



研究报告

乌鳢源杀鱼爱德华菌的分离鉴定及药敏特性研究

付立霞^{1,2} 马士杰² 徐敬潇³ 龚建森³ 杨辉² 赖迎迢¹ 赵飞¹ 黄志斌^{*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 扬州大学动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009

3 中国农业科学院家禽研究所 江苏 扬州 225125

摘要:【背景】江苏省扬州市某乌鳢养殖场发生疾病,给养殖户造成了严重的经济损失。【目的】确定病因并筛选出敏感药物,为乌鳢相关疾病的防治提供参考。【方法】从患病乌鳢体内分离致病菌,并从形态、生理生化特征、16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列及特异性 PCR 检测等方面对分离菌株进行鉴定,同时开展人工感染试验分析其致病性,通过纸片扩散法进行药敏特性分析。【结果】从患病乌鳢体内分离获得优势菌株 SHL,经形态特征、理化特性、16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列及特异性 PCR 检测鉴定为杀鱼爱德华菌。进一步人工感染试验证实其对乌鳢有较强的致病性,LD₅₀ 为 1.6×10⁵ CFU/g,发病症状与自然发病症状相似。药敏试验结果显示,该菌株对青霉素、氯霉素、四环素等 28 种抗菌药物高度敏感,对红霉素中度敏感,对苯唑西啉、克拉霉素、万古霉素等 6 种药物耐药。【结论】引起江苏省扬州市某养殖场的乌鳢体表溃烂及死亡的病原菌为杀鱼爱德华菌,这是我国首次从淡水鱼类中检出致病性杀鱼爱德华菌,表明该菌的感染谱在扩大,需引起水产养殖领域的重视,在养殖过程中可根据药敏实验结果选用合适的国标渔药进行防治。

关键词: 乌鳢, 杀鱼爱德华菌, 16S rRNA 基因, *gyrB*, 药敏试验

Foundation items: Open Project Program of Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs & Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province (201801); National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900103); Science and Technology Project of Guangdong Province (2016B020234003)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-81334212; E-mail: hzb1393@163.com

Received: 28-02-2021; **Accepted:** 24-03-2021; **Published online:** 02-04-2021

基金项目: 农业农村部渔用药物创制重点实验室和广东省水产动物免疫技术重点实验室项目(201801); 国家重点研发计划(2019YFD0900103); 广东省科技计划(2016B020234003)

***通信作者:** Tel: 020-81334212; E-mail: hzb1393@163.com

收稿日期: 2021-02-28; **接受日期:** 2021-03-24; **网络首发日期:** 2021-04-02

Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Edwardsiella piscicida* from *Channa argus*

FU Lixia^{1,2} MA Shijie² XU Jingxiao³ GONG Jiansen³ YANG Hui² LAI Yingtiao¹
ZHAO Fei¹ HUANG Zhibin^{*1}

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

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

3 Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225125, China

Abstract: [Background] A fish disease occurred in a snakehead farm in Yangzhou, Jiangsu Province, causes great economic losses. [Objective] To determine the etiology and screen out sensitive drugs for the control of snakehead-related diseases. [Methods] The pathogenic bacteria were isolated from the sick snakeheads, and the isolates were identified in terms of morphology, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene and *gyrB* sequences and specific PCR assays, while their pathogenicity was analyzed by artificial infection tests and antimicrobial sensitivity was tested by paper diffusion method. [Results] A dominant strain SHL isolated from the sick snakeheads was identified as *Edwardsiella piscicida*, by its morphological characteristics, physicochemical properties, 16S rRNA gene and *gyrB* sequences, specific PCR results, and further artificial infection tests confirmed its strong pathogenicity to snakeheads with an LD_{50} of 1.6×10^5 CFU/g with similar symptoms to natural disease. The drug sensitivity test results showed that the strain was highly sensitive to 28 antibacterial drugs such as penicillin, chloramphenicol and tetracycline, moderately sensitive to erythromycin, and resistant to 6 drugs such as oxacillin, clarithromycin and vancomycin. [Conclusion] *Edwardsiella piscicida* is the pathogen causing the ulceration and death of snakeheads (*Channa argus*) cultured in Yangzhou, Jiangsu province. It is the first time that *Edwardsiella piscicida* was detected from freshwater fish in China. The results demonstrated that the infection spectrum of *Edwardsiella piscicida* is expanding, which needs to be paid more attention in the field of aquaculture. In aquaculture practice, we can treat the disease with the appropriate national standard fishery drugs according to the results of the drug sensitivity test.

