

文章编号: 1674-5566(2014)06-0867-07

南美白对虾养殖水体中霍乱弧菌的毒力、耐药及重金属抗性研究

唐毓祎^{1,2,3}, 谈建国⁴, 缪海振⁴, 彭 丽⁴, 杨丹丹⁴, 潘迎捷^{1,2,3}, 陈兰明^{1,2,3}

(1. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全与风险评估重点实验室, 上海 201306; 2. 上海市水产品质量控制与风险评估工程中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 4. 上海市气象与健康重点实验室, 上海 200135)

摘 要:旨在分析南美白对虾养殖水体中霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的毒力、抗菌素耐药性以及重金属抗性特性, 为致病性霍乱弧菌流行预警的研究提供数据支撑。利用聚合酶链反应技术检测了 84 株霍乱弧菌分离菌株的毒力以及整合接合元件 (ICEs) 相关基因; 采用美国临床与实验室标准研究所 (CLSI) 标准 Kirby-Bauer 纸片扩散法以及最小抑菌浓度法测定了受试菌株的抗菌素和重金属抗性; 运用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术对部分受试菌株进行了分子分型。结果显示: 受试霍乱弧菌菌株均不携带致病性肠毒素基因 *ctxAB* 以及毒素相关基因 *sto*、*tcpA*、*ace*、*zot*; 含有毒素表达调控蛋白基因 *toxR*, 其中 19.05% 菌株还含有 RTX 家族毒素基因 *rtxA*; 携带 SXT-R391 家族 ICEs 保守功能模块部分相关基因 (*int*、*traI*、*traC*、*setR*、*attR*)。受试霍乱弧菌菌株对六大类十种抗菌素的耐药性存在显著差异, 其中对氨苄西林的耐药率最高为 13.10%, 其次是庆大霉素 (2.38%); 利福平、链霉素、氨苄西林、卡那霉素、壮观霉素的中介耐药率为 25.00% ~ 1.19%; 对四环素、氯霉素、甲氧苄啶嘧啶、复方新诺明均敏感。此外, 30% 的受试霍乱弧菌菌株对重金属铅、锌具有高度抗性, 而对铬、镉、铜、镍、汞、钡敏感; PFGE 分子分型可分为 5 种 *NotI*-PFGE 型 13 种亚型, 相似性值为 56% ~ 100%。本研究结果为进一步探讨致病性霍乱弧菌的进化起源奠定了基础。

研究亮点:本研究首次对南美白对虾养殖水体中霍乱弧菌分离菌株进行了毒力、耐药及重金属抗性研究, 发现受试菌株均不携带致病性肠毒素基因 *ctxAB* 及其他多种毒素相关基因; 携带 SXT-R391 家族 ICEs 保守功能模块部分相关基因; 对六大类十种抗菌素的耐药性存在显著差异, 对氨苄西林的耐药率最高为 13.10%, 其次是庆大霉素 (2.38%); 30% 受试菌株对重金属铅、锌具有高度抗性, 并具有明显的遗传多样性。本研究结果为致病性霍乱弧菌进化起源及流行预警的研究奠定了基础。

关键词:南美白对虾; 霍乱弧菌; 药物敏感性; 重金属抗性; 分子分型
中图分类号: S 917.1
文献标志码: A

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 隶属于 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria), 弧菌属 (*Vibrio*), 广泛存在于江河、海水以及鱼、虾和贝类等水产品中^[1]。摄入致病性霍乱弧菌污染的水或水产品可引起致死性脱水性腹泻, 甚至导致霍乱疾病的暴发流行^[2-3]。霍乱弧菌 *ctxAB* 基因编码的霍乱肠毒素是决定其毒力的主要因素^[3], 该基因表达调控蛋白 ToxR, 正调控 *ctxAB*、毒素共调节纤毛 (*tcpA*) 以及编码其他重要毒素基因的转录^[4]。不同于临床分离菌株, 大多数霍乱弧菌环境菌株不

