

文章编号: 1000-0615(2018)09-1446-08

DOI: 10.11964/jfc.20170610882

怀头鲇体表溃烂症病原鉴定及致病性分析

李绍戊, 王 荻, 曹永生, 刘红柏, 卢彤岩*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 为探讨黑龙江流域怀头鲇体表溃烂症的病因及防控措施, 本研究采用常规方法从患病鱼的肝脏、脾脏和肾脏等部位分离病原菌, 通过人工感染试验确定分离菌株的致病性, 并对菌株的基本形态、理化特性、分子特征、毒力基因携带情况及耐药性等进行了系统研究。结果显示, 从患病鱼体内分离得到3株病原菌, 分别命名为NY-8、NY-9和NY-12; 人工感染试验发现, NY-8和NY-9株对试验鱼有较强的致病力, NY-12株毒力较弱; 3株细菌混合感染后, 鱼体发病症状与临床自然发病症状一致, 试验鱼死亡率高达100%。综合理化特征和16S *rRNA*基因序列分析结果, 确定NY-8、NY-9和NY-12株分别为气单胞菌属的维氏气单胞菌、杀鲑气单胞菌和嗜水气单胞菌。5种毒力基因在3株气单胞菌中的分布表现为两种基因型, *hly+*/*aer+*/*act+*/*alt+*/*GCAT+*和*hly+*/*aer-*/*act+*/*alt+*/*GCAT+*, 同时携带5种毒力基因的NY-8和NY-9分离株致病性显著高于NY-12株。3株细菌在耐药谱上有一定差异性, NY-8和NY-9株均对4种氟喹诺酮类药物敏感, 对氨基糖苷类、呋喃类等药物耐药; NY-12株仅对左氧氟沙星和氟苯尼考等2种药物敏感。

关键词: 怀头鲇; 体表溃烂症; 气单胞菌; 混合感染; 毒力基因; 药敏试验

中图分类号: S 965; S 941.42

文献标志码: A

怀头鲇(*Silurus soldatovi*)俗称黑龙江六须鲇, 隶属于鲇形目(Siluriformes)、鲇科(Siluridae)、鲇属(*Silurus*), 广泛分布于黑龙江流域的松花江、乌苏里江等支流中, 因其具有耐低氧、生长速度快、易饲养、起捕率高等特点, 已成为黑龙江省重要的水产养殖品种。但在怀头鲇养殖过程中, 由于养殖密度和养殖环境等因素导致疾病时有发生, 给渔民造成严重的经济损失。国内对怀头鲇的研究多集中在繁殖生物学、养殖技术等方面, 缺乏对该养殖品种病害防治及病原生物学的研究报道, 宋林等^[1]于2006年简略概括了怀头鲇的常见疾病种类及防控措施。目前, 研究人员从其他鲇形目鱼类如胡鲇(*Clarias fuscus*)、斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)等体内已分离到多种可引起败血症、腐皮病和

腹水病等疾病^[2-5]的细菌性病原, 主要为气单胞菌属(*Aeromonas*)的嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)和温和气单胞菌(*A. sobria*)等。

气单胞菌属细菌广泛存在于水体环境中, 是水产动物重要的条件致病菌, 其致病力强弱与其携带的毒力基因密切相关, 国内外学者对此进行了大量研究。龙苏等^[2]报道了胡鲇源气单胞菌携带的6种毒力基因及其与菌株致病性的关系, 研究表明, *ahp*基因在菌株致病力中可能起重要作用。熊静等^[6]比较了7株鳗鲡(*Anguilla* spp.)源气单胞菌的8种胞外毒力因子种类和数量差异, 结果显示, *hlyA*可能是鳗源气单胞菌的重要致病因子。本研究对黑龙江流域患体表溃烂症的怀头鲇进行了病原菌的分离鉴定、致病

收稿日期: 2017-06-21 修回日期: 2017-08-16

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD1009)

通信作者: 卢彤岩, E-mail: lutongyan@hotmail.com

性、耐药性及其5种主要毒力基因携带情况的检测,旨在查明怀头鲈体表溃烂症的病原菌及其致病力与毒力因子的相关性,结合药敏分析结果,为该病的快速诊断及有效防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