Keywords: *Channa argus*, *Edwardsiella piscicida*, 16S rRNA gene, *gyrB*, antimicrobial sensitivity test

乌鳢(*Channa argus*)是我国常见的名贵淡水养殖品种之一,但随着乌鳢养殖规模的不断扩大和集约化程度的不断提高,病害频繁发生,迄今已报道的疾病有费氏枸橼酸杆菌引起的腹水病^[1]、嗜水气单胞菌引起的腐皮病和溃烂病^[2-3]、鲺诺卡氏菌引起的结节病及温和气单胞菌引起的出血病等^[4-5]。2018年6月江苏省扬州市某养殖场养殖乌鳢发生疾病,主要症状为:病鱼食欲减退甚至完全不进食,活力下降,头部及体表多处出现严重溃烂,鳞片脱落,肛门红肿外翻,部分病鱼腹部膨大有积液,并陆续出现死鱼现象,未死的鱼也因病而失去商品价值,给养殖户造成了严重的经济损失。通过对患病乌鳢进行病原检查、分离鉴定及致病性试验,证实

其病原为近年来新确立的细菌物种——杀鱼爱德华菌。

杀鱼爱德华菌在分类上隶属于肠杆菌科爱德华菌属,呈全球性地理分布,宿主范围也十分广泛,多为海水和咸淡水鱼类,包括尖吻鲈、欧洲鳗鲡、真鲷、大菱鲆、大口黑鲈和黑斑刺鲃等^[6],给相关养殖产业造成了巨大的经济损失,不过目前尚未见有杀鱼爱德华菌感染乌鳢并致病的相关报道。本研究首次从患病乌鳢中分离到致病性杀鱼爱德华菌,这是我国首次从淡水鱼类中检出致病性杀鱼爱德华菌,表明该菌的感染谱在扩大,需引起水产养殖领域的重视,这也可为进一步研究其流行病学及致病机制奠定基础。通过药敏试验分析可为乌

鳢养殖过程中暴发的细菌性疾病防治、杀鱼爱德华菌的耐药谱分析及遗传改造中抗性标记的选择等提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

患病乌鳢采自江苏省扬州市某养殖场,攻毒用健康乌鳢购自广东省佛山市南海百容水产良种有限公司,体长 5.8–6.3 cm,体重 2.5±0.2 g,暂养于循环水泥池(2.0 m×2.0 m×0.6 m)中,期间水温为 28.4–30.4 °C。用于种特异性引物鉴别的菌株 SHL 分离自患病乌鳢;人源的迟缓爱德华菌 ET-1 和 ET-13 由南京农业大学陆承平教授惠赠;黄颡鱼源的鲶爱德华菌 YCH 由本实验室分离保存;斑点叉尾鲴源的鲶爱德华菌 CH01 由长江水产研究所曾令兵研究员惠赠。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰蛋白大豆琼脂(Trypsin Soy Agar, TSA)、胰蛋白大豆肉汤(Trypsin Soy Broth, TSB)和 SS 琼脂,北京陆桥技术股份有限公司;革兰染色液、细菌微量生化反应管及药敏纸片,杭州滨和微生物试剂有

限公司;PrimeSTAR HS (Premix)、Premix Taq (Plus Dye)、DNA A-Tailing Kit、pMD19-T Vector Cloning Kit、DL2000 DNA Marker 和 DL5000 DNA Marker,宝日医生物技术(北京)有限公司;基因组提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit、胶回收试剂盒 TIANGel Mini Purification Kit,天根生化科技(北京)有限公司;所有引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。无菌操作台,苏州净化设备有限公司;PCR 仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 患病乌鳢细菌的分离和纯化

先对患病乌鳢进行实验室常规检查,然后用 70%酒精棉球对体表消毒,在无菌条件下打开病鱼腹腔,接种环穿刺挑取少量内脏组织,划线接种于 TSA 和 SS 平板,于 28 °C 培养过夜,选取形状、色泽和大小一致的优势单个菌落,重复划线分离直至获得纯培养菌。

1.3 形态和生理生化鉴定

挑取上述纯培养单菌落制备菌涂片进行革兰染色,于显微镜下观察菌体形态;同时用接种针取对应的纯培养菌接种至各类微量生化反应管,于 28 °C 培养 24 h,观察记录反应管培养基颜色的变化,参照产品说明书判定结果。

表 1 本研究中所用引物及其序列

Table 1 Primers and its sequences used in this study

引物名称	引物序列	产物大小	参考文献
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Product size (bp)	References
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1 508	[7]
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>gyrB</i> -F	GGATAACGCGATTGACGAAG	1 921	[8]
<i>gyrB</i> -R	GCCGTGARCAAARTCRAA		
EP-F	CTTTGATCATGGTTGCGGAA	130	[8]
EP-R	CGGCGTTTTCTTTCTCG		
EPL-F	TTTGATCGGGTACGCTGT	128	[8]
EPL-R	AATTGCTCTATACGCACGC		
ET-F	CAGTGATAAAAAGGGGTGGA	114	[8]
ET-R	CTACACAGCAACGACAACG		
ESC-F	ACTTATCGCCCTCGCAAC	129	[8]
ESC-R	GCCTCTGATAAGTGGTTTCG		

注:引物序列中的 M 为 A/C, Y 为 C/T, R 为 A/G

Note: M in the primer sequence is A/C, Y is C/T, and R is A/G

1.4 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析

由于所有分离菌株前述实验结果完全一致,因此从中选取一株分离自肝脏组织的纯化菌株 SHL 作为代表菌株进行分子鉴定及后续试验。将菌株 SHL 接种至 TSB 培养基, 28 °C、150 r/min 振荡培养过夜。次日取 1.5 mL 菌液, 用基因组提取试剂盒参照说明书提取细菌基因组 DNA, 然后以其为模板, 利用引物对 27F/1492F 和 *gyrB*-F/*gyrB*-R 分别对 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 灭菌双蒸水 22 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环。

