

研究报告

江苏水产养殖区拟态弧菌种群结构及遗传多样性

魏富成^{1,2}, 李席席^{1,2}, 吴颖^{1,2}, 张晨^{1,2}, 张策^{1,2}, 袁圣^{1,2,3}, 赵哲^{*1,2}

1 河海大学 江苏省海洋生物资源可持续利用工程研究中心, 江苏 南京 210024

2 河海大学海洋学院海洋生物系, 江苏 南京 210024

3 江苏农牧科技职业学院水产科技学院, 江苏 泰州 225300

魏富成, 李席席, 吴颖, 张晨, 张策, 袁圣, 赵哲. 江苏水产养殖区拟态弧菌种群结构及遗传多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2635-2647.

WEI Fucheng, LI Xixi, WU Ying, ZHANG Chen, ZHANG Ce, YUAN Sheng, ZHAO Zhe. Population structure and genetic diversity of *Vibrio mimicus* isolated from aquaculture area in Jiangsu, China[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2635-2647.

摘要:【背景】拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是一种常见的革兰氏阴性病原菌, 广泛分布于水环境和水生动物体内, 可导致多种水产动物和人类感染。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)已被应用于多种病原菌的分子分型, 其通过分析不同菌株之间的遗传关系, 监测细菌传播的时间和地理分布, 确定感染和传播途径, 但目前未见有关拟态弧菌 MLST 的报道。【目的】开发一种基于 MLST 的拟态弧菌分型方法, 并用于江苏水产养殖区拟态弧菌的种群结构和遗传进化分析, 为拟态弧菌感染所引起的疾病防治提供理论基础。【方法】选择拟态弧菌的 7 个管家基因 *dnaE*、*gyrB*、*mdh*、*recA*、*rpoD*、*pntA* 和 *pyrH* 作为靶点, 对江苏水产养殖区分离的 155 株拟态弧菌进行 PCR 扩增和测序。将测序结果分配等位基因, 制作等位基因谱, 分配不同的序列类型(sequence type, ST), 利用软件 goeBURST-1.2.1 和 MEGA-X 对分配的 ST 型进行克隆复合体和遗传进化树聚类分析; 此外, 利用 Kirby-Bauer 圆盘扩散法测试 155 株拟态弧菌的药敏特性。【结果】155 株拟态弧菌被分为 56 个 STs, 其中 ST11 占比最高; 在双位点变异(double locus variants, DLV)水平分析发现 56 个 STs 分为 3 个克隆复合体和 3 个单体; 系统发育树显示, 56 个 STs 被分为 3 个集群(cluster I、cluster II、cluster III)。药敏结果显示, 155 株拟态弧菌对红霉素类抗生素的耐药性最高(88.39%, 137/155), 对氯霉素类抗生素敏感性最高(91.61%, 142/155)。【结论】本研究建立的 MLST 方法具有良好的分辨率, 可作为拟态弧菌系统发育和未来流行病学调查有用的分子分型工具。根据抗生素耐药谱结果, 提示在养殖过程中可选用氟苯尼考等国家批准使用的专用抗菌药对拟态弧菌进行防治。

关键词: 拟态弧菌; 多位点序列分型; 耐药性

资助项目: 国家自然科学基金(31872597); 江苏省现代农业(大宗鱼)产业技术体系项目(JATS [2022] 517); 江苏省海洋科技创新项目(JSZRHYKJ202209); 江苏海洋生物资源创新中心科研计划专项资金(2022YHTZZZ04)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872597), the Earmarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS [2022] 517), the Innovation Project for Marine Science and Technology of Jiangsu Province (JSZRHYKJ202209), and the Research Funds of the Jiangsu Marine Bioresources Innovation Center (2022YHTZZZ04).

*Corresponding author. E-mail: zhezha@hhu.edu.cn

Received: 2022-12-14; Accepted: 2023-02-09; Published online: 2023-03-02

Population structure and genetic diversity of *Vibrio mimicus* isolated from aquaculture area in Jiangsu, China

WEI Fucheng^{1,2}, LI Xixi^{1,2}, WU Ying^{1,2}, ZHANG Chen^{1,2}, ZHANG Ce^{1,2}, YUAN Sheng^{1,2,3}, ZHAO Zhe^{*1,2}

1 Jiangsu Province Engineering Research Center for Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Hohai University, Nanjing 210024, Jiangsu, China

2 Department of Marine Biology, College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210024, Jiangsu, China

3 Department of Aquatic Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Vibrio mimicus*, a common Gram-negative pathogen, is widely distributed in the aquatic environment and often involved in infectious diseases of aquatic animals and humans. Multilocus sequence typing (MLST) has been applied to the molecular typing of many pathogens, which allows for investigations into genetic relatedness between different strains, therefore provides insights into bacterial evolution and epidemiology. However, no report is available on the MLST of *V. mimicus*. [Objective] To develop a powerful MLST typing method for *V. mimicus* and then apply it to analyze the population structure and genetic evolution of different *V. mimicus* strains, and eventually provide theoretical references for the prevention and control of diseases caused by *V. mimicus* infection. [Methods] Seven housekeeping genes (*dnaE*, *gyrB*, *mdh*, *recA*, *rpoD*, *pntA*, and *pyrH*) of *V. mimicus*, were selected as target genes for MLST, and their conserved fragments were obtained by polymerase chain reaction (PCR) from a total of 155 *V. mimicus* strains isolated from the aquaculture area in Jiangsu and sequenced. All unique DNA sequences were assigned alleles, made allelic profiles, and assigned different sequence type (ST). The clonal complex and genetic evolution tree clustering of the assigned ST types were analyzed using goeBURST-1.2.1 and MEGA-X. In addition, antibiotic sensitivity of the 155 *V. mimicus* strains was tested using the Kirby-Bauer disk diffusion method. [Results] The 155 *V. mimicus* strains were divided into 56 STs, among them ST11 had the highest proportion. At the level of double locus variants (DLV), 56 STs were further divided into three clonal complexes and three monomers. Phylogenetic tree showed that 56 STs fell into three clusters (cluster I, cluster II, and cluster III). The Kirby-Bauer disk diffusion assay showed that the 155 *V. mimicus* strains exhibited the highest resistance to erythromycin (88.39%, 137/155) and the highest sensitivity to chloramphenicol (91.61%, 142/155). [Conclusion] The MLST method established in this study displays good resolution and can be used as a molecular typing tool for phylogeny and future epidemiological investigation of *V. mimicus*. Antibiotic resistance profiles suggest that florfenicol, one of antibacterial agents that approved for application, can be used for the treatment of *V. mimicus* infections in the aquaculture process.

