

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170222001

http://www.yykxjz.cn/

贾丹, 史成银, 黄捷, 张庆利, 万晓媛, 许华, 刘冉阳, 王海波, 郭程程, 谢国驹. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103-111

Jia D, Shi CY, Huang J, Zhang QL, Wan XY, Xu H, Liu RY, Wang HB, Guo CC, Xie GS. Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 103-111

凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原 分离鉴定及其致病性分析*

贾 丹^{1,2} 史成银^{1,3} 黄 捷^{1,3} 张庆利^{1,3} 万晓媛^{1,3}
许 华^{1,3} 刘冉阳^{1,2} 王海波^{1,2} 郭程程¹ 谢国驹^{1,3①}

(1. 农业部海水养殖病害防治重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究从患急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺中分离到一株优势菌, 编号为 20160303005-1, 通过 16S rRNA 和分子伴侣蛋白 *groEL* 基因序列分析, 并结合生理生化特征, 将该细菌鉴定为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 其血清型为 O1:KUT(K untypeable)。基因分析结果显示, 该菌株携带可引起对虾 AHPND 的相关毒力蛋白基因 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}*, 但不携带副溶血弧菌临床菌株毒力基因: 耐热直接溶血毒素(Thermostable direct hemolysin, *tdh*)和相对耐热直接溶血毒素(TDH-related hemolysin, *trh*)基因。菌株对凡纳滨对虾具有较强的致病性, 浸泡感染的半数致死剂量(LD₅₀)为 7.96×10^3 CFU/ml。对虾急性感染后, 6 h 肝胰腺颜色变浅, 肠胃变空; 9 h 肝胰腺呈浅白色, 萎缩变小。9 h 死亡数过半, 24 h 全部死亡。组织病理学分析显示, 感染后对虾肝胰腺小管崩塌, 上皮细胞严重脱落, 呈现出典型的 AHPND 病理症状。药敏实验结果显示, 该菌对庆大霉素、环丙沙星和头孢他啶等 16 种药物敏感, 对阿莫西林、替卡西林和头孢噻吩等 5 种药物表现为耐药。上述研究可为该病原的流行病学及药物防控研究提供基本数据。

关键词 凡纳滨对虾; 急性肝胰腺坏死病; 副溶血弧菌; 细菌鉴定

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0103-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)作为优良的 主要的养殖虾类, 在我国渔业经济中占有重要地位。
养殖品种, 20 世纪 80 年代引入我国, 现已成为我国 2015 年该品种养殖产量达 162.5 万 t, 占我国对虾总

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)、现代农业产业技术体系(CARS-48)、山东省泰山学者建设工程专项(S41201203)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002), the Scientific and Technological Innovation Project Financially supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), China Agriculture Research System (CARS-48), and Construction Programme for "Taishan Scholarship" of Shandong Province of China (S41201203)]. 贾 丹, E-mail: jiadandc@163.com

①通讯作者: 谢国驹, E-mail: xiegs@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-22, 收修改稿日期: 2017-04-16

产量的 80%以上(农业部渔业渔政管理局, 2016)。但同其他经济水生养殖动物一样, 各类疫病频发的现状已严重威胁到包括凡纳滨对虾在内的对虾养殖业的可持续发展(Flegel, 2012; Thitamadee *et al.*, 2016)。

2010 年以来, 早期死亡综合症(Early mortality syndrome, EMS)/急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)在全球虾类主要养殖地区肆虐, 给越南、中国、马来西亚、泰国、墨西哥和菲律宾等国对虾产业带来巨大损失(Tran *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Dabu *et al.*, 2017; de la Peña *et al.*, 2015; Kongrueng *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015)。该疫病因在早期(投苗 30 d 左右)引起虾苗不寻常的高死亡率而被称之为 EMS。2012 年 8 月, 亚太水产养殖中心网络(NACA, 2012)针对感染该疫病的对虾肝胰腺盲管从中段到末端进行性变性, B、F 和 R 细胞功能紊乱, 部分细胞核膨大, 肝胰腺盲管上皮细胞坏死或脱落, 在后期肝胰腺盲管间或盲管内血细胞浸润, 肝胰腺被细菌二次感染等组织病理学特征, 正式命名该疫病为 AHPND, 以区别也可引起对虾早期死亡的其他疾病, 但在该会上并未确定该疫病的致病原因。世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, OIE)当前给出的 AHPND 定义也是参照上述的研究结果。目前认为对虾 AHPND 是由部分致病性弧菌所引起的, 这些弧菌均携带着编码毒力蛋白 Pir^{VP} 的质粒。已报道的可引起对虾 AHPND 的弧菌种类包括副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、欧文斯氏弧菌(*Vibrio owensii*)和坎贝氏弧菌(*Vibrio campbellii*) (Lee *et al.*, 2015; Kondo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017)。

