

doi: 10.7541/2013.108

黄沙鳖白底板病病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测

黄 钧¹ 黄艳华¹ 胡大胜² 罗华平³ 施金谷¹ 彭民毅¹
禤均成¹ 覃丽芬¹ 滕忠作¹ 曾桂忠³

(1. 广西大学动物科学技术学院/广西水生动物病害诊断实验室, 南宁 530005; 2. 广西水产技术推广总站, 南宁 530022;
3. 广西武鸣县渔政监督管理站, 武鸣 530100)

摘要: 用常规方法从患典型白底板病黄沙鳖的心脏、肝脏等处进行细菌的接种分离, 通过人工感染确定分离菌株的致病性, API 20NE、16S rRNA 基因序列分析进行病原菌鉴定和确定其系统发育地位, K-B 纸片扩散法进行药敏试验, PCR 检测病原菌的 6 种毒力基因。试验结果, 共分离到 13 株病原菌, 其中嗜水气单胞菌 9 株, 温和气单胞菌 4 株。在 9 株嗜水气单胞菌中, 有 5 株与 *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 菌株亲源关系最近, 4 株与 *Aeromonas hydrophila* 北京株 QDC01 的亲源关系最近; 而 4 株温和气单胞菌与 *Aeromonas sobria* ATCC 43979 的亲源关系最近。药敏试验结果, 仅头孢哌酮对 13 株病原菌都高度敏感, 来源于不同养殖区域的病原菌药敏结果相差较大。6 种毒力基因的阳性率, *Aer*、*Act* 和 *ahp* 均为 100%, *hly* 和 *Alt* 为 92.31%, *ahal* 为 76.92%; 毒力基因型共有 4 种, 嗜水气单胞菌主要为 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型, 而温和气单胞菌主要为 *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。

关键词: 黄沙鳖; 白底板病; 嗜水气单胞菌; 温和气单胞菌; 毒力基因

中图分类号: S947.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)05-0844-11

黄沙鳖(*Trionyx sinensis*)主要分布于广西、广东的西江流域地区, 是西江流域特有的鳖种, 被认为是中华鳖(*Trionyx sinensis*)的地理群, 但其分类地位尚未最终定论。黄沙鳖体色金黄, 脐边宽厚, 肌肉结实, 营养丰富、肉质鲜美, 历来是宴席上的美味佳肴, 全身均可入药, 具有一定的保健、药用功能。随着野生资源的不断减少和市场需求量的不断增大, 黄沙鳖的养殖规模也在迅速扩大, 2010 年广西桂平市的黄沙鳖获全国地理标志农产品。但最近几年来, 在黄沙鳖养殖业迅猛发展和高密度集约化养殖条件下, 当管理不善时容易引起养殖环境恶化, 导致细菌性疾病暴发流行, 常常造成巨大的经济损失, 细菌性疾病对广西黄沙鳖养殖业的发展已构成严重威胁, 其中白底板病因其具有传播快、发病率高、死亡惨重等特点, 已成为危害最为严重的黄沙鳖细菌

性疾病之一。在中华鳖白底板病病原的研究方面国内已取得了大量有价值的成果^[1—8], 但对黄沙鳖细菌性疾病病原的研究报告尚少, 童桂香等对黄沙鳖温和气单胞菌进行了分离鉴定和药敏试验^[9]。普遍认为, 气单胞菌(*Aeromonads*) 的致病性是多种毒力因子共同作用的结果, 这些毒力基因的种类与数量在不同来源菌株间存在一定的差异性。针对气单胞菌的毒力基因, 不少国内外学者已进行了深入研究^[10—19], 可至今未见有关黄沙鳖源气单胞菌毒基因分布情况的研究报道。为此, 作者对广西南宁市和柳州市养鳖场的黄沙鳖白底板病进行了病原菌的分离鉴定、药敏试验, 并对病原菌的 *hly*、*Ae*、*Alt*、*Act*、*ahal* 和 *ahp* 六种毒力基因进行了检测, 以期为黄沙鳖白底板病病原分子流行病学等领域的深入研究及相关疫苗的研发提供参考。

收稿日期: 2012-10-08; 修订日期: 2013-05-17

基金项目: 广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018065); 广西水产畜牧兽医局专项项目(桂渔牧财[2010]58号; 桂渔牧财[2011]52号)资助

通信作者: 黄钧(1957—), 男, 广西南宁市人; 学士, 教授; 主要从事水产动物疾病防治技术的教学和研究工作。E-mail: hj1351@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

黄沙鳖病样分别采自广西南宁市和柳州市的不同黄沙鳖养殖场。健康黄沙鳖购自南宁市某养鳖场, 试验前在实验室经 20d 暂养确认健康无病后用于人工感染试验。

API 20NE 为法国梅里埃公司生产。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。pMD18-T 载体质粒, *BamH I*、*Hinc II*、*HindIII*内切酶购于 TaKara 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒均购自北京天根生物公司; 质粒提取试剂盒购于上海生物工程公司; 氨苄青霉素购于 Solarbio 公司; 琼脂糖购于上海基因技术有限公司。PCR 扩增引物由上海生物工程技术公司合成, 用超纯水稀释后-20°C 保存。

1.2 细菌的分离与鉴定

细菌的分离 取发病症状典型的黄沙鳖, 用 75% 酒精棉球擦拭体表消毒后解剖, 在无菌条件下取心脏、肝脏和腹水, 划线接种于普通营养琼脂培养基上, 37°C 培养 18—24h, 挑选优势菌落进一步纯化, 并转接至营养琼脂斜面上, 4°C 保存备用。

细菌的鉴定 细菌基本特征观察: 将分离菌株接种到兔血培养基上, 37°C 培养 24h 后观察其溶血性。纯培养细菌在普通营养琼脂培养基上扩培, 37°C 培养 18—24h 后进行革兰氏染色观察细菌的形态特征。

API 20NE 鉴定 根据氧化酶试验结果, 选用 API 20NE 细菌鉴定系统及生化鉴定试剂条对分离菌株进行鉴定^[20]。

16S rRNA 基因序列分析 将菌株接种于 4 mL 的 LB 培养基中, 置 28°C, 200 r/min 振荡培养 16h, 取 0.8 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中, 12000 r/min 离心 2min 收集菌体。按照“TIANamp Bacterial DNA Kit”试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA, -20°C 保存备用。采用细菌通用引物进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增: 正向引物 fD1: 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 rp2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', 反应体系(25 μL)为: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 25 pmol/L 上下游引物各 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5U) 0.3 μL, DNA 模板 3 μL, 用 ddH₂O 补足余下体积。

