

南美白对虾养殖场中副溶血性弧菌潜在风险识别分析

蔡佳怡^{1,2}, 程健恒², 张祥志¹, 冯瑞珍², 张颖², 闻丞渤², 陈谋通^{2*}

(1. 五邑大学药学与食品工程学院, 广东江门 529020) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州 510070)

摘要: 为了解南美白对虾养殖场副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 的污染状况和潜在风险, 掌握其遗传多样性和潜在毒力特征。于 2024 年在广东省江门市和中山市两个南美白对虾养殖场采集水样和虾样共 354 份, 副溶血性弧菌的检出率为 41.53% (147/354), 多重 PCR 共检出 O1、O3/O13、O5、O7、O11、O12 六个血清群, O1 (44.21%, 65/147) 和 O11 (31.97%, 47/147) 为优势血清群。PCR 法结果显示, *tlh* 和 *toxR* 基因携带率均为 100%, *pirAB* 为 24.49% (36/147), *tdh* 和 *trh* 基因未检出。利用多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 技术可将 147 株分离株分为 26 种序列型 (Sequence Type, ST), ST2408 (17.69%, 26/147) 为主要流行型。最小抑制浓度法结果显示, 分离株对多粘菌素 B 的耐药率为 11.56% (17/147), 对其余 21 种抗生素敏感率均 >90%。综上, 养殖场中发现高污染携带 *pirAB* 基因和多粘菌素 B 耐药的副溶血性弧菌, 存在潜在食品安全风险。该研究结果为副溶血性弧菌的风险识别与分子溯源工作奠定了基础数据支持, 对水产健康养殖和副溶血性弧菌潜在危害预防具有重要的意义。

关键词: 副溶血性弧菌; 南美白对虾; 血清群; 多位点序列分析

文章编号: 1673-9078(2026)6-377-384

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0492

Potential Risk Identification of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* Aquaculture Farms

CAI Jiayi^{1,2}, CHENG Jianheng², ZHANG Xiangzhi¹, FENG Ruizhen²,
ZHANG Ying², WEN Chengbo², CHEN Moutong^{2*}

(1.College of Pharmacy and Food Science, Wuyi University, Jiangmen 529020, China)

(2.Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The prevalence, genetic diversity, and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* were analyzed in Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture systems. In 2024, 354 samples were collected from *L. vannamei* aquaculture farms in Jiangmen and Zhongshan cities, Guangdong Province. The prevalence of *V. parahaemolyticus* was 41.53% (147/354). Six serogroups were identified via multiplex polymerase chain reaction (PCR), including O1, O3/O13, O5, O7, O11, and O12 serogroup.

引文格式:

蔡佳怡,程健恒,张祥志,等.南美白对虾养殖场中副溶血性弧菌潜在风险识别分析[J].现代食品科技,2026,42(6):377-384.

CAI Jiayi, CHENG Jianheng, ZHANG Xiangzhi, et al. Potential risk identification of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* aquaculture farms [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 377-384.

收稿日期: 2025-04-08; 修回日期: 2025-06-16; 接受日期: 2025-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32222068); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022B1515020068); 广东省科学院青年人才专项 (2023GDASQNR-0102)

作者简介: 蔡佳怡 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌控制, E-mail: 2014639368@qq.com

通讯作者: 陈谋通 (1984-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: cmtton@163.com

O1 (44.21%, 65/147) and O11 (31.97%, 47/147) were the dominant strains. PCR analysis showed that the presence of both *tlh* and *toxR* genes were 100%, whereas *pirAB* was detected in 24.49% (36/147) isolates; *tdh* and *trh* gene was not detected. A total of 26 different sequence types (STs) were identified using multilocus sequence typing, seven (26.92%) STs were identified as novel STs. ST2408 (17.69%, 26/147) was identified as the predominant ST. The antibiotic resistance of isolates was tested using minimum inhibitory concentration. Results showed that the resistance rate to polymyxin B was 11.56% (17/147), whereas the susceptibility to the other 21 antibiotics were all above 90%. A high prevalence of *pirAB*-carrying and polymyxin B-resistant *V. parahaemolyticus* isolates was identified in aquaculture farms, indicating a potential food safety risk. These results of this study provide fundamental data for the risk identification and molecular traceability of *V. parahaemolyticus*, which play an important role in healthy aquaculture practices and the prevention of potential risk of this pathogen.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *Litopenaeus vannamei*; serogroup; multilocus sequence typing

