



研究报告

9株鱼源鳕诺卡氏菌生物学特征和致病性比较

罗愿^{1,2} 邓玉婷^{*1,3} 赵飞¹ 谭爱萍¹ 张美超^{1,2} 姜兰¹

1 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部渔用药物创制重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室 广东 广州 510380

2 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

3 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室 北京 100141

摘要:【背景】鳕诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是一种革兰氏阳性好氧菌,易引起鲈形目鱼类结节病发生,近几年对大口黑鲈、杂交鳢等名优鱼类的危害越来越大。【目的】比较分析9株不同年份、不同地区患结节病的不同淡水鱼品种分离的鳕诺卡氏菌的种间同源关系、生长特性、致病性以及药物敏感性差异,为进一步研究制定相应的防控与治疗措施提供基础数据和科学依据。【方法】在9株试验菌生理生化实验鉴定结果基础上,采用16S rRNA基因序列比对、限制性片段长度多样性比较菌株间的同源性;扩增看家基因 *secA1* 基因序列进行不同来源菌株种内相似度比对;通过体外培养比较不同菌株的生长情况;人工注射感染分析9株试验菌对大口黑鲈的致病性差异;采用微量肉汤二倍稀释法测试9株试验菌对13种抗菌药物的最小抑菌浓度;运用PCR技术检测菌株携带毒力基因和耐药基因的情况。【结果】生理生化结果显示9株试验菌与鳕诺卡氏菌的基本理化特征相符;9株试验菌聚类分析聚为一类,种内相似度高,限制性片段长度多样性酶切图谱相同,生长特性无明显差异;9株试验菌对大口黑鲈致病性无显著差异,但毒力基因携带情况略有不同,其均携带 *mce1A*、*mig* 和 *pup* 基因,而 *dop* 和 *whiB3* 只在部分菌株检出;9株试验菌均对氟甲喹和氨苄西林耐药,除 NS1 外,都对磺胺间甲氧嘧啶耐药,对大部分抗菌药物敏感,主要携带 *bla*_{TEM} 和 *sul1* 耐药基因。【结论】不同时间、不同地区及不同宿主分离的9株鳕诺卡氏菌在生物学特性、致病性和药物敏感性等方面无明显差异;同源性相近,提示华南地区感染淡水鱼的鳕诺卡氏菌可能为同一流行株型。研究结果为鳕诺卡氏菌的发病机制及防控技术的进一步研究奠定了基础。

关键词: 鳕诺卡氏菌, 同源性, 致病性, 药物敏感性

Foundation items: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2021SJ-XT3); National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Special of China (CARS-46); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515011584)

***Corresponding author:** E-mail: dengyt@prfri.ac.cn

Received: 25-11-2020; **Accepted:** 18-01-2021; **Published online:** 24-03-2021

基金项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021SJ-XT3); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 广东省自然科学基金(2020A1515011584)

***通信作者:** E-mail: dengyt@prfri.ac.cn

收稿日期: 2020-11-25; **接受日期:** 2021-01-18; **网络首发日期:** 2021-03-24

Comparative on characteristics and pathogenicity of *Nocardia seriolae* isoalted from 9 fishes

LUO Yuan^{1,2} DENG Yuting^{*1,3} ZHAO Fei¹ TAN Aiping¹ ZHANG Meichao^{1,2}
JIANG Lan¹

1 Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China

2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Key Laboratory of Aquatic Product Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China

Abstract: [Background] *Nocardia seriolae* is a kind of Gram-positive aerobic bacterium, which may cause sarcoidosis in both freshwater and marine fish, among them, perciformes are the most susceptible to the disease. In recent years, serious losses caused by *N. seriolae* in freshwater fishes such as *Micropterus salmoides* and *Channa argus* have been increasing. [Objective] To compare and analyze the homology, growth characteristics, pathogenicity and antimicrobial susceptibilities, 9 *N. seriolae* strains isolated from different freshwater fish species suffering from sarcoidosis in different years and regions were determined in this study, and to further develop a reliable scientific measures to control and treat this disease. [Methods] 16S rRNA gene and the housekeeping gene *secA1* were amplified and sequenced for identification and phylogenetic analysis of *N. seriolae* after biological characteristics and phylogenetic analysis. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was developed to analyze the homology of different origins of *N. seriolae*. Growth curve of 9 strains was determined by *in vitro* culture. Pathogenicity of 9 *N. seriolae* strains was characterized by artificial injection against largemouth bass. Antimicrobial susceptibility testing was carried out to determine the phenotypes of 13 antimicrobial agents by microbroth double dilution method. Virulence genes and drug resistance genes of 9 strains were also detected in this study. [Results] Based on the biological characteristics, most of the phenotypes in 9 strains were similar to *Nocardia seriolae*. Nine strains were identified to be *N. seriolae* and clustered into one category with high intraspecies similarity. PCR-RFLP digestion patterns were identical and the growth curve of 9 strains showed no significant difference of growth characteristics. A variety of virulence genes were detected in 9 strains. Three genes of *mce1A*, *mig* and *pup* were all detected in 9 strains, whereas *dop* and *whiB3* genes were only carried in some of the strains. There was no significant difference in the pathogenicity of 9 *N. seriolae* to largemouth bass. All the strains were resistant to sulfamonomethoxine, flumequine and ampicillin, while most of the strains were susceptible to other antimicrobial agents tested. *bla*_{TEM} gene was detected in 9 *N. seriolae* strains, some of which also carried *sul1* gene. [Conclusion] Nine strains of *N. seriolae* isolated from different origins showed similar growth characteristics, pathogenicity and antimicrobial susceptibilities. It implied that *N. seriolae* was the predominant pathogen of sarcoidosis prevailed in freshwater fish and with similar homology. The results of the study provide foundation of further research on the pathogenesis, prevention and control technology of *N. seriolae*.

Keywords: *Nocardia seriolae*, homology, pathogenicity, antimicrobial susceptibility

鳊诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*), 革兰氏阳性丝状杆菌, 属于放线菌目(*Actinomycetales*)诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[1]。鳊诺卡氏菌最早于 1967 年在日本 5 条鳊中被分离发

现^[2], 随后在多种海水和淡水鱼类中发现并报道, 如鲮鱼(*Mugil cephalus*)、七星鲃鱼(*Lateolabrax japonicus*)、乌鳢(*Channa argus*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、六带鲈(*Caranx sexfasciatus*)、

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)、赤鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)等^[3-7]。鳗诺卡氏菌的可感染宿主范围甚广, 鲈形目鱼类最易感。鱼类感染鳗诺卡氏菌后肝、脾、肾、鳔、肠系膜等出现大量肉眼可见的白色结节, 部分鱼心脏、卵巢、肌肉等也可观察到结节。该病感染率、死亡率较高, 自然发病率为 20%–60%, 死亡率高达 100%^[8]。Yasuike 等^[9]和 Han 等^[10]通过全基因组测序对鳗诺卡氏菌毒力因子进行预测与报道, 参考分枝杆菌(*Mycobacterium*)和人源诺卡氏菌(*Nocardia*)中已知毒力因子进行功能推测, 还从鳗鲡(*Anguilla japonica*)源鳗诺卡氏菌中发现与弧菌(*Vibrio*)溶血素和毒素蛋白相似的编码基因, 为鳗诺卡氏菌毒力因子的进一步研究奠定了基础。目前对鱼源鳗诺卡氏菌的研究大多集中在细菌分离鉴定、快速检测、组织病理和疫苗研制等方面, 仍未见关于不同来源该菌生长特性与同源性的比较。

本研究针对 9 株不同来源的鳗诺卡氏菌在生长特性、同源性等生物学特性, 以及致病性及药物敏感性等方面进行了分析, 探讨鳗诺卡氏菌的流行分布特征, 为进一步开展鳗诺卡氏菌病原学及鳗诺卡氏菌病防治技术研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

9 株试验菌均由中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室分离保存。实验菌株具体信息见表 1。

1.1.2 实验鱼

实验用大口黑鲈、杂交鳢、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)购自广东省佛山市某养殖场, 体重规格均为 100±5 g, 在实验室暂养 1 个月(温度 25±1 °C, 正常投喂), 采用镜检、抽血接菌、剖检等方式检测寄生虫和诺卡氏菌病等病原感染情况后用于鳗诺卡氏菌人工感染实验。