2016 年 3 月山东省潍坊市某凡纳滨对虾养殖场下塘 38 d 的虾苗(2~4 cm)出现大规模急性死亡, 发病虾表现为空肠空胃, 肝胰腺颜色变浅或发白, 伴有肌肉轻微浑浊等症状, 与 AHPND 临床特征相似(Tran *et al.*, 2013)。以肝胰腺 DNA 为模板的病原检测中, AHPND 致病相关的 *pirA*^{VP} 和 *pirB*^{VP} 基因的检测结果也呈阳性。以此为基础, 本研究进行疑似 AHPND 感染对虾的细菌病原的分离鉴定及致病性分析, 以期掌握该病原的基本生物学特征, 为虾类 AHPND 病原的流行病学及其药物防控研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验虾

患病凡纳滨对虾于 2016 年 3 月采自山东省潍坊市某养殖场, 体长约为 2~4 cm。健康凡纳滨对虾购自

山东省潍坊市另一养殖场, 平均体长为(3.1±0.2) cm。健康对虾采用室内水箱(60 cm×30 cm×40 cm)养殖, 实验期间, 水温为(28±1)℃, 正常投饵管理, 24 h 充气, 每天吸污、换水 1/2。实验前暂养 1 周。

1.2 细菌分离

用无菌接种环蘸取患病虾肝胰腺样品, 划线接种于添加了 2% NaCl 的 TSA⁺ 固体平板(北京陆桥技术股份有限公司)上, 28℃ 恒温培养, 并对形态一致的优势菌进行纯化, 菌株编号为 20160303005-1。

1.3 菌株的 API-20NE 鉴定

按照 API-20NE 鉴定试剂盒(梅里埃公司)说明书对菌株 20160303005-1 进行鉴定。

1.4 菌株的血清型鉴定

按照血清检测试剂盒(天津生物芯片技术有限公司)说明书, 对纯化的菌株 20160303005-1 进行 O 和 K 抗原血清型鉴定, 该试剂盒含有 O 抗原(13 种单价, 1 种多价)和 K 抗原(65 种单价, 9 种多价)。

1.5 菌株特定基因的 PCR 扩增及测序

以煮沸菌液的上清为模板, 按 Premix Ex Taq Version 2.0(TaKaRa, 大连)说明书, 进行菌株各基因的 PCR 扩增, 包括 16S rRNA、分子伴侣蛋白 *groEL* 基因、与 AHPND 致病相关的 *pirA*^{VP} 和 *pirB*^{VP} 基因、耐热直接溶血毒素基因 *tdh* 和相对耐热直接溶血毒素基因 *trh*。所用引物见表 1。25 μl 的 PCR 反应体系包含 Premix Ex Taq 12.5 μl, 正、反向引物(10 μm/L)各 0.5 μl, 模板 DNA 1 μl, ddH₂O 10.5 μl。扩增条件为 94℃ 预变性 7 min; 94℃ 变性 40 s, 适当温度退火 30 s, 72℃ 延伸一定时间, 30 个循环; 72℃ 温育 10 min。其中, 16S rRNA 基因退火温度为 54℃, 72℃ 延伸 90 s; *groEL* 退火温度为 58℃, 72℃ 延伸 1 min; *pirA*^{VP} 和 *pirB*^{VP} 基因退火温度为 60℃, 72℃ 延伸 30 s。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒(OMEGA, 美国)纯化, 再用 pEASY-T5 克隆载体试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行连接转化。阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。采用 NCBI 中的 BLAST 工具进行核酸序列的比对分析, MEGA7 软件用于基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ 法)的 *groEL* 基因的系统进化树的构建, 并进行 1000 次的 Bootstraps 重复检验。

1.6 对虾急性感染实验及组织病理分析

健康凡纳滨对虾随机分成 3 个组(感染组、对照

表 1 本实验所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

基因 Target gene	引物名称 Primer Name	引物序列 Sequence (5'~3')	产物大小 Amplicon size (bp)	参考文献 Reference
16S rRNA	27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGCTACCTTGTTACGACTT	1465	-
<i>groEL</i>	GroEL-F GroEL-R	AGGTCAGGCTAAGCGCGTAAGC GTCACCGTATTACCCGTCGCT	510	(Hossain <i>et al.</i> , 2012)
<i>pirA^{VP}</i>	PirA-F PirA-R	TGACTATTCTCACGATTGGACTG CACGACTAGCGCCATTGTTA	284	(Han <i>et al.</i> , 2015)
<i>pirB^{VP}</i>	PirB-F PirB-R	TGATGAAGTGATGGGTGCTC TGTAAGCGCCGTTAACTCA	392	(Han <i>et al.</i> , 2015)
<i>tdh</i>	Tdh-F Tdh-R	CCCGTTCTGATGAGATATTGT CCACTACCACTCTCATATGCTTCT	404	(Tey <i>et al.</i> , 2015)
<i>trh</i>	Trh-F Trh-R	TCCATACCTTTTCTTCTCCAG GCTCTCATATGCTTCGACATTG	414	(Tey <i>et al.</i> , 2015)