Keywords: *Vibrio mimicus*; multilocus sequence typing; antibiotic resistance

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是一种革兰氏阴性菌,广泛分布于水环境和水生动物体内。拟态弧菌由 Davis^[1]于 1981 年首次发现,因其形态特征、培养特征和抗原结构等与非典型霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)十分相似但生化特征不典型而被命名为“拟态弧菌”。越来越多的证据显示拟态弧菌是人畜共患的条件性致病菌,在适当的条件下可引起鱼、虾和蟹等水生动物的出血、皮肤溃疡和腹水症状^[2]。近年来,我国水产养殖动物由拟态弧菌感染引发疾病的案例被陆续报道^[3-4]。

在弧菌属成员中,对霍乱弧菌、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的毒力机制有相对较系统的研究,但有关拟态弧菌的致病机理知之甚少。目前,研究者已对拟态弧菌的毒力因子开展了一些探索,如拟态弧菌不耐热溶血素(*Vibrio mimicus* hemolysin, VMH)是一种肠毒性溶血素,其溶血作用是通过在红细胞膜上形成孔洞引起的; Mizuno 等^[5-6]的研究表明蛋白酶 VmtA 和 VmtX 可以激活 pro-VMH,介导 VMH 成熟。Tanabe 等^[7]的研究发现拟态弧菌能够利用血红素和血红蛋白作为铁源来满足自身生长需求,发挥毒力作用;并鉴定了一个编码血红素/血红蛋白受体的基因 *mhuA*。根据弧菌三型分泌系统(type III secretion system, T3SS)保守基因设计 PCR 引物,检测发现 T3SS2 基因在个别拟态弧菌菌株中的存在,这为拟态弧菌的毒力机制研究提供了新的方向^[8]。这些毒力因子如何发挥致病作用仍需进一步阐明。值得注意的是,上述毒力因子并不是保守存在于所有拟态弧菌的毒力菌株中,有些也存在于环境菌株中,部分毒力菌株中也并未发现上述毒力因子。因此,开发一种拟态弧菌分子分型技术将对其流行病学、毒力差异机制和传播控制等研究具有重要意义。

细菌分子分型方法有很多种,如脉冲场凝胶电泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、任意引物聚合酶链式反应(arbitrarily primed-polymerase chain reaction, AP-PCR)、肠杆菌基因间重复一致序列 PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC-PCR)等已被广泛应用于弧菌属成员的分型^[9-11]。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种新型的基于核酸序列测定的分子分型方法,1998 年首次应用于脑膜炎奈瑟菌研究^[12]。这种方法通过 PCR 扩增 7 个管家基因内部片段,每个片段大约 450–500 bp,测定其序列,分析序列的变异情况进而进行分型^[13]。对于每个管家基因,一个物种中存在的不同序列被指定为不同的等位基因,对于每个分离株,7 个位点的等位基因定义了等位基因谱或序列类型(sequence type, ST)^[14]。与大多数涉及比较凝胶中 DNA 片段大小的分型方法相比,MLST 技术的最大优势是其序列数据是明确的,分离株的等位基因谱能够通过互联网与已知数据库进行比较分析^[15]。

MLST 技术已经被应用于多个弧菌属成员的分型研究,包括霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌^[16-18],但还未见到有关拟态弧菌 MLST 分型的报道。本研究旨在建立一种基于 MLST 的拟态弧菌分型方法,并应用于从江苏水产养殖地区分离的 155 株拟态弧菌分离株的种群结构及其遗传多样性分析,以期为拟态弧菌的流行病学调查等研究提供一种实用、便捷、基于基因序列的分型方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究中使用的 155 株拟态弧菌是本实验室在 2021–2022 年间从江苏不同地区水产养殖对象分离到或者扬州大学张晓君教授实验室惠

赠。从区域看,南京 18 株,镇江 4 株,宿迁 19 株,盐城 28 株,扬州 74 株,连云港 12 株;从宿主来源看,其中 114 株来自鱼类临床样本,30 株来自虾类临床样本,11 株来自养殖水体,具体信息见表 1。所有菌株使用硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS)平板培养分离,并经 16S rRNA 基因鉴定。

TCBS 琼脂培养基,广东环凯微生物科技有限公司;细菌基因组快速抽提试剂盒,南京诺维赞生物科技股份有限公司;药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司。超微量紫外分光光度计, Mettler-Toledo 公司;梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司;小型冷冻离心机, Beckman Coulter 公司。

1.2 引物设计及 PCR 扩增

从已发表的弧菌 MLST 论文^[16-21]中选择了 10 个管家基因作为建立拟态弧菌 MLST 分型方法的候选基因,分别为 *asd*、*dnaE*、*ftsA*、*groEL*、*gyrB*、*mdh*、*recA*、*rpoD*、*pntA* 和 *pyrH*。以拟态

弧菌 ATCC 33654^T (GenBank 登录号为 CP014042 和 CP014043)和 MB-451 (GenBank 登录号为 ADAF00000000)基因组中上述 10 个基因的序列为模板,根据它们各自的保守区域设计 PCR 扩增引物,引物序列和扩增片段长度见表 2。扩增片段大小为 400–600 bp,以确保一个测序反应即可完成对扩增产物的测序。用细菌基因组快速抽提试剂盒提取拟态弧菌基因组 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系(50 μL):2×Master Mix 25.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 2.0 μL,模板 DNA 2.0 μL, ddH₂O 19.0 μL。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 34 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测大小是否正确,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3 拟态弧菌遗传多样性分析

