

研究报告

## 鲫源迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其毒力基因的检测

程俊茗<sup>1</sup> 万明月<sup>1</sup> 周晋扬<sup>1</sup> 贾丹<sup>1,2</sup> 胡鲲<sup>1\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

(2. 中国水产科学院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

**摘要:**【目的】探明上海某养殖场的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)发生死亡的病因, 研究致病菌分类地位和毒力基因携带情况。【方法】通过病原菌的筛查和回感试验, 确定发病原因, 对 16S rRNA 基因、*gyrB* 和 *rpoB* 管家基因测序, 建立病原菌系统进化树, 结合 API-32E 细菌鉴定系统对菌株的生理生化进行鉴定, 综合判定致病菌的种类及其分类地位; 根据已报道的 7 个毒力基因 *fimA*、*citC*、*gadB*、*mukF*、*katB*、*esrB* 和 *sodB* 序列, 设计引物进行 PCR 扩增, 研究病原菌毒力基因携带情况。【结果】致病菌 GY15 是导致异育银鲫发病的原因, GY15 的 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoB* 基因与已报道的迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)相似性在 99% 以上, 构建系统进化树和 API 鉴定确定该菌株为 *E. tarda*, 腹腔注射回感可导致异育银鲫死亡, 半致死浓度(LD<sub>50</sub>)为 4.26×10<sup>5</sup> CFU/mL; 已报道的 7 种毒力基因在该致病菌中均能被检测到; 药敏试验结果显示, 该菌对恩诺沙星、氟苯尼考和氧氟沙星等 15 种药物敏感, 对新霉素、四环素和复方新诺明等 18 种药物表现为耐药。【结论】首次报道 *E. tarda* 可感染异育银鲫, 它对异育银鲫的养殖造成威胁。

**关键词:** 异育银鲫, 迟缓爱德华氏菌, 鉴定, 毒力基因

**Foundation item:** Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201203085); National Natural Resources Platform of China; Shanghai Ocean University Knowledge Service Platform

\*Corresponding author: Tel: 86-21-61900453; E-mail: khu@shou.edu.cn

Received: January 16, 2017; Accepted: May 04, 2017; Published online (www.cnki.net): August 08, 2017

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201203085); 国家水产种质资源平台项目; 上海海洋大学知识服务平台项目

\*通讯作者: Tel: 86-21-61900453; E-mail: khu@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-01-16; 接受日期: 2017-05-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-08

## Identification and virulence genes detection of *Edwardsiella tarda* isolated from *Carassius auratus gibelio*

CHENG Jun-Ming<sup>1</sup> WAN Ming-Yue<sup>1</sup> ZHOU Jin-Yang<sup>1</sup> JIA Dan<sup>1,2</sup> HU Kun<sup>1\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract:** [Objective] To confirm the pathogeny that causes *Carassius auratus gibelio* death in some fish farms in Shanghai, and characterize the virulence genes of the pathogenic bacteria. [Methods] The pathogenic bacteria were confirmed based on the pathogens screening and artificial challenge experiment, and identified according to 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* genes sequence and biochemical characteristics. Published nucleotide sequence methods were used to study the virulence genes (*fimA*, *citC*, *gad*, *mukF*, *katB*, *esrB* and *sodB*) by PCR amplification, and PCR primers for virulence genes. [Results] Strain GY15 isolated from infected fish was proved to be the pathogeny to *Carassius auratus gibelio*. Analysis of the 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences of the GY15 gave the highest identity (99%) to *Edwardsiella tarda*. This was further supported by phylogenetic tree and biochemical characteristics. GY15 was identified as *E. tarda*. Intraperitoneal injection with GY15 could lead to *Carassius auratus gibelio* death, with a value of the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of 4.26×10<sup>5</sup> CFU/mL. GY15 gave positive PCR results for 7 virulence genes. Antibiotic sensitivity test showed that among 35 antibiotics tested, GY15 was sensitive to 15 antibiotics such as enrofloxacin, florfenicol and ofloxacin, but was resistant to 18 antibiotics such as neomycin, achromycin and cotrimoxazole. [Conclusion] *Carassius auratus gibelio* was the susceptible host species of *E. tarda*, which is a new potential threat to carp's breeding.

**Keywords:** *Carassius auratus gibelio*, *Edwardsiella tarda*, Identification, Virulence genes

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是革兰氏阴性杆菌,属于肠杆菌科。在自然环境和动物内脏中均有发现<sup>[1]</sup>, *E. tarda* 是一种致病性强的水产病原菌,能导致水产养殖动物全身细菌性败血症<sup>[2]</sup>,给水产养殖业造成巨大的经济损失。同时,*E. tarda* 被认为是人鱼共患传染病病原,可导致人类严重肠胃炎、脑膜炎、败血症和伤口感染等<sup>[3]</sup>。

*E. tarda* 存在多个毒力基因,利用分子杂交技术进行基因组学研究发现,该菌有 14 种毒力基因,其中只有 7 种毒力基因存在于致病性的菌株中<sup>[4]</sup>: *fimA*、*katB*、*citC*、*gadB*、*mukF*、*orfA* 和 *esrB*。这 7 种毒力基因的功能已得到一定程度的研究:*fimA* 编码鞭毛蛋白,帮助病原黏附到宿主细胞表面,完成侵入细胞的功能<sup>[5]</sup>; *katB* 基因编码过氧化氢酶,抵抗有毒的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞膜、酶和 DNA 等细胞组成的损伤<sup>[6]</sup>; *citC* 基因有帮助分解柠檬酸的功能; *gadB* 基因参与抵抗酸性条件,从而减轻