1.1.3 抗菌药物

渔用抗菌药物 96 孔药敏测试板由天津市金章科技发展有限公司定制。药板包含 8 大类 13 种广谱抗菌药物, 其中包括喹诺酮类(氟甲喹、恩诺沙星、环丙沙星)、磺胺类及其增效剂(磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶)、酰胺醇类(氟苯尼考、甲矾霉素)、氨基糖苷类(新霉素)、四环素类(多西环素)、大环内酯类(红霉素)、β-内酰胺类(氨苄西林)以及喹啉酮类(恶喹酸)。

表 1 9 株试验菌来源信息
Table 1 Source information of 9 strains

菌株序号 Strain No.	采样时间 Time	样品名称 Source	采样地区 Area
NS1	2017	泰国虎 <i>Datnoides microlepis</i>	广州 Guangzhou
NS2	2013	七星鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	珠海 Zhuhai
NS3	2014	杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂) <i>Channa maculata</i> ♀× <i>C. argus</i> ♂	中山 Zhongshan
NS4	2013	宝石鲈 <i>Scortum barcoo</i>	佛山 Foshan
NS5	2013	革胡子鲶 <i>Clarisalareza</i>	广州 Guangzhou
NS6	2015	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	珠海 Zhuhai
NS7	2013	杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂) <i>Channa maculata</i> ♀× <i>C. argus</i> ♂	重庆 Chongqing
NS8	2013	杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂) <i>Channa maculata</i> ♀× <i>C. argus</i> ♂	佛山 Foshan
NS9	2013	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	广州 Guangzhou

1.1.4 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 脑心浸液肉汤培养基(Brain Heart Infusion Broth, BHI)、5%绵羊血平板, 广东环凯微生物科技有限公司; 胶回收试剂盒及 *Msp* I、*Hinf* I、*Bst*E II、*Bsa*H I 限制性内切酶, TaKaRa 公司。麦氏比浊仪, Mérieux 公司; 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 人工感染实验在室内 1.0 m×1.0 m×0.5 m 水族箱进行, 具充氧及控温设备。

1.2 细菌鉴定和菌株同源相似性分析

1.2.1 生理生化特性分析

参照伯杰氏细菌鉴定手册^[11]和中国科学院微生物研究所放线菌分类组^[12]中鲚诺卡氏菌的鉴定内容和方法, 对 9 株试验菌的产生酶类、水解活性以及单一碳源生长和温度耐受性等生理生化指标进行研究。

1.2.2 16S rRNA 基因序列分析

利用 TIANamp Bacteria DNA Kit 分别提取 9 株试验菌的全基因组 DNA, 于-20℃保存备用。

16S rRNA 基因的扩增引物为通用引物 27F 和 1492R^[13], 引物序列信息及退火温度见表 2, 反应条件参考王芳等^[14]。

PCR 反应体系(25 μL): 10×*Taq* Buffer 2.5 μL, dNTP Mix (2 mmol/L) 1.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 补

加 ddH₂O 至 25 μL。

PCR 扩增产物委托广州艾基生物技术有限公司测序。

1.2.3 基于 *hsp65* 基因的限制性片段长度多样性 (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)分析

65-kD 热休克蛋白(Heat-Shock Protein, HSP)基因的扩增引物、反应体系和条件参考 De Armas 等^[15]。PCR 扩增产物委托广州艾基生物技术有限公司测序, 比对产物的符合度。切胶回收目的条带, 利用 4 种限制性内切酶(*Msp* I、*Hinf* I、*Bst*E II、*Bsa*H I)进行酶切, 反应结束后利用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 90 V 电泳 1 h 后置于凝胶成像系统观察并比较酶切片段大小。

1.2.4 *secA1* 基因(Secretory A1 Gene)序列分析

secA1 基因的扩增引物、反应体系和条件参考 Conville 等^[16]。PCR 扩增产物委托广州艾基生物技术有限公司测序。

1.3 菌株生长特性分析

取适量绵羊血平板上 25℃ 恒温培养 3 d 的新鲜鲚诺卡氏菌, 置于灭菌玻璃匀浆器中, 加入适量 BHI 进行研磨。将研磨均匀后的鲚诺卡氏菌用 BHI 调整至浓度为 9.0×10⁷ CFU/mL 的菌液, 然后将菌液分装到无菌玻璃试管中, 每管 5 mL, 设置 2 个平行, 并将其置于 25℃、180 r/min 条件下振荡培养。实验开始每间隔 24 h 分别取 2 管培养菌液, 分别研磨均匀后测定记录 OD₆₀₀ 值, 连续观察 28 d。

表 2 鲚诺卡氏菌 16S rRNA、65-kD HSP 和 *secA1* 基因扩增相关信息

Table 2 Amplification of 16S rRNA gene, *secA1* and 65-kD HSP gene of *N. seriolae*

目的基因 Target gene	引物序列 Primers sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	长度 Sequence size (bp)
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCATGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	55	1 500
<i>secA1</i>	F: GTAAAACGACGGCCAGGACAGGAGTGGATGGGYCGSGTGACACCG R: CAGGAAACAGCTATGACGCGG ACGATGTAGTCCTTGTC	60	468
65-kD HSP	F: ACCAACGATGGTGTGTCCAT R: CTTGTCTGAACCGCATACCCCT	60	439

1.4 细菌致病性比较

取冻干保存的实验菌株进行复苏培养, 接种于绵羊血平板, 25 °C 培养 48 h, 均质后的细菌用 0.85% 无菌生理盐水稀释菌液浓度至 3×10^6 CFU/mL 和 3×10^5 CFU/mL 这 2 个浓度梯度。取一株试验菌 NS8 采用肌肉注射(菌液浓度 3×10^6 CFU/mL) 分别感染健康大口黑鲈、杂交鳢、罗非鱼和草鱼(体重均为 100 ± 5 g), 实验组与对照组每组分别 20 尾鱼, 每尾注射 0.2 mL, 同时设等量 0.85% 无菌生理盐水作为空白对照, 养殖水温控制在 25 ± 1 °C, 实验期间正常投喂, 连续观察 14 d, 记录结果。

9 株试验菌采用 2 个浓度通过肌肉注射分别对大口黑鲈(体重为 100 ± 5 g) 进行人工感染, 每尾注射 0.2 mL, 高浓度组(3×10^6 CFU/mL) 与低浓度组(3×10^5 CFU/mL) 每组分别 10 条鱼, 养殖水温控制

在 25 ± 1 °C, 实验期间正常投喂, 连续观察 14 d, 记录结果。

1.5 毒力因子分析

根据鲺诺卡氏菌全基因组序列(GenBank 登录号为 AP017900) 并参考分枝杆菌已有毒力基因, 选取 11 种毒力基因(表 3): 编码分泌蛋白 Ag85 复合物的 *fbpA* 和 *fbpC* 基因^[17]; 与异烟肼敏感性与霉菌酸合成相关的 *kasA* 和 *kasB* 基因^[18]; 哺乳动物细胞入侵因子(Mammalian Cell Entry, MCE) 蛋白家族的 *mce1A*^[19]; 泛素样蛋白-蛋白酶体系统(Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein-Proteasome System, PPS) 包含的 4 个调控因子 *pup*、*mpa*、*pafA* 和 *dop*^[20]; 与细菌在巨噬细胞内复制相关的 *mig* 基因^[21]; WhiB-Like 蛋白家族中的 *whiB3* 基因^[22]。PCR 反应体系同 1.2.2, PCR 扩增后利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 委托广州艾基生物技术有限公司测序。