使用软件 MEGA X^[22]对获得每个基因的序列进行比对切割,获得统一长度的片段。在 MEGA X 中查找每个基因位点中的不同序列,

表 1 江苏省水产养殖区中分离的拟态弧菌菌株信息

Table 1 Information of *Vibrio mimicus* strains isolated from aquaculture areas in Jiangsu province

来源地区 Area of source	样品来源/菌株数 Sample source/Number of strains		总菌株数 Total number of strains
南京 Nanjing	0	日本沼虾/18 <i>Macrobrachium nipponense</i> /18	18
镇江 Zhenjiang	0	日本沼虾/4 <i>Macrobrachium nipponense</i> /4	4
宿迁 Suqian	斑点叉尾鮰/19 <i>Ictalurus punctatus</i> /19	0	19
盐城 Yancheng	斑点叉尾鮰/18 <i>Ictalurus punctatus</i> /18	0	28
连云港 Lianyungang	斑点叉尾鮰/4 <i>Ictalurus punctatus</i> /4	南美白对虾/7 <i>Penaeus vannamei</i> /7	12
扬州 Yangzhou	黄颡鱼/73 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> /73	罗氏沼虾/1 <i>Macrobrachium rosenbergii</i> /1	74
总计 Total	114	30	155

表 2 拟态弧菌 10 个潜在靶基因的引物信息、扩增产物大小

Table 2 Primer sequences and amplicon sizes of the target regions for the ten loci of *Vibrio mimicus*

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	片段长度 Size of amplicon (bp)	来源 Source
<i>asd</i>	F: AGCGTATGGTAGAAGAGCGC	563	本研究 This study
	R: GTTGTTCGGTTGGGAAAGTGC		
<i>dnaE</i>	F: CAACACCACCAAGCAGAAGC	529	本研究 This study
	R: TCGAGATGGATAAACCGCGG		
<i>ftsA</i>	F: TGCACCTGATCACTTGCCAT	534	本研究 This study
	R: CCTTCTATTTGTGCTGCGCC		
<i>groEL</i>	F: TGGATCTGAAGCGCGGTATC	528	本研究 This study
	R: CACCCGTCAGAATCGCGATA		
<i>gyrB</i>	F: CACAAGCACCGTTGTCTGTG	538	本研究 This study
	R: GGCACCTTTCACCGAAACCAC		
<i>mdh</i>	F: CTGGTTTCTGCTGGTGTGTC	514	本研究 This study
	R: CACCTTGCAGTGCTTTCACC		
<i>recA</i>	F: AGGTTCCATCATGCGCCTAG	413	本研究 This study
	R: CGCCCATTTTCGCCTTCAATT		
<i>rpoD</i>	F: ACTTGTCCCTTCGAGGCAAGG	555	本研究 This study
	R: TCTTCATCAGCGAGATCGGC		
<i>pntA</i>	F: TCGGCTCAAGCGAAGAAGTT	577	本研究 This study
	R: ACATCTTTCGCTTGTGCAGC		
<i>pyrH</i>	F: TGCAAAAGCTGGCATGAACC	519	本研究 This study
	R: GTACCTTCCGCTTACCCAT		

进而将其分配不同的等位基因编号, 相同的序列被分配为相同的等位基因编号。根据 7 个位点的等位基因编号建立等位基因谱, 分配为不同序列类型。利用 DnaSP 6^[23] 评估群体遗传参数, 如多态位点数目(number of polymorphic sites, S)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, Pi)和单倍型多样性(haplotype diversity, Hd)。

1.4 克隆复合体分析

使用软件 goeBURST-1.2.1^[24] 对已分配的 ST 进行克隆复合体聚类分析; 通过计算 7 个等位基因编号之间的相似性确定等位基因距离, 定义每一组的单位点变异(single locus variant, SLV)和双位点变异(double locus variant, DLV)的数量。克隆复合体(clonal complex, CC)被定义为一组存在一个或两个等位基因不同的 ST, 而

存在 3 个或更多位点上不同的 ST 被定义为单体 (singleton)。在每个克隆复合体中, 祖先 ST 型被定义为单个位点变异数量最多的 ST^[25]。

1.5 系统发育树构建

将 56 个 ST 的 7 个管家基因的片段序列按 *dnaE-gyrB-mdh-recA-rpoD-pntA-pyrH* 顺序依次进行拼接, 然后使用 MEGA X 对所有串联序列进行 Cluster W 比对分析, 基于最大似然法估计遗传距离, 运用邻近法构建无根系统发育树, 并通过 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 进行可视化处理。

1.6 K-B 法检测耐药表型

采用 Kirby-Bauer 圆盘扩散法(K-B 法)检测 155 株拟态弧菌对 12 种常用抗生素的敏感性。药敏纸片的抗生素分别为氨苄西林(AMP, 10 μg/片)、氯霉素(CHL, 30 μg/片)、氟苯尼考

(FFC, 30 μg /片)、红霉素(ERY, 15 μg /片)、磺胺异噁唑(SOX, 250 μg /片)、甲氧苄氨嘧啶(TMP, 5 μg /片)、复方新诺明(SMP/TMZ, 23.75/1.25 μg /片)、卡那霉素(KAN, 30 μg /片)、新霉素(NEO, 30 μg /片)、环丙沙星(CIP, 5 μg /片)、恩诺沙星(ENR, 10 μg /片)和多西环素(DOX, 30 μg /片)。以大肠杆菌 ATCC 25922 菌株作为质控菌株。使用游标卡尺测量其抑菌圈的直径后, 所有的结果均根据临床和实验室标准研究所(CLSI)指南(<https://clsi.org/>)进行判断, 将判定结果分为敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。如果菌株对 3 种或 3 种以上的抗生素耐药, 则认为是多重耐药(multidrug-resistant, MDR)菌株。

2 结果与分析

2.1 拟态弧菌管家基因的筛选及 MLST 分型方法的建立

PCR 产物的凝胶电泳结果显示 10 个潜在的候选管家基因中有 3 个基因(*asd*、*ftsA* 和 *groEL*)扩增产物出现非特异性条带(图 1), 不符

