



鱼源气单胞菌的毒力基因检测、分型及致病力

刘小芳^{1,2}, 任燕^{1*}, 张德锋¹, 巩华¹,
石存斌¹, 常藕琴¹, 潘厚军¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室,
农业农村部渔用药物创制重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为调查鱼源气单胞菌毒力基因与其致病力的相关性, 以 2009—2018 年从不同患病鱼分离的 173 株气单胞菌为研究对象, 通过检测毒力相关基因、测定溶血活性、腹腔注射感染异育银鲫等方法开展评价。通过管家基因 *gyrB* 分子鉴定结果显示, 173 株气单胞菌中维氏气单胞菌 (119/173, 68.9%) 和嗜水气单胞菌 (50/173, 28.9%) 是主要流行的菌株。10 个毒力基因 *aer* (162/173, 93.64%)、*act* (131/173, 75.72%)、*ast* (55/173, 31.79%)、*alt* (58/173, 33.53%)、*lip* (152/173, 87.86%)、*exu* (154/173, 89.02%)、*fla* (143/173, 82.66%)、*gcaT* (148/173, 85.55%)、*eprCAI* (41/173, 23.70%) 和 *ahyB* (51/173, 29.48%) 普遍存在于 173 株气单胞菌中。依据检测到的毒力基因数量从多到少分布情况, 这些菌株可分为 7 大类 (I~VII) 53 个毒力基因型。大部分嗜水气单胞菌检测到 8~10 个毒力基因, 主要分布于 I、II 和 III 类基因型; 维氏气单胞菌的 *eprCAI*、*ahyB*、*ast* 和 *alt* 等 4 个毒力基因检测率低, 主要分布于 IV、V 和 VI 类基因型。大部分气单胞菌 (94.22%, 163/173) 具有溶血活性。代表性毒力基因型的 38 株维氏气单胞菌和 20 株嗜水气单胞菌腹腔注射异育银鲫攻毒结果显示, 3.0×10^6 CFU/尾的剂量下, 3 株维氏气单胞菌使鲫死亡率达 80%~100%, 16 株嗜水气单胞菌使鲫死亡率达 90%~100%。研究表明, 维氏气单胞菌是目前最主要流行的气单胞菌, 但其检测到的毒力基因普遍少于嗜水气单胞菌, 且对异育银鲫的致病力普遍弱于嗜水气单胞菌。本研究能够为气单胞菌败血症的流行病学调查和疫苗研究提供理论依据。

关键词: 气单胞菌; 毒力基因; 致病性; 患病鱼

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

气单胞菌 (*Aeromonas*) 是革兰氏阴性菌, 广泛存在于土壤、淡水及海水等环境中, 是人 (*Homo sapiens*)、兽以及水产动物共患条件致病菌, 其引起的运动性气单胞菌败血症 (motile aeromonad septicemia, MAS) 可造成养殖鱼类巨

大的经济损失^[1]。具有致病性的气单胞菌主要有维氏气单胞菌 (*A. veronii*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) 和达卡气单胞菌 (*A. dhakensis*) 等^[2], 近年来维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌作为条件致病菌引起淡水鱼类

收稿日期: 2020-03-05 修回日期: 2020-06-20

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900102); 国家大宗淡水鱼产业技术体系 (CARS-45); 广州市科技计划项目 (201904020004); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020XT0405)

第一作者: 刘小芳 (照片), 从事水产动物免疫与病害防控研究, E-mail: liushine1113@163.com

通信作者: 任燕, E-mail: renyannj@126.com



细菌性败血症的病例逐渐增多^[3-4]。在淡水养殖中气单胞菌主要危害异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[5-6]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[7]、鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*)^[8-9]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[10-11]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[12] 及金鱼 (*C. auratus*)^[13] 等, 引发鱼类免疫力下降、出血、腹水、眼球突出及肠炎等症状^[14]。

有研究表明, 气单胞菌的毒力基因是判断其致病性的重要指标, 而多种毒力基因的协同作用能够直接或者间接增强其致病性^[15-17]。本研究中, 以 2009—2018 年从不同省市养殖池塘、不同种类患病鱼中分离的 173 株气单胞菌为研究对象, 检测气单胞菌的气溶素基因 (*aer*)、热不稳定性细胞兴奋性肠毒素基因 (*alt*)、热稳定性细胞兴奋性肠毒素基因 (*ast*)、细胞毒性肠毒素基因 (*act*)、脂肪酶基因 (*lip*)、脱氧核糖核酸酶基因 (*exu*)、甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因 (*gcaT*)、弹性蛋白酶基因 (*ahyB*)、鞭毛蛋白基因 (*fla*) 和温度敏感性蛋白酶基因 (*eprCAI*) 等 10 个毒力相关基因的分布情况, 同时进行毒力基因分型。本实验选取不同基因型的菌株通过腹腔注射攻毒异育银鲫, 观察记录其死亡情况, 旨在研究气单胞菌的毒力基因分布状况及其致病力间的差异, 为气单胞菌败血症的流行病学调查及免疫防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株为 2009—2018 年从不同患病鱼分离的 173 株气单胞菌, 存于 -80 °C 备用。其中嗜水气单胞菌 NJ-35 由南京农业大学刘永杰教授赠送, 其他 172 株由本研究室分离、鉴定和保存。异育银鲫购自广州南沙某养殖场, 平均体长 9.1 cm、体质量 8.53 g。脑心浸出液体培养基 (BHI)、5% 绵羊血琼脂平板购自北京陆桥技术股份有限公司; 2×*Taqmix*、细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。PCR 仪、凝胶电泳成像仪为美国 BIO-RAD 公司。