下体积。扩增条件: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 56°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。PCR 反应结束后以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳方法(100V 电压下电泳 35min)进行鉴定, 用凝胶成像系统观察, 根据出现的电泳条带确定并记录结果。PCR 产物送上海生物工程公司进行序列测定。

1.3 人工感染试验

无菌滤液的人工感染试验 在进行细菌分离的同时, 将病鳖的心、肝、脾、肾等内脏组织匀浆, 以细菌滤器过滤后得无菌滤液。将无菌滤液涂布于普通营养琼脂培养基上 37°C 培养 24h, 检验无菌滤液是否无菌。取健康黄沙鳖, 腹腔注射无菌滤液 0.2 mL/只, 对照组注射等量的无菌 PBS 液, 试验组和对照组分别在不同水簇箱内进行 15d 的饲养观察, 期间正常管理。若试验组发生死亡现象时, 取刚死和濒死个体再进行一次无菌滤液的人工感染试验。

菌液的人工感染 取 37°C 恒温培养 18—24h 的试验菌平板培养物, 用无菌 PBS 液洗下菌苔, 制成菌悬液, 采用参照麦氏比浊管和结合活菌计数的方法确定细菌浓度, 腹腔注射, 试验组注射菌悬液, 对照组注射等量的无菌 PBS 液。注射后分置于不同水族箱中连续进行 15d 的饲养观察。取人工感染濒死个体再进行细菌分离、滤液人工感染和菌液人工感染。

1.4 菌株毒力基因的检测

细菌基因组 DNA 的抽提 将菌株接种于 4 mL 的 LB 培养基中, 置 28°C, 200 r/min 振荡培养 16h, 取 0.8 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中, 12000 r/min 离心 2min 收集菌体。按照“TIANamp Bacterial DNA Kit”试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA, -20°C 保存备用。

PCR 检测 根据文献, *hly*^[17]、*Aer*^[18]、*Alt*^[21]、*Act*^[19]、*ahaI*^[10] 和 *ahp*^[22] 六种毒力基因分别选择一对特异性引物进行 PCR 扩增, 引物序列及退火温度见表 1。

反应体系(25 μL)为: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 25 pmol/L 上下游引物各 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5U) 0.3 μL, DNA 模板 3 μL, 用 ddH₂O 补足余下体积。PCR 反应结束后以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳方法(100V 电压下电泳 35min)进行鉴定, 用凝胶成像系统观察, 根据出现的电泳条带确定并记录结果。PCR 产物经 1%

表 1 PCR 反应引物及退火温度

Tab. 1 Primers and annealing temperatures for PCR

毒力基因 Virulence gene	引物序列 Primer sequences (5'-3')	退火温度 Denatured temperature (℃)	片段大小 Fragments (bp)
<i>hly</i>	F: ggc cgg tgg ccc gaa gat acg gg R: ggc ggc gcc gga cga gac ggg	62	597
<i>Aer</i>	F: cac agc caa tat gtc ggt gaa g R: gtc acc ttc tcg ctc cag gc	52	326
<i>Alt</i>	F: atg acc cag tcc tgg cac gg R: gcc gct cag ggc gaa gcc gc	58	482
<i>Act</i>	F: aga agg tga cca cca aga aca R: aac tga cat cgg cct tga act c	55	232
<i>aha1</i>	F: cta tga aaa aga caa ttc tgg ct R: agg cta gat tag aag ttg tat tg	58	1132
<i>ahp</i>	F: att gga tcc ctg cct atc gct tca gtt ca R: gct aag ctt gca tcc gtg ccg tat tcc	55	898

琼脂糖凝胶电泳后, 切下相应大小的目的基因片段, 按“TIANGel Midi Purification Kit”试剂盒说明书对目的片段进行回收, 分别连接 pMD18-T 载体、转化, 用“EZ Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit”抽提重组质粒。将鉴定为阳性的重组质粒送上海生物工程公司进行测序。

1.5 药物敏感试验

K-B 纸片扩散法, 在普通营养琼脂培养基中用灭菌接种环致密划线法接种病原菌, 然后将各种药敏纸片紧贴于培养基上, 37℃培养 18—24h 后测定抑菌圈的直径。

2 结果

2.1 病鳌的主要症状

自然患病黄沙鳌的症状为底板发白, 其中雄性个体常伴有生殖器外露。解剖发现, 病鳌咽喉发白无血色(个别有轻度发炎), 咽喉内壁上常有大量小泡和黏液, 肝脏发黑质地变硬, 肠道发白, 心脏肿大发白、收缩无力, 体腔中有大量颜色较清的积液。

2.2 病原菌的分离结果

共从 5 批黄沙鳌白底板病病样中分离到 13 株革兰氏阴性、氧化酶试验阳性短杆菌, 其中有 8 株为 β 溶血, 4 株为 α 溶血, 1 株不溶血(表 2)。

表 2 细菌分离结果与溶血性

Tab. 2 Pathogens isolated and their hemolytic properties

病鳌来源 Infected <i>Truogx sinensis</i> farms	菌株编号 Isolates	溶血特征 Hemolytic properties
柳州 A 养殖场 Liuzhou A	LZG11, LZX11	β 溶血
柳州 B 养殖场 Liuzhou B	LZG12, LZX12, LZP12	β 溶血
南宁 C 养殖场 Nanning C	NNG1, NNX1	α 溶血
南宁 D 养殖场 Nanning D	NNX2, NNG2	α 溶血
南宁 E 养殖场 Nanning E	NNE1, NNE2, NNE4	β 溶血
南宁 E 养殖场 Nanning E	NNE3	不溶血

2.3 菌株的人工感染结果

无菌滤液 将无菌滤液涂布于普通营养琼脂培养基上 37℃培养 24h 无细菌生长。腹腔注射无菌滤液和无菌 PBS 液的黄沙鳌经 15d 观察均无病症也无死亡现象。这表明黄沙鳌白底板病由病毒引起的可能不大。

菌株的人工感染 试验期间平均水温(28.5±1.5)℃。15d 的试验观察结果见表 3。

根据表 3, 大部分试验组的黄沙鳌在注射菌悬液后 24h 内出现死亡, 8d 的死亡率除注射 NNE3 菌株为 75.00% 外, 其余各组均为 100%, 而对照组经 15d 的观察仍 100% 成活且无任何病症, 说明 13 株分离菌株对黄沙鳌都有很强的致病性。在注射菌悬液后, 随着时间的推移, 试验黄沙鳌对外界的刺激反应逐渐变得缓慢、反应迟钝。2—3d 后可见外表皮有轻微腐烂、四肢浮肿、身体柔软。解剖死亡个体, 可见体腔中均有不同程度的积液; 肠道发炎; 肝脏颜色多数发黑, 有的变淡, 在肝脏表面常见到大量的血丝或红点、红斑; 咽喉均有红肿发炎症状; 但只有个别试验鳌出现轻微的白底板症状。尽管人工感染发病的黄沙鳌白底板症状不明显, 但从人工感染死亡黄沙鳌的心脏、肝脏和腹水中均能分离到菌体形态和生化特性与从自然发病黄沙鳌体内分离到的菌株相同, 认为分离到的菌株都是黄沙鳌白底板病的病原菌。