组和空白组), 15 尾/组, 每组设 3 个平行。急性感染参照 Tran 等(2013)的方法。

感染组: 将 400 ml 浓度为 2.01×10^9 CFU/ml 的菌液(含 2% NaCl 的 TSB⁺液体培养基)加入到 3.6 L 海水中, 充气; 将实验对虾放入其中浸浴 15 min 后, 再移入 40 L 添加了 40 ml 浓度为 2.01×10^9 CFU/ml 菌液的海水中, 充气观察。

对照组: 参照感染组, 但养殖海水中仅添加无菌 TSB⁺; 空白组: 对虾放入 40 L 海水中养殖。

取感染组的濒死虾及对照组和空白组虾的肝胰腺、胃、肠及鳃组织, 置于 Davidson's AFA 固定液中, 固定 24 h 后更换为 75%乙醇保存。按常规病理组织学方法制备石蜡切片, HE 染色, 镜检观察。

1.7 菌株的致病力分析

健康凡纳滨对虾随机分成 7 个组(6 个感染组和 1 个对照组), 12 尾/组, 每组设 3 个平行。

感染组: 将 1.64×10^9 CFU/ml 浓度的菌液离心并重悬于海水中, 再 10 倍梯度稀释为 $1.64 \times 10^2 \sim 1.64 \times 10^7$ CFU/ml 的 6 个梯度。

对照组: 对虾放入不含有菌液的海水中养殖。实验期间, 对虾正常饲养管理, 每天换水量为总水体的 1/2, 并相应补充菌液以维持海水中原菌液浓度。连续观察 7 d, 记录对虾死亡情况。根据不同细菌浓度浸泡下的实验虾的累积死亡数进行细菌致病力评估, 采用 Reed 等(1938)方法计算 LD₅₀。

实验期间, 随机取 18 尾濒死虾的肝胰腺, 接种于 TSA⁺平板, 用其分离菌株为模板, 进行 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因的 PCR 检测分析。

1.8 菌株的药敏性分析

按照 ATB G-5 肠细菌药敏试剂盒(梅里埃公司)

说明书, 进行菌株的药物敏感性分析, 该试剂盒含有阿莫西林等 21 种药物。

2 结果

2.1 菌株 20160303005-1 的 API-20NE 鉴定及理化特征

API-20NE 鉴定系统对菌株的理化指标检测结果如表 2 所示, 该鉴定结果显示, 菌株 20160303005-1 为副溶血弧菌, 其鉴定百分率值为 99.1%。

2.2 细菌 16S rRNA 和 *groEL* 基因序列分析

基于 16S rRNA 基因序列分析结果显示, 20160303005-1 株属于弧菌属, 与副溶血弧菌、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)等弧菌的相似度超过 99%, 但其菌种无法确定。进一步对 *groEL* 基因进行序列分析, 所构建系统进化树显示, 该菌株与副溶血弧菌聚为一支(图 1)。上述结果再结合菌株的理化特征, 将该分离菌株鉴定为副溶血弧菌。

2.3 菌株的血清型鉴定结果

血清试剂盒检测结果显示, 菌株 20160303005-1 的 O 抗原为 O1 型, 但其 K 抗原不属于检测试剂盒的 65 种 K 抗原中的任何一种, 即为不可分型(Untypeable)类, 也即该菌株血清型为 O1:KUT(K untypeable)。

2.4 致病基因的 PCR 扩增

PCR 检测结果显示, 菌株 20160303005-1 的 AHPND 相关毒力蛋白 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因的 PCR 扩增结果均为阳性(图 2), 其 PCR 扩增产物的核酸测序结果也与 Han 等(2015)研究中的相应序列完全一致(GenBank No. BAVF00000000.1); 副溶血弧菌的临床致病基因 *tdh* 和 *trh* 基因的 PCR 扩增结果均为阴性。