1.2 细菌基因组提取

将 173 株气单胞菌接种于 BHI 液体培养基进行活化, 28 °C 摇床过夜培养 20 h, 取 1.5 mL

新鲜菌液离心获得菌体细胞, 按照细菌基因组试剂盒方法提取 DNA, 存于 -20 °C 备用。

1.3 *gyrB* 管家基因的扩增与测序

参照 Yáñez 等^[18] 的方法扩增气单胞菌 *gyrB*。上下游引物分别为 *gyrB*-F: 5'-TCCGGCGGTCTGCACGGCGT-3' 和 *gyrB*-R: 5'-TTGTCCGGGTTGTACTCGTC-3'。反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、59 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 由广州艾基生物技术有限公司完成产物纯化及测序。将所得序列使用 Blast 在线分析与已知序列的同源性进行比对分析, 并使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.4 *aer* 等 10 个毒力相关基因检测及分型

参照任燕等^[16]、Nawaz 等^[17] 的引物和 PCR 扩增程序, 检测 *aer*、*act*、*fla*、*lip*、*gcaT*、*exu*、*ast*、*alt*、*eprCAI* 和 *ahyB* 等 10 个毒力相关基因。引物由广州艾基生物技术有限公司合成, PCR 扩增条件稍有改动。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min (表 1)。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。分别随机挑选数个阳性产物交由广州艾基生物技术有限公司测序, 使用 Blast 在线分析测序结果。

1.5 溶血性测定

将 173 株气单胞菌分别划线接种于 5% 绵羊血营养平板上, 28 °C 培养 24 h, 观察有无溶血活性。

1.6 腹腔注射感染异育银鲫

依据“*aer* 等 10 个毒力相关基因检测及分型”部分毒力基因检测结果, 按照检测到的毒力基因数量选取不同毒力基因型的气单胞菌, 毒力基因型相同的则选择不同分离年份和分离对象的气单胞菌, 通过鱼体攻毒实验评估气单胞菌致病性强弱。菌株经 5% 绵羊血细胞平板活化 22 h, 用接种环刮取适量菌苔, 用 0.65% 盐水将细菌悬浮并调整浓度为 1.5×10^7 CFU/mL。每株菌攻毒 20 尾鲫, 每尾鲫腹腔注射 0.2 mL。对照组 20 尾, 每尾腹腔注射 0.2 mL 生理盐水。注射前停喂饲料 1 d。注射后水温控制在 (28 ± 0.5) °C, 每天观察并记录鲫的累计死亡情况, 连续观察记录 7 d。

表 1 10 个毒力相关基因的引物

Tab. 1 The primer sequences used for amplification of different virulence genes

目的基因 target gene	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/°C Tm	片段大小/bp product size
<i>act</i>	F: AGAAGGTGACCACCACCAAGAACA R: AACTGACATCGGCCTTGAATC	65	232
<i>ast</i>	F: TCTCCATGCTTCCCTTCCACT R: GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	63	331
<i>alt</i>	F: TGACCCAGTCCTGGCACGGC R: GGTGATCGATCACCACCAGC	64	442
<i>aer</i>	F: CCTATGGCCTGAGCGAGAAG R: CCAGTTCAGTCCCACCACT	63	431
<i>fla</i>	F: TCCAACCGTYTGACCTC R: GMYTGGTTGCGRATGGT	55	608
<i>gcaT</i>	F: CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG R: GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT	65	237
<i>ahyB</i>	F: ACACGGTCAAGGAGATCAAC R: CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	59	513
<i>exu</i>	F: (A/G)GACATGCACAACCTCTTCC R: GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA(C/G)	61	323
<i>lip</i>	F: CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG R: GT(A/G)CCGAACCAAGTCGGAGAA	63	247
<i>eprCAI</i>	F: GCTCGACGCCAGCTCACC R: GGCTCACCGCATTTGGATTCTG	63	389