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是重要的食源性致病菌, 常在海洋、河口等环境中检出, 易引起水产品污染, 食用被污染的食品可能引起食物中毒, 轻度导致腹泻、急性肠胃炎, 重度可引起休克、败血症^[1]。在 1990 年至 2019 年间, 由副溶血性弧菌引起的全球范围内的大流行病多达 40 余次^[2]。近年在中国东部沿海省份报告的 802 次食源性疾病中, 40.1% 的食源性疾病暴发事件是由于副溶血性弧菌污染造成^[3], 表明副溶血性弧菌是中国细菌性食物中毒的重要因素之一。

依据菌体 O 抗原副溶血性弧菌分为 13 个血清群, 即 O1~O13。其中, O1、O2、O3、O4、O5、O10 血清群易引起食物中毒^[4]。前期研究报道了多个与副溶血性弧菌毒力基因相关的基因, *tdh* 编码的耐热性直接溶血素和 *trh* 编码的耐热性相关溶血素被认为是副溶血性弧菌主要的毒力因子^[5]。热不稳定溶血素普遍存在于副溶血性弧菌中, 其编码基因 *tlh* 可作为特异性毒力基因用于检测副溶血性弧菌^[5]。*toxR* 在副溶血性弧菌的发病过程中具有重要作用, 有助于副溶血性弧菌在哺乳动物肠道内的定植^[6]。急性肝胰腺坏死病 (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) 于 2009 年在中国首次被发现, 主要由毒力基因 *pirAB* 编码, 感染 AHPND 后死亡率高达 100%^[7]。

目前, 已报道多种分型技术对食源性致病菌进行分子分型, 多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 是一种基于核酸序列的分型方法, 通过对同一病原菌的管家基因进行测序、分析和比较, 确定菌株间的克隆关系^[8], 从而为致病菌溯源、控制及治疗策略的制定提供坚实的科学支撑。基于 MLST 方法衍生了序列型 (Sequence Types, STs) 和克隆复合群 (Clonal complexes, CCs) 命名体系。目前, 副溶血性弧菌主要流行 ST 型包括全球暴发的 ST3、地区性流行的 ST36, 以及区域性传播的 ST88 和 ST189^[9]。同时,

由于在临床、水产养殖和农业生产中过度使用和滥用抗生素导致耐药性副溶血性弧菌广泛存在^[10]。前期的研究报道主要集中在零售终端水产品中副溶血性弧菌的耐药性状况, 对养殖环境中副溶血性弧菌的污染状况及其潜在危害鲜有报道。作为水产品供应链的源头, 养殖场的抗生素使用及其所引发的致病菌耐药性对后续食品流通各个环节具有重要影响。因此, 对食品生产源头进行副溶血性弧菌进行污染水平、分子分型和耐药性分析十分必要。

该研究于 2024 年 5~8 月对广东省江门市和中山市两个南美白对虾养殖场水样和虾样中副溶血性弧菌进行污染状况分析, 并对分离株进行血清型、毒力基因、MLST 及耐药性分析, 评估其潜在致病性和风险特征, 为高效防控副溶血性弧菌污染和从源头保障食品安全提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

弧菌显色培养基、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂固体培养基 (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar Culture Medium, TCBS)、质量分数 3% 氯化钠碱性蛋白胨水、质量分数 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、细菌 DNA 提取试剂盒、2×Fast Taq Master Mix, 广东环凯生物科技有限公司; Tubes for Qubit Assay, 广州禾尔若生物科技有限公司; Agilent High Sensitivity DNA kit, 上海伯豪生物技术有限公司; Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit, 思博锐科技 (广州) 有限公司; 非发酵菌/氧化酶阳性革兰氏阴性杆菌鉴定药敏板、药敏配套试剂, 珠海迪尔生物工程股份有限公司; 50×TAE 缓冲液、琼脂糖、核酸染料, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 乙醇, 广东广试试剂科

技术有限公司；甲酸，上海麦克林生化科技股份有限公司； α -氨基-4-羟基肉桂酸，德国 Bruker Daltonics 公司；乙腈，天津市科密欧化学试剂有限公司。所有与 PCR 相关引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

SHP-250 恒温培养箱，广东环凯微生物科技有限公司；Research[®] plus 微量可调移液器，德国 Eppendorf 公司；HZQ-F100 振荡培养箱，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；BSA224S-CW 电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；EPS 300 核酸电泳仪、Tanon-2500 凝胶成像系统，上海天能科技有限公司；Biometra TOne 96G PCR 仪，德国 Biometra 公司；Qubit[®] 3.0 荧光定量仪、Covaris M220，美国 Covaris 公司；Agilent 2100 生物分析仪，美国 Agilent Technologies 公司；Illumina NextSeq[™] 550 测序系统，美国 Illumina 公司；DL-MC1 浊度仪、DL-96A 细菌鉴定及药敏分析系统，珠海迪尔生物工程股份有限公司，Microflex LT MALDI-TOF 质谱仪，德国 Bruker Daltonics 公司。