合 MLST 位点选择的标准; 剩余 7 个基因(*dnaE*、*gyrB*、*mdh*、*recA*、*rpoD*、*pntA* 和 *pyrH*)用于后续的 MLST 分型分析。分析结果显示, 7 个管家基因组合后将 155 株拟态弧菌分离株共分为 56 个 ST, 其中 ST11 是菌株数量最多的 ST, 占 155 株拟态弧菌的 49.03% (76/155)。

2.2 拟态弧菌遗传多样性

利用 DnaSP 6 软件对 7 个管家基因的等位基因多样性数据进行分析, 包括分析片段大小、等位基因数量、多态性位点数量、核苷酸多样性和单倍型多样性等信息, 结果见表 3。每个管家基因的不同等位基因数量不同, 从 7 个(*dnaE*、*recA*)到 18 个(*pntA*)不等, 大多数等位基因的核苷酸序列和氨基酸序列存在差异。7 个管家基因的多态性位点数共有 1 189 个, 以 *pntA* 的数量最多, 包含有 330 个多态位点; 其次为 *pyrH* 基因, 包含有 320 个多态性位点; 最少的为 *recA*, 含有 46 个多态性位点。核苷酸多样性(Pi)结果显示在 7 个 MLST 位点中, *pyrH* 位点的核苷酸多样性最大; 其次是 *pntA* 和

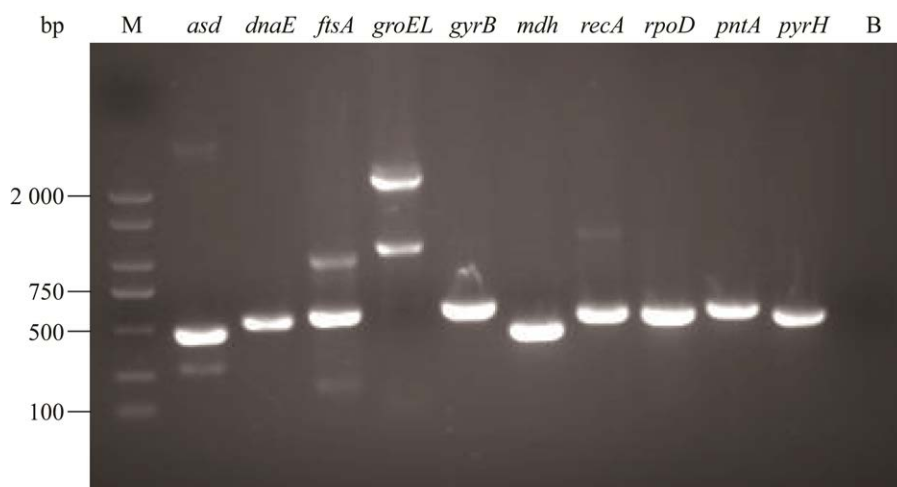


图 1 凝胶电泳分析拟态弧菌 10 个管家基因的 PCR 扩增结果 M: 2 000 bp DNA Marker; B: 空白对照

Figure 1 Gel electrophoresis analysis of PCR products of 10 *Vibrio mimicus* housekeeping genes. M: 2 000 bp DNA Marker; B: Blank.

表3 155株拟态弧菌的等位基因序列变异特征分析

Table 3 Characterization of allelic sequence variation observed in 155 isolates of *Vibrio mimicus*

位点 Locus	序列大小 Sequence length (bp)	等位基因数 Alleles number	多态性 位点数 S	菌株(n=155)		序列型	
				Isolates (n=155)		STs (n=56)	
				核苷酸多样性 Pi	单倍型多样性 Hd	核苷酸多样性 Pi	单倍型多样性 Hd
<i>dnaE</i>	490	7	75	0.056 23	0.516	0.081 63	0.893
<i>gyrB</i>	484	13	283	0.047 30	0.623	0.107 36	0.872
<i>mdh</i>	470	12	89	0.057 73	0.524	0.076 30	0.987
<i>recA</i>	384	7	46	0.048 04	0.526	0.056 45	0.929
<i>rpoD</i>	503	9	50	0.027 24	0.463	0.047 00	0.972
<i>pntA</i>	528	18	330	0.024 27	0.245	0.147 70	0.993
<i>pyrH</i>	463	14	320	0.117 61	0.541	0.191 11	0.908
7 locus totals	3 322	50	1 189	0.012 39	0.965	0.077 38	0.992

gyrB,但是 *pntA* 在辨别能力方面优于 *pyrH* 和 *gyrB*。单倍型多样性(haplotype diversity, Hd)结果显示 *pntA* 的单倍型多样性最大,其次是 *mdh* 和 *rpoD*。以上结果表明,本研究使用的7个管家基因在拟态弧菌 MLST 分型中具有很强的识别能力。

2.3 克隆复合体聚类结果

采用 eBURST 算法对 56 个 ST 进行了种群结构表征分析,在单位点变异水平上的分析显示 56 个 ST 聚类为 4 个克隆复合体和 6 个单体,其中一个以 ST11 为中心,有 23 个卫星 ST;一个以 ST6 为中心,有 16 个卫星 ST;一个以 ST53 为中心,有 5 个卫星 ST;另一个以 ST27 为中心,有 2 个卫星 ST。在双位点变异水平的研究发现 56 个 ST 聚类为 3 个克隆复合体(CC1、CC2 和 CC3)和 3 个单体(图 2),其中 CC1 是最大的克隆复合体,由 25 个卫星序列型组成,ST11 是 CC1 的祖先序列型,主要来源于鱼类样本;CC2 包含 17 个序列型,其中 ST6 是 CC2 的祖先序列型,ST2 为次级祖先序列型,来源于虾类菌株主要聚集在 CC2;CC3 包含全部 11 个序列型,ST53 是 CC3 的祖先序列型,CC3 由环境分离株组成,聚类更加分散。ST12、ST24 和 ST37 因有 3 个或更多位点的序列差异而被定