患病怀头鲈采自黑龙江流域,体质量为150~200 g。病鱼体色花斑,体表皮溃烂,躯干部位有圆形或椭圆形病灶,严重者肌肉腐烂并露出骨头。剖检可见肝脏出血、脾脏肿大,伴有严重肠炎。健康怀头鲈购自黑龙江北渔科技开发有限公司,平均体质量为(190±10) g。

1.2 实验方法

病原菌形态观察及理化特性鉴定 无菌条件下从患病鱼肝脏、脾脏和肾脏处取样,划线接种于普通营养琼脂平板上,25℃倒置培养24 h,挑取单个优势菌落纯化培养,获得纯培养菌株NY-8、NY-9和NY-12株。肉眼观察菌落形态、大小、隆起度、颜色等,同时进行革兰氏染色,利用光学显微镜观察细菌形态特征;各项理化指标的测定参照法国生物梅里埃公司API 20NE试剂条进行。

人工感染试验 取健康怀头鲈于室内水族箱中暂养一周,期间水温为(18±1)℃,放养密度为6尾/m³。将NY-8、NY-9和NY-12菌株接种于TSA琼脂平板上,25℃恒温培养24 h后,用无菌生理盐水冲洗并参照麦氏比浊法将菌悬液稀释至1×10⁷ CFU/mL,同时制备3株细菌的混合液。每组随机选取怀头鲈10尾,通过腹腔注射方式进行人工感染试验。按照0.1 mL/50 g体质量腹腔注射3株菌及其等比混合菌液,同时设立注射等比例生理盐水的对照组,分别于腹腔注射后12、24、36、48及72 h观察并记录死亡情况及病理症状。取具有自然发病症状的人工感染鱼,在无菌条件下进行细菌再分离培养,并比较分离得到的细菌和攻毒用菌株的理化特征,若为同种细菌则说明用于人工感染的细菌为病原菌。

分离菌株16S rRNA分子鉴定 将NY-8、NY-9和NY-12菌株接种于TSB液体培养基中,25℃下220 r/min振荡培养18 h后离心收集菌体,按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细

菌基因组DNA并作为PCR模板。利用细菌16S rRNA基因通用引物^[7]27F: 5'-AGAGTTTG-ATCMTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-GRTACCT-TGTTACGACTT-3'对3株细菌的16S rRNA基因进行扩增。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环;72℃终延伸10 min。PCR产物经纯化后由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

将3株细菌的16S rRNA基因序列与GenBank数据库中已知的气单胞菌属不同种和其他水产常见致病菌16S rRNA基因序列比较分析,采用Clustal W软件进行多序列匹配排列(multiple alignments),用系统发生推断软件包MEGA 5.0进行系统发育分析^[8]。在Kimura-2-parameter模型的基础上,用Neighbor-Joining法构建分子系统树,自举分析(Bootstrap)1 000次重复检测分子系统树的置信度,缺失和不确定的位点在计算中被省略。

毒力基因检测 根据已有研究报道,针对气单胞菌属细菌的5种毒力基因进行PCR检测,包括甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因(*GCAT*)、气溶素基因(*aer*)、细胞毒性肠毒素基因(*act*)、细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)和溶血素基因(*hly*)(表1)。PCR反应体系为10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 μmol/L的上下游引物各1 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 U) 0.2 μL, DNA模板1 μL,加ddH₂O补足至25 μL。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;94℃变性30 s,55~62℃退火30 s,72℃延伸45 s,30个循环;72℃终延伸10 min。以1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,凝胶成像后观察条带大小。

药敏试验 采用微量肉汤稀释法测定NY-8、NY-9和NY-12菌株对15种抗菌药物的最小抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MIC)。将15种抗菌药物分别配成不同浓度的母液并保存于-20℃待用,实验中所用药物包括左氧氟沙星(levofloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、诺氟沙星(norfloxacin)、恩诺沙星(enrofloxacin)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、链霉素(streptomycin)、四环素(tetracycline)、强力霉素(doxycycline)、呋喃唑酮(furazolidone)、呋喃妥因(furadantin)、氯霉素(chloramphenicol)、氟苯尼考(flornfenicol)、甲砒霉素(thiamphenicol)和利福平(rifampicin)。