2.4 病原菌的生化鉴定结果

API 20NE 鉴定结果, 13 株病原菌中的 NNE1、NNE2、NNE3 和 NNE4 菌株为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*), 其余的 9 株均为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。病原菌的生化谱见表 4。

表3 分离菌株的人工感染试验结果
Tab. 3 Animal challenged with the isolates

菌株号 Isolates	试验数 (只) Animal indi- viduals tested	细菌浓度 Bacteria con- centration(cfu/mL)	注射量 Volume (mL)	观察时间 Duraton (d)											死亡总数(只) Total numbers of dead <i>Trugox</i> <i>sinensis</i>	死亡率 Morta- lity rate (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-15		
LZG11	8	8.33×10 ⁶	0.2	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
LZX11	8	5.67×10 ⁶	0.2	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
LZG12	8	6.00×10 ⁶	0.2	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
LZX12	8	4.67×10 ⁶	0.2	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
LZP12	8	8.33×10 ⁶	0.2	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
NNG1	8	5.33×10 ⁶	0.2	3	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	8	100
NNX1	8	8.33×10 ⁶	0.2	0	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0	8	100
NNX2	8	7.00×10 ⁶	0.2	4	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	8	100
NNG2	8	5.00×10 ⁶	0.2	3	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	8	100
NNE1	8	6.67×10 ⁶	0.2	2	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	8	100
NNE2	8	5.67×10 ⁶	0.2	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	8	100
NNE3	8	5.67×10 ⁶	0.2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	8	100
NNE4	8	7.33×10 ⁶	0.2	3	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	8	100
PBS组	8	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表4 分离菌株的API 20 NE 鉴定结果
Tab. 4 API 20 NE assay for the isolates

测定项目 Test items	试验菌株 Isolates												
	LZG11	LZX11	LZG12	LZX12	LZP12	NNG1	NNX1	NNX2	NNG2	NNE1	NNE2	NNE3	NNE4
硝酸钾 KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
色氨酸 TRP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖 GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
精氨酸 ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脲素 URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
七叶灵 ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
明胶 GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
对硝基-β-D 甲基半乳糖 PNPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖 GLE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
甘露糖 MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇 MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺 NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖酸盐 GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
癸酸 CAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
己二酸 ADI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苹果酸 MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸 CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
苯乙酸 PAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
四甲基-对-苯二胺 OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性

Note: “+” positive; “-” negative

2.5 16S rRNA 基因序列分析结果

13 株病原菌扩增出大小一致的 16S rRNA 基因片段, 大小约为 1.5 kb。基因测序结果, 菌株 LZG11、LZX11、LZG12、LZX12 和 LZP12 的 16S rRNA 基因序列长度为 1457 bp (登录号 JX478236-JX478240), 菌株 NNG1、NNX1、NNX2、NNG2 的 16S rRNA 基因序列长度为 1452 bp (登录号 JX478241-JX478244), NNE1、NNE2、NNE3 和 NNE4 得到的 16S rRNA 基因序列长度为 1426 bp (登录号 JX478245-JX478248)。

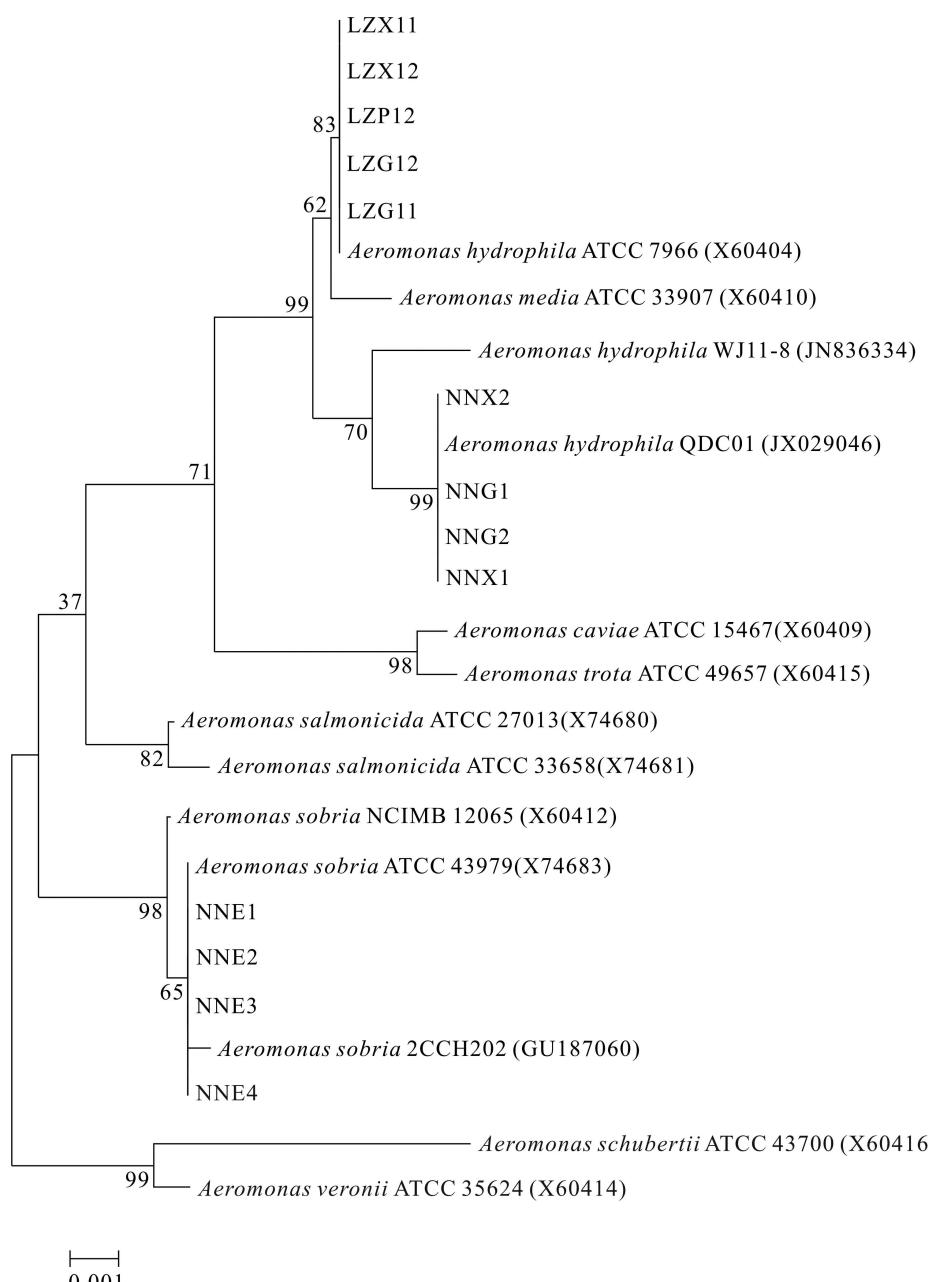


图 1 13 株病原菌的 16S rRNA 基因序列系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA genes of the 13 isolates

