

研究报告

基于全基因组测序技术的副溶血性弧菌分子特征及耐药性研究

陈玉凤, 矫继龙, 岳雪瑶, 侯君, 于鹏, 薄志坚
(大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116035)

摘要:目的 了解大连市副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)的基因组特征及耐药性,为 VP 分子溯源、毒力基因分析及耐药机制的研究提供所需数据支持。**方法** 本研究对 2023 年大连市分离的 96 株 VP 进行全基因组测序及药物敏感性试验,应用北京微未来病原微生物信息分析系统对全基因组测序数据进行拼接,对拼接的基因组序列进行 MLST、cgMLST、cgSNP 分析,并进行毒力基因和耐药基因分析,对耐药基因和耐药表型进行比较分析。**结果** 96 株 VP 被分为 9 个 ST 型,以 ST3 型为主;96 株 VP 被分为 96 个 cgMLST 和 cgSNP 型,表现出丰富的遗传多样性。96 株 VP 携带毒力基因较多,其中 16 个毒力基因携带率差异有统计学意义($\chi^2=72.004, P<0.001$),每个分离株菌至少携带 11 种毒力基因。19 个耐药基因携带率差异有统计学意义($\chi^2=1539.1, P<0.001$),*CARB*、*CRP* 和 *tet(35)* 基因携带率最高,均为 98.96%;其他耐药基因携带率均为 1.04%。96 株 VP 分离株对氨苄西林和多黏菌素 E 耐药率高,分别为 57.29% 和 46.88%,对链霉素敏感性下降,中介率为 53.13%;仅 4 株分离菌表现为多重耐药菌。**结论** 2023 年大连市分离的 96 株 VP 具有遗传多样性,携带毒力基因和耐药基因,并且表现出对氨苄西林和多黏菌素 E 的耐药性。同时,本研究证明全基因组测序技术可为细菌的分子溯源、毒力基因分析及耐药机制的研究提供所需的数据支持。**关键词:** 副溶血性弧菌; 全基因组测序; 多位点序列分型; 核心基因组多位点序列分型; 核心基因组单核苷酸多态性分析; 毒力基因; 耐药基因

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)08-0699-08
DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.08.002

Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* using whole genome sequencing

CHEN Yufeng, JIAO Jilong, YUE Xueyao, HOU Jun, YU Peng, BO Zhijian
(Dalian Center for Disease Control and Prevention, Liaoning Dalian 116035, China)

Abstract: Objective To understand the genomic characteristics and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) isolated in Dalian City, and provide necessary data support for VP molecular tracing, virulence gene analysis, and drug resistance mechanism research. **Methods** This study conducted whole genome sequencing and drug sensitivity tests on 96 strains of VP isolated in Dalian City in 2023. The whole genome sequencing datas were assembled using the Beijing Micro Future Pathogenic Microbial Information Analysis System. The assembled genome sequences were subjected to MLST, cgMLST, and cgSNP analysis. Virulence genes and drug resistance genes were also analyzed, and a comparative analysis of drug resistance genes and phenotypes was conducted. **Results** Ninety-six strains of VP were divided into 9 ST types, with ST3 being the most prevalent. The 96 strains of VP were classified into 96 cgMLST and cgSNP types, exhibiting rich genetic diversity. Ninety-six strains of VP carried a large number of virulence genes, with a total of 16 virulence genes showing differences ($\chi^2=72.004, P<0.001$), and each strain carried at least 11 virulence genes. A total of 19 drug resistance genes showing differences ($\chi^2=1539.1, P<0.001$), with the highest carriage rates of *CARB*, *CRP*, and *tet(35)* genes, all at 98.96%; the carriage rates of other drug resistance genes were 1.04%. The resistance rates to ampicillin and colistin were high, at 57.29% and 46.88% respectively, and the sensitivity to streptomycin decreased, with an intermediate rate of 53.13%. Only 4 strains were multidrug-resistant. **Conclusions** The 96 strains of VP isolated in Dalian City in 2023 exhibit genetic diversity, and carry virulence genes and drug resistance genes, showing resistance to ampicillin and colistin. This study also demonstrated that whole genome sequencing technology can provide necessary data support for molecular tracing, virulence gene analysis and drug resistance mechanism research of pathogenic bacteria.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; whole Genome Sequencing (WGS); multilocus Sequence Typing; core-genome Multilocus Sequence Typing; core-genome single nucleotide polymorphism; toxic gene; resistance gene

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种常见的食源性致病菌,是全球范围内腹泻类疾病暴发的主要原因之一。在我国,VP引起的食源性疾病的病例数占微生物性食源性疾病的首位^[1],特别是在大连^[2]等沿海地区,VP在食品和食源性疾病患者中都是检出率最高的致病菌,经常引起食源性疾病暴发。

本研究对大连地区患者和食品中分离的VP进行全基因组测序和药物敏感性检测,利用基因组测序数据进行多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)、核心基因组多位点序列分型(Core-genome multilocus sequence typing, cgMLST)和核心基因组单核苷酸多态性分析(Core-genome single nucleotide polymorphism, cgSNP),毒力基因和耐药基因分析,从而了解大连市分离的VP的亲缘关系和分型、致病性、药物敏感性等特征,为进一步开展VP的分子流行病学监测、防控和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