表 1 5个毒力基因PCR检测用引物信息

毒力基因 virulence genes	引物序列(5'—3') primer sequences	片段大小/bp fragment size	退火温度/°C annealing temperature	参考文献 references
<i>GCAT</i>	F: CTCCTGGAATC CCAAGTATCAG R: GGCAGGTTGAA CAGCAGTATCT	237	60	[9]
<i>aer</i>	F: GAGCGAGAAGGT GACCACCAAGAAC R: TTCCAGTCCCAC CACTTCACTTAC	417	60	[10]
<i>act</i>	F: AGAAGGTGACCA CCACCAAGAACA R: AACTGACATCGG CCTTGAATCT	232	55	[11]
<i>alt</i>	F: TGACCCAGTCCT GGCACGGC R: GGTGATCGATCA CCACCAGC	442	59	[12]
<i>hly</i>	F: GGCCGGTGGCCC GAAGATACGGG R: GGCGGCGCCGGA CGAGACGGG	597	62	[13]

2 结果

2.1 人工感染试验

从患病怀头鲂的肝脏、脾脏和肾脏中分离得到3株病原菌,分别命名为NY-8、NY-9和NY-12,并通过腹腔注射的方式进行人工感染试验。结果显示, NY-8和NY-9分离株对试验鱼有较强的致病力,以 1.0×10^7 CFU/mL菌液浓度攻毒后,其致死率分别达到50%和80%,而NY-12分离株仅导致20%的试验鱼死亡。将3株病原菌的混悬液通过腹腔注射方式感染试验鱼发现,混合感染可导致试验鱼100%的死亡率(表2)。另外,从人工感染发病的鱼体中重新分离到的菌株,经生化鉴定和分子鉴定表明其与人工感染菌株一致。

表 2 3株菌对健康怀头鲂的人工感染试验结果

菌株 strain	菌液浓度/ (CFU/mL) concentration	试验鱼 数量/尾 no. of fish	不同时间死亡数/尾 no. of death					死亡率/% mortality
			12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	
NY-8	1.0×10^7	10	2	2	1	0	0	50
NY-9	1.0×10^7	10	1	3	1	2	1	80
NY-12	1.0×10^7	10	0	1	0	1	0	20
混合感染 co-infection	1.0×10^7	10	2	5	2	1	0	100
对照 control	0	10	0	0	0	0	0	0

混合感染导致的患病鱼表现出与自然发病症状一致:体表皮肤溃烂、躯干部位有不同形状的溃疡病灶,剖检可见试验鱼肝脏、脾脏肿大,肝脏上有出血点。NY-9株单一感染可引起试验鱼体表溃烂,而NY-8和NY-12株单一感染仅有体表和内脏出血、腹水和肠炎症状。

2.2 理化特征

3株细菌在TSA平板上28 °C培养24 h后,菌落光滑、微凸、圆整、无色,革兰氏染色结果显示为阴性菌。经API 20NE系统鉴定(表3), NY-8、NY-9和NY-12菌株分别为维氏气单胞菌、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和嗜水气单胞菌。

2.3 16S rRNA基因序列和系统发育学分析

PCR扩增结果显示, NY-8、NY-9和NY-12菌株的16S rRNA基因片段大小约1 400 bp,在GenBank中的登录序列号分别为KT215605、KT215606和KT215607。同源性检索结果显示,3株细菌与气单胞菌属细菌的核苷酸同源性最高。

从NCBI核酸数据库中选取16株水产动物致病菌的16S rRNA基因序列进行系统发育学分析,并利用MEGA 5.0软件构建系统进化树。结果显示, NY-8与维氏气单胞菌聚为一支, NY-9与杀鲑气单胞菌聚为一支, NY-12与嗜水气单胞菌聚为一支;3株细菌与黄杆菌属(*Flavobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的细菌遗传距离较远(图1)。综合API 20NE系统鉴定和16S rRNA基因序列分析结果, NY-8、NY-9和NY-12分别鉴定为维氏气单胞菌、杀鲑气单胞菌和嗜水气单胞菌。

