

doi: 10.7541/2013.44

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

张旭杰^{1,2} 杨五名^{1,2} 李彤彤^{1,2} 李爱华¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了调查引起鱼类运动型气单胞菌败血症(俗称暴发病)的嗜水气单胞菌的遗传多样性和毒力特征, 阐明其流行规律, 研究于2006—2009年度从湖北省内3个不同地区的6个发病鱼塘中分离了30株嗜水气单胞菌, 其中20株为临床株(分离自血液、肝脏、肾脏或腹水), 6株为肠道株, 4株为池水株。基于所有菌株 *gyrB* 基因序列, 构建了系统发育树; 通过 ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus, 肠道细菌基因间重复序列)指纹图谱进行菌株的遗传分型; 用 PCR 方法检测了7个毒力基因在菌株中的分布模式。这7个基因包括气溶素(*aerA*)、溶血素(*hlyA*)、热不稳定性细胞兴奋性肠毒素(*alt*)、热稳定性细胞兴奋性肠毒素(*ast*)、弹性蛋白酶(*ahpB*)、脂酶(*lip*)和鞭毛基因(*fla*)。此外, 以斑马鱼为感染对象, 通过腹腔注射测定了15株代表菌株的毒力。结果表明: 不同来源的20株临床株、1株肠道株和3株池水株具有相同的遗传特性, 体现为在系统树上聚为一枝, 序列相似性为100%, 具有相同的 ERIC 指纹图谱, 毒力基因分布模式为: *aerA*⁺*hlyA*⁺*alt*⁺*ast*⁺*ahpB*⁺*lip*⁺*fla*⁺, 且均为强毒株($LD_{50} < 9.74 \times 10^4$ cfu/尾)。与临床株相比, 其余5株肠道株和1株池水株或具有不同的 ERIC 指纹图谱或具有不同的毒力基因分布模式, 显示出了遗传多样性, 且毒力均弱于临床株($LD_{50} > 1.01 \times 10^6$ cfu/尾)。这说明在一定时间、一定区域内, 作为暴发病病原的嗜水气单胞菌为同一克隆系在流行, 不存在明显的变异或遗传多样性。此结果有助于阐明嗜水气单胞菌引起的暴发病的流行规律, 制定相应的防御措施。多种毒力基因在致病性菌株中的联合流行行为发病机理的解析奠定了基础。此外, 鉴于毒力基因谱与致病性之间的相关性, 表明毒力基因可作为标记基因, 用于致病性菌株的检测。

关键词: 发病鱼塘; 嗜水气单胞菌; 遗传多样性; 毒力基因; 毒力

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0458-09

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)隶属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*), 广泛分布于自然界的各种水体, 是多种水产养殖动物多种不同疾病的致病菌, 包括肠炎、烂尾病、腹水病、竖鳞病、疥疮病等^[1]。特别是, 自20世纪80年代末至今, 常引起我国养殖鱼类暴发性的出血性败血症, 俗称暴发病, 又称运动型气单胞菌败血症(Motile *Aeromonas* Septicemia, MAS), 导致严重的经济损失^[2-4]。

大量的研究表明嗜水气单胞菌具有高度的表

型、血清型和遗传多样性^[5-7]。有研究者通过DNA指纹图谱等技术手段, 对人类腹泻和环境分离株进行了分型分析, 结果表明此菌具有高度种内多样性, 未曾发现优势克隆^[8, 9]。嗜水气单胞菌作为鱼类和贝类疾病的病原, 虽被广泛分离鉴定, 但对引起鱼类MAS的嗜水气单胞菌的种群结构和遗传多样性缺乏系统研究, 因此对此病原菌在养殖区域中的流行规律仍不清楚, 增加了防御的难度, 只能依赖抗菌药物进行防治。

嗜水气单胞菌作为运动型气单胞菌败血症

收稿日期: 2012-03-01; 修订日期: 2013-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30670112 和 31070112), 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2009CB118705)资助

作者简介: 张旭杰(1986—), 男, 土家族, 湖北恩施人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类病原微生物学。E-mail: zhangxujie08@163.com

通信作者: 李爱华, E-mail: liaihua@ihb.ac.cn

(MAS)最常见的病原,其在致病过程中,多种毒力因子发挥了重要作用,包括气溶素、溶血素、肠毒素、蛋白酶、脂酶、S-层和鞭毛等^[10-15]。嗜水气单胞菌有致病性和非致病性菌株之分,毒力基因常被用作标记基因,用来区分嗜水气单胞菌的有毒株和无毒株^[16]。朱大玲等检测了9株鱼源嗜水气单胞菌的毒力与毒力基因谱(Virulence gene profile)的相关性^[17]。Li, et al.检测了毒力基因 *alt*, *ahp* 和 *aerA* 在不同来源嗜水气单胞菌中的分布以及不同基因型与毒力的相关性^[18]。遗憾的是,这些研究所用的嗜水气单胞菌菌株地域来源分散,分离年代相差甚远,且不完全来自 MAS 病鱼,有些可能分离自肠炎等其他类型的疾病,所以对引起鱼类 MAS 的致病性嗜水气单胞菌的毒力特性依然不清楚。