PCR 反应结束后, 产物于 1%琼脂糖凝胶中电泳后在紫外分析仪中切下目的片段, 用胶回收试剂盒 TIANgel Mini Purification Kit 回收目的片段, 然后用 DNA A-Tailing Kit 对平末端产物的 3'端加“A”, 再连入 pMD19-T 载体并通过热激转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 均匀涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 挑选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

将所测序列通过 NCBI 的 BLAST 进行序列同源性分析, 然后从中选取部分相关 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列, 通过 MEGA X 软件中的 Align 组件进行多序列匹配排列后, 采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统进化树, 并通过自举法(Bootstrap)进行置信度检验, 自举重复次数设置为 1 000。

1.5 人工感染试验

将健康乌鳢暂养 7 d 后随机分成 6 组, 每组 20 尾分入 6 个相同规格的水族箱中。攻毒菌株 SHL 接种于 TSB 培养基, 28 °C、150 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.5)后, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀, 用 pH 7.2 的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后, 10 倍比梯度稀释成 5 种不同浓度菌悬液, 同时进行平板计数以获得更为精确的

菌液浓度。采用腹腔注射的方式对乌鳢进行攻毒, 注射剂量为 50 μ L/尾, 对照组则注射等体积无菌 PBS。实验期间, 对人工感染后的乌鳢正常喂养并定时观察, 连续观察 7 d, 每日记录发病和死亡情况, 并对感染发病乌鳢再次进行细菌分离鉴定(分离菌株命名为 SHL-2), 最后根据 Reed-Muench 公式计算菌株 SHL 对乌鳢的半数致死量(LD_{50})^[9]。

1.6 特异性引物检测

参照文献[8]所述方法对菌株 SHL、SHL-2 及爱德华菌属内其他菌种进行 PCR 检测, 其中引物对 EP-F/EP-R、EPL-F/EPL-R、ET-F/ET-R 和 ESC-F/ESC-R 分别适用于杀鱼爱德华菌、类杀鱼爱德华菌、迟缓爱德华菌和鲶爱德华菌的特异性引物检测。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。

1.7 药敏试验

采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法对分离菌株进行药敏实验。在无菌操作下, 将菌株 SHL 接种至 TSB 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 18 h 后, 用无菌 PBS 洗涤并稀释调整至 0.5 麦氏标准浊度, 取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于 TSA 平板, 贴上药敏纸片, 置于 28 °C 恒温培养 48 h 后测量药敏纸片的抑菌圈直径, 根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)文件并结合杭州滨和微生物试剂有限公司提供的药敏判读标准进行结果判定。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态特征

对患病乌鳢的实验室常规检查未发现真菌及寄生虫感染, 在无菌条件下从病鱼的肝、肾、脾等组织中分离到了大量菌落形态一致的优势菌落, 通过重复划线共获得 9 株纯培养菌株。分离菌株在 TSA 平板上 28 °C 培养 24 h 后形成圆形、光滑、湿润、微凸的细小菌落(图 1A), 在 SS 平板上形成的菌落呈黑色(图 1B), 革兰氏染色阴性, 短杆状。

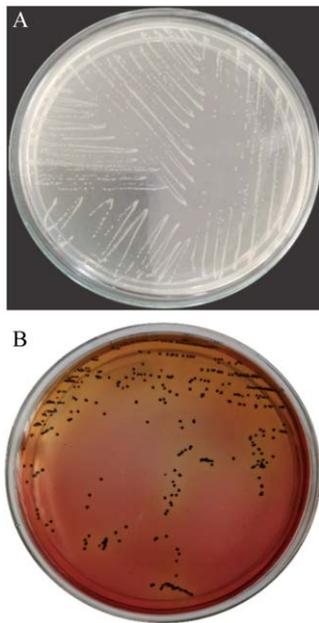


图1 分离菌株 SHL 在 TSA 平板(A)和 SS 平板(B)上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of isolated strain SHL on TSA plate (A) and SS plate (B)

2.2 生理生化鉴定

通过系列微量生化反应管对分离菌株进行鉴定,结果显示分离菌株 SHL 对甘露糖、麦芽糖、鸟氨酸、赖氨酸、甲基红、吲哚和 H_2S 等的反应呈阳性,阿拉伯糖、鼠李糖、蔗糖、纤维二糖、乳糖、邻硝基苯半乳糖苷 (Ortho-Nitrophenyl- β -Galactoside, ONPG)、甘露醇、枸橼酸盐、精氨酸、水杨素、七叶苷、苯丙氨酸和 V-P 反应等呈阴性(表 2),与参照菌株杀鱼爱德华菌 ET883 和迟缓爱德华菌 ATCC 15947 一致,但在 42 °C 生长测试中,SHL 和杀鱼爱德华菌 ET883 均呈阴性,而迟缓爱德华菌 ATCC 15947 为阳性。

