

大黄鱼中哈维氏弧菌毒力及耐药特性分析

吴立婷^{1#}, 廖金轩^{2#}, 庞茂达¹, 包红朵¹, 周艳¹, 孙利厂¹, 王冉^{1*}, 张辉^{1*}

(1. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 南京 210014; 2. 扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: **目的** 分析鉴定海产养殖中主要病原哈维氏弧菌的毒力及耐药特性。**方法** 采集来自于网箱养殖区病死大黄鱼, 分离并鉴定哈维氏弧菌, 利用微量肉汤稀释法分析分离株对13种抗生素的敏感特性, PCR鉴定耐药基因(*tetA*、*tetB*、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*mecA*、*aac(6′)-Ib*、*oqxA*、*sul1*、*sul2*、*mcr-1*)及其毒力基因。**结果** 从病料中分离并鉴定出54株哈维氏弧菌, 耐药分析表明对硫酸粘杆菌素、庆大霉素、四环素、氨基西林、复方新诺明和阿莫西林均耐药, 96.2%的分离株对头孢噻唑, 92.6%的分离株对链霉素、阿米卡星表现为耐药, 88.9%的分离株对恩诺沙星, 87.1%的分离株对卡那霉素呈现高度耐受特性。所有分离株同时对9种抗生素显示100%耐药, 同时耐受10种抗生素的菌株有94.4%, 同时对11和12种抗生素耐受的菌株分别达到85.2%和64.8%, 对13种抗生素均产生耐药的菌株达到37.0%(20/54)。耐药基因分析表明四环素类*tetA*为主要耐药基因, 检出率高达81.5%; 氨基糖苷类*aac(6′)-Ib*、β-内酰胺类*mecA*、磺胺类*sul1*、*sul2*、喹诺酮类*oqxA*和大环内酯类*ermA*、*ermC*分别检出4~7株。毒力基因分析表明*toxR*携带率高达75.9%。**结论** 本研究分析了海产养殖中主要病原哈维氏弧菌感染状况, 其耐药严重且普遍携带毒力基因, 表明哈维氏弧菌耐药和毒力对海产养殖造成重要威胁。同时本研究为弧菌病的有效防治提供参考依据。

关键词: 哈维氏弧菌; 耐药特征; 耐药基因; 毒力基因

Virulence and antimicrobial resistance of *Vibrio harveyi* in large yellow croaker

WU Li-Ting^{1#}, LIAO Jin-Xuan^{2#}, PANG Mao-Da¹, BAO Hong-Duo¹, ZHOU Yan¹,
SUN Li-Chang¹, WANG Ran^{1*}, ZHANG Hui^{1*}

(1. Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Institute of Food Safe and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Biological Sciences and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and identify of virulence and drug resistance of *Vibrio harveyi*, which is the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671955)、江苏省农业科技自主创新资金项目[cx(16)1028]

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31671955), and the Jiangsu Agricultural Science and Technology Foundation [cx(16)1028]

[#]吴立婷、廖金轩为共同第一作者。

[#]WU Li-Ting and LIAO Jin-Xuan are co-first authors.

***通讯作者:** 张辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性病原菌监测及生物防控。E-mail: Huiz@jaas.ac.cn

王冉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品污染物监测及防控。E-mail: wangran2001@126.com

***Corresponding author:** ZHANG Hui, Ph.D, Professor, Institute of Food Safe and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China. E-mail: Huiz@jaas.ac.cn

WANG Ran, Ph.D, Professor, Institute of Food Safe and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China. E-mail: wangran2001@126.com

main pathogen in marine culture. **Methods** *Vibrio harveyi* was isolated and identified from dead yellow croaker collected from cage culture area. Antibiotic susceptibility was tested by broth microdilution with 13 antibiotics. Resistance genes (*tetA*, *tetB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mecA*, *aac(6)-Ib*, *oqxA*, *sul1*, *sul2* and *mcr-1*) and virulence genes were identified by PCR. **Results** Totally 54 *Vibrio harveyi* strains were identified from the infected materials. Resistance analysis showed that all strains were resistant to colistin sulfate, gentamicin, tetracycline, ampicillin, co-trimoxazole and amoxicillin, 96.2% of the isolates showed resistance to cefotaxime, 92.6% of the isolates showed resistance streptomycin and amikacin, and 88.9% and 87.1% of the isolates showed high resistance to enrofloxacin and kanamycin. All isolates showed 100% resistance to 9 antibiotics at the same time, 94.4% of the strains were resistant to 10 antibiotics at the same time, 85.2% and 64.8% of the strains were resistant to 11 and 12 antibiotics, respectively, and 37.0% of the strains were resistant to 13 antibiotics (20/54). From the results of resistance genes, *tetA* was the main resistance gene, and the detection rate was as high as 81.5%. Aminoglycosides *aac(6)-Ib*, β -lactam *mecA*, sulfonamide *sul1*, *sul2*, quinolones *oqxA* and macrolides *ermA*, *ermC* were detected in 4-7 strains, respectively. The results of the virulence genes test showed that the frequency of *toxR* carrying rate was as high as 75.9%. **Conclusion** This study analyzed the infection status of *Vibrio harveti*, the main pathogens in marine aquaculture, and its drug resistance was severe and it generally carried virulence genes, indicating that the drug resistance and virulence of *Vibrio harveti* posed an important threat to marine aquaculture. At the same time, this study provides a reference for the effective prevention and treatment of *Vibriosis*.