2 结果

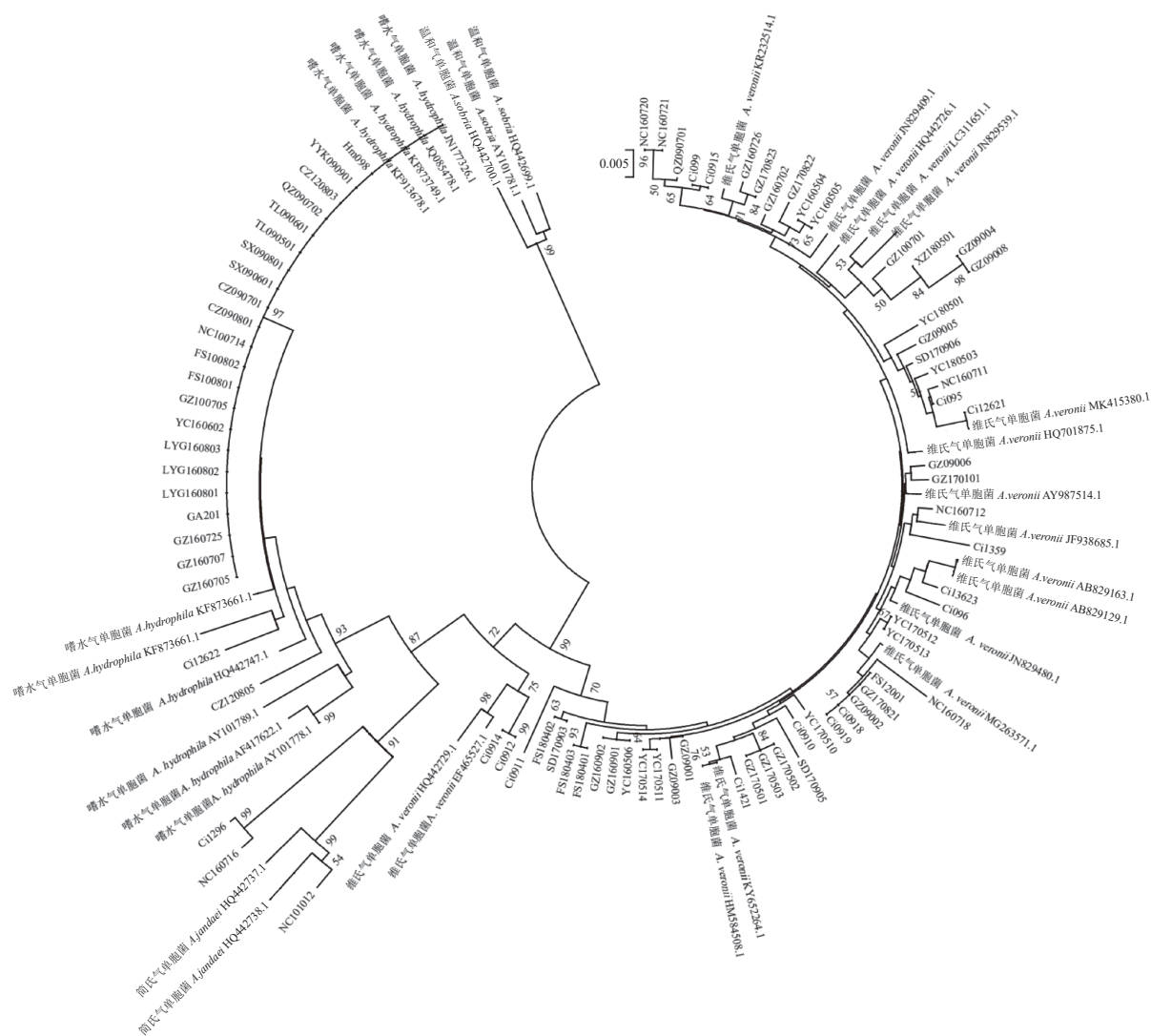
2.1 气单胞菌管家基因 *gyrB* 序列分析

gyrB 管家基因测序并构建进化树，分析结果显示，173 株气单胞菌主要是维氏气单胞菌 (68.9%, 119/173)，其次为嗜水气单胞菌 (28.9%, 50/173)，简氏气单胞菌仅 4 株 (图 1)。可见，目前维氏气单胞菌已是危害水产养殖鱼类的主要气单胞菌。

2.2 10 种毒力基因分布及分型

173 株气单胞菌 10 个毒力基因的分布情况为 *aer*(162/173, 93.64%)、*act*(131/173, 75.72%)、*ast*(55/173, 31.79%)、*alt*(58/173, 33.53%)、*lip*(152/173, 87.86%)、*exu*(154/173, 89.02%)、*fla*(143/173, 82.66%)、*gcaT*(148/173, 85.55%)、*eprCAI*(41/173, 23.70%) 和 *ahyB*(51/173, 29.48%)。其中 119 株维氏气单胞菌中的分布情况为 *aer*(116/119, 96.64%)、*act*(112/119, 94.12%)、*ast*(7/119, 5.88%)、*alt*(24/119, 20.17%)、*lip*(100/119, 84.03%)、*exu*(110/119, 92.44%)、*fla*(91/119, 76.47%)、*gcaT*(98/119, 82.35%)、*eprCAI*(0/119, 0%) 和 *ahyB*(19/119, 15.13%)；50 株嗜水气单胞菌检测结果为 *aer*(45/50, 90%)、*act*(31/50, 62%)、*ast*(46/50, 92%)、*alt*(33/50, 66%)、*lip*(48/50, 96%)、*exu*(46/50, 92%)、*fla*(49/50, 98%)、*gcaT*(49/50, 98%)、*eprCAI*(40/50, 98%) 和 *ahyB*(32/50, 64%)。

可见，*aer* 在维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌中检出率均超过 90%；维氏气单胞菌中肠毒素基因 (*ast* 和 *alt*) 和蛋白酶基因 (*eprCAI* 和 *ahyB*) 检出率低于嗜水气单胞菌，其中 *eprCAI* 在嗜水气单胞菌中检出率达 98%，但在 119 株维氏气单胞菌中未检测到。依据检测到毒力基因的数量和种类分布情况，173 株气单胞菌可被分为 7 大类 (I~VII)53 个基因型，其中检测到 10 个毒力基因的 11 株为 I 类 (6.37%, 11/173)，9 个毒力基因的 16 株为 II 类，共 5 个基因型组合 (9.25%, 16/173)，8 个毒力基因的 16 株为 III 类，共 9 个基因型组合 (9.25%, 16/173)，7 个毒力基因的 31 株为 IV 类，共 8 个基因型组合 (17.92%, 31/173)，6 个毒力基因的 47 株为 V 类，共 7 个基因型组合 (27.17%, 47/173)，5 个毒力基因的 31 株为 VI 类，共 8 个基因型组合 (17.92%, 31/173)，4 个及以下毒力基因的 21 株为 VII 类，共 15 个基因型 (12.14%, 21/173)。50 株嗜水气单胞菌分为 19 个毒力基因型，大部分归于毒力基因较多的 I、II 和 III 类，119 株维氏气单胞菌分为 34 个基因型，主要分布在 IV、V 和 VI 类中；通过比较嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌的差异基因，结果显示，维氏气单胞菌大部分菌株同时缺少 *eprCAI*、*ahyB* 和 *ast(alt)* 等 3 种以上的毒力基因。可见，嗜水气单胞菌检测到的毒力基因普遍比维氏气单胞菌多，且气单胞菌菌株间毒力基因分布呈现多态性。

图 1 部分气单胞菌 *gyrB* 系统发育树Fig. 1 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of *Aeromonas* spp.