产生霍乱毒素^[5-6], 但却可在类似养殖环境的条件下获得霍乱毒素基因^[7-8], 从而使得原来非致病性霍乱弧菌环境菌株转变成致病性流行菌株^[9]。南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是目前世界上养殖产量最高的虾类^[1], 也是集约化高产养殖的优良品种。迄今为止, 国内外对霍乱弧菌临床分离株的毒力及耐药性已开展了大量研究, 可是, 对于养殖环境中霍乱弧菌的相关报道甚少。本文首次对南美白对虾养殖水体中的霍乱弧菌进行了分离鉴定, 以探讨水产养殖中霍乱弧菌的致病性、耐药及重金属抗性, 为水产养殖疾

收稿日期: 2014-06-17 修回日期: 2014-07-10

基金项目: 上海市气象与健康重点实验室资助课题 (QXJK201207)

作者简介: 唐毓祎 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: m110250462@st.shou.edu.cn

通信作者: 陈兰明, E-mail: lmchen@shou.edu.cn

病的防控提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

主要仪器有 PCR 仪 (Eppendorf 6325, 德国)、高速冷冻离心机 (Eppendorf 5424, 德国)、脉冲场凝胶电泳仪 (BioRad CHEF Mapper XA System, 美国)、凝胶成像系统 (BioRad Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR + System, 美国)、多模块微板读数仪 (multi-mode microplate reader BioTek Synergy[™] 2, BioTek, 美国)。过滤膜 (0.8 μm 、0.22 μm 孔径, 47 mm 直径, Millipore, 爱尔兰), 琼脂糖 (Seakem Gold Agarose, 美国)。MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Premix Ex Taq DNA 聚合酶、蛋白酶 K、NotI 限制性核酸内切酶均购自大连宝生物工程有限公司。庆大霉素琼脂培养基、碱性蛋白胨水培养基均购自北京陆桥技术责任有限公司。

1.2 霍乱弧菌的分离与鉴定

2012 年 6 至 11 月采集上海市某虾业养殖合作社南美白对虾淡水养殖池塘表层水体, 参考 MOMTAZ 等的方法^[10]富集水样中的细菌。根据中国国家标准霍乱诊断标准及处理原则 (GB15984—1995), 参考美国食品药品管理的标准细菌分析手册 (the Standard of the Bacteriological Analytical Manual (BAM) of U. S. Food and Drug Administration, 8th Edition, Revision A, 1998) 分离、鉴定霍乱弧菌。挑取纯化后的单菌落, 采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术扩增霍乱弧菌特异性外膜脂蛋白基因 *lolB*^[11] 以及 16S rRNA 基因。寡核苷酸引物合成和 DNA 序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 毒力及整合接合元件相关基因的检测

采用碱性蛋白胨水培养基培养霍乱弧菌, 利用 MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的基因组 DNA, 通过 PCR 技术检测霍乱弧菌肠毒素基因 (*ctxAB*)、热稳定毒素基因 (*sto*)、RTX 家族细胞毒素基因 (*rtxA*)、毒素共调菌毛基因 (*tcpA*)、小带联结毒素基因 (*zot*)、辅助霍乱肠

毒素基因 (*ace*) 以及毒素表达调控蛋白基因 (*toxR*)。检测的 SXT-R391 家族整合接合元件 (Integrative conjugative elements, ICEs) 保守功能模块核心相关基因包括整合酶基因 (*int*)、整合接合位点 (*attR*)、接合转移相关蛋白基因 (*traI*、*traC*)、整合接合调控蛋白基因 (*setR*)。PCR 扩增反应条件参考 SONG 等的方法^[22], PCR 反应引物以及相应的扩增产物长度见表 1。