1.1.2 标准菌株

副溶血性弧菌标准株 ATCC17802、ATCC33847 和大肠埃希氏菌 ATCC 25922 由广东省科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集与处理

于 2024 年 5~8 月在广东省江门市和中山市南美白对虾养殖场进行采样。参考 GB 4789.7-2013 的方法采集、处理样品^[1]，采取多区域采集，隔断采样点，采集过程中注意采集工具消毒，防止样品交叉污染，共采集养殖水样 201 份、疑似病虾样品 153 份。样品及时放入含有 9 mL 质量分数 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管中进行增菌处理，并记录信息。其中，水样的采集量应不少于 5 mL，虾样需先用自来水彻底冲洗去污，甩干水分后将整只虾剪碎。采样完成后，需将增菌试管在室温下迅速运回实验室，在 8~18 h 内完成后续样品处理。

1.2.2 副溶血性弧菌分离鉴定

样品经增菌培养后，利用接种环（约 10 μ L）蘸取菌液在弧菌显色培养皿上进行划线分离。每个增菌试管对应接种一个平板，接种完成后，将平板置于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 18~24 h。从每块平板上分别挑选 3 个可疑菌落，接种至 TCBS 平板、质量分数 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂固体平板进行两次连续的纯化培养。

利用 MALDI-TOF 质谱仪对分离株进行鉴定，

挑取单菌落在 MALDI 靶板上均匀涂布点样，先加入 1 μ L 的体积分数 70% 甲酸覆盖样本，自然风干，再加入 1 μ L 的 α -氨基-4-羟基肉桂酸基质液覆样，室温下晾干，样品靶点完全干燥后将靶板放入质谱仪中鉴定，获得微生物质谱图。将质谱图与微生物数据库 MALDI Biotyper 进行比对，依据肽指纹图谱匹配得分判断微生物种类，选取评分高于 2.00 的菌株，鉴定结果具有高置信度。

1.2.3 副溶血性弧菌检出率

若从样本中成功鉴别出副溶血性弧菌，则该样品被标记为阳性。每份阳性样品中仅选取一株副溶血性弧菌分离株用于后续的实验研究。检出率按如下公式

(1) 计算：

$$R = \frac{P}{N} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

R——副溶血性弧菌检出率（DR），%；

P——阳性样品数；

N——总样品数。

1.2.4 血清型鉴定

参考 Chen 等^[12]的方法和引物信息并稍加修改，利用多重 PCR 检测副溶血性弧菌 O 血清群，将血清群分为 2 组，分别为组 1：O1、O2、O4、O5、O6、O10，组 2：O3/O13、O7、O8、O9、O11、O12。PCR 反应体系：摩尔浓度 10 μ mol·L⁻¹ 上下引物 0.2 μ L、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 9.1 μ L、DNA 模板 1 μ L。PCR 循环参数设置如下：预变性阶段 94 $^{\circ}$ C 5 min；30 个循环扩增阶段包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 40 s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s；延伸阶段 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增结束后，取 5 μ L PCR 产物，采用质量分数 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳分离，电泳条件为恒定电压 120 V，电泳时间 30 min。

1.2.5 毒力基因检测

利用 PCR 分析副溶血性弧菌分离株毒力基因（*tlh*、*tdh*、*trh*、*toxR*、*pirAB*）携带情况，PCR 反应体系：摩尔浓度 10 μ mol·L⁻¹ 上下引物 1 μ L、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L、DNA 模板 1 μ L。PCR 循环参数同 1.2.4 中，退火温度见表 1。以副溶血性弧菌 ATCC17802（*tlh*⁺、*tdh*⁻、*trh*⁺、*toxR*⁺、*pirAB*⁻）和 ATCC33847（*tlh*⁺、*tdh*⁺、*trh*⁻、*toxR*⁺、*pirAB*⁻）为参考菌株。

1.2.6 全基因组测序及 MLST 分析

利用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA，并通过质量分数 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性，采用荧光定量仪测定 DNA 浓度，以确保 DNA 质量。

质控合格的 DNA 进行随机片段化、末端修复、3' 端加 A 尾反应，最后将测序接头与 DNA 片段连接，完成高通量测序文库的制备。使用 Agilent 2100 生物分析仪检测文库片段大小分布，保证文库质量。在质量

测试合格后，利用 Illumina Nextseq 550 测序平台进行簇生成、边合成边测序以及数据采集，生成 reads。最后，使用 SPAdes v3.6.2 软件对这些 reads 进行组装，得到完整的基因组序列。

