

大黄鱼感染致病弧菌的检测及其病害的预测预警

葛明峰, 郑晓叶, 王国良*

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:为预防与控制大黄鱼溃疡病的发生,本研究利用特异多重 PCR 技术,对象山县养殖大黄鱼的 3 种致病弧菌感染情况进行了流行病学调查。每月在各定点网箱组随机采集大黄鱼肝、肾、脾、肌肉等组织进行感染情况的检测。结果显示,3 种致病弧菌对大黄鱼的感染率存在一定的差异性。溶藻弧菌、哈维弧菌对大黄鱼的感染率整体高于副溶血弧菌;从感染组织分析,与肝脏、肾脏相比 3 种致病弧菌更易感染肌肉、脾脏;3 种致病弧菌对不同鱼龄的大黄鱼感染率各不相同。研究还表明,3 种致病弧菌在各个采样时间点均有感染,其中 7—9 月为弧菌感染高峰期,而台风后的感染率较台风前都有一定提高。另外,根据大黄鱼溃疡病发生与 3 种致病弧菌感染率关系的研究可知,在大黄鱼溃疡病暴发前几天,弧菌的感染率都会显示出较高数值。因此,可以通过 3 种致病弧菌对大黄鱼感染的分子流行病学调查与分析来预测预警病害的发生和流行。

关键词:大黄鱼;弧菌;流行病学;预测预警;多重 PCR

中图分类号:S 941.42

文献标志码:A

在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 养殖生产中,病害问题是制约其产业发展的主要瓶颈,而细菌性病害仍然是主要的危害类型。目前已明确引起大黄鱼溃疡病的病原主要有溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、哈维弧菌 (*V. harveyi*) 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)^[1-2]。许多学者对大黄鱼溃疡病防控也进行了相关研究^[3-4],但是应用于养殖生产中的病害防治效果甚差。究其原因,大多是病害暴发后的被动性防治,而不是提前主动预防,其问题在于缺乏对大黄鱼病害流行规律的掌握以及病原感染与环境变化之间关系的认识,导致没能在最适时机实施病害防治措施。

鱼类的病原生物在早期少量感染、无临床症状,往往难以察觉,只有当病原生物在鱼体中繁殖积累到一定程度,开始影响鱼体正常生活及鱼体组织受到损伤时,才会被察觉。因此,依据疾病的流行病学进行早期检测病原生物,分析病原生物感染状况及其消长趋势,实现病害的预测预警就显得至关重要。

鉴于上述情况,本研究以引起养殖大黄鱼溃疡病的 3 种致病弧菌为对象,采用本实验室建立的针对这 3 种致病弧菌的特异性多重 PCR 检测技术^[5],自 2012 年至 2013 年开展了为期 2 年的分子流行病学调查与分析,为养殖大黄鱼溃疡病的预测预警及制订有效防控技术提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

养殖大黄鱼均采自宁波象山黄避岙乡宁港水产养殖有限公司,选定投喂鱼虾等鲜活饵料的大黄鱼网箱 3 组,分别为 1 龄鱼、2 龄鱼、3 龄鱼。2012 年采样时间从 5 月 16 日至 11 月 20 日共 11 次,2013 年采样时间从 5 月 11 日至 12 月 14 日共 15 次,每次采样从上述 3 组网箱中各随机取 10 尾大黄鱼。

1.2 菌株来源

作为阳性对照的溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈维

收稿日期:2014-07-23 修回日期:2014-10-30

资助项目:教育部长江学者与创新团队 (IRT0734);国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903029);浙江省自然科学基金 (LY13C190005);大学生科技成果创新 (2013R405031)