吞噬细胞和胃肠道的酸性物质对病原菌的杀伤作用<sup>[7]</sup>; *mukF* 基因编码杀伤蛋白,对细胞起直接杀伤作用<sup>[8]</sup>; *orfA* 编码一个重要的分泌蛋白或者膜蛋白; *esrB* 是 III 型分泌系统调节基因<sup>[4]</sup>; 此外,还有学者发现 *sodB* 基因也是毒力基因,参与抵抗补体作用<sup>[9]</sup>。利用 PCR 方法确认毒力基因在分离株中的分布情况,筛选可用于检测致病性迟缓爱德华氏菌的毒力基因,对疾病的检测、预防和治疗上应用分子定向进化技术进行研究提供了检测手段,最终为建立致病性迟缓爱德华氏菌的 PCR 检测体系提供参考。

本文从患病异育银鲫体内分离到一株 *E. tarda*,首次报道 *E. tarda* 能够感染异育银鲫并导致死亡的病例,利用 PCR 方法检测到该菌存在 7 种毒力基因(*fimA*、*katB*、*citC*、*gadB*、*mukF*、*esrB* 和 *sodB*),同时测定其对 35 种药物的敏感性,最终为致病性 *E. tarda* 的快速检测和防治措施提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用 鱼

实验采集滨海基地的濒死异育银鲫, 体长  $13\pm 2$  cm, 体重  $76\pm 9$  g; 用于回感试验的健康异育银鲫来自同一滨海基地, 健康异育银鲫在实验室环境中暂养 15 d, 用已曝气的自来水换水, 每天换 20% 的水量, 暂养水温  $20\pm 1$  °C, 整个养殖过程不间断充氧。

### 1.2 主要试剂和仪器

营养琼脂培养基(NA)、胰蛋白胨液体培养基(TSB)、SS 培养基和药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; 细菌全基因组 DNA 抽提试剂盒, 大连美仑生物技术有限公司; 胶回收试剂盒, Zymoclean 公司; 琼脂糖, 美国 Lonza 公司。ATB 系统, 法国 BioMérieux 公司; 恒温摇床, 上海新苗医疗器械制造有限公司; PCR 扩增仪, Thermo Fisher Scientific 公司。PCR 引物合成和产物测序由上海迈浦生物科技有限公司完成。

### 1.3 病原筛查和细菌的分离培养

将濒死的异育银鲫捞出, 用 70% 的酒精反复擦洗鱼体表面, 从鱼体尾静脉取血(血样加入肝素抗凝), 用无菌手术剪剪下鳃丝, 手术刀片背部刮取黏液, 打开腹腔, 无菌分离出肝胰腺、肾脏、肠道, 用无菌 PBS 清洗 3 次。将取得的病样充分研磨, 研磨后的组织匀浆稀释后涂布于营养琼脂(NA), 28 °C 恒温培养, 48 h 后观察结果。

### 1.4 腹腔注射感染试验

挑取纯化后的单菌落于胰蛋白胨液体培养基(TSB)中, 28 °C、140 r/min 恒温培养 24 h, 用无菌磷酸缓冲液(PBS: 0.01 mol/L, pH 7.4)十倍稀释法稀释菌悬液并进行细菌计数。取健康的异育银鲫 50 尾(体重  $81\pm 9$  g), 随机分成 5 组(4 组实验组, 1 组对照组), 每组 10 尾鱼。实验组采取腹腔注射方法注射 100  $\mu$ L, 菌浓度为  $8.5\times 10^3$ – $8.5\times 10^6$  CFU/mL, 对照组注射 100  $\mu$ L 的无菌 PBS。腹腔注射感染期间的异育银鲫置于蓝色塑料桶内(装水 50 L), 每天

用已曝气的自来水换水 20%, 养殖水温  $27\pm 1$  °C 并连续充氧。感染期间不投喂饲料, 每天观察并记录发病症状和死亡情况, 连续观察 6 d, 用 TSK 法计算半致死浓度<sup>[10]</sup>, 并取濒死异育银鲫的内脏再次进行细菌的分离、纯化和鉴定。

### 1.5 病原菌的鉴定

**1.5.1 病原菌的菌落形态观察:** 将病原菌分别接种至 NA 和 SS 培养基上, 28 °C 培养 48 h 后观察菌落的形态。

**1.5.2 病原菌的生理生化鉴定:** 取已纯化的单菌落接种至 TSA 培养基中, 28 °C 培养 48 h。采用 ATB 系统分析致病菌的生化特征, 参照 API-32E 试剂条说明书操作, 实验重复 2 次。

**1.5.3 16S rRNA 基因测序:** (1) 菌株 GY15 全基因组的提取。取已纯化的单菌落接种于新鲜的 TSB 培养基中, 28 °C、140 r/min 培养 20 h。取菌液 1 mL, 用细菌全基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 具体操作按说明书进行。

(2) 16S rRNA 基因 PCR 扩增。25  $\mu$ L PCR 反应体系: 10 $\times$ Taq buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP mix (2 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, 正反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, DEPC 处理水 15.25  $\mu$ L。PCR 扩增条件参照 Weisburg 等<sup>[11]</sup>, 具体见表 1。

(3) PCR 产物的胶回收纯化、连接转化。16S rRNA 基因的 PCR 产物采用胶回收试剂盒进行回收纯化, 实验步骤按照试剂盒说明书进行; 实验所用载体为 pMD18-T, 实验步骤按试剂盒说明书进行。

### 1.6 多位序列分析

**1.6.1 菌株 GY15 基因组的提取:** 菌株 GY15 基因组的提取方法参照 1.5.3(1)的方法进行。

**1.6.2 *gyrB* 和 *rpoB* 基因的 PCR 扩增:** 选取 *gyrB*<sup>[12]</sup> 和 *rpoB*<sup>[13]</sup> 基因进行多位序列分析。PCR 扩增体系参照 1.5.3(2), PCR 反应条件见表 1。