2.3 溶血活性检测

气单胞菌划线接种于 5% 绵羊血营养平板, 经 28 °C 培养 24 h 观察发现, 大部分菌株 (94.22%, 163/173) 能完全裂解绵羊血红细胞, 即在菌落或菌苔周围呈现清晰的溶血环, 且嗜水气单胞菌产生的溶血环直径较维氏气单胞菌普遍大。仅 10 株菌 (7 株维氏气单胞菌, 3 株嗜水气单胞菌) 不能裂解绵羊血红细胞, 即不具有溶血活性。结果表明, 从患病鱼分离的大部分气单胞菌能够产生溶血活性物质, 且嗜水气单胞菌的溶血活性较维氏气单胞菌更强。

2.4 腹腔注射攻毒实验

20 株不同毒力基因型的嗜水气单胞菌液通

过腹腔注射方式对异育银鲫进行攻毒实验, 结果显示, 毒力基因型分别为 I、II-1、II-3、II-5、III-1、III-2、III-3、III-5、IV-1 和 IV-2 的 16 株嗜水气单胞菌在攻毒 12~24 h 内对鲫的致死率均为 90%~100%, 且濒死或刚死亡实验鱼的头部、腹部出血症状比维氏气单胞菌严重, 但 NJ-35(I)、Ci13623(III-8)、GA201(V-3) 和 Ci12622(VII-15) 4 株嗜水气单胞菌未引起鲫死亡。仅缺少 *ahyB*、*act* 和 *aer* 其中一个毒力基因的 II 类基因型并不影响嗜水气单胞菌的强致病性, 同时缺少 *aer* 和 *act* (*fla*)、*alt* 和 *ahyB* (*act*) 2 种毒力基因的 III 类基因型 (III-1、III-2、III-3 和 III-5) 的嗜水气单胞菌致病性也很强, IV 类基因型 (IV-1、IV-2) 中缺 *act*、*alt* 和 *exu* (*ahyB*) 等 3 个毒力基因的嗜水气单胞菌

致病性仍未下降。38株维氏气单胞菌大部分同时缺少 *eprCAI*、*ahyB* 和 *ast* (*alt*) 等3种以上的毒力基因, 仅4株引起鲫死亡, 分别含有5、6和7种毒力基因的 XZ180501(IV-5)、YC170511(V-1) 和 GZ09007(VI-1) 在攻毒30 h内使鲫死亡率达到80%~100%, 而毒力基因型为Ⅲ-8、Ⅳ-4、Ⅳ-5、Ⅳ-7、Ⅴ-4、Ⅵ-2、Ⅵ-4、Ⅵ-6、Ⅵ-7、Ⅶ-3、Ⅶ-5、Ⅶ-6、Ⅶ-13、Ⅶ-14、Ⅶ-15、Ⅳ-5、Ⅴ-1和Ⅵ的其他34株攻毒组无死亡(表2)。可见, 嗜水气单胞菌菌株比维氏气单胞菌普遍致病力强。

3 讨论

目前使用16S *rRNA* 以及管家基因鉴定气单胞菌已经成为最常用、有效的方法, 但由于16S *rRNA* 在不同种属之间具有高度保守性, 只能区别几个核苷酸, 无法准确将气单胞菌鉴定到种。研究表明, 利用管家基因(*cpn60*、*dnaJ*、*gyrB* 和 *rpoB*) 鉴定气单胞菌是一种高分辨率的分子方法, Yáñez 等^[18] 和 Hu 等^[19] 通过 *gyrB* 序列进行系统发育分析, 有效地将气单胞菌鉴定到种。本实验通过构建 *gyrB* 序列系统发育树, 确定173株气单胞菌主要是维氏气单胞菌(68.9%, 119/173), 其次为嗜水气单胞菌(28.9%, 50/173), 这与其他研究结果一致, 维氏气单胞菌是鱼源气单胞菌的主要流行菌株, 是鲤科鱼类气单胞菌败血症的主要病原^[19-21]。Hossain 等^[22] 使用管家基因 *gyrB* 鉴定65株气单胞菌, 结果显示, 维氏气单胞菌所占比例较多, 是主要流行病原菌。可见, 目前维氏气单胞菌已成为淡水鱼类细菌性败血症的主要流行病原。

