

海水养殖鱼类鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)临床分离株的血清型和抗生素耐药谱*

赵鲁宁^{1,2,3} 李贵阳^{2,3} 李杰^{2,3} 李晨^{2,3} 张乐萃¹ 莫照兰^{2,3}

(1. 青岛农业大学动物科技学院 青岛 266109; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是常见的海水鱼类病原菌,有 23 种血清型,其中 O1—O3 为主要的致病血清型。我国海水养殖鱼类鳃弧菌的血清型种类尚未明确。本研究对实验室分离和收集自海水养殖鱼类的 31 株鳃弧菌临床菌株进行了生理生化、16S rRNA 基因序列、血清分型、抗生素敏感性的分析,旨在系统了解存在于我国海水养殖环境的鳃弧菌血清学型及耐药特征。首先用 API ID 32E 生化反应鉴定系统对鳃弧菌进行生理生化鉴定,结果未能将待测菌株鉴定到种的水平;然后测定鳃弧菌的 16S rRNA 基因序列并构建系统发育树,结果显示所有分离株聚为一簇,与鳃弧菌有最近的亲缘关系(相似性 99%—100%),据此可将临床菌株鉴定为鳃弧菌。以鳃弧菌 O1—O5 血清型标准菌株为 O 抗原制备兔抗血清,采用玻片凝集反应对鳃弧菌菌株进行血清学分析,结果显示属于 O1、O2、O3、O5 血清型菌株分别有 16、5、3、1 株,表明我国海水鱼类养殖存在 3 种血清型的致病性鳃弧菌,O1 为主要流行的血清型。用 ATB 药敏检测系统检测鳃弧菌对 28 种抗生素的敏感性,结果显示菌株对 7 种抗生素(林可霉素、夫西地酸、甲硝唑、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、苯唑西林、青霉素)的耐药率为 100%,对 3 种抗生素(红霉素、原始霉素、泰洛星)的耐药率为 94.4%(34 株),有 83% 以上的菌株(30 株)对 12 种以上的抗生素产生耐药,表明我国海水鱼类养殖鳃弧菌普遍存在多重耐药性。研究结果为进一步揭示鳃弧菌的流行病学规律和防控弧菌病奠定了良好的基础。

关键词 鳃弧菌;生理生化反应;16S rRNA 基因;血清学鉴定;抗生素敏感性

中图分类号 S941.4 doi: 10.11693/hyhz20140500148

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)为革兰氏阴性菌,广泛存在于沿岸海水、沉积物和海洋动物体体表和肠道中,在世界范围内已引起多种淡水和海水鱼类出血性败血症(Austin *et al*, 1995),还可感染对虾和贝类引起死亡(Aguirre-Guzman *et al*, 2004; Christine *et al*, 2004)。对病原进行血清型鉴定对流行病学研究和疾病控制具有重要意义,美国、日本、丹麦、中国台湾的学者建立了鳃弧菌的各种血清型分型系统(Gould *et al*, 1979; Ezura *et al*, 1980; Kitao *et al*, 1983, 1984; Chart *et al*, 1984; Sørensen *et al*, 1986; Tajima *et al*,

1986a, 1986b; Song *et al*, 1988; Austin *et al*, 1995),其中,日本学者 Kitao 等(1983)将 267 株鱼源鳃弧菌分为 A—F 血清型,而 Tajima 和 Ezura 则将鳃弧菌分为 JO1—JO8 (Tajima *et al*, 1986a, 1986b);丹麦学者 Sørensen 等(1986)综合了上述学者的血清型分析系统,在吸收日本的 JO1—JO3 和 A、B、C 血清分型系统基础上,建立了一种简单实用的血清分型系统,将来自鱼类、环境和其它脊椎动物的鳃弧菌分为 O1—O10 血清型,后来 Grisez 等(1995)和 Pedersen 等(1999)进一步补充,将鳃弧菌的血清型扩展至 23 种血清型。在 23 种血清

*中国水产科学研究院黄海水产研究所所级基本科研业务费项目,2014A06XK02 号;国家自然科学基金项目,31372567 号,31402342 号;山东泰山学者计划项目资助。赵鲁宁,硕士研究生, E-mail: zhaoluning_2007@163.com

通讯作者:张乐萃,硕士生导师,教授, E-mail: lc Zhang@qau.edu.cn;莫照兰,博士生导师,研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn
收稿日期:2014-05-19,收修改稿日期:2015-03-12

型中, O1、O2 以及部分的 O3 血清型为主要的致病性血清型(Pedersen *et al*, 1999), 后来发现 O2a、O2b 以及另外一种新的 O2 血清型亚型是引起大西洋鳕鱼弧菌病的主要病原(Knappskog *et al*, 1993; Larsen *et al*, 1994; Mikkelsen *et al*, 2007)。鳗弧菌的致病机理也得到深入研究, 一些与趋化性、运动力、粘附、侵袭、繁殖和生长相关的致病因子已经被鉴定(Naka *et al*, 2011)。例如, 多数的 O1 血清型菌株都携带一个 65kb 的毒性质粒 pJM1, 该质粒编码铁摄取系统, 而一些不携带质粒的 O1、O2、O3 血清型菌株则在染色体上编码铁摄取系统(Soengas *et al*, 2006; Balado *et al*, 2008)。

近 20 年来, 我国海水养殖对虾(郑国兴等, 1990)、鲈鱼(肖慧等, 1999)、大黄鱼(李清禄等, 2001)、牙鲆(莫照兰等, 2002)、大菱鲆(陈吉祥等, 2005)等受到鳗弧菌的侵染, 带来了严重的经济损失。国内尚未系统开展鳗弧菌流行病学研究, 也不清楚当前流行