KEY WORDS: *Vibrio harveyi*; antimicrobial resistance; resistance gene; virulence gene

1 引言

大黄鱼是我国海产养殖中主要鱼类之一,近年来随着福建宁德地区海产网箱养殖规模的不断扩大,养殖密度急剧增加,生物、有毒有害物质的侵袭,水体环境污染等因素的影响^[1],养殖病害频发,其中弧菌病是危害最为严重的细菌性疾病,给大黄鱼养殖业带来了巨大的威胁和经济损失^[2]。弧菌病在世界范围内都有出现,主要分布在印度、泰国、澳大利亚、厄瓜多尔及中国等国家和地区,在美国曾发现引起鲈鱼出现眼部感染^[3]。此外,浙江省主要香鱼养殖区域宁海县发生香鱼爆发性病害,病鱼表现典型的弧菌病特征^[4]。研究表明,诱发大黄鱼弧菌病的主要病原为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),其不仅可以感染鱼类,误食感染哈维氏弧菌的食物或水能够引起人类腹泻、败血症、中耳炎等^[5],给公共安全造成严重威胁。目前针对哈维氏弧菌感染危害,主要措施仍是使用抗生素物进行防治。然而随着药物的不规范使用,致使弧菌产生较强的耐药性,未来将可能出现“无药可控”的局面,本研究通过研究致病性哈维氏弧菌的耐药性及毒力特性,以期为弧菌病的防治提供可靠的参考依据和指导信息,保障海产养殖业的持续发展及海产品的质量安全。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

微量细菌定量药敏试剂盒、水解酪蛋白

(mueller-hinton, MH)肉汤培养基、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salt sucrose agar culture medium, TCBS)、海生细菌培养基(2216E)、细菌琼脂粉(北京陆桥技术有限责任公司); Goldview、DNA 染料、DNAMarker(日本 Takara 公司); DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)。

Ge1Doc 2000 凝胶图像分析系统(美国 BIO-RAD 公司); Labcycler PCR 仪(德国圣欧国际有限公司); 电泳槽(北京博思公司)。

2.2 哈维氏弧菌分离与鉴定

采集宁德网箱养殖区域患病及濒死大黄鱼 300 份,参考国际 GB 4789.7-2013^[6]进行弧菌分离鉴定,取肝脏、胰腺及病灶接种到 TCBS 培养基,30 °C±1 °C 培养 18~24 h。典型的哈维氏弧菌在 TCBS 上呈圆形、表面光滑的黄色菌落,用接种环轻触,有粘稠质感,直径约 2~3 mm。从培养箱取出 TCBS 平板后,应尽快挑取菌落,每个平板应挑取 3~5 个。于 2216E 培养基进行纯培养,28 °C, 12~16 h; 将纯化后的单菌落接种到 2216E 液体培养基中,加入 20%甘油于 -80 °C 保存。

2.3 耐药性分析

选择大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌株,采用 CLSI 推荐的微量肉汤稀释法对分离的哈维氏弧菌进行 8 类 13 种抗生素的耐药性检测(见表 1),分别为青霉素与 β -内酰胺类: 氨苄西林(ampicillin, AMP)、阿莫西林(amoxicillin, AMX); 头孢类: 头孢噻呋(ceftriaxone, EFT); 氨基糖苷类:

庆大霉素(gentamicin, CN)、链霉素(streptomycin, SM)、卡那霉素(kanamycin, KAN)及阿米卡星(amikacin, AMK); 四环素类: 四环素(tetracycline, TE); 喹诺酮类: 恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)及环丙沙星(ciprofloxacin, CIP); 磺胺类: 复方新诺明(sulfamethoxazole-trimethoprim, SMZ-TMP); 多肽类: 硫酸粘杆菌素(polymyxin E, PE); 利福霉素家族: 利福平(rifampin, RIF)。