义为单体。以上研究结果表明江苏水产养殖区拟态弧菌分离株 ST 型呈多元化分布,并且和宿主来源存在一定的联系,源于环境株的序列型主要聚集在 CC3 内。

2.4 基于 MLST 数据的系统发育研究

基于 56 个序列型的总核苷酸序列构建了系统发育树。结果显示,56 个序列型被分为 3 大类群(图 3)。类群 I 包含来自 CC2 的 8 个 ST 和来自 CC1 的 ST10。类群 II 分为两个亚类群(IIa 和 IIb),亚类群 IIa 由 CC1 和 CC3 的序列型共同组成,菌株主要分离于鱼类及其池塘水环境,值得注意的是亚类群 IIb 全部由来自 CC2 的序列型组成。类群 III 是 3 个类群中包含数量最多也最复杂的类群,不仅包括由 CC1 和 CC3 衍生的 ST,也包括 3 个单体 ST12、ST24 和 ST37。

2.5 抗生素耐药性和 MDR 图谱

K-B 法药敏结果表明,155 株拟态弧菌具有广泛的抗生素耐药性,其中对 ERY 的耐药率最高,约为 88.39% (137/155),耐药菌株来源于鱼类及其养殖水体,而来源于虾类的拟态弧菌对 ERY 表现出中介。对复方新诺明、磺胺异噁唑和甲氧苄胺嘧啶等磺胺类抗生素的耐药率分

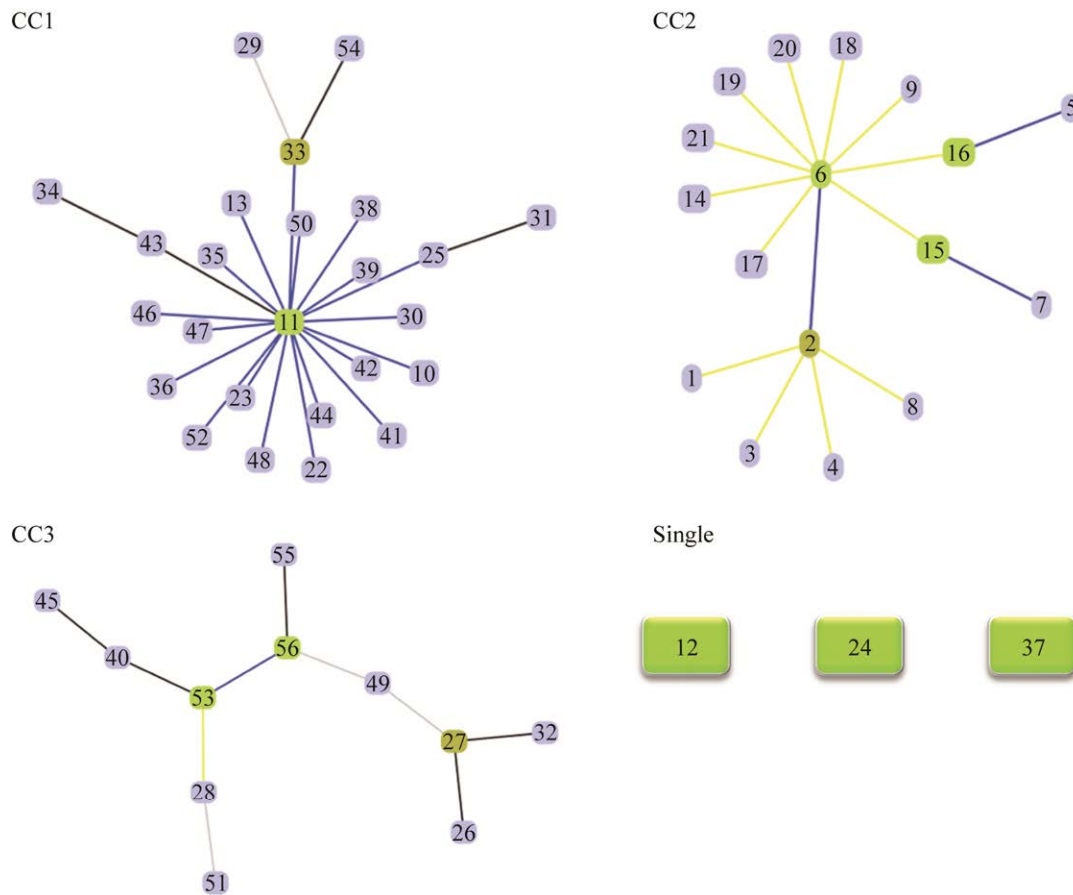


图 2 双位点变异水平分析拟态弧菌的种群结构 eBURST 网络图中数字代表一个序列型. 实线代表单位点变异, 虚线代表双位点变异

Figure 2 Population structure of *Vibrio mimicus* as indicated by eBURST at the double locus variant (DLV) level. Each of the 56 STs in the eBURST network is represented by a box. Heavy lines represent single locus variants, light (grey) lines represent double locus variants.

别为 76.77% (119/155)、72.9% (113/155) 和 52.9% (82/155)。对恩诺沙星、环丙沙星等喹诺酮类抗生素的耐药率为 58.7% (91/155) 和 43.9% (68/155)。相反地, 155 株拟态弧菌对氯霉素类抗生素较为敏感, 其中对氯霉素和氟苯尼考的敏感性分别为 90.32% (140/155) 和 91.61% (142/155)。155 株拟态弧菌中大部分菌株表现出对 3 种及 3 种以上抗生素耐药, 多重耐药率达 81.29% (126/155); 但不同菌株呈现不同的耐药谱, 统计分析显示共有 31 种耐药谱(表 4), 其中 6 株拟态弧菌(6/155, 3.87%)对 10 种以上抗

生素具有耐药性。值得注意的是, 有 10 株拟态弧菌(10/155, 6.45%)对 12 种抗生素均无耐药性, 它们都分离于不同养殖区的虾类样本。

3 讨论与结论

拟态弧菌隶属于弧菌属, 是一种常见的条件致病菌, 可感染多种水产养殖动物引起腹水病、烂身病等, 造成巨大的经济损失, 严重危害水产养殖业的健康发展。因此, 针对拟态弧菌的研究主要集中在分离株的研究上, 疫苗研发近年来也受到了关注, 但由于缺乏有效的分

