

浙江省患病凡纳对虾副溶血弧菌的分离、鉴定及毒力基因分析

方 磊¹, 石 坚^{1,2}, 夏武强³, 张 鑫¹, 孟庆珍¹, 陈铁枫^{1,2}, 徐锦余², 钱 冬^{1*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 杭州三合创新科技有限公司, 浙江 杭州 310020;

3. 象山县海洋与渔业局质量技术检测中心, 浙江 象山 315700)

摘要: 对浙江省发病凡纳对虾进行了弧菌分离、鉴定, 对分离菌株进行了 API-20E 生化鉴定, 不耐热毒素基因 *tlh*、致病基因 *tdh*、*trh* 和毒力基因 *pir* 的 PCR 检测, 以及高致病性副溶血弧菌对小鼠致病性研究结果显示, 150 个分离菌株中共检出 *tlh* 基因菌株 61 株(40.67%), *ap* 阳性菌株 21 株(14.00%); 189 个固定样品中检出副溶血弧菌阳性样品 108 个(57.14%), *ap* 阳性样品 24 个(12.70%); 所有 *tlh* 阳性样品中均未检出 *tdh*、*trh* 毒力基因; *ap* 阳性副溶血弧菌灌胃小鼠死亡率为 20%, 且其培养上清液有弱溶血效价。表明副溶血弧菌在浙江省凡纳对虾弧菌感染中占有重要地位, 高致病性副溶血弧菌在副溶血弧菌中占较高比例, *ap* 阳性副溶血弧菌对小鼠具有一定毒力和溶血性。

关键词: 副溶血弧菌; 分离和鉴定; 毒力基因; 凡纳对虾

中图分类号: P735

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 01-0029-06

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)通称南美白对虾, 是我国主要的养殖虾类。近年来养殖的凡纳对虾受到白斑综合征^[1-2]、传染性皮下和造血组织坏死病^[3-4]、弧菌病、偷死病^[5]、肠胞虫病^[6]和早死综合征等多种疾病的危害, 造成严重的经济损失。早死综合征又称急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND), 是近年来危害凡纳对虾最为严重的疾病, 常发生于 30~40 日龄养殖凡纳对虾, 主要由携带发光杆菌杀虫毒素基因(*Photorhabdus* insect-related toxin, *pir*)的高致病性副溶血弧菌引起。高致病性副溶血弧菌为副溶血弧菌的一种, 是含有 *PIR* 毒素基因的质粒^[7], 对凡纳对虾具有较强毒力, 因此设计 *ap* 引物(AHPND primer, *ap*)用于 *pir* 基因的检测。

副溶血弧菌是凡纳对虾养殖中较为普遍的弧菌病病原, 可在不良的环境条件下引起凡纳对虾的发病和死亡, 同时也是人重要的食源性致病菌, 可引起急性肠胃炎或经伤口感染传播, 严重时

引起败血病^[8]。副溶血弧菌的 *tlh* 基因是种特异性基因, 可编码产生不耐热性溶血素(Thermolabile Hemolysin, TLH)。耐热性直接溶血素(Thermostable Direct Hemolysin, TDH)的 *tdh* 基因和 TDH 相关溶血素(TDH related hemolysin, TRH)的 *trh* 基因是副溶血弧菌引起急性肠胃炎的致病基因^[9]。携带 *tdh* 基因的副溶血弧菌具有溶血性、肠毒性、细胞毒性和心脏毒性, 可引起小鼠发病致死^[10]。

为了解患病凡纳对虾副溶血弧菌的感染, 本研究对浙江省 2014~2015 年间发病凡纳对虾样品进行了副溶血弧菌和高致病性副溶血弧菌的分离、鉴定。对分离到的弧菌菌株进行了 *tlh*、*tdh*、*trh*、*pir* 的毒力基因检测, 对其中两株 *ap* 阳性菌株进行了小鼠毒力研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2014~2015 年采集于浙江宁波、台州、嘉兴和