1.4 抗菌素药物敏感性及重金属抗性分析

采用美国临床与实验室标准研究所 (clinical and laboratory standards institute, CLSI, 2010 版) 标准纸片扩散法 (Kirby Bauer disc diffusion test), 测定霍乱弧菌抗菌素敏感性。抗菌素试纸片以及 Muller-Hinton Broth 培养基均购自英国 OXOID 公司, 其中包含链霉素 (10 μg)、甲氧苄苄嘧啶 (5 μg)、利福平 (5 μg)、氨苄西林 (10 μg)、庆大霉素 (10 μg)、氯霉素 (30 μg)、四环素 (30 μg)、复方新诺明 (25 μg)、卡那霉素 (30 μg)、壮观霉素 (100 μg)。质控菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC2785 购自上海工业微生物研究所。采用 CLSI 的液体微量稀释试验 (Broth Micro Dilution Test) 对受试菌株进行重金属氯化铬、氯化镉、氯化汞、氯化铅、氯化镍、氯化锌、氯化钡和氯化铜最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定。

1.5 脉冲场凝胶电泳条件及图谱分析

参考 COOPER 等的方法^[12]进行霍乱弧菌单菌落琼脂包埋样品的制备、细胞裂解以及基因组 DNA 的 NotI 酶切、上样及电泳。脉冲场凝胶电泳参数设置如下: 脉冲电场角度 120°, 电压 6 V, 温度 14 $^{\circ}\text{C}$; 脉冲时间 2 ~ 10 s, 电泳 13 h; 然后脉冲时间 20 ~ 25 s, 电泳 6 h。电泳结束后, 使用溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 溶液 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 染色琼脂糖凝胶 20 min, 凝胶成像系统读取、保存图像。运用 NTSYSpc version 2.10e, Applied Biostatistics 软件, 采用 UPGMA 方法 (unweighted pair group method with arithmetic mean algorithm) 对 PFGE 图谱进行聚类分析。

表 1 寡核苷酸引物及其序列

Tab.1 Sequences of the oligonucleotide primers used in this study

引物	序列(5'→3')	扩增基因	扩增产物长度/bp	参考文献
traI-F	GCAAGTCCTGATCCGCTATC	<i>traI</i>	697	[13]
traI-R	CCAGGGCATCTCATATGCCGT			
traC-F	TTGACGCTGTTTTACCAACG	<i>traC</i>	657	[13]
traC-R	GGCAGGACCTTTTTCTCCC			
setR-F	ACGGCGGAGATGTTTTTGT	<i>setR</i>	888	[13]
setR-R	GTGCCCAATGCTCAGTT			
attR-F	GGTTAGCCACAGTTGTTT	<i>attR</i>	313	[14]
attR-R	CCTCAGGCTGCCGAGAT			
BrIn-F	CCTAACCTCGGAAAGTGTCTAC	<i>int</i>	639 or 2 642	[15]
BrIn-R	TGTGCCACAGCTTGTTCGTG			
ctxAB-F	TGA AAT AAA GCA GTC AGG TG	<i>ctxAB</i>	777	[16]
ctxAB-R	GGT ATTCTGCAC ACA AAT CAG			
toxR-F	CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC	<i>toxR</i>	779	[17]
toxR-R	AGGTTAGCAACGATGCGTAAG			
sto-F	TATTTATTTCTTCAATCGCATTTAGC	<i>sto</i>	206	[18]
sto-R	ATTTAAACATCCAAAGCAAGCTGG			
rtxA-F	GGGATACAATGCCCTCTGGCA	<i>rtxA</i>	977	[18]
rtxA-R	TGGGTTGGCGGTTGGATTTTAC			
tcpA-F	ATGCAATTATTA AAAACAGCTTTTTAAG	<i>tcpA</i>	675	[18]
tcpA-R	TTAGCTGTTACCAAATGCAACAG			
zot-F	TCGCTTAACGATGGCCGCTTTT	<i>zot</i>	947	[17]
zot-R	AACCCGCTTTCACCTTCTACCCA			
ace-F	TAAGGATGTGCTTATGATGACACCC	<i>ace</i>	316	[18]
ace-R	CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG			
VHMF	TGGGAGCAGCGTCCATTGTG	<i>lolB</i>	519	[11]
VHA-AS5	CAATCACACCAAGTCACTC			