96株VP中有93株分离自2023年大连市腹泻患者粪便或肛拭子,3株(VP2023089、VP2023090、VP2023093)分离自大连市海产品,患者样品采集和检测参考《2023年食源性疾病监测工作手册》^[3]-《粪便标本检验标准操作程序》,由哨点医院进行采集和菌株分离鉴定,区市两级疾控中心实验室进行复核。食品样品采集和检测参考《2023年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》^[4]-副溶血性弧菌检验标准操作程序,由区疾控进行样品采集和菌株分离鉴定,市疾控中心实验室进行复核。样本采集时间为2023年7月—2023年9月,采集地点为大连市10个区市县。质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)和肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)自本实验室。

1.1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)(中国安图),Miseq TMDx测序仪(美国Illumina),Sensititre AIM微生物药敏分析仪(美国赛默飞)。

含3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)(中国陆桥),细菌基因组提取试剂盒(中国天根),基质液(中国安图),药敏板(美国赛默飞),建库及测序试剂盒(美国Illumina)。北京微未来病原微生物信息

分析系统。

1.2 方法

1.2.1 全基因组测序

将菌株从菌种保存管划线接种至含3%氯化钠TSA平板复苏活化,36℃恒温培养箱过夜培养。在1.5 mL EP管内加入1 mL无菌水,用10 μL接种环刮取平板菌落半环,制备成新鲜菌液,按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取菌株的全基因组DNA。提取的DNA用Miseq TMDx测序仪进行全基因组测序。测序策略:先将DNA随机打断成350 bp左右的片段,经末端修复、连接A碱基,将特定测序引物连接到DNA片段上,纯化后定量,再制备混合文库,进行PE150测序。将下机数据导入北京微未来病原微生物信息分析系统(微未来)软件,进行基因组拼接组装。

1.2.2 基于MLST、cgMLST、cgSNP的遗传多样性分析

(1)基于MLST的遗传多样性分析:将全基因组测序结果的FASTA格式文件上传PubMLST(<http://pubMLST.org/organisms>)进行线上数据分析,获取每株菌7个管家基因(*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*)的等位基因序列号,与VP MLST标准数据库进行比对,获得菌株的序列型别(ST),7个管家基因都有编号但没有ST型的菌株,将菌株的管家基因编号上传至在该网站,申请新的ST型。利用BioNumerics7.5软件,采用UPGMA法对其进行MLST聚类分析。

(2)基于cgMLST的遗传多样性分析:根据网站PubMLST(<http://pubMLST.org/organisms>)上的*Vibrio parahaemolyticus*数据库,从上述拼接好的序列中选取3 054个等位基因,利用chewBBACA^[5]进行等位基因检测,用PHYLOVIZ Online(<https://online.phyloviz.net/index>),采用N-J法构建系统发育树。

(3)基于cg-SNP的遗传多样性分析:使用snippy4.6.0软件^[5],对96株VP株的全基因组与NCBI上获得的参考菌株2210633(GCF_000196095.1)基因组进行SNP检测,然后应用IQ-TREE软件^[5],采用ML法构建系统发育树。

1.2.3 毒力基因和耐药基因分析

(1)毒力基因分析:利用北京微未来病原微生物信息分析系统(微未来)软件,通过与病原菌毒力因子数据库(Virulence factor database, VFDB,

www.mgc.ac.cn)进行序列比对分析毒力基因,按照一致性 $\geq 90\%$,覆盖度 $\geq 60\%$ 标准进行比对,应用Rstudio(Pretty heatmap, pheatmap包)绘制毒力基因热图,应用Rstudio比较各毒力基因携带率差异。

(2)耐药基因分析:利用微未来软件,通过与抗性基因数据库(Comprehensive anti-biotic research database, CARD, <https://card.mcmaster.ca>)进行序列比对分析耐药基因,按照一致性 $\geq 90\%$,覆盖度 $\geq 60\%$ 标准进行比对。同时将全基因组序列结果(fasta)上传网站 <http://genepi.food.dtu.dk/resfinder> 和 <http://genepi.food.dtu.dk/PlasmidFinder>,分别应用线数据库 ResFinder 和 PlasmidFinder 分析通过水平转移获得的耐药基因和质粒。应用Rstudio(Pretty heatmap, pheatmap包)绘制耐药基因热图,应用Rstudio比较各耐药基因携带率差异。

1.2.4 药物敏感性试验

对VP采用微量肉汤法检测药物敏感性,包含17种抗生素:氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、复方新诺明(Sulfamethoxazole trimethoprim, SXT)、多黏菌素E(Colistin E, CT)、厄他培南(Ertapenem, ETP)、美罗培南(Meropenem, MEM)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、头孢他啶/阿维巴坦(Ceftazidime and Avibactam Sodium, CZA)、四环素(Tetracycline, TET)、替加环素(Tigecycline, TIG)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、萘啶酸(Nalidixic acid, NAL)、阿奇霉素(Azithromycin, AZM)、阿米卡星(Amikacin, AMI)、链霉素(Streptomycin, STR)、氨苄西林(Ampicillin, AMP)、氨苄西林-舒巴坦(Ampicillin sodium and sulbactam sodium, AMS),按照Sensititre™革兰阴性菌MIC药敏板使用说明书,挑取菌落数个,置于3 mL无菌水中,用Sensititre Nephelometer比浊仪进行比浊,调整浊度至0.5,用Sensititre AIM微生物药敏分析仪接种至药敏板,经过35℃孵育20 h后,用Sensititre AIM微生物药敏分析仪进行结果判读,分析其最低抑菌浓度(Micro-inhibitory concentration, MIC),并根据《M100抗微生物药物敏感性试验执行标准》^[6],获得相应敏感、中介和耐药结果,应用Rstudio绘制药物敏感性热图。用大肠埃希菌ATCC25922和肺炎克雷伯杆菌ATCC700603作为质控菌株。