收稿日期: 2016-04-08。

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益技术研究农业项目(2013C32SA1G0002); 宁波市科技富民强县项目(2016C10049)。

第一作者: 方磊(1991-), 男, 浙江浦江人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水生动物病害。E-mail: 420219351@qq.com

*通信作者: 钱冬(1963-), 男, 浙江嵊州人, 研究员, 主要研究方向: 水生动物病害。E-mail: qiandong@nbu.edu.cn

绍兴等地的患病凡纳对虾样品以及发病时养殖池水样,置冰盒中 3 h 内运至实验室。革兰染液、氧化酶试纸、葡萄糖氧化发酵(O/F)管等生化试剂购自杭州天和微生物试剂有限公司;梅里埃 API-20E 细菌鉴定条购自杭州怡丹生物技术有限公司;虾组织 DNA 提取试剂盒 SH09-D 购自杭州三合科技有限公司;实验相关引物购自上海英俊生物技术有限公司;TCBS^[11]、营养琼脂培养基和营养肉汤培养基购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 病虾样品的弧菌分离和固定样品的制备

(1)病虾样品的弧菌分离。采集患病凡纳对虾样品,剥离鳃和肝胰腺,用划线分离法将病虾鳃、肝胰腺及养殖水样接种至 TCBS 培养基,置于 28 °C 恒温培养箱中培养 18~24 h。

(2)固定样品的制备。收集病虾样品及水样,添加无水乙醇制成固定样品,寄送至实验室。

1.2.2 分离弧菌的纯化、形态观察和生化鉴定

挑取上述培养 18~24 h 后 TCBS 平板上的蓝绿色单菌落,于 1.5% NaCl 营养琼脂培养基划线、培养。纯化培养 18 h 后将挑取的单菌落进行革兰染色,氧化酶、触酶检测及运动性分析,并用 API-20E 细菌鉴定条进行鉴定^[12]。

API-20E 细菌鉴定过程^[12]:挑取单菌落于 0.85% 无菌生理盐水中打散,吸取 100 μL 菌液涂布于 1.5% NaCl 营养琼脂培养基,28 °C 培养 18 h;刮取菌苔至 0.85% 无菌生理盐水中,涡旋混匀成菌悬液,用麦氏比浊管测量菌悬液浓度,并调节其浓度至 1.5×10^8 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将调好浓度的菌悬液滴入到

API-20E 鉴定条中,加无菌液体石蜡,置于湿盒中,28 °C 孵育 24~48 h,观察、记录结果。用 API 细菌鉴定软件鉴定菌株。

1.2.3 弧菌的主要毒力基因检测

用灭菌牙签挑取培养得到的蓝绿色单菌落菌株进行主要毒力基因检测,副溶血弧菌的主要毒力基因(tlh、tdh、trh)和高致病性副溶血弧菌的毒力基因(pir)的 PCR 引物及反应条件见表 1。

取单菌落菌株,加 100 μL 无菌水涡旋混匀,99 °C 金属浴加热 10 min,冰浴 5 min,8 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液作为 DNA 模板,进行 PCR 扩增实验。

PCR 反应于 50 μL 体系中进行,2 $\times$ taq mix 体系 25 μL ,引物各 1 μL ,DNA 模板 2 μL ,蒸馏水补体积至 50 μL 。PCR 结束后,取反应液进行凝胶电泳(恒压 130 V),30 min 后用凝胶成像仪分析 PCR 结果。

1.2.4 固定样品的 tlh、pir 毒力基因检测

用 SH09-D 试剂盒提取上述固定样品的 DNA。步骤为:取病虾鳃和肝胰腺各 50 mg,加入 0.8 mL SH09-D 裂解液后充分匀浆;加入 10 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 20 μL ,56 °C 水浴 30 min,期间混匀 3~4 次,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,将上清液吸至 SH09-D 核酸吸附柱中,静置 1 min;12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,弃去底管废液;加入 0.8 mL SH09-D 洗液-1,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,离心弃去洗液,重复洗 2 次;加入 SH09-D 核酸洗脱液 50 μL ,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,用离心管收集洗脱核酸,作为 PCR 检测模板。