表 3 11 种毒力基因扩增相关信息

Table 3 Amplification of 11 virulence genes

目的基因 Target gene	引物序列 Primers sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	长度 Sequence size (bp)
<i>mig</i>	F: CGATGGATCCCCGATCGACGCGCCGCT R: CGATGGATCCTCGATGGCCGCGACCAAC	60	1 000
<i>mce1A</i>	F: ATGGTGCAACAACACAGCGATGTGG R: GCTTGTTGCCCCCGCCAGTCCGGGC	55	1 254
<i>pup</i>	F: CATAAGCTTATGGCGCAAGAGCAGACCAAGCG R: TGAGAATTCTCACTGTCCGCCCTTTTGGACGT	62	213
<i>dop</i>	F: CCCGAATTCATGTTCTGGGTCGGCGGGCCTT R: TAAAAGCTTTTAGCGAGGCTCAGCGGTCAGT	63	1 683
<i>pafA</i>	F: CACGAATTCGTGCAGCGTCGAATCATGGGCATC R: TAGAAGCTTCTACATGCTCGCGATCAGCCGCTT	65	1 377
<i>mpa</i>	F: CATGAATTCATGGGTGAGTCAGAGCGTTCTCAGG R: TAGAAGCTTCTACAGGTACTGGCCGAGGTTGGAC	65	1 848
<i>kasA</i>	F: CGGAGGAGCACGCCAAAG R: TGGCCCAGCGCAGACTTC	62	286
<i>kasB</i>	F: GACATCGCGGGTCGCGAGGCATATGGTGGGGGT R: CTGTCGCGTAGAGCTCGGGTTTAGTACCG	55	
<i>whiB3</i>	F: CCGGATCCAGCTGCAGAAATGCCACAGCCGGAGCAGC R: GTTAACTACGTTCGACATCTTAAGCTGTGCGGCGGATG	63	1 152
<i>fbpA</i>	F: CGGGATCCATGCAGCTTGTTGACAGGGTT R: TTGCGGCCCGCTAGGCGCCCTGGGG	60	1 109
<i>fbpC</i>	F: CGCGGATCCATCGTGCGGCAGATGAGA R: CCGGAATTCATGCTGGCTTGCTGGCT	61	1 093

1.6 药物敏感性测试

使用定制的 96 孔药敏板,采用微量肉汤二倍稀释法测定受试菌株对 13 种抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC),根据美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的抗菌药物敏感性判定标准判断受试菌株对抗菌药物的敏感性^[23]。

1.7 耐药基因检测

根据参考文献[24-28]合成相关引物并进行 PCR 扩增(表 4),检测受试菌株中 9 种常见耐药基因的携带情况,包括 β -内酰胺类耐药基因(*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M})、四环素类耐药基因(*tetA*, *tetM*)、磺胺类耐药基因(*sul1*, *sul2*)、喹诺酮类耐药基因(*qnrS*, *oqxAB*)及 I 类整合酶基因(*intI1*); PCR 反应体系同 1.2.2,切胶回收后送广州艾基生物技术有限公司测序。

1.8 数据处理

将测序结果利用 NCBI 中的 GenBank 数据库进行在线 BLAST 比对分析;采用 MEGA X/ClustalW 程序对 9 株试验菌的 16S rRNA、*secA1* 基因序列进

行多序列比对;根据邻接(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统进化树;采用 Lasergene/MegAlign 程序计算种内相似度;运用 SPSS 16.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 生理生化特征

9 株试验菌均能以 D-葡萄糖、柠檬酸盐为唯一碳源生长;对过氧化氢酶阳性,氧化酶、溶菌酶、脲酶阴性;水解七叶苷,不能使明胶液化、淀粉水解;除 NS1 外,都不能还原硝酸盐;45 °C 和 50 °C 处理 8 h 后均不能生长,与王芳等^[14]和王国良等^[29]关于鳊诺卡氏菌的生理生化实验结果基本一致。9 株试验菌都具备了诺卡氏菌属细菌的基本理化特征,与鳊诺卡氏菌基本相同(表 5)。

2.2 同源性分析

2.2.1 16S rRNA 基因聚类分析

9 株试验菌的 16S rRNA 基因扩增均获得长度约为 1 437 bp 的 DNA 片段。通过 NCBI BLAST 进行序列比对,9 株试验菌均鉴定为鳊诺卡氏菌。运用 NJ 法构建系统进化树,9 株试验菌均与鳊诺卡氏菌聚为一簇(图 1)。

表 4 9 种耐药基因扩增相关信息

Table 4 Amplification of 9 antimicrobial resistance genes

目的基因	引物序列	退火温度	长度
Target gene	Primers sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Sequence size (bp)
<i>bla</i> _{TEM}	F: AAAGATGCTGAAGATCA	56	425
	R: TTTGGTATGGCTTCATTC		
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG	56	538
	R: CGCAATATCATTGGTGGTGCC		
<i>tetA</i>	F: GTAATTCTGAGCACTGTCGC	60	956
	R: CTGCCTGGACAACATTGCTT		
<i>tetM</i>	F: ACAGAAAGCTTATTATATAAC	55	171
	R: TGGCGTGTCTATGATGTTAC		
<i>qnrS</i>	F: ATGGAAACCTACCGTCACACATAT	55	656
	R: CTAGTCAGGAAAAACAACAATACCC		
<i>oqxAB</i>	F: GATCAGTCAGTGGGATAGTTT	52	670
	R: TACTCGGCGTTAACTGATTA		
<i>intI1</i>	F: ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG	55	892
	R: GTCAAGTTCTGGACCAGTTGC		
<i>sul1</i>	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG	55	433
	R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG		
<i>sul2</i>	F: TCCGGTGGAGGCCGCTATCTGG	56	191
	R: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG		

表 5 9 株试验菌和鳊诺卡氏菌参照菌株的生理生化特征
Table 5 Physiological and biochemical characteristics of 9 strains and reference strain of *N. seriolae*

指标 Traits	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	NS6	NS7	NS8	NS9	JCM3360 ^T
唯一碳源利用 Growth on sole carbon sources										
甘露醇 Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐 Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酶类产生 Enzyme production										
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
溶菌酶 Lysozyme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶 Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水解活性 Hydrolysis										
七叶苷 Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
淀粉 Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 °C 生长 Growth at 45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 °C 培养 8 h Culture 8 h at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+：阳性；-：阴性
Note: +: Positive; -: Negative

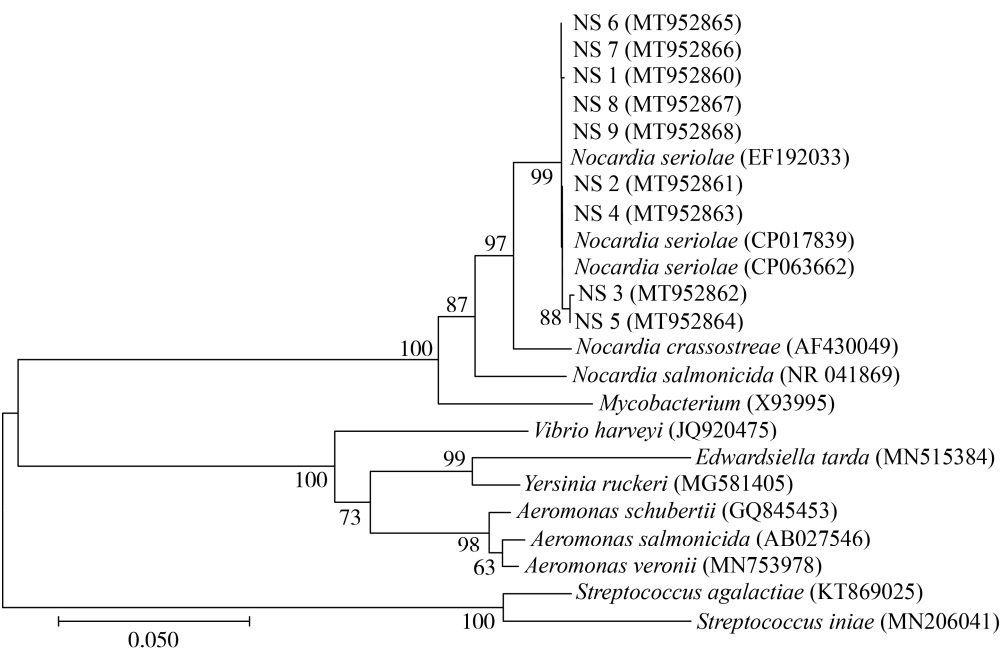


图 1 9 株试验菌的 16S rRNA 基因聚类分析
Figure 1 16S rRNA gene cluster analysis of nine strains

注：括号中的数字代表 GenBank 登录号，每个分支点上的数字是软件输出的百分比，标线代表 5% 的序列差别
Note: Those in parentheses are GenBank accession number; Numbers at each branch points indicated the percentage of software output; Bar: Nucleotide divergence is 5%