通信作者:王国良, E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

弧菌等均为本实验室历年从大黄鱼体内分离所得,并已通过分子鉴定确认为该菌种。

1.3 主要试剂和仪器

2 × GoldStar Best MasterMix、RNase-Free Water (北京康为), 琼脂糖 (GENERAY BIOTECH), SDS、CTAB、TE Buffer、异戊醇 (25:24:1)、氯仿:异戊醇 (24:1) (北京索莱宝), 6 × loading buffer、100 bp DNA Ladder、NaCl、RNA 酶、蛋白酶 K 溶液 (大连宝生物), OSE-Y10 组织研磨器 (北京天根), 高速冷冻离心机、PCR 扩增仪 (Eppendorf), 稳压稳流定时电泳仪 (DYY-Ⅲ 8 型, 北京六一), 凝胶图像处理系统 (Gel Doc™, BIO-RAD)。

1.4 大黄鱼总基因组的提取

每组每尾大黄鱼在无菌条件下, 分别用无菌剪刀剪取约 0.2 g 的肝、脾、肾、肌肉等组织样品, 放入已灭菌的 2 mL 离心管中。用研磨器将组织震碎, 后续步骤参照《分子克隆》第三版^[6]经典的酚氯法提取 DNA。提取的 DNA 于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.5 3 种致病弧菌多重 PCR 检测

以大黄鱼各组织 DNA 为检测模板, 以溶藻弧菌、哈维弧菌、副溶血弧菌基因组 DNA 为阳性模板, RNase-Free Water 为阴性模板, 进行多重 PCR 扩增检测。

多重 PCR 反应体系: 溶藻弧菌引物 (10 μmol/L) 1 μL, 哈维弧菌引物 (10 μmol/L) 1 μL, 副溶血弧菌引物 (10 μmol/L) 0.4 μL, 2 × GoldStar Best Master Mix (包含 Mg²⁺) 12.5 μL, 模板 1 μL, 用 RNase-Free Water 补足至 25 μL。

PCR 循环参数: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、57 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 80 s, 4 个循环后, 退火温度每降低 1 °C 进行 4 个循环, 退火温度到 54.8 °C 时进行 20 个循环, 总共进行 32 个循环; 68 °C 延伸 7 min; 于 4 °C 下保存。

扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 凝胶成像系统结果显示 3 种弧菌的特异性扩增片段分别为溶藻弧菌 737 bp, 哈维弧菌 382 bp, 副溶血弧菌 271 bp。如果有上述核酸条带, 说明样品中有对应弧菌感染, 反之则没有。为防止非特异性扩增干扰实验结果, 随机挑选阳性条带去测序, 检测是否为该 3 种弧菌, 以确保检测样品的准确性。

1.6 大黄鱼溃疡病发生的调查

在象山黄避岙乡宁港水产养殖有限公司采样期间, 同时对采样网箱大黄鱼进行溃疡病发生的跟踪分析和统计。即分别于 2012 年、2013 年实验期间, 对网箱养殖大黄鱼溃疡病进行实时检测与诊断, 并将统计数据与 3 种致病弧菌的感染率进行相关性分析, 来探讨大黄鱼溃疡病的发生与 3 种致病弧菌感染之间的关系。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼 3 种致病弧菌的感染率

2012 年共检测大黄鱼 326 尾, 其中 57 尾检测到溶藻弧菌, 感染率为 17.48%; 67 尾检测到哈维弧菌, 感染率 20.55%; 副溶血弧菌感染率相对于溶藻弧菌、哈维弧菌较低, 为 12.88% (42/326)。2013 年共检测大黄鱼 450 尾, 其中 138 尾检测到溶藻弧菌, 感染率为 30.67%; 101 尾检测到哈维弧菌, 感染率为 22.44%; 副溶血弧菌感染率为 18.22% (82/450) (图 1)。