本研究在湖北省内三个不同地区,从发生 MAS 池塘的病鱼血液、肝脏、肾脏或腹水中以及同一池塘的池水和底泥中,分离嗜水气单胞菌,然后对这些嗜水气单胞菌克隆进行系统研究,包括构建基于 *gyrB* 基因序列的系统发育树,分析肠道细菌基因间重复序列 (Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)图谱,测定其毒力基因谱以及对斑马鱼的致病性,来了解这些来源于 MAS 病鱼和池塘的菌株的遗传多样性,以阐明运动型气单胞菌败血症(MAS)的流行病学规律,揭示其发病机理。此外,通过阐明这些菌株的遗传特征,为建立相应的快速检测技术,制备地区特异性疫苗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病鱼和水样采集自位于湖北省的武汉、汉川和荆门三个地区的6个暴发病鱼塘,采样时间为2006年8月至2009年7月(表2)。其中4个鱼塘为单养鱼塘:塘1主养团头鲂,塘2主养鲢,塘5和塘6主养鲫;塘3和塘4为混养鱼塘,养殖品种包括鲫、草鱼、鲢、团头鲂和鳊。发病鱼的主要症状为:鳃盖、尾鳍基部出血,肝脏、肠壁和肛门充血,腹腔内有积水。

AB 近交系斑马鱼取自中国科学院水生生物研究所,体长为(3.7±0.4) cm,体重为(0.76±0.1) g,暂养于本实验室。

TSA 和 TSB 培养基购自美国 BD 公司,DL2000 marker、dNTP、pMD18-T 载体和 Ex Taq 均购自 TaKaRa 公司,DL5000 marker 购自上海莱枫生物科

技有限公司。

1.2 实验方法

菌株分离 病鱼的血液、肝脏、肾脏或腹水无菌接种于 TSA 平板;塘2的水样和塘3病鱼的肠道内容物通过灭菌管带回实验室,于4h内处理完毕。病鱼编号及样品信息(表2)。

水样直接用 PBS (pH 7.0)梯度稀释,肠道内容物匀浆后用 PBS 梯度稀释,均涂布于气单胞菌选择培养基平板^[19],于28℃培养24h后,每平板随机挑取2—3个菌落接种至 TSB 液体培养基中,振荡,28℃培养10h后将培养物浓缩,并用15%甘油+新鲜 TSB 保存于-80℃,待进一步鉴定。

基因组的提取 细菌基因组的提取采用细菌基因组提取试剂盒(天根,中国)。

常规生理生化鉴定 以嗜水气单胞菌 XS91-4-1^[20]作为参照菌株。保种菌及参照菌株进行氧化酶、触酶、O/F(葡萄糖氧化发酵)、运动性及弧菌抑制剂(O/129)敏感性试验^[21]。

分子生物学鉴定、系统发育树构建 用引物 16SF (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 16SR (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增保种菌的 16S rRNA 基因。回收目的片段,用内切酶 *Alu* I 和 *Mbo* I 双酶切,取酶切产物跑 PAGE 电泳。通过比较标准菌株酶切图谱,初步判定菌株种类^[22]。

以 *gyrB*3F (5'-TCCGGCGGTCTGCACGGCGT-3') *gyrB*14R(5'-TTGTCCGGGTTGTACTCGTC-3')^[23]为引物扩增初步鉴定菌株的 *gyrB* 基因。反应体系为:10×Ex Taq Buffer, 5 μL; dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 3 μL; 引物(10 μmol/mL)1 μL; 模板 DNA, 1 μL; Takara Ex Taq (5 U/μL), 0.25 μL; 补灭菌蒸馏水至 50 μL。扩增条件为:94℃ 5min, 接着 30 个循环:94℃ 30s, 59℃ 30s, 72℃ 90s, 最后 72℃延伸 10min。将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体(Takara)上进行克隆测序。

用 ClustalX (1.81)软件进行序列比对,再用 Mega4.1 软件构建 NJ 系统发育树,并进行 1000 次 Bootstraps 重复检验。

ERIC-PCR 根据 Aguilera-Arreola 等的程序和反应体系^[24],用引物 ERIC1R (5'-ATGTAAGCTC CTGGGGATTAC-3') 和 ERIC2 (5'-AAGTAAGTG ACTGGGGTGAGCG-3')扩增基因组 DNA,取 PCR 产物电泳拍照,并分析图谱类型^[25]。

毒力基因检测 我们共检测了 7 个毒力基因在病原菌中的分布, 包括气溶素、溶血素、热不稳定性细胞兴奋性肠毒素、热稳定性细胞兴奋性肠毒

素、弹性蛋白酶、脂酶和鞭毛基因。引物及参考文献信息(表 1)^[16, 26, 27]。

PCR 反应采用前述扩增 *gyrB* 基因体系。PCR

表 1 毒力基因扩增引物信息
Tab. 1 Details of the primers used for amplification of virulence genes