2.2.2 PCR-RFLP 分析

9 株试验菌的 *Msp* I 酶切图谱呈 2 条带, 分别位于 100–150 bp、150–200 bp; *Hinf* I 酶切图谱的 2 条带分布于 100–150 bp 与 300–400 bp; *Bst* E II 酶切图谱呈 1 条带, 在 400–500 bp; *Bsa* H I 酶切图谱呈 3 条带, 分别位于 50–100、100 和 150–200 bp。9 株试验菌经 4 种酶切后均呈同一种带型, 表明 9 株试验菌同源性相近, 属同一基因型(4 种酶切结果见图 2)。

2.2.3 *secA1* 种内相似度分析

对 9 株试验菌的 *secA1* 基因扩增均获得约

468 bp 长度的 DNA 片段, 通过测序比对确认为鳊诺卡氏菌。通过多序列比对分析并计算种间相似度水平, 结果显示, 9 株试验菌的 *secA1* 基因较为保守, 仅存在 1 个碱基差异, 种内相似度水平高达 97.5%–99.0%, 表明 9 株不同来源鳊诺卡氏菌种间相似性很高(比对分析结果见图 3、图 4)。

2.3 生长特性分析

菌株生长实验显示(图 5), 9 株试验菌的对数生长期均在 48–132 h, OD_{600} 峰值在 1.073–1.388 之间, 无显著差异($P=0.953$)。

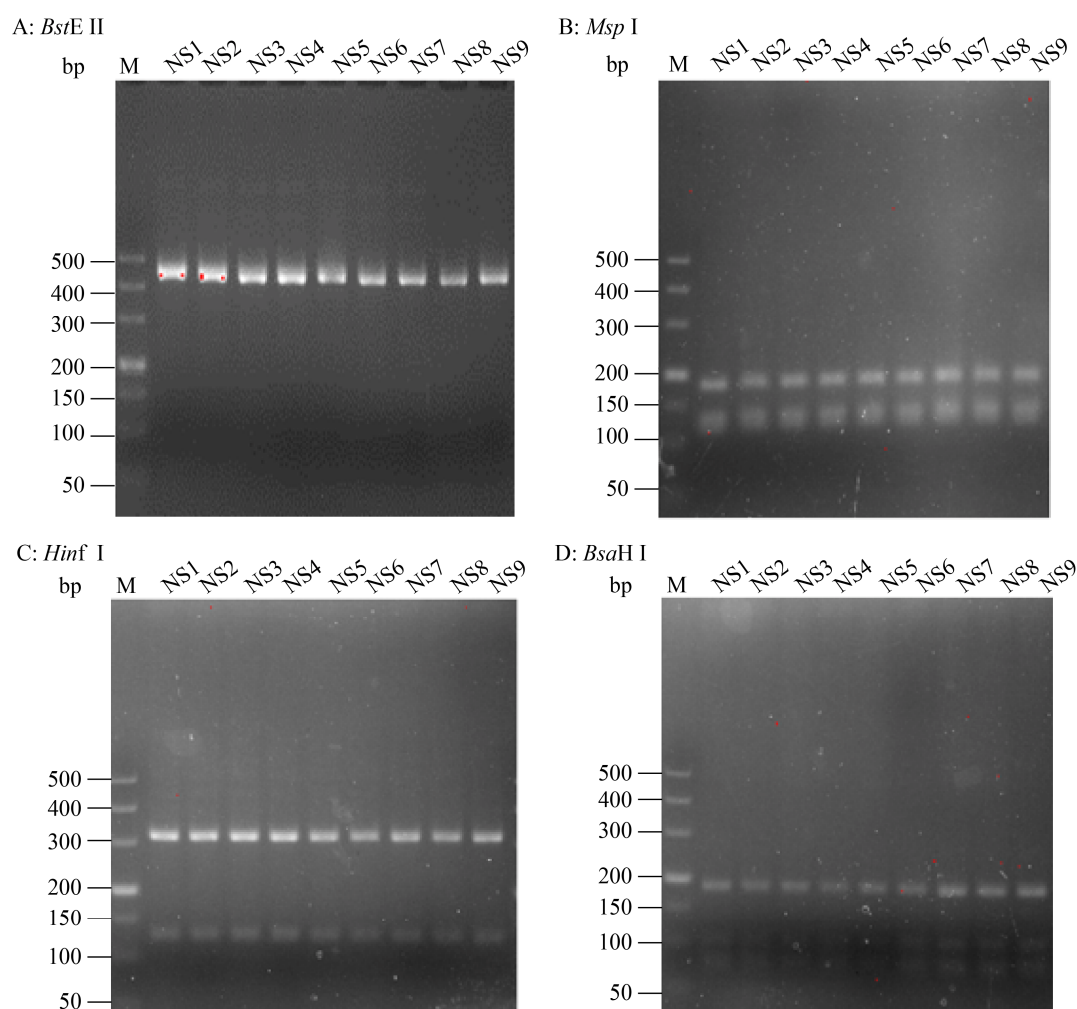
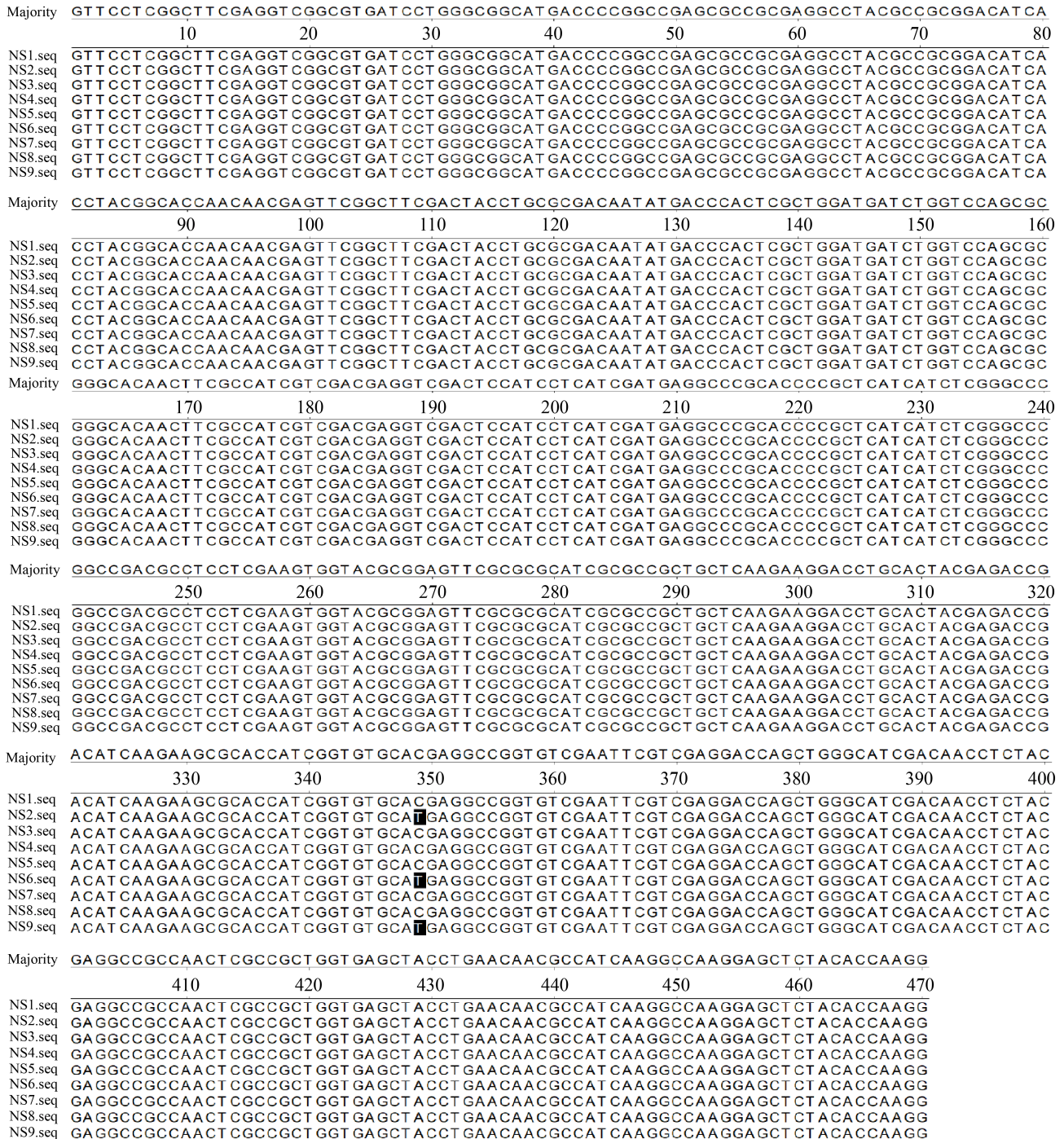