2 结果

2.1 全基因组测序数据质量

数据满足以下条件:原始数据量 ≥ 0.5 G,平均测序读长为150 bp,基因组整体覆盖深度 $\geq 100\times$, SCAFFOLD数量 < 100 个,Contig数量 < 200 个,单碱

基错误率 $< 1/100\,000$ 。

2.2 基于MLST、cgMLST、cgSNP的遗传多样性分析结果

2.2.1 基于MLST的遗传多样性分析结果

MLST分析结果显示,本研究的96株VP分为9个ST型,83株为ST3型,占86.46%(83/96),3株为ST332型,3株为ST527型,2株为ST121,其余5株菌分别为ST3055、ST3724、ST3807、ST3810、ST3822型,见图1。

2.2.2 基于cgMLST的遗传多样性分析结果

cgMLST分析显示,96株菌被分为96个cgMLST型,等位基因差异数为0~2 810个。其中,83株ST3型差异1~143个,3株ST527型差异5~10个,3株ST332型差异3~14个,2株ST121型差异2个,ST3055、ST3724、ST3807、ST3810、ST3822型菌株之间差异2 700~2 716个。相同ST型别菌株之间的等位基因差异数量 < 143 个,不同ST型别菌株之间的等位基因数量差异均 $> 2\,700$ 个。系统发育分析(图2)可以看出,96株VP可分为3个主进化分支,主进化分支1上只有1株菌,主进化分支2上24株菌,其余71株菌均在主进化分支3上。83株ST3型菌株与13株其他ST型的菌株遗传距离较远,ST332、ST527、ST121、ST3055、ST3724、ST3807、ST3810、ST3822型菌株分别在各自分支上。

2.2.3 基于cgSNP的遗传多样性分析结果

cgSNP分析显示,96株VP被分为96个cgSNP型,所有菌株间cgSNP差异数为64 948,其中83株ST3型菌株之间cgSNP差异数为1 542,3株ST527型菌株之间cgSNP差异数为56,3株ST332型菌株之间cgSNP差异数为147,2株ST121型菌株之间cgSNP差异数为23,ST3055、ST3724、ST3807、ST3810、ST3822型菌株之间cgSNP差异数为57 962。系统发育分析(图3)可以看出,96株VP被分为2个主进化分支,2株食品来源的菌株(VP2023090、VP2023093)位于主进化分支1上,1株食品来源的菌株(VP2023089)和93株患者来源的菌株和参考菌株位于主进化分支2上。主进化分支1上的菌株位于整个进化树的根部,与另1株食品分离株(VP2023089)和患者分离株进化差异较大,而VP2023089则与患者分离株进化差异较小。2株ST121菌株则与83株ST3菌株位于主分支2的亚分支2b上,其他7个ST型菌株位于主分支2的亚分支2a上。