2.4 菌株毒力基因检测及其与致病力的关系

PCR结果显示,3株病原菌均携带*hly*、*act*、*alt*和*GCAT*基因, NY-8和NY-9菌株中*aer*基因扩增结果呈弱阳性,而NY-12菌株缺失*aer*基因(图2)。攻毒试验结果表明, NY-9的致病力最高,达到80%,其次为NY-8菌株, NY-12菌株对试验鱼的致死率仅为20%。

2.5 药敏试验

3株菌对15种抗菌药物的耐药谱稍有不同: NY-8和NY-9均对左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星和恩诺沙星等4种氟喹诺酮类药物敏感,对氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素等3种氯霉素类药

表 3 3株细菌的理化特征鉴定

Tab. 3 Characterization of physicochemical properties of three isolated strains

鉴定项目 characteristics	菌株 strain		
	NY-8	NY-9	NY-12
KNO ₃	+	+	+
色氨酸 tryptophan	+	-	+
葡萄糖酸化 glucose oxidation	+	+	+
精氨酸 arginine	-	-	+
脲素 urea	-	-	-
七叶灵 esculin	+	+	+
明胶 gelatin	+	+	+
对硝基-β-D甲基半乳糖 p-nitrophenyl β-D-galactopyranoside	+	-	+
葡萄糖同化 glucose assimilation	+	+	+
阿拉伯糖 arabinose	-	-	+
甘露糖 mannose	+	-	+
甘露醇 mannitol	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺 N-acetylglucosamine	+	+	+
麦芽糖 maltose	+	+	+
葡萄糖酸盐 gluconate	+	+	+
癸酸 capricacid	+	-	+
己二酸 adipate	-	-	-
苹果酸 malic acid	+	+	+
柠檬酸 citric acid	+	-	-
苯乙酸 phenyl acetic acid	-	-	-
氧化酶 oxidase	+	+	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性

Notes: “+” indicates positive; “-” indicates negative

物的耐药性存在差异; NY-12仅对左氧氟沙星和氟苯尼考敏感; 3株菌均对氨基糖苷类药物和喹诺酮类药物耐药(表4)。

3 讨论

3.1 气单胞菌感染引起的怀头鲂细菌性疾病

气单胞菌广泛存在于河流、湖泊、池塘、海水等自然生态环境中, 该属包括嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单

胞菌(*A. caviae*)和杀鲑气单胞菌等20多个种, 感染水生动物后, 根据病原和感染动物的不同, 患病动物通常表现为出血、溃疡、肿胀、肠炎等病征。国内外学者对气单胞菌感染水生动物引发的疾病进行了大量研究报道。嗜水气单胞菌可感染大多数海淡水养殖鱼类并导致其出血、溃疡, 剖检可见腹水和肠炎。王玉娟等^[3]从患出血病的革胡鲂(*C. gariepinus*)体内分离到一株高致病性嗜水气单胞菌, 该菌株对革胡鲂的半致死浓度为 6.32×10^6 CFU/mL。龙苏等^[2]从胡鲂体内分离到嗜水气单胞菌和温和气单胞菌, 但是两种病原感染引起的病鱼症状十分相似, 因此认为这可能是由于“一症多病”现象造成的。维氏气单胞菌可感染斑点叉尾鲷、鲤(*Cyprinus carpio*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、大鲵(*Andrias davidianus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等水生动物, 汪开毓等^[14]通过对四川主要斑点叉尾鲷养殖地区的病害调查发现, 维氏气单胞菌对该鱼的致病率非常高, 已经严重危害斑点叉尾的产业发展。杀鲑气单胞菌主要引起鲑科(*Salmonidae*)鱼类疔疮病, 其感染鲑形目鱼类的报道较少, Sumino等^[15]研究表明, 杀鲑气单胞菌可感染低眼无齿鲢(*Pangasianodon hypophthalmus*)并引起疔疮病, Thomas等^[16]同样发现杀鲑气单胞菌对胡鲂有很强的致病性。本研究从怀头鲂体内分离得到一株杀鲑气单胞菌, 人工感染试验表明, 该菌株对怀头鲂有很高的致病性, 且感染导致的病症与自然发病临床症状相似; 分离株NY-8和NY-12人工感染试验鱼后仅表现为体表和内脏出血、腹水和肠炎等症状, 未见体表有明显溃疡病灶。这与已有的报道一致, 即嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌感染鱼体后有时仅出现败血症或腹水症状。因此, 在水产动物病害临床诊断过程中, 需结合临床症状和实验室病原分离鉴定方可对疾病进行确诊并制定相应防控措施。