图 2 4 种酶对 9 株试验菌的酶切结果

Figure 2 The results of four enzymes digestion of 9 strains

图 3 9 株试验菌 *secA1* 基因多序列比对图Figure 3 Multi-sequence alignment of *secA1* genes for 9 strains

注: 黑色阴影处表示 NS2、NS6 和 NS9 与其他菌株存在碱基差异

Note: The shade indicates the difference of nucleobase in NS2, NS6 and NS9 from other strains

Percent identity										
Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1		99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	99.8	1 NS1.seq
2	0.2		99.8	99.8	99.8	100.0	99.8	99.8	100.0	2 NS2.seq
3	0.0	0.2		100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	99.8	3 NS3.seq
4	0.0	0.2	0.0		100.0	99.8	100.0	100.0	99.8	4 NS4.seq
5	0.0	0.2	0.0	0.0		99.8	100.0	100.0	99.8	5 NS5.seq
6	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2		99.8	99.8	100.0	6 NS6.seq
7	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2		100.0	99.8	7 NS7.seq
8	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0		99.8	8 NS8.seq
9	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.2		9 NS9.seq

图 4 *secA1* 基因种内相似度比较结果
Figure 4 Inter comparison of *secA1* genes in *N. seriolae*

2.4 致病性比较

用杂交鳢源的鳊诺卡氏菌(NS8)进行人工感染注射,水温 25 ℃ 条件下,大口黑鲈和杂交鳢对鳊诺卡氏菌更易感,而且死亡率高。感染第 5 天开始,死亡鱼脾、前肾出现明显白色结节;而罗非鱼与草鱼则不易感,死亡率很低,死亡鱼内脏也未出现明显的症状(图 6)。人工感染 14 d 后,对各实验组未发病死亡的实验鱼进行剖检,发现大口黑鲈和杂交鳢内脏有结节,但罗非鱼、草鱼和空白对照组实验鱼内脏器官均无此症状。

水温 25 ℃ 条件下,分别用 9 株试验菌对大口黑鲈进行人工感染,高浓度组在感染后第 5 天开始出现大批死亡,而低浓度组在感染后第 9 天

大批死亡。感染后第 5 天,高浓度组死亡的大口黑鲈心、脾、前肾开始出现白色结节;而低浓度组死亡的大口黑鲈在感染后第 8 天才在心、脾以及前肾呈现白色结节。感染 14 d 后,对各实验组未发病死亡的实验鱼进行剖检,发现所有实验组实验鱼内脏均有结节症状,而空白对照组实验鱼内脏均无此症状。高浓度组中菌株 NS2、NS3、NS5、NS6、NS7 和 NS8 对大口黑鲈的感染致死率为 100%,其余菌株的致死率为 90%。低浓度组中菌株 NS2、NS3、NS4 和 NS6 的致死率为 100%,其余菌株的致死率为 70%–90%。结果显示,9 株试验菌对大口黑鲈的致病性无显著差异(图 7)。

2.5 毒力基因检测

毒力基因检测结果显示,9 株试验菌均携带 *mce1A*、*mig* 和 *pup*,而 *dop* 只在 NS2、NS3、NS4、NS5 和 NS6 检测到,仅 NS3、NS4、NS6 和 NS9 检测到 *whiB3* (表 6)。NS3、NS4 和 NS6 携带 5 种不同类型的毒力基因,其余菌株携带 3–4 种。

2.6 药物敏感性分析

9 株试验菌均对氟甲喹和氨苄西林耐药;除 NS1 外,其余菌株都对磺胺间甲氧嘧啶耐药,所有菌株均对磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶、新霉素及多环西素敏感(表 7)。

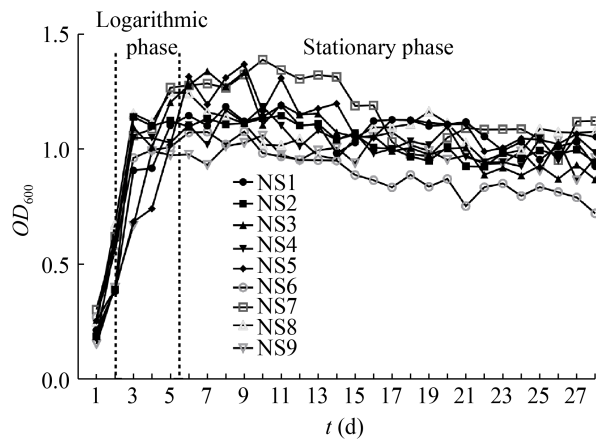


图 5 9 株试验菌的生长曲线
Figure 5 Growth curve of 9 strains

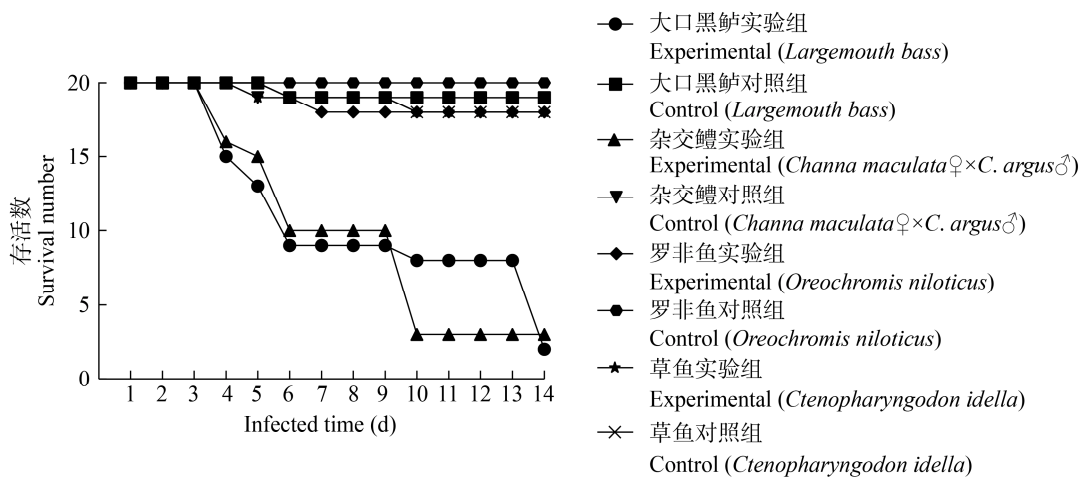


图 6 25 °C 时鳊诺卡氏菌对不同鱼人工感染结果
Figure 6 Artificial infection result of *N. seriolae* to different fish at 25 °C

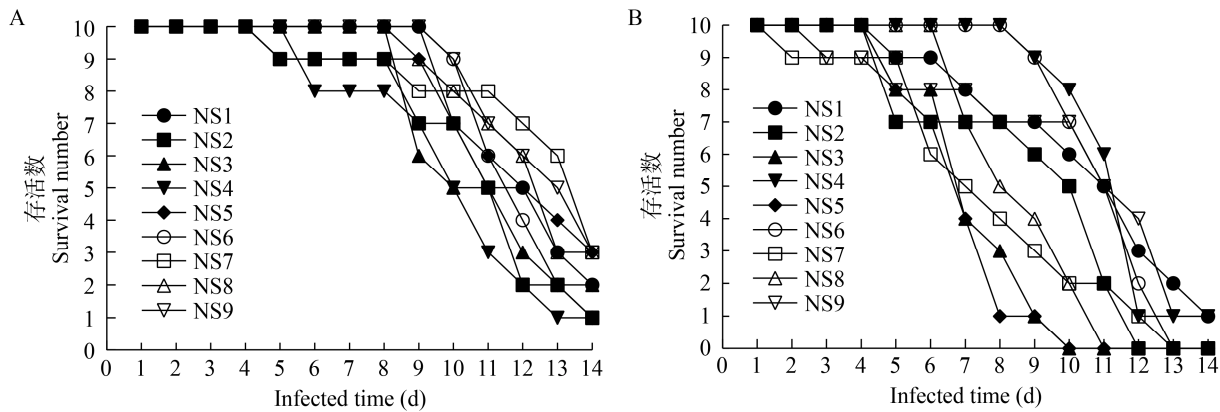


图 7 25 °C 时 9 株试验菌不同浓度 [3×10^5 CFU/mL (A)、 3×10^6 CFU/mL (B)] 对大口黑鲈的人工感染结果
Figure 7 Artificial infection results of 9 strains at 25 °C in two different density (3×10^5 CFU/mL (A), 3×10^6 CFU/mL (B))