气单胞菌的致病性与其分泌大量毒力因子(外毒素、胞外蛋白酶和黏附素)有关, 毒力基因分布情况不同的菌株对鱼体致病性存在差异^[23]。气单胞菌外毒素中, 气溶素(Aer)具有溶血活性、细胞毒性, 能够改变细胞膜的通透性, *aer* 缺失株浸泡感染斑马鱼(*Danio rerio*)的死亡率明显下降, *aer* 是维氏气单胞菌致病性的关键毒力基因^[21]。本研究中 *aer* 在气单胞菌中的检测率达到93.64%, 占比最高, 与 El-Bahar 等^[24] 研究结果一致, 但 *aer* 检测的有无并不能判断气单胞菌致病性的强弱, 在5%绵羊血琼脂平板上, 具有 *aer* 的部分菌株并未出现溶血现象, 推测 *aer* 可能与其他毒力基因相互协同作用才能增强气单胞菌的致病性。肠毒素(Act/Ast/Alt)具有溶血性、细

胞毒性, 可裂解细胞和损坏组织, 引发鱼源出血和败血等症状。而 *ast* 和 *alt* 在维氏气单胞菌中检出率低, 这可能是其致病力弱的一个原因。气单胞菌产生的各种酶在其致病性中也发挥重要功能, 尤其是胞外蛋白酶(ECPase)。胞外蛋白酶种类较多, 能够裂解宿主细胞, 为细菌生长提供营养物质。本研究中 *eprCAI* 和 *ahyB* 在维氏气单胞菌检测到的比例低, 且119株维氏气单胞菌中均未检测到, 与 Sun 等^[25] 检测结果不同。98%嗜水气单胞菌 *eprCAI* 检测呈阳性, 这与任燕等^[16] 的检测结果一致。这2种基因的缺失可能造成维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌毒力存在差异, 但有待进一步研究。GcaT、Lip 和 Exu 这些酶类在激活气单胞菌的气溶素活性、增强细菌在宿主细胞中的黏附能力及降解宿主细胞成分等方面具有重要作用^[17]。在本研究中 *gcaT*、*lip* 和 *exu* 的阳性检测率分别达到87.86%、85.55%和89.20%, 这与 Hossain 等^[22] 在气单胞菌中的检测率结果基本一致。鞭毛蛋白(Fla)参与形成气单胞菌生物膜的形成, 增强其致病性和抗性^[26], 是一种黏附因子, 也是判断气单胞菌致病性强弱的指标之一。

研究表明, 气单胞菌携带不同毒力因子其致病性具有差异, 气单胞菌的致病性和毒力基因型具有相关性^[18-19, 24]。Zhang 等^[27] 认为随着气单胞菌含有毒力基因数量的降低, 气单胞菌的致病性降低, 毒力基因型为 *aer*⁺*act*⁺*ser*⁺*exu*⁺*lip*⁺*LuxS*⁺*aha*⁺ 的气单胞菌, 半数致死量(LD₅₀)明显低于少于7个毒力的半数致死量。毒力基因型为 *aer*⁺*alt*⁺*act*⁺*eprCAI*⁺*ahp*⁺ 的气单胞菌比其他菌株对斑马鱼的毒力更强^[19], 同时携带 *aer* 和 *act* (*hly*) 的毒力基因型 *act*⁺*aer*⁺*hly*⁺*ast* 或 *act*⁺*aer*⁺*hly*⁺*ast* 的嗜水气单胞菌对尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)的致病力高于无毒力基因的或者1个毒力基因的菌株, 其致病力与含有毒力基因的数量有关^[24]; 嗜水气单胞菌对黄沙鳖(中华鳖地方种, *Pelodiscus sinensis*)的致病力是多个毒力基因共同作用的结果, *hly* 和 *act* 是重要的毒力基因, *alt* 和 *ahal* 对菌株的致病力与其他毒力基因之间存在协同作用^[28]。*act*、*ast*、*alt*、*hly* 和 *aer* 等5个毒力基因与嗜水气单胞菌致病性呈正相关^[29]。本研究用于攻毒的菌株中, 大多数嗜水气单胞菌(15/20)具有8~10个毒力基因(I~Ⅲ毒力基因型), 除 NJ35 和 Ci13623

表 2 不同毒力基因型维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌对异育银鲫的致病力

Tab. 2 The pathogenicity of *A. veronii* and *A. hydrophila* strains with different virulence genotypes to *C. auratus gibelio*