**1.6.3 PCR 产物的胶回收纯化和连接转化:** *gyrB* 和 *rpoB* 的 PCR 产物胶回收纯化、PCR 产物连接、转化至大肠杆菌感受态细胞, 具体步骤参照

1.5.3(3)进行。

**1.6.4 系统发育分析:** 将 16S rRNA 基因的测序结果在数据库中进行比对分析(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/results>); *gyrB* 和 *rpoB* 基因的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 选取 *E. tarda* 及其近缘物种鳗鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella anguillarum*)、保科爱德华氏菌(*Edwardsiella hoshinae*)和鲶鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)等相关序列, 采用 NCBI 中的 BLAST 工具进行核酸序列的比对分析, MEGA 7.0 软件用于基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ)的 16S rRNA 基因、*gyrB* 和 *rpoB* 管家基因的系统进化树的构建, 并进行 1 000 次的 Bootstrap 重复检验。

## 1.7 毒力基因的测定

### 1.7.1 菌株 GY15 的全基因组提取: 菌株 GY15 的

全基因组提取方法参照 1.5.3(1)的方法进行。

**1.7.2 毒力基因引物及设计:** 根据相关参考文献和 GenBank 已公布的 *E. tarda* 毒力基因, 选取 *sodB*<sup>[9]</sup>、*katB*<sup>[14]</sup>、*esrB*<sup>[15]</sup>、*fimA*<sup>[16]</sup>、*citC*<sup>[17]</sup>、*gadB* 和 *mukF* 共 7 种毒力基因, 其中 *gadB* 和 *mukF* 基因用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。PCR 扩增体系参照 1.5.3(2), 反应条件见表 1。PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.8 药物敏感性测定

参考李楠等<sup>[18]</sup>的方法, 采用 K-B 纸片扩散法, 用无菌棉签蘸取新鲜的菌悬液均匀涂布于 TSA 培养基上。用无菌镊子取药敏纸片轻轻贴附于平板上, 实验设置 3 个平行, 28 °C 培养 30 h 后测量抑菌圈直径。选用恩诺沙星、氟苯尼考、利福平等 35 种药物。

表 1 引物序列及 PCR 扩增条件  
Table 1 Sequences of primers and amplification conditions

目的基因 Target gene	引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	参考文献 References	PCR 扩增条件 Amplification conditions
16S rRNA gene	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg 等 <sup>[11]</sup>	94 °C 5 min ;94 °C 30 s ,54 °C 30 s ,72 °C 90 s , 36 个循环 ;72 °C 10 min
	1492R	GGTTACCTGTTACGACTT		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -F	GAAAGACCAGGAACGGATCA	Pridgeon 等 <sup>[12]</sup>	退火温度为 54.1 °C , 其余反应条件同上
	<i>rpoB</i> -R	AGGTCGTCACGGTAACAAGG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	Yamamoto 等 <sup>[13]</sup>	退火温度为 61.3 °C , 其余反应条件同上
	<i>gyrB</i> -R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC		
<i>sodB</i>	<i>sodB</i> -F	ATGTCATTCGAATTACCTGC	Yamada 等 <sup>[9]</sup>	退火温度为 53 °C , 其余反应条件同上
	<i>sodB</i> -R	TCGATGTAATAAGCGTGTCCCA		
<i>katB</i>	<i>katB</i> -F	GATGCGATCAAGTTCCCGGA	Han 等 <sup>[14]</sup>	退火温度为 54.7 °C , 其余反应条件同上
	<i>katB</i> -R	ACCTGGATGTACAGATCCCAT		
<i>esrB</i>	<i>esrB</i> -F	GATCATGCCTTGCTAGCC	Tan 等 <sup>[15]</sup>	退火温度为 53.3 °C , 其余反应条件同上
	<i>esrB</i> -R	TCGGCGACCAGCTTGAGA		
<i>gadB</i>	<i>gadB</i> -F	ATCCCCGCTTTGGTTTCAGA	GenBank AY078505	退火温度为 53.5 °C , 其余反应条件同上
	<i>gadB</i> -R	GGAGGAGCCGATAGTATTGGTA		
<i>fimA</i>	<i>fimA</i> -F	ACAGCCTGGAAGAGTCCTAC	Sakai 等 <sup>[16]</sup>	退火温度为 51.8 °C , 其余反应条件同上
	<i>fimA</i> -R	TTGAGAGTCGCTGCTTAC		
<i>citC</i>	<i>citC</i> -F	TTTCCGTTTGTGAATCAGGTC	江云等 <sup>[17]</sup>	退火温度为 53 °C , 其余反应条件同上
	<i>citC</i> -R	AATGTTTCGGCATAGCGTTG		
<i>mukF</i>	<i>mukF</i> -F	TTTGGACGGTGAAATGAGC	GenBank AY078510	退火温度为 54 °C , 其余反应条件同上
	<i>mukF</i> -R	CGTTGCGGTGCCAGTGAA		

## 2 结果与分析

### 2.1 疾病调查及发病状况

发病时养殖水体的温度为 25–27 °C, pH 为 8.3±0.2, 溶解氧为 5.6±0.6 mg/L, 总氨氮含量为 0.50±0.02 mg/L, 养殖密度约为 15 000 尾/ha, 现场死亡率为 20%–30%。患病异育银鲫体重为 85 g 左右, 初期症状为摄食量减少, 伏于池底不动; 随后病情加重, 表现为全身性出血, 腹部肿胀, 腹部鳞片基部严重出血(图 1), 鳍条充血以至出血, 肛门红肿出血并伴有脓样液体流出, 胸鳍周围肌肉每隔 5–8 s 抽搐 1 次, 鳃丝呈现紫红色。打开腹腔后有黄色浑浊腹水, 观察到肝胰腺充血, 肠道易断, 肠内无食物, 鳃壁充血, 肌肉充血出血, 呈现典型的细菌性败血症症状。