表 6 毒力基因的 PCR 扩增结果

Table 6 PCR amplification results of virulence genes

毒力基因 Virulence gene	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	NS6	NS7	NS8	NS9
<i>mig</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>kasA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pafA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>kasB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mpa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fbpA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pup</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dop</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>whiB3</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>fbpC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mce1A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +: 目的基因检测阳性; -: 目的基因检测阴性

Note: +: Virulence gene positive; -: Virulence gene negative

表 7 9 株试验菌对 13 种抗菌药物的敏感性结果
Table 7 13 antimicrobial agents sensitivity of 9 strains

药物名称 Drug name	MIC 测定 MIC value (mg/L)								
	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	NS6	NS7	NS8	NS9
恩诺沙星 Enrofloxacin	2.00 (I)	0.50 (S)	0.12 (S)	0.25 (S)	0.12 (S)	0.03 (S)	0.12 (S)	0.12 (S)	0.50 (S)
氟苯尼考 Florfenicol	2.00 (S)	4.00 (I)	4.00 (I)	4.00 (I)	4.00 (I)	2.00 (S)	4.00 (I)	4.00 (I)	4.00 (I)
氟甲喹 Flumequine	32.00	>32.00	>32.00	>32.00	>32.00	>32.00	>32.00	>32.00	>32.00
新霉素 Neomycin	≤0.50	≤0.50	≤0.50	≤0.50	≤0.50	≤0.50	≤0.50	≤0.50	1.00
甲砒霉素 Thiamphenicol	8	4	8	8	8	8	8	8	8
多西环素 Doxycycline	1.00 (S)	2.00 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)
恶喹酸 Oxolinic acid	>8	>8	>8	8	4	>8	>8	>8	>8
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	256.00 (S)	>1 024.00 (R)	>1 024.00 (R)	>1 024.00 (R)	512.00 (R)	>1 024.00 (R)	>1 024.00 (R)	>1 024.00 (R)	>1 024.00 (R)
红霉素 Erythromycin	≤0.25 (S)	≤0.25 (S)	≤0.25 (S)	≤0.25 (S)	≤0.25 (S)	0.50 (S)	0.50 (S)	>8.00 (R)	≤0.25 (S)
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶 Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)	19.00/1.00 (S)	≤9.50/0.50 (S)	≤9.50/0.50 (S)
磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶 Sulfadimidine/ Trimethoprim	5.00/1.00 (S)	≤2.50/0.50 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)	5.00/1.00 (S)
环丙沙星 Ciprofloxacin	8.00 (R)	1.00 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	≤0.50 (S)	2.00 (I)
氨苄西林 Ampicillin	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)	>512.00 (R)

注：R：耐药；I：中介；S：敏感；氟甲喹、新霉素、甲砒霉素和恶喹酸无耐药判定标准
Note: R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible; Flumequine, neomycin, thiamphenicol and oxolinic acid have no clinical breakpoint

耐药基因扩增结果显示所有鳊诺卡氏菌均携带 β-内酰胺类耐药基因(*bla*_{TEM})；仅 NS3、NS4、NS5、NS9 携带了磺胺类耐药基因(*sul*_I)，其余耐药基因并未检测到(表 8)。

3 讨论与结论

3.1 不同来源菌株的生理生化特性与同源性

9 株试验菌显示出与鳊诺卡氏菌标准菌株基本相同的理化特性，结果也与国内报道的鳊诺卡氏菌分离菌株基本一致^[14,29]，但在硝酸盐还原性上不同菌株存在差异，可能与菌株来源和地域差异有关，在此基础上，通过分子生物学技术进行进一步的细菌分类鉴定。在细菌分类鉴定中，通常用 16S rRNA 基因序列构建系统发育树进行种间亲缘关系分析^[30]，满其蒙等^[31]根据 16S rRNA 基因序列对 15 株鳊诺卡氏菌进行了同源性分析，发现受试菌相似性达 99%以上，与鳊诺卡氏菌聚为一簇。但

16S rRNA 基因因其保守性过高在同属不同种细菌的分类上受到一定限制，因此，越来越多的管家基因如 *secA1*、*gyrB* 和 *hsp65* 等应用于系统进化分析。*secA1* 基因是诺卡氏菌的管家基因之一，编码 SecA1 蛋白，已经运用于分枝杆菌属、戈登氏杆菌属(*Gordonia*)近缘种的种内鉴定，司晨琛等^[32]利用 *secA1* 基因完成了对 91 株诺卡氏菌属细菌的分类鉴定，受试的诺卡氏菌属细菌可以被分为 16 个独立分支，在诺卡氏菌属近缘菌种分型方面有独特优势，特别是对诺卡氏菌复合体的分型方面具有独特优势。王颜颜等^[33]对构建的 16S rRNA 基因和 *secA1* 基因的系统发育树进行了比较，发现 *secA1* 基因在种内分类上更具优越性。PCR-RFLP 方法是在 PCR 扩增的基础上，经过限制性内切酶将目的基因进行酶切得到大小不同的基因片段，以观察酶切位点的变异及基因重组的发生，从而

表 8 9 株试验菌的耐药基因检测结果
Table 8 Detection of resistance genes of 9 strains

耐药基因 Drug resistance gene	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	NS6	NS7	NS8	NS9
<i>bla</i> _{TEM}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>bla</i> _{CTX-M}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetM</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>oqxAB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>int11</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sul1</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+：目的基因检测阳性；-：目的基因检测阴性
Note: +: Resistance gene positive; -: Resistance gene negative

对菌株进行分子分型^[34]，以此了解不同来源菌株的同源性。De Armas 等^[15]发现通过 PCR-RFLP 方法可对不同的诺卡氏菌进行快速分型，相较于传统的 16S rRNA 基因方法更为快捷。

本研究通过对 16S rRNA 基因的测序和聚类分析、基于 *secA1* 基因的种内分析，以及 PCR-RFLP 分子分型方法，结果显示不同来源的 9 株试验菌与鳜诺卡氏菌聚为一簇，PCR-RFLP 酶切均呈现相同的带型，综合生理生化检测 results 和分子鉴定，确定 9 株试验菌在细菌分类上均同为鳜诺卡氏菌；*secA1* 基因比较分析表明，不同来源菌株间种内相似度达 97.5% 以上，提示不同来源的 9 株鱼源鳜诺卡氏菌的同源性相近。通过比较不同来源菌株的生长曲线，发现 9 株试验菌的生长特性基本一致，延滞期都较长，24 h 后才进入对数生长期，132 h 后进入平台期，与夏立群等^[35]卵形鲳鲹源鳜诺卡氏菌生长情况试验结果相似。以上结果表明，不同时间、不同地区、不同淡水鱼分离的鳜诺卡氏菌具有相同的生物学特性和同源相关性，提示华南地区感染淡水鱼的鳜诺卡氏菌可能为同一流行株型。

3.2 不同来源菌株的致病性与毒力基因

鳜诺卡氏菌是一种胞内寄生菌^[36]，感染后期会产生肉芽肿——一种由中央坏死细胞碎片组成

的结节状病灶，可限制鳜诺卡氏菌的扩散^[37-38]。鳜诺卡氏菌对鱼类尤其是鲈形目的鱼感染致死率都较高，海鲈、卵形鲳鲹、乌鳢和大口黑鲈的发病率在 20%–60%，但感染后病程较长，最终死亡率在 35%–100%^[7,39-40]。本实验中，用杂交鳊源鳜诺卡氏菌进行人工感染，显示大口黑鲈和杂交鳊的感染致死率高达 85% 以上，并呈现出典型的结节症状，而草鱼和罗非鱼的感染致死率仅为 10% 且未出现典型的症状。为进一步了解不同来源菌株对大口黑鲈的致病性差异，本研究用 9 株试验菌、采用 2 种浓度(3×10⁶ CFU/mL 和 3×10⁵ CFU/mL)对大口黑鲈进行人工感染，结果显示，除试验鱼出现大量死亡的时间不同(高浓度组比低浓度组提前 3–4 d)外，感染死亡率(分别为 90%–100% 和 70%–100%)和发病症状(内脏组织呈现白色结节)均无明显差异，表明 9 株试验菌的致病性相似。

