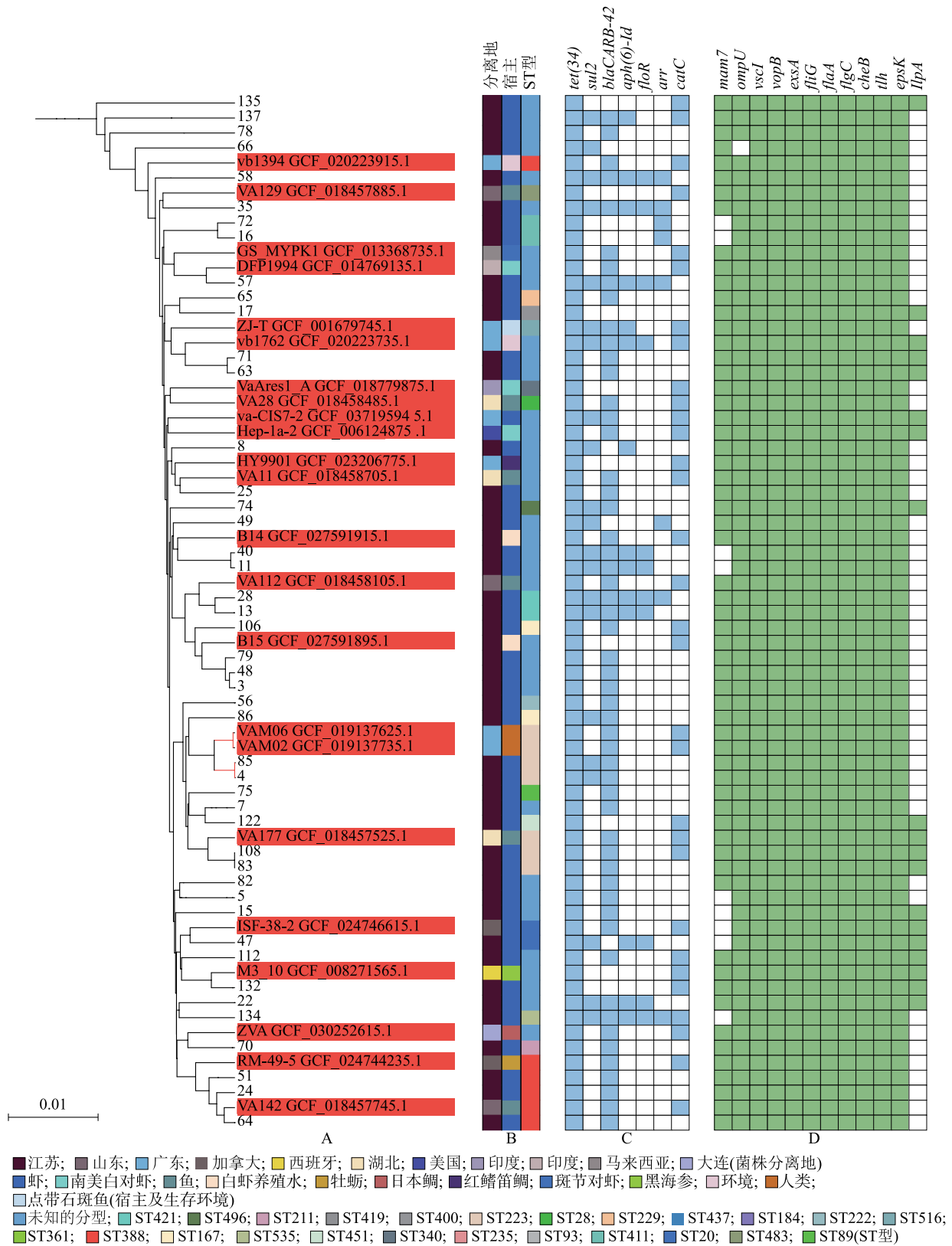
数字表示分离株编号,进化树最外圈为弧菌分离株 ST 型,内圈表示分离株弧菌具体种属。

图1 弧菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Vibrio* isolates

耐药率相似(7.14%);对磺胺异噁唑的耐药率为26.89%,高于吕蓓等^[35]报道的桐乡地区食品源副溶血弧菌磺胺异噁唑的耐药率(12.5%)。通过分析南通地区虾源弧菌的耐药状况及耐药基因分布,

本研究认为该地区在对虾养殖过程中可使用氟苯尼考和盐酸环丙沙星等相对敏感的抗菌药物防治虾的弧菌感染,不仅可以取得较好的防治效果,同时可以减少耐药性的产生。本研究分离的溶藻弧菌分离株



进化树中标红的为数据库中溶藻弧菌,未标红的为本研究获得的溶藻弧菌分离株;热图中蓝色代表耐药基因,绿色代表毒力基因。
 图 2 溶藻弧菌系统发育树 (A)、ST 型 (B) 及耐药基因 (C)、毒力基因 (D) 热图
 Fig.2 Phylogenetic tree of *Vibrio alginolyticus* isolates (A), ST typing (B), antimicrobial resistance gene heatmap (C), and virulence gene heatmap (D)