表 2 菌株 20160303005-1 的理化特征

Tab.2 Phenotypic characteristics of isolated 20160303005-1

生化项目 Biochemical item	结果 Result	生化项目 Biochemical item	结果 Result
d-甘露醇同化 MANa	+	己二酸盐同化 ADIa	-
阿拉伯糖同化 ARAa	+	癸酸盐同化 CAPa	-
柠檬酸盐同化 CITa	-	七叶灵(水解)ESC	-
明胶 GEL	+	d-葡萄糖 GLU	+
d-葡萄糖同化 GLUa	+	精氨酸双水解酶 ADH	-
d-麦芽糖同化 MALa	+	尿素酶 URE	-
苹果酸盐同化 MLGa	+	d-甘露糖同化 MNEa	+
N-乙酰葡萄糖胺同化 NAGa	+	硝酸盐还原 NO ₃	+
氧化酶 OX	+	苯乙酸盐同化 PACa	-
P-硝基苯-β-D-半乳糖苷酶 PNPG	+	吡啶 TRP	+
d-龙胆二糖同化 GNTa	+		

+：阳性；-：阴性
 +: Positive; -: Negative

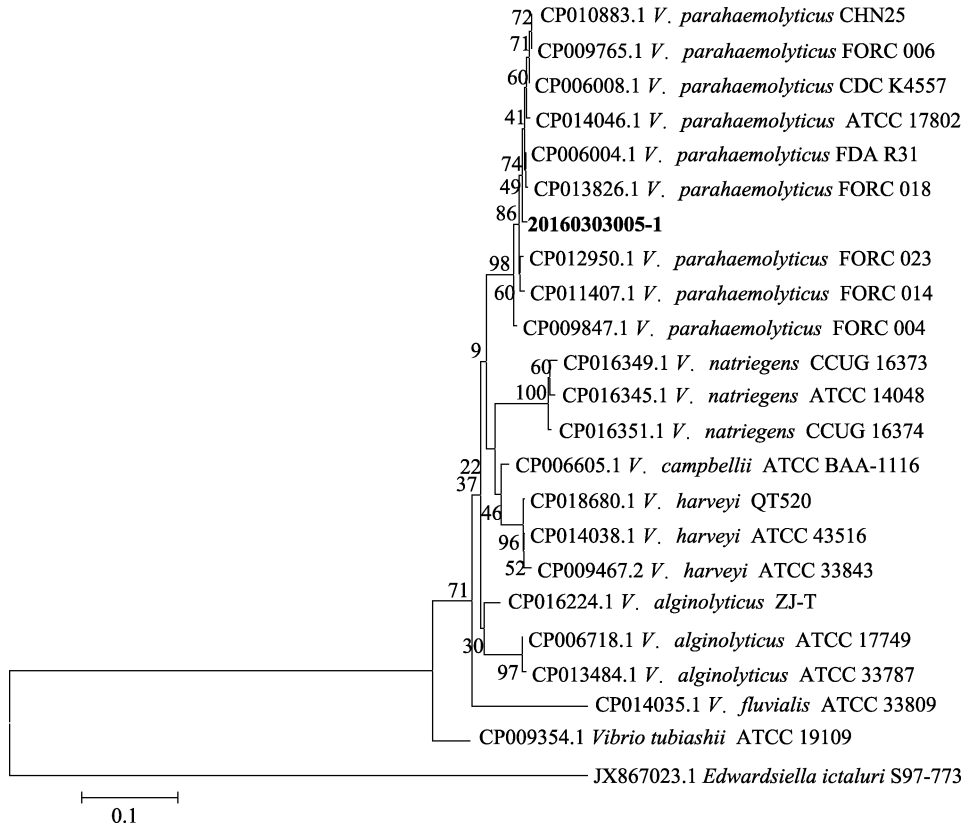


图 1 基于 Neighbor-Joining 方法的 *groEL* 基因系统进化树

Fig.1 The phylogenetic tree based on *groEL* gene sequences using the neighbour-joining method 1000 次的 Bootstraps 重复检验，比例尺代表遗传距离 1000 bootstrap replicates, and scale bars represented distance values

2.5 对虾急性感染及其病理分析

急性感染的凡纳滨对虾，感染后 3 h 没有明显症状，但个别对虾开始死亡；6 h 对虾出现空肠空胃，肝胰腺颜色变浅，死亡虾增多；9 h 对虾肝胰腺呈浅

白色并萎缩变小(图 3A)，死亡数过半；12 h 对虾整个身体几近透明，部分对虾甲壳变软；甲壳变软症状在 18 h 更为明显，24 h 对虾死亡率达到 100%。而对照组对虾(图 3B)摄食正常，活力良好，无死亡。

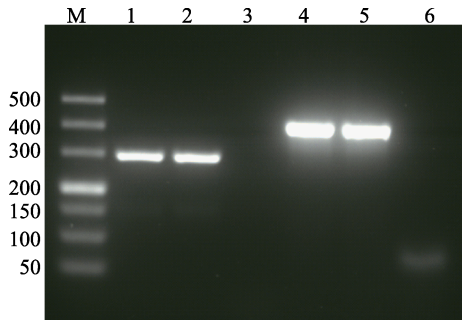


图 2 菌株 20160303005-1 的 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR screening results of *pirA^{VP}* and *pirB^{VP}* genes from the isolated strain 20160303005-1