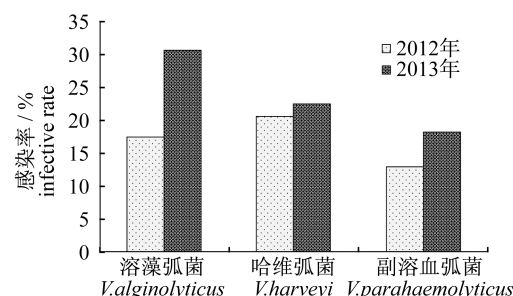


图 1 2012、2013 年养殖大黄鱼 3 种致病弧菌感染结果
Fig.1 Result of three pathogenic vibrio infections in cultured *L. crocea* in 2012 and 2013

根据实验结果, 2013 年大黄鱼 3 种致病弧菌的感染率均高于 2012 年。同时通过这 2 年检测数据可知, 溶藻弧菌和哈维弧菌的感染率都高于副溶血弧菌。据此推测相比副溶血弧菌, 溶藻弧菌和哈维弧菌更有可能成为象山黄避岙一带网箱养殖大黄鱼溃疡病暴发的潜在病原菌。

2.2 3 种致病弧菌对不同龄鱼的感染率

2012 年的统计结果: 溶藻弧菌对 2 龄鱼的感染率最高, 为 21.10% (23/109), 其次为 1 龄鱼, 感染率为 17.27% (19/110), 3 龄鱼的感染率最低, 为 14.02% (15/107)。哈维弧菌在 3 组不同龄鱼的感染率较溶藻弧菌有较大的不同, 其对 3 龄鱼的感染率 31.78% (34/107) 明显高于 1 龄鱼

19.09% (21/110) 和 2 龄鱼 11.01% (12/109)。副溶血弧菌感染率同哈维弧菌表现出相同的趋势,但感染率普遍降低,分别为 1 龄鱼 11.82%, 2 龄鱼 7.34%, 3 龄鱼 17.76% (图 2)。

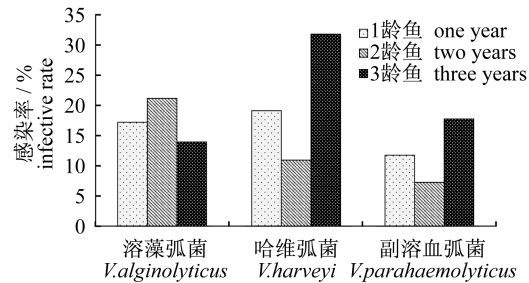


图 2 2012 年 3 种致病弧菌对不同龄鱼感染率结果
Fig. 2 Result of three pathogenic vibrio infections in different age of fish in 2012

2013 年的统计结果:溶藻弧菌、哈维弧菌对不同龄鱼的感染率同 2012 年趋势相同,但感染率均较 2012 年偏高。具体为溶藻弧菌对 2 龄鱼感染率最高,为 36% (54/150),其次为 1 龄鱼的 29.33% (44/150) 和 3 龄鱼的 26.67% (40/150)。哈维弧菌对各个龄鱼的感染率分别为 23.33% (35/150)、18.67% (28/150) 和 28.00% (42/150)。副溶血弧菌对 3 龄鱼的感染率最高,为 24.67% (37/150),与 2012 年结果不同的是其 1 龄鱼的感染率 12.00% (18/150) 较 2 龄鱼 18.00% (27/150) 低 (图 3)。

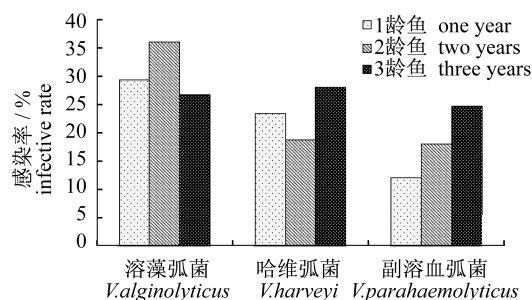


图 3 2013 年 3 种致病弧菌对不同龄鱼感染率结果
Fig. 3 Result of three pathogenic vibrio infection in different age of fish in 2013