### 2.2 病原的筛查与细菌分离

取自然发病的濒死病鱼检查, 从濒死的病鱼

肝胰腺、肾脏、肠道组织内平板涂布法分离细菌, 结果得到一株菌株命名为 GY15。

### 2.3 人工感染及病原菌的再分离

健康的异育银鲫腹腔注射  $8.5 \times 10^5$  CFU/mL 的菌株 GY15 后, 异育银鲫陆续出现游动缓慢、反应迟钝等症状。异育银鲫人工感染死亡率统计如表 2 所示, 半致死浓度为  $4.26 \times 10^5$  CFU/mL。部分鱼出现腹部、鳍条基部严重充血以至出血, 肛门红肿等症状。从濒死病鱼的内脏内可分离到菌落形态、生理生化特性、16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoB* 基因序列都与菌株 GY15 相同的菌株。

### 2.4 病原菌的鉴定

**2.4.1 菌落形态特征:** 在 NA 和 TSA 培养基上形成正圆形、凸起、温润光泽小菌落(48 h); 在 SS 琼脂培养基形成中间为黑色、周边为淡黄色透明的小菌落(48 h)(图 2)。



图 1 发病异育银鲫的临床症状

Figure 1 Clinical symptoms of diseased *Carassius auratus gibelio*

表 2 异育银鲫腹腔注射感染菌株 GY15 的死亡情况统计表

Table 2 Mortality of *Carassius auratus gibelio* challenged with isolate GY15 by intraperitoneal injection

注射菌含量 Bacterial dose (CFU/mL)	每天死亡量 Number of fish dead						死亡率 Mortality (%)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	
$8.5 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0
$8.5 \times 10^4$	0	0	0	0	1	1	20
$8.5 \times 10^5$	0	0	0	2	4	0	60
$8.5 \times 10^6$	1	5	4	0	0	0	100
对照组(PBS) Control	0	0	0	0	0	0	0



图2 GY15在SS培养基上的菌落形态  
Figure 2 Colonial morphology of the strain GY15 in SS

**2.4.2 生化特性:** 采用API-32E鉴定系统对致病菌GY15进行生理生化指标的测试。GY15经鉴定为迟缓爱德华氏菌(表3),其鉴定百分率值为99.8%。

**2.4.3 致病菌的系统进化分析:** 为确定其分类地位,采用16S rRNA基因测序与多位序列分析相结合的方法进行致病菌GY15的系统进化分析。经

PCR扩增和测序,分别得到了1410 bp (16S rRNA基因)、1164 bp (*gyrB*)和914 bp (*rpoB*)的基因片段。将GY15菌株的16S rRNA、*gyrB*和*rpoB*基因序列在NCBI上进行同源性检索并构建系统进化树,结果显示,在以上3个基因的系统进化树中,GY15均与*E. tarda*聚在一起(图3-5)。

### 2.5 毒力基因的测定

毒力基因用设计的7种毒力基因的特异性引物进行PCR扩增,经琼脂糖凝胶电泳后,7种毒力基因均被检测到:*sodB* (490 bp)、*katB* (377 bp)、*esrB* (454 bp)、*gadB* (308 bp)、*fimA* (839 bp)、*citC* (553 bp)和*mukF* (303 bp)(图6)。

以上测序结果在NCBI进行比对分析,*sodB*基因与*E. tarda* (AB232350.1和AB009853.1)相似性达100%;*katB*基因与*E. tarda* (HQ407402.1和CP002154.1)相似性达99%;*esrB*基因与*E. tarda* (AY643478.1和KM267087.1)相似性达98%;*gadB*基因与*E. tarda* (AY078505.1和CP004441.1)相似

表3 菌株GY15的API-32E鉴定结果  
Table 3 Results of API-32E bacteria identification of strain GY15

生化项目 Biochemical items	结果 Results	生化项目 Biochemical items	结果 Results
L-阿拉伯醇 L-Arabitol	-	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-
D-甘露醇 D-Mannitol	-	肌醇 Inositol	+
丙二酸盐 Usage of malonic acid	-	D-半乳糖酸盐同化 D-Galactose assimilation	-
D-阿拉伯醇 D-Arabitol	-	D-纤维二糖 D-Cellobiose	-
L-天冬氨酸芳胺酶 L-Aspartate arylamidase	-	侧金盏花醇 Adonitol	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	肌醇 Inositol	-
D-海藻糖 D-Trehalose	-	$\beta$ -葡萄糖醛酸酶 $\beta$ -Glucuronidase	-
$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -Glucosidase	-	$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -Galactosidase	-
$\alpha$ -麦芽糖 $\alpha$ -Maltose	-	$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase	-
D-麦芽糖 D-Maltose	+	尿素酶 Urease	-
$\beta$ N 乙酰葡萄糖胺 $\beta$ N-Acetyl glucosamine	-	D-山梨醇 D-Sorbitol	-
蔗糖 Saccharose/sucrose	-	酚红 Phenol red	+
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	古老糖 Palatinose	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	$\alpha$ -半乳糖苷酶 $\alpha$ -Galactosidas	-

注:-: 阴性;+: 阳性。

Note: -: Negative; +: Positive.