取固定样品的发病塘水样 5 mL,10 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$

表 1 弧菌毒力基因检测的引物和反应条件

检测基因	引物名称	序列	PCR 产物	PCR 反应条件
pir	AP1-F	CCTTGGGTGTGCTTAGAGGATG	700	94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 循环: 72 ℃延伸 5 min ^[13]
	AP1-R	GCAAACATATCGCGCAGAACACC		
	AP2-F	TCACCCGAATGCTCGCTTGTGG	700	
	AP2-R	CGTCGCTACTGTCTAGCTGAAG		
tlh	TLH-F	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 循环: 72 ℃延伸 3 min ^[14]
	TLH-R	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC		
trh	TRH-F	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500	
	TRH-R	CATAACAAACATATGCCCATTTCC		
tdh	TDH-F	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	269	
	TDH-R	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		

表 2 副溶血弧菌 API 生化鉴定								
鉴定性状	TZ201506-1 ATCC18072		鉴定性状	TZ201506-1 ATCC18072		鉴定性状	TZ201506-1 ATCC18072	
革兰染色	—	—	鸟氨酸脱羧酶	—	—	肌醇产酸	—	—
TCBS 生长	蓝绿	蓝绿	枸橼酸利用	—	—	山梨醇产酸	—	—
麦康凯生长	NG	NG	硫化氢产生	—	—	鼠李糖产酸	—	—
氧化酶	+	+	尿素利用	—	—	蔗糖	—	—
触酶	+	+	色氨酸脱氨酶	d	—	密二糖	—	—
运动性	+	+	吲哚产生	+	+	苦杏仁苷	—	+
葡萄糖发酵	F	F	丙酮酸试验	—	—	阿拉伯糖	+	+
β-半乳糖苷	—	—	明胶水解	+	+	硝酸盐还原	d	+
精氨酸双水解酶	—	—	葡萄糖产酸	+	+	硝酸盐还原	—	—
赖氨酸脱羧酶	+	+	甘露醇产酸	+	+			

注: NG 为不生长, d 为菌株间有差异。

离心 10 min 后弃去上清液, 提取核酸用于水样毒力基因 PCR 检测, 提取步骤同上. tlh、pir 毒力基因检测方法同 1.2.3 节。

1.2.5 高致病性副溶血弧菌对小鼠的毒力研究

取 1.2.3 节中 ap 阳性副溶血弧菌菌株接种于 1.5% NaCl 营养肉汤培养基(28 °C, 200 r·min⁻¹)培养 18 h 后, 7 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集菌体沉淀并用生理盐水洗涤 3 次后再加入生理盐水制成菌悬液, 测定其浓度并稀释至 5×10⁶, 5×10⁷, 5×10⁸ cfu·mL⁻¹ 3 个处理梯度. 腹腔注射 4 周龄 ICR 小鼠 (12±0.5) g, 每只小鼠注射 0.1 mL, 每个梯度处理小鼠 5 只. 小鼠灌胃实验采用 5×10⁸ cfu·mL⁻¹ 菌悬液浓度, 每只小鼠灌胃 0.1~0.2 mL, 处理小鼠 5 只. 每隔 12 h 观察、记录小鼠死亡情况, 共观察 5 d.

1.2.6 高致病性副溶血弧菌上清液溶血性研究

取 1.2.5 节培养菌上清液 100 mL, 用 60%饱和硫酸铵沉淀后于 7 500 r·min⁻¹, 4 °C离心 10 min. 用生理盐水溶解沉淀, 搅拌透析 4~5 h, 12 000 r·min⁻¹, 4 °C离心 10 min 后, 调节蛋白浓度至 1 mg·mL⁻¹, 测定培养上清液和硫酸铵沉淀蛋白的溶血性^[13-15].