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	参考文献 Reference	产物长度 Length (bp)	PCR 产物测序菌株编号 及 Genbank 登录号
气溶素 <i>aerA</i>	aerA-F: CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA aerA-R: ACGAAGGTGTGGTTCCAGT	Wang, <i>et al.</i> (2003) ^[16]	309	4LNG101 (JF738029) JBN1201 (JF738030)
溶血素 <i>hlyA</i>	hlyA-F: GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG hlyA-R: GGC GCGCGCCGACGAGACGGG	Wong, <i>et al.</i> (1998) ^[26]	597	JBN1003 (JQ003195) DWCG102 (JF738031) JBN1103 (JQ003196) JBN1302 (JQ003197) 2JBN101 (JF738033) 4LNS301 (JF738034)
热不稳定性肠毒素 <i>alt</i>	alt-F: TGACCCAGTCCTGGCACGGC alt-R: GGTGATCGATCACCACCAGC	Sen and Rodgers (2004) ^[27]	442	JBN1203 (JQ003198) 4LNG201 (JF738035) JBN1207 (JQ003199) JBN1301 (JQ003200) 2WCL101 (JF738037) JG102 (JF738038)
热稳定性肠毒素 <i>ast</i>	ast-F: TCTCCATGCTTCCCTTCCACT ast-R: GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	Sen and Rodgers (2004) ^[27]	331	JBN1003 (JF738039) LNB103 (JF738040) JBN1303 (JQ003201) 2JBN301 (JF738041) 4LNS301 (JF738042)
弹性蛋白酶 <i>ahpB</i>	ahpB-F: ACACGGTCAAGGAGATCAAC ahpB-R: CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	Sen and Rodgers (2004) ^[27]	513	
脂酶 <i>lip</i>	lip-F: ATCTTCTCCGACTGGTTCGG lip-R: CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	Sen and Rodgers (2004) ^[27]	382	
鞭毛基因 <i>fla</i>	fla-F: TCCAACCGTYTGACCTC fla-R: GMYTGGTTGCGRATGGT	Sen and Rodgers (2004) ^[27]	608	

表 2 从败血症暴发池塘分离的嗜水气单胞菌
Tab. 2 *A. hydrophila* strains isolated from fishponds with outbreaks of septicemia

菌株 Strain	宿主/编号 Host/ID	来源 Source	菌株数 No. of strains	分离时间 Year	地点/池塘 Locality/Pond
IB102	团头鲂/1 Wuchang bream	血液 Blood	1	08/2006	汉川/塘 1 Hanchuan/Pond1
IB336	团头鲂/2 Wuchang bream	血液 Blood	1	08/2006	汉川/塘 1 Hanchuan/Pond1
4LNG101	鲢/3 Silver carp	肝脏 Liver	1	06/2008	荆门/塘 2 Jingmen/Pond2
4LNG201	鲢/4 Silver carp	肝脏 Liver	1	06/2008	荆门/塘 2 Jingmen/Pond2
4LNC202, 203, 209, 212, 215	鲢/4 Silver carp	肠道 Intestine	5	06/2008	荆门/塘 2 Jingmen/Pond2
4LNS301	鲢/5 Silver carp	肾脏 Kidney	1	06/2008	荆门/塘 2 Jingmen/Pond2
4LNC305	鲢/5 Silver carp	肠道 Intestine	1	06/2008	荆门/塘 2 Jingmen/Pond2
JG101	鲫/6 Crucian carp	肝脏 Liver	1	06/2008	荆门/塘 3 Jingmen/Pond3
CG101	草鱼/7 Grass carp	肝脏 Liver	1	06/2008	荆门/塘 3 Jingmen/Pond3
LNB101	鲢/8 Silver carp	血液 Blood	1	06/2008	荆门/塘 3 Jingmen/Pond3
PW01, 06, 14, 20	-	池水 Pond water	4	06/2008	荆门/塘 3 Jingmen/Pond3
DWCG101	团头鲂/9 Wuchang bream	肝脏 Liver	1	06/2009	武汉/塘 4 Wuhan/Pond4
DLNG101	鲢/10 Silver carp	肝脏 Liver	1	06/2009	武汉/塘 4 Wuhan/Pond4
DLNG201	鲢/11 Silver carp	肝脏 Liver	1	06/2009	武汉/塘 4 Wuhan/Pond4
DBHS101	鳙/12 Bighead carp	肾脏 Kidney	1	06/2009	武汉/塘 4 Wuhan/Pond4
JBN1001	鲫/13 Crucian carp	血液 Blood	1	06/2009	武汉/塘 5 Wuhan/Pond5
JBN1101	鲫/14 Crucian carp	血液 Blood	1	06/2009	武汉/塘 5 Wuhan/Pond5
JBN1201	鲫/15 Crucian carp	血液 Blood	1	06/2009	武汉/塘 5 Wuhan/Pond5
JBN1301	鲫/16 Crucian carp	血液 Blood	1	06/2009	武汉/塘 5 Wuhan/Pond5
2JBN101	鲫/17 Crucian carp	血液 Blood	1	07/2009	武汉/塘 6 Wuhan/Pond6
2JBN301	鲫/18 Crucian carp	血液 Blood	1	07/2009	武汉/塘 6 Wuhan/Pond6
2JFN201	鲫/19 Crucian carp	腹水 Ascites fluid	1	07/2009	武汉/塘 6 Wuhan/Pond6
2WCL101	团头鲂/20 Wuchang bream	肝脏 Liver	1	07/2009	武汉/塘 6 Wuhan/Pond6
XS91-4-1	鲢 Silver carp	内脏 Internal organ	1	1991	孝感

扩增程序为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 30s, 59℃ (*aerA*) 或 62℃ (*hlyA*) 或 59℃ (*alt*) 或 55℃ (*ast*) 或 57℃ (*ahpB*) 或 57℃ (*lip*) 或 55℃ (*fla*) 30s, 72℃ 1min, 32 个循环; 72℃ 延伸 10min。