于我国海水养殖的鳗弧菌主要有哪些血清型, 给疾病监测和疫苗防治带来了困难。本研究针对自 1999 年以来分离和收集的临床鳗弧菌菌株进行生理生化、16S rRNA 基因序列、血清分型、抗生素敏感性的分析, 旨在系统了解存在于我国海水养殖环境的鳗弧菌血清学特征及耐药特征, 为深入阐明鳗弧菌的分子流行病学和疾病控制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株和实验动物

本研究所用菌株见表 1, 其中 M0、M1 由黄海所王印庚研究员赠送, 0401、1703、2301、112601、MN 由黄海水产研究所王秀华研究员赠送, 279、285 由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心梁利国博士赠送, 其余为本实验室保藏菌株。体重 2.0—2.5 kg 的健康新西兰大白兔(*Oryctolagus cuniculus*)购自青岛康大兔业发展有限公司, 实验前暂养一周。

表 1 本研究所用鳗弧菌菌株
Tab.1 *V. anguillarum* strains used in this study

菌株编号	来源	分离时间
ATCC43305(O1), ATCC43306(O2), ATCC43307(O3), ATCC43308(O4), ATCC43309(O5)	美国典型培养物保藏中心(ATCC)	—
M3	山东养鱼场发病牙鲆	1999 年
M5	山东养鱼场发病牙鲈	1999 年
SMP1, SMP3, SMP4	山东养鱼场发病大菱鲆	2001 年
SMW1, SMW5, SMW9, SMQ23, SMQ29	山东养鱼场发病大菱鲆	2002 年
MHK3, MHK6, MHK7, MHK9, MHK11, MHK13	河北北戴河养鱼场发病牙鲆	2003 年
L4, L62	山东养鱼场养殖水体	2003 年
M0, M1	山东养鱼场发病大菱鲆	2004 年
0401, MN	山东养鱼场发病大菱鲆	2005 年
LSV1, LSV5, LSV7	山东养鱼场养殖水体	2006 年
112601	山东养鱼场发病大菱鲆	2006 年
2301	山东养鱼场发病大菱鲆	2007 年
279	江苏盐城养鱼场发病鲫鱼	2012 年
285	江苏海安养鱼场发病鲢鱼	2012 年
34	山东养鱼场发病大西洋鲑	2013 年
1703	山东养鱼场发病大菱鲆	2013 年

1.2 兔抗鳗弧菌血清制备

将表 1 所示的 5 株鳗弧菌 ATCC 标准菌株(O1—O5 血清型)分别在胰大豆蛋白胨琼脂(TSA)平板划线, 于 28°C 培养 24h, 挑取单菌落转接胰大豆蛋白胨肉汤(TSB)培养过夜, 取适量菌液涂布 TSA 平板, 于 28°C 培养 24h 后用无菌的 PBS 缓冲液(0.01mol/L, pH 7.3)冲洗菌苔, 收集菌液于 100°C 水浴灭活 2.5h 后, 再 4000 g 离心 10min, 收集菌体并用 PBS 重悬, 所得菌悬液用麦氏比浊管调整浓度至 10^9 CFU/mL, 所得菌液即为鳗弧菌 O 抗原, 置于 4°C 冰箱保存。

按照文献方法免疫新西兰大白兔制备兔抗血清, 制备的血清效价 $>1:1600$, 将得到的兔抗血清采用血清非特异抗原吸附法对兔抗血清进行纯化(窦勇等, 2007)。

1.3 鳗弧菌的生理生化及抗生素敏感性检测

用 API ID 32E 生化反应试剂条和 ATB 药敏检测系统(均购自法国梅里埃, BioMerieux)检测鳗弧菌的生化反应和抗生素药物敏感性, 使用 ATBTMNew 软件判读结果。用 NYSYpc2.1 软件的非加权组平均法(UPGMA)对生化反应性状进行聚类分析。

1.4 鳃弧菌株 16S rRNA 基因序列分析

按文献方法扩增鳃弧菌 16S rRNA 基因序列(莫照兰等, 2002), 所用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3'), 所得 PCR 产物经上海桑尼生物科技有限公司测序, 所得序列在 NCBI 上使用 BLAST 程序进行比对。从 GenBank 数据库中获取其它细菌 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育树, 用 MEGA5.2 软件采用邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 用 Kimura 模式计算遗传距离, 用 Bootstrap 法重复 1000 次进行评估(Saitou *et al.*, 1987)。

1.5 鳃弧菌血清型的鉴定

采用玻片凝集法进行鳃弧菌血清型鉴定。具体步骤为: 将鳃弧菌在 TSA 划线, 挑取培养 24h 的菌落与 20 μ L 兔抗血清在玻璃片上混匀; 设置两组阴性对照:

一组为细菌与 20 μ L PBS 混合, 另一组为 20 μ L 血清。所有混合物在 10min 内观察凝集情况, 并记录结果。

2 实验结果

2.1 生理生化检测结果

对 31 株临床分离菌株和 5 株标准菌株进行生理生化分析。所有菌株均为革兰氏阴性菌, 在 2216E 海水培养基和 TSA 培养基上生长良好。API ID 32E 鉴定结果显示, 所有 36 株菌在吲哚的反应为阳性, 在赖氨酸脱羧酶、脲酶、L-阿拉伯糖醇、5-酮基葡萄糖酸钠、侧金盏花醇、 β -葡萄糖酸酶、N-乙酰- β -葡萄糖苷酶、D-阿拉伯糖醇、肌醇的反应为阴性; 有 35 株菌分别在 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和精氨酸双水解酶反应为阳性(表 2)。特别指出的是有 2 株菌的生理生化反应呈现特殊性: 菌株 34 在酚红、L-天门冬