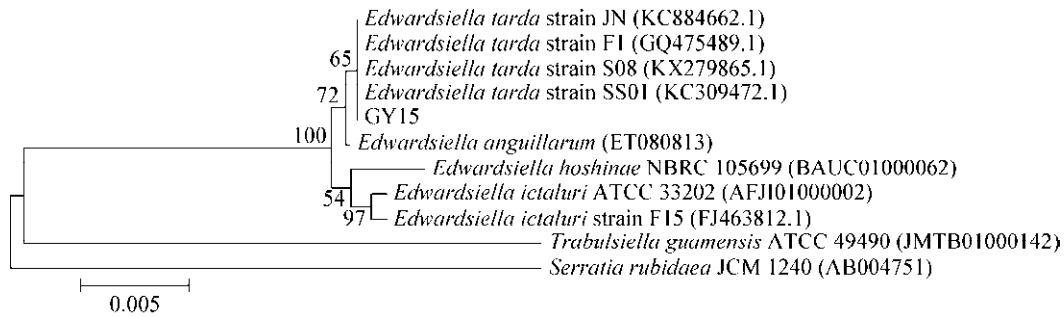


图3 菌株 GY15 的 16S rRNA 基因的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain GY15

注：标尺：表示序列差异的分支长度；括号内的数字为 GenBank 序列号；节点处的数字为 Bootstrap 值；括号内为 GenBank 数据库的登录号。

Note: Bar: Nucleotide divergence; Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the Bootstrap values; Those in parentheses are GenBank accession number.

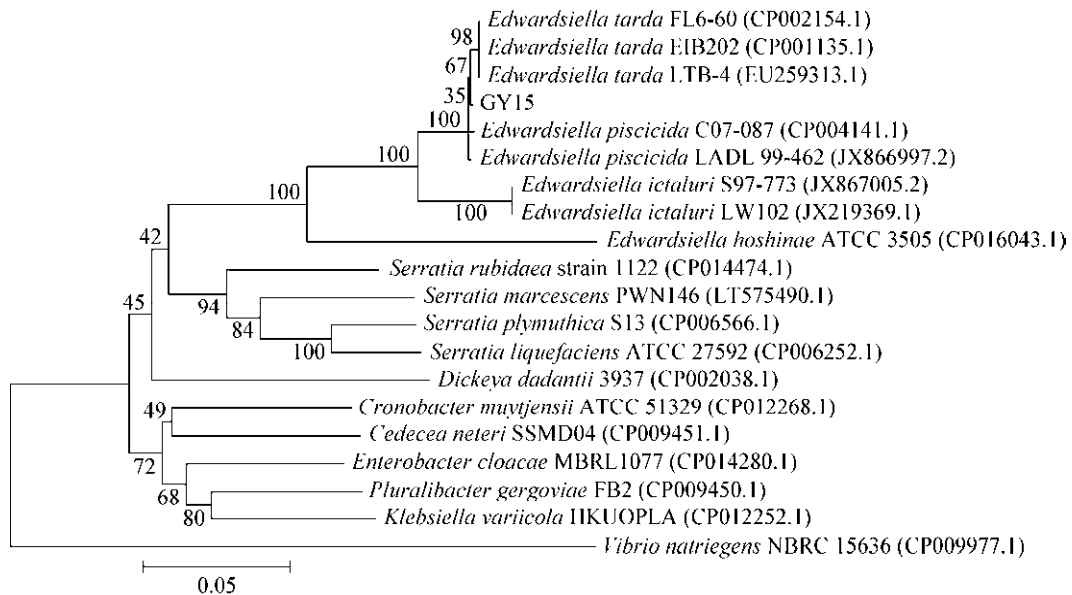


图4 菌株 GY15 的 gyrB 基因的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on gyrB gene sequences of strain GY15

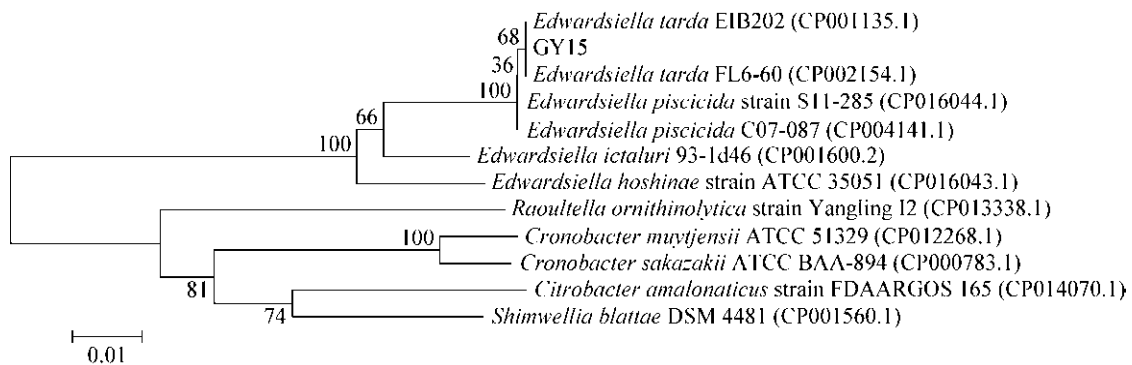


图5 菌株 GY15 的 rpoB 基因的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on rpoB gene sequences of strain GY15