表 1 副溶血性弧菌毒力基因引物

Table 1 Primers for virulence genes of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>				
毒力基因	引物序列 (5'-3')	片段大小/bp	退火温度/℃	参考文献
trh	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500	58	[13]
	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG			
tdh	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	269	58	[13]
	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC			
tlh	CGAACGAGAACGCAGACATT	110	58	[14]
	CTTTGTTGATTTGATCTGGCTG			
toxR	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	63	[15]
	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG			
pirAB	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	336	53	[16]
	GTGGTAATAGATTGTACAGAA			

表 2 副溶血性弧菌抗生素敏感性测试评估准则

Table 2 Evaluation criteria for antibiotics susceptibility of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>						
序号	药物名称	英文名称	缩写	最小抑制质量浓度/(μg·mL ⁻¹)		
				敏感	中介	耐药
1	头孢吡肟	Cefepime	FEP	≤8	16	≥32
2	头孢他啶	Ceftazidime	CAZ	≤4	8	≥16
3	庆大霉素	Gentamicin	GEN	≤4	8	≥16
4	妥布霉素	Tobramycin	TOB	≤4	8	≥16
5	阿米卡星	Amikacin	AMK	≤16	32	≥64
6	哌拉西林	Piperacillin	PIP	≤16	32~64	≥128
7	亚胺培南	Imipenem	IPM	≤1	2	≥4
8	哌拉西林 - 他唑巴坦	Piperacillin-Tazobactam	PTZ	≤16/4	32/4~64/4	≥128/4
9	美罗培南	Meropenem	MRP	≤1	2	≥4
10	氨苄西林 / 舒巴坦	Ampicillin-Sulbactam	AMS	≤8/4	16/4	≥32/4
11	头孢哌酮 / 舒巴坦	Cefoperazone-Sulbactam	CPS	≤16/8	32/8	≥64/8
12	氨曲南	Aztreonam	ATM	≤4	8	≥16
13	左氧氟沙星	Levofloxacin	LEV	≤2	4	≥8
14	替卡西林 / 克拉维酸	Ticarcillin-Clavulanate	TIM	≤16/2	32/2~64/2	≥128/2
15	复方新诺明	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	SXT	≤2/38	—	≥ 4/76
16	诺氟沙星	Norfloxacin	NOR	≤1	2	≥4
17	米诺环素	Minocycline	MI	≤4	8	≥16
18	替加环素	Tigecycline	TGC	≤4	8	≥16
19	环丙沙星	Ciprofloxacin	CIP	≤1	2	≥4
20	多粘菌素 B	Polymyxin B	PB	≤2	—	>2
21	多西环素	Doxycycline	DOX	≤4	8	≥16
22	氯霉素	Chloramphenicol	CHL	≤8	16	≥32

组装完成的全基因数据上传数据库 (<https://pubmlst.org/organisms/vibrio-parahaemolyticus>)^[17] 匹配管家基因号及 ST 型, 对未匹配到的副溶血性弧菌参照 MLST 官网上的 7 对管家基因引物 (*recA*、*gyrB*、*dnaE*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*) 进行 PCR 扩增。针对未扩增出 *recA* 基因的菌株, 设计并利用引物 (rec3A-F: TCAGAAGGCGTCTTCATCCGC, rec3A-R: ATGGATGATAATAAGCAAAAAGCTCTAGCG, 1052bp;) 再次扩增。PCR 反应体系同 1.2.3, 扩增程序如下: 预变性阶段 95 ℃ 2 min; 30 个循环扩增阶段包括 95 ℃ 变性 20 s、55 ℃ 退火 20 s 及 72 ℃ 延伸 20 s; 延伸阶段 72 ℃ 5 min。对扩增产物序列测定后, 上传 MLST 数据库序列比对, 对新出现的管家基因变异位点和 ST 型提交至数据库分配新序列型。

1.2.7 抗菌药物敏感实验

挑取副溶血性弧菌单菌落至药敏稀释液中, 制备麦氏浊度为 0.45~0.55 的菌悬液。通过自动加样器加样到非发酵菌 / 氧化酶阳性革兰氏阴性杆菌鉴定药敏板, 使用全自动病原菌鉴定药敏分析系统对 22 种抗生素进行最小抑制浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 分析 (表 2)。采用大肠埃希氏菌 ATCC 25922 菌株作为药敏测试质控菌株, 评估标准遵循 CLSI M45 药敏试验标准, 如表 2 所示, 将测试结果分类为敏感 (Susceptible, S)、中介 (Intermediate, I) 和耐药 (Resistant, R)。对三类或三类以上不同抗菌药物具有耐药性的菌株, 界定为多重耐药菌株。