表 2 鳃弧菌的 API ID 32E 生理生化分析结果
Tab.2 Biochemical characteristics of *V. anguillarum* analyzed with API ID 32E

生化项目	统计结果			
	阴性反应(株)	阳性反应(株)	阳性反应比例(%)	阴性反应比例(%)
鸟氨酸脱羧酶	28	8	22.2	77.8
精氨酸双水解酶	5	31	86.1	13.9
赖氨酸脱羧酶	36	0	0	100
脲酶	36	0	0	100
L-阿拉伯糖醇	36	0	0	100
半乳糖酸盐	32	4	11.1	88.9
5-酮基葡萄糖酸钠	36	0	0	100
脂肪酶	33	3	8.3	91.7
酚红	35	1	2.8	97.2
β -葡萄糖苷酶	5	31	86.1	13.9
甘露醇	33	3	8.3	91.7
麦芽糖	20	16	44.4	55.6
侧金盏花醇	36	0	0	100
古老糖	35	1	2.8	97.2
β -葡萄糖酸酶	36	0	0	100
丙二酸	33	3	8.3	91.7
吲哚(+JAMES)	0	36	100	0
N-乙酰- β -葡萄糖苷酶	36	0	0	100
β -半乳糖苷酶	1	35	97.2	2.8
葡萄糖	32	4	11.1	88.9
蔗糖	32	4	11.1	88.9
L-阿拉伯糖	25	11	30.6	69.4
D-阿拉伯糖醇	36	0	0	100
α -葡萄糖	35	1	2.8	97.2
α -半乳糖苷酶	30	6	16.7	83.3
海藻糖	30	6	16.7	83.3
鼠李糖	30	6	16.7	83.3
肌醇	36	0	0	100
纤维二糖	31	5	13.9	86.1
山梨醇	32	4	11.1	88.9
α -麦芽糖苷酶	33	3	8.3	91.7
L-天门冬素芳胺	35	1	2.8	97.2

素芳胺酶和古老糖的反应为阳性，而其它菌株反应均为阴性；菌株 L62 的 α -葡萄糖反应显示阳性，而其它菌株反应均为阴性。上述结果表明，待检菌株既有稳定的生理生化性状，也有生理生化性状的多样性。

根据 API ID 32E 鉴定系统软件的鉴定结果，未能将待检菌株鉴定到种的水平。应用 UPGMA 方法对生理生化形状的相似性进行聚类分析，按照相似性 >80% 分为 8 个亚型，其中 I 型菌株数量最多(图 1)。