2.3 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析

以提取的分离菌株 SHL 的基因组 DNA 为模板,利用引物对 27F/1492F 和 *gyrB*-F/*gyrB*-R 进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳可检测到大小分别约为 1 508 bp 和 1 921 bp 的 PCR 产物条带(图 2),与预期目的片段大小一致。将测得的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列提交至 GenBank (登录号分别为

表 2 菌株 SHL 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains SHL

检测项目 Test items	实验菌株和参照菌株 Experimental strain and reference strains		
	SHL	ET883 ^[10-11]	ATCC 15947 ^[10-11]
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-
甘露糖 Mannitose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	-
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-
邻硝基苯半乳糖苷 ONPG	-	-	-
精氨酸 Arginine	-	-	-
鸟氨酸 Ornithine	+	+	+
赖氨酸 Lysine	+	+	+
七叶苷 Esculin	-	-	-
水杨素 Salicin	-	-	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	-	-	-
甲基红 Methyl Red	+	+	+
V-P 反应 V-P Reaction	-	-	-
吲哚 Indole	+	+	+
硫化氢 Hydrothion	+	+	+
42 °C 生长 Growth at 42 °C	-	-	+

注: ET883: 杀鱼爱德华菌参考菌株; ATCC 15947: 迟缓爱德华菌参考菌株。+: 阳性; -: 阴性

Note: ET883: *Edwardsiella piscicida* reference strain; ATCC 15947: *Edwardsiella tarda* reference strain. +: Positive; -: Negative

MW488931 和 MW525116)并通过 BLAST 进行比对分析,结果均显示菌株 SHL 与杀鱼爱德华菌的同源性最高,相似性分别为 99.93% (16S rRNA 基因)和 99.84% (*gyrB* 基因)。选取部分检索序列进行系统发育学分析,从构建的系统进化树中可以看出,菌株 SHL 与杀鱼爱德华菌自然类聚,与爱德华菌属的其他种类亲缘关系也较近,而与嗜水气单胞菌、溶藻弧菌和无乳链球菌等菌株的亲缘关系则较远(图 3)。

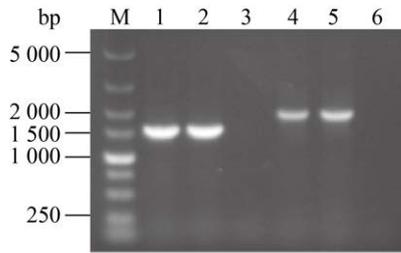


图2 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因的 PCR 产物

Figure 2 PCR products of 16S rRNA gene and *gyrB*

注: M: DL5000 DNA Marker; 1, 2: 菌株 SHL 16S rRNA 基因 PCR 产物; 4, 5: 菌株 SHL *gyrB* PCR 产物; 3, 6: 阴性对照
 Note: M: DL5000 DNA Marker; 1, 2: PCR products of 16S rRNA gene of strain SHL; 4, 5: PCR products of *gyrB* of strain SHL; 3, 6: Negative control

2.4 人工感染试验

根据平板计数结果可知,人工感染的菌液浓度分别为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 CFU/mL。人工感染健康乌鳢后,高浓度实验组在感染第2天即发生急性死亡,3-4 d 为各组发病死亡高峰期,被感染的发病鱼出现与自然发病鱼相似的症状。在为期一周的试验期间,从高到低各感染浓度组的死亡率分别为 100%、85%、50%、20% 和 5%,注射无菌 PBS 的对照组未出现发病或死亡(表 3),根据 Reed-Muench 方法算出菌株 SHL 对乌鳢的 LD_{50} 为 1.6×10^5 CFU/g。从死亡病鱼体内能再