操作方法: 挑取单个菌落, 接种到 2216E 中, 37 °C 振荡培养 6~8 h。用无菌蒸馏水将新鲜菌液 OD_{600 nm} 调至 0.5, 然后用 2216E 液体培养基稀释 1000 倍使菌液浓度为 10⁵ CFU/mL。按照培养基、药物、菌液的步骤依次加入 96 孔板中, 分别设置试验组, 细菌对照组, 空白对照组, 37 °C, 16~20 h 过夜培养。

参考临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准, 观察孔内完全抑制哈维氏弧菌生长的最低药物浓度为最小抑菌浓度(minimum

inhibitory concentration, MIC)值, 阳性对照孔内细菌应有明显生长, 空白对照孔内无细菌生长, 此时, 测定视为有效。药敏试验结果的临界值判定值和质控范围(见表 1)。

2.4 基因组 DNA 的提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明对 54 株哈维氏弧菌基因组 DNA 进行提取, 将提取的 DNA 在 -20 °C 保存备用。

2.5 耐药基因检测

通过 PCR 方法分析哈维氏弧菌中 11 种主要耐药基因携带情况, 11 种耐药基因主要包括 β-内酰胺类: *mecA*; 四环素类: *tetA*, *tetB*; 氨基糖苷类: *aac(6')-Ib*; 磺胺类: *sul1*, *sul2*; 喹诺酮类: *oqxA*; 大环内酯类(红霉素): *ermA*, *ermC*, *ermB*; 多肽类: *mcr-1*。参考文献设计并合成引物^[5,7](见表 2), PCR 检测后电泳分析扩增产物。

表 1 药敏试验判断标准
Table 1 The judgment standard of drug sensitivity test

药物名称	质控范围/(μg/mL)	判断标准/(μg/mL)		
		敏感(sensitive, S)	中介(intermediary, I)	耐药(resistance, R)
庆大霉素	0.064~4	≤4	8	≥16
氨基西林	0.125~4	≤8	16	≥32
四环素	0.125~1	≤4	8	≥16
环丙沙星	0.008~0.03	≤1	2	≥4
利福平	4~16	≤1	2	≥4
阿米卡星	0.5~4	≤16	32	≥64
硫酸粘杆菌素	0.25~2	≤8	-	≥2
复方新诺明	8~32	≤2/38	-	≥4/76
恩诺沙星	0.004~0.016	≤0.5	1~2	≥4
卡那霉素	1~4	≤16	32	≥64
链霉素	2~16	≤8~32	32	≥64
头孢噻唑	4~16	≤2	4	≥8
阿莫西林	2/1~8/4	≤8/4	16/8	≥32/16

表 2 耐药基因引物序列设计
Table 2 Primer sequences of resistance genes

药物名称	耐药基因	引物序列	扩增长度/bp
四环素类	<i>tetA</i>	F:GCTACATCCTGCTTGCCTTC	220
		R:CATAGATC GCCGTGAAGAGG	
	<i>tetE</i>	F:GTGGACAAAGGTACAACGAG	230
		R:CGGTAAAAGTTCGTCACACAC	
氨基糖苷类	<i>aac(6')-Ib</i>	F:TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	544
		R:CTCGAATGCCTGGCGTGTTC	
喹诺酮类	<i>oqxA</i>	F:GATCAGTCAGTGGGATAGTTT	670
		R:TACTCGGCGTAACTGATTA	

续表 2

药物名称	耐药基因	引物序列	扩增长度/bp
大环内酯类	<i>ermA</i>	F:AAGCGGTAAAACCCCTCGAG R:TCAAAGCCTGTCGGATTGG	651
	<i>ermB</i>	F:GAAAAGGTACTCAACCAAATA R:CATTGTGTTAAATTCATGGCAATGA	639
	<i>ermC</i>	F:TCAAAAACATAATATAGATAAA R:GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	641
β -内酰胺类	<i>mecA</i>	F:TAG AAATGACTGAACGTC CG R:TTG CGATCAATGTTACCG TAG	154
	<i>Sul1</i>	F:GTGACGGTGTTCGGCATTCT R:CATCATTTTCGGCATCGTC	779
磺胺类	<i>Sul2</i>	F:GCAACAGTTGGTGCTAAACGAGA R:AGCAGATGTGATTGATTGGGAG	753
	<i>mcr-1</i>	F:CGGTCAGTCCGTTTGTTC R:CTTGGTCGGTCTGTAGGG	560

2.6 毒力基因检测

参照文献^[8,9]和 GenBank 中毒力基因序列, 设计 9 种毒力基因扩增引物(见表 3), 针对分离的哈维氏弧菌基因组进行 9 种毒力基因的 PCR 产物扩增并分析基因序列。