普遍携带耐药基因 *tet* (34)、*bla*_{CARB-42}, 与郑宏源等^[36]、Ye 等^[37]的研究结果一致。此外,除常见的 *bla*_{ampC}、*bla*_{CARB} 等 β -内酰胺耐药基因之外,本研究发现 2 例弧菌携带碳青霉烯耐药基因 *bla*_{IMP-15}^[38]。碳青霉烯类药物仅批准应用于人类临床医疗,但是水产弧菌中检出了碳青霉烯类的耐药基因,这可能与该基因的水平转移和引入有关,同时 β -内酰胺类药物在水产养殖中的长期使用也可能促进该耐药基因的传播和扩散。

时晨等^[39]的研究结果表明,携带 *tdh*、*trh* 毒力基因的产毒株与食源性疾病爆发事件密切相关。本研究分离的弧菌菌株 *tdh*、*trh* 基因的检出率均为 0, 与非临床来源分离株 *tdh*、*trh* 携带率较低^[40-42]一致。而 *tlh* 基因的检出率为 90.76%,说明南通地区对虾生产环境中存在较严重的副溶血弧菌污染。本研究得到的弧菌分离株普遍携带鞭毛、黏附因子、T3SS 等相关毒力基因^[42-43],且不同 ST 型菌株之间毒力基因的携带情况有所差异,说明不同菌株的毒力强弱可能存在差异。本研究还分离到携带重复毒素基因 *rtxA* 和溶血毒素基因 *hlyA* 的弧菌菌株,这 2 种基因分别在创伤弧菌和霍乱弧菌中有所报道,推测对虾养殖过程中可能通过基因水平转移的方式获得了这两种毒力基因^[19-21]。

4 结论

弧菌不仅是水产养殖中重要病原菌之一,也是重要的人兽共患菌。南通地区虾源弧菌的种类丰富,其中溶藻弧菌、副溶血弧菌、欧文氏弧菌、溶蛋白弧菌、鳃弧菌、坎贝氏弧菌、麦氏弧菌、河流弧菌的检出率分别为 73.95%、7.56%、5.88%、4.20%、4.20%、2.52%、0.84%、0.84%。分离株对氨苄西林、头孢氨苄和多西环素的总耐药率较高,分别达 73.11%、58.82%、45.38%,多重耐药菌株占比 26.89%。分离株中共检测到 47 种耐药基因,其中 *tet* (34)、*tet* (35)、*bla*_{ampC} 检出率较高,分别为 97.48%、88.24%、61.34%。分离株中共检测到 117 种毒力基因,未发现 *trh*、*tdh* 食源性相关毒力基因;119 株弧菌分离株中 53 株可分为 34 种 ST 型,主要流行型为 ST388。综上所述,南通地区虾源弧菌具有多样性,具有广泛的进化可能性;该地区弧菌分离株携带的毒力基因亦呈现多样性,耐药基因较多且耐药率较高。

参考文献:

- [1] 郑志伟. 食品中弧菌的耐药性和致病性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [2] THOMPSON F L, HIDA T, SWINGS J. Biodiversity of vibrios[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 403-431.
- [3] YE L W, ZHENG Z W, WANG Y L, et al. Integrating metagenomic and isolation strategies revealed high contamination of pathogenies and resistome in market shrimps[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 926: 171924.
- [4] 郑玉东, 张翔, 姚梦丽, 等. 养殖环境及贝源溶藻弧菌 MLST 分型及其毒力基因、耐药性分析[J]. *渔业科学进展*, 2024, 45(1): 211-223.
- [5] 谢腾飞. 中国食源性副溶血性弧菌遗传多样性分析与冷胁迫研究[D]. 广州:华南理工大学,2018.
- [6] ALLARD M W. The future of whole-genome sequencing for public health and the clinic[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(8): 1946-1948.
- [7] 沈应博, 史晓敏, 沈建忠, 等. 全基因组测序与生物信息学分析在细菌耐药性研究中的应用[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 541-557.
- [8] BERTELLI C, GREUB G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, 19(9): 803-813.
- [9] 吴书香, 李丽倩, 姚琳, 等. 海产源多重耐药共生菌的耐药表型及耐药基因分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(2): 248-255.
- [10] 刘建军. 上海市水产品及其养殖环境中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的流行、毒力及抗生素耐药性分析[D]. 上海:上海海洋大学,2022.
- [11] 安伟, 张海强, 高晓华. 上海地区虾源弧菌分离鉴定及分子分型研究[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(36): 140-145.
- [12] 吴俊敏, 王艺, 郝婧薇, 等. 湛江地区患病对虾池塘中副溶血性弧菌的 MLST 分型和新型耐药毒株的分离鉴定[J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(1): 59-67.
- [13] 高晓华, 安伟, 张明辉. 上海凡纳滨对虾源副溶血弧菌耐药性及其耐药基因检测分析[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(3): 827-836.
- [14] 魏文娟, 赵姝, 王元, 等. 副溶血弧菌养殖对虾分离株耐药性及耐药基因分析[J]. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 9-16.
- [15] 李璐璐, 骆延波, 齐静, 等. CLSI 药物敏感性试验标准 VET01-A4 概述及更新要点[J]. *中国家禽*, 2014, 36(24): 63-66, 69.
- [16] 吉星, 李俊, 王冉, 等. 金黄色葡萄球菌毒力调控及减毒药物研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56(4): 1594-1607.
- [17] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.