2.3 毒力基因和耐药基因分析结果

与VFDB比对分析,96株VP携带毒力基因谱不同。比对111个毒力基因,用Rstudio绘制热图(只

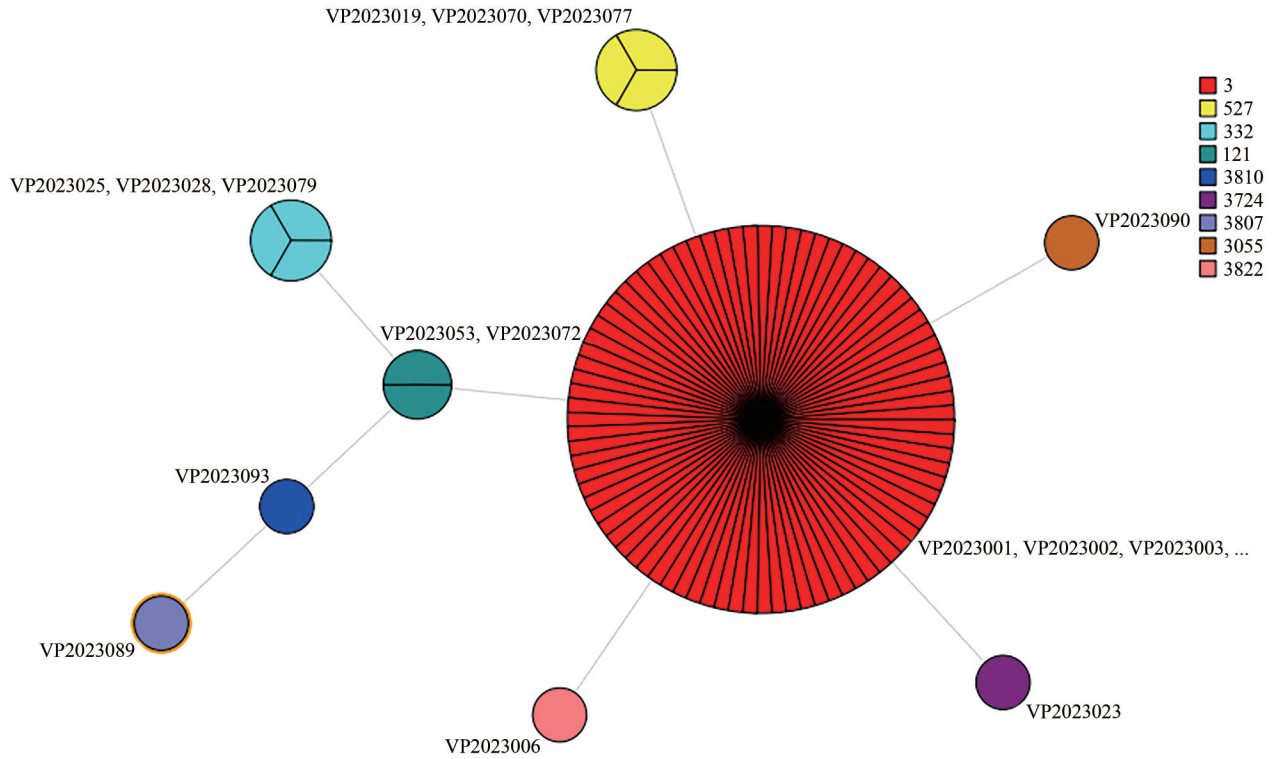


图 1 96 株 VP MLST 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic trees constructed based on MLST of 96 VP

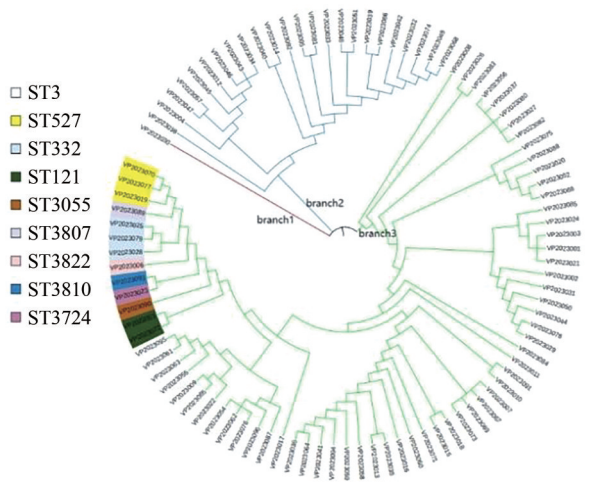


图 2 96 株 VP 的 cgMLST 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic trees constructed based on cgMLST of 96 VP

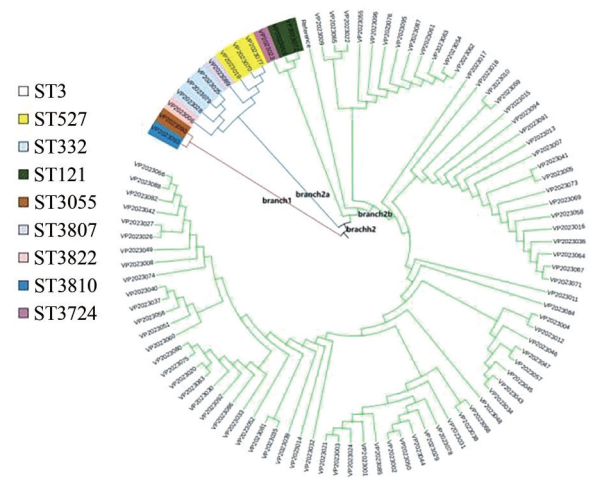


图 3 96 株 VP 的 cgSNP 系统发育树

Figure 3 Phylogenetic trees constructed based on cgSNP of 96 VP

列出所研究菌株携带的毒力基因)(图 4)。可以看出大连市分离的菌株携带毒力基因较多,96 株 VP 中共有 16 个毒力基因有差异,其中 2 株 ST332 型菌及 83 株 ST3 型菌携带毒力基因情况相似,携带毒力基因较多,至少携带 15 种毒力基因,其他 7 个 ST 型菌株携带毒力基因情况相近,携带毒力基因较少,但是至少也携带 11 种毒力基因。其中与侵袭力相关的毒力基因尤以侧鞭毛(lateral flagella)、多价黏附分子(MAM7)居多,携带率为 100%,VpadF 携带率为 98.96%,IV 型菌毛和甘露糖敏感血凝素携带率也很高,为 89%。与毒素相关的毒力基因

携带率均较高,图 4 可以看出,除 *tdh* (包括编码 thermostable direct hemolysin S 和 thermostable direct hemolysin A 的基因)携带率为 95.83%、周质结合蛋白依赖型 ABC 转运系统携带率为 98.96%,其他毒素基因携带率均为 100%。各毒力基因功能和携带率见表 1,各毒力基因携带率差异有统计学意义($\chi^2=72.004, P<0.001$)。

通过与 CARD 和 ResFinder 数据库比对分析,96 株 VP 携带耐药基因谱不同。比对 55 个耐药基因,用 Rstudio 绘制耐药基因热图(只列出所研究菌株携带的耐药基因)(图 4)。96 株 VP 中共有 19 个耐药