3.2 细菌混合感染对鱼体的影响

当鱼体同时或继发感染两种或以上病原时称为混合感染(co-infection), 其可对鱼体产生协同或抑制性的毒害作用。Kotob等^[17]将鱼类混合感染分为两大类: 同类病原混合感染和异类病原混合感染, 前者包括细菌/细菌、病毒/病毒和寄生虫/寄生虫混合感染, 而后者包括寄生虫/细菌、寄生虫/病毒、细菌/病毒和真菌/细菌混合感

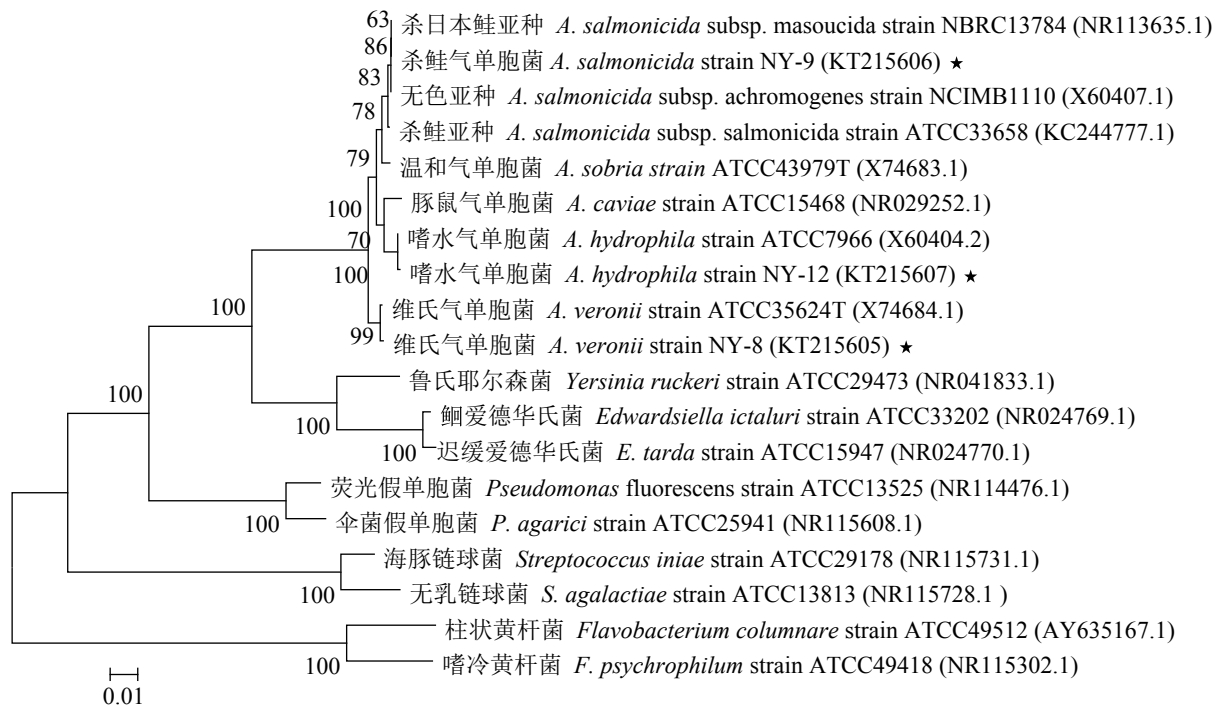


图1 基于16S rRNA序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences

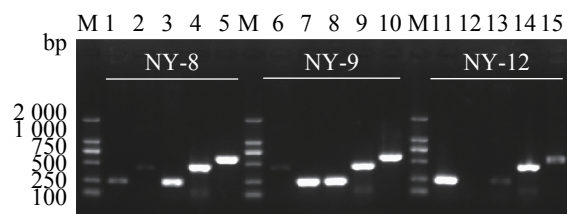


图2 5种毒力基因在3株气单胞菌中的扩增结果

M. DNA分子量Marker DL2000; 泳道1、7、11. *GCAT*基因扩增结果; 泳道2、6、12. *aer*基因扩增结果; 泳道3、8、13. *act*基因扩增结果; 泳道4、9、14. *alt*基因扩增结果; 泳道5、10、15. *hly*基因扩增结果