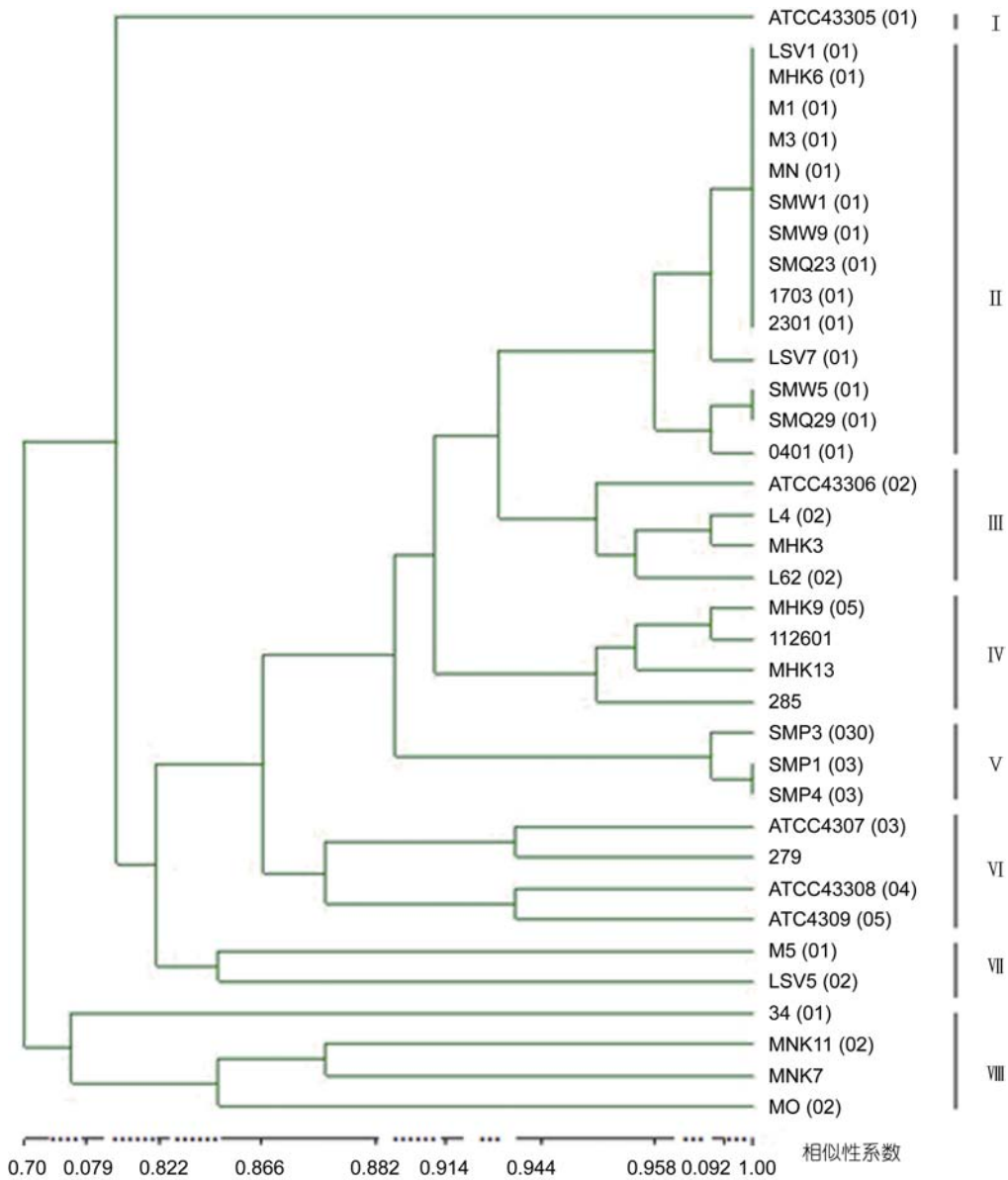


图 1 基于鳃弧菌生理生化性状的 UPGMA 聚类分析

Fig.1 Dendrogram of *V. anguillarum* strains analyzed with UPGMA cluster algorithm based on biochemical characteristics

2.2 16S rRNA 基因序列分析

对 31 株临床分离菌株和 5 株鳃弧菌标准菌株进行 16S rRNA 基因扩增，得到的序列在 GenBank 上进行 BLAST，结果显示，所有菌株的序列均与 GenBank 中鳃弧菌(*V. anguillarum*)的 16S rRNA 基因序列具有最高相似性(99%—100%)。系统发育树分析结果显示，所检测的菌株与 5 株鳃弧菌 ATCC 菌株聚为一大簇，

其它弧菌菌株聚为不同的几簇(图 2)。这个结果表明临床菌株与鳃弧菌具有最近的亲缘关系，可鉴定为鳃弧菌。

2.3 鳃弧菌血清型鉴定

利用鳃弧菌标准菌株(O1-O5 血清型)制备的兔抗血清对 31 株鳃弧菌临床菌株进行血清型分型。结果如表 3 显示，检测到 16 株 O1 血清型菌株，O2、O3、

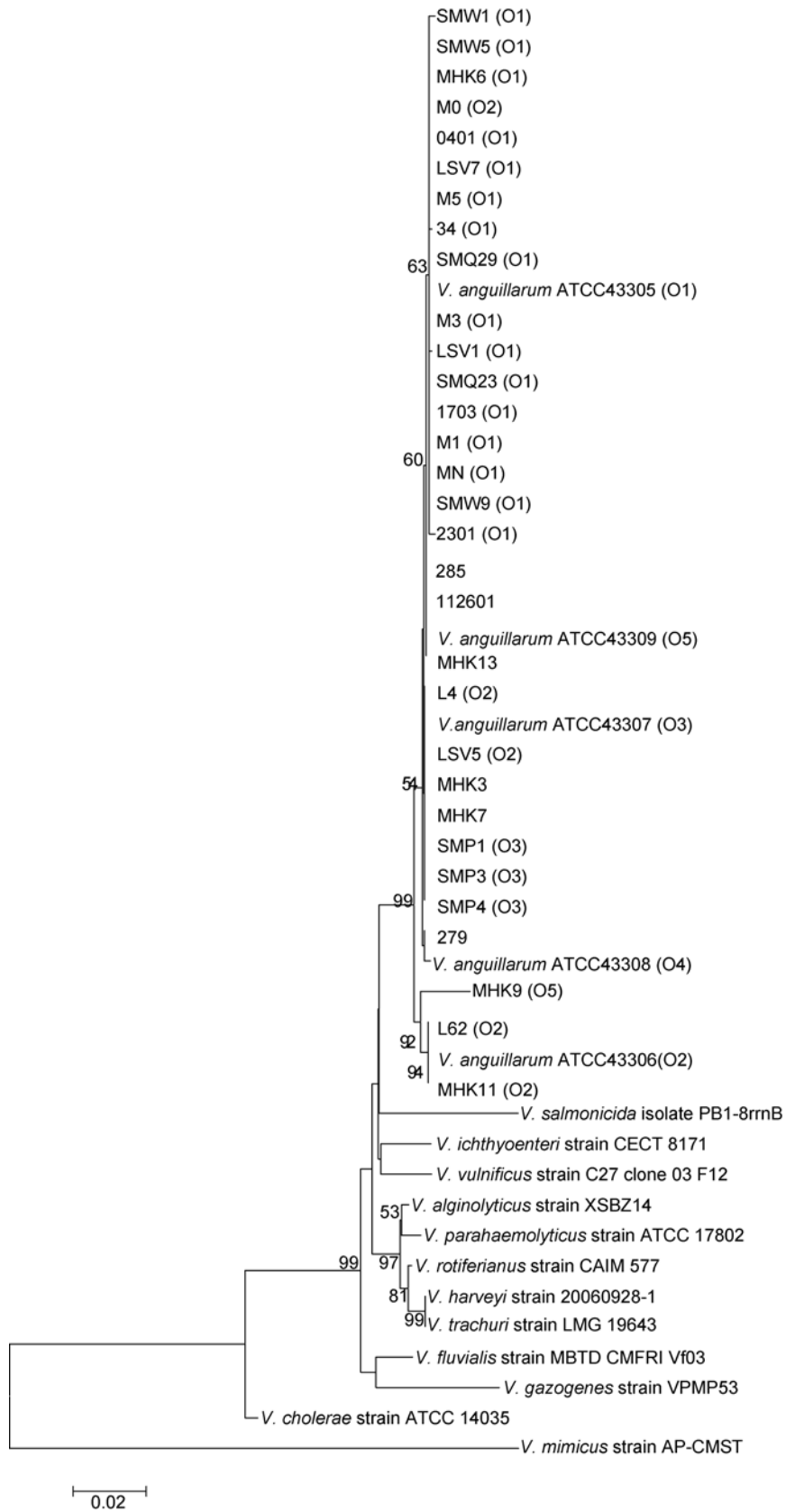


图 2 鳃弧菌和其它弧菌的 16S rRNA 基因序列的系统发育树(括号指菌株的血清型)