1.2.8 数据处理

实验数据用 Excel 2016 软件进行整理与分析, 利用 Origin 2024 软件进行数据的图表可视化。

2 结果与讨论

2.1 副溶血性弧菌检出率

从南美白对虾养殖场采集的 354 份样品中检出 147 份样品含有副溶血性弧菌, 检出率为 41.53% (表 3), 高于报道的上海市水产养殖环境 30.76% (72/234)^[18] 和深圳市近岸海水 (26.11%, 82/314)^[19], 表明不同地

区的养殖环境中副溶血性弧菌的污染水平具有一定差异。从样品类型分析, 水样总检出率 (43.28%, 87/201) 高于虾样 (39.22%, 60/153), 但差异不显著 ($P>0.05$); 而 Siddique 等^[20] 研究中副溶血性弧菌在沉积物中最高 (72.22%, 26/36), 其次是虾 (69.44%, 25/36)、水样 (61.11%, 22/36), 表明副溶血性弧菌在不同样品类型中的分布存在差异。副溶血性弧菌的检出率在不同月份有明显差异 ($P<0.01$), 其中 2024 年 8 月检出率为 86.93% (133/153) 高于 5 月 (11.54%, 12/104) 和 7 月 (2.06%, 2/97)。刘军军等^[18] 报道了上海市水产养殖中副溶血性弧菌检出率呈现明显季节性波动, 夏季检出水平显著升高。该研究 7 月份副溶血性弧菌检出率较低可能与强降雨导致的水体盐度骤降有关, Song 等^[21] 指出低盐浓度下副溶血性弧菌生长速度显著降低, 滞后时间延长, 并降低最大比生长速率。表明养殖环境中副溶血性弧菌的分布不仅受样本类型影响, 还受环境因素 (特别是水温 and 盐度) 影响。

2.2 血清型分布

利用多重 PCR 对 147 株副溶血性弧菌分离株进行了 O 血清群鉴定, 结果如图 1 所示。共检出 6 个 O 血清群, 分别为 O1 (44.21%, 65/147)、O3/O13 (5.44%, 8/147)、O5 (9.52%, 14/147)、O7 (0.68%, 1/147)、O11 (31.97%, 47/147)、O12 (8.16%, 12/147) 血清群, 而 O2、O4、O6、O8、O9、O10 血清群均未检出。主要流行血清群是 O1 群 (44.21%, 65/147), 其次是 O11 群 (31.97%, 47/147); 而辽宁省主要流行血清群为 O2 群^[4] (42.41%, 67/158); 深圳地区未发现明显的优势血清群^[9]; 上海地区主要流行群同样为 O1 群 (66.67%, 48/72), 但占比更高^[18], 表明血清群分布呈现地区性差异。根据前期文献报道, 副溶血性弧菌的特定血清群与食源性疾病的发生模式存在显著相关性, 其中 O3 和 O4 血清群更易引起暴发性食物中毒, 而 O1、O2、O5 和 O10 血清群则更多与散发性病例相关^[4]。该研究中易引发食物中毒的副溶血性弧菌血清群占 59.17% (87/147), 虽低于刘军军等^[18] 在南美白对虾养殖场中报道的 87.93% (51/58), 但仍表明养殖环境中的副溶血性弧菌具有引起食源性疾病的潜在风险。

表 3 南美白对虾养殖场中副溶血性弧菌分离情况

Table 3 The prevalence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in <i>Litopenaeus vannamei</i> aquaculture farms										
采样时间	采样地点	水样			虾样			总计		
		样品数	阳性样品	检出率/%	样品数	阳性样品	检出率/%	样品数	阳性样品	检出率/%
2024 年 5 月	中山	55	7	12.73	49	5	10.2	104	12	11.54
2024 年 7 月	中山	54	1	1.85	43	1	2.33	97	2	2.06
2024 年 8 月	江门	92	79	85.87	61	54	88.52	153	133	86.93
总计		201	87	43.28	153	60	39.22	354	147	41.53

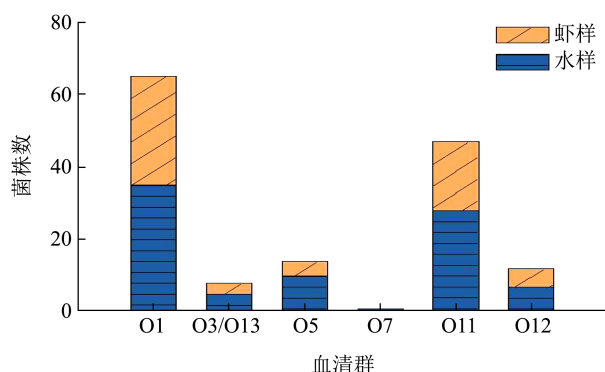


图1 副溶血性弧菌分离株的O血清群分布

Fig.1 Serogroup O distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolates

2.3 毒力基因携带情况

如图2所示, 147株分离株 *tlh* 和 *toxR* 基因携带率均为 100%, 未检测到携带 *tdh* 和 *trh* 基因, 引发 AHPND 的 *pirAB* 毒力基因携带率为 24.49%(36/147), 并随机选取了 6 株副溶血性弧菌的 PCR 扩增产物送往北京六合华大基因测序验证。副溶血性弧菌的毒力基因 *tdh* 和 *trh* 在环境及水产品中的检出率普遍较低, Narayanan 等^[22]报道副溶血性弧菌在零售海鲜中 *tdh* 的检出率仅为 2.62% (17/648), 未检出 *trh* 基因; Lian 等^[23]发现环境分离的 193 株副溶血性弧菌均不携带 *tdh* 和 *trh* 基因。AHPND 具有高致死率, 自被发现以来已对全球对虾养殖业造成了巨大的经济损失。该研究在对虾养殖场采集的样品中, 引发 AHPND 的毒力基因 *pirAB* 高达 24.49% (36/147), 高于吴俊敏等^[24]在湛江病虾塘检出的 13.79% (8/58), 表明养殖环境中存在高致病性副溶血性弧菌给对虾健康养殖带来潜在的严重威胁。

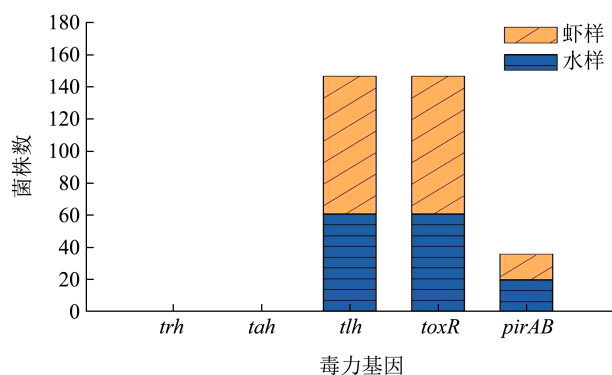


图2 副溶血性弧菌毒力基因携带情况

Fig.2 The presence of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolates

2.4 MLST分析

利用 MLST 技术可将 147 株副溶血性弧菌分离株分为 26 种 ST 型, 其中 ST3712、ST3713、ST3714、

ST3715、ST3716、ST3728 及 ST3729 为新 ST 型, 占比为 26.92% (7/26)。如图 3 所示, 副溶血性弧菌分离株的主要流行型为 ST2408 (17.68%, 26/147), 其次是 ST3008 (9.52%, 14/147) 和 ST3223 (9.52%, 14/147)。在虾样中分离出 14 种 ST 型的副溶血性弧菌分离株, 水样中分离出 24 种 ST 型, 表明不同 ST 型菌株可能对对虾的污染具有偏好性。根据 PubMLST 数据库显示, 全球报道的副溶血性弧菌已有 3754 种 ST 型 (更新至 2025-04-02), 地区间的差异及环境条件等多种因素可能导致不同地区水产品中副溶血性弧菌优势 ST 型菌株流行存在差异。成都市水产品中分离的 104 株副溶血性弧菌分为 38 个 ST 型, 以 ST1801(12.5%)、ST392 (11.5%) 和 ST413 (9.6%) 居多^[25], 曼谷和泰国东部海鲜中分离的 36 株副溶血性弧菌分为 25 个 ST 型, ST1925 (20%)、ST197 (12%) 及 ST2926 (12%) 是主要流行型^[26]。图 4 中每个圆圈均代表一个序列类型 (ST), 圆圈的大小反映了相应分离株的数量, 连接各圆圈的线条上方的数字则显示了这两个 ST 型之间等位基因的差异数目, 该研究分离的副溶血性弧菌在 ST 型之间相差较大, 均有至少 5 个等位基因的差异, 表明对虾养殖场中的副溶血性弧菌具有丰富的遗传多样性。