结合两年数据分析可知,溶藻弧菌对 1 龄鱼、2 龄鱼的感染率大于 3 龄鱼,而哈维弧菌、副溶血弧菌对 3 龄鱼的感染率都较 1、2 龄鱼高。另外,哈维弧菌对 1 龄鱼的感染率大于 2 龄鱼,而副溶血弧菌在这两年检测中对 1、2 龄鱼的感染率互有

高低。

2.3 3 种致病弧菌在不同组织中的感染率

2012 年同 2013 年实验结果类似,仅以 2013 年数据显示 (图 4)。溶藻弧菌对肌肉的感染率最高,为 18.44% (83/450),对肝、脾、肾的感染率差别不大,分别为 12.00% (54/450) 和 13.56% (61/450)、11.33% (51/450)。哈维弧菌对肌肉的感染率也最高,为 11.33% (51/450),其余依次为脾脏 8.89% (40/450)、肾脏 6.22% (28/450) 和肝脏 3.11% (14/450)。副溶血弧菌对脾脏、肌肉的感染率分别为 8.00% (36/450)、7.11% (32/450),明显高于肝脏的 4.89% (22/450) 及肾脏的 3.11% (14/450)。

分析表明,相对于肝脏、肾脏,3 种致病弧菌均较易感染大黄鱼的脾脏、肌肉组织,后 2 种组织的弧菌检出率均高于前 2 种组织。

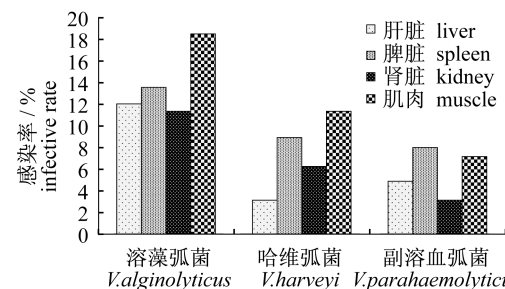


图 4 2013 年 3 种致病弧菌对不同组织感染率结果
Fig. 4 Result of three pathogenic vibrio infections in different tissues of fish in 2013

2.4 3 种致病弧菌感染大黄鱼的时空分布

3 种致病弧菌在各个时间点均有感染大黄鱼。比较 3 种致病弧菌,哈维弧菌和溶藻弧菌的感染率在整体趋势上高于副溶血弧菌,而在每个采样时间点,3 种致病弧菌感染率又有所差异。溶藻弧菌在 2012 年 8 月 13 日和 8 月 29 日两个时间段感染率最高,达 20.69%,哈维弧菌在 8 月 29 日感染率最高,达 37.93%,副溶血弧菌最高感染率 26.67% 出现在 6 月 27 日 (表 1)。另外,由于 8 月 8 日台风“海葵”在象山登陆,对网箱养殖大黄鱼造成了很大影响。溶藻弧菌在台风后的感染率为 20.69%,高于台风前的感染率 16.67%,而哈维弧菌、副溶血弧菌台风前后的感染率变化更加明显,分别为 6.67% (8 月 6 日) 对比 31.03% (8 月 13 日) 和 6.67% 对比 20.69%。

表 1 2012 年大黄鱼不同采样时间的 3 种弧菌感染结果
Tab.1 Result of three vibrio infections in
L. crocea in different times in 2012

日期 date	感染率/% infective rate		
	溶藻弧菌	哈维弧菌	副溶血弧菌
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
05-16	10.71	7.14	7.14
06-05	6.67	10	10
06-27	16.67	33.33	26.67
07-16	20	13.33	16.67
08-06	16.67	6.67	6.67
08-13	20.69	31.03	20.69
08-29	20.69	37.93	10.34
09-20	16.67	30	6.67
10-09	20	36.67	10
10-31	13.33	10	10
11-20	10	10	6.67