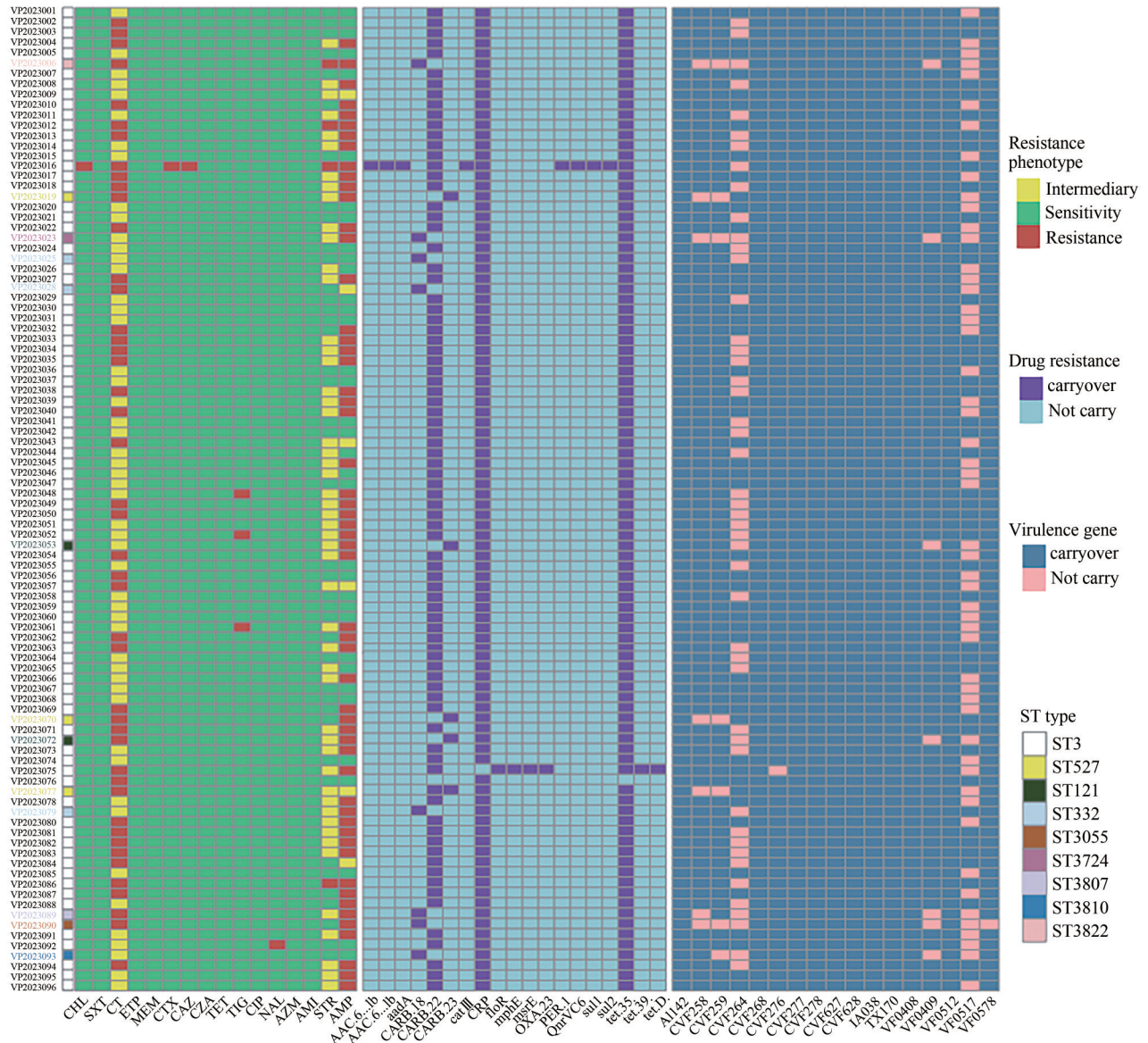


图4 96株VP ST型和耐药表型、耐药基因、毒力基因热图

Figure 4 Heatmaps of ST type ,resistance phenotypes, resistance genes and virulence genes of 96 VP

基因有差异, *CARB*、*CRP* 和 *tet*(35) 基因携带率最高, 均为 98.96%; 其他耐药基因携带率均很低, 为 1.04%。各耐药基因携带率差异有统计学意义 ($\chi^2=1539.1, P<0.001$)。除 VP20230076 只携带 *CRP* 基因外, 所有菌株均携带 3 种以上耐药基因, 其中 VP20230016 和 VP20230075 分别携带 11 种和 8 种耐药基因。耐药基因携带情况与系统发育无关。质粒分析发现 96 株 VP 均不携带耐药质粒。

2.4 药敏试验结果

本研究 96 株 VP 对 SXT、ETP、MEM、CZA、TET、CIP、AZM、AMI、AMS 敏感性最高, 为 100%; 对 CHL、CTX、CAZ、NAL 的敏感性也很高, 为 98.96%; 其次为 TIG, 敏感率为 96.88%; 对 AMP、CT 和 STR 敏感性较低, 其中对 AMP 耐药率最高, 为 57.29%, 耐药和中介率合计为 63.54%; CT 的耐药率为 46.88%, 耐药

和中介率合计 100%; 53.13% 的菌株对 STR 表现为中介, 4.17% 的菌株表现为耐药(图 5)。96 株 VP 中有 4 株菌为多重耐药菌, 同时耐 CT、AMP 和 STR, 其中 VP2023016 除以上 3 种抗生素外还耐 CHL、CTX 和 CAZ(图 4)。药敏试验结果与系统发育无关。