Fig.2 Phylogenetic tree of *V. anguillarum* and other *Vibrio* sp. strains based on 16S rRNA gene sequences(the bracket presents serotype assigned for the strain)

表 3 鳎弧菌血清型分型
Tab.3 Serotyping of *V. anguillarum* strains

血清	菌株名称	菌株数	比例(%)
O1	LSV1, LSV7, LSV9, MHK6, M1, M3, M5, MN, SMW1, SMW5, SMW9, SMQ23, SMQ29, 0401, 1703, 2301, 34	16	51.6
O2	L62, MHK11, M0, LSV5, L4	5	16.1
O3	SMP1, SMP3, SMP4	3	9.7
O4	—	0	0.0
O5	MHK9	1	3.2
其它	MHK3, MHK7, MHK13, 112601, 279, 285	6	19.4

O5 血清型分别为 5、3、1 株，没有检测到有 O4 血清型菌株，有 6 株菌株不属于 O1—O5 血清型。

2.4 鳎弧菌抗生素敏感性检测

对所有鳎弧菌菌株进行 ATB 药敏检测，统计结果显示，97.2%(35 株)的鳎弧菌菌株对氟甲喹、奥索利酸、大观霉素、庆大霉素等 4 种抗生素敏感，94.4%(34 株)菌株对依氟沙星和安普霉素敏感，90.9%菌株(33 株)对呋喃妥因和卡那霉素敏感。所有菌株对林可霉素、夫西地酸、甲硝唑、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、苯唑西林、青霉素等 7 种抗生素产生耐药，94.4%(34 株)的菌株对红霉素、原始霉素、泰洛星等 3 种抗生素耐药，86.1%(31 株)菌株对磺胺甲恶唑耐药。图 3 给出了鳎弧菌对不同抗生素产生耐药率。

从耐药数量来看，所有的 36 株鳎弧菌菌株对 9 种以上的抗生素产生耐药性，有 11 株菌(30.6%)对 12 种抗生素产生耐药性。83.3%的菌株(30 株)对 12 种以

上的抗生素产生耐药，其中有 24 株 O1—O3 血清型临床分离株。2002 年分离到的 3 株 O3 血清型菌株(SMP1, SMP3, SMP4)对 18—19 种抗生素产生耐药，2003 年分离到的一株菌 MHK3(非 O1—O3 血清型)对 26 种抗生素产生耐药(表 4)。耐药种类涵盖大环内酯类(红霉素，林克霉素，原始霉素，泰洛星)、多肽类抗生素(粘菌素)、β-内酰胺类(青霉素，阿莫西林，苯唑西林，头孢噻吩)。

使用 UPGMA 方法对抗生素敏感性进行聚类分析，按照相似形>80%分为 7 个亚型，其中 型菌株数量最多(图 4)。

2.5 血清型与表型和基因型之间的关系

比较鳎弧菌血清型与生理生化聚类分析的结果，发现 O1、O3 血清型的大部分临床菌株分别聚为 型和 型，但未与相应的标准血清型菌株聚在一起，其它的菌株也与相应的标准血清型菌株分属不同的

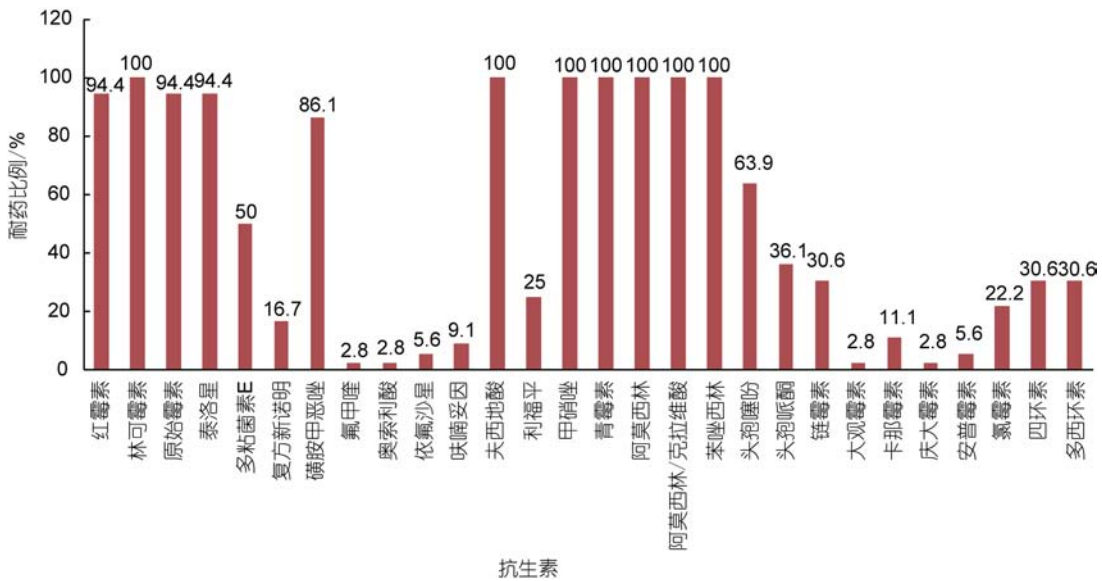


图 3 鳎弧菌对不同抗生素的耐药率

Fig.3 Percentage of *V. anguillarum* strains against different antibiotics

表 4 鳃弧菌耐药分析
Tab.4 Analysis of the antibiotics resistance of *V. anguillarum* strains