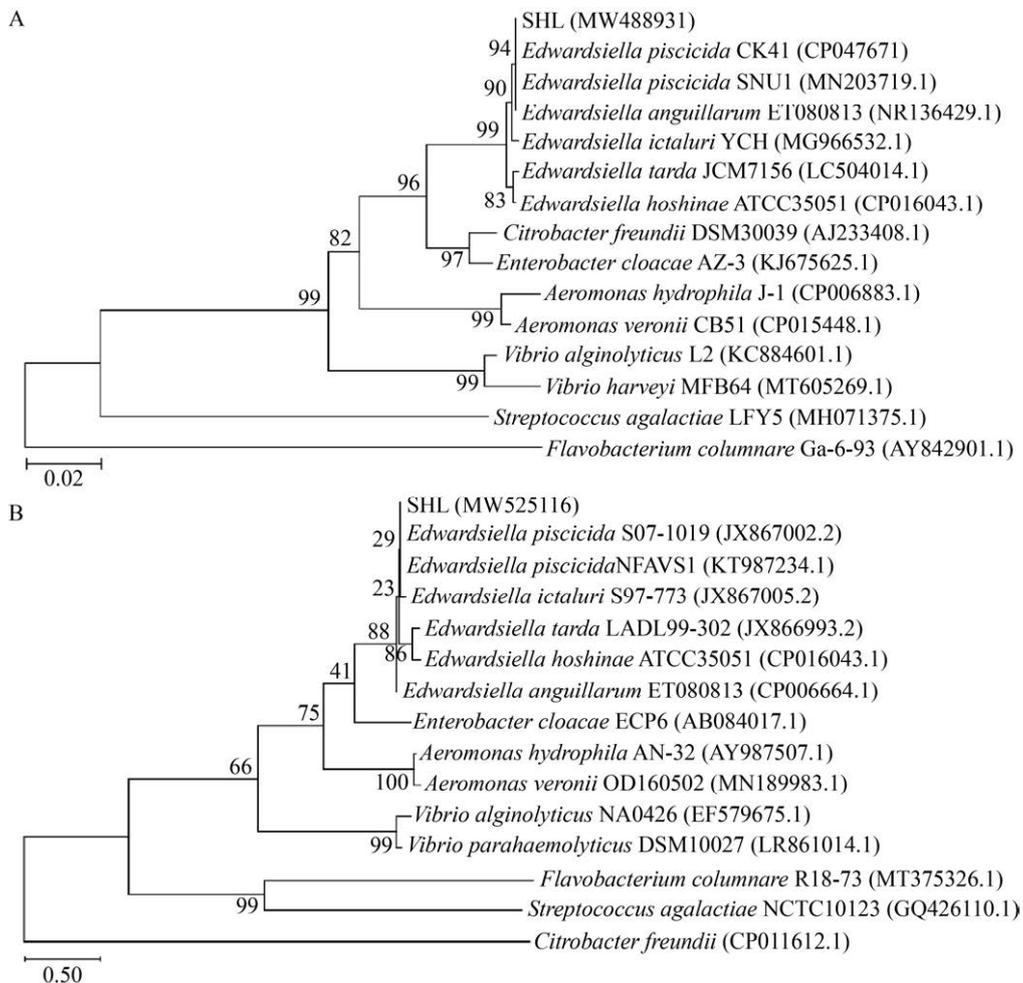


图3 基于 16S rRNA 基因(A)和 *gyrB* 基因(B)序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic trees based on the sequences of the 16S rRNA gene (A) and *gyrB* (B)

注: 括号内的数字为 GenBank 登录号; 节点处的数字为 Bootstrap 值; 标尺下的数字为核苷酸替换率单位

Note: Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values. Numbers under the bar indicated the nucleotide substitution rate units

表 3 分离菌株 SHL 对乌鳢的人工感染试验结果
Table 3 Results of artificial infection of snakeheads by isolated strain SHL

菌液浓度 Bacteria concentration (CFU/mL)	攻毒剂量 Injection dose (μ L)	试验鱼数量 Number of test fish	死亡数 Number of deaths	死亡率 Mortality (%)
1.0×10^9	50	20	20	100
1.0×10^8	50	20	17	85
1.0×10^7	50	20	10	50
1.0×10^6	50	20	4	20
1.0×10^5	50	20	1	5
PBS	50	20	0	0

次分离到细菌,而且形态特征及理化特性等均与攻毒菌株 SHL 完全一致。

2.5 特异性引物检测

采用种属特异性引物对本次发病乌鳢分离菌株、人工感染再分离菌株、收集保存的迟缓爱德华菌和鲷爱德华菌等菌株进行特异性检测,结果显示,发病乌鳢分离菌株 SHL 及人工感染后

再次分离的菌株 SHL-2 可用杀鱼爱德华菌种特异引物 EP-F/EP-R 扩增出 130 bp 的预期特异性条带(图 4A),类杀鱼爱德华菌种特异引物 EPL-F/EPL-R 对所有实验菌株均未能扩增出相应条带(图 4B),而迟缓爱德华菌和鲷爱德华菌的种特异引物 ET-F/ET-R 和 ESC-F/ESC-R 则仅可对迟缓爱德华菌(ET-1 和 ET-13)及鲷爱德华菌(YCH 和 CH01)分别扩增出大小为 114 bp 和 129 bp 的预期条带,对同组的其他菌株则未能扩增出相应条带(图 4C、4D)。

2.6 药敏试验

药敏试验结果显示,菌株 SHL 对苯唑西啉、克拉霉素、万古霉素、克林霉素、复方新诺明和麦迪霉素等 6 种药物呈现耐药,对红霉素为中度敏感,而对其他 28 种测试药物,包括青霉素、大观霉素、氯霉素、四环素、米诺环素、诺氟沙星、多粘菌素 B、呋喃妥因和头孢唑啉等则均为敏感(表 4)。