2013 年不同采样时间点 3 种致病弧菌的感染率总体趋势与 2012 年类似,即在 6—10 月 3 种致病弧菌表现出较高感染率,5、11、12 月的感染率均较低(表 2)。2013 年 2 次台风也使得象山养殖大黄鱼感染率较台风前要高。7 月 13 日台风“苏力”给象山带来了较大风力,表现在 7 月 26 日 3 种致病弧菌的感染率均高于 7 月 10 日;8 月 21 日台风“潭美”影响象山,8 月 26 日 3 种致病弧菌感染率对比 8 月 10 日分别提高了 16.66、13.33、和 10 个百分点。

表 2 2013 年大黄鱼不同采样时间的 3 种弧菌感染结果
Tab.2 Result of three vibrio infections in
L. crocea in different times in 2013

日期 date	感染率/% infective rate		
	溶藻弧菌	哈维弧菌	副溶血弧菌
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
05-10	13.33	3.33	3.33
05-25	23.33	3.33	6.67
06-09	33.33	10	13.33
06-24	73.33	13.33	13.33
07-10	26.67	13.33	16.67
07-26	30	46.67	26.67
08-10	26.67	30	16.67
08-26	43.33	43.33	26.67
09-11	40	10	16.67
09-27	20	60	23.33
10-14	20	33.33	26.67
11-01	16.67	26.67	13.33
11-14	13.33	3.33	13.33
11-30	10	13.33	6.67
12-14	10	6.67	3.33

2.5 大黄鱼溃疡病发生与 3 种致病弧菌感染的关系

经调查统计,象山黄避岙乡宁港水产养殖公司在 2012、2013 年大黄鱼溃疡病发生的时间与 3 种致病弧菌感染大黄鱼的时间存在关联性。

2012 年 7 月 1 日大黄鱼溃疡病开始流行,7 月 8 日起病情加重并普遍流行,7 月 16 日达到高峰,而在 6 月 27 日实验数据显示溶藻弧菌、哈维弧菌、副溶血弧菌的感染率较 5 月 16 日、6 月 5 日都有明显提高,分别为 16.67%、33.33%、26.67%。这可能预示着病害的潜在暴发,而 7 月 1 日的发病流行也吻合了弧菌感染率增长趋势。

8 月 8 日台风“海葵”登陆象山,对养殖网箱造成很大影响。8 月 13 日部分鱼开始死亡并持续到 8 月 23 日。感染率情况显示:3 种弧菌 8 月 13 日(台风登陆后 5 d)的感染率为 20.69%、31.03%和 20.69%,明显大于 8 月 6 日(台风登陆前)的感染率 16.67%、6.67%和 6.67%。

9 月 15 日开始,受天文大潮及 16 号台风“三巴”影响,大黄鱼呈现严重的烂尾、擦皮等症状,死亡率较高,持续至 10 月 20 日才稳定。感染率检测结果也表明:在 9 月 20 日及 10 月 9 日 2 次采样中,3 种弧菌的感染率均保持较高的态势。从 10 月 31 日到 11 月 20 日,感染率开始逐步降低。而该时段已很少有大黄鱼溃疡病发生。

2013 年 6 月 24 日部分鱼出现批量死亡,通过解剖分离获得 2 株细菌,经鉴定为溶藻弧菌和哈维弧菌,而此时 3 种弧菌的感染率与之前 3 次采样数据相比,达到了一个较高数值,其中溶藻弧菌的感染率更是高达 73.33%。

7 月 13 日受台风“苏力”的影响,大黄鱼陆续出现死亡。8 月 1 日经细菌分离、鉴定为哈维弧菌,而此阶段(7 月 26 日)哈维弧菌的感染率也相对较高,达到 46.67%,明显高于 7 月 10 日 13.33%的感染率。