表 3 毒力基因的引物设计
Table 3 Primer sequences of virulence genes

毒力基因	引物序列	扩增长度/bp
<i>toxR</i>	F:TTCTGAAGCAGCACTCAC R:TCGACTGGTGAAGACTCA	390
<i>toxS</i>	F:TCCGTTCTTTTCAGCAGTTG R:GCTGTGCTTCGAAAAAGTCT	355
<i>vhpA</i>	F:TGAACGACGCCATTATT R:CCATTCGGAACTTGTACC	1324
<i>vhpB</i>	F:GCGATGCCGACGACAAT R:CTGCCCTGCTTCCTGTGT	1005
<i>vhhA</i>	F:ATCATGAATAAAACTATTACGTTACT R:GAAAGGATGGTTTGACAAT	1300
<i>vhhB</i>	F:TCAGTGCCCTCAAGTAAGA R:GCTTGATAACACTTTGCGGT	216
<i>luxR</i>	F:ATCTTGCGGCGTGTAGTG R:AGTTGGTTAGTGC GGTTTGT	679
<i>pap6</i>	F:ACTGTGAAAGCGGTCAAC R:GCAAGGTAGGCGTCAGAG	154
<i>flaA</i>	F:GGG AAA ACG ACA ATT GC	355
	R:GCACCAACTCAGCGTCAG R:CGACCCGATTTTGTGAAC	

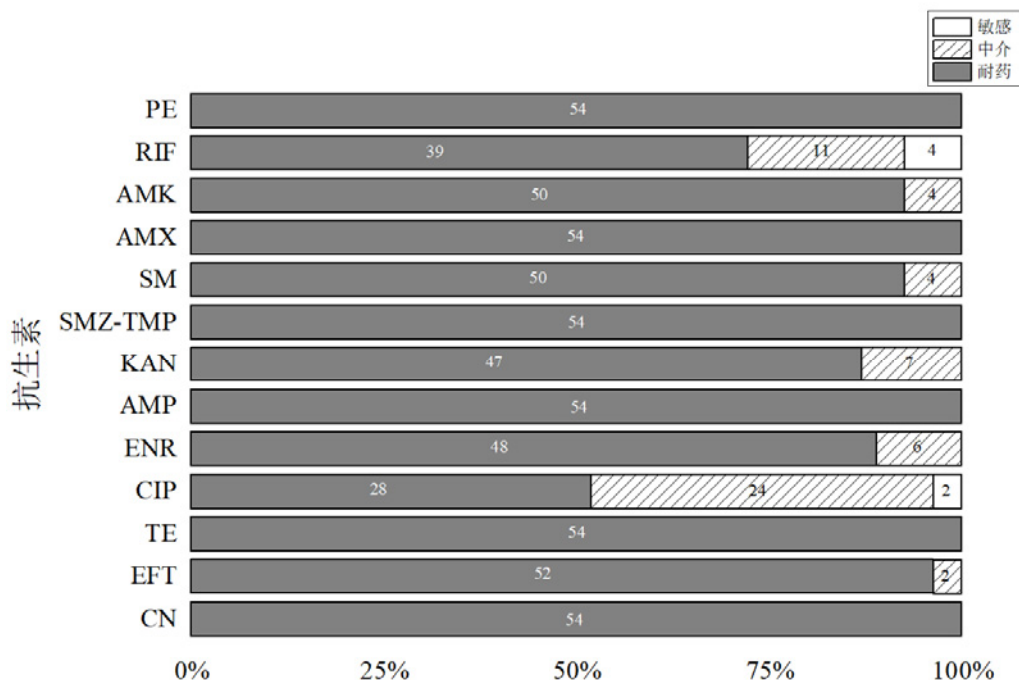
3 结果与分析

3.1 哈维氏弧菌鉴定及耐药性分析

从 300 份大黄鱼病料中分离哈维氏弧菌, 通过挑取 TCBS 平板中黄色菌落进行进一步鉴定并纯化, 获得了 54 株哈维氏弧菌(如图 1)。通过微量肉汤稀释法对分离株进行了 13 种抗生素的敏感性鉴定, 结果如图 2 所示, 根据不同药物的耐药折点可见所有分离株均对硫酸粘杆菌素、庆大霉素、四环素、氨苄西林、复方新诺明和阿莫西林 6 种抗生素呈现高度耐受; 其次对头孢噻唑耐药率高达 96.2% (52/54), 链霉素和阿米卡星为 92.6% (50/54); 对恩诺沙星、卡那霉素、环丙沙星、利福平的耐药率分别为 88.9%(48/54)、87.1%(47/54)、51.9%(28/54)、72.2%(39/54); 而对于利福平、阿米卡星、链霉素、卡那霉素、氨苄西林、环丙沙星、恩诺沙星、头孢噻唑, 则处于中介范围的菌株数较多, 仅有利福平和环丙沙星存在敏感菌株, 耐药性较为严重。