3 讨论

近年来, 全基因组测序技术已成为研究致病菌亲缘关系和分型、致病性、药物敏感性的重要手段^[7]。本研究中 MLST 分型结果显示 2023 年大连市 VP 有高度流行 ST 型别, 即 ST3 型(83 株), 其余 13 株菌被分为 8 个 ST 型, 国内多地^[8-9]报道 ST3 型是 VP 的主要流行株, 也是全球流行株, 但是大连地区以往未见报道。而 cgMLST 和 cgSNP 结果则提示这些菌株具有遗传多样性。

表1 毒力基因功能表
Table1 Functional table of virulence genes

毒力基因名称	短名称	详细描述	携带该毒力基因的 菌株数 株/%
AI142	lateral flagella(侧鞭毛)	LfgN protein, putative flagellin, hypothetical protein, chemotaxis LafU protein	96(100.00)
VF0578	VpadF	surface adhesin VpadF	95(98.96)
VF0512	MAM7(多价黏附分子)	multivalent adhesion molecule MAM7	96(100.00)
CVF258	Type IV pilus(Ⅳ型菌毛)	type Ⅳ prepilin-like proteins leader peptide processing enzyme, type Ⅳ pilin PilA	89(92.71)
CVF259	Mannose-sensitive hemagglutinin(甘露糖 敏感血凝素)	MSHA biogenesis protein MshH, putative MSHA pilin protein MshD	89(92.71)
TX170	TLH/LDH(不耐热溶血素)	thermolabile hemolysin TLH	96(100.00)
CVF264/VF0517	TDH(耐热直接溶血素)	thermostable direct hemolysin S thermostable direct hemolysin A	92(95.83)
VF0408	T3SS1(Ⅲ型分泌系统)	type Ⅲ secretion system translocator protein VopD, transcrip- tional regulator ExsC, type Ⅲ secretion system effector, type Ⅲ secretion system protein Ysc	96(100.00)
VF0409	vopC, vopL	type Ⅲ secretion system effector V、vopC, type Ⅲ secretion sys- tem effector vopL, actin filament nucleation activity	89(92.71)
CVF268	EPS type Ⅱ secretion system(Ⅱ型分泌系 统)	general secretion pathway protein C, general secretion pathway protein N	96(100.00)
CVF276	Periplasmic binding protein-dependent ABC transport systems(周质结合蛋白依 赖性ABC转运系统)	ABC transporter, ATP-binding protein, periplasmic iron- compound-binding protein	95(98.96)
CVF277	Enterobactin receptors(肠杆菌素受体)	iron-regulated outer membrane virulence protein homolog, putaive Fe-regulated protein B precursor	96(100.00)
CVF278	Heme receptors(血红素受体)	heme transport protein HutA	96(100.00)
CVF627	Cholerae autoinducer-1(霍乱自诱导物-1)	hypothetical protein	96(100.00)
CVF628	Cholerae Autoinducer-2(霍乱自诱导物-2)	S-ribosylhomocysteinase	96(100.00)
IA038	Vibrio ferrin(弧菌铁蛋白)	iron-dicitrate transporter ATP-binding subunit, putative diami- nopimelate decarboxylase protein	96(100.00)

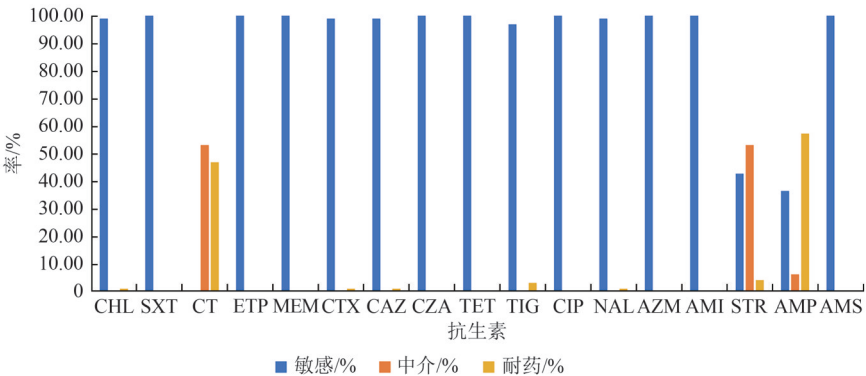


图5 96株VP对17种抗生素的耐药情况

Figure 5 Resistance analysis of 96 strains of *Vibrio Parahaemolyticus* to 17 antibiotics

cgMLST 结果显示,96 株菌被分为 96 个 cgST 型,相同 cgST 型别菌株之间存在等位基因差异,但是数量较少,不同 ST 型别菌株之间的等位基因差异数量较多。由此可见 cgMLST 与 MLST 分型结果具有较高的一致性,并且对于同一 ST 型的菌株,cgMLST 比 MLST 分辨率更高。因为 MLST 只针对 7~9 个管家基因,不能反映基因组全貌;而 cgMLST 是 MLST 的拓展方法,包含用于 MLST 分型的管家

基因和其他基因,这样既提高了分辨率,又可以与 MLST 分型结果进行比较,检验 cgMLST 分型结果的可靠性^[10]。当怀疑由细菌感染引起食源性或传染性疾病爆发时,且不具备全 WGS 条件时,可以用 MLST 方法进行初步检测,但是当 ST 型别一致时,cgMLST 则具有更高的分辨能力。

cgSNP 结果显示,96 株菌被分为 96 个 cgSNP 型,结果与 MLST 和 cgMLST 具有很高的一致性,与

cgMLST 分辨率也相当,但是 cgSNP 更能体现菌株间的系统发育关系,在研究同一谱系病原菌亲缘关系时更具有优势。研究者通过分析 cgSNP 系统发育树的分支结构特点,并结合菌株耐药性、分离信息(包括时间和地点)以及标本类型,能够明确菌株之间的亲缘关系,并推测其传播和进化历程^[11]。但是本研究中的 96 株菌分离时间相距较短、地点范围也较小,未体现出 cgSNP 方法在分析菌株分离时间、地点之间进化关系的优势。所以在应用全基因组测序数据进行溯源分析时,应根据不同场景选择合适的分型方法进行溯源分析。