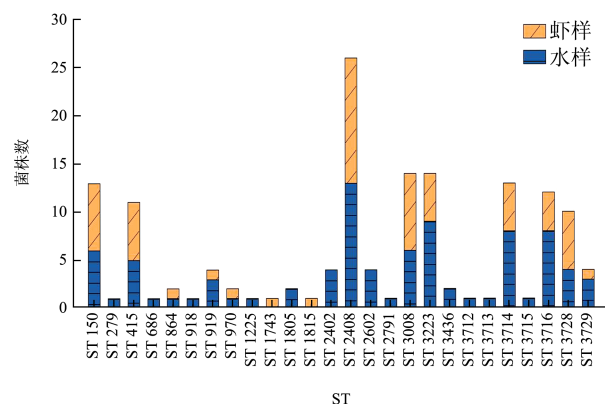


图3 副溶血性弧菌 MLST 分型结果

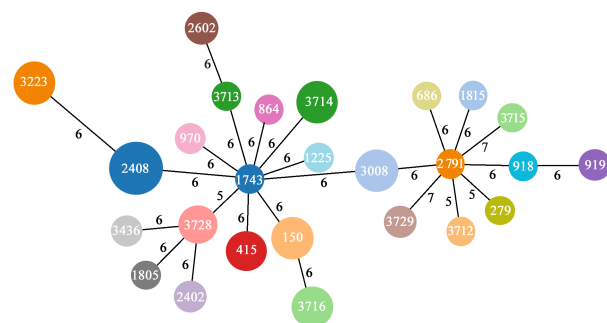
Fig.3 MLST analysis results of *Vibrio parahaemolyticus* isolates

图4 基于 MLST 的 147 株副溶血性弧菌聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of 147 strains of *Vibrio parahaemolyticus* based on MLST analysis

2.5 耐药性分析

147 株副溶血性弧菌分离株对 22 种抗生素耐药情况如图 5 所示，分离株对多粘菌素 B、头孢他啶、氨曲南和阿米卡星的耐药率依次为 11.56%（17/147）、2.72%（4/147）、2.72%（4/147）、0.68%（1/147），仅检测到 4 株分离株对两种抗生素均呈现耐药性，未发现多重耐药菌株。除多粘菌素 B 外，分离株对其余 21 种抗生素的敏感性均> 90%。虽然分离株对氯霉素、美罗培南和妥布霉素未表现出耐药性，但这三种抗生素均有低水平的中介耐药率（< 5%），分别为 2.04%（3/147）、1.36%（2/147）、0.68%（1/147），提示对虾养殖环境中可能已受到这三种抗生素的轻微污染。不同地区的副溶血性弧菌分离株在耐药性上呈现区域性差异，如韩国沿海地区分离株对粘菌素和氨苄青霉素的耐药性相对较高^[27]，福建宁德地区分离株对磺胺阿莫唑、利福平和红霉素的耐药率较高^[28]，而深圳大鹏新区分离株则对青霉素类药物表现出明显的耐药性^[19]。有研究发现抗生素耐药基因在水样中更普遍，且随时间推移，水样、沉积物、虾样中的副溶血性弧菌抗性率及抗性基因会显著增加^[29]。水生动物中的耐药性副溶血性弧菌可通过食物链传递给人类，从而对消费者健康造成严重威胁。在新型抗生素研发滞后的现状下，多粘菌素已被视为应对多重耐药革兰氏阴性菌感染的最后一道防线^[30]。尽管多个国家已明确禁止将多粘菌素作为兽药或饲料添加剂用于水产养殖，但该研究中仍发现有 11.56% 的副溶血性弧菌分离株对多粘菌素 B 具有耐药性，因此，亟需加强各地区水产养殖环境中耐药性的监测与防控措施。

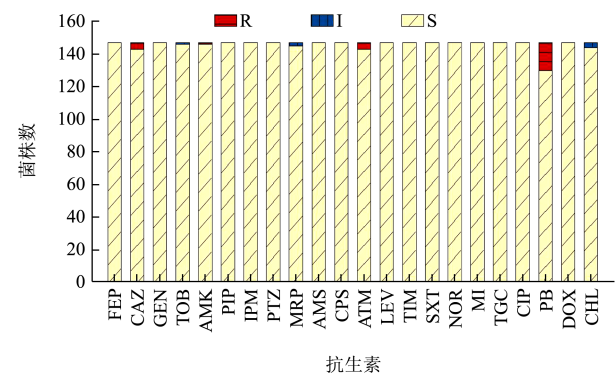


图 5 副溶血性弧菌分离株耐药性情况

Fig.5 The antibiotics susceptibility analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolates

3 结论

该研究对广东省江门市和中山市的两个对虾养殖场进行了副溶血性弧菌的检测，检出率为 41.53%

（147/354）。在分离出的副溶血性弧菌菌株中，易引发食物中毒的血清群占比为 59.17%（87/147），同时 AHPND 毒力基因 *pirAB* 的携带率为 24.49%（36/147）。此外，共检出了 26 种不同的 ST 型，且这些 ST 型之间差异较大，呈现出丰富的遗传多样性。对分离株进行耐药性检测发现，多粘菌素 B 的耐药率为 11.56%（17/147），而其余 21 种抗生素的敏感率均超过 90%。这表明南美白对虾养殖场中存在潜在的食品安全风险，需加强风险防控和管理措施。该研究结果为副溶血性弧菌的风险识别与分子溯源工作奠定了基础数据支持，对水产健康养殖和副溶血性弧菌潜在危害预防具有重要的意义。

参考文献

[1] DA SILVA L V, OSSAI S, CHIGBU P, et al. Antimicrobial and genetic profiles of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the maryland coastal bays, United States [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676249.