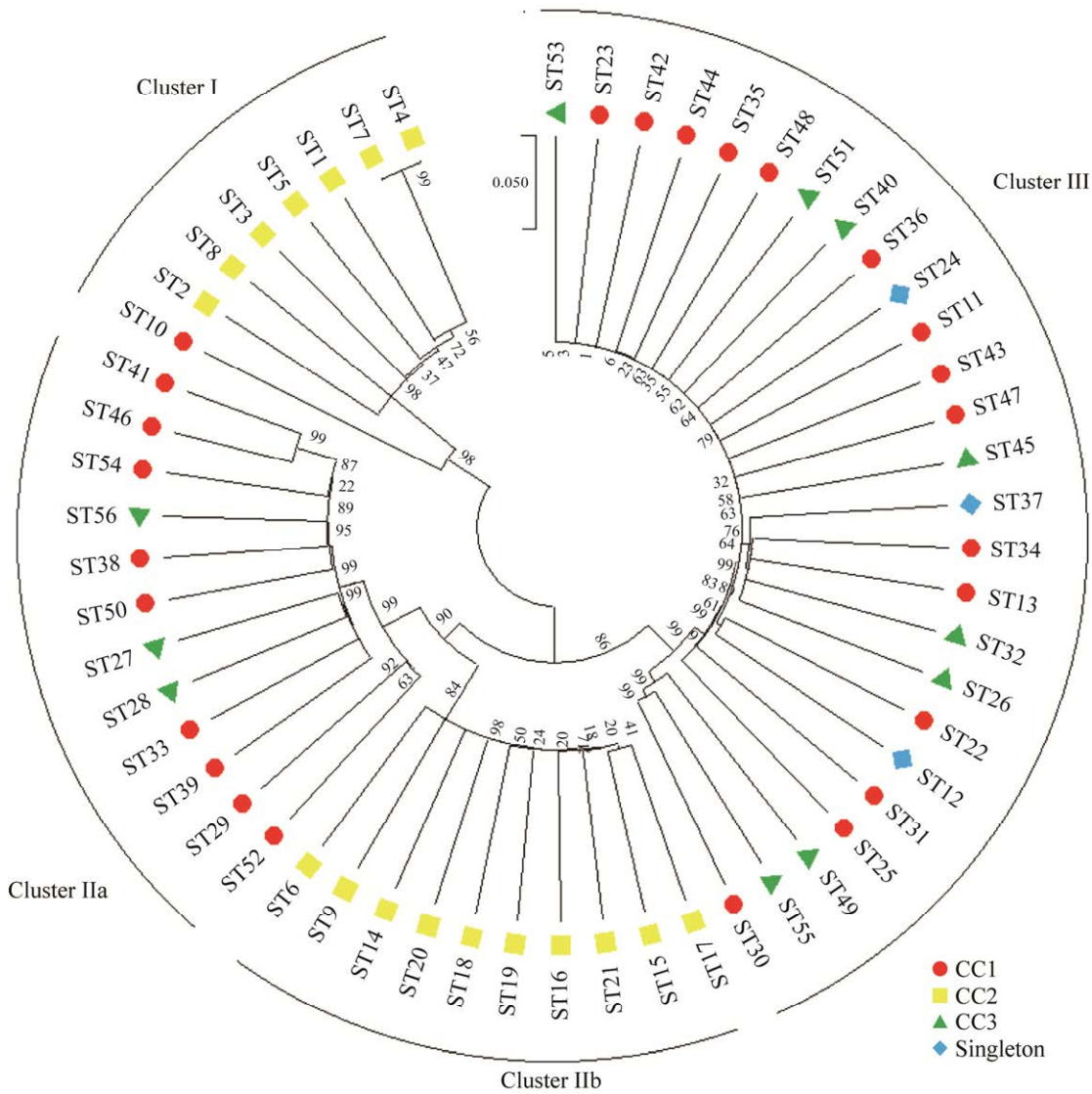


图 3 拟态弧菌 56 个序列型的系统发育树 系统发育树是基于 7 个 MLST 位点的串联序列构建，数字表示可信度

Figure 3 Phylogenetic tree of the 56 STs of *Vibrio mimicus*. The tree was constructed using the concatenated sequences of the seven MLST loci.

子分型手段，拟态弧菌的流行病学调查研究仍需加强。

本研究利用分离于江苏不同养殖区的 155 株拟态弧菌分离株，建立了基于 MLST 技术的拟态弧菌分型方法。该方法采用 *dnaE*、*gyrB*、*mdh*、*recA*、*rpoD*、*pntA* 和 *pyrH* 这 7 个管家基因的保守片段，并基于片段内的序列差

异组成等位基因谱，最终将 155 株拟态弧菌分为 56 个 ST。等位基因的数量反映管家基因的多样性，等位基因数量越多其多样性越丰富^[26]。本研究各管家基因的等位基因数量分布在 7-18 之间，其中 *pntA* 的等位基因数量最多，表明多态性可能主要来自该位点，*dnaE* 和 *recA* 的等位基因数量最少，表明拟态弧菌的 *dnaE* 和 *recA*

表 4 155 株拟态弧菌的耐药谱

Table 4 Antibiotic resistance profiles of 155 *Vibrio mimicus* strains.