图 1 哈维氏弧菌鉴定结果
Fig.1 Identification of *Vibrio harveyi*



注: PE: 硫酸粘杆菌素; RIF: 利福平; AMK: 阿米卡星; AMX: 阿莫西林; SM: 链霉素; SMZ-TMP: 复方新诺明; KAN: 卡那霉素; AMP: 氨基西林; ENR: 恩诺沙星; CIP: 环丙沙星; TE: 四环素; EFT: 头孢噻唑; CN: 庆大霉素。

图 2 哈维氏弧菌耐药性分析

Fig.2 Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi*

3.2 耐药基因检测结果

针对 54 株分离株耐药基因的检测结果显示(如图 3), 四环素类耐药基因 *tetA* 的携带率最高 81.5%(44/54), *tetB* 未检出; 氨基糖苷类 *aac(6)-Ib* 和 β -内酰胺类耐药基因 *mecA* 的携带率分别为 13.0%(7/54)和 7.4%(4/54); 磺胺类 *sul1*、*sul2* 和喹诺酮类 *oqxA* 耐药基因的携带率分别为 9.3%(5/54)、13.0%(7/54)和 7.4%(4/54); 大环内酯类 *ermA*、*ermC* 携带率为 9.3%(5/54), 未检出 *ermB*; 所有菌株均未检出多肽类耐药基因 *mcr-1*(硫酸粘杆菌素)。

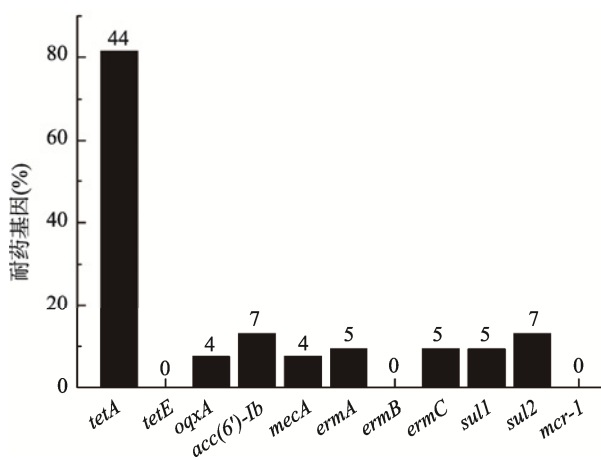


图 3 耐药基因鉴定结果

Fig.3 Identification of the resistance genes in *Vibrio harveyi*

3.3 毒力基因检测结果

对 54 株哈维氏弧菌分离株进行 9 种毒力基因检测, 结果如图 4 所示, *toxR* 检出率最高达到 75.9%(41/54); *luxR* 及 *vhhB* 检出率均为 74.1%(40/54); 64.8%(35/54)分离株检测到毒力基因 *vhhA*; 3.7%(2/54)分离株检出 *toxS*, *flaA*, 54 株分离株中均未检出毒力基因 *vhpA*、*vhpB* 及 *pap6*。

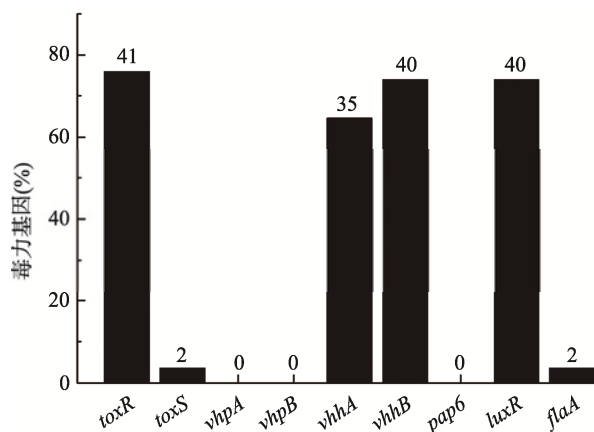


图 4 毒力基因鉴定结果

Fig.4 Identification of the virulence genes in *Vibrio harveyi*

3.4 耐药基因型、耐药表型及毒力基因比较分析

根据耐药基因型、耐药表型及毒力基因检测结果进

行比较分析(见表 4), 至少对 9 种抗生素产生耐药的菌株达到 100%; 同时耐受 10 种抗生素的菌株高达 94.4%; 分别对 11、12 种抗生素表现耐药性的菌株达到 85.2%和 64.8%; 能够同时对 13 种抗生素均产生耐药性的哈维氏弧菌有 20 株, 达到 37.04 %。87.0%的哈维氏弧菌至少携带 1 种耐药基因, 其中 4 株分离株能同时携带 5 种耐药基因(分别包括磺胺类, 喹诺酮类, 氨基糖苷类及四环素类)。约 60%的株菌携带 *toxR*、*vhhA*、*vhhB* 及 *luxR* 4