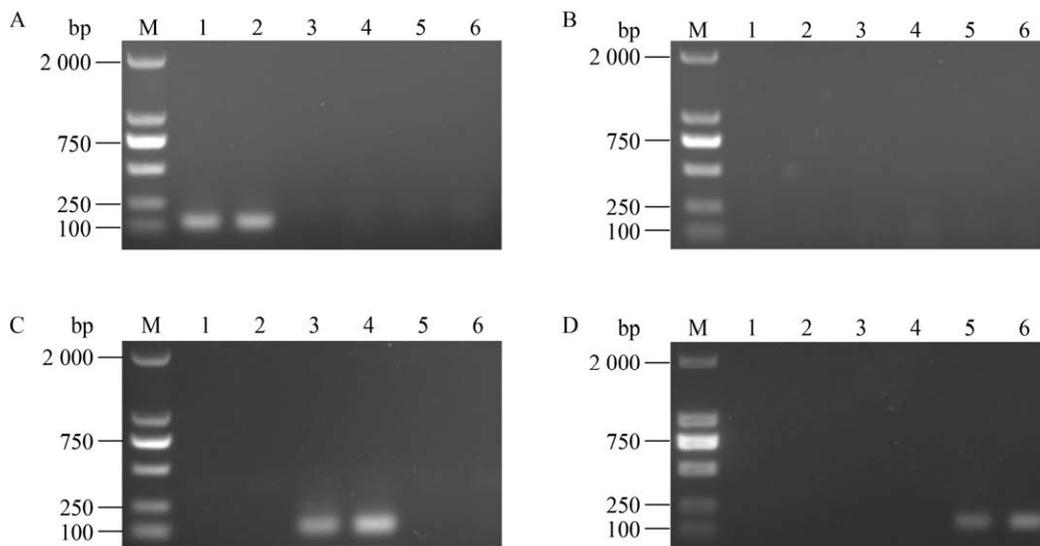


图 4 种特异性引物对爱德华菌分离株的鉴别

Figure 4 Identification of *Edwardsiella* isolates with species-specific primers

注: A: 杀鱼爱德华菌 PCR 检测; B: 类杀鱼爱德华菌 PCR 检测; C: 迟缓爱德华菌 PCR 检测; D: 鲷爱德华菌 PCR 检测。M: DL2000 DNA Marker; 1: SHL; 2: SHL-2; 3: ET-1; 4: ET-13; 5: YCH; 6: CH01

Note: A: PCR detection for *E. piscicida*; B: PCR detection for *E. piscicida*-like; C: PCR detection for *E. tarda*; D: PCR detection for *E. ictaluri*. M: DL2000 DNA Marker; 1: SHL; 2: SHL-2; 3: ET-1; 4: ET-13; 5: YCH; 6: CH01

表 4 菌株 SHL 对 35 种药物的敏感性

Table 4 Sensitivity of strain SHL to 35 drugs

药物 Drugs	含药量 Contents ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	敏感性 Sensitivity
苯唑西林 Oxacillin	1	R
青霉素 Penicillin	10	S
红霉素 Erythromycin	15	I
大观霉素 Spectinomycin	100	S
克拉霉素 Clarithromycin	15	R
万古霉素 Vancomycin	30	R
克林霉素 Clindamycin	2	R
氯霉素 Chloramphenicol	30	S
四环素 Tetracycline	30	S
米诺环素 Minocycline	30	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	S
左氟沙星 Levofloxacin	5	S
多粘菌素 B Polymyxin B	30	S
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	S
氨苄西林 Ampicillin	10	S
氨基糖苷类 Aztreonam	30	S
复方新诺明(SMZ/TMP) Compound Sulfamethoxazole	23.75/1.25	R
头孢唑啉 Cefamezin	30	S
头孢噻吩 Cefalotin	30	S
头孢呋辛 Cefuroxim	30	S
头孢哌酮 Cefoperazone	75	S
头孢噻肟 Cefotaxime	30	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	S
头孢吡肟 Cefepime	30	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	S
头孢西汀 Cefoxitin	30	S
氧氟沙星 Ofloxacin	5	S
链霉素 Streptomycin	10	S
妥布霉素 Tobramycin	10	S
卡那霉素 Kanamycin	30	S
哌拉西林 Piperacillin	100	S
庆大霉素 Gentamycin	10	S
阿米卡星 Amikacin	30	S
麦迪霉素 Midecamycin	30	R

注: S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 不敏感(耐药)

Note: S: Highly sensitive; I: Medium sensitivity; R: Resistant

3 讨论与结论

传统上爱德华菌属包括迟缓爱德华菌、保科爱德华菌和鳎爱德华菌 3 个种, 其中以迟缓爱德华菌的分布和宿主范围最广泛^[12]。基于生化测试和宿主范围的不同, 迟缓爱德华菌可分为野生型

和生物群 1 两个亚群, 前者的生化特征为产硫化氢, 不能利用阿拉伯糖、甘露醇和蔗糖, 与人类和鱼类的感染相关; 后者的特征与前者相反, 见于爬行动物与鸟类^[13-14]。根据基因组序列的相似性又可将迟缓爱德华菌分为 EdwGI 和 EdwGII 这 2 种基因型, EdwGI 型迟缓爱德华菌含有可能促进毒力进化和宿主适应性的相关基因, 如 III 型分泌系统(T3SS)、VI 型分泌系统(T6SS)及铁清除相关基因等, 值得注意的是, 系统发育学显示 EdwGI 和 EdwGII 类群间的种内亲缘关系居然比 EdwGI 或 EdwGII 与鳎爱德华菌的种间亲缘关系要远得多^[15]。