为了验证 PCR 产物是否为特异性扩增, 每基因随机挑取 2—4 个克隆测序, 并将序列上传到 Genbank 数据库。

毒力的测定 根据 ERIC 图谱和毒力基因分布模式的不同, 选取分离自 6 个塘的 15 株代表菌株, 在斑马鱼中进行攻毒试验。无菌接种攻毒菌株于 TSA 平板, 28℃ 培养 18h, 挑单菌落接种于 TSB 培养液, 28℃ 震荡培养(150 r/min), 于 4℃ (1500 g, 5min) 离心收集处于对数生长期的菌体, PBS 洗涤一次, 重新悬浮菌体于 PBS, 用分光光度计调整菌液浓度为 10^6 — 10^8 CFU/mL^[28]。对每株攻毒试验病原菌, 40 尾斑马鱼被随机分为四组, 每组 10 尾, 实验组腹腔注射 50 μ L 浓度为 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/mL 的菌液, 对照组注射 50 μ L PBS, 观察两个星期并记录死亡率。半致死浓度(LD_{50})由软件 SPSS 13.0 通过几率单位加权回归法(Bliss)计算。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果

共分离到 30 株嗜水气单胞菌, 包括 20 株临床株(分离自血液、肝脏、肾脏或腹水), 6 株肠道株和 4 株池水株(表 2)。所有菌株均为氧化酶、触酶阳性, 葡萄糖氧化型, 具有运动性, 对弧菌抑制剂不敏感。

用 *gyrB* 序列构建的系统发育树(图 1)。所有的分离株在系统发育树上都与 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966^T 聚在一起, 形成一大枝。20 株临床株均为嗜水气单胞菌, 且极有可能为嗜水亚种, 其 *gyrB* 序列相似性为 100%。6 个鱼塘皆为同一种病原菌引起的发病。

与临床株相比, 5 株肠道株(4LNC203、4LNC209、4LNC212、4LNC215 和 4LNC305)和 1 株池水株(PW01)的 *gyrB* 序列相似性较低。

2.2 ERIC 指纹图谱分析

所有的菌株均独立扩增了两次, 获得了可重复的谱带。标准菌株 ATCC7965 为参照菌株。图 2 为代表菌株的 ERIC 电泳图谱。

分离自 6 个塘的 20 株临床株, 1 株肠道株(4LNC202) 和 3 株池水株(PW06, PW14 和 PW20)

具有相同的 ERIC 图谱, 均由 6 条带组成。

2.1 中 6 株与临床株 *gyrB* 序列相似性较低的肠道和池水株, 具有与临床株不同的 ERIC 图谱。6 株菌共有 5 种不同的图谱类型, 体现出高度的遗传多样性。

来自塘 2 的临床株, 其 ERIC 带型虽与其他塘的临床株相同, 但是最小条带(—600 bp)的拷贝数明显高于其他塘临床株, 因此与其他塘菌株应属于不同的克隆。

2.3 毒力基因分布模式

30 株嗜水气单胞菌的基因组 DNA 经 PCR 扩增之后, 7 种毒力基因扩增片段都与预期的片段大小相吻合。为了确认所有产物均为特异性扩增, 对于每个基因, 我们随机测序了 2—4 株菌的扩增产物, 序列均上传到了 Genbank 数据库, 菌株编号及 Genbank 登录号(表 1)。经 Blast 序列比对, 所有毒力基因均为特异性扩增。

30 株菌的毒力基因分布模式(表 3)。共有 3 种不同的毒力基因型。所有的临床株都含有所检测的 7 种毒力基因, 其毒力基因型为: *aerA*⁺*hlyA*⁺*alt*⁺*ast*⁺*ahpB*⁺*lip*⁺*fla*⁺。6 株肠道株分属于 3 种毒力基因型, 显示出最高的多样性。4 株池水株与临床株毒力基因型相同。

2.4 毒力测定

攻毒试验菌株的信息及半致死浓度(表 4)。15 株攻毒菌株分别分离自鲢的肝脏、草鱼的肝脏、团头鲂的血液和肝脏、鲫的血液和腹水、池水及鲢的肠道。来自 6 个塘的临床株都为强毒株, 攻毒斑马鱼绝大部分死亡发生在 16h 以内, 24h 后几乎不再死亡, 表现出急性毒性, 其半致死浓度(LD_{50})均小于 10^5 CFU/尾。分离自池水和肠道的菌株, 其中与临床株具有相同 ERIC 图谱, 且毒力基因型相同的菌株, 亦属于强毒株, 其余菌株均属于弱毒株($LD_{50}>10^6$ cfu/尾)(表 3)。部分菌株, 其 3 个浓度组的攻毒斑马鱼均死亡, LD_{50} 定义为小于可计算的最低浓度($<9\times 10^3$)。