种毒力基因, 其中 2 株菌携带 5 种毒力基因。分离株 *vh-46* 及 *vh-48* 不仅是耐受抗生素种类最多的菌株同时也是且携带最多耐药基因类型(分别包括 *tetA*、*aac(6['])-Ib*、*oqxA*、*sul1*、*sul2*)。此外, 分离株 *vh-23* 及 *vh-29* 能够耐受 13 种抗生素且同时携带 5 种毒力基因。由此可见, 海产养殖鱼类哈维氏弧菌分离株所携带的耐药基因数量繁多, 涉及的抗生素种类广, 出现严重的多重耐药现象, 且毒力较强。

表 4 耐药表型、耐药基因型及毒力基因携带特性
Table 4 Characteristics of the resistance, resistance genes and virulence genes in *Vibrio harveyi*

菌名称	耐药表型	耐药基因	毒力基因
vh-1	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-2	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-3	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-4	AMP、AMX、CN、SM、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE	<i>ermC</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-5	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	ND
vh-6	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i> 、 <i>ermC</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-7	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-8	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-9	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> 、 <i>ermC</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-10	AMP、AMX、EFT、CN、SM、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	ND
vh-11	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-12	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> 、 <i>ermC</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-13	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>mecA</i> 、 <i>ermC</i>	<i>toxS</i>
vh-14	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>ermA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-15	AMP、AMX、EFT、CN、SM、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-16	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-17	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>ermA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-18	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> 、 <i>ermA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-19	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-20	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-21	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>
vh-22	AMP、AMX、EFT、CN、SM、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	ND
vh-23	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i> 、 <i>flaA</i>
vh-24	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> 、 <i>ermA</i>	<i>toxR</i> 、 <i>vhhA</i> 、 <i>vhhB</i> 、 <i>luxR</i>

续表 4

菌名称	耐药表型	耐药基因	毒力基因
vh-25	AMP、AMX、EFT、CN、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-26	AMP、AMX、EFT、CN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-27	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-28	AMP、AMX、CN、SM、KAN、AMK、TE、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	ND
vh-29	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>toxS</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-30	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	ND
vh-31	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i> , <i>mecA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-32	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhB</i> , <i>flaA</i>
vh-33	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>mecA</i>	ND
vh-34	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	ND
vh-35	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-36	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-37	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-38	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>mecA</i> , <i>sul2</i>	ND
vh-39	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	ND
vh-40	AMP、AMX、EFT、CN、KAN、AMK、TE、ENR、CP、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	ND
vh-41	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-42	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i> , <i>mecA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-43	AMP、AMX、EFT、CN、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-44	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-45	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-46	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	ND
vh-47	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	ND
vh-48	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	ND
vh-49	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-50	AMP、AMX、EFT、CN、SM、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-51	AMP、AMX、EFT、CN、SM、TE、ENR、SMZ-TMP、PE	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>sul2</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-52	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>
vh-53	AMP、AMX、EFT、CN、KAN、AMK、TE、ENR、SMZ-TMP、PE、RIF	ND	ND
vh-54	AMP、AMX、EFT、CN、SM、KAN、AMK、TE、ENR、CIP、SMZ-TMP、PE、RIF	<i>tetA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>toxR</i> , <i>vhhA</i> , <i>vhhB</i> , <i>luxR</i>

注: ND, 未检出; PE: 硫酸粘杆菌素; RIF: 利福平; AMK: 阿米卡星; AMX: 阿莫西林; SM: 链霉素; SMZ-TMP: 复方新诺明; KAN: 卡那霉素; AMP: 氨苄西林; ENR: 恩诺沙星; CIP: 环丙沙星; TE: 四环素; EFT: 头孢噻吩; CN: 庆大霉素。