耐药数量	耐药菌株号	耐药菌株数量	耐药菌株比例(%)
9 种	ATCC53309, L4, LSV1	3	8.3
10 种	M3, MN	2	5.6
11 种	L62, LSV7	2	5.6
12 种	ATCC53305, ATCC53308, LSV5, MHK6, M1, SMW1, SMW9, SMQ23, SMQ29, 0401, 1703	11	30.6
13 种	MHK9, SMW5, 2301	3	8.3
14 种	ATCC53306	1	2.8
15 种	ATCC53307, 279	2	5.6
16 种	MHK7, M5, 285	3	8.3
17 种	MHK11, M0, 34	3	8.3
18 种	SMP1, SMP4	2	5.6
19 种	MHK13, SMP3	2	5.6
22 种	112601	1	2.8
26 种	MHK3	1	2.8

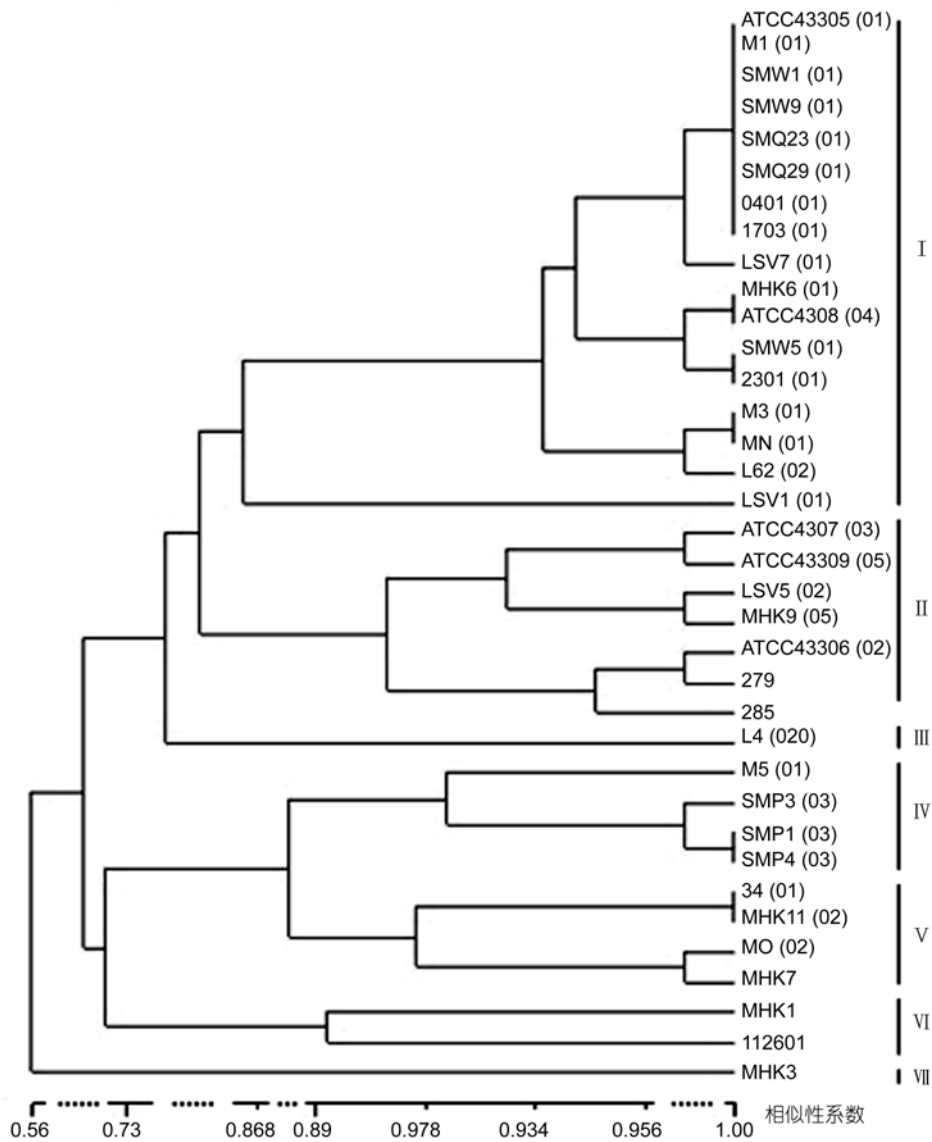


图 4 基于鳃弧菌抗生素敏感性状的 UPGMA 聚类分析(括号指菌株的血清型)

Fig.4 Dendrogram of *V. anguillarum* strains analyzed with UPGMA cluster algorithm based on antibiotics sensitivity(the bracket presents serotype assigned for the strain)

亚型。比较血清型与抗生素聚类分析的结果,发现 O1 血清型的大部分临床菌株与 O1 血清型标准菌株 ATCC43305 聚为一型,其它的菌株与相应的标准血清型菌株分属不同的亚型。比较血清型与 16S rRNA 基因系统发育树的结果,发现所有 O1 血清型临床菌株与鳗弧菌标准菌株 ATCC43305(O1)聚为一支,有 2 株 O2 临床株与标准菌株 ATCC43306(O2)聚为一支,3 株 O3 临床菌株与标准菌株 ATCC43307(O3)聚为一支。

上述结果表明,鳗弧菌的血清型与其生理生化性状、抗生素敏感性状、16S rRNA 基因序列存在一定的相关性,其中血清型与 16S rRNA 基因序列的相关性更明显。相同血清型的菌株数量越多,相关性越显著。