Fig. 2 Amplification of five virulence genes in three *Aeromonas* spp. strains

M. molecular Marker DL2000; lane 1, 7 and 11. amplification of *GCAT* gene; lane 2, 6 and 12. amplification of *aer* gene; lane 3, 8 and 13. amplification of *act* gene; lane 4, 9 and 14. amplification of *alt* gene; lane 5, 10 and 15. amplification of *hly* gene

染等。细菌混合感染(bacterial co-infection)研究报道较多,且大多起到协同促进致病性的作用。Dong等^[18]在条纹鲈鱼中发现了鲷爱德华氏菌和柱状黄杆菌共感染情况,并通过肌肉注射和腹腔注射两种攻毒方式比较了单一病原和两种病原对条纹鲈幼鱼的致病性,研究表明,两种病原混合感染可引发高死亡率且患病鱼与临床症状一致。Crumlish等^[19]通过人工感染试验研究了

鲷爱德华氏菌和嗜水气单胞菌混合感染对条纹鲈的致病性,浸泡攻毒后两种病原混合感染可导致试验鱼95%的死亡率,单一感染鲷爱德华氏菌的死亡率为80%,单一感染嗜水气单胞菌的死亡率仅为10%,因此认为鲷爱德华氏菌是条纹鲈的主要病原菌,而嗜水气单胞菌是条件病原菌。龙苏等^[2]从暴发性死亡的胡鲈体内分离到嗜水气单胞菌和温和气单胞菌,且3株嗜水气单胞菌分离株对试验鱼的致死率达到76.67%~100%,但未进行混合感染致病性的研究。本研究中,我们从患病怀头鲈体内分离到3种气单胞菌属细菌,维氏气单胞菌(NY-8)、杀鲑气单胞菌(NY-9)和嗜水气单胞菌(NY-12),人工感染试验表明,3种病原混合感染可导致试验鱼死亡率高达100%,NY-9、NY-8和NY-12单一感染导致的死亡率分别为80%、50%和20%,混合感染在此次怀头鲈发病中起到了协同促进作用。值得一提的是,NY-9分离株(杀鲑气单胞菌)单一感染对怀头鲈的致病性最高,这在以往研究报道中较为少见,Thomas等^[16]研究表明,杀鲑气单胞菌对胡鲈有很强的致病性,Sumino等^[15]指出杀鲑气单胞菌是越南条纹鲈的重要致病菌,并评价了榄仁树(*Terminalia catappa*)树叶提取物对杀鲑气单胞菌的抑

表4 3菌株对15种抗菌药物的敏感性试验

Tab. 4 Antimicrobial susceptibility of 3 strains to 15 kinds of antibiotics

药物 drugs	最小抑菌浓度 / (μg/mL) minimum inhibitory concentration					
	NY-8		NY-9		NY-12	
	敏感性 sensitivity	敏感性 sensitivity	敏感性 sensitivity	敏感性 sensitivity	敏感性 sensitivity	敏感性 sensitivity
左氧氟沙星 levofloxacin	0.015	S	0.015	S	1	S
环丙沙星 ciprofloxacin	0.015	S	0.015	S	1	I
诺氟沙星 norfloxacin	0.125	S	0.06	S	4	R
恩诺沙星 enrofloxacin	0.015	S	0.015	S	4	R
庆大霉素 gentamicin	16	R	8	R	>64	R
卡那霉素 kanamycin	32	R	16	R	>128	R
链霉素 streptomycin	128	R	16	R	>128	R
四环素 tetracycline	0.3	R	0.3	R	40	R
强力霉素 doxycycline	0.15	S	0.3	S	10	R
呋喃唑酮 furazolidone	>64	R	>64	R	>64	R
呋喃妥因 furadantin	>128	R	>128	R	>128	R
氯霉素 chloramphenicol	2	R	1	S	>64	R
氟苯尼考 florfenicol	1	S	2	R	1	S
甲磺霉素 thiamphenicol	4	R	1	S	>64	R
利福平 rifampicin	2.5	S	5	R	5	R