2 实验结果

2.1 分离弧菌的形态观察和生化鉴定

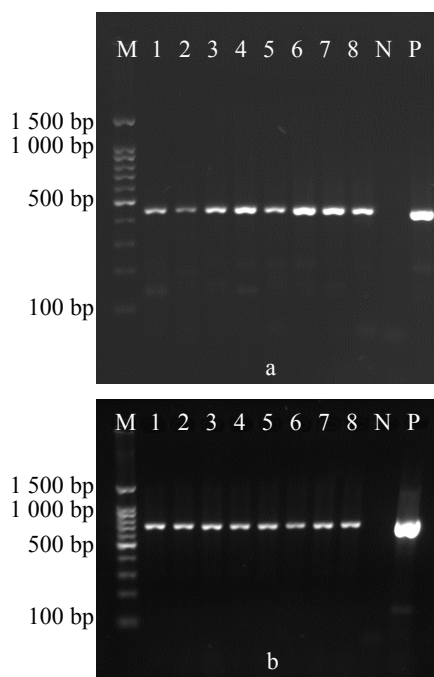
弧菌的革兰染色结果显示, 分离菌株为革兰阴性短杆菌, 略弯曲呈弧状, 大小为 1~3 μm×0.8~1.2 μm. 挑取 tlh 阳性菌株 TZ201506-1 进行生化鉴定, 菌株形态、生长和生理生化性状见表 2. 由

表 2 可见, 分离菌株具运动性, 氧化酶及触酶鉴定为阳性, 可利用葡萄糖发酵, 产生赖氨酸脱羧酶、β-半乳糖苷酶、吲哚、明胶水解酶, 不产生精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶、色氨酸脱氨酶、硫化氢、丙酮酸等, 可利用葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖产酸, 不利用枸橼酸、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、密二糖、苦杏仁苷. 上述性状与副溶血弧菌参考菌株 ATCC18072 性状基本符合, 可鉴定 TZ201506-1 菌株为副溶血弧菌。

2.2 弧菌的主要毒力基因检测

实验共分离到 150 株弧菌菌落, 检出副溶血弧菌(tlh 阳性)菌株 61 株, 分离率为 40.67%, 未检出 tdh 和 trh 阳性基因菌株. 61 株副溶血弧菌分离株中, 检出 ap 阳性菌株 21 株, 占 34.43%. 高致病性副溶血弧菌(tlh-ap 阳性)占有所有分离菌株的 14.00%. 上述结果表明副溶血弧菌在浙江省凡纳对虾弧菌感染中占有重要地位, 高致病性副溶血弧菌在副溶血弧菌中占较高比例(表 3, 图 1).

表 3 副溶血弧菌致病基因检测			
基因	检测菌株	毒力基因 阳性菌株	毒力基因/ 阳性检出率/%
tlh	150	61	40.67
tdh	150	0	0
trh	150	0	0
ap	150	21	14.00
ap-tlh	150	21	14.00
tdh-trh	150	0	0



a 为 t1h, b 为 AP1; M 为 100 bp Marker; 1~8 为分离菌株;
N 为阴性对照, P 为阳性对照

图 1 副溶血弧菌分离株 t1h 和 ap 的 PCR 检测

2.3 固定样品的 t1h、pir 毒力基因检测

对 189 个固定样品进行 t1h、pir 毒力基因检测, 结果见表 4。从表 4 可知, 132 个固定虾样中 t1h 阳性样品有 86 个, 占 65.15%; ap 阳性样品 18 个, 占 13.63%。57 个固定水样中, 22 个样品 t1h 阳性, 占 38.60%; 6 个样品 ap 阳性, 占 10.52%。189 个样品中有 108 个携带副溶血弧菌, 占 57.14%; 24 个样品检出高致病性副溶血弧菌, 占 12.70%, 所有 ap 基因阳性样品均为 t1h 阳性。