将此序列进行 BLAST, 与 GenBank 中已报道的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 采用 DNA Star 5.0 软件进行多重序列比对分析, 并用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。根据系统发育树, 菌株 LZG11、LZX11、LZG12、LZX12、LZP12 与嗜水气单胞菌 ATCC 7966 亲源关系最近, 相似性达 99.9%; 菌株 NNG1、NNX1、NNX2、NNG2 与嗜水气单胞菌北京株 QDC01 亲源关系最近, 相似性达 99.8%; NNE1、NNE2、NNE3、NNE4 与温和气单胞菌的 ATCC 43979 亲源关系最近, 相似性达 99.9% (图 1)。

2.6 六种毒力基因的 PCR 检测结果

13 株病原的基因组 DNA 经 PCR 扩增之后, 6 种毒力基因扩增到的片段均与预期片段大小相吻合, 毒力基因的检测结果见表 5。

从表 5 可见, 6 种毒力基因在嗜水气单胞菌和在温和气单胞菌中的检出阳性率和分布特点都不尽相同。在 9 株嗜水气单胞菌中, 毒力基因的阳性率 *hly*、*Aer*、*Alt*、*Act* 和 *ahp* 均为 100%, *ahal* 为 88.89%, 而在 4 株温和气单胞菌中, *Aer*、*Act*、*ahal* 和 *ahp* 的阳性率均为 100%, *hly* 为 75.00%, *Alt* 为 25.00%。毒力基因型共 4 种, 嗜水气单胞菌和温和气单胞菌各 2 种, 其分布情况在嗜水气单胞菌中 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型占 88.89%, *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型占 11.11%; 在温和气单胞菌中 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型占 75.00%, *hly*⁻*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型占 25.00%。

2.7 病原菌的药敏试验结果

根据 13 株病原菌对 26 种药物的药敏试验结果, 不同菌株对同一种药物的药敏试验结果不尽相同, 有的甚

表 5 13 株菌株毒力基因检测结果

Tab. 5 Detection of six known virulence genes in thirteen strains

菌株编号 Isolates	细菌种类 Types of bacteria	<i>hly</i>	<i>Aer</i>	<i>Alt</i>	<i>Act</i>	<i>ahal</i>	<i>ahp</i>
LZG11	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
LZX11	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
LZG12	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
LZX12	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
LZP12	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
NNG1	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
NNX1	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	-	+
NNX2	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
NNG2	嗜水气单胞菌	+	+	+	+	+	+
NNE1	温和气单胞菌	+	+	-	+	+	+
NNE2	温和气单胞菌	+	+	-	+	+	+
NNE3	温和气单胞菌	-	+	+	+	+	+
NNE4	温和气单胞菌	+	+	-	+	+	+

至相差很大。只有头孢哌酮 1 种药物对 13 株病原菌都达到高度敏感水平。但 26 种药物中也没有任何 1 种药物对所有的试验菌株都不敏感的。药敏试验结果见表 6。

根据表 6, 分别以高度敏感和不敏感的菌株数占试验菌株数的比例, 对嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的药敏结果进行比较(表 7)。

从表 7 可以看出, 70% 以上嗜水气单胞菌菌株对菌必治、头孢哌酮、多黏菌素 B、氟苯尼考、哌拉西林、复达欣和先锋必 7 种药物高度敏感, 对复方新诺明和磺胺间甲氧嘧啶 2 种药物不敏感。而 70% 以上温和气单胞菌菌株对头孢哌酮、复达欣、菌必治、氟哌酸、恩诺沙星、多黏菌素 B、氧氟沙星和哌拉西林 8 种药物高度敏感, 对多西环素和磺胺间甲氧嘧啶 2 种药物不敏感。

不同养殖场的嗜水气单胞菌对 26 种药物敏感性比较从表 6 可以看到, 来源于同一养殖场的不同嗜水气单胞菌菌株间对 26 种药物的药敏结果除少数几种药物有较大差别外, 其余大部分药物的药敏结果基本一致。为初步比较来源于不同养殖场的嗜水气单胞菌对药物的敏感性, 我们将表 6 中来源于同一养殖场嗜水气单胞菌菌株的抑菌圈直径取平均值后进行比较(表 8)。

从表 8 可见, 来源于柳州和南宁各养殖场的嗜水气单胞菌对菌必治、头孢哌酮和多黏菌素 B 都高度敏感, 而对复方新诺明和磺胺间甲氧嘧啶都不敏

感或低度敏感。但达到高度敏感的药物种类, 南宁 2 个养殖场均比柳州 2 个养殖场都多。这说明柳州 2 个黄沙鳖养殖场用于防治嗜水气单胞菌引起的白底板病可选药物比南宁 2 个养殖场相对要少, 而柳州 2 个养殖的嗜水气单胞菌的耐药性比南宁 2 个养殖场相对要强。