M: Marker DL500;泳道 1~3 和 4~6 为分别用 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因的引物的扩增产物。泳道 1, 2, 4 和 5 以菌液为模板, 泳道 3 和 6 为阴性对照

M: Marker DL500. Lanes 1~3 and 4~6: PCR amplification used the primers of *pirA^{VP}* and *pirB^{VP}* gene, respectively. Lanes 1, 2, 4 and 5: Boiled cells were used as templates for PCR amplification. Lanes 3 and 6: Negative control



图 3 感染 20160303005-1 组与对照组凡纳滨对虾
Fig.3 The shrimp infected by the isolated strain 20160303005-1 and normal *L. vannamei*

A: 感染组虾(感染 9 h); B: 对照组虾

A: 20160303005-1 infected shrimp (9 h post-challenged); B: Normal shrimp in the control group

对感染后 12 h 的濒死虾进行组织病理切片观察, 与对照组(图 4A)相比, 感染组凡纳滨对虾的肝胰腺小管上皮细胞严重萎缩, 大量坏死、脱落, 导致肝胰腺小管变薄、崩塌(图 4B), 呈典型的 AHPND 病理特征。

2.6 菌株 20160303005-1 的致病力分析

用菌株 20160303005-1 浸泡感染凡纳滨对虾, 各组的 7 天累积死亡情况如图 5 所示, 经计算, 其 LD_{50} 值为 7.96×10^3 CFU/ml。以随机所取 18 尾濒死虾肝胰腺中分离的细菌为模板, *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因的 PCR 扩增结果均为阳性, 该结果提示对虾死于该病原感染。实验期间, 对照组对虾正常无死亡。

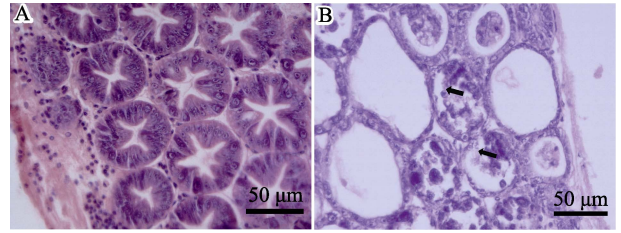


图 4 凡纳滨对虾的肝胰腺 HE 染色组织切片观察

Fig.4 HE-stained histological sections of the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 对照组; B: AHPND 特征感染组(浸泡 12 h 后), 箭头表示脱落的肝胰腺小管上皮细胞

A: Normal shrimp from the control group; B: Infected shrimp with the lesions characteristic of AHPND from the immersion treatments at 12 h post-challenged. Necrotic sloughing of hepatopancreas (HP) tubule epithelial cells (arrows) are shown in the HP tubule lumens

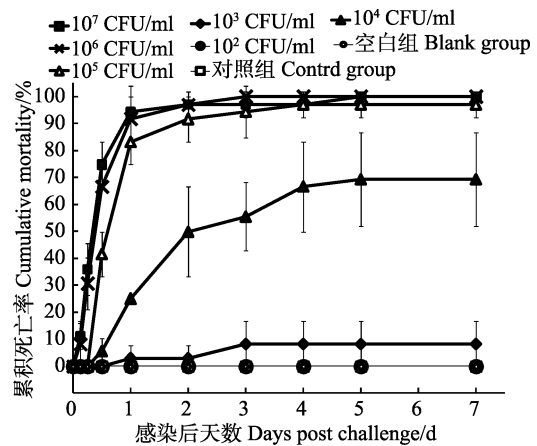


图 5 实验各组的累积死亡率(平均数±标准差)

Fig.5 The cumulative mortality of *L. vannamei* in different treatments (Mean±SD)

2.7 菌株 20160303005-1 的药物敏感性

菌株 20160303005-1 的药敏结果见表 3。从表 3 可以看出, 菌株 20160303005-1 对庆大霉素、环丙沙星等 16 种药物敏感, 但对阿莫西林、替卡西林、头孢噻吩、头孢呋辛、复方新诺明这 5 种药物表现为耐药。

3 讨论

AHPND 是近年来导致全球对虾养殖大规模减产的重要病害之一, 对其疫病病原的准确鉴定是进行后续病原防控的基础。本研究从疑似患 AHPND 临床症状的凡纳滨对虾中分离得到一株细菌, 传统及分子鉴定的方法确定了该菌株为副溶血弧菌。鉴定中所选择的 *groEL* 基因的聚类分析结果也证实了该基因具有

表 3 菌株 20160303005-1 的药物敏感性
Tab.3 Antimicrobial susceptibility testing of isolated 20160303005-1