3 讨论

本研究对 1999—2013 年从海水养殖环境分离得到的临床鳗弧菌菌株进行了表型和基因型的分类鉴定,旨在确证这些细菌的分类地位。传统的表型鉴定方法是通过对细菌形态和生理生化反应的特征进行分类地位的分析。本研究在确定分离菌株为革兰氏阴性菌后,利用 API ID 32E 细菌快速鉴定系统对分离菌株开展 32 项生理生化反应指标的分析,由于该快速检测系统主要用于陆地肠杆菌科和其它革兰氏阴性杆菌的鉴定,海洋细菌模式种信息较少,利用该系统未能将鉴定到种的地位。细菌的 16S rRNA 基因具有特征性的进化序列,已被广泛用于细菌的分类和鉴定的分子标记,本研究对分离菌株的 16S rRNA 基因序列进行分析,结果显示所有临床株的 16S rRNA 基因序列与标准鳗弧菌的相似性为 99%—100%,在发育进化树中紧密地聚为一簇,说明它们在进化中具有最近的亲缘关系。综合生理生化和 16S rRNA 基因的分析结果,我们将这些待测菌鉴定为鳗弧菌。

细菌的血清学分型是根据细菌表面抗原(外膜蛋白和脂多糖)的不同,将细菌分成不同血清型。O1、O2、O3 血清型鳗弧菌可引起鱼类疾病(Pedersen *et al.*, 1999),O1 和 O2 血清型分布在世界各地,O3 血清型在丹麦、意大利和日本等国家偶有发现(Larsen *et al.*, 1994; Tiainen *et al.*, 1997)。本研究结果显示,在 31 株临床分离菌株中,O1 型菌株数量最多,其次为 O2、O3 血清型菌株。本研究结果说明了流行于我国海水养殖鱼类的鳗弧菌存在 3 种潜在的致病性血清型,O1 血清型菌株为主要的流行株。值得注意的是本次研究发现三株 O3 血清型菌株(SPM1, SPM3, SMP4),于

2002 年分离自苗种来源鱼欧洲的发病大菱鲆,说明引种可导致外来病原入侵的危险。通过比较血清型分型结果与表型和基因型的聚类分析结果,我们尝试建立血清型与生理生化表型和基因型的对应关系,结果显示鳗弧菌的血清型与其生理生化性状、抗生素敏感性状、16S rRNA 基因序列存在一定的相关性,其中血清型与 16S rRNA 基因序列的相关性更明显。

病原菌的耐药性,特别是对多种抗生素的多耐药性给水产养殖和人类健康带来严重的安全问题。细菌的耐药性有天然性耐药和获得性耐药,前者是由细菌染色体存在的耐药基因决定,后者是在抗生素选择压力下,某种细菌通过基因水平转移从别的细菌获得了抗性基因。本研究利用 ATB 药敏系统检测了鳗弧菌株的耐药性,结果显示鳗弧菌对 β -内酰胺类(阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、苯唑西林、青霉素)、林可酰胺类(林克霉素)、硝咪唑类(甲硝唑)和夫西地酸的耐药率为 100%,其原因可能是鳗弧菌对这些抗生素具有天然性耐药的結果。另外,结果还显示鳗弧菌对红霉素(大环内酯类)、原始霉素、泰洛星等 3 种抗生素的耐药率为 94%(34 株),对磺胺甲恶唑的耐药率为 86%(31 株)。红霉素和原始霉素常用于医院的临床治疗,红霉素还常用作水产饲料添加剂;泰洛星为畜禽专用抗生素,作为饲料添加剂用于预防畜禽疾病和促进畜禽生长发育;磺胺类药物具有广谱性抗菌作用而广泛用于水产养殖。根据这些分析,我们认为鳗弧菌对上述四种药物产生高耐药率的原因是医院、畜牧业、水产业大量使用和滥用这些抗生素引起的。进一步的分析结果还显示,鳗弧菌对多种抗生素产生了耐药,83%以上的菌株对 12 种以上的抗生素产生耐药,耐药种类涵盖 3 种以上,说明了鳗弧菌普遍存在多重耐药性。在具有潜在致病性的 O1—O3 血清型菌株中,于 2001 年分离自山东大菱鲆的三株菌(SMP1, SPM3, SPM4)对 18—19 种抗生素产生耐药性,耐药种类涵盖 6 类抗生素(大环内酯类,多肽类抗生素, β -内酰胺类,酰胺醇类,四环素类,磺胺类),这些潜在病原菌的多重耐药性增加了对病害防治的难度。

综上所述,本研究首次对存在我国海水养殖鱼类的鳗弧菌进行了血清学鉴定,同时还分析了它们对抗生素的耐药性,研究结果明确了流行于我国海水养鱼类鳗弧菌血清学特征及其耐药特征,对鳗弧菌病的流行病学研究、疫苗研制具有明确的指导作用。