目前通过鳜诺卡氏菌全基因组测序及其他毒力基因方面的研究已发现，鳜诺卡氏菌携带有多种不同类型的毒力基因，包括与细菌在巨噬细胞中存活相关、构成细菌细胞壁并具有转移酶活性的毒力基因 *fbpA* 和 *fbpC*，以及与细菌入侵及脂代谢相关的 MCE 蛋白家族基因和与破坏吞噬细胞的 SOD 氧化杀伤机制相关基因等^[9]。由于鳜诺卡氏菌与分枝杆菌在生长特性和致病机制等方面相

似,本研究也检测了分枝杆菌的一些毒力相关基因,包括在细菌定殖中发挥作用的巨噬细胞诱导基因(*mig*)^[41],在致病性和引起宿主免疫应答反应中发挥重要作用的泛素样蛋白-蛋白酶体系统相关调控基因 *pup*、*mpa*、*pafA* 和 *dop*^[20],以及在细菌转录调控中发挥作用的 WhiB-Like 家族相关基因^[22]。本实验中,9 株试验菌均检测到 *mce*、*mig* 和 *pup* 基因,*dop* 和 *whiB3* 基因则在部分菌种中检测到。结果表明,这些毒力基因可能在鳙诺卡氏菌侵入细胞、定殖过程以及与巨噬细胞相互作用等方面发挥了作用。

3.3 不同来源菌株的药物敏感性与耐药基因

药物敏感性试验结果显示,9 株试验菌的药物敏感性存在差异。受试菌株均对氨苄西林耐药,与水产养殖临床分离的不同来源的诺卡氏菌药敏结果相同^[39],而且受试菌均检测到 β -内酰胺类耐药基因 *bla*_{TEM}。已有研究表明,动物源及水环境的细菌大量检出 *bla*_{TEM} 基因,可能与畜牧养殖和人类医学临床大量使用 β -内酰胺类药物有关,*bla*_{TEM} 基因多位于耐药质粒上,可通过水平传播在不同细菌中转移^[42-43]。尽管 β -内酰胺类药物不是水产养殖批准使用的药物,但多种文献^[43-45]报道在水产养殖源细菌中检出 β -内酰胺类耐药基因并表现出对该类药物耐药,提示耐药基因可能通过水环境等介质在不同来源细菌中广泛扩散。本研究中,除1株菌外,其余8株试验菌均对磺胺间甲氧嘧啶耐药,而且4株试验菌检测到磺胺类耐药基因 *sulI*。磺胺类药物是水产养殖中使用历史最长久、用量最大的一类药物,已经在多种病原菌中出现耐药现象^[46]。国内外研究已证明^[7],临床分离的鳙诺卡氏菌对单方的磺胺类药物产生耐药,而对复方的磺胺类药物仍敏感,因此临床上应减少单方磺胺类药物的治疗,多使用复方的药物如磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶等,从而减少磺胺类耐药性的产生。本研究中,9 株试验菌对大部分广谱类抗菌

药物敏感,与国内外研究报道相似^[4,7,47]。然而,尽管体外药物敏试验中鳙诺卡氏菌对大多数抗菌药物敏感,但临床治疗上抗菌药物对鳙诺卡氏菌病的疗效欠佳,可能与鳙诺卡氏菌是胞内寄生菌有关,该菌在感染后期组织器官形成肉芽肿,限制细菌扩散的同时也会阻挡药物对细菌的作用。根据体外感染试验结果显示,易感鱼类5 d后开始出现结节,因此建议在肉芽肿形成之前进行用药。本实验结果提示,应注意做好鳙诺卡氏菌病的前期预防,饲养的同时也要注意观察鱼类有无异常症状如少食、迟钝等现象出现,在感染初期及时进行药物治疗,避免在感染中后期肉芽肿形成后影响渔用药物治疗效果。

鳙诺卡氏菌是近年来造成杂交鳢、大口黑鲈等内脏结节病的主要病原,目前仍缺乏有效的防控技术手段。不同来源的鳙诺卡氏菌在分类地位、种间相似度及致病性等方面均具有高度相似性,在此基础上可深入开展鳙诺卡氏菌病原学研究及预警检测技术等研究,将有助于预防控制该病害的流行与传播。

REFERENCES

- [1] McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7(3): 357-417
- [2] Kariya T, Kubota S, Nakamura Y, Kira K. Nocardial infection in cultured yellowtails (*Seriola quinqueriata* and *S. purpurascens*)—I[J]. Fish Pathology, 1968, 3(1): 16-23
- [3] Shimahara Y, Huang YF, Tsai MA, Wang PC, Yoshida T, Lee JL, Chen SC. Genotypic and phenotypic analysis of fish pathogen, *Nocardia seriolae*, isolated in Taiwan[J]. Aquaculture, 2009, 294(3/4): 165-171
- [4] Cao Z, Shen JY, Xie RL, Pan XY, Lv WQ, Hao GJ, Yin WL, Wu YL. Isolation and Identification of a strain of *Nocardia* a pathogen of snakehead fish (*ophicephalus Argus-Argus*) with tuberculosis[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 338-341 (in Chinese)
曹铮, 沈锦玉, 谢荣林, 潘晓艺, 吕伟清, 郝贵杰, 尹文林, 吴颖蕾. 乌鳢结节病病原-诺卡氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 338-341
- [5] Labrie L, Ng J, Tan Z, Komar C, Ho E, Grisez L. Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia[A]//Bondad-

- Reantaso MG, Mohan CV, Crumlish M, Subasinghe RP. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section[M]. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 2008: 297-312
- [6] Yuan SP, Wang GL, Jin S. Nocardiosis in large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* cultivated in net cages[J]. Fisheries Science, 2005, 24(9): 35-36 (in Chinese)
袁思平, 王国良, 金珊. 海水网箱养殖大黄鱼诺卡氏菌病及防治[J]. 水产科学, 2005, 24(9): 35-36
- [7] Jiang YY, Li YW, Zhou SM, Li AX. Isolation and identification of *Nocardia*, a pathogen of nocardiosis in largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2012, 51(1): 76-81 (in Chinese)
蒋依依, 李言伟, 周素明, 李安兴. 加州鲈诺卡菌病原的分离与鉴定[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(1): 76-81
- [8] Bransden MP, Carson J, Munday BL, Handlinger JH, Carter CG, Nowak BF. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(1): 83-85
- [9] Yasuike M, Nishiki I, Iwasaki Y, Nakamura Y, Fujiwara A, Shimahara Y, Kamaishi T, Yoshida T, Nagai S, Kobayashi T, et al. Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: the first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173198
- [10] Han HJ, Kwak MJ, Ha SM, Yang SJ, Kim JD, Cho KH, Kim TW, Cho MY, Kim BY, Jung SH, et al. Genomic characterization of *Nocardia seriolae* strains isolated from diseased fish[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(3): e00656
- [11] LECHE VA11ER HA. Nocardioform Actinomycetes[C]// Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Vol.4. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1989: 2348-2404
- [12] Liu ZH, Jiang CL. Actinomycetes Modern Biology and Biotechnology[M]. Beijing: Science Press, 2004 (in Chinese)
刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004
- [13] Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(7): 1671-1674
- [14] Wang F, Chang OQ, Yan YY, Jiang L, Liu C, Li KB. *Nocardia seriolae* infection in the African catfish *Clarias gariepinus*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(5): 744-750 (in Chinese)
王芳, 常藕琴, 颜远义, 姜兰, 刘春, 李凯彬. 革胡子鲶的鳢诺卡氏菌感染[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(5): 744-750
- [15] De Armas Y, Fernández CM, Díaz R, Stefano NB, Wissmann G, Calderón EJ. PCR-RFLP methodology to identify *Nocardia* isolates in Cuba[J]. Advances in Microbiology, 2015, 5(10): 724-729
- [16] Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(8): 2760-2766
- [17] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis[J]. Science, 1997, 276(5317): 1420-1422
- [18] Slayden RA, Barry CE 3rd. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Tuberculosis, 2002, 82(4/5): 149-160
- [19] Gao F, Xu HD, Xu LW, Su YL, Guo ZX, Jiang K, Feng J. Cloning *mce1A* gene from *Nocardia seriolae* and its expression[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(1): 94-103 (in Chinese)
高芳, 许海东, 徐力文, 苏友禄, 郭志勋, 蒋魁, 冯娟. 诺卡氏菌 *mce1A* 基因的克隆及重组表达[J]. 南方水产科学, 2017, 13(1): 94-103
- [20] Zhang YQ, Lei Y, Wu F, Zhang L, Wu JD, Cao XD, Zhu B, He L, Wu B, Li RS, et al. Construction and identification of *Escherichia coli*-*Mycobacterium* recombinant shuttle expression plasmids for *pup*, *dop*, *pafA*, and *mpa* of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2014, 9(9): 769-774 (in Chinese)
张玉清, 雷英, 吴芳, 章乐, 吴江东, 曹旭东, 朱彬, 何丽, 邬博, 李瑞山, 等. 结核分枝杆菌 *pup*、*dop*、*pafA*、*mpa* 基因重组穿梭表达质粒的构建及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(9): 769-774
- [21] Zhang WM, He L, Zhang ZD. Cloning study on *mig* gene relate to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. China New Medicine, 2004, 3(8): 52-54 (in Chinese)
张为民, 何林, 张宗德. 结核分枝杆菌毒力相关基因 *mig* 的克隆研究[J]. 中国新医药, 2004, 3(8): 52-54
- [22] Feng LP. Analysis of wbl family proteins and functional characterization of WhiB3 in *Mycobacterium tuberculosis*[D]. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese)
冯立鹏. 结核分枝杆菌 Wbl 家族蛋白分析和 WhiB3 功能研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉病毒研究所) 博士学位论文, 2016
- [23] Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd Edition M24ed³. [S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015