池水株 PW01 含有 7 种毒力基因, 其毒力基因型与临床株相同, 但具有不同的 ERIC 图谱, 属于弱毒株。

3 讨论

嗜水气单胞菌是我国养殖鱼类最重要的病原菌之一, 常引起池塘养殖鱼类出血性败血症、肠炎, 竖

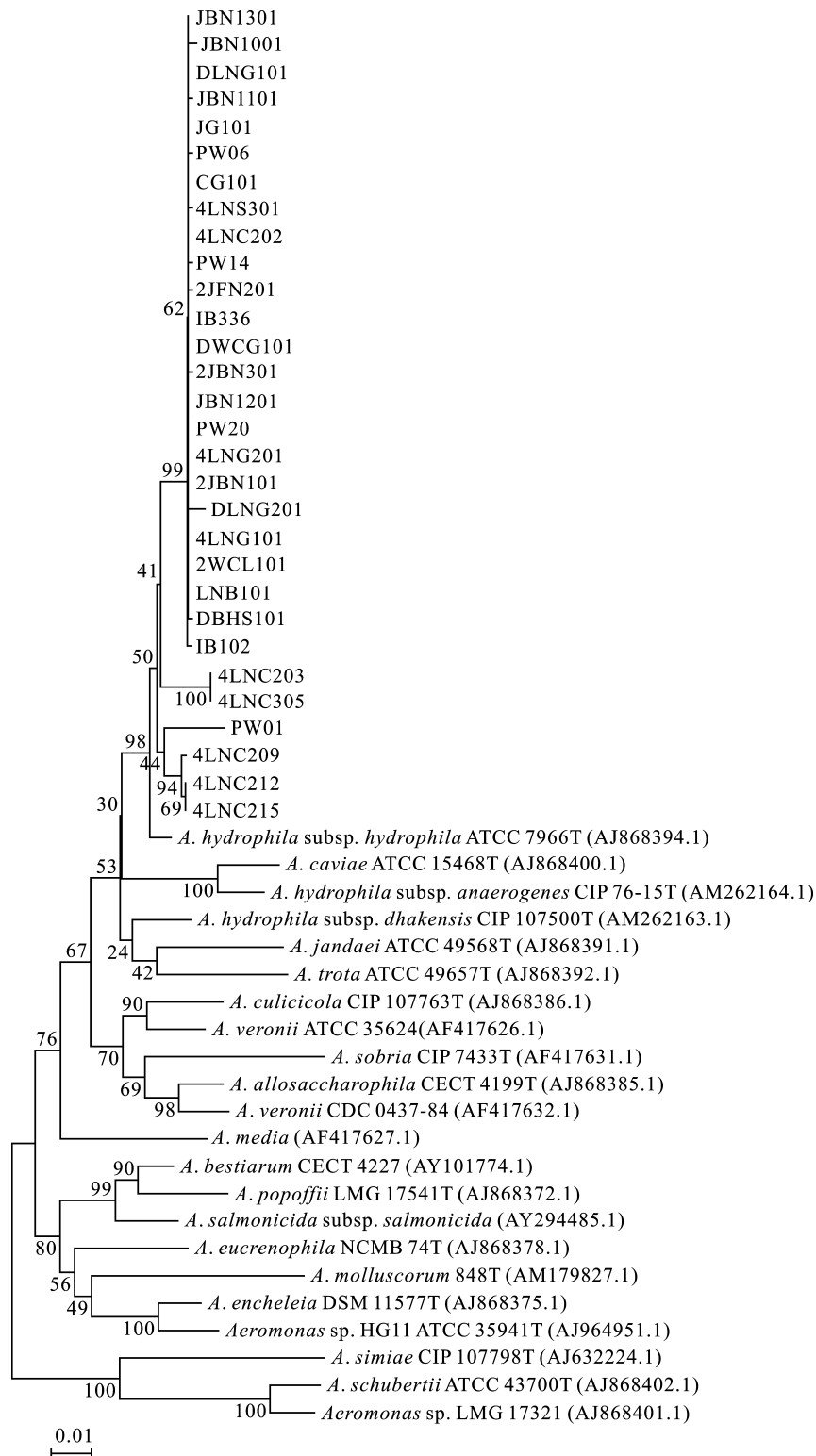


图 1 基于气单胞菌属的 *gyrB* 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of bacteria from genera of *Aeromonas*

鳞病, 烂尾烂鳍等多种疾病的流行, 不同的疾病有不同的症状表现。其发病机理、病原菌的流行规律及毒力特征至今仍不明确。虽然嗜水气单胞菌从

20 世纪 80 年代末期流行至今已有 20 余年, 笔者未检索到对发病池塘中此病原菌遗传多样性和毒力特征的系统调查。

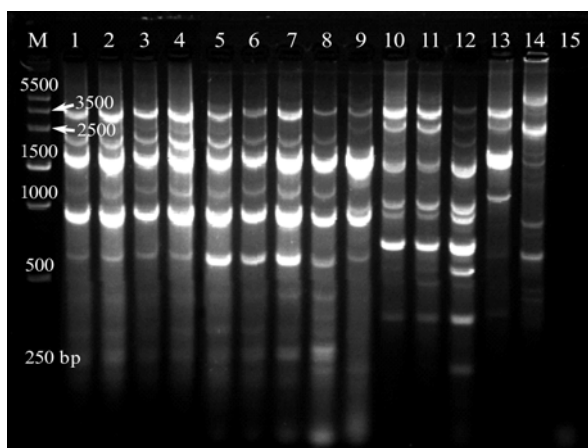


图2 嗜水气单胞菌代表菌株的ERIC图谱

Fig. 2 ERIC profiles of representative *Aeromonas hydrophila* strains

M: marker; Lanes 1—15: IB102, JG101, DWCG101, JBN1001, 4LNG101, 4LNS301, 4LNC202, 2JBN101, 4LNC203, 4LNC209, 4LNC212, 4LNC215, 4LNC305, ATCC7965; 15, negative control

2006—2010年, 我们从湖北省3个地区6个由嗜水气单胞菌引发的暴发病发病鱼塘中共分离了30株菌, 通过ERIC-PCR和毒力基因检测, 比较分析了鱼类MAS暴发病塘中此菌的遗传多样性和毒力特征。

嗜水气单胞菌作为自然界的正常菌群, 具有高度的遗传多样性。ERIC是一类广泛存在于细菌基因组上的基因外非编码倒转重复序列, 被大量用于分析嗜水气单胞菌的遗传多样性和种群结构^[24, 29], 具有良好的区分度。通过ERIC-PCR, 我们发现所有6个塘的临床株都具有相同的带型, 虽然塘2的临床株其最小条带(~600 bp)的拷贝数明显高于其他塘临床株, 不属于同一克隆, 但具有很近的亲缘关系, 属于同一克隆系。肖丹等采用ERIC-PCR方法对49株分别采集于中国浙江、江苏、江西、广东、湖北、