2 结果

2.1 霍乱弧菌分离菌株毒力相关基因的分析

本文自南美白对虾养殖池塘水体样品中分离、鉴定了数百株霍乱弧菌,均含有霍乱弧菌特异性 *lolB* 基因,对其中 *int* 基因检测为阳性的 84 株分离菌株进行了进一步鉴定。霍乱弧菌毒力相关基因分析结果显示,受试霍乱弧菌均不携带致病性霍乱肠毒素基因(*ctxAB*);且热稳定毒素基因(*sto*)、毒素共调菌毛基因(*tcpA*)、辅助霍乱肠毒素基因(*ace*)、小带联结毒素基因(*zot*)也均检测为阴性。可是,受试菌株均含有毒素表达调控蛋白基因(*toxR*),其中 19.05% 的菌株还含有 RTX 家族毒素基因(*rtxA*,图 1)。

2.2 霍乱弧菌分离菌株整合接合元件相关基因的分析

本研究对 *int* 基因检测为阳性的 84 株霍乱弧菌菌株进行了保守功能模块相关核心基因的检测,结果显示,整合接合位点(*attR*)、接合转移

相关蛋白(*traI*、*traC*)、整合接合调控蛋白基因(*setR*)的检出率分别为 97.62%、1.19%、50.00% 和 85.71% (图 1),未发现同时携带所有检测基因的菌株,提示受试菌株携带的 ICEs 元件可能不具有潜在的接合转移活性。

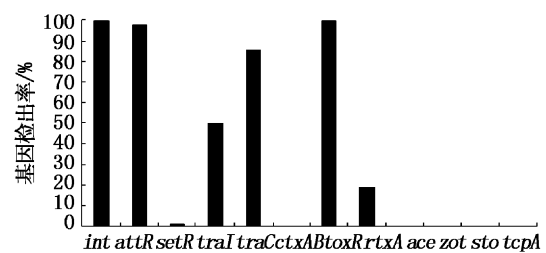


图 1 霍乱弧菌分离菌株的毒力及 SXT/R391 家族 ICEs 元件相关基因

Fig. 1 PCR test for virulence and SXT/R391 family ICEs-related genes in the *V. cholerae* isolates

2.3 霍乱弧菌分离菌株的药物敏感性及重金属抗性

进一步对 84 株霍乱弧菌分离菌株分别进行

了六大类十种抗生素的药物敏感性试验,结果如图 2(a)所示。受试菌株对检测药物的耐药性存在显著差异,其中氨苄西林的耐药率最高为 13.10%,其次是庆大霉素(2.38%);利福平、链霉素、氨苄西林、卡那霉素、壮观霉素的中介耐药率分别为 25.00%、20.24%、7.14%、2.38%、1.19%;四环素、氯霉素、甲氧苄嘧啶、复方新

诺明均敏感。

本研究还对部分受试菌株进行了重金属敏感性试验,结果显示出较窄的重金属抗性谱。30%分离自南美白对虾养殖水体的霍乱弧菌对汞、铬、镉、铜、镍、钡敏感,仅对重金属铅(≥ 15.5 mmol/L)、锌(≥ 49.2 mmol/L)具有高度抗性(图 2b)。