参 考 文 献

- 李清禄, 陈 强, 2001. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究. 应用与环境生物学报, 7(5): 489—493
- 肖 慧, 李 军, 王祥红等, 1999. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究. 青岛海洋大学学报, 29(1): 87—93
- 陈吉祥, 李彩凤, 颜显辉等, 2005. 大菱鲆病原鳃弧菌生物学及分子特征研究. 高技术通讯, 15(6): 92—96
- 郑国兴, 沈亚林, 李 何, 1990. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. 水产学报, 14(1): 1—7
- 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2002. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 42(3): 263—269
- 窦 勇, 宁喜斌, 2007. 副溶血弧菌多克隆抗体的制备及其特性分析. 食品与生物技术学报, 26(3): 85—89
- Aguirre-Guzmán G, Ruíz M H, Ascencio F, 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio species* important in diseases of cultivated shrimp. Aquaculture Research, 35(15): 1395—1404
- Austin B, Alsina M, Austin D A *et al*, 1995. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. Systematic and Applied Microbiology, 18(2): 285—302
- Balado M, Osorio C R, Lemos M L, 2008. Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. Microbiology, 154(5): 1400—1413
- Chart H, Trust T J, 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Canadian Journal of Microbiology, 30(5): 703—710
- Christine P, Frédérique L R, Borrego J J, 2004. Bacterial disease in marine bivalves: a review of recent studies: trends and evolution. Aquatic Living Resources, 17(4): 477—498
- Ezura Y, Tajima K, Yoshimizu M *et al*, 1980. Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. Fish Pathology, 14(4): 167—179
- Gould R W, Antipa R, Amend D F, 1979. Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. Journal of the Fisheries Board of Canada, 36(2): 222—225
- Grisez L, Ollevier F, 1995. Comparative Serology of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and environmental microbiology, 61(12): 4367—4373
- Kitao T, Aoki T, Fukudome M *et al*, 1983. Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. Journal of Fish Diseases, 6(2): 175—181
- Kitao T, Aoki T, Muroga K, 1984. Three new O-serotypes of *Vibrio anguillarum*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 50(11): 1955
- Knappskog D H, Rødseth O M, Slinde E *et al*, 1993. Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. Journal of Fish Diseases, 16(4): 327—338
- Larsen J L, Pedersen K, Dalsgaard I, 1994. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. Journal of Fish Diseases, 17(3): 259—267
- Mikkelsen H, Lund V, Martinsen L - C *et al*, 2007. Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. Aquaculture, 266(1—4): 16—25
- Naka H, Crosa J H, 2011. Genetic determinants of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Fish Pathology, 46(1): 1—10
- Pedersen K, Grisez L, Van Houdt R *et al*, 1999. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. Current Microbiology, 38(3): 183—189
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4(4): 406—425
- Soengas R G, Anta C, Espada A *et al*, 2006. Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. Tetrahedron Letters, 47(39): 7113—7116
- Song Y L, Chen S N, Kon G N, 1988. Serotyping of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish in Taiwan. Fish Pathology, 23(3): 185—189
- Sørensen U B S, Larsen J L, 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, 51(3): 593—597
- Tajima K, Ezura Y, Kimura T, 1986a. Serological typing of thermostabile antigens of *V. anguillarum*-I. *V. anguillarum* O-serotypes (J-O-1—J-O-3). Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 37(3): 230—239
- Tajima K, Ezura Y, Kimura T, 1986b. Serological typing of thermostabile antigens of *V. anguillarum*-II. *V. anguillarum* O-serotypes (J-O-4—J-O-8). Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 37(3): 240—245
- Tiainen T, Pedersen K, Larsen J L, 1997. *Vibrio anguillarum* serogroup O3 and *V. anguillarum*-like serogroup O3 cross-reactive species-comparison and characterization. Journal of Applied Microbiology, 82(2): 211—218

SEROTYPING AND ANTIBIOTICS SENSITIVITY OF *VIBRIO ANGUILLARUM* STRAINS ISOLATED FROM MARINE FARMED FISH

ZHAO Lu-Ning^{1,2,3}, LI Gui-Yang^{2,3}, LI Jie^{2,3}, LI Chen^{2,3}, ZHANG Le-Cui¹, MO Zhao-Lan^{2,3}

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract *Vibrio anguillarum* is a bacterial pathogen commonly found in fish mariculture. There are 23 serotypes assigned for *V. anguillarum*, and O1, O2, and O3 serotype are associated with fish vibriosis. At present, few is known about the serotype and antibiotics resistance of *V. anguillarum* from mariculture fish in China. The present studies were carried out to reveal the serotype and antibiotics resistance of 31 clinical *V. anguillarum* strains isolated from fish farm. API ID 32E identification system was used to analyze the physiological and biochemical characteristics of the tested strains. The results showed the strains had the constant and variable physiological and biochemical characteristics, and thus was difficult to identify these strains to species level based on the physiological and biochemical characteristics. Nevertheless, the 16S rRNA gene sequences of the isolates revealed the highest identities (99%—100%) with *V. anguillarum* strains deposited in the GenBank, and phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that all isolates concentrated in a cluster with known *V. anguillarum* strains. Therefore, all clinical isolates could be identified as *V. anguillarum*. Moreover, serotypes of the *V. anguillarum* isolates were determined by glass agglutination reaction test using rabbit anti-serum against O1—O5 serotype *V. anguillarum*. The results displayed that the isolates belonged to O1, O2, O3, and O5 in number of 16, 5, 3, and 1, respectively, presenting three potential pathogenic serotypes (O1—O3) of *V. anguillarum* strains, of which O1 was prevalent. Furthermore, the antibiotics sensitivity of *V. anguillarum* against 28 antibiotics were detected with ATB system. The results show that the resistance of the isolates reached 100% against seven antibiotics (lincomycin, fusidine, metronidazole, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, oxacillin, penicillin) and 94.4% (34 strains) against three antibiotics (erythromycin, pristinamycin, tylosin). Over 83% (30 strains) were resistant against 12 antibiotics. Therefore, most *V. anguillarum* isolates were multi-antibiotics-resistant strains. The findings here may help scientists to investigate the epidemiology of *V. anguillarum* and to control fish vibriosis.

Key words *Vibrio anguillarum*; physiological and biochemical identification; 16S rRNA gene; serotyping; antibiotics sensitivity