表 4 副溶血毒力基因检测结果

地区	种类	样品数	t1h 阳性	t1h 检出率/%	AP 阳性	AP 阳性率/%	AP:t1h/%
宁波	虾样	52	34	65.38	0	0.00	0.00
	水样	1	0	0	0	0.00	0.00
嘉兴	虾样	11	5	45.45	4	36.36	80.00
	水样	8	3	37.50	3	37.50	100.00
台州	虾样	58	45	77.59	14	24.14	31.11
	水样	47	19	40.43	3	6.38	15.79
绍兴	虾样	5	2	40.00	0	0.00	0.00
	水样	1	0	0	0	0.00	0.00
舟山	虾样	6	0	0	0	0.00	0.00
	总计	189	108	57.14	24	12.70	

2.4 高致病性副溶血弧菌对小鼠的毒力研究

ap 阳性的副溶血弧菌菌株 TZ201406-1 和 TZ201506-1 分别以腹腔注射和灌胃两种途径感染小鼠, 结果见表 5。实验表明, 感染 14 h 后, 小鼠出现摄食减少、四肢无力、体毛竖起、眼屎增多等症状, 个别出现稀便。TZ201506-1 以每只 5×10^7 cfu 菌量灌胃处理小鼠时, 部分小鼠出现死亡, 死亡率为 20%。对死亡小鼠解剖后发现, 其胃部明显膨大, 肠道有气泡, 表现为较明显的肠胃炎。其余感染未死亡小鼠 24 h 后症状逐步缓解, 48 h 后基本恢复正常摄食和活动。将死亡小鼠的胸腔液进行 TCBS 平板划线分离、培养, 得到副溶血弧菌。

表 5 副溶血弧菌对小鼠的毒力

感染菌量/cfu		5×10^7		5×10^6		5×10^5	
		感染数	死亡数	感染数	死亡数	感染数	死亡数
注射	TZ201406-1	5	0	5	0	5	0
	TZ201506-1	5	0	5	0	5	0
灌胃	TZ201406-1	5	0	5	0	ND	ND
	TZ201506-1	5	1	5	0	ND	ND

注: ND 为未做。

2.5 高致病性副溶血弧菌上清液的溶血性研究

分别测定 TZ201406-1、TZ201506-1 菌株的上清液和硫酸铵沉淀浓缩物的溶血性, 可见 TZ201406-1、TZ201506-1 均有一定的溶血性。其中 TZ201406-1 培养上清液和沉淀物的溶血效价均为 1:2; TZ201506-1 培养上清液溶血效价高于 1:2, 硫酸铵沉淀物未出现明显溶血。

表 6 副溶血弧菌培养上清的溶血性

处理项目	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	盐水
TZ201406-上清	++++	++	-	-	-	-	-
TZ201406-沉淀	+++	++	+	±	-	-	-
TZ201506-上清	++++	+++	-	-	-	-	-
TZ201506-沉淀	±	-	-	-	-	-	-

注: ± 为溶血不明显。

3 讨论

副溶血弧菌是凡纳对虾养殖中重要的致病菌^[16-17], 同时也是人类重要的食源性病原菌^[18-20]。近年来, 随着凡纳对虾疾病的日益严重, 研究者对副溶血弧菌的关注也日益增多。本研究对 2014~

2015 年间浙江省发病虾样和水样进行了弧菌的分离,对典型的副溶血弧菌进行革兰染色、形态和生化性状的鉴定,并对分离的副溶血弧菌进行了毒力基因分析;同时提取固定样品的DNA进行 *tlh* 和 *ap* 基因分析.结果表明,从患病样品中共分离到弧菌 150 株,生化鉴定和 PCR 检测结果显示共有 61 个菌株携带 *tlh* 基因,为副溶血弧菌,占总分离菌株的 40.67%; 21 个菌株携带 *ap* 基因,为高致病性副溶血弧菌,占总分离菌株的 14.00%. 上述结果表明,2014~2015 年间发病凡纳对虾中副溶血弧菌占有重要地位,其中 *ap* 阳性菌株占有较高的比例.