4 结论与讨论

目前,以哈维氏弧菌为主要病原引起的弧菌病已被认为是海产养殖中最为严重的疾病之一,是海产养殖行业发展的重要限制性因素。国内外海产养殖中分离的弧菌耐药性的研究表明,随着海产养殖的快速集约化发展,弧菌耐药性日益严重。在国内,对海水养殖源弧菌进行耐药性检测表明喹诺酮类、氯霉素类、磺胺类、氨基糖苷、 β -内酰胺类、大环内酯类耐药率均较高并且多重耐药率高达 76%以上^[3,9];在江苏、上海、福建和海南四地区的弧菌对磺胺甲恶唑、氨苄西林、硫酸新霉素、土霉素表现出高耐药率^[7,10];来源于山东省主要贝类养殖区的哈维氏弧菌针对 17 种抗生素的药敏试验,结果显示氨苄西林和阿莫西林的耐药最为严重。在国外,巴西地区分离出的弧菌,约 50%的菌株耐氨苄西林和四环素,约 1/3 的菌株出现多重耐药性^[11];从韩国海岸线渔场中分离到的 371 株弧菌,60%左右对 1 种及以上的抗生素表现出耐药性,50%以上的分离菌株耐氨苄青霉素^[12]。而在本研究中,分离自宁德地区大黄鱼的哈维氏弧菌对青霉素与 β -内酰胺类头孢类、氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类、多肽类、利福霉素家族均表现为高水平耐药(100%),其中对多肽类硫酸粘杆菌素的耐药性表现最为严重,而硫酸粘杆菌素被誉为是目前人类所用抗生素中的最后一道防线。其他菌株则呈现低水平耐受特性,这些菌株随着环境适应性、抗生素的频繁使用以及耐药基因的传播,终将对抗生素产生耐药性。由此可见,大黄鱼中主要病原哈维氏弧菌的耐药程度较为严重,其耐药形势严峻,与其他地区相比较,该地区耐药与长期超量滥用抗生素直接相关,整体耐药水平高于其他地区。

本研究中,54 株分离株呈现多重耐药特征,相应耐药基因的检出率也较高。针对耐受四环素菌株,检出耐药基因 *tetA* 81.5%(44/54)株,表明 *tetA* 耐药基因是导致四环素对哈维氏弧菌高耐受的主要原因之一。然而,氨基糖苷类 *aac(6')-Ib*, β -内酰胺类耐药基因 *mecA*, 磺胺类 *sul1*、*sul2*, 喹诺酮类 *oqxA* 和大环内酯类 *ermA*、*ermC* 的携带菌株仅 4~7 株,而 *tetA* 和 *ermB* 并未检出。同时针对硫酸粘杆菌素的高耐受菌株并未检出其耐药基因 *mcr-1*。*sul1*、*sul2* 是 2 种质粒介导的耐药基因,其编码产生耐药性二氢叶酸合成酶 I 和 II, *sul1* 常位于结合性质粒的整合子中, *sul2* 常位于宿主范围广泛的质粒和小的非接性质粒上,并常与链霉素耐药基因相连^[13]。而本研究中的哈维氏弧菌对磺胺类药物的耐药率为 100%,而 *sul1*、*sul2* 基因的检出率仅为 10%。同样,其他抗生素也具有类似情况,大部分分离株具有耐药性却未检出耐药基因。由此表明,耐药表型与耐药基因的携带并不相一致,这与耐药基因种类的多样性及变种多样性有关,携带耐药基因的菌株并不表现耐药可能源于耐

药基因沉默,而一些耐药菌株不携带耐药基因则有可能是其他耐药机制所致。

弧菌生活在水体并与环境互作进化,部分菌株不断从外界获取有利于在宿主体内定居与繁殖的遗传因子,从而发展成毒力株或致病株,在这个过程中,毒力基因是进化的关键因素之一^[14]。因此,分别对群体效应调节基因(*luxR*)、毒力调控基因(*toxR*)、溶血素基因(*vhhA* 和 *vhhB*)、金属蛋白酶基因(*vhpA* 和 *vhpB*)、毒力相关基因(*toxS*)、鞭毛结构基因(*flaA*)及锌金属蛋白酶基因(*pap6*)毒力基因进行检测分析^[15,16],鉴定哈维氏弧菌毒力基因携带情况。*toxR* 毒力基因检出率最高达到 75.9%,而同时携带 4 种毒力基因的菌株高达 63.0%。这一结果与山东地区哈维氏弧菌分离株的毒力基因携带情况相似^[1],从而表明 *toxR*、*vhhA*、*vhhB*、*luxR* 基因在宁德地区海产养殖中哈维氏弧菌呈优势毒力基因型。*toxR* 能对多种弧菌毒力基因的表达进行调控,而溶血素基因 *vhhA*、*vhhB* 产生多种酶可以引起溶血作用,包括磷脂酶 A、溶血磷脂酶以及其他直接溶血因子,从而表明,哈维氏弧菌携带较为丰富的毒力基因,其与致病性呈正相关性。