- [18] KOTLOWSKI R, GRECKA K, KOT B, et al. New approaches for *Escherichia coli* genotyping[J]. *Pathogens*, 2020, 9(2):73.
- [19] CHOI G, CHOI S H. Complex regulatory networks of virulence factors in *Vibrio vulnificus* [J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(12):1205-1216.
- [20] BENITEZ J A, SILVA A J. *Vibrio cholerae* hemagglutinin (HA)/protease; an extracellular metalloprotease with multiple pathogenic activities[J]. *Toxicon*, 2016, 115:55-62.
- [21] KWAK J S, JEONG H G, SATCHELL K J F. *Vibrio vulnificus* rtxA1 gene recombination generates toxin variants with altered potency during intestinal infection [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(4):1645-1650.
- [22] LEE K K, YU S R, YANG T I, et al. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22(2):111-114.
- [23] 林燕, 郑双来. 一起由溶藻弧菌引起食源性疾病疫情的调查分析[J]. *中国农村卫生事业管理*, 2017, 37(1):59-60.
- [24] 程亚琪, 隋凌云. 一起溶藻弧菌引起的食物中毒[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2014, 1(11):2043.
- [25] LEE D Y, MOON S Y, LEE S O, et al. Septic shock due to *Vibrio alginolyticus* in a cirrhotic patient; the first case in Korea [J]. *Yonsei Medical Journal*, 2008, 49(2):329-332.
- [26] 王筱, 梁艳茹, 周雨晴, 等. 2017-2021年上海市浦东新区水产品中致病性弧菌监测分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(12):1437-1440.
- [27] 谭维维, 鞠佩锋, 许海燕. 2017-2022年南通市副溶血性弧菌污染状况分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(13):1566-1568, 1572.
- [28] 秦思, 乔昕, 沈赞, 等. 2016年江苏省淡水养殖环节常见致病性弧菌污染状况调查[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12):3946-3951.
- [29] WATTS J E M, SCHREIER H J, LANSKA L, et al. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6):158.
- [30] LIU J, WU Q, XU H, et al. Change of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. during shrimp culture in Shanghai [J]. *Aquaculture*, 2024, 580:740303.
- [31] 王娟, 刘秀峰, 陈凡冰, 等. 福建省福清市 2021-2023 年副溶血性弧菌食源性疾病暴发分离株病原学特征与溯源分析[J]. *中国热带医学*, 2024, 24(6):740-744.
- [32] 董慧明, 种婷, 刘霓, 等. 辽宁省市售水产品中副溶血性弧菌的污染状况及耐药性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12):5066-5071.
- [33] 黄宏芬, 刘坚基, 连宪强, 等. 2021-2022年广东省深圳市大鹏新区海水及海产品溶藻弧菌的污染状况、毒力基因分布和耐药性研究[J]. *疾病监测*, 2024, 39(8):1074-1078.
- [34] 邓佩韦, 郑双芝, 严晗, 等. 杭州市水产品中溶藻弧菌耐药表型及耐药基因分布特征[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(9):319-326.
- [35] 吕蓓, 吴龙飞, 张英英, 等. 132株副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(8):941-943.
- [36] 郑宏源, 闫琳, 杨超, 等. 溶藻弧菌群体基因组学研究[J]. *遗传*, 2021, 43(4):350-361.
- [37] YE L W, ZHENG Z W, XUY T, et al. Prevalence and genetic basis of tetracycline resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolates recovered from food products in Shenzhen, China during 2013 to 2021 [J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 902:166026.
- [38] SHANTHI AMUDHAN M, SEKAR U, KAMALANATHAN A, et al. bla(IMP) and bla(VIM) mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India [J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2012, 6(11):757-762.
- [39] 时晨, 于良, 王悦, 等. 秦皇岛市一起由副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发事件的检测和溯源分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9):3503-3507.
- [40] 李翠苹, 翟倩倩, 王想, 等. 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(6):174-180.
- [41] 张婷, 杨梦华. 副溶血弧菌的毒力基因表达调控的分子机制[J]. *微生物学报*, 2020, 60(7):1345-1357.
- [42] 廖冬冬, 曹祥玉, 林馨, 等. 福州市 2016-2023 年水产品副溶血性弧菌污染状况及毒力基因检测[J]. *海峡预防医学杂志*, 2024, 30(1):60-62.
- [43] 李宏杰, 陈志杭, 叶斌, 等. 食源性相关腹泻患者粪副溶血性弧菌检测结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(2):154-157.

(责任编辑:石春林)