鉴于长期以来迟缓爱德华菌不同来源分离株在表型和遗传特征方面存在的诸多差异^[13,15-17], Abayneh 等于 2013 年在全面比较研究的基础上, 认为鱼源爱德华菌分离株不属于迟缓爱德华菌或爱德华菌属内任何先前建立的分群, 并以分离自欧洲鳎的 ET883 为代表菌株定义了一个新的细菌物种——杀鱼爱德华菌^[11], 对应于上述的 EdwGI 基因型。后来, Griffin 等在利用 *gyrB* 基因对爱德华菌属的分离株进行系统发育分析的基础上, 又进一步将其分为杀鱼爱德华菌和类杀鱼爱德华菌 2 个类群, 这 2 个类群在部分序列和生化特性上存在差异^[8]。Shao 等在杀鱼爱德华菌组内也发现了类似的分界, 不过他们通过对爱德华菌属细菌的多相表型和基因组特征进行分析后, 认为这一独特的类杀鱼爱德华菌应被定义为一个新的爱德华菌物种——鳎爱德华菌(*E. anguillarum* sp. nov.), 这一类细菌分别含有至少 2 组不同的 T3SS 和 3 组 T6SS 基因簇^[18], 以分离自花鳎的 ET080813 为代表菌株。

随着杀鱼爱德华菌作为新种从迟缓爱德华菌中分设, 过去对鱼源迟缓爱德华菌的关注也被相应转移至杀鱼爱德华菌。虽然截至目前尚无杀鱼爱德华菌感染人类的报道, 但 Castro 等对小鼠的人工感染实验显示, 杀鱼爱德华菌可能对一些哺乳动物具有致病性^[19]。被杀鱼爱德华菌感染的鱼类通常

会出现体表溃烂、腹水及内脏器官肿大等症状^[20-22], 与其他一些水生病原菌如嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌和摩氏摩根菌等感染所致疾病的症状具有一定的相似性^[3,13,23], 因此, 在实际养殖过程中不能仅凭发病症状就推定病原, 而是需要根据科赫法则进行病原菌的分离和鉴定。

作为关系密切的 2 个物种, 已有研究显示杀鱼爱德华菌和迟缓爱德华菌之间的生理生化特征差异较小^[10-11], 这一点在本研究中也体现, 在 21 种细菌微量生化反应管测试中, 分离菌株呈现出了与参照菌株杀鱼爱德华菌 ET883 和迟缓爱德华菌 ATCC 15947 相同的鉴定结果, 只是在 42 °C 生长这一测试项目中显现了差异, 这可能与二者的宿主来源不同有关: 分离菌株和杀鱼爱德华菌 ET883 均来源于水生动物, 而迟缓爱德华菌 ATCC 15947 源自人类排泄物^[11]。为克服传统生理生化鉴定的局限性, 本研究对分离菌株的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因进行了克隆及序列分析, 结果显示分离菌株与杀鱼爱德华菌具有高度的同源性。除此之外, 还通过爱德华菌种属特异性引物进行了快速鉴定, 分离菌株可用杀鱼爱德华菌引物 EP-F/EP-R 扩增出 130 bp 的预期特异性条带。综上所述, 本次分离的菌株为杀鱼爱德华菌, 系首次从患病乌鳢中分离到致病性杀鱼爱德华菌, 也是我国首次从淡水鱼类中检出致病性杀鱼爱德华菌, 表明其感染谱在扩大, 值得引起重视。

当前防治鱼类细菌性疾病的常见措施之一仍然是使用抗菌药物。本研究中测试了分离菌株对 35 种抗菌药物的药物敏感性, 结果显示该菌株对青霉素、氯霉素、四环素等 28 种抗菌药物高度敏感, 对红霉素中度敏感, 仅对苯唑西啉、克拉霉素、万古霉素等 6 种药物耐药。这与尚琨等^[24]和毛灿等^[25]的结果不尽相同, 可能与菌株的地域分布及宿主来源不同等因素有关, 因此生产上抗菌药物的选用须参考具体分离菌株的药敏特性, 选用合适的国标渔药进行防治。至于水产养殖中明