3 讨论

3.1 关于鳖白底板病的病因和病原

白底板病是近年来中国各地暴发流行、危害最严重的鳖病之一, 给广大养殖者造成了重大的经济损失^[6]。有关鳖白底板病的病因和病原各研究者的研究结果也不尽相同。福建各地患病鳖病原菌为嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和普通变形杆菌^[1]; 从山东济宁分离到的主要是温和气单胞菌, 部分为迟缓爱德华氏菌^[2]; 叶巧真和翁少萍等在广东省东莞市病鳖中分离到的病原菌有温和气单胞菌、肺炎克雷伯氏菌和金黄色葡萄球菌, 同时在病鳖的肝、肺等多个组织器官中检测到了病毒, 并认为病毒是白底板病的主要病原, 但病毒的感染不致死鳖, 细菌的继发感染是鳖最终死亡的因素^[3, 5, 7]; 周兵等分离到的是嗜水气单胞菌, 同时发现有球状病毒, 认为中华鳖白底板病可能是致病性细菌和病毒混合感染引起^[4]; 沈锦玉等认为浙江嘉兴中华鳖白底板病是由病毒和嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌混合感染引起^[6]; 另有研究表明, 鳖白底板病与饲料酸值有关^[23]。根据这些研究结果, 鳖白底板病的病因和病原虽然很复杂, 病原也表现为多样性, 但多数研究者都分离到嗜水气单胞菌和温和气单胞菌, 表明嗜水气单胞菌和温和气单胞菌是鳖白底板病重要的病原菌。本试验从白底板症状典型的发病黄沙鳖中分离到的是嗜水气单胞菌和温和气单胞菌, 没有发现这两种菌的混合感染现象, 无菌组织滤液人工感染 15d, 也没有发现试验鳖有任何的病症和死亡现象。在系统发育树中, 分离到的 13 株病原菌与亲源关系最近的相应菌株 ATCC 7966、北京株 QDC01 和 ATCC 43979 均具有 99.8%—99.9% 相似性, 因此认为, 广西的柳州市和南宁市黄沙鳖白底板病的病原是嗜水气单胞菌和温和气单胞菌, 与多数学者的研究结果一致。鳖白底板病病原种类上的差异可能与不同养殖区域因苗种来源、养殖技术、养殖历史、用药习惯等因素的不同导致病原区系不同有关。但

表 6 药物敏感性试验结果
Tab. 6 Tests of pathogen sensitivity to drug

药物名称 Drug	试验菌株及抑菌圈直径 Isolates tested and sizes in diameter of bacterium-inhibited circles (mm)												
	LZG11	LZX11	LZG12	LZX12	LZP12	NNG1	NNX1	NNX2	NNG2	NNE1	NNE2	NNE3	NNE4
复达欣 Fortum	14.2	28.0	24.0	21.5	24.1	24.9	20.0	21.0	18.2	12.0	25.0	25.0	26.1
先锋 VI Cephalosporin VI	16.2	2.0	0.0	0.0	0.0	24.1	24.0	20.0	28.0	10.0	20.0	9.0	22.0
菌必治 Ceftriaxone	26.2	32.0	27.0	25.0	26.0	40.0	30.0	33.1	28.0	8.5	29.5	30.8	34.5
链霉素 Streptomycin	17.8	20.0	22.9	20.0	17.0	14.9	18.0	14.5	15.1	15.5	17.5	18.8	22.0
庆大霉素 Kanamycin	20.0	16.0	21.0	20.0	0.0	16.5	14.0	16.2	14.5	10.0	14.0	19.0	17.0
复方新诺明 Cotrimoxazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0
新霉素 Neomycin	22.0	24.0	21.8	24.5	22.5	16.9	18.0	15.8	14.9	17.0	16.5	19.0	20.8
头孢哌酮 Cefoperazone	22.5	29.2	22.6	23.5	24.4	36.2	22.0	31.0	32.0	26.0	27.0	30.0	25.5
新生霉素 Albamycin	0.0	0.0	9.5	11.0	13.9	18.6	14.0	19.5	20.0	10.5	0.0	13.5	11.0
氟哌酸 Norfloxacin	0.0	0.0	0.0	10.5	11.5	16.0	24.0	21.0	19.9	0.0	20.0	23.5	27.5
恩诺沙星 Enrofloxacin	17.5	14.0	16.0	16.4	15.9	26.0	20.2	20.0	19.1	8.0	25.5	21.5	31.0
环丙沙星 Ciprofloxacin	11.2	15.0	0.0	14.2	16.0	21.0	15.9	21.5	18.9	10.0	33.0	10.0	22.0
多黏菌素 B Polymyxin B	14.5	12.5	16.0	14.0	12.7	14.9	13.2	12.9	8.4	0.0	13.0	13.0	13.0
左氟沙星 Levofloxacin	16.8	17.5	17.5	19.0	18.6	25.9	22.0	24.0	21.2	13.0	16.8	25.0	26.0
依诺沙星 Enoxacin	0.0	0.0	10.0	0.0	12.0	19.1	21.7	16.0	18.1	0.0	19.5	23.5	29.5
氧氟沙星 Ofloxacin	18.5	14.0	18.0	16.7	14.0	25.0	0.0	22.0	23.1	12.0	24.5	25.5	25.0
先锋必 Cefobid	29.5	15.0	23.0	22.0	23.0	23.5	26.0	21.5	17.1	0.0	24.0	0.0	27.8
哌拉西林 Piperacillin	25.0	20.0	25.0	25.4	22.8	21.5	0.0	20.0	20.0	17.5	23.0	26.0	22.0
多西环素 Doxycycline	0.0	9.8	9.8	11.9	12.0	14.0	18.9	14.0	8.9	0.0	18.0	0.0	0.0
红霉素 Erythromycin	14.0	0.0	0.0	7.5	0.0	15.0	18.0	17.1	17.5	11.0	16.0	9.0	0.0
氟苯尼考 Florfenicol	9.5	20.5	24.0	24.0	29.0	31.0	31.2	36.0	28.9	13.0	23.0	30.0	14.0
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	14.5	16.5	19.0	19.8	19.5	24.9	21.0	21.5	22.9	12.0	20.0	11.0	25.0
盐酸沙拉沙星 Sarafloxacin	18.8	0.0	20.0	20.0	21.7	29.1	0.0	24.5	24.5	17.0	18.0	25.5	25.0
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	0.0	0.0	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0	0.0
磺胺对甲氧嘧啶 Sulfamethoxydiazine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	22.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0
复方磺胺嘧啶 Compound Sulfadiazine	16.0	14.5	16.7	16.3	18.9	27.0	21.2	22.0	25.0	12.5	16.5	24.0	26.5

注: 直径 $d > 20.0$ mm 判定为高度敏感; $10.0 \text{ mm} < d \leq 20.0$ mm 判定为中度敏感; $0 \text{ mm} < d \leq 10.0$ mm 判定为低度敏感; $d = 0$ mm 判定为不敏感。多黏菌素 B 则以 $d \geq 9.0$ mm 判定为高度敏感, $0 \text{ mm} < d < 9.0$ mm 判定为低度敏感; $d = 0$ mm 判定为不敏感。

Note: Under definition when diameter(d) > 20.0 mm, the drug sensitivity was considered to be high; when $10.0 \text{ mm} < d \leq 20.0$ mm, the drug sensitivity, medium; when $0 \text{ mm} < d \leq 10.0$ mm, the drug sensitivity, light; when $d = 0$ mm, the drug sensitivity, none. However, for Polymyxin B $d \geq 9.0$ mm is high, $0 \text{ mm} < d < 9.0$ mm is medium, and $d = 0$ mm is insensitivity.