抗菌药物 Antibiotics	MIC	敏感度 Susceptibility	抗菌药物 Antibiotics	MIC	敏感度 Susceptibility
阿莫西林 AMO/Penicill.gr.A	>16	R	阿莫西林/克拉维酸 Amoxic./Clavsre	≤8	S
哌拉西林 PIC/Ureidopen.	≤16	S	哌拉西林/他唑巴坦 Piper/tazobactam	≤16	S
替卡西林 Ticarcillin	>16	R	替卡西林/克拉维酸 Ticarc/Clavsre	≤16	S
头孢噻吩 CFT/Cefalo. 1g	>8	R	头孢西丁 Cefoxitin	≤8	S
头孢噻肟 CTX/Cefalo. 3g	≤8	S	头孢他啶 Ceftazidim	≤8	S
头孢吡肟 Cefepim	≤8	S	头孢呋辛 Cefuroxim	>8	R
美洛培南 Meropenem	≤4	S	亚胺培南 Imipenem	≤4	S
头孢他啶 1 Ceftazidim 1	≤1	S	复方新诺明 Cotrimoxazol	>2	R
妥布霉素 Tobramycin	≤4	S	阿米卡星 Amikacin	≤16	S
庆大霉素 Gentamicin	≤4	S	奈替米星 Netilmicin	≤8	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	≤1	S			

S: 敏感; R: 耐药

S: Sensitive; R: Resistant

普遍性、保守性及种间变异性的优点,可作为弧菌属细菌分子鉴定的靶基因(Hossain *et al*, 2012; Hossain *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2016)。

病原菌的血清学特征可为流行病学调查及临床用药提供参考。目前,国际上副溶血弧菌多采用基于 13 种 O 抗原(菌体抗原)和 71 种 K 抗原(荚膜抗原)的血清型分型系统(Ishibashi *et al*, 2000)。我国临床副溶血弧菌的血清型主要为 O3:K6、O4:K8、O4:K68 和 O1:K36 等,而水产品中分离的副溶血弧菌主要为 O2、O1 和 O11 型等,基于 K 抗原自身的多样性,以及抗原检测方法多是依据临床菌株的原因,目前水产品中副溶血弧菌的 K 抗原很多都无法定型(K untypeable, KUT)(Chen *et al*, 2016; Xu *et al*, 2016)。本研究分离到的菌株 20160303005-1 的血清型为 O1:KUT,这与 Kongrueng 等(2015)报道的可引起 AHPND 的副溶血弧菌泰国株的血清型一致。目前,我们正对近 4 年全国虾类流行病学调查中收集到的 100 多株副溶血弧菌的血清型进行分类鉴定工作,以期找到我国虾类副溶血弧菌致病株的血清型特征。

作为一种食源性致病菌,国内外均有副溶血弧菌引起食物中毒的报道。*tdh* 和 *trh* 基因作为该病原的重要毒力分子标志基因,常用于人源副溶血弧菌致病菌的分子检测中(Honda *et al*, 1988)。目前包括本研究在内,国内水产品源副溶血弧菌的 *tdh* 和 *thr* 基因检测结果均为阴性。但国外已有虾源副溶血弧菌的 *tdh* 和 *thr* 基因检测结果为阳性的报道(Sujeewa *et al*, 2009;

Rahimi *et al*, 2010),应当引起我国水产品质量监测部门的关注。

本研究分离到的副溶血弧菌菌株 20160303005-1 对凡纳滨对虾具有较强的致病力,浸泡感染实验中的 LD₅₀ 为 7.96×10³ CFU/ml。当菌液浓度为 1.64×10³ CFU/ml 时,对虾开始出现死亡,且死亡率随着菌液浓度的提高而显著增加,当菌液浓度达到 1.64×10⁶ CFU/ml 时,实验虾在感染第 5 天即达到 100%的死亡率,这与 Joshi(2014)和 Soto-Rodriguez 等(2015)的研究结果相似,即副溶血弧菌细菌剂量与对虾死亡率具有相关性,只有当致病副溶血弧菌浓度达到一定值时,才会导致对虾发病死亡。AHPND 感染虾表现有明显的空肠空胃,肝胰腺发白等特征,病理学观察结果证实,该菌株可引起凡纳滨对虾的 AHPND 典型症状,诸如肝胰腺小管崩塌,上皮细胞严重脱落等(Tran *et al*, 2013; Joshi *et al*, 2014; Soto-Rodriguez *et al*, 2015)。Joshi 等(2014)报道的该菌株 AP2 引物(http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?Publication_id=1128)的检测结果为阳性,但该病原感染凡纳滨对虾后,不引起 AHPND 的肝胰腺小管上皮细胞严重坏死病变,却可引起小管上皮细胞的崩解,并在 E 细胞中形成特有的大量空泡等特征。提示 OIE 目前关于 AHPND 病理特征的界定尚待进一步明确。