毒力是指细菌对宿主产生伤害的能力,其包括侵袭力和毒素。经预测本研究中的菌株携带与黏附、铁摄取、T3SS 分泌系统、II 型分泌系统以及外毒素等相关的毒力基因。本研究中分别比对到编码 TDH-S 和 TDH-A 的 *tdh* 基因,携带率为 92.71%,*trh* 基因携带率为 0%,而 *tlh* 基因携带率为 100%。*tdh* 和 *trh* 携带率各地结果不同,但是 *tlh* 携带率均为 100%^[12-14]。经预测发现,2 株 ST332 及 83 株 ST3 型菌较其他 ST 型菌株携带毒力基因略多,所以 MLST 分型还可以初步预测细菌毒力。

96 株 VP 对 AMP 和 CT 耐药率较高,大部分菌株(53.13%)对 STR 表现为中介,对其他抗生素敏感性较高,仅 4 株菌为多重耐药菌。2018 年^[15]大连市监测发现耐药率最高为头孢唑啉,福建省^[16]对头孢唑啉耐药率较高,但与北京^[17]结果一致。可见不同地区不同年份药物敏感性检测结果不同,需要实时监测细菌耐药情况,以便根据监测结果合理使用抗生素。

耐药基因分析显示 *CARB* 基因、*CRP* 基因和 *tet* (35) 基因携带率较高,均为 98.96%。*CARB* 基因编码 β -内酰胺酶,从而发挥对阿莫西林、氨苄西林和哌拉西林的耐药作用。*CRP* 介导了对氟喹诺酮类、大环内酯类和青霉素类药物的耐药。*tet* (35) 则介导了对四环素类药物的耐药^[18]。

本研究中 *CARB* 基因携带率较高,为 98.96%,耐药率最高的也是 AMP,为 57.29%,虽然携带该基因的菌株只有部分菌株对 AMP 耐药,但是未携带该基因的菌株对 AMP 敏感;*CRP* 基因携带率也很高,为 98.96%,但是仅青霉素耐药率较高,对氟喹诺酮类、大环内酯类敏感,本研究中的 *CRP* 基因可能只介导了青霉素类药物耐药;*tet* (35) 基因携带率也是 98.96%,但是对 TET 全部敏感,仅有 3 株菌耐 TIG,且耐 TIG 的菌株全部携带该基因。副溶血性弧菌检出 *tet* (35) 基因的报道较多,但是关于该基因导致四环素耐药的机制研究较少,初步的 Southern 杂交实验表明,*tet* (35) 基因与原始分离株及其转移

结合子的染色体 DNA 发生杂交^[18]。结合 *tet* 家族其他基因研究,推测 *tet* (35) 可能编码核糖体保护蛋白,保护核糖体免受四环素类药物抑制来介导耐药,需进一步通过功能实验来验证。虽然检出该基因,但是菌株并不耐四环素,可能与基因沉默或低表达有关,可能只有在合适的环境下才能高表达,表现出对相应抗生素的耐受性^[19]。本研究中 CT 的耐药率很高,但是相应的耐药基因携带率并不高。CT 的耐药可能与染色体或质粒介导的脂多糖有关^[20],肠杆菌科细菌对 CT 的耐药通常与染色体 *pmrC/E/A/B*、*phoP/Q*、*mgrB* 和质粒 *mcr-1*^[21] 等基因突变有关。本研究将全基因组数据与 CARD、Resfinder 和 Plasmidresfinder 数据库比对,均未检测到相关基因,提示可能存在新的耐药机制,需要我们深入研究。在本研究中,96 株 VP 的耐药表型与基因并不完全对应,但耐药基因能一定程度体现其耐药性。而且 WGS 可快速准确地得到菌株包括耐药质粒在内的所有耐药基因,可用于研究耐药机制。

综上所述,2023 年大连市分离的 96 株 VP 具有遗传多样性,而且携带毒力基因、耐药基因,并且表现出对 AMP 和 CT 的耐药性,对 STR 的敏感性下降。因此需加大对 VP 的监测,在 VP 的临床治疗中尽量避免使用 AMP、CT 和 STR。本研究还证明,全基因组测序技术可为细菌的分子溯源、毒力基因分析以及耐药机制的研究提供所需的数据支持。

参考文献

- [1] 吴鹏,刘继开,戴月,等. 2010—2020 年中国大陆副溶血性弧菌引发食源性疾病暴发调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 73-78.
WU P, LIU J K, DAI Y, et al. Investigation of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* in China's Mainland from 2010 to 2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(1): 73-78.
- [2] 陈玉凤,潘微,栾明春,等. 2017—2019 年大连市食源性疾病监测结果分析[J]. 职业与健康, 2021, 37(11): 1473-1477.
CHEN Y F, PAN W, LUAN M C, et al. Analysis on surveillance results of foodborne diseases in Dalian City from 2017—2019 [J]. Occup and Health, 2021, 37(11): 1473-1477.
- [3] 国家食品安全风险评估中心. 2023 年国家食源性疾病预防工作手册[Z]. 2023.
National Food Safety Risk Assessment Center. 2023 National Foodborne Disease Surveillance Work Manual[Z]. 2023.
- [4] 国家食品安全风险评估中心. 2023 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册[Z]. 2023.
National Food Safety Risk Assessment Center. 2023 National Food Risk Monitoring Manual[Z]. 2023.
- [5] 贾慧琼,阮陟. 全基因组测序在病原菌分型与溯源中的应用研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 949-967.