在试验中也发现, 由嗜水气单胞菌和温和气单胞菌引起的黄沙蟹白底板病在症状上无明显差别, 需经过实验室进行确诊, 这给生产实践中对黄沙蟹白底板病进行现场诊治带来一定困难, 加上这 2 种病原菌引起的疾病通常都表现为急性暴发流行, 实验室诊断需要耗费一定的时间, 往往在确诊过程中养殖生产已造成重大损失, 因此急需有针对性地研发如胶体金技术等相应的快速诊断方法。

在试验中, 人工感染虽然可以引起试验蟹死亡, 表现的症状以发红为主, 白底板、白肠道等在自然发病个体中看到的症状却并不明显, 不少研究者也观

察到了这一现象^[2, 3], 但也有能复制出典型白底板病病症的^[5]。关于蟹的白底板病症状不易复制问题, 可能与水产动物疾病中的“一症多病和一病多症”^[6]有关, 也可能与病原菌的感染数量、感染环境、感染后潜伏期的长短等诸多因素有关。总之, 有关白底板病的发病机理尚须更多更深入地研究。

3.2 关于蟹白底板病病原菌的毒力基因

嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的胞外产物含有多种毒力因子。本研究采用 PCR 方法对 13 株分离自患白底板病黄沙蟹的菌株 *hly*、*Aer*、*Alt*、*Act*、*ahal* 和 *ahp* 六种毒力基因的检测结果显示, *hly*、*Aer*、*Alt*、

表 7 不同病原菌对 26 种药物的敏感率
Tab. 7 Pathogens sensitive to 26 drugs (%)

药物名称 Drug names	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>		温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i>		药物名称 Drug names	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>		温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i>	
	高度敏感率 High sensitivity	不敏感率 No sensitivity	高度敏感率 High sensitivity	不敏感率 No sensitivity		高度敏感率 High sensitivity	不敏感率 No sensitivity	高度敏感率 High sensitivity	不敏感率 No sensitivity
复达欣 Fortum	77.78	0.00	75.00	0.00	左氟沙星 Levofloxacin	44.44	0.00	50.00	0.00
先锋 先锋 VI Cephalosporin VI	44.44	33.33	50.00	0.00	依诺沙星 Enoxacin	11.11	33.33	50.00	25.00
菌必治 Ceftriaxone	100	0.00	75.00	0.00	氧氟沙星 Ofloxacin	33.33	11.11	75.00	0.00
链霉素 Streptomycin	33.33	0.00	25.00	0.00	先锋必 Cefobid	77.78	0.00	50.00	50.00
庆大霉素 Kanamycin	33.33	11.11	0.00	0.00	哌拉西林 Piperacillin	88.89	11.11	75.00	0.00
复方新诺明 Cotrimoxazole	0.00	100	0.00	75.00	多西环素 Doxycycline	0.00	11.11	0.00	75.00
新霉素 Neomycin	55.56	0.00	25.00	0.00	红霉素 Erythromycin	0.00	33.33	0.00	25.00
头孢哌酮 Cefoperazone	100	0.00	100	0.00	氟苯尼考 Florfenicol	88.89	0.00	50.00	0.00
新生霉素 Albamycin	11.11	22.22	0.00	25.00	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	44.44	0.00	50.00	0.00
氟哌酸 Norfloxacin	22.22	33.33	75.00	25.00	盐酸沙拉沙星 Sarafloxacin	66.67	22.22	50.00	0.00
恩诺沙星 Enrofloxacin	33.33	0.00	75.00	0.00	磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	0.00	88.89	0.00	75.00
环丙沙星 Ciprofloxacin	22.22	11.11	50.00	0.00	磺胺对甲氧嘧啶 Sulfamethoxydiazine	44.44	0.00	50.00	0.00
多黏菌素 B Polymyxin B	88.89	11.11	75.00	25.00	复方磺胺嘧啶 Compound Sulfadiazine	11.11	33.33	50.00	25.00

表 8 来源于不同养殖场嗜水气单胞菌的药敏感结果比较
Tab. 8 Comparisons of drug sensitivities for isolates obtained from different farms (mm)

菌株来源 The source of isolates obtained	高度敏感药物 High effective drugs		低度敏感和不敏感药物 Low or no effective drugs	
	复方新诺明、磺胺间甲氧嘧啶、先锋 VI、新生霉素、氟哌酸、依诺沙星、多西环素、红霉素、盐酸沙拉沙星、磺胺对甲氧嘧啶	复方新诺明、磺胺间甲氧嘧啶、先锋 VI、氟哌酸、依诺沙星、红霉素、磺胺对甲氧嘧啶	复方新诺明、磺胺间甲氧嘧啶、	复方新诺明、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶
柳州 A 养殖场 Liuzhou A	菌必治、头孢哌酮、多黏菌素 B、复达欣、新霉素、先锋必、哌拉西林			
柳州 B 养殖场 Liuzhou B	菌必治、头孢哌酮、多黏菌素 B、复达欣、链霉素、新霉素、先锋必、哌拉西林、氟苯尼考、盐酸沙拉沙星			
南宁 C 养殖场 Nanning C	菌必治、头孢哌酮、多黏菌素 B、复达欣、氟哌酸、恩诺沙星、左氟沙星、依诺沙星、先锋必、氟苯尼考、磺胺二甲嘧啶			
南宁 D 养殖场 Nanning D	菌必治、头孢哌酮、多黏菌素 B、氟哌酸、环丙沙星、左氟沙星、氧氟沙星、哌拉西林、氟苯尼考、磺胺二甲嘧啶、盐酸沙拉沙星、复方磺胺嘧啶			

Act 和 *ahp* 在 9 株嗜水气单菌中的阳性率均为 100%，*ahal* 为 88.89%；而在 4 株温和气单胞菌中，*Aer*、*Act*、*ahal* 和 *ahp* 的阳性率均为 100%，*hly* 和 *Alt* 分别为 75.00% 和 25.00%；毒力基因型包含

hly⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺、*hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁻*ahp*⁺、*hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 和 *hly*⁻*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型 4 种，其中在嗜水气单胞菌中主要是 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 基因型，在温和气单胞菌

中主要为 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺基因型; 而中华鳖源温和气单胞菌的毒力基因型为 *alt*⁺*ahal*⁻*hly*⁻, 嗜水气单胞菌为 *alt*⁺*ahal*⁺*hly*⁺^[10]; 在鱼源嗜水气单胞菌中, *ahpA* 阴性菌株是无毒株, 强毒株都呈 *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺基因型^[12]; 王志铮等从患白底板病典型症状濒死中华鳖内脏中分离获得的 4 株嗜水气单胞菌均含有 *Aha*、*AHH*、*AerA* 和 *OMP* 四种毒力基因^[14]。对来源于南京地区池塘水中 7 株嗜水气单胞菌胞外毒力因子的检测结果表明, 具有 *aer* 的占 85.71%, *act* 占 28.57%, *eprCAI* 占 42.86%, *alt* 占 85.71%, *ahp* 占 57.14%, *ahyB* 占 100%, 毒力基因的基因型有 6 种之多^[15]。可见, 毒力基因的分布在不同菌株间存在差异, 毒力基因型也表现为多样性。