目前,对虾 AHPND 的产生机制是本领域的研究热点。Lee 等(2015)研究发现,VP-AHPND 中均含有一个约 69 kb 的质粒,该质粒中携带有产生 AHPND

的2个相关毒力蛋白的 *pirA^{VP}* 和 *pirB^{VP}* 基因, 蛋白结构及信息学分析发现, 尽管2个蛋白与昆虫致病菌苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)分泌的1种Cry毒素蛋白(Cry insecticidal toxin-like protein)的基因序列同源性很低(<10%), 但却在结构上十分相似, 提示两菌株间可能存在一定的关联性。Lee (2015)还发现, 用重组表达的 *PirA^{VP}*+*PirB^{VP}* 及 *PirB^{VP}* 蛋白均可引起AHPND的症状, 据此推测 *pirB^{VP}* 可能是引起AHPND的主要致病基因。Lai 等(2015)采用免疫印渍法(Western blotting)和酶联免疫吸附实验(ELISA)的方法进行了VP-AHPND致病蛋白在对虾各组织的定位分析及病理学研究, 其结果也提示了该病原的单独的 *PirB^{VP}* 蛋白也可引起感染对虾AHPND的病理症状。不同于上述的 *Pir* 蛋白与AHPND直接相关的结果, Joshi 等(2014)研究发现, 携带该质粒却产生不同于AHPND典型病理特征的弧菌。因此, 该2种 *Pir* 蛋白在AHPND的产生机制及致病中作用还有待深入研究。携带 *Pir^{VP}* 基因的质粒也存在水平转移的可能, 继引起AHPND的副溶血弧菌报道之后, 哈维氏弧菌、欧文斯氏弧菌和坎贝氏弧菌均带有该质粒的事实也提示了这种水平转移存在的可能性(Lee *et al.*, 2015; Kondo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017), 阐释该质粒/*Pir* 致病基因的致病及其水平转移的机制, 可为该病原的防控提供理论依据。

本研究分离菌株对阿莫西林等5种药物表现为耐药特征, 较国内外副溶血弧菌不同株耐药谱不尽一致的结果, 应主要与菌株分离来源及抗生素药物使用等因素有关, 其中抗生素使用所造成的选择压力也客观上促进了耐药菌株的产生(Lai *et al.*, 2015; Elmahdi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Bennett, 2008; Freel *et al.*, 2013)。本研究分离的耐药菌株的结果也再次提醒当前水产菌株耐药及食品安全等问题的严重性。近年来, 通过生物安保来实现动物疫病的预防与控制的目的已为健康养殖业所接受, 联合国粮食及农业组织(FAO)和世界动物卫生组织(OIE)对生物安保的定义是为了降低病原对水产养殖系统的传入、定植和扩散的风险, 在管理、技术和设施上执行的一整套措施(FAO 渔业委员会水产养殖分委员会, 2010; OIE, 2015)。黄健研究团队在OIE和国内生物安保概念的发展和应用推广中做出了引领性的工作, 该理念所提倡的包括疫病防控在内的与水产养殖健康相关的各种措施的集成来保障水生生物的健康养殖(黄健等, 2016), 有望克服当前水产养殖业中, 因针对各类病害被动防控的药物使用, 所带来的诸如食品安全、环境恶化及耐药菌株等系列问题。相信水产生物安

保的推广实施, 可有效保障我国水产健康养殖业的可持续发展, 也应成为今后水产养殖业健康发展的理论基础。

参 考 文 献

- Ahmed R, Rafiqzaman SM, Hossain MT, *et al.* Species-specific detection of *Vibrio alginolyticus* in shellfish and shrimp by real-time PCR using the *groEL* gene. *Aquaculture International*, 2016, 24(1): 157–170
- Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(S1): S347–S357
- Bureau of Fisheries and Fisheries Law Enforcement, Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2016, 28, 30, 71 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016, 28, 30, 71]
- Chen Y, Chen X, Yu F, *et al.* Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(3): 258(e9–e16)
- COFI Sub-committee on Aquaculture. Aquatic biosecurity: A key for sustainable aquaculture development. Phuket: CoFI Sub-Committee on Aquaculture, 2010 [FAO 渔业委员会水产养殖分委员会. 水生生物安保: 可持续水产养殖发展的一个关键. 普吉: FAO 渔业委员会水产养殖分委员会, 2010]
- Dabu IM, Lim JJ, Arabit PMT, *et al.* The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquaculture Research*, 2017, 48(3): 792–7998
- de la Peña LD, Cabillon NA, Catedral DD, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 116(3): 251–254
- Dong X, Wang HL, Xie GS, *et al.* An isolate *Vibrio campbellii* carrying the *pir^{VP}* gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes and Infections*, 2017, 6(1): e2
- Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 2016, 57: 128–134
- Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 166–173
- Freel KC, Millán-Aguñaga N, Jensen PR. Multilocus sequence typing reveals evidence of homologous recombination linked to antibiotic resistance in the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5997–6005