鉴于基层单位多采用酒精将患病凡纳对虾固定处理后送检,这些样品往往无法进行弧菌分离.我们取固定虾样的鳃和肝胰腺提取核酸后进行副溶血弧菌毒力基因的 PCR 检测,189 个样品中检出副溶血弧菌阳性样品 108 个,检出率为 57.14%; 虾样和水样的高致病性副溶血弧菌(*ap* 阳性)检出率分别为 13.64%和 10.53%. 表明固定样品核酸提取检测方法和病样弧菌分离检测方法的毒力基因检出率的分布趋势基本相同,其中固定样品的副溶血弧菌检出率略高,高致病性副溶血弧菌检出率略低.因此,固定样品法可直接用于患病凡纳对虾的弧菌感染分析,优势为可扩大样品送检范围、减轻异地采样工作量、提高病虾检测分析的全面性和时效性.

本研究中所有病虾分离的副溶血弧菌均未检出 *tdh* 和 *trh* 两个致病相关基因,这一结果低于其他研究者报道的 *tdh* 和 *trh* 检出率^[18-20,21]. 究其原因可能源于样品的不同来源,我们采用的是凡纳对虾发病群体,该群体主要源于养殖环境恶化或其他疾病引起的凡纳对虾继发感染,与正常水产品的副溶血弧菌外源性污染造成的弧菌携带有一定区别,造成了毒力基因差异.通过开展副溶血弧菌分离株 O 抗原分析将有助于解释 *tdh* 和 *trh* 检出率差异造成的原因.

pir 基因最早分离自发光杆菌(*P. luminescens*),PIR 毒素对昆虫具有较强毒性^[7],而携带 PIR 毒素的副溶血弧菌对人类和其他陆生动物的毒力还没有明确的结论.对于携带 PIR 毒素的弧菌,冰冻虾的弧菌分离率要明显低于活虾,国外研究者认为冻虾制品受食源性副溶血弧菌感染的风险较低^[22].

我国学者通过对不同虾制品的副溶血弧菌检出率和毒力基因检测分析发现,冰冻虾和虾干的副溶血弧菌分离率分别要比活虾低 3.21 倍和 6.96 倍,而与副溶血弧菌毒力相关的 *trh* 基因,冰冻虾和虾干无一例检出^[8].携带 PIR 毒素的高致病性副溶血弧菌,虽然试验所用菌株均为 *trh* 和 *tdh* 阴性,但对小鼠具有一定毒力,以每只小鼠 5×10^7 cfu 菌量灌胃感染的死亡率为 20%,同时分离菌培养上清液具有一定的溶血性,溶血效价为 1:2.鉴于分离菌株对小鼠表现出一定的毒力和溶血性,而 AHPND 目前在我国凡纳对虾养殖中存在较高的感染率,加上我国广泛的活虾烹食习惯,因此对于高致病性副溶血弧菌对人类及其他动物的潜在威胁,应进一步开展研究.

参考文献:

- [1] 郑天伦,王国良.对虾白斑综合症病毒的诊断和检测[J].海洋湖沼通报,2002(3):65-70.
- [2] 郑志肖,林建东,顾建明,等.宁波地区凡纳对虾白斑综合症病毒(WSSV)的检测与分析[J].南方农业学报,2010,41(11):1226-1228.
- [3] 杨冰,宋晓玲,黄健,等.对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 IHNV 的流行病学与检测技术研究进展[J].中国水产科学,2005,12(4):520-524.
- [4] 袁颜颜,杨冰,万晓媛,等.采用 OIE 标准检测养殖对虾中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)的 PCR 检出类型[J].渔业科学进展,2015(1):67-72.
- [5] ZHANG Q, LIU Q, LIU S, et al. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp[J]. Journal of General Virology, 2014, 95:2700-2709.
- [6] 刘珍,张庆利,万晓媛,等.虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测[J].渔业科学进展,2016,37(2):119-126.
- [7] HAN J E, TANG K F, TRAN L H, et al. *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp[J]. Dis Aquat Org, 2015, 113(1):33-40.
- [8] XU X, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets[J]. Food Control, 2014, 46(46): 81-85.
- [9] 李晶娇,薛峰,曾德新,等.副溶血弧菌毒力因子的研究进展[J].畜牧与兽医,2014(12):613-619.
- [10] HIROTAKA H, TOSHIO K, TETSUYA I, et al.

- Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(4):1772-1780.
- [11] KOBAYASHI T, ENOMOTO S, SAKAZAKI R, et al. A new selective isolation medium for vibrio group on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium)[J]. Nihon Saikingaku Zasshi (Japanese Journal of Bacteriology), 1963, 18(10/11):387-392.
- [12] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007:120-125.
- [13] FLEGEL T W, LO C F. Interim primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[EB/OL]. [2015-10-12]. http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128.
- [14] 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.
- [15] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1995(6):460-464.
- [16] 翟秀梅, 王斌, 毛连菊, 等. 副溶血弧菌对凡纳对虾生理生化指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2007, 16(2):162-168.
- [17] 宋春华, 孟庆显. 副溶血弧菌引起中国对虾红腿病的组织病理及防治[J]. 齐鲁渔业, 1998(3):24-27.
- [18] 金培婕, 吴蓓蓓, 王淑娜, 等. 浙江沿海地区海产品及环境中副溶血弧菌的分离与主要毒力基因分析[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7):962-967.
- [19] 魏霜, 洗钰茵, 赵晖, 等. 多重 PCR 检测四种食源性病原弧菌[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8):1682-1686.
- [20] 林祥田. 94 起副溶血弧菌食物中毒流行病学特征分析[J]. 上海预防医学, 2006, 18(3):141-143.
- [21] 周向阳, 王淑娜, 周秀锦, 等. 沿海地区副溶血弧菌的表型及其主要毒力基因分布特征[J]. 华北农学报, 2011, 26(1):192-195.
- [22] THOMSON W K, THACKER C L. Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures[J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1973, 6(3):156-158.

Isolation, identification and main virulence analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from diseased *Penaeus vannamei* in Zhejiang province

FANG Lei¹, SHI Jian^{1,2}, XIA Wu-qiang³, ZHANG Xin¹, MENG Qing-zhen¹,
CHEN Tie-feng^{1,2}, XU Jing-yu², QIAN Dong^{1*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2.Hangzhou Sanhe Innovation Technology Co. Ltd, Hangzhou 310020, China; 3.Xiangshan Marine and Fishery Quality Surveillance Center, Xiangshan 315700, China)

Abstract: To investigate the vibrio infection of diseased *Penaeus vannamei*, a certain number of diseased samples of *Penaeus vannamei* in Zhejiang province are collected for vibrio isolation and biochemical identification. Vibrio isolations with TCBS agar are used for biochemical identification of API-20E as well as for PCR detection of tlh, tdh, trh and pir gene. High pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* are applied in order for evaluating the virulence to mice. The results show that 61 tlh isolations (accounting for 40.67%) and 21 ap positive isolations (14%) have been detected from a total of 150 isolations; 108 (57.14%) out of 189 fixed samples are tlh positive, while 24 ap positive samples are detected (12.70%). No tdh and trh positive are found. The supernatant of the bacteria manifests the weak hemolytic activity (1:2) and the bacterium can cause death of mice. The results indicate that *Vibrio parahaemolyticus* plays an important part in the diseased *Penaeus vannamei* infected by vibrio. Furthermore, high pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* has been found to share a large proportion of *Vibrio parahaemolyticus* isolations which are separated from diseased *Penaeus vannamei*. High pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* of ap positive suggests the hemolytic activity and virulence to some degree.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; isolation and identification; virulence; *Penaeus vannamei*

(责任编辑 史小丽)