- [24] Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(10): 938-947
- [25] Guo XZ, Zhang RQ, Jiang L, Tan AP, Deng YT, Li JX, Zhao F, Liu FC, He S. Detection and analysis of quinolone resistance and resistance-associated genes in bacteria isolated from tilapias sold in the supermarkets[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 1032-1039 (in Chinese)
郭学中, 张瑞泉, 姜兰, 谭爱萍, 邓玉婷, 李金祥, 赵飞, 刘付翠, 何山. 罗非鱼水产品中的喹诺酮类药物耐药菌和耐药基因检测分析[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 1032-1039
- [26] Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 50(4): 513-516
- [27] Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5675-5682
- [28] Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(2): 317-321
- [29] Wang GL, Xu YJ, Jin S, Zhu JL, Zhu WY. Research on the nocardiosis and pathogen in reared snakehead, *Ophiocephalus Argus cantor*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2): 277-283 (in Chinese)
王国良, 徐益军, 金珊, 祝璟琳, 朱文渊. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(2): 277-283
- [30] Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(1): e01419-17
- [31] Man QM, Feng J, Ou YJ, Su PT, Xu LW. Cluster analysis on 15 strains of pathogenic *Nocardia seriolae* from fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(5): 86-92 (in Chinese)
满其蒙, 冯娟, 区又君, 苏佩亭, 徐力文. 15 株鱼源致病性鱼诺卡氏菌的聚类分析[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(5): 86-92
- [32] Si CC, Li ZJ, Tang L, Wei C, Ji XZ, Xu S, Lou YL. Identification of *Nocardia* species based on *secA1* gene[J]. *Disease Surveillance*, 2016, 31(12): 1001-1006 (in Chinese)
司晨琛, 李振军, 唐璐, 韦超, 吉兴照, 徐帅, 楼永良. *secA1* 基因用于诺卡菌菌种鉴定分型的研究[J]. *疾病监测*, 2016, 31(12): 1001-1006
- [33] Wang YY, Xia MN, Ou WZ, Huang J, Ming CY, Liu TH, Lv Q, Zhou B, Kang YQ. Comparison of phylogeny of clinical *Nocardia* species based on 16S rRNA and *secA1* gene sequences[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2017, 42(4): 409-415 (in Chinese)
王颜颜, 夏茂宁, 欧维正, 黄劲, 明春艳, 刘涛华, 吕倩, 周兵, 康颖倩. 16S rRNA 和 *secA1* 基因构建临床诺卡菌的系统发育树比较[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(4): 409-415
- [34] Qian HM, Zhu YF, Dong C, Kong XX, Zhou L, Gu L, Tang FY, Zhu FC. Molecular typing of 110 strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Jiangsu Province by PCR-RFLP[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2016, 43(12): 2216-2219 (in Chinese)
钱慧敏, 朱叶飞, 董晨, 孔筱筱, 周璐, 顾玲, 汤奋扬, 朱凤才. PCR-RFLP 方法对江苏省 110 株产志贺毒素大肠埃希菌 O157 分型研究[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(12): 2216-2219
- [35] Xia LQ, Wang B, Xia HL, Huang YC, Jian JC, Lu YS. Optimal culture conditions and medium of *Nocardia serioleae*[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 51-56 (in Chinese)
夏立群, 王蓓, 夏洪丽, 黄郁葱, 简纪常, 鲁义善. 鱼诺卡氏菌培养条件及培养基的优化[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 51-56
- [36] Barry DP, Beaman BL. *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(1): 86-96
- [37] Boiron P, Locci R, Goodfellow M. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma[J]. *Medical mycology*, 1998, 36(Suppl1): 26-37
- [38] Bransden MP, Carson J, Munday BL, Handlinger JH, Nowak BF. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(1): 83-85
- [39] Man QM, Xu LW, Ou YJ, Su YL, Guo ZX, Feng J. Histopathological study on golden pompano *Trachinotus ovatus* infected with *Nocardia seriolae*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(21): 132-135,4 (in Chinese)
满其蒙, 徐力文, 区又君, 苏友禄, 郭志勋, 冯娟. 鲷鱼诺卡氏菌感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(21): 132-135,4
- [40] Wang Z, Ge MF, Xu YJ, Wang GL. Histopathological and

- ultrapathological observation on nocardiosis of *Ophicephalus argus*[J]. Journal of Ningbo University: Natural Science & Engineering Edition, 2015, 28(2): 13-18 (in Chinese)
- 王桢, 葛明峰, 徐益军, 王国良. 乌鳢诺卡氏菌病的组织病理和超微病理观察[J]. 宁波大学学报(理工版), 2015, 28(2): 13-18
- [41] Morsczech C, Berger S, Plum G. The macrophage-induced gene (*mig*) of *Mycobacterium avium* encodes a medium-chain acyl-coenzyme A synthetase[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Gene Structure and Expression, 2001, 1521(1/2/3): 59-65
- [42] Ugwu IC, Anyanwu MU, Ugwu CC, Ugwuanyi OW. Prevalence and antibiogram of generic extended-spectrum β -lactam-resistant enterobacteria in healthy pigs[J]. Notulae Scientia Biologicae, 2017, 9(1): 22
- [43] Deng YT, Wu YL, Tan AP, Huang YP, Jiang L, Xue HJ, Wang WL, Luo L, Zhao F. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China[J]. Microbial Drug Resistance: Larchmont, NY, 2014, 20(4): 350-356
- [44] Chen PL, Ko WC, Wu CJ. Complexity of β -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications[J]. Journal of Microbiology Immunology & Infection, 2012, 45(6): 398-403
- [45] Morita K, Watanabe N, Kurata S, Kanamori M. Beta-Lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources[J]. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 1994, 38(2): 353-355
- [46] Akiyama K, Hirazawa N, Hatanaka A. The absorption-enhancing effect of citric acid on oral oxytetracycline treatment against *Nocardia seriolae* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*[J]. Aquaculture, 2019, 500: 464-468
- [47] Ismail TF, Takeshita A, Umeda N, Itami T, Yoshida T. Application of α -glucosidase activity and drug susceptibility tests to epidemiological studies on the fish pathogen *Nocardia seriolae*[J]. Fisheries Science, 2011, 77(1): 113-118