[2] IGERE B E, EKUNDAYO T C. Global mapping of cholera *Vibrio* and outbreaks in the pre-millennium development goals (MDG)/sustainable development goals (SDG) and MDGs/SDGs era of 1990-2019 [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104319.

[3] 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].咸阳:西北农业科技大学,2018.

[4] 刘海霞,李雪,张铭琰,等.辽宁省食源性副溶血性弧菌毒力基因、血清分型及耐药性分析[J].*中国微生态学杂志*,2022,34(3): 284-288.

[5] CAMPÀS M, LEONARDO S, FERRÉ-GODE A, et al. Duplex electrochemical biosensor for the detection of the *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters [J]. *Food Control*, 2023, 149: 109689.

[6] CHEN B W, HUANG J M, LI H H, et al. Eradication of planktonic and its sessile biofilm by curcumin-mediated photodynamic inactivation [J]. *Food Control*, 2020, 113: 107181.

[7] MAI-HOANG T-D, TIEN H-L, CHAU-HOANG H-M, et al. A novel PCR method for simultaneously detecting acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and mutant-AHPND in shrimp [J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736336.

[8] ZHANG L Y, TIAN B, HUANG Y H, et al. Classification and prediction of *Klebsiella pneumoniae* strains with different MLST allelic profiles via SERS spectral analysis [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16161.

[9] GONZALEZ-ESCALONA N, JOLLEY K A, REED E, et al. Defining a core genome multilocus sequence typing scheme for the global epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(6): 1682-1697.

[10] LI Y P, LIN G S, PENGSAKUL T, et al. Antibiotic resistance in *Vibrio parahaemolyticus*: mechanisms, dissemination, and global public health challenges-a comprehensive review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2025, 17(1): 13010.

[11] 中华人民共和国食品安全国家标准审评委员会.GB 4789.7-2013

- 食品微生物检验副溶血性弧菌检验[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [12] CHEN M, GUO D, WONG H C, et al. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(2): 122-129.
- [13] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 215-225.
- [14] WONG S K, ZHANG X H, WOO N Y S. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes [J]. Aquaculture, 2012, 330: 29-36.
- [15] KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [16] SIRIKHARIN R, TAENGCHAIYAPHUM S, SANGUANRUT P, et al. Characterization and PCR detection of binary, *pir*-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp [J]. Public Library of Science ONE, 2015, 10(5): e0126987.
- [17] JOLLEY K A, CHAN M S, MAIDEN M C. mlstdbNet-distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases [J]. BMC Bioinformatics, 2004, 5: 86.
- [18] 刘建军,刘单阳,李达容,等.上海市养殖水产品中副溶血性弧菌的流行、毒力及耐药性分析[J].食品与发酵工业,2023, 49(4):250-257.
- [19] 范秋华,刘坚基,连宪强,等.深圳市大鹏新区近岸海水副溶血性弧菌污染状况及耐药性分析[J].现代疾病预防控制,2024, 35(2):122-130.
- [20] SIDDIQUE A B, MONIRUZZAMAN M, ALI S, et al. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish aquaculture of the southwest coastal area of Bangladesh [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 635539.
- [21] SONG Z, CHEN L, TANG S, et al. Effects of low-salt stress on biological characteristics and transcriptomic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 430: 111047.
- [22] NARAYANAN S V, JOSEPH T C, PEERALIL S, et al. Prevalence, virulence characterization, AMR pattern and genetic relatedness of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from retail seafood of Kerala, India [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 592.
- [23] LIAN X Q, LIU G D, HUANG M F, et al. Antimicrobial resistance, virulence factors and phylogenetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in the eastern coast of Shenzhen [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1452942.
- [24] 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.
- [25] 尤祯丹.成都市售常见水产品中副溶血性弧菌的污染情况、耐药性及MLST分型研究[D].成都:四川农业大学,2020.
- [26] CHANGSEN C, LIKHITRATTANAPISAL S, LUNHA K, et al. Incidence, genetic diversity, and antimicrobial resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Bangkok and eastern Thailand [J]. PeerJ, 2023, 11: e15283.
- [27] MOK J S, CHO S R, PARK Y J, et al. Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast [J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 171: 112785.
- [28] ZHANG F, ZHANG J, LIN G, et al. Antibiotic resistance and genetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ningde regions [J]. Microorganisms, 2024, 12(1): 152.
- [29] 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.
- [30] YANG S, WANG H, ZHAO D, et al. Polymyxins: recent advances and challenges [J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1424765.