综上所述,针对宁德地区分离自大黄鱼的哈维氏弧菌进行了 8 大类 13 种抗生素敏感性分析,呈现高水平多重耐药现象。耐药基因检测中携带四环素耐药基因最多,*toxR*、*vhhA*、*vhhB*、*luxR* 为主要毒力基因,至少有 12 株菌耐受 13 种抗生素且携带 4 种毒力基因和至少 1 种耐药基因。结合耐药表型、耐药基因型和毒力基因分析可为有效控制由哈维氏弧菌引起的疾病提供直接的用药参考,为明确海产鱼类弧菌耐药现状分析提供可靠的参考依据。目前,针对哈维氏弧菌致病机制的研究鲜少,通过毒力基因基础数据深入探讨致病机理,可为有效防控弧菌病的爆发提供预警,同时促进海产养殖业的健康发展,保证食品安全和人类健康。

参考文献

- [1] 金珊,王国良,赵青松,等.海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究[J].水产科学,2005,(1):17-19.
Jin S, Wang GL, Zhao QS, et al. Epidemiology of vibriosis in large yellow croaker *pseudosciaena crocea* (richardson) in marine cage culture [J]. Fish Sci, 2005, (1): 17-19.
- [2] 葛明峰.三种致病弧菌感染养殖大黄鱼的分子流行病学研究[D].宁波:宁波大学,2014.
Ge MF. Molecular epidemiology research on three pathogenic vibrio infection of cultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2014.
- [3] 李林桂.海水弧菌耐药性 I 类整合子分析与副溶血弧菌分子分型研究[D].雅安:四川农业大学,2013.
Li LG. Study on class I antibiotic resistance integrons of vibrios and multilocus sequence typing of *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013.

- [4] 李长红, 陈炯, 史雨红, 等. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 931-937.
Li CH, Chen J, Shi YH, *et al.* Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(7): 931-937.
- [5] 李健. 海水养殖源弧菌耐药性调查与外排泵抑制剂对其耐药性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Li J. Investigation of drug resistance on phenicols and quinolone by efflux pump inhibitors [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [6] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验标准[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standard-Standard for food microbiological test [S].
- [7] 胡伟昭. 副溶血弧菌: 分子分型与主要耐药基因双重 PCR 检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
Hu SW. *Vibrio parahaemolyticus*: Molecular subtyping an duplex PCR assays for detection of major antibiotics resistance genes [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [8] 李启蒙. 山东省贝类弧菌流行病学调查、药敏试验及毒力基因检测[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
Li QM. Epidemiology, Antibiotic susceptibility test and virulence gene detection of *Vibrios* isolated from shellfish in Shandong Province [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2017.
- [9] 写腊月. 海水弧菌耐药性调查及整合子-基因盒系统检测[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Xie LY. Survey of antimicrobial resistance and detection of integron gene cassettes of *Vibrio* isolates from mariculture [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [10] 刘旭. 海水养殖源弧菌耐药性调查及 *qnrVC* 基因在弧菌中的流行情况研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Liu X. Investigation on antimicrobial resistance and the prevalence of *qnrVC* gene in *Vibrios* from mariculture [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [11] Helena RR, Viana DSO, Sousa LA, *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil [J]. *Environ Res*, 2011, 111(1): 21-24.
- [12] Lee D, Han H, Choi S, *et al.* Antibigrams and the estimation of epidemiological cut off values for *Vibrio ichthyenteri* isolated from larval olive flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2012, 342-343: 31-35.
- [13] 吴蓓蓓, 俞盈, 金培婕, 等. 宁波地区海产品及环境中副溶血弧菌主要毒力及耐药性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(5): 381-385.
Wu BB, Yu Y, Jin PJ, *et al.* Analysis of major virulence and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from environment and seafood in Ningbo of Zhejiang Province [J]. *Chin J Zoon*, 2011, 27(5): 381-385.
- [14] 谢珍玉, 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展[J]. 热带海洋学报, 2005, (3): 86-95.
Xie ZY, Hu CQ. Studying progress in horizontal transfer and evolution of *Vibrio* virulence genes [J]. *J Trop Oceanogr*, 2005, (3): 86-95.
- [15] 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.
Xie TF. Study on genetic diversity and cold stress of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [16] 魏大伟. 中国沿海地区副溶血弧菌流行病学调查及遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
Wei DW. Epidemiological investigation and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal areas of China [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



吴立婷, 硕士, 主要从事食源性病原菌的耐药性研究。

E-mail: 1206186910qq.com



廖金轩, 主要从事食源性病原菌的耐药性研究。

E-mail: 191887332qq.com

张辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性病原菌监测及生物防控。

E-mail: Huiz@jaas.ac.cn

王冉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品污染物监测及防控。

E-mail: wangran2001@126.com