注: “S”表示高度敏感; “M”表示中度敏感; “R”表示不敏感
Notes: “S”. high sensitive; “M”. medium sensitive; “R”. resistant

菌效果。结合攻毒试验结果和已有报道, 我们认为杀鲑气单胞菌可能是本次怀头鲂细菌混合感染的原生病原菌, 而维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌为继发感染或次级病原菌。

3.3 分离菌株毒力基因及其与致病力的相关性

已有研究表明, 气单胞菌属细菌的致病力与其所携带的多个毒力基因关系密切, 其主要毒力基因包括溶血素、气溶素、肠毒素、胞外蛋白酶、外膜蛋白、脂多糖等, 对毒力基因的检测有助于确定病原菌潜在的致病性。胡鲂源嗜水气单胞菌有 $act+/aha1+/hly+/alt+/ahp+/aer+$ 和 $act+/aha1+/hly+/alt+/ahp-/aer+$ 2种毒力基因型, 前者对胡鲂的致死率达到100%; 毒力基因型为 $act+/aha1-/hly-/alt-/ahp-/aer+$ 的胡鲂源温和气单胞菌致病力显著低于 $act+/aha1+/hly+/alt+/ahp-/aer+$ 型菌株^[2]; 黄钧等^[20]报道, 黄沙鳖(*Truogx*

sinensis)源嗜水气单胞菌主要毒力基因型为 $hly+/aer+/alt+/act+/ahal+/ahp+$, 而温和气单胞菌为 $hly+/aer+/alt-/act+/ahal+/ahp+$ 基因型, 同时携带 hly 基因的菌株其致病力更强。本研究分离的3株病原菌共包含2个毒力基因型, $hly+/aer+/act+/alt+/GCAT+$ 和 $hly+/aer-/act+/alt+/GCAT+$, 部分毒力基因在菌株中的扩增强弱差异较大, 其表达量差异是否会对菌株致病性有显著影响仍需进一步研究。NY-8和NY-9分离株同时携带5种毒力基因且致病性显著高于NY-12株, 推测气单胞菌的致病力是由多种毒力基因共同作用的结果。

参考文献:

- [1] 宋林, 李秋, 鄂春宇, 等. 怀头鲂疾病的防治[J]. 科学养鱼, 2006(9): 55.
Song L, Li Q, E C Y, et al. Prevention and control of diseases in *Silurus soldatovi*[J]. Scientific Fish Farming, 2006(9): 55(in Chinese).
- [2] 龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 等. 胡子鲈致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 308-317.
Long S, Han S Y, Niu Z W, et al. Isolation and Identification of pathogenic *Aeromonas* in *Clarias fuscus* and analysis of the correlation between its pathogenicity and virulence genotypes[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 308-317(in Chinese).
- [3] 王玉娟, 王秀华, 曲宪成, 等. 革胡子鲈出血性败血症病原菌的分离鉴定[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 32-37.
Wang Y J, Wang X H, Qu X C, et al. Isolation and identification of a bacterium associated with haemorrhagic septicaemia in walking catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(3): 32-37(in Chinese).
- [4] 黄艳华, 施金谷, 黄钧, 等. 胡子鲈腐皮病病原菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 广西畜牧兽医, 2013, 29(1): 8-11.
Huang Y H, Shi J G, Huang J, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Clarias fuscus* with rotten skin disease[J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 29(1): 8-11(in Chinese).
- [5] 刘韬, 王二龙, 汪开毓, 等. 河南中牟地区斑点叉尾鲷突发性败血症病原分离及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(1): 53-57.
Liu T, Wang E L, Wang K Y, et al. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* from *Ictalurus*

- punctatus*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(1): 53-57(in Chinese).
- [6] 熊静, 赖晓健, 余钦, 等. 7株鳗鲡致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 76-85.
- Xiong J, Lai X J, Yu Q, *et al.* Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(1): 76-85(in Chinese).
- [7] Lane D J. 16S/23S *rRNA* sequencing[M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: Wiley, 1991: 115-175.
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-273.
- [9] Mendes-Marques C L, Hofer E, Leal N C. Development of duplex-PCR for identification of *Aeromonas* species [J]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013, 46(3): 355-357.
- [10] Nam I Y, Joh K. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR[J]. Journal of Microbiology, 2007, 45(4): 297-304.
- [11] Kingombe C I, Huys G, Tonolla M, *et al.* PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12): 5293-5302.
- [12] Nawaz M, Khan S A, Khan A A, *et al.* Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 327-331.
- [13] Heuzenroeder M W, Wong C Y F, Flower R L P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(1): 131-136.
- [14] 汪开毓, 范方玲, 肖丹, 等. 鱼源维氏气单胞菌的生物特性和基因分型[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(4): 367-374.
- Wang K Y, Fan F L, Xiao D, *et al.* Biological characteristics and genotyping of *Aeromonas veronii* from fish[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(4): 367-374(in Chinese).
- [15] Sumino, Supriyadi A, Wardiyanto. The effectiveness of Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) leave extract for the treatment of *Aeromonas salmonicida* infection in catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*)[J]. Jurnal Sain Veteriner, 2013, 31(1): 79-88.
- [16] Thomas J, Jerobin J, Seelan T S J, *et al.* Studies on pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* in catfish *Clarias batrachus* and control measures by neem nanoemulsion[J]. Aquaculture, 2013, 396-399: 71-75.
- [17] Kotob M H, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, *et al.* The impact of co-infections on fish: a review[J]. Veterinary Research, 2016, 47: 98.
- [18] Dong H T, Nguyen V V, Phiwsaiya K, *et al.* Concurrent infections of *Flavobacterium columnare* and *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand[J]. Aquaculture, 2015, 448: 142-150.
- [19] Crumlish M, Thanh P C, Koesling J, *et al.* Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(9): 717-722.
- [20] 黄钧, 黄艳华, 胡大胜, 等. 黄沙鳖白底板病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 844-854.
- Huang J, Huang Y H, Hu D S, *et al.* Characterization of white plastron disease pathogens and detection of six known virulence genes in *Truogx sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 844-854(in Chinese).

Identification of the causative pathogen causing skin-ulcer in *Silurus soldatovi* and its pathogenicity

LI Shaowu, WANG Di, CAO Yongsheng, LIU Hongbai, LU Tongyan*

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: In order to investigate the cause and prevention measure of skin-ulcer of *Silurus soldatovi* in Heilongjiang River, the pathogenic bacteria were isolated from the liver, spleen and kidney of diseased *S. soldatovi* with conventional methods. Artificial infection experiment was carried out to prove the pathogenicity of isolated strains. The morphological, biochemical, molecular and characteristics, virulence genes and antimicrobial resistance to bacteria were examined. The results indicated that 3 pathogenic strains were isolated from diseased fish, named NY-8, NY-9 and NY-12, respectively. Artificial infection showed that NY-8 and NY-9 were highly pathogenic to experimental fish while NY-12 strain was less virulent to fish. Co-infection of 3 strains caused 100% mortality of fish with the same clinical signs as the natural case. Combining the biochemical and molecular characteristics of 3 strains, NY-8, NY-9 and NY-12 were determined to be *Aeromonas veronii*, *A. salmonicida* and *A. hydrophila*, respectively. The three strains contained two virulence genotypes, including *hly+/aer+/act+/alt+/GCAT+* and *hly+/aer-/act+/alt+/GCAT+*. The pathogenicity of NY-8 and NY-9 carrying all five virulence genes was significantly higher than that of NY-12. Antimicrobial susceptibility tests showed that there were some differences in drug resistance spectrum in 3 strains. NY-8 and NY-9 were sensitive to 4 kinds of fluoroquinolones and resistant to aminoglycoside and nitrofurans antibiotics, while NY-12 was only sensitive to levofloxacin and florfenicol.

Key words: *Silurus soldatovi*; skin-ulcer; *Aeromonas* spp.; co-infection; virulence genes; antimicrobial susceptibility

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD1009)