携带毒力基因是病原菌具有致病性的必要条件, 在本试验中, 虽然 NNE3 菌株缺乏溶血素基因 *hly*、NNE1、NNE2 和 NNE 菌株缺乏细胞性肠毒素基因 *Alt*、NNX1 菌株缺乏黏附素基因 *ahal*, 但所有菌株在人工感染注射后第 10 天内均可引起试验鳖全部发病死亡, 都具有很强的致病性, 只是缺乏溶血素基因的 NNE3 菌株对试验鳖的致死速度比携带溶血素基因的其他菌株稍慢而已。这表明溶血素、气溶素、细胞性肠毒素、细胞兴奋性肠毒素、黏附素基因和丝氨酸蛋白酶均为嗜水气单胞菌和温和气单胞菌主要的毒力因子, 但携带有溶血素基因的菌株其致病力更强, 更容易引起疾病的暴发性流行。

3.3 关于嗜水气单胞菌对药物敏感性的差异

近年来的生产实践发现, 不少常用药物的疗效很不稳定, 有的甚至变得无效。在本试验中, 黄沙鳖白底板病病原菌嗜水气单胞菌对抗菌药物的敏感性因来源于不同养殖场而有所不同。根据表 4, 在 26 种试验药物中, 对来源于柳州和南宁各养殖场的嗜水气单胞菌菌株全部为高度敏感或不敏感的药物只有菌必治、头孢哌酮和复方新诺明 3 种, 其他药物的药敏结果相差较大。值得重视的是, 嗜水气单胞菌对过去在生产中很常用且效果很好的复方新诺明和磺胺间甲氧嘧啶这 2 种药的高度敏感率均为 0, 而不敏感率复方新诺明为 100%, 磺胺间甲氧嘧啶也达到 88.89%。这种不同养殖场来源的嗜水气单胞菌药敏结果差别大和生产中药物疗效不稳定甚至变得无效的现象可能与各养殖场的用药习惯导致病原菌产生耐药性有关。目前广西的养鳖业发展迅猛, 各养殖场的技术水平参差不齐, 在疾病防治过程中,

多数都是根据症状和凭借个人经验用药而不是对症下药, 有的养殖户却是听说别人用什么药就跟着用什么药, 当发现某种药物有好的疗效后往往就会长期反复使用, 这就容易导致病原菌产生耐药甚至抗药。已有研究证明, 嗜水气单胞菌在长期接触某种药物后会获得对该药物产生耐药, 主要表现为该种药物对嗜水气单胞菌的最小抑制菌浓度(*MIC*)上升数十倍甚至数千倍^[24, 25], 当前我国鱼源性嗜水气单胞菌的耐药情况严重, 多重耐药普遍。这就科学合理地解释了生产实践中常用药效果不稳定甚至变得无效的现象, 对正确、合理使用渔药进行水产动物细菌性疾病防治具有重要的指导意义。

根据试验结果, 建议对黄沙鳖白底板病等水产动物细菌性疾病的防治必须建立在实验室细菌分离鉴定和药敏试验结果的基础上, 不要长期反复使用同一种药物, 实行多种药物交叉使用, 以防病原菌耐药性或抗药性的产生。

参考文献 :

- [1] Chen X F, Zhou C Y, Qing X. Research on pathogen of white abdominal shell disease of turtle [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(3): 309—315 [陈晓凤, 周常义, 青新. 鳖“白板病”致病细菌的研究. 水产学报, 1997, 21(3): 309—315]
- [2] Ding L, Yue Y S, Song J Y, et al. Studies on the pathogenic bacteria of white shell disease and skin fester disease from Turtle and drug treatment [J]. *Freshwater Fisheries*, 2001, 31(1): 46—48 [丁雷, 岳永生, 宋憬愚, 等. 鳖白底板病、腐皮病并发症病原菌及药物治疗. 淡水渔业, 2001, 31(1): 46—48]
- [3] Ye Q Z, He J G, Qiu D Q, et al. Bacteria identification and their pathogenesis in red and white abdominal shell disease of *Trionyx sinensis* [J]. *Microbiology*, 2000, 27(6): 407—413 [叶巧真, 何建国, 邱德全, 等. 中华鳖白底板病和红底板病细菌的分离鉴定及致病性. 微生物学通报, 2000, 27(6): 407—413]
- [4] Zhou B, Huang X H, Zheng Y Y. Study on pathogenic bacteria and pathological of the white abdominal shell disease from *Trionyx sinensis* [J]. *Current Fisheries*, 2000, (10): 7—9 [周兵, 黄小辉, 郑毅艺. 中华鳖白底板病病原体及组织病理研究. 内陆水产, 2000, (10): 7—9]
- [5] Ye Q Z, He J G, Weng S P. Study on the pathogenesis of virus and bacteria in white and red abdominal shell disease of *Trionyx sinensis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 1999, 29(8): 3—7 [叶巧真, 何建国, 翁少萍. 中华鳖白底板病和红底板病病毒及细菌的致病性. 淡水渔业, 1999, 29(8): 3—7]