表3 嗜水气单胞菌的毒力基因分布模式

Tab. 3 Distribution patterns of virulence-gene in *Aeromonas hydrophila*

菌株来源 Strain source	菌株数 No. of strain	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>ahpB</i>	<i>lip</i>	<i>fla</i>	ERIC 图谱 ERIC-profile	毒力 ^c Virulence
临床株 Clinical isolates	20	+ ^a	+	+	+	+	+	+	I	H
	1	+	+	+	+	+	+	+	I	H
肠道株 Intestinal isolates	1	- ^b	+	+	+	+	+	+	II	L
	1	-	+	+	+	+	+	+	III	L
	1	-	-	-	+	+	+	+	IV	L
	2	-	-	-	+	+	+	+	V	L
池水株 Pond water isolates	3	+	+	+	+	+	+	+	I	H
	1	+	+	+	+	+	+	+	V	L

注: ^a +, 阳性; ^b -, 阴性; ^c H, 高毒力; ^c L, 低毒力

Note: ^a +, positive; ^b -, negative; ^c H, high; ^c L, low

表4 代表菌株在斑马鱼中的攻毒结果

Tab. 4 Results of pathogenicity assays to zebrafish with representative strains

菌株 Strain	宿主 Host	来源 Source	池塘 Pond	毒力基因型 ^a Virulence gene profile	半致死浓度(CFU/尾) <i>LD</i> ₅₀ (CFU/fish)
IB102	团头鲂 Wuchang bream	血液 Blood	1	1	9×10 ³
4LNG201	鲢 Silver carp	肝脏 Liver	2	1	9.74×10 ⁴
4LNC202	鲢 Silver carp	肠道 Intestine	2	1	<9×10 ³
CG101	草鱼 Grass carp	肝脏 Liver	3	1	<9×10 ³
PW06	—	池水 Pond water	3	1	1.54×10 ⁴
PW14	—	池水 Pond water	3	1	1.01×10 ⁴
DLNG101	鲢 Silver carp	肝脏 Liver	4	1	<9×10 ³
JBN1001	鲫 Crucian carp	血液 Blood	5	1	3.18×10 ⁴
JBN1201	鲫 Crucian carp	血液 Blood	5	1	<9×10 ³
2JFN201	鲫 Crucian carp	腹水 Ascites fluid	6	1	<9×10 ³
2WCL101	团头鲂 Wuchang bream	肝脏 liver	6	1	<9×10 ³
PW01	—	池水 Pond water	3	1	1.01×10 ⁶
4LNC203	鲢 Silver carp	肠道 Intestine	2	2	2.89×10 ⁶
4LNC305	鲢 Silver carp	肠道 Intestine	2	2	1.61×10 ⁶
4LNC209	鲢 Silver carp	肠道 Intestine	2	3	6.61×10 ⁶

Note: ^a 1. *aerA/hlyA/alt/ast/ahpB/lip/fla*; 2. *hlyA/alt/ast/ahpB/lip/fla*; 3. *ast/ahpB/lip/fla*

上海等主要淡水养殖区的致病性嗜水气单胞菌进行了基因分型^[30],发现 49 株菌共分为 12 个基因型。除菌株 GD08、GD04 以外的广东分离株的基因型均为 VIII 型,除菌株 JX04 以外的江西分离株均属 VI 型,而上海、浙江等地分离株的基因型均呈现多态性;而且不同基因型菌株的分布特点也有差异。例如, VII 型菌株在广东、江苏、上海、浙江均有出现,而 IV 型、V 型、X 型菌株仅在上海出现。不同基因型菌株的分布呈现了一定的区域性。其中有 5 株分离自湖北洪湖和丹江口的病鱼,除分离自洪湖的菌株 HB01 为基因型 II 型外,其余 4 株均为同一亚型。由于文中未涉及发病鱼的种类、症状和这 5 株菌的图谱,因此无法与本文中的分离株进行直接比较。

嗜水气单胞菌有致病性菌株和非致病性菌株之分。随着致病性嗜水气单胞菌潜在毒力因子的不断阐明,越来越多的学者使用毒力基因作为标记基因,研究嗜水气单胞菌的潜在毒力及致病性^[15-17]。通过遗传操作,该菌的气溶素(*aerA*)、溶血素(*hlyA*)、热不稳定性细胞兴奋性肠毒素(*alt*)、热稳定性细胞兴奋性肠毒素(*ast*)、弹性蛋白酶(*ahpB*)、脂酶(*lip*)和鞭毛基因(*fla*)已经被证明在侵染过程中发挥重要作用^[10-12, 14, 26]。本实验检测了这 7 个毒力基因在 MAS 暴发池塘中的流行情况,发现这些基因在临床株中的流行率皆为 100%,为多毒力基因的联合流行。如此显著的结果让我们加深了对嗜水气单胞菌暴发株的认识,并且为池塘 MAS 致病机理的解析提供了理论依据。83.3%的肠道株虽然有部分毒力基因缺失,对斑马鱼只有弱毒性,但仍然具有多种毒力基因,这是否说明在暴发病发病池塘中,存在致病性菌株与非致病性菌株之间的毒力基因交流?这个问题值得进一步研究。