抗生素耐受的 Types of antibiotic resistance	抗生素耐药图谱 Antibiotic resistance profile	菌株数 Number of strains
11	AMP-FFC-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-CIP-ENR-DOX	1
	AMP-CHL-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-CIP-ENR-DOX	1
10	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-CIP-ENR-DOX	2
	AMP-CHL-FFC-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-ENR-DOX	1
	AMP-CHL-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-ENR-DOX	1
9	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-CIP-ENR	2
	AMP-CHL-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-NEO-ENR-DOX	1
8	AMP-CHL-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO	1
7	AMP-ERY-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-ENR-DOX	1
	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN-NEO	2
	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-KAN-NEO-ENR	1
6	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-NEO-ENR	2
	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-NEO	2
	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-KAN	1
	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-CIP-ENR	2
	AMP-ERY-SOX-TMP-(SMP-TMZ)-DOX	76
5	AMP-SOX-(SMP-TMZ)-NEO-CIP	1
	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-ENR	6
	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-KAN	41
	AMP-ERY-SOX-(SMP-TMZ)-NEO	1
4	ERY-SOX-(SMP-TMZ)-ENR	4
	AMP-SOX-TMP-(SMP-TMZ)	2
	ERY-(SMP-TMZ)-CIP-ENR	1
3	ERY-SOX-(SMP-TMZ)	3
	SOX-(SMP-TMZ)-CIP	1
	AMP-ERY-(SMP-TMZ)	1
2	CIP-ENR	1
1	(SMP-TMZ)	2
	CIP	1
	ENR	1
0		10

AMP: 氨苄西林; ERY: 红霉素; CHL: 氯霉素; FFC: 氟苯尼考; SOX: 磺胺异噁唑; KAN: 卡那霉素; NEO: 新霉素; CIP: 环丙沙星; ENR: 恩诺沙星; DOX: 西环素; (SMP-TMZ): 复方新诺明

AMP: Ampicillin; ERY: Erythromycin; CHL: Chloramphenicol; FFC: Florfenicol; SOX: Sulfamethoxazole; KAN: Kanamycin; NEO: Neomycin; CIP: Ciprofloxacin; ENR: Enrofloxacin; DOX: Doxycycline; (SMP-TMZ): Paediatric compound sulfamethoxazole tablets.

位点相对较为保守。单倍型多样性反映从样本群体中提取的任何一对菌株在一个位点上携带不同等位基因的概率^[27]。本研究建立的 MLST 方法的 Hd 值为 0.992, 而且 7 个位点 MLST 方案对整个群体中菌株鉴定的鉴别能力为 96.5%, 说明该方法具有较高的鉴别能力和指示分型系统中位点识别能力^[28], 与弧菌属其他成员的 MLST 方案相当^[29]。

克隆复合体分析结果表明 CCs 与宿主来源具有一定的相关性。单位点变异和双位点变异分析均表明, 分离于鱼类的拟态弧菌所组成的 CC1 是最大的克隆复合体, 包含菌株数量最多, 而且两种分析都显示 ST11 均处于 CC1 的中心位置, 说明 ST11 在江苏水产养殖区拟态弧菌种群进化中可能处于祖先位置, 属于优势菌株, 应加强对这种序列型菌株致病力的监测。CC2 全部由从虾中分离出来的序列型组成, ST6 是 CC2 的祖先序列型, ST2 是 CC2 的次级祖先序列型; ST2 为代表的次级进化支从罗氏沼虾的样本分离, 在进化树中与青虾分离序列型属于不同的进化分支, 这可能是由于宿主来源的变化所致。CC3 主要包含来源于养殖环境的序列型, 系统发育树显示它们(ST26、ST32、ST40、ST49、ST51、ST53 和 ST55)与 CC1 的序列型有着密切的联系, 说明这些菌株与鱼类分离株在进化上有密切关系。

基于对 56 个序列型的整体核苷酸序列变异的系统发育分析为了解拟态弧菌群体结构提供了另一种视角(图 3)。本研究 56 个序列型聚类为 3 个大类群, 类群 I 除了分离于鱼的 ST10 外, 其余全部是来自虾的序列型组成, 推测这些虾源拟态弧菌可能由鱼源拟态弧菌进化而来。这与早期的报道类似, 属于相同克隆复合体的分离株可能被分为不同的进化支^[24]。在系统发育树类群 IIa 和类群 IIb 的序

列型组成也证实了这一现象。这种不一致是由于分析方法不同而造成。eBRUST 算法是基于等位基因图谱的方法, 将等位基因差异分配为单体或克隆复合体^[30]。然而邻近法获得的系统发育树基于序列构建, 并且将差异较少的序列聚类在一起, 为揭示进化关系提供了更高的分辨率。类群 III 中包含的序列型最多且最为复杂, 主要是来自鱼类样本及其相应水环境的序列型, 说明江苏水产养殖区内流行的拟态弧菌具有很强的遗传多样性。Abayneh 等^[31]报道 MLSA 方法可以根据分离株的地理来源或宿主进行解析, 这与我们的 MLST 分析结果相一致。

抗生素菌素类药物是过去多年治疗水产养殖动物细菌性疾病的主要手段, 抗生素长时间或者不规范使用会造成细菌对抗生素的耐药性。对 155 株拟态弧菌进行耐药性分析发现, 它们对 12 种不同的抗菌素有 31 种耐药谱, 81.29% 的菌株为 MDR 菌株。这与之前蔺凌云等^[3]调查的拟态弧菌耐药性趋势是一致的, 报道显示从浙江养殖黄颡鱼分离得到的 11 株拟态弧菌均表现为多重耐药, 而且对恩诺沙星、强力霉素、土霉素、氟苯尼考、环丙沙星、交沙霉素、红霉素的敏感率为 100%。特别值得关注的是, 本研究从虾类样本分离的拟态弧菌的耐药性远远低于鱼类样本菌株, 这提示可能与不同养殖品种的养殖模式有关。

综上所述, 本研究建立的 MLST 方案是一种有效鉴定拟态弧菌的分子分型方法, 具有可重复性、快速和经济有效等优点, 避免核心基因组多位点序列分型等基因组检测分析所需的严格分离过程, 可作为拟态弧菌系统发育研究和未来流行病学调查的实用工具, 产生的数据可通过网络访问数据库(<https://pubmlst.org>)直接在实验室之间进行比较。