	毒力基因型 virulence genotype	菌株 strain	菌种 species	分离地点 isolated area	宿主 host	攻毒尾数 challenged number	死亡数/尾 dead number	死亡率/% mortality
I	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci001	嗜水气单胞菌	广东	草鱼	20	0	0
			<i>A. hydrophila</i>	Guangdong	<i>C. idella</i>			
I	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Hn099	嗜水气单胞菌	广东	鳊	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Guangdong	<i>H. nobilis</i>			
I	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	TL090601	嗜水气单胞菌	安徽	鲫	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Anhui	<i>C. auratus</i>			
I	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	NJ-35	嗜水气单胞菌	江苏	鲫	20	0	0
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>C. auratus</i>			
I	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	YYK090901	嗜水气单胞菌	广东	鳊	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Guangdong	<i>H. nobilis</i>			
II-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	CZ090801	嗜水气单胞菌	江苏	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>M. amblycephala</i>			
II-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	QZ090702	嗜水气单胞菌	浙江	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Zhejiang	<i>M. amblycephala</i>			
II-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	CZ120803	嗜水气单胞菌	江苏	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>M. amblycephala</i>			
II-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Cyc102	维氏气单胞菌	广东	锦鲤	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>C. carpio</i> var. <i>koi</i>			
II-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	CZ090701	嗜水气单胞菌	江苏	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>M. amblycephala</i>			
II-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	LYG160803	嗜水气单胞菌	江苏	异育银鲫	20	18	90
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>C. auratus gibelio</i>			
III-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	LYG160801	嗜水气单胞菌	江苏	异育银鲫	20	18	90
			<i>A. hydrophila</i>	Jiangsu	<i>C. auratus gibelio</i>			
III-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci1364	嗜水气单胞菌	湖北	草鱼	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Hubei	<i>C. idella</i>			
III-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	SX090601	嗜水气单胞菌	浙江	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Zhejiang	<i>M. amblycephala</i>			
III-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci13616	嗜水气单胞菌	湖北	草鱼	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Hubei	<i>C. idella</i>			
III-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci13636	嗜水气单胞菌	湖南	草鱼	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Hunan	<i>C. idella</i>			
III-8	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci13623	嗜水气单胞菌	湖南	草鱼	20	0	0
			<i>A. hydrophila</i>	Hunan	<i>C. idella</i>			
IV-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci14816	嗜水气单胞菌	广西	草鱼	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Guangxi	<i>C. idella</i>			
IV-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci13511	嗜水气单胞菌	广东	草鱼	20	18	90
			<i>A. hydrophila</i>	Guangdong	<i>C. idella</i>			
IV-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	MaY13633	嗜水气单胞菌	湖南	团头鲂	20	20	100
			<i>A. hydrophila</i>	Hunan	<i>M. amblycephala</i>			
IV-4	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci1359	维氏气单胞菌	山西	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Shanxi	<i>C. idella</i>			
IV-4	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	GZ170101	维氏气单胞菌	广东	鲫	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>C. auratus</i>			
IV-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Hm0913	维氏气单胞菌	广东	鲢	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>H. molitrix</i>			
IV-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci1407	维氏气单胞菌	湖南	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Hunan	<i>C. idella</i>			
IV-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci1426	维氏气单胞菌	湖南	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Hunan	<i>C. idella</i>			
IV-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	YC170511	维氏气单胞菌	江苏	鲫	20	20	100
			<i>A. veronii</i>	Jiangsu	<i>C. auratus</i>			
IV-7	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	FS12001	维氏气单胞菌	广东	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>C. idella</i>			
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci091	维氏气单胞菌	广东	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>C. idella</i>			
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci095	维氏气单胞菌	江西	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Jiangxi	<i>C. idella</i>			
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁺exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	Ci002	维氏气单胞菌	广东	草鱼	20	0	0
			<i>A. veronii</i>	Guangdong	<i>C. idella</i>			

· 续表 2 ·

	毒力基因型 virulence genotype	菌株 strain	菌种 species	分离地点 isolated area	宿主 host	攻毒尾数 challenged number	死亡数/尾 dead number	死亡率/% mortality
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1486	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江西 Jiangxi	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	YC160505	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江苏 Jiangsu	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ160702	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江西 Jiangxi	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ160901	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	LYK090702	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	鲢 <i>H. molitrix</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ170822	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	FS180401	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	XZ180501	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江苏 Jiangsu	草鱼 <i>C. idella</i>	20	16	80
V-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁺</i>	GA201	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
V-4	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1345	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ09007	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	贵州 guizhou	草鱼 <i>C. idella</i>	20	16	80
VI-1	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci092	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江西 Jiangxi	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci0915	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江西 Jiangxi	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	FS180402	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-2	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	YC180501	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江苏 Jiangsu	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-4	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1410	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖南 Hunan	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-4	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci13630	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖南 Hunan	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci13643	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖南 Hunan	草鱼 <i>C. idella</i>	20	4	20
VI-6	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1275	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VI-7	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	YC160504	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	江苏 Jiangsu	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Hm0911	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	鲢 <i>H. molitrix</i>	20	0	0
VII-3	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1368	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖北 Hubei	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-5	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1408	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖南 Hunan	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-6	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci1299	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	广东 Guangdong	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-6	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ09002	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	贵州 guizhou	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-13	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci13622	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	湖南 Hunan	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-14	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	GZ09003	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	贵州 Guizhou	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0
VII-15	<i>aer⁺act⁺fla⁺lip⁺gcaT⁻exu⁺ast⁺alt⁺eprCAI⁺ahyB⁻</i>	Ci12622	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	湖北 Hubei	草鱼 <i>C. idella</i>	20	0	0

外, 其毒力强于 92% 的维氏气单胞菌 (35/38)。38 株维氏气单胞菌中仅 4 株引起鲫死亡, 分别含有 5、6 和 7 种毒力基因的 XZ180501(IV-5)、YC170511(V-1) 和 GZ09007(VI-1) 菌株在攻毒 30 h 内对鲫