斑马鱼作为模式动物,已经被证明是良好的嗜水气单胞菌感染对象^[18]。我们随机选取了分离自不同时间、不同池塘、不同发病鱼类、不同组织和不同来源的嗜水气单胞菌,用斑马鱼进行攻毒试验,测定了其毒力水平。依据 Li, *et al.* 的毒力划分标准^[18],所有的临床株皆为强毒株,其 $LD_{50} < 10^5$ CFU/尾。在池水和肠道株中,与临床株 ERIC 图谱和毒力基因型相同的菌株,亦属于强毒株。其他肠道和池水株皆属于弱毒株,其 $LD_{50} > 10^6$ CFU/尾。

值得一提的是,池水株 PW01 虽与临床株毒力基因分布模式相同,但其 *gyrB* 序列与临床株相似度较低,且具有不同的 ERIC 图谱类型,属于弱毒株。

一方面这可能是由于它缺失我们未检测的毒力基因或者未阐明的毒力基因,另一方面也表明嗜水气单胞菌的致病性是多因子共同作用的结果,单纯检测毒力基因,无法将所有的有毒株和无毒株区分开,而 ERIC-PCR 结合毒力基因检测的方法,在此病原菌流行病学的研究中具有更可靠的应用前景。

从表 3 和表 4 我们可以发现,嗜水气单胞菌的毒力大体与菌株含有的毒力基因数量呈正相关。代表菌株的毒力测定显示,除池水株 PW01 外,含有 7 个毒力基因的临床株、肠道株和池水株均为强毒株($LD_{50} < 10^5$ CFU/尾),缺失气溶素的菌株(4LNC203, 4LNC305)为弱毒株($LD_{50} \geq 1.61 \times 10^6$),同时缺失气溶素与溶血素的菌株(4LNC209)毒力最弱($LD_{50} = 6.61 \times 10^6$)。这表明毒力基因作为标记基因,在此病原菌的检测中具有良好的应用前景。从表 3 我们还发现, *aerA*、*hlyA* 和 *alt* 三个基因或许可以作为基因标记,用来区分嗜水气单胞菌的强毒株和弱毒株。

综上所述,本文第一次系统性的研究了 MAS 暴发鱼塘中嗜水气单胞菌的遗传多样性和毒力特征。20 株临床株分别分离自 3 个城市、6 个不同的池塘、3 个不同的年份、4 个不同的时间点和 5 种不同的鱼类,其 *gyrB* 序列、ERIC 带型、毒力基因型和致病性,均表明此疫区中的病原嗜水气单胞菌属于同一克隆系。同一池塘中的其他非同源的池水和肠道株致病性弱,表现出了遗传多样性。在一定区域内 MAS 暴发病的病原具有相似遗传特征这一研究发现,提示可望借助地区特异性疫苗防御此疾病。此外,7 种重要毒力基因的广泛流行,为致病机理的解析提供了线索。

参考文献:

- [1] Cipriano R C. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish [M]. Fish Disease Leaflet, 2001, 68
- [2] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282—288 [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3): 282—288]
- [3] Ge H Y, Wang L M, Zheng Y H, *et al.* Effects of raffinose on growth performance, immunity, stress response and survival of Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 283—290 [葛红云, 王兰梅, 郑银桦, 等. 棉子糖对花鲈生长、免疫抗应激及抵御嗜水气单胞菌攻毒的影响. 水生生物学报, 2011, 35(2): 283—290]
- [4] Ai X H, Ding Y M, Wang K Y, *et al.* Study on pharmacokinetics/pharmacodynamics model of doxycycline against

- Aeromonas hydrophila* in serum of channel catfish *ex vivo* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 893—899 [艾晓辉, 丁运敏, 汪开毓, 等. 在斑点叉尾鮰血清中强力霉素对嗜水气单胞菌药动-药效模型研究. 水生生物学报, 2011, **35**(6): 893—899]
- [5] Abbott S L, Cheung W K W, Janda J M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41**(6): 2348—2357
- [6] Thomas L V, Gross R J, Cheasty T, *et al.* Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, **28**(5): 980—984
- [7] Szczuka E, Kaznowski A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**(1): 220—228
- [8] Borchardt M A, Stemper M E, Standridge J H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, **9**(2): 224—228
- [9] Aguilera-Arreola M G, Hernandez-Rodriguez C, Zuniga G, *et al.* Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, **53**(7): 877—887
- [10] Howard S P, Garland W J, Green M J, *et al.* Nucleotide sequence of the gene for the hole forming toxin arolysin of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(6): 2869—2871
- [11] Hirono I, Aoki T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1991, **11**(3): 189—197
- [12] Sha J, Kozlova E V, Chopra A K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: Generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity [J]. *Infection and Immunity*, 2002, **70**(4): 1924—1935
- [13] Cascon A, Yugueros J, Temprano A, *et al.* A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 2000, **68**(6): 3233—3241
- [14] Merino S, Aguilar A, Nogueras M M, *et al.* Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O : 34 [J]. *Infection and Immunity*, 1999, **67**(8): 4008—4013
- [15] Rabaan A A, Gryllos I, Tomas J M, *et al.* Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells [J]. *Infection and Immunity*, 2001, **69**(7): 4257—4267
- [16] Heuzenroeder M W, Wong C Y, Flower R L. 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
- [17] 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]
- [18] Li J, Ni X D, Liu Y J, *et al.* Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, **110**(3): 823—830
- [19] Farmer J J, Arduino M J, Hickman-Brenner F W. The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* [M]. In: Balows A, Triiper H G, Dworkin M, *et al* (Eds.), *The Prokaryotes*. New York, USA. 1992, 3012—3043
- [20] Xu B H, Yin Z, Wu Y S, *et al.* Studies on the taxonomy of pathogenic bacterial of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured fishes in freshwater [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, **17**(3): 259—266 [徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究. 水生生物学报, 1993, **17**(3): 259—266]
- [21] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Systematic Determination of Familiar Bacteria [M]. Beijing: Science Press. 2001, 162—171, 353—386 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 162—171, 353—386]
- [22] Borrell N, Acinas S G, Figueras M J, *et al.* 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
- [23] Yanez M A, Catalan V, Apraiz D, *et al.* Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, **53**(3): 875—883
- [24] Aguilera-Arreola M G, Hernandez-Rodriguez C, Zuniga G, *et al.* *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **242**(2): 231—240
- [25] Millemann Y, Lesage-Descauses M C, Lafont J P, *et al.* Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella* [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996, **14**(2—3): 129—134
- [26] Wong C Y F, Heuzenroeder M W, Flower R L P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model [J]. *Microbiology*, 1998, **144**(2): 291—298
- [27] Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**(5): 1077—1086
- [28] Li A H. The study of the drug resistance, resistance plasmid of fish pathogenic bacteria, and the antibacterial action of several drug in China [D]. Wuhan. Chinese Academy of