令禁止的抗菌药物, 虽不宜用于病害防治, 但可用于研究分离菌株的耐药特性及对菌株进行遗传改造时的抗性筛选。

REFERENCES

- [1] Shu XH, Jin XL, Xiao KY, He SL. Identification and isolation of pathogenic bacteria of snake head's ascitesis[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1998, 24(4): 286-290 (in Chinese)
舒新华, 金燮理, 肖克宇, 贺顺莲. 乌鳢腹水病原的分离和鉴定[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(4): 286-290
- [2] Zeng K, Shu XH, Jin XL, Chen KY, Xiao KY. Studies on pathogen of snake head's putrid skin disease[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1999, 25(5): 395-398 (in Chinese)
曾慷, 舒新华, 金燮理, 陈可毅, 肖克宇. 乌鳢腐皮病致病细菌的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25(5): 395-398
- [3] Yu YC, Wang XB, Peng CY, Zhao QS, Jin S. Pathogenic and hemopathological studies on the skin-ulcerating disease of *Channa argus*[J]. Freshwater Fisheries, 2014, 44(4): 73-76 (in Chinese)
余银春, 王锡波, 彭程远, 赵青松, 金珊. 养殖乌鳢皮肤溃烂病的病原及血液病理研究[J]. 淡水渔业, 2014, 44(4): 73-76
- [4] Wang EL, Wang KY, Chen DF, Wang J, He Y, Liu T. Isolation, identification and drug sensitivity test of causative pathogen of farmed snakehead (*Channa argus*) with visceral sarcoidosis[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(5): 90-98 (in Chinese)
王二龙, 汪开毓, 陈德芳, 王均, 贺扬, 刘韬. 养殖乌鳢内脏结节病的病原分离、鉴定与药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5): 90-98
- [5] Wu YZ, Jian JC, Cai SH. Isolation, identification and pathohistological observation of *Channa argus* infected by *Aeromonas sobria*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(4): 41-45 (in Chinese)
伍元植, 简纪常, 蔡双虎. 乌鳢出血病的病原及组织病理学研究[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(4): 41-45
- [6] Buján N, Toranzo AE, Magariños B. *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2018, 131(1): 59-71
- [7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703
- [8] Griffin MJ, Ware C, Quiniou SM, Steadman JM, Gaunt PS, Khoo LH, Soto E. *Edwardsiella piscicida* identified in the Southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR[J]. Diseases of Aquatic

- Organisms, 2014, 108(1): 23-35
- [9] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493-497
- [10] Ucko M, Colorni A, Dubytska L, Thune RL. *Edwardsiella piscicida*-like pathogen in cultured grouper[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 121(2): 141-148
- [11] Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørum H. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(3): 644-654
- [12] Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(3): 1331-1344
- [13] Park SB, Aoki T, Jung TS. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. Veterinary Research, 2012, 43: 67
- [14] Esteve C, Alcaide E. Seasonal recovery of *Edwardsiella piscicida* wild European eels and natural waters: isolation methods, virulence and reservoirs[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(11): 1613-1623
- [15] Yang MJ, Lv Y, Xiao JF, Wu HZ, Zheng HJ, Liu Q, Zhang YX, Wang QY. *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36987
- [16] Acharya M, Maiti NK, Mohanty S, Mishra P, Samanta M. Genotyping of *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish culture system[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2007, 30(1): 33-40
- [17] Nucci C, Da Silveira WD, Da Silva Corrêa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA, Pestana de Castro AF. Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 89(1): 29-39
- [18] Shao S, Lai QL, Liu Q, Wu HZ, Xiao JF, Shao ZZ, Wang QY, Zhang YX. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(1): 36-47
- [19] Castro N, Magariños B, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE. Pathogenic potential of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot[J]. Fish Pathology, 2011, 46(1): 27-30
- [20] Shafiei S, Viljamaa-Dirks S, Sundell K, Heinikainen S, Abayneh T, Wiklund T. Recovery of *Edwardsiella piscicida* from farmed whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), in Finland[J]. Aquaculture, 2016, 454: 19-26
- [21] Fogelson SB, Petty BD, Reichley SR, Ware C, Bowser PR, Crim MJ, Getchell RG, Sams KL, Marquis H, Griffin MJ. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016, 28(3): 338-344
- [22] Griffin MJ, Reichley SR, Baumgartner WA, Aarattuthodiyil S, Ware C, Steadman JM, Lewis M, Gaunt PS, Khoo LH, Wise DJ. Emergence of *Edwardsiella piscicida* farmed channel ♀, *Ictalurus punctatus* in × blue♂, *Ictalurus furcatus*, hybrid catfish cultured in Mississippi[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2019, 50(2): 420-432
- [23] Yang YB, Song Y, Yang QH, Liu YT, Yang XL, Ai XH. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Morganella morganii* from *Channa argus*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(2): 194-202 (in Chinese)
杨移斌, 宋怿, 杨秋红, 刘永涛, 杨先乐, 艾晓辉. 乌鳢 (*Channa argus*)源摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)的分离、鉴定及药敏特性[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(2): 194-202
- [24] Shang K, Wang B, Liu X, Gao P, Qu LY. Isolation and identification of *Edwardsiella piscicida* from turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Hebei Fisheries, 2019(1): 21-25 (in Chinese)
尚琨, 王斌, 刘欣, 高萍, 曲凌云. 大菱鲆源杀鱼爱德华菌(*Edwardsiella piscicida*)的分离鉴定[J]. 河北渔业, 2019(1): 21-25
- [25] Mao C, Su YL, Li Y, Zhang YQ, Gu QH, Deng YQ, Wang BT, Chen HX, Feng J. Analysis of the relationship between antibiotic resistance and virulence of *Edwardsiella piscicida* strains isolated from *Lateolabrax maculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(7): 846-857 (in Chinese)
毛灿, 苏友禄, 李勇, 张亚秋, 古群红, 邓益琴, 王宝屯, 陈皓祥, 冯娟. 花鲈源杀鱼爱德华菌耐药谱及毒力相关性分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(7): 846-857