致谢

感谢扬州大学张晓君团队提供部分拟态弧菌菌株，感谢阳耀帆和曹海航同学在拟态弧菌分离过程中提供的帮助。

REFERENCES

- [1] DAVIS BR, FANNING GR, MADDEN JM, STEIGERWALT AG, Jr BRADFORD HB, Jr SMITH HL, BRENNER DJ. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1981, 14(6): 631-639.
- [2] NILAVAN E, VAIYAPURI M, SADANANDAN SHEELA G, NADELLA RK, THANDAPANI M, KUMAR A, MOTHADAKA MP. Prevalence of *Vibrio mimicus* in fish, fishery products, and environment of south west coast of Kerala, India[J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2021, 104(3): 790-794.
- [3] 蔺凌云, 冯东岳, 潘晓艺, 姚嘉赞, 尹文林, 曹铮, 刘忆瀚, 夏焱春, 沈锦玉. 黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 799-810.
LIN LY, FENG DY, PAN XY, YAO JY, YIN WL, CAO Z, LIU YH, XIA YC, SEHN JY. Identification, virulence-related factors, and antimicrobial susceptibility of *Vibrio mimicus* from yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 799-810 (in Chinese).
- [4] 邓梦玲, 韩帅, 耿毅, 刘丹, 汪开毓, 陈成, 黄小丽, 陈德芳. 南方鲇拟态弧菌的分离、鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(3): 394-400, 405.
DENG ML, HAN S, GENG Y, LIU D, WANG KY, CHEN C, HUANG XL, CHEN DF. Isolation and identification of *Vibrio mimicus* from *Silurus meridionalis* and pathologic lesions of its infection[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(3): 394-400, 405 (in Chinese).
- [5] MIZUNO T, NANKO A, MAEHARA Y, SHINODA S, MIYOSHI SI. A novel extracellular protease of *Vibrio mimicus* that mediates maturation of an endogenous hemolysin[J]. Microbiology and Immunology, 2014, 58(9): 503-512.
- [6] MIYOSHI SI, TOKO N, DODO T, NANKO A, MIZUNO T. Second extracellular protease mediating maturation of *Vibrio mimicus* hemolysin[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(12): 241.
- [7] TANABE T, FUNAHASHI T, MOON YH, TAMAI EJ, YAMAMOTO S. Identification and characterization of a *Vibrio mimicus* gene encoding the heme/hemoglobin receptor[J]. Microbiology and Immunology, 2010, 54(10): 606-617.
- [8] OKADA N, MATSUDA S, MATSUYAMA J, PARK KS, de LOS REYES C, KOGURE K, HONDA T, IIDA T. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 302.
- [9] SUFFREDINI E, LOPEZ-JOVEN C, MADDALENA L, CROCI L, ROQUE A. Pulsed-field gel electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(17): 6301-6304.
- [10] GOARANT C, REYNAUD Y, ANSQUER D, de DECKER S, SAULNIER D, LE ROUX F. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(7): 570-580.
- [11] YANG A, LI W, TAO Z, YE H, XU Z, LI Y, GAO Y, YAN X. *Vibrio harveyi* isolated from marine aquaculture species in Eastern China and virulence to the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(4): 1710-1721.
- [12] MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG. 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.
- [13] URWIN R, MAIDEN MCJ. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. Trends in Microbiology, 2003, 11(10): 479-487.
- [14] IBARZ PAVÓN AB, MAIDEN MCJ. Multilocus sequence typing[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2009, 551: 129-140.
- [15] JOLLEY KA, BRAY JE, MAIDEN MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications[J]. Wellcome Open Research, 2018, 3: 124.

- [16] OCTAVIA S, SALIM A, KURNIAWAN J, LAM C, LEUNG Q, AHSAN S, REEVES PR, NAIR GB, LAN RT. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65342.
- [17] GONZÁLEZ-ESCALONA N, MARTINEZ-URTAZA J, ROMERO J, ESPEJO RT, JAYKUS LA, DePAOLA A. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2831-2840.
- [18] BISHARAT N, COHEN DI, MAIDEN MC, CROOK DW, PETO T, HARDING RM. The evolution of genetic structure in the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2007, 7(6): 685-693.
- [19] TEH CSJ, CHUA KH, THONG KL. OL-061 Genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolated in Malaysia based on multilocus sequencing typing (MLST) and multi-virulence locus sequencing typing (MVLST)[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15: S35.
- [20] LEE JH, HAN KH, CHOI SY, LUCAS MES, MONDLANE C, ANSARUZZAMAN M, SACK DA, von SEIDLEIN L, CLEMENS JD, SONG M, CHUN J, The mozambique cholera vaccine demonstration project coordination group, KIM DW. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(Pt 2): 165-170.
- [21] RAHMAN MS, MARTINO ME, CARDAZZO B, FACCO P, BORDIN P, MIONI R, NOVELLI E, FASOLATO L. *Vibrio* trends in the ecology of the Venice lagoon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2372-2380.
- [22] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [23] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS SE, SÁNCHEZ-GRACIA A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [24] FRANCISCO AP, BUGALHO M, RAMIREZ M, CARRIÇO JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 152.
- [25] FEIL EJ, LI BC, AANENSEN DM, HANAGE WP, SPRATT BG. 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.
- [26] DO T, GILBERT SC, CLARK D, ALI F, FATTURI PAROLO CC, MALTZ M, RUSSELL RR, HOLBROOK P, WADE WG, BEIGHTON D. Generation of diversity in *Streptococcus mutans* genes demonstrated by MLST[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9073.
- [27] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [28] LIAO YL, GUO G, MAO XH, XIE QH, ZHANG WJ, LIU XF, ZOU QM. Core genome haplotype diversity and *vacA* allelic heterogeneity of Chinese *Helicobacter pylori* strains[J]. Current Microbiology, 2009, 59(2): 123-129.
- [29] ANSARUZZAMAN M, LUCAS M, DEEN JL, BHUIYAN NA, WANG XY, SAFA A, SULTANA M, CHOWDHURY A, NAIR GB, SACK DA, von SEIDLEIN L, PURI MK, ALI M, CHAIGNAT CL, CLEMENS JD, BARRETO A. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(6): 2559-2562.
- [30] LI Y, YIN HQ, XIA J, LUO H, WANG MY. Population structure and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* from a coastal area of China based on a multi-locus sequence typing (MLST) scheme[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2019, 112(8): 1199-1211.
- [31] ABAYNEH T, COLQUHOUN DJ, SØRUM H. Multi-locus sequence analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158(3-4): 367-375.