的致死率达到 80% 以上, 而具有相同或更多数量毒力基因的其他维氏气单胞菌未引起鲫发病或死亡, 维氏气单胞菌中的这种现象有待进一步研究。

攻毒的 20 株嗜水气单胞菌主要来自 2009—2013 年患败血症的鲫、草鱼、团头鲂和鳊, 38 株维氏气单胞菌分离自 2009—2018 年患病的草鱼、鲫和鲢, 从攻毒结果来看, 菌株的分离年份和分离对象对其致病力无明显影响。嗜水气单胞菌与维氏气单胞菌致病力的差异, 一方面可能是嗜水气单胞菌具有更多的毒力基因, 这些毒力基因的表达有协同作用, 另一方面可能与毒力因子的表达量和活性有关。从菌株在 5% 绵羊血平板上生长情况看, 嗜水气单胞菌的溶血环直径普遍比维氏气单胞菌大, 即嗜水气单胞菌的溶血活性比维氏气单胞菌的强。研究发现, 维氏气单胞菌强毒株 GZ09007 对绵羊、兔、草鱼和鲫的血红细胞溶血价比弱毒株 FS12001 更高, 但 GZ09007 的毒力基因少于 FS12001, 推测维氏气单胞菌的致病性可能与相关毒力基因的表达量和蛋白活性有关^[30]。Ran 等^[21]也证实维氏气单胞菌弱毒株 Ci092、Ci093、Ci095 和 Ci098 中 *aer* 的相对表达量显著低于强毒株 Hm091。另外, 人工感染途径也可能是造成菌株毒力差异的重要因素。用连续浸泡方式感染无菌斑马鱼, 发现维氏气单胞菌比嗜水气单胞菌表现出更强的毒力, 且气溶素表达量和活性的差异是引起二者毒力差异的主要因素^[21]。在鱼类的自然感染过程中, 病原菌首先要突破宿主黏膜屏障。腹腔注射使病原菌绕过宿主黏膜屏障, 浸泡感染途径模拟了自然感染, 其所表现的细菌毒力应该更可靠。但目前, 注射感染方式仍是气单胞菌毒力和疫苗免疫效果评价的一种重要途径。

参考文献 (References):

- [1] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] Teunis P, Figueras M J. Reassessment of the enteropathogenicity of mesophilic *Aeromonas* species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1395.
- [3] 郭闯, 王永坤. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. *水产科学*, 2003, 22(6): 48-51.
Guo C, Wang Y K. Advancement in study on *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fisheries Science*, 2003, 22(6): 48-51(in Chinese).
- [4] 吴同垒, 单晓枫, 孟庆峰, 等. 维氏气单胞菌研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2011, 45(7): 41-44.
Wu T L, Shan X F, Meng Q F, *et al.* Advances in *Aeromonas veronii*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(7): 41-44(in Chinese).
- [5] 乔毅, 沈辉, 万夕和, 等. 异育银鲫源嗜水气单胞菌对磺胺类耐药性分析[J]. *水产科学*, 2018, 37(4): 456-463.
Qiao Y, Shen H, Wan X H, *et al.* Drug resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from allogynogenetic silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* to sulfonamides[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(4): 456-463(in Chinese).
- [6] 林溪, 田国明, 朱凝瑜, 等. 浙江地区异育银鲫内脏携带细菌多样性与毒力基因分析[J]. *水产科学*, 2014, 33(12): 785-789.
Lin X, Tian G M, Zhu N Y, *et al.* Detection and diversity analysis of bacteria isolated from viscera of hybridized crassian carp (*Carassius auratus gibelio*) in Zhejiang province[J]. *Fisheries Science*, 2014, 33(12): 785-789(in Chinese).
- [7] 高彩霞, 任燕, 王庆, 等. 草鱼源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(3): 409-415.
Gao C X, Ren Y, Wang Q, *et al.* Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from grass carp[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(3): 409-415(in Chinese).
- [8] Liu X C, Zhang Y M, Li D P, *et al.* Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C[J]. *Food Microbiology*, 2017, 62: 106-111.
- [9] 孙承文, 任燕, 石存斌, 等. 鲢鳊鱼源致病性嗜水气单胞菌的分离、鉴定[J]. *广东农业科学*, 2010, 37(9): 5-8.
Sun C W, Ren Y, Shi C B, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, 37(9): 5-8(in Chinese).
- [10] Zhan F B, Jakovlić I, Wang W M. Identification, characterization and expression in response to *Aeromonas hydrophila* challenge of five interferon regulatory factors in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 204-212.
- [11] Zhang H M, Song C Y, Xie J, *et al.* Comparative proteomic analysis of hepatic mechanisms of *Megalobrama amblycephala* infected by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 339-349.
- [12] Dong H T, Techatanakitarnan C, Jindakittikul P, *et al.* *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