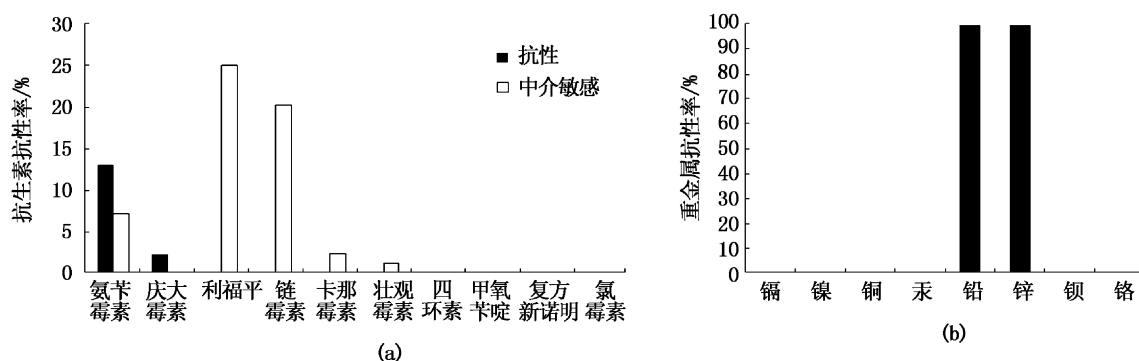


图 2 霍乱弧菌分离菌株的抗菌素及重金属敏感性

Fig. 2 Susceptibility of the *V. cholerae* isolates to antimicrobial agents (a) and heavy metals (b)

2.4 霍乱弧菌分离菌株的分子分型

本研究运用 PFGE 技术对霍乱弧菌毒力、耐药及重金属抗性受检菌株进行了分子分型,采用 UPGMA 方法对获得的 *NotI*-PFGE 图谱进行了聚

类分析,结果如图 3 所示。受试 25 株霍乱弧菌分离菌株可分为 5 类,共 13 个亚型,相似性值为 56% ~ 100%。

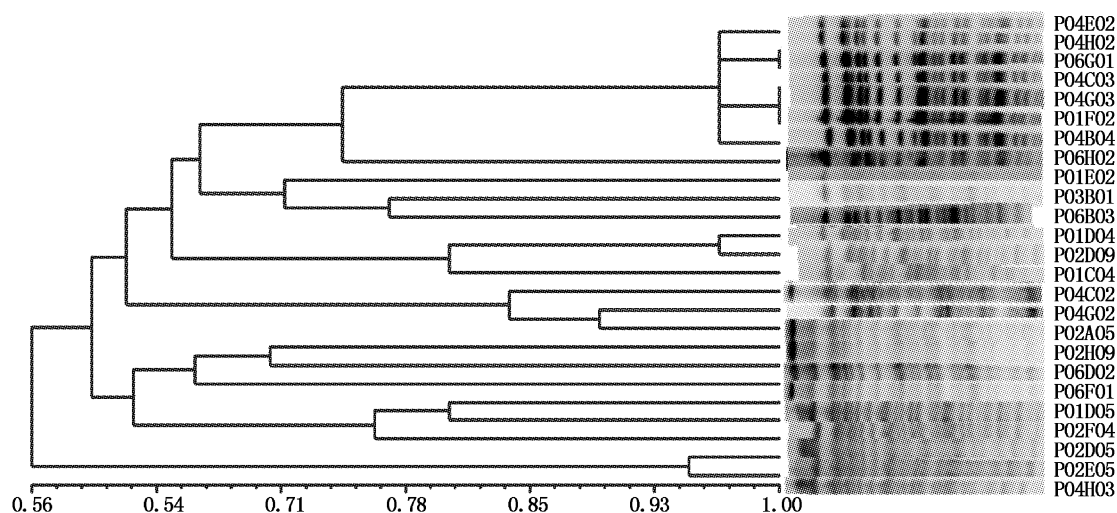


图 3 霍乱弧菌部分分离菌株的 *NotI*-PFGE 图谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of *NotI*-PFGE patterns of some *V. cholerae* isolates

3 讨论

有研究表明,不同于临床分离菌株,大多数

霍乱弧菌环境分离菌株不产生霍乱毒素^[5-6]。可是,与本研究结果一致,KUMAR 等也发现 *toxR* 基因存在于 90 株分离自印度不同水体环境的霍乱

弧菌中^[18]。*toxR* 基因以及本研究发现的 *rtxA* 基因在霍乱弧菌环境菌群中存在的生物学意义,及其对霍乱弧菌毒力形成的作用有待于进一步的研究。

ICEs 元件系一类能够整合到宿主菌染色体上并进行自我剪切,进而在细菌间接合转移的遗传性可移动元件^[19]。高分子量的 ICEs 元件携带大量基因信息,在细菌基因组进化以及环境适应性中发挥着十分重要的作用^[20]。1992 年 WALDOR 等首次从致病性霍乱弧菌 O139 血清型菌株中发现了 SXT/R391 家族 ICEs,携带耐甲氧苄苄嘧啶/磺胺甲恶唑、氯霉素、四环素和链霉素抗性基因^[21]。SXT/R391 家族 ICEs 元件含有 3 个保守功能模块,分别编码整合-切离、接合转移及其调控相关基因^[22]。本研究发现受试霍乱弧菌分离菌株携带 SXT-R391 家族 ICEs 保守功能模块部分相关基因 (*int*、*traI*、*traC*、*setR*、*attR*),为进一步分析 ICEs 元件的遗传多样性以及霍乱弧菌基因组进化提供了分析材料。

鉴于 β -内酰胺类,氨基糖苷类等抗菌素在医疗及生产上的广泛应用,与本研究结果一致,霍乱弧菌临床、环境水体、海产品分离菌株对氨苄西林、庆大霉素、卡那霉素、链霉素等抗菌素普遍具有不同程度的抗药性^[23-25]。例如,SONG 等^[13]和 TAVIANI 等^[26]分别对分离自长江入海口、莫桑比克 (Mozambique) 环境水体中携带 ICEs 的霍乱弧菌药物敏感性进行了分析,发现大多数分离菌株检测为氨苄西林抗性表型。氨苄西林抗性菌株的广泛散布可能是药物滥用或工业废水不适当释放到环境中所致^[26]。尽管美国、加拿大禁止在动物 (包括食用动物) 疾病防治中使用利福平、壮观霉素等抗菌素^[27],但是鉴于它们抗菌谱广,价格低廉,在水产养殖业存在盲目大量投放的情况,诱导环境菌株产生抗性^[28]。

迄今为止,国内外关于霍乱弧菌分离菌株的重金属抗性的相关报道甚少^[13,29]。SONG 等^[13]首次发现分离自长江入海口水体中携带 ICEs 的霍乱弧菌 (>80%) 对重金属汞 (≥ 1 mmol/L)、镉 (≥ 10 mmol/L) 具有高度抗性,且约 50% 的霍乱弧菌对铅 (≥ 10 mmol/L) 具有抗性,这很可能与长江入海口特殊的地理位置,较为严重的重金属污染相关^[30]。与长江入海口水体中的霍乱弧菌明显不同,本研究受试霍乱弧菌对汞、铬、镉、铜、

镍、钡敏感,仅对重金属铅、锌具有高度抗性,其中的原因有待进一步的探讨。

目前不依赖 PCR 的分子分型技术主要包括核糖体分型 (ribotyping, RT)、PFGE、DNA 测序分型及染色体 DNA 限制性内切酶分析 (restriction enzyme analysis, REA) 等技术^[31]。其中,PFGE 以其重复性好、分辨力强而被称为细菌分子分型技术的“金标准”^[32],并已应用于霍乱弧菌临床和环境分离菌株的分子分型中^[33-34]。本研究发现分离自南美白对虾养殖水体中的霍乱弧菌具有多种多样的 *NotI*-PFGE 分子分型,推测在复杂的水生生境中,霍乱弧菌与水生动物、其他微生物相互作用,通过基因突变和基因水平转移而获得广泛的遗传多样性。

参考文献:

- [1] GARIBALDI L, GRAINGER R, JARA F, et al. Fishery and Aquaculture Statistics [M]// MATHIESEN M A. FAO yearbook 2010; 2010. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012; 1-102.
- [2] RABBANI G H, GREENOUGH W B. Food as a vehicle of transmission of cholera [J]. Journal of Diarrhoeal Disease Research, 1999, 17(1): 1-9.
- [3] BOYD E F, MOYER K E, SHI L, et al. Infectious CTXPhi and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(3): 1507-1513.
- [4] PARSOT C, MEKALANOS J J. Expression of ToxR, the transcriptional activator of the virulence factors in *Vibrio cholerae*, is modulated by the heat shock response [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(24): 9898-9902.
- [5] KURAZONO H, PAL A, BAG P K, et al. Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins [J]. Microbial Pathogenesis, 1995, 18(3): 231-235.
- [6] SHARMA C, THUNGAPATHRA M, GHOSH A, et al. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(3): 756-763.
- [7] FARUQUE S M, ALBERT M J, MEKALANOS J J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1301-1314.
- [8] FARUQUE S M, NAIR G B. Molecular ecology of toxigenic

- Vibrio cholerae* [J]. *Microbiology and Immunology*, 2002, 46 (2): 59 - 66.
- [9] GOEL A K, PONMARIAPPAN S, KAMBOJ D V, et al. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. *Folia microbiologica*, 2007, 52(1): 81 - 85.
- [10] MOMTAZ H, DEHKORDI F S, RAHIMI E, et al. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* species, and *Vibrio cholerae* in tap water and bottled drinking water in Isfahan, Iran [J]. *BMC Public Health*, 2013, 13(1): 556.
- [11] LALITHA P, SITI SURAIY M N, LIM K L, et al. Analysis of *lolB* gene sequence and its use in the development of a PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(1): 142 - 144.
- [12] COOPER K L, LUEY C K, BIRD M, et al. Development and validation of a pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae* [J]. *Food Pathogens and Disease*, 2006, 3(1): 51 - 58.
- [13] SONG Y Z, YU P, LI B L, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China [J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 214.
- [14] BANI S, MASTROMARINO P N, CECCARELLI D, et al. Molecular characterization of ICE V_{ch} Vie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 266(1): 42 - 48.
- [15] MCGRATH BM, O'HALLORAN J A, PITERINA A V, et al. Molecular tools to detect the IncJ elements: a family of integrating, antibiotic resistant mobile genetic elements [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(1): 32 - 42.
- [16] KOCH W H, PAYNE W L, CEBULA T A. Detection of enterotoxigenic *Vibrio cholerae* in foods by the polymerase chain [S]// HAMMACK T. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. US: United States Food and Drug Administration, 1998, 8(A): 28.
- [17] RIVERA I N, CHUN J, HUQ A, et al. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2421 - 2429.
- [18] KUMAR P, PETER W A, THOMAS S. Rapid detection of virulence-associated genes in environmental strains of *Vibrio cholerae* by multiplex PCR [J]. *Current Microbiology*, 2010, 60(3): 199 - 202.
- [19] WOZNAK R A, WALDOR M K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 552 - 563.
- [20] GOGARTEN J P, TOWNSEND J P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 679 - 687.
- [21] WALDOR M K, TSCHÄPE H, MEKALANOS J J. A New Type of Conjugative Transposon Encodes Resistance to Sulfamethoxazole, Trimethoprim, and Streptomycin in *Vibrio cholerae* O139 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(14): 4157 - 4165.
- [22] BURRUS V. Significance of the SXT/R391 Family of Integrating Conjugative Elements in *Vibrio cholerae* [M]// RAMAMURTHY T, BHATTACHARYA S K. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera*. New York: Springer, 2011: 161 - 184.
- [23] 权怡, 方锦嵩, 周凌云, 等. 2006年-2009年广西水体及海水产品霍乱弧菌监测分析 [R]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(2): 464 - 465.
- [24] 汪皓秋, 孟冬梅, 于新芬, 等. 杭州市 O139 群霍乱弧菌耐药变迁及毒力基因携带 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(3): 321 - 322.
- [25] 马聪, 郝秀红, 马学斌, 等. 中国海域海洋细菌抗生素敏感性分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(1): 53 - 58.
- [26] TAVIANI E, CECCARELLI D, LAZARO N, et al. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class1 integrons [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(1): 45 - 54.
- [27] HOLMSTRÖM K, GRÄSLUND S, WAHLSTRÖM A, et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2003, 38(3): 255 - 266.
- [28] 胡梦红. 抗生素在水产养殖中的应用、存在的问题及对策 [J]. *水产科技情报*, 2006, 33(5): 217 - 221.
- [29] MATYAR F, KAYA A, DINCER S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 407(1): 279 - 285.
- [30] ZHAO S, FENG C, QUAN W, et al. Role of living environments in the accumulation characteristics of heavy metals in fishes and crabs in the Yangtze river estuary, China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(6): 1163 - 1171.
- [31] 江晓, 任春华, 胡超群. 分子分型技术在弧菌研究中的应用进展 [J]. *海洋科学进展*, 2010, 28(4): 563 - 569.
- [32] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE) 在分子分型中的应用现状 [J]. *疾病监测*, 2006, 21(5): 276 - 279.
- [33] 李志峰, 赵波, 廖春艳, 等. 61 株 O1 群霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳分型分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(5): 1000 - 1002.
- [34] GU W P, YIN J W, YANG J B, et al. Characterization of *Vibrio cholerae* from 1986 to 2012 in Yunnan Province, southwest China bordering Myanmar [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 21: 1 - 7.

Virulence genes and susceptibility to antimicrobial agents and heavy metals of *Vibrio cholerae* isolated from aquaculture water farming *Litopenaeus vannamei*

TANG Yu-yi^{1,2,3}, TAN Jian-guo⁴, MIU Hai-zhen⁴, PENG Li⁴, YANG Dan-dan⁴, PAN Ying-jie^{1,2,3}, CHEN Lan-ming^{1,2,3}

(1. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 2. Engineering Centre for Quality Control and Risk Assessment of Aquatic Products, Shanghai 201306, China; 3. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Shanghai Key Laboratory of Meteorology and Health, Shanghai 200135, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate virulence genes and susceptibility to antimicrobial agents and heavy metals of *Vibrio cholerae* strains isolated from aquaculture water farming *Litopenaeus vannamei*, in order to provide scientific data support for early warning of food-borne and life-threatening cholera disease caused by *V. cholerae*. The genes involved in pathogenicity and integrative conjugative elements (ICEs) were detected by polymerase chain reaction (PCR). The virulence-related genes were absent in all *V. cholerae* isolates, including *ctxAB*, *sto*, *tcpA*, *ace* and *zot*. However, all the isolates were tested positive for a *toxR* gene, 19.05% of which also contained a *rtxA* gene. Some of the functional genes (*int*, *traI*, *traC*, *setR*, *attR*) involved in conserved module structures of SXT-R391 family ICEs were detected positive, suggesting no possible transfer activity of the ICEs detected in the isolates. Antimicrobial susceptibility of *V. cholerae* strains were examined by using standard Kirby Bauer disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (USA, 2010 Edition), showing distinct susceptibility to ten antimicrobial agents belonging to six drug classes tested. Total 13.10% and 2.38% of the *V. cholerae* strains were resistant to ampicillin and gentamycin, respectively. About 25.00% – 1.19% of the isolates also displayed intermediate resistance to rifampicin, streptomycin, ampicillin, kanamycin and spectinomycin. In addition, a narrow heavy metal resistance profile was detected in the isolates tested, showing strong resistance to Pb and Zn. By pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping, these *V. cholerae* isolates were clustered into five *NotI*-PFGE types and thirteen subtypes with 56% – 100% identity. The data in this study constituted the first evidence for molecular and resistance phenotype characterization of the *V. cholerae* isolates of aquaculture environmental origin.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Vibrio cholerae*; antibiotic resistance; heavy metal resistance; molecular typing