- Han JE, Tang KF, Tran LH, *et al.* Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33–40
- Honda T, Yuxin NI, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 1988, 56(4): 961–965.
- Hossain MT, Kim EY, Kim YR, *et al.* Application of *groEL* gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(1): 67–72
- Hossain MT, Kim EY, Kim YR, *et al.* Development of a *groEL* gene-based species-specific multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(2): 448–456
- Huang J, Zeng LB, Dong X, *et al.* Trend analysis and policy recommendation on aquatic biosecurity in China. *Engineering Sciences*, 2016, 18(3): 15–21 [黄健, 曾令兵, 董宣, 等. 水产生物安保发展趋势与政策建议. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 15–21]
- Ishibashi M, Ohta K, Shimada T, *et al.* Current status of OK serotype combinations of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 2000, 55: 539–541
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 2014, 428–429: 297–302
- Kondo H, Van PT, Dang LT *et al.* Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): e00978–15
- Kongrueng J, Yingkajorn M, Bunpa S, *et al.* Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(11): 957–966
- Lai HC, Ng TH, Ando M, *et al.* Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006–1014
- Lee CT, Chen IT, Yang YT, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- Liu LY, Xiao JZ, Xia XM, *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01395–15
- NACA. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). 2012
- Nunan L, Lightner D, Pantoja C, *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 81–86
- Rahimi E, Ameri M, Doosti A, *et al.* Occurrence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in shrimp in Iran. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(9): 1107–1111
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27(3): 493–497
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689–1699
- Sujeewa AKW, Norrakiah AS, Laina M. Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research Journal*, 2009, 16: 89–95
- Tey YH, Jong KJ, Fen SY, *et al.* Genetic variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquacultural environments. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(4): 321–327
- Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 2016, 452: 69–87
- Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45–55
- World Organization for Animal Health (OIE). Aquatic animal health code. Paris: OIE, 2015
- Xu X, Cheng J, Wu Q, *et al.* Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail aquatic products in North China. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 32–41

Identification and Pathogenicity Analysis of Bacterial Pathogen Associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in the Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei*

JIA Dan^{1,2}, SHI Chengyin^{1,3}, HUANG Jie^{1,3}, ZHANG Qingli^{1,3}, WAN Xiaoyuan^{1,3}, XU Hua^{1,3},
LIU Ranyang^{1,2}, WANG Haibo^{1,2}, GUO Chengcheng¹, XIE Guosi^{1,3}①

(1. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is an emerging shrimp disease causing great losses for the shrimp culture industry worldwide since 2010. In the present study, a bacterial strain 20160303005-1 was isolated from the hepatopancreas tissue of *Litopenaeus vannamei* with early mortality syndrome (EMS), and was identified as *Vibrio parahaemolyticus* based on its physiological and biochemical characteristics; and the analysis of both 16S rRNA and *groEL* gene sequence. The serotype of the bacterium is O1:KUT (K untypeable). It revealed positive amplification of the genes *pirA^{VP}* and *pirB^{VP}* which is related to cause AHPND in a virulence plasmid harboring this strain. However, the isolate examined showed negative amplification results for the virulent clinical *V. parahaemolyticus* strain markers—thermostable direct hemolysin gene *tdh* and TDH-related hemolysin gene *trh*. The immersion challenge test with *L. vannamei* was also employed to study pathogenicity and histopathology. The results showed that the isolate was highly virulent, with a median lethal dose (LD₅₀) value of 7.96×10^3 CFU/ml. The empty gut in shrimp was observed at 6 h post-challenged. The hepatopancreas appeared pale and atrophic at 9 h. More than half of the shrimps died at 12 h, and up to 100% died at 24 h. Subsequent histological analyses showed that the hepatopancreas tubules collapsed with massive sloughing of hepatopancreas epithelial cells, which was the typical pathological characteristics of AHPND. Among 21 antibiotics tested, the isolate was resistant to amoxicillin, cefalotin, ticarcillin, cefuroxime, and cotrimoxazol; however, it was sensitive to gentamicin, ciprofloxacin, and other 14 antibiotics tested. These results provide basic data for epidemiology and drug control research on *V. parahaemolyticus* in aquaculture.

Key words *Litopenaeus vannamei*; AHPND; *Vibrio parahaemolyticus*; Bacterial identification

① Corresponding author: XIE Guosi, E-mail: xiegs@ysfri.ac.cn