- (L.)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(10): 1395-1403.
- [13] Shameena S S, Kumar K, Kumar S, *et al.* Virulence characteristics of *Aeromonas veronii* biovars isolated from infected freshwater goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734819.
- [14] Ghatak S, Blom J, Das S, *et al.* Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, 109(7): 945-956.
- [15] 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.
- [16] 任燕, 陆承平, 姚火春. 嗜水气单胞菌温敏胞外蛋白酶基因 *eprJ* 的克隆与检测[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 924-928.
- Ren Y, Lu C P, Yao H C. Cloning, sequence analysis and detection of an extracellular temperature-labile protease encoding gene (*eprJ*) from *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 924-928(in Chinese).
- [17] Nawaz M, Khan S A, Khan A A, *et al.* Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(3): 327-331.
- [18] Yáñez M A, Catalán V, Apráiz 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.
- [19] Hu M, Wang N, Pan Z H, *et al.* Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(3): 224-233.
- [20] 张德锋, 刘礼辉, 李宁求, 等. 我国南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征[J]. *水产科学*, 2015, 34(11): 673-682.
- Zhang D F, Liu L H, Li N Q, *et al.* Epidemic characteristics of different species of *Aeromonas* in diseased fish in southern China[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(11): 673-682(in Chinese).
- [21] Ran C, Qin C B, Xie M X, *et al.* *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(9): 3442-3456.
- [22] Hossain S, De Silva B C J, Wimalasena S H M P, *et al.* Characterization of virulence determinants and multiple antimicrobial resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from ornamental goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2019, 29: 51-62.
- [23] 宋明芳, 张东星, 张海鹏, 等. 维氏气单胞菌毒力因子的研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(8): 1038-1042.
- Song M F, Zhang D X, Zhang H P, *et al.* Research advances of virulence factors in *Aeromonas veronii*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(8): 1038-1042(in Chinese).
- [24] El-Bahar H M, Ali N G, Aboyadak I M, *et al.* Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*[J]. *International Microbiology*, 2019, 22(4): 479-490.
- [25] Sun J J, Zhang X J, Gao X J, *et al.* Characterization of virulence properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 496.
- [26] Freire N B, Magalhães T C, Soares R A N, *et al.* Nutritional interference for phenotypic biofilm quantification in *Aeromonas* spp. isolates containing the *fla* gene[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 198-201.
- [27] Zhang D X, Kang Y H, Song M F, *et al.* Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from healthy northern Snakehead (*Channa argus*) in China[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2019, 69(2): 100-109.
- [28] 刘杰, 黄艳华, 黄钧, 等. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 698-706.
- Liu J, Huang Y H, Huang J, *et al.* Studies on the correlation with pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* by *Truogx sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 698-706(in Chinese).
- [29] El-Dein Omar A A, Moustafa E M, Zayed M M. Identification and characterization of virulence-associated genes from pathogenic *Aeromonas hydrophila* strains[J]. *World's Veterinary Journal*, 2016, 6(4): 185-192.
- [30] 任燕, 高彩霞, 曾伟伟, 等. 两株草鱼源维氏气单胞菌菌株的主要表型特征及致病力比较[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(2): 145-150.
- Ren Y, Gao C X, Zeng W W, *et al.* Pathogenicity and main phenotype characteristics of two *Aeromonas veronii* isolated from diseased grass carp[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(2): 145-150(in Chinese).

Detection, genotyping and pathogenicity of virulence genes in *Aeromonas* species isolated from diseased freshwater fish

LIU Xiaofang^{1,2}, REN Yan^{1*}, ZHANG Defeng¹, GONG Hua¹,
SHI Cunbin¹, CHANG Ouqin¹, PAN Houjun¹

(1. Key Lab of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Key Lab of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese

Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

Abstract: *Aeromonas* spp. are gram-negative bacteria that can infect a variety of aquatic and terrestrial animals, including humans and cause motile aeromonad septicemia. The prevalence of *Aeromonas* spp. in various water and food sources poses a significant public health threat. *Aeromonas* spp. encompass a diversity of strains or genotypes with varying pathogenic potentials. Many strains are pathogenic, but others are avirulent and produce little harm to the host. The availability of methods to assess the pathogenic potential of *Aeromonas* spp. would contribute to the improved control and prevention strategies for this bacterial infection. An approach to the direct detection of potentially pathogenic *Aeromonas* spp. is the use of virulence determinants as genetic markers. To investigate the correlation between virulence genes and pathogenicity of *Aeromonas* spp., 173 strains of *Aeromonas* were isolated from different diseased freshwater fish from 2009 to 2018 as the research object. Virulence genes including *aer*, *act*, *fla*, *lip*, *gcaT*, *exu*, *ast*, *alt*, *eprCAI* and *ahyB* were detected and the bacterial pathogenicity with different virulence genotypes was assessed through intraperitoneal (IP) injection challenged *Carassius auratus gibelio* (gibel carp). Molecular identification revealed that *A.veronii* (119/173, 68.8%) and *A.hydrophila* (50/173, 28.9%) were the prevalent species based on *gyrB* gene sequencing. The distribution of 10 virulence genes including *aer* (162/173, 93.64%), *act* (131/173, 75.72%), *ast* (55/173, 31.79%), *alt* (58/173, 33.53%), *lip* (152/173, 87.86%), *exu* (154/173, 89.02%), *fla* (143/173, 82.66%), *gcaT* (148/173, 85.55%), *eprCAI*(41/173, 23.70%) and *ahyB* (51/173, 29.48%) were determined and these strains were sorted into 7 clusters (I -VII) and formed 53 genotypes according to the virulence distribution profile. 8-10 virulence genes were present in 24.86% (43/173) *Aeromonas* strains, among which 38 strains were identified as *A. hydrophila* and 4 strains *A.veronii*. The *eprCAI* (0/119, 0%), *ahyB* (19/119, 15.13%), *ast* (7/119, 5.88%) and *alt* (24/119, 20.17%) genes were detected from the *A.veronii* isolates. Most of the *Aeromonas* strains (94.22%, 163/173) had hemolytic activity. At the challenge dose of 3.0×10^6 CFU per fish, 3 strains of *A.veronii* (IV-5, V-1 and VI genotype) and 16 strains of *A.hydrophila* (I, II-1, II-3, II-5, III-1, III-2, III-3, III-5, IV-1 and IV-2 genotype) were highly pathogenic and the mortality reached 80%-100%. The study suggested that *A.veronii* was the most prevalent species in the diseased fish. *A.veronii* isolates had fewer virulence genes and lower pathogenicity than *A.hydrophila* ones. The result may provide reference for epidemiological investigation of motile aeromonad septicemia and vaccine research.

Key words: *Aeromonas* spp.; virulence gene; pathogenicity; diseased fish

Corresponding author: REN Yan. E-mail: renyannj@126.com

Funding projects: National Key R&D Program of China(2019YFD0900102); China Agriculture Research System (CARS-45); Guangzhou Science and Technology Program (201904020004); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2020XT0405)