- JIA H Q, RUAN Z. Advances on whole genome sequencing-powered typing and source tracking of bacterial pathogens [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 949-967.
- [6] CLSI. Clinical and Laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-29[S]. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [7] BESSER J, CARLETON HA, GERNER-SMIDT P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2018, 24(4): 335-341.
- [8] 梅玲玲, 龚璞, 占利, 等. 浙江省副溶血性弧菌 O3:K6 血清型菌株多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(3): 278-281.
- MEI L L, GONG P, ZHANG L, et al. Multi-locus sequence typing analysis of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 serotype strains isolated from Zhejiang Province, China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2014, 30(3): 278-281.
- [9] 蔡楠楠, 吴莹, 杜波, 等. 辽宁省阜新市副溶血性弧菌的生物学特征、毒力基因、耐药特征及分子溯源[J]. 中国热带医学, 2021, 21(8): 724-729.
- CAI N N, WU Y, DU B, et al. Biological characteristics, virulence genes, drug resistance characteristics and molecular traceability analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in Fuxin, Liaoning [J]. China Tropical Medicine, 2021, 21(8): 724-729.
- [10] 朱丽萍, 张文成, 颜世敬, 等. 细菌核心基因组多位点序列分型 (cgMLST) 与溯源评价[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(6): 140-146.
- ZHU L P, ZHANG W C, YAN S G, et al. Evaluation of core genome multilocus sequence typing and traceability of bacteria [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(6): 140-146.
- [11] 贾慧琼, 阮陟. 全基因组测序在病原菌分型与溯源中的应用研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 949-967.
- JIA H Q, RUAN Z. Advances on whole genome sequencing-powered typing and source tracking of bacterial pathogens [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 949-967.
- [12] 岳雪瑶, 陈玉凤, 于鹏, 等. 大连市两种来源副溶血性弧菌毒力基因的分析[J]. 职业与健康, 2022, 38(2): 162-166.
- YUE X Y, CHEN Y F, YU P, et al. Research on virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* from two sources in Dalian City [J]. Occup and Health, 2022, 38(2): 162-166.
- [13] 陈佳璇, 刘巧谊, 张晶, 等. 2020—2022 年广州地区副溶血性弧菌病原学特征分析[J]. 热带医学杂志, 2024, 24(7): 1036-1039.
- CHEN J X, LIU Q Y, ZHANG J, et al. Pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Guangzhou from 2020 to 2022[J]. Journal of Tropical Medicine, 2024, 24(7): 1036-1039.
- [14] 曹文婷, 管红霞, 倪程佩, 等. 2016—2021 年无锡市副溶血性弧菌毒力基因和耐药性分析及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(10): 1482-1490.
- CAO W T, GUAN H X, NI C P, et al. Virulence genes, antibiotic resistance, and molecular typing study of *Vibrio parahaemolyticus* in Wuxi City from 2016 to 2021 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(10): 1482-1490.
- [15] 吕秋月, 刘大鹏, 栾明春, 等. 2018 年大连地区副溶血性弧菌耐药性及毒力基因分析[J]. 预防医学论坛, 2020, 26(9): 652-654.
- LYU Q Y, LIU D P, LUAN M C, et al. Analysis on drug resistance and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*, Dalian city, 2018 [J]. Preventive Medicine Tribune, 2020, 26(9): 652-654.
- [16] 陈伟伟, 洪锦春, 叶海梅, 等. 福建省 2018—2021 年副溶血性弧菌的病原学特征[J]. 海峡预防医学杂志, 2023, 29(2): 1-4, 13.
- CHEN W W, HONG J C, YE H M, et al. Etiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Fujian Province, 2018—2021 [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2023, 29(2): 1-4, 13.
- [17] 曲梅, 田祎, 黄瑛, 等. 2010—2019 年北京市副溶血性弧菌临床分离株血清型和耐药性分析[J]. 首都公共卫生, 2020, 14(6): 285-290.
- QU M, TIAN W, HUANG Y, et al. Serotype distribution and drug resistance analysis on clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing, 2010—2019 [J]. Capital Journal of Public Health, 2020, 14(6): 285-290.
- [18] CLAUDIO DM, CORINNA K, CHERINE U, et al. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 883-888.
- [19] DIPANJAN D, ANUPAM K, DHIRENDRA K, et al. Foodborne pathogenic vibrios: antimicrobial resistance [J]. Front Microbiol, 2021, 30: 12.
- [20] LIU Y Y, WANG Y, WALSH TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16: 161-168.
- [21] 乔涵, 游雪甫, 李聪然. 多黏菌素抗菌机理及耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(7): 770-777.
- QIAO H, YOU X F, LI C R. Advances on mechanisms of action and resistance of polymyxins [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(7): 770-777.