8 月 21—22 日台风“潭美”影响象山,在台风登陆后的 2 d 开始,大黄鱼出现头、尾或躯干溃疡及死亡,之后几天大黄鱼发病及死亡现象较普遍。9 月 11 日仍有较多养殖网箱未控制病害,累积死亡量较高。取濒死鱼进行细菌分离,鉴定结果为弧菌感染(主要是溶藻弧菌和哈维弧菌)。8 月 26 日采样结果显示,溶藻弧菌和哈维弧菌的感染率均达到 43.33%,比 8 月 10 日的感染率分别高

出 16.66% 和 13.33%。

3 讨论

Shoemaker 等^[7]在报道中指出,传统的细菌划线分离培养方法对病原菌检测的灵敏度有限,有可能存在漏检的情况,导致检出率偏低。目前多重 PCR 技术在流行病学调查中发挥了重要作用,尤其是针对大样本量的分析^[8-9]。因此为了能早期有效检测大黄鱼 3 种致病弧菌的感染,更好地预测大黄鱼溃疡病的发生和发展,本实验运用高灵敏度并有较高特异性的多重 PCR 技术进行跟踪检测。

2012 年 3 种致病弧菌中哈维弧菌感染率最高,而 2013 年溶藻弧菌为主要感染病原菌,副溶血弧菌在这两年中感染率都较低。金珊等^[10]在对海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究中提到,该 3 种致病弧菌皆能从组织中分离得到,可见感染大黄鱼的优势菌种并不是一定的,可能随着年份及环境因子的变化而浮动。另外,从弧菌周年感染监测数据分析,6 月份应做好大黄鱼溃疡病的预防工作,因该阶段是有效预防大黄鱼溃疡病病害发生的关键时间。

3 种弧菌对不同鱼龄大黄鱼的感染率存在一定差异性,溶藻弧菌对 2 龄鱼的感染率较高,哈维弧菌和副溶血弧菌均表现为对 3 龄鱼有较高的感染率。关于致病菌对鱼类不同年龄的感染差异研究,仅张俊等^[11]在对广东省养殖罗非鱼、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、海鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 感染有报道。该调查指出海豚链球菌对这 3 种鱼的感染率随着体长 (鱼龄) 的增加而降低,与本实验结果不相符。众所周知,环境因子是决定致病菌对宿主感染结果的主要因素之一,对致病菌及宿主都有着重要影响^[12]。同时,致病弧菌感染与否也取决于其黏附大黄鱼体表抵御免疫系统及存活于细胞内的能力^[13],以及胞外产物损伤鱼体组织有利细菌侵染等因素^[14]。鉴于此,3 种致病弧菌的感染与养殖水体环境变化、大黄鱼免疫防御能力强弱等密切相关,而与鱼体大小无直接关联性。

3 种致病弧菌在不同组织中检测结果表明,其对各个组织呈现出相似的感染特点,即肝脏、脾脏、肾脏、肌肉都有感染;肌肉比肝、肾、脾感染率更高,而后 3 种内脏组织的感染率差异并不大。

张俊等^[11]研究海豚链球菌在鱼体不同组织中感染率时发现,肌肉的感染率高于肝、脾、肾,但并未分析其中原因,本实验结果与之相似,其成因有待进一步探讨。通常大黄鱼体表损伤时会导致鱼体免疫抗病能力下降,水体中的条件致病菌亦趁虚侵染鱼体,并局部繁殖引发鱼轻度炎症反应。而后随血液循环感染肝、脾、肾等器官,导致鱼体从体表溃烂到全身组织受损^[15-16]。

尽管本研究某些时段 3 种致病弧菌在大黄鱼组织中有较高的感染率,但并未与大黄鱼溃疡病的暴发相关联。已知哈维弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌均为条件致病菌,可在鱼体内无症状携带^[17-18],祝璟琳等^[19]在对大黄鱼 3 种致病弧菌检测中得到的结果与本实验相同。然而,当养殖水体的环境因子等发生改变,如水质恶化、水温升高、养殖密度过大、体表损伤等,形成了利于这些细菌感染的条件时,就会引起大黄鱼溃疡病的发生和流行^[20-21]。