- Sciences, Institute of Hydrobiology, PhD thesis. 1998 [李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究. 武汉. 中国科学院水生生物研究所博士学位论文. 1998]
- [29] Maiti B, Raghunath P, Karunasagar I, *et al.* Typing of clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. using two PCR based methods and whole cell protein analysis [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, **78**(3): 312—318
- [30] Xiao D, Cao H P, Hu K, *et al.* ERIC-PCR genotyping and drug resistant analysis of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from freshwater animals [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, **18**(5): 1092—1099 [肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 等. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 分型与耐药性. 中国水产科学, 2011, **18**(5): 1092—1099]
- [31] Wang N, Zhang X J, Liu Y J, *et al.* Research Progress of Type III Secretion System in *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2011, **25**(1): 21—24 [王娜, 张小军, 刘永杰, 等. 嗜水气单胞菌 III 型分泌系统研究进展. 河北科技师范学院学报, 2011, **25**(1): 21—24]
- [32] Silver A C, Graf J. Prevalence of genes encoding the type three secretion system and the effectors AexT and AexU in the *Aeromonas veronii* Group [J]. *DNA and Cell Biology*, 2009, **28**(8): 383—388
- [33] Carvalho-Castro G A, Lopes C O, Leal C A G, *et al.* Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, **144**(3—4): 371—376
- [34] Martino M E, Fasolato L, Montemurro F, *et al.* Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, **77**(14): 4986—5000

THE GENETIC DIVERSITY AND VIRULENCE CHARACTERISTICS OF *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLATED FROM FISHPONDS WITH DISEASE OUTBREAKS IN HUBEI PROVINCE

ZHANG Xu-Jie^{1,2}, YANG Wu-Ming^{1,2}, LI Tong-Tong^{1,2} and LI Ai-Hua¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To investigate the genetic diversity and virulence characteristics, and to clarify the epidemic regularity of *Aeromonas hydrophila* which caused motile *Aeromonas* septicaemia outbreak (commonly known as disease outbreaks) in fish, 30 strains were isolated from 6 diseased fishponds which located in three different regions of Hubei province from 2006 to 2009. Among these strains, 20 were clinical strains (isolated from blood, liver, kidney or ascites fluid), 6 were intestinal strains and 4 were pond-water strains. A phylogenetic tree was constructed on the basis of the *gyrB* gene sequence of all 30 strains; the genetic typing of these strains were done through ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-fingerprinting; the distribution patterns of seven virulence genes in these strains were tested by PCR method, including aerolysin (*aerA*), haemolysin (*hlyA*), heat-labile cytotoxic enterotoxin (*alt*), heat-stable cytotoxic enterotoxin (*ast*), elastase (*ahpB*), lipase (*lip*), and flagella (*fla*). In addition, the virulence of 15 representative strains was assayed in zebrafish by intraperitoneal injection. The results showed that regardless of the origin, all the 20 clinical strains, 1 intestinal strain and 3 pond-water strains had the same genetic characteristics. These included that clustered together in the phylogenetic tree, with 100% sequence similarities among these strains; have the same ERIC-fingerprinting and the same virulence-gene pattern: *aerA*⁺*hlyA*⁺*alt*⁺*ast*⁺*ahpB*⁺*lip*⁺*fla*⁺; all of them were high virulent strains ($LD_{50} < 9.74 \times 10^4$ cfu/fish). Compared with clinical strains, the rest 5 intestinal strains and 1 pond-water strain either had different ERIC-fingerprints or have different virulence-gene patterns, showing higher genetic diversity and lower virulence ($LD_{50} > 1.01 \times 10^6$ cfu /fish). These results indicated that as the pathogen of disease outbreaks, a clonal lineage of *A. hydrophila* was in popular within a certain time and areas, and no obvious variation or genetic diversity was found among these strains. This result would help in the clarification of the epidemic regularity of *A. hydrophila* underlying outbreaks, and help to make the right defense measures to prevent this infection. Meanwhile, the combined prevalence of multiple virulence genes in pathogenic strains of *A. hydrophila* laid the foundation for clarify the pathogenic mechanism underlie this infection. Moreover, the correlation of virulence and virulence-gene patterns of *A. hydrophila* showed that virulence genes can be chosen as gene-marker to detect pathogenic strains of this bacterium.

Key words: Diseased fishponds; *Aeromonas hydrophila*; Genetic diversity; Virulence gene; Virulence