- [6] Shen J Y, Pan X Y, Yu X P, et al. Pathogen in white abdominal shell disease of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, (5): 815—822 [沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平, 等. 中华鳖白底板病病原的分析. 中国水产科学, 2007, (5): 815—822]
- [7] Weng S P, Ye Q Z, He J G, et al. Study on the Pathogen and Histopathology of Red and White Skin Disease of *Trionyx sinensis* [J]. *Supplement To The Journal of Sun Yatsen University*, 1996, (suppl): 61—65 [翁少萍, 叶巧真, 何建国, 等. 中华鳖红底板病和白底板病病原及组织病理. 中山大学学报论丛, 1996, (增刊), 61—65]
- [8] Zhang X J, Yang W M, Li T T, et al. The genetic diversity and virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from fishponds with disease outbreaks in Hubei Province [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 458—466 [张旭杰, 杨五名, 李彤彤, 等. 湖北地区暴发病池塘中嗜水气单胞菌的遗传多样性和毒力特征研究. 水生生物学报, 2013, 37(3): 458—466]
- [9] Tong G X, Wei X X, Li X Z, et al. Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas sobria* from *Truogx sinensis* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, (12): 124—126 [童桂香, 韦信贤, 黎小正, 等. 黄沙鳖温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验. 广东农业科学, 2010, (12): 124—126]
- [10] Fang B, Li J N, Wang T J, et al. Cloning and sequence analysis of virulence genes of six *Aeromonas* strains isolated from aquatic animals in Anhui [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 966—972 [方兵, 李槿年, 汪天杰, 等. 6株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因的克隆与序列分析. 中国水产科学, 2006, 13(6): 966—972]
- [11] Pan X Y, Hao G J, Yao J Y, et al. Fusion expression of *spe* gene with *hly* gene of *Aeromonas hydrophila* strain TPS-30 in *Escherichia coli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(3): 591—597 [潘晓艺, 郝贵杰, 姚嘉赟, 等. 嗜水气单胞菌 TPS-30 株丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因在大肠杆菌中的融合表达. 水生生物学报, 2010, 34(3): 591—597]
- [12] Zhu D L, Li A H, Wang J G, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2006, 45(1): 82—85 [朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82—85]
- [13] He M X, Ye Q Z, Chen C, et al. Construction and high expression of an *act-OmpTS* fusion vector of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(2): 169—173 [何鸣筱, 叶巧真, 陈诚, 等. 嗜水气单胞菌外毒素和外膜蛋白双基因融合表达载体的构建和高效表达. 水生生物学报, 2004, 28(2): 169—173]
- [14] Wang Z Z, Zhao P P, Wang Z F, et al. Phentype and molecular indentification of virulence genes for four pathogenic *AEROMONAS hydrophila* isolated from a dying *Trionyx sinensis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(5): 776—783 [王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发, 等. 四株鳖源致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的表型、分子鉴定及其毒力基因检测. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 776—783]
- [15] Jiang C Y, Huang J H, Chen M, et al. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in some pools of Nanjing and detection of the virulence-associated genes [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 42(16): 4—7 [蒋春阳, 黄金虎, 陈默, 等. 南京地区池塘水中嗜水气单胞菌的分离鉴定与相关毒力基因检测. 畜牧与兽医, 2010, 42(16): 4—7]
- [16] Zhang X J, Yan B L, Bing X W, et al. Detection of hemolysin gene and phenotypic and molecular identification of pathogenic *Aeromonas sobria* from gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(4): 102—107 [张晓君, 阎斌伦, 邝旭文, 等. 异育银鲫病原温和气单胞菌表型及分子鉴定与溶血素基因检测. 水生态学杂志, 2010, 3(4): 102—107]
- [17] Heuzenroeder M W, Wong C Y, Flower R L. Flower. 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
- [18] Vijai Singh G D, Kapoor B N, Mishra W S, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2008, 48(12): 453—458
- [19] Cesar B K, Geert H, Mauro T, et al. PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas* spp [J]. *American Society for Microbiology*, 1999, 65(12): 5293—5302
- [20] Huang J, Wen H C, Shi J G, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria from *Pelteobagrus fulvidraco* ulcerative syndrome and its drug sensitive test [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(1): 107—112 [黄钧, 温华成, 施金谷, 等. 黄颡鱼体表溃疡病病原菌的分离鉴定与药敏试验. 南方农业学报, 2012, 43(1): 107—112]
- [21] Per Einar Granum, Kristin O'Sullivan, Juan M Tomaès, et al. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, 21: 131—137
- [22] Chu W H, Lu C P. Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(1): 84—88 [储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析. 水产学报, 2004, 28(1): 84—88]
- [23] Wang H T, He L, Zhang J. Relationship on feed quality and white abdominal shell disease from *Trionyx sinensis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(2): 32—33 [王鸿泰, 何力, 王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发, 等. 饲料品质与中华鳖白底板病病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测. 水生生物学报, 2002, 28(2): 32—33]

- 张俊. 饲料质量与中华鳖白底板病的关系. 淡水渔业, 2002, 32(2): 32—33]
- [24] Meng X L, Chen C F, Wu Z X, et al. In vitro study on sensitivity, development of drug-resistance and reversion of acquired drug-resistance characteristics of *Aeromonas hydrophila* to oxytetracycline [J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition) Agricultural Science Volume*, 2009, 6(1): 42—46 [孟小亮, 陈昌福, 吴志新, 等.]
- 嗜水气单胞菌对盐酸多西环素的耐药性获得与消失速率研究. 长江大学学报(自然科学版), 2009, 6(1): 42—46]
- [25] Wang M Z, Chen C F, Liu Z X, et al. In vitro study on drug-resistance characteristics of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and fluoroquinolones [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(1): 89—93 [王美珍, 陈昌福, 刘振兴, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 89—93]

CHARACTERIZATION OF WHITE PLASTRON DISEASE PATHOGENS AND DETECTION OF SIX KNOWN VIRULENCE GENES IN *TRUOGX SINENSIS*

HUANG Jun¹, HUANG Yan-Hua¹, HU Da-Sheng², LUO Hua-Ping³, SHI Jin-Gu¹,
PENG Min-Yi¹, XUAN Jun-Cheng¹, QIN Li-Fen¹, TENG Zhong-Zuo¹ and ZENG Gui-Zhong³

(1. Lab of Aquatic Animal Diseases Diagnosis, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Marine Products Technical Promotion Station, Nanning 530022, China; 3. Wuming fishery Supervision and Management Station, Wuming 530100, China)

Abstract: Pathogenetic bacteria were isolated from hearts and livers of the infected individual *Truogx sinensis*, cultured on conventional methods, and used as challenge to determine their infectiveness. Identities of the isolated pathogens were distinguished through API 20NE, their phylogenetic status were analyzed by 16S rRNA sequencing and their sensitivities to drugs were tested by K-B method. The six known virulence genes in the pathogens were detected by PCR. The results showed that, of the thirteen pathogens obtained, nine strains were *Aeromonas hydrophila*, and four strains were *Aeromonas sobria*. In phylogenetical relationship of the nine *Aeromonas hydrophila*, five strains were close to *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, and four strains were close to *Aeromonas hydrophila* QDC01, while four *Aeromonas sobria* were close to *Aeromonas sobria* ATCC 43979. Drug sesnsitive testes indicated that only thirteen strains were found to be highly sensitive to cefoperazone, and pathogens from different farms presented to be quite different in drug sensitivity. Virulence gene detection showed that *Aer*, *Act* and *ahp* was positive at 100%; *hly* and *Alt*, 92.31%; and *Ahal*, 76.92%. Four genotypes were found in pathogens isolated, being *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ and *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺, mainly dominating in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*, respectively, and strains with *hly* exhibited stronger pathogenicity.

Key words: *Truogx sinensis*; White plastron disease; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; Virulence gene