同时,根据连续 2 年对大黄鱼溃疡病发生与 3 种致病弧菌感染率关系的研究可知,在大黄鱼溃疡病大面积暴发流行前几天,弧菌的感染率都会显示出较高数值,这说明弧菌感染率的增长从某种程度上预示了病害的发生。可见,病害的发生往往有一个潜伏的过程,而这种时间上的延迟恰能对疾病的预防与控制起到积极的预警作用。

因此,通过 3 种致病弧菌对大黄鱼感染的分子流行病学调查与分析,掌握大黄鱼溃疡病病原弧菌感染频率及趋势,能弥补传统流行病学研究的不足及实施防控技术的滞后性,对阐明疾病的发生发展过程和实行最适时机进行有效预防将有积极的理论意义及应用价值。本实验结果也将为养殖大黄鱼溃疡病病害的预测模型构建提供实验依据和理论基础。

参考文献:

- [1] Xu X J, Xu B, Wang J, et al. Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 618-625. [徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察. 水产学报, 2010, 34(4): 618-625.]
- [2] Cai L T, Li S Y, Ge M F, et al. Effect of three
<http://www.scxuebao.cn>

- pathogenic vibrios on the blood biochemical parameters of *Pseudosciaena crocea* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(2): 65 – 72. [蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 65 – 72.]
- [3] Li W L, Cheng Y X, Luo H M. Major disease of deep water cultured *Pseudosciaena crocea* and the control measures [J]. Rich Fishing Guide, 2004, 24: 49 – 50. [李利卫, 程岩雄, 罗华明. 大黄鱼深水网箱养殖的主要疾病和防治措施. 渔业致富指南, 2004, 24: 49 – 50.]
- [4] Zheng T L, Wang G L, Huang J Q, et al. Studies on pathogen of ulcer disease of cultured large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) and its control medicines [J]. Journal of Zhejiang University: Science Edition, 2006, 33(5): 573 – 577. [郑天伦, 王国良, 黄家庆, 等. 养殖大黄鱼溃疡病的病原菌及其防治药物. 浙江大学学报: 理学版, 2006, 33(5): 573 – 577.]
- [5] Wang G L, Zhu J L, Jin S. A kind of multiple PCR reaction kit and its detection method of a marine vibrio; China, ZL200710069213X [P]. 2009 – 09 – 16. [王国良, 祝璟琳, 金珊. 一种海洋弧菌的多重 PCR 反应试剂盒及其检测方法: 中国, ZL200710069213X. 2009 – 09 – 16.]
- [6] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [7] Shoemaker C A, Klesius P H, Evans J J. Prevalance of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States [J]. American Journal of Veterinary Research, 2001, 62(2): 174 – 177.
- [8] Li C, Wang X H, Huang J. Multiplex PCR for the detection of three main aquatic pathogens [J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(3): 100 – 106. [李晨, 王秀华, 黄健. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 100 – 106.]
- [9] Weng S C, Zhu J L, Li J R. Establishment and evaluation on a multiplex-PCR method for detection of four pathogenic bacteria in aquatic products [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 305 – 314. [翁思聪, 朱军莉, 励建荣. 水产品中 4 种常见致病菌多重 PCR 检测方法的建立及评价. 水产学报, 2011, 35(2): 305 – 314.]
- [10] Jin S, Wang G L, Zhao Q S, et al. Epidemiology of vibrios in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in marine cage culture [J]. Fisheries Science, 2005, 24(1): 17 – 19. [金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究. 水产科学, 2005, 24(1): 17 – 19.]
- [11] Zhang J, Zhou S M, Li A X. *Streptococcus iniae* infection in cultured tilapia, sea bass, and barramundi in Guangdong [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 161 – 166. [张俊, 周素明, 李安兴. 广东省养殖罗非鱼、海鲈、尖吻鲈海鲈链球菌感染调查. 中国水产科学, 2012, 19(1): 161 – 166.]
- [12] Chen Q, Yan Q P, Wang K J, et al. Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 80(3): 181 – 188.
- [13] Yan Q P, Zhan M H, Wang X L, et al. Adhesion mechanisms of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara* [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(2): 260 – 266.
- [14] Chen Y F, Wang J, Su Y Q, et al. Study on the extra cellular products (ECP) of the pathogenic *Vibrio harveyi* isolated from the farmed groupers [J]. Marine Sciences, 2006, 30(10): 30 – 34. [陈雅芳, 王军, 苏永全, 等. 养殖石斑鱼溃疡病病原哈维氏弧菌胞外产物的研究. 海洋科学, 2006, 30(10): 30 – 34.]
- [15] Toranzo A E, Magarinos B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems [J]. Aquaculture, 2005, 246(1 – 4): 37 – 61.
- [16] Dai Y L, Lv Y L, Li K, et al. Histopathological and ultrapathological study on ulcer disease of *Pseudosciaena crocea* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 174 – 179. [戴瑜来, 吕永林, 李凯, 等. 大黄鱼溃疡病的组织病理和超微病理研究. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 174 – 179.]
- [17] Jayaprakash N S, Pai S S, Philip R, et al. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(3): 187 – 191.
- [18] Cai J P, Li J, Thompson K D, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Journal