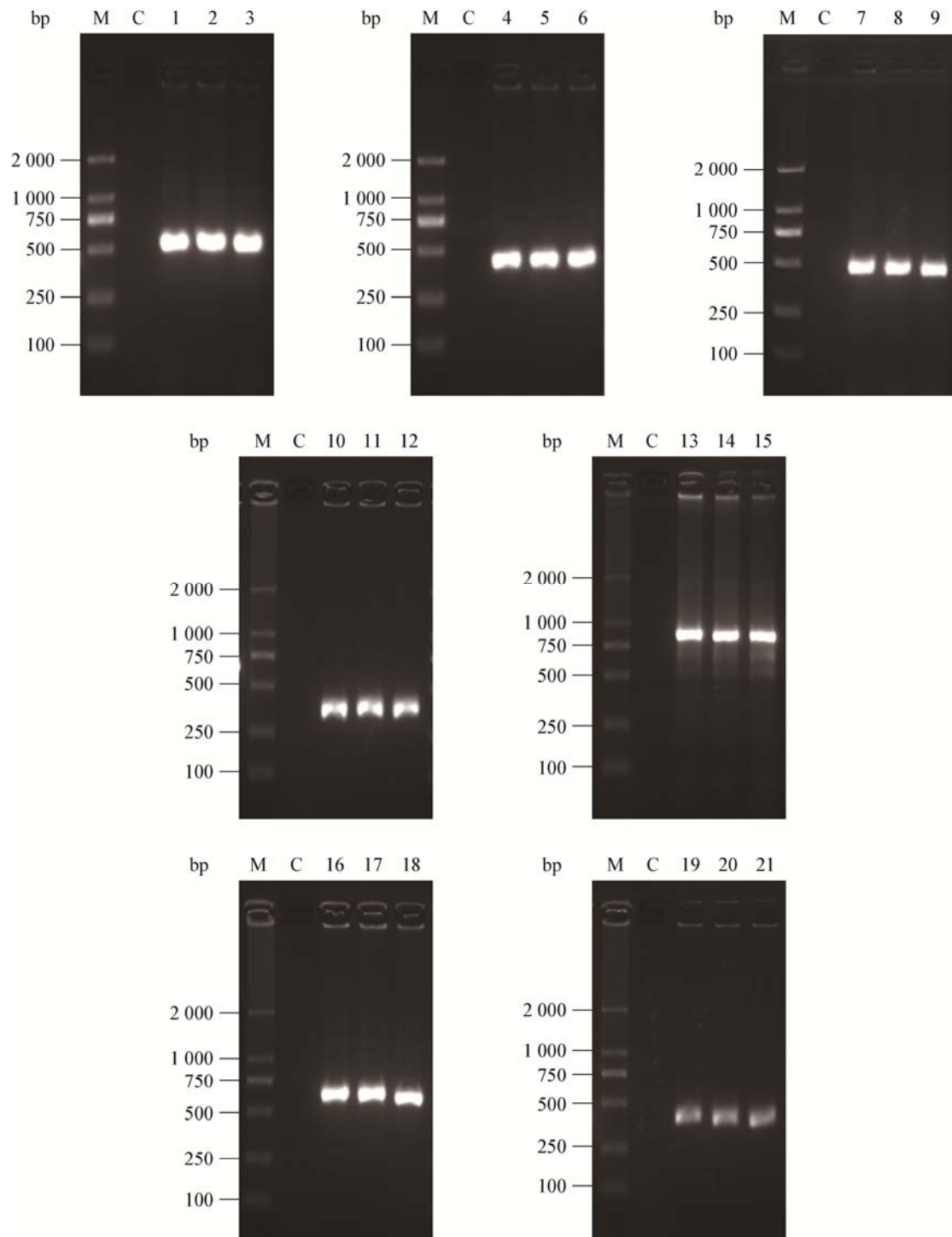


图 6 7个毒力基因 PCR 扩增结果

Figure 6 The PCR results of seven kinds of virulence genes

注：M：Marker DL2000；C：阴性对照；1-3、4-6、7-9、10-12、13-15、16-18和19-21分别为用 *sodB*、*katB*、*esrB*、*gadB*、*fimA*、*citC*和 *mukF* 基因的引物进行扩增获得的 PCR 产物。

Note: M: Marker DL2000; C: Negative control; 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18 and 19-21: PCR amplification used the primers of *sodB*, *katB*, *esrB*, *gadB*, *fimA*, *citC* and *mukF* gene, respectively.



性达 98% ; *fimA* 基因与 *E. tarda* (AB100170.2 和 CP001135.1)相似性达 99% ; *citC* 基因与 *E. tarda* (CP002154.1 和 CP001135.1)相似性达 99% ; *mukF* 基因与 *E. tarda* (CP002154.1 和 CP001135.1)相似性达 99%。

## 2.6 病原菌的药物敏感性实验

采用 K-B 纸片扩散法进行菌株 GY15 的药物敏感性实验, 结果显示: 菌株 GY15 对恩诺沙星、氟苯尼考和氧氟沙星等 15 种药物敏感, 对新霉素、四环素和复方新诺明等 18 种药物表现为耐药(表 4)。

表 4 菌株 GY15 对 35 种药物敏感性测试  
Table 4 Susceptibility to antibiotics results of strain GY15

药物 Antibiotic	药物浓度 Dosage ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感程度 Sensitivity	药物 Antibiotic	药物浓度 Dosage ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感程度 Sensitivity
恩诺沙星 Enrofloxacin	10.00	18	S	头孢拉定 Cefradine	30.00	5	R
氟苯尼考 Florfenicol	30.00	30	S	头孢氨苄 Cefalexin	30.00	8	R
利福平 Rifampicin	5.00	9	R	新霉素 Neomycin	30.00	8	R
链霉素 Streptomycin	10.00	0	R	万古霉素 Vancomycin	30.00	0	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30.00	29	S	头孢唑啉 Cefazolin	30.00	21	S
头孢噻吩 Cefalothin	30.00	0	R	哌拉西林 Piperacillin	100.00	23	S
头孢他啶 Ceftazidime	30.00	25	S	庆大霉素 Gentamycin	10.00	14	I
克林霉素 Clindamycin	2.00	0	R	羧苄西林 Carbenicillin	100.00	22	S
氯霉素 Chloramphenicol	30.00	32	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5.00	19	S
红霉素 Erythromycin	15.00	9	R	卡那霉素 Kanamycin	30.00	0	R
头孢呋辛 Cefuroxime	30.00	20	S	丁胺卡那 Amikacin	30.00	22	S
呋喃唑酮 Furaxone	300.00	20	S	氨苄西林 Ampicillin	10.00	6	R
米诺环素 Minocycline	30.00	14	I	氧氟沙星 Ofloxacin	5.00	16	S
多西环素 Doxycycline	30.00	4	R	麦迪霉素 Midecamycin	30.00	0	R
四环素 Acheomycin	30.00	2	R	头孢哌酮 Cefoperazone	75.00	24	S
多黏菌素 Polymyxin B	300 IU	6	R	诺氟沙星 Norfloxacin	10.00	18	S
复方新诺明 Cotrimexazole	23.75	0	R	苯唑西林 Oxacillin	1.00	0	R
青霉素 Penicillin	10 U	0	R				

注: S: 高度敏感(抑菌圈直径 $>15$  mm); I: 中度敏感( $10 \leq$  抑菌圈直径 $\leq 15$ ); R: 低度敏感或不敏感( $0 \leq$  抑菌圈直径 $< 10$ ).

Note: S: Highly sensitive (Diameter of inhibition zone $>15$  mm); I: Moderately sensitive ( $10 \leq$  Diameter of inhibition zone $\leq 15$ ); R: Low sensitivity or insensitivity ( $0 \leq$  Diameter of inhibition zone $< 10$ ).

### 3 讨论

随着水产养殖业的逐步扩大, 高密度的养殖模式导致病害频发, 爱德华氏菌病也日趋严重。*E. tarda* 可以感染黑鲈<sup>[19]</sup>、大菱鲆<sup>[20]</sup>、虹鳟<sup>[21]</sup>、欧洲鳗鲡<sup>[22]</sup>等。近几年有学者报道 *E. tarda* 也可以感染齐口裂腹鱼<sup>[23]</sup>, 本研究首次报道了在异育银鲫养殖过程中 *E. tarda* 作为潜在的细菌性病原体也可以感染异育银鲫导致死亡的案例, 说明 *E. tarda* 的宿主范围在扩大, 需要引起重视。

本实验从濒死异育银鲫体内分离到一株 GY15, 运用分子生物学方法测定 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoB* 基因。16S rRNA 基因具有高度的保守性和特异性, 是种属鉴定的分子基础<sup>[24]</sup>。16S rRNA 基因检测技术已成为病原菌检测和鉴定的强有力工具, 应用该技术可以实现对病原菌进行快速、微量和准确的分类鉴定<sup>[25]</sup>, 但是对于水产病原菌例如气单胞菌属和弧菌属, 16S rRNA 基因的种间相似度高达 99% 以上, 该技术的特异性和灵敏度一直存在争议<sup>[26]</sup>。多位点序列分型 MLST (Multilocus sequence typing) 是基于管家基因内部片段的序列多态性, 对多个管家基因扩增、测序并对扩增序列进行比对分析, 具有很高的分辨率, 可以准确反映细菌群体的变异进化<sup>[27]</sup>, 为流行病学监测、微生物分型和微生物进化的基础研究提供了一种简便可行的方法<sup>[28]</sup>。因此, 本文运用 16S rRNA 基因、管家基因 *gyrB* 和 *rpoB* 同时结合生理生化实验, 综合判定导致异育银鲫死亡的致病菌为 *E. tarda*。

本实验扩增并检测出 *E. tarda* 的 7 种毒力基因, 与国内已报道菌株的毒力基因有差异, 是对国内有关 *E. tarda* 毒力基因研究的补充。有文献报道<sup>[4]</sup>利用基因组学进行毒力基因的研究, 7 个毒力基因(*orfA*、*citC*、*fimA*、*gadB*、*katB*、*mukF*、*esrB*) 只在致病性的迟缓爱德华氏菌分离株中被发现。其中 *orfA* 基因的序列未提交, 因此无法设计引物。不同的学者选用不同的目标毒力基因进行检测, 如江云等<sup>[17]</sup>选取了 6 种毒力基因, 扩增出 4 种(*fimA*、*gadB*、*citC* 和 *mukF*)毒力基因, 另外 2 种(*esrB* 和

*katB*)未检测出, 认为选择任意一种基因(*fimA*、*gadB*、*citC* 和 *mukF*)都可作为致病性 *E. tarda* 的检测对象。赵飞等<sup>[29]</sup>扩增出地图鱼 *E. tarda* 的 *fimA* 基因; 朱文进等<sup>[30]</sup>认为 *fimA* 毒力基因存在于致病性迟缓爱德华氏菌中, 可作为快速检测致病性迟缓爱德华氏菌的标志物; 张晓君等<sup>[31]</sup>对 10 株 *E. tarda* 的 4 种毒力基因(*fimA*、*fimB*、*gadB* 及 *citC*)进行扩增, 结果显示 4 种毒力基因在 10 株 *E. tarda* 中均存在; 管峰等<sup>[32]</sup>检测港口航道水域中 *E. tarda* 的 6 种毒力基因, 但只检测到 2 种毒力基因(*fimA* 和 *gadB*); 贾俊涛等<sup>[33]</sup>检测到导致大菱鲆发病的 *E. tarda* 的 3 种毒力基因(*fimA*、*gadB* 和 *citC*)。综合本实验和国内文献报道的毒力基因, 认为利用 *fimA* 和 *gadB* 毒力基因可以对 *E. tarda* 进行快速检测。

本试验选取的药物并非均可用于养殖环境, 其中氯霉素、环丙沙星、万古霉素、呋喃类和头孢类等抗生素已被农业部列为禁药, 结合养殖户常见药物, 推荐使用恩诺沙星、氟苯尼考和诺氟沙星对迟缓爱德华氏菌病进行治疗。

本文通过常规 PCR 方法扩增到 7 个毒力基因, 进一步明确了 *E. tarda* GY15 的毒力基因携带情况, 可为进一步研究核酸疫苗、亚单位疫苗和快速检测试剂盒的开发奠定基础, 为该菌的快速检测和防治奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Amandi A, Hiu SF, Rohovec JS, et al. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1380-1384
- [2] Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(S3): 1331-1344
- [3] Janda JM, Abbott SL. Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 111(2/3): 275-280
- [4] Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(3): 1343-1351
- [5] Sakai T, Kanai K, Osatomi K, et al. Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 226(1): 127-133
- [6] Matthew JA, Tan YP, Srinivasa Rao PS, et al. *Edwardsiella tarda* mutants defective in siderophore production, motility, serum

- resistance and catalase activity[J]. Microbiology, 2001, 147(2): 449-457
- [7] Casterine-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, et al. Control of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biosciences, 1999, 181(11): 3525-3535
- [8] Jin F, Kunitoshi Y, Hironori N, et al. New killing system controlled by two genes located immediately upstream of the mukB gene in *Escherichia coli*[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 243(2): 136-147
- [9] Yamada Y, Wakabayashi H. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella tarda* by sequence analysis of *sodB*[J]. Fish Pathology, 1999, 34(3): 145-150
- [10] Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays[J]. Environmental Science and Technology, 1977, 11(7): 714-719
- [11] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Biosciences, 1991, 73(2): 697-703
- [12] Pridgeon JW, Klesius PH, Yildirim-Aksoy M. Attempt to develop live attenuated bacterial vaccines by selecting resistance to gossypol, proflavine hemisulfate, novobiocin, or ciprofloxacin[J]. Vaccine, 2013, 31(8): 2222-2230
- [13] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109
- [14] Han HJ, Kim DH, Lee DC, et al. Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel)[J]. Journal of Fish Disease, 2006, 29(10): 601-609
- [15] Tan YP, Zheng J, Tung SL, et al. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2301-2313
- [16] Sakai T, Yuasa K, Sano M, et al. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2009, 21(2): 124-132
- [17] Jiang Y, Li SS, Wang SK, et al. Detection of the virulence genes of pathogenic *Edwardsiella tarda* by PCR assay[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(4): 123-129 (in Chinese)  
江云, 李寿崧, 王寿昆, 等. 致病性迟钝爱德华氏菌毒力基因的PCR检测[J]. 中国食品学报, 2008, 8(4): 123-129
- [18] Li N, Guo HZ, Jiao R, et al. Identification and pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak on bacterial disease of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(6): 980-987 (in Chinese)  
李楠, 郭慧芝, 焦冉, 等. 草鱼的一种急性细菌性传染病病原的分离鉴定及致病性研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6): 980-987
- [19] Blanch AR, Pinto RM, Jofre JT. Isolation and characterization of an *Edwardsiella* sp. strain, causative agent of mortalities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquaculture, 1990, 88(3/4): 213-222
- [20] Nougayrede PH, Vuillaume A, Vigneulle M, et al. First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1994, 14: 128-129
- [21] Uhland FC, Hélie P, Higgins R. Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12(1): 74-77
- [22] Alcaide E, Herraiz S, Esteve C. Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild european eels *Anguilla anguilla* from mediterranean spain[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 73(1): 77-81
- [23] Zhou Y, Geng Y, Wang KY, et al. *Edwardsiella tarda* infection in cultured Ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China[J]. Aquaculture Research, 2014, 47(7): 2349-2354
- [24] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1719-1728
- [25] Liu Y, Cui XL, Li WJ, et al. Application of RNA secondary structure in phylogenetic analysis of microbiology[J]. Microbiology China, 2006, 33(2): 147-150 (in Chinese)  
刘杨, 崔晓龙, 李文均, 等. RNA 二级结构在微生物系统发育分析上的应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 147-150
- [26] Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(3): 412-421
- [27] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. Trends in Microbiology, 2003, 11(10): 479-487
- [28] Ji XW, Liao YL, Mao XH, et al. MLST of the pathogenic microorganism genotyping research progress in application[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(2): 246-249 (in Chinese)  
姬小微, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 246-249
- [29] Zhao F, Zou WM, Tan AP, et al. Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* in oscar *Astronotus ocellatus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(6): 403-408 (in Chinese)  
赵飞, 邹为民, 谭爱萍, 等. 地图鱼迟钝爱德华氏菌病原菌的鉴定及毒力基因的检测[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(6): 403-408
- [30] Zhu WJ, Chen CZ, Su YM, et al. Detection and sequencing of virulence genes of pathogenic *Edwardsiella tarda* in *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(11): 20-24 (in Chinese)  
朱文进, 陈翠珍, 苏咏梅, 等. 牙鲈致病性迟钝爱德华氏菌毒力基因的检测及序列分析[J]. 动物医学进展, 2014, 35(11): 20-24
- [31] Zhang XI, Bai XS, Bi KR, et al. Virulence genes and duplex PCR and the LAMP methods for the detection of pathogenic *Edwardsiella tarda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7): 1087-1094 (in Chinese)  
张晓君, 白雪松, 毕可然, 等. 病原迟钝爱德华氏菌毒力基因及双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1087-1094
- [32] Guan F, Chen JG, Mao ZJ, et al. Virulence genetic studies of pathogenic bacteria in Ningbo-Zhoushan port and channel waters[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(2): 183-189 (in Chinese)  
管峰, 陈吉刚, 毛芝娟, 等. 宁波-舟山港口航道水域致病性细菌的毒力基因型鉴定[J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(2): 183-189
- [33] Jia JT, Chen JX, Lu LL, et al. Identification and study on the virulence gene of *Edwardsiella tarda*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(8): 186-190 (in Chinese)  
贾俊涛, 陈吉祥, 卢丽丽, 等. 1 株迟钝爱德华氏菌的鉴定及毒力基因的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(8): 186-190