- of Basic Microbiology, 2007, 47(1): 84 – 86.
- [19] Zhu J L, Wang G L, Jin S. Development and application of multiplex PCR of vibrios pathogenic to cultured large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 156 – 164. [祝璟琳, 王国良, 金珊. 养殖大黄鱼病原弧菌多重 PCR 检测技术的建立和应用. 中国水产科学, 2009, 16(2): 156 – 164.]
- [20] Ni H E, Wang G L. The forecasting model for incidence of ulcer disease of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) in marine cage culture [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(2): 334 – 341. [倪海儿, 王国良. 网箱养殖大黄鱼溃疡病的预报模型. 水产学报, 2009, 33(2): 334 – 341.]
- [21] Ni H E, Wang G L. Relationship between diseases in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* in marine cage culture and environmental factors [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(1): 72 – 77. [倪海儿, 王国良. 网箱养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 疾病与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 72 – 77.]

Detection of pathogenic vibrios infection in *Larimichthys crocea* and its forecast and warning of disease

GE Mingfeng, ZHENG Xiaoye, WANG Guoliang*

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to prevent and control the incidence of ulcer in large yellow croaker, we evaluated the prevalence of infection with three pathogenic vibrios in cultured *Larimichthys crocea* in Xiangshan by specific multiplex PCR. We collected the liver, kidney, spleen, muscle of fish in each sentinel cage randomly and detected the infection status. The results showed that there were some differences between the three kinds of pathogenic vibrios that infected the fish. The infection rate of *V. alginolyticus* and *V. harvey* large in *L. crocea* was higher than *V. parahaemolyticus*. The three vibrios were more susceptible to muscle, spleen than to the liver and kidney. The infection rate of different age of fish was not identical. In every sampling time, there existed infection rate. From July to September was the peak of infection rate and the rate increased after the typhoon certainly. In addition, according to the investigation on the relationship between incidence of ulcer and the prevalence of pathogenic vibrio, it showed that the infection rate would reach a higher value a few days before the outbreak of ulcer disease. So we could forecast the incidence and prevalence of the diseases through molecular epidemiology investigation and analyzing the infection of three pathogenic vibrios in the fish. Then, we will establish RT-PCR method of three vibrios to analyse the intensity of infection further. Thus the experimental results will be more convincing.

Key words: *Larimichthys crocea*; vibrio; epidemiology; forecast and warning; multiplex PCR

Corresponding author: WANG Guoliang. E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn