

DOI: 10.12264/JFSC2020-0281

一株分离自团头鲂的嗜水气单胞菌病原学及其与 ST251 型菌株的全基因组比较

王超杰¹, 王至诚¹, 康兴宇¹, 黎洁¹, 刘乃瑜¹, 王卫民¹, 罗毅^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;
2. 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为确定湖北仙桃一团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)专养池塘的发病病原体及病原特征, 并从全基因组层面初步分析该病原菌的毒力和耐药特征, 本研究从患病团头鲂的肝脏分离得到一株病原菌 LHW39, 经理化性状及 16S rRNA 鉴定, 表明 LHW39 为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。多序列分型结果显示 LHW39 属于嗜水气单胞菌 ST251 型克隆群, 该克隆群是导致中国和美国地区鱼类暴发气单胞菌败血症(motile *Aeromonas* septicemia, MAS)的流行菌株群。回归感染实验证实菌株 LHW39 是引起本次团头鲂患病的病原菌; LHW39 对斑马鱼(*Danio rerio*)的半致死剂量为 1.55×10^5 CFU/尾, 表明 LHW39 为高毒力菌株。药敏实验显示, LHW39 对头孢噻吩耐药。全基因组测序结果发现, LHW39 全基因组大小为 5099855 bp, GC 含量为 60.80%, 共预测到 4572 个编码序列(CDS), GenBank 登录号 CP050012。基因组毒力基因比较分析结果显示: LHW39 与其他 ST251 型菌株相似, 基因组中含有丰富的毒力基因, 并且含有 VI 型分泌系统(T6SS); 此外, 聚类热图暗示 ST251 克隆群中菌株毒力相关基因的进化可能与菌株分离的地理位置和感染的宿主存在关联。基因组原噬菌体预测结果显示, LHW39 基因组中含有一个长度为 30.2 kb 的完整原噬菌体 phAHLHW39, 其在 ST251 型菌株中相当保守、并且是 ST251 型菌株所特有。耐药基因分析结果表明, LHW39 中含有抗磺胺类、喹诺酮类、四环素类、头孢类和碳青霉烯类等抗生素的相关基因, 这些基因在 ST251 型菌株中高度保守。本研究对致病性嗜水气单胞菌 LHW39 进行了病原学及全基因组比较分析, 为防控鱼类嗜水气单胞菌感染提供了一定的参考依据。

关键词: 团头鲂; 嗜水气单胞菌; ST251; 全基因组; 毒力; 耐药; 原噬菌体

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)04-0503-14

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是中国独有的一种重要的草食性人工养殖淡水经济鱼类, 因其生长快、适应性强、肉质鲜美、规格适中等优点, 深受中国养殖户的青睐, 在中国市场上需求量较大。在团头鲂人工养殖过程中, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[1]、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)^[2]、皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)^[3]、非霍乱弧菌(non-cholera *Vibrio*)^[4]、肺炎

克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[5]、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)^[6]等病原菌可引起团头鲂大规模细菌性败血症疾病的暴发。其中嗜水气单胞菌是危害团头鲂在内的多个养殖种类最为严重的病原菌^[7]。

嗜水气单胞菌是继发性或条件性致病菌, 是典型的能引起人类-畜类-鱼类共患的病原菌^[8]。嗜水气单胞菌能导致草鱼(*Ctenopharyngodon*

收稿日期: 2020-08-31; 修订日期: 2020-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31570078).

作者简介: 王超杰(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物疾病与防控. E-mail: 1742467881@qq.com

通信作者: 罗毅, 副教授, 研究方向为水产动物疾病与防控. E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn

idellus)^[9]、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)^[10]、鲟(*Acipenser sinensis*)^[11]、鲫(*Carassius auratus*)^[12]、团头鲂^[13]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[14]等多种淡水养殖品种败血症的暴发,造成重大经济损失^[15]。导致中国和美国地区鱼类暴发运动性气单胞菌败血症(motile *Aeromonas septicemia*, MAS)的流行菌株群 ST251 克隆群更是引起了水产界的广泛重视^[1,16]。目前,有关 ST251 克隆群菌株的全基因组特征的研究报道还不多。Pang 等^[17]通过比较基因组学分析发现编码肌醇、唾液酸及 L-岩藻糖等 3 条代谢途径的基因区域只存在于 ST251 型流行株中,暗示这些途径可能与 ST251 型流行株的毒力表达密切相关。

2018 年 7 月,湖北仙桃一团头鲂专养池塘暴发败血症,鱼体大量死亡,造成较大经济损失。为了分析病因,本研究对造成此次败血症的病原菌进行了分离鉴定,发现该病原菌为嗜水气单胞菌,并且属于流行的 ST251 型克隆群。为进一步分析分离株的毒力、耐药特征以及与其他 ST251 型流行株的异同,同时探讨 ST251 型克隆群菌株多次引起鱼类发病的潜在原因,我们对该分离株进行了全基因组测序和比较基因组学分析,进一步阐明了 ST251 型流行株的全基因组特征,为嗜水气单胞菌 ST251 型流行株引起的鱼类病害防治、深入研究鱼源致病性嗜水气单胞菌的流行病学及致病机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细菌分离

随机选取湖北仙桃一团头鲂专养池塘中多尾患病团头鲂,进行病理检验。取患病鱼的肝、肾和脾加入灭菌的生理盐水匀浆,倍比稀释后无菌涂布于 LB 琼脂平板上 28 ℃ 孵化 48 h。挑选优势菌落移接于 LB 琼脂平板上保存供检验用。

1.2 细菌形态、菌落特征与理化特性检查

用微生物生理生化实验检测得到菌株的理化特性,根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果,主要依据 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(9th ed)^[18]、Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish^[19]及有关资料,

判定分离菌的种属分类位置。

1.3 细菌的分子鉴定

利用碱裂解法提取细菌总 DNA,参照 Clarridge Jill E 方法对分离菌株进行 16S rDNA 鉴定^[20]。16S rDNA 片段 PCR 扩增的引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序后,利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)确定所分离菌株的种属。

多序列分型(multilocus sequence typing MLST)参照 Martino 等^[21]描述的引物和方法。将各菌株信息上传至 MLST 1.8 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)进行分析,通过比较 *gltA*、*groL*、*gyrB*、*metG*、*ppsA* 和 *recA* 这 6 个基因位点处的等位基因的差异,并得到比对后各菌株 6 个基因的等位基因序列信息。

1.4 回归感染及细菌毒力检测

从湖北团风团头鲂育苗养殖基地购进没有任何发病史 40~50 g 的健康团头鲂,每天饱食喂养两周。将分离菌株接种于 LB 固体培养基,28 ℃ 培养 12 h。用无菌生理盐水配制成浓度分别为 10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL 的菌液。将所选鱼分为 1 个对照组和 1 个实验组,每组 6 尾。实验组经腹腔注射 0.2 mL 的菌液,对照组注射 0.2 mL 无菌生理盐水。每天观察鱼的活动情况,从濒死团头鲂肝、肾和脾重新分离细菌来确认患病是否与攻毒有关。

分离菌株的 LD₅₀ 通过斑马鱼模型测定^[22]。用无菌生理盐水配制成浓度分别为 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL 的菌液。实验组每尾鱼腹腔注射 0.02 mL 的菌液,对照组注射 0.02 mL 无菌生理盐水,每个浓度梯度为一组,共 6 组,每组 10 尾。注射完毕后,将斑马鱼饲养于 28 ℃ 的环境下,每天定时观察并记录斑马鱼死亡情况,并做好换水和记录。对斑马鱼进行一周的观察,LD₅₀ 值的计算基于生存数据,采用改进的 Karbers 方法^[23],实验独立重复 3 次。

1.5 细菌耐药性实验

采用常规琼脂扩散(K-B)法对分离株进行 22

种抗菌药物敏感性测定,依据 CLSI 药敏试验标准鉴定手册^[24],以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标。药敏纸片均购买自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.6 全基因组测序

取纯化的单菌落,于 LB 培养基中 28 ℃ 培养 18 h,按照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒[北京天根生化科技(北京)有限公司]步骤提取菌株 LHW39 全基因组 DNA。基因组 DNA 用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific) 核酸浓度检测仪检测纯度,确保 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0,浓度大于 10 μg。

菌株 LHW39 基因组 DNA 检测合格后,首先构建基因组小片段文库(350 bp),然后利用 Illumina 公司的 HiSeq2500 测序平台进行双末端测序,测序深度 200X。获得的原始数据去除引物、接头和筛选低质量的数据之后,利用短序列组装软件 SOAPdenovo2 (<http://soap.genomics.org.cn/>)对二代测序后的优化序列拼接,得到最优的 contigs 组装结果。Contigs 之间的拼接组装由 PCR 扩增及测序的方式完成。

得到完整的基因组序列后,将基因组上传到 GenBank,并利用原核生物基因组自动注释渠道(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)对细菌的全基因组进行注释。细菌基因组测序及前期的组装工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。将蛋白序列上传至在线注释网站 eggNOG-mapper (<http://eggno-mapper.embl.de>),得到直系同源簇(cluster of orthologous group COG)结果,并使用 R 软件中的 ggplot2 软件绘制 COG 功能分类图。

1.7 基因组原噬菌体分析

利用 PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>)在线预测工具对细菌基因组进行原噬菌体预测,利用 RAST (<https://rast.nmpdr.org/>)注释工具并结合 GenBank 文件和 BLAST 比对工具对预测到的原噬菌体进行注释。利用软件 easyfig (Version 2.1)对原噬菌体基因组进行共线性分析。利用 MEGA5 进行系统进化树的构建。

1.8 毒力和耐药基因分析

使用 diamond (version 0.9.24)软件^[25],检索毒力因子数据库(virulence factor database VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)中已知的气单胞菌属相关的毒力因子,使用 R 软件中的 pheatmap 软件对 10 株 ST251 菌株进行聚类分析并绘制热图。

利用抗生素抗性基因数据库(The comprehensive antibiotic resistance database CARD, <https://card.mcmaster.ca/home>)并使用 CARD 团队开发的 RGI 软件(resistance gene identifier),筛选 LHW39 蛋白序列,得到抗性基因序列。

2 结果与分析

2.1 致病菌的分离及鉴定

患病团头鲂发病前期不进食、乱窜,随后出现机体活力明显下降,病鱼体表充血,鳞片脱落,鱼鳍溃烂,眼球突出,腹水积水等情况。

利用 LB 培养基,从患病鱼肝脏中可以分离到大量形态一致的圆形不透明、边缘光滑、中央隆起、淡黄色、直径多在 2 mm 左右的菌落。将优势菌株进行纯化,命名为 LHW39。

菌株 LHW39 主要理化性状的反应结果与标准菌株一致(表 1);对 LHW39 的 16S rDNA 片段进行 PCR 扩增并测序后 BLAST 分析结果显示, LHW39 的 16S rDNA 片段与嗜水气单胞菌菌株 J-1 的一致性为 100%,表明菌株 LHW39 为嗜水气单胞菌。

为进一步鉴定 LHW39,本研究利用嗜水气单胞菌的 *gltA*、*groL*、*gyrB*、*metG*、*ppsA* 和 *recA* 六个基因对 LHW39 进行了多位点序列分型。结果表明,菌株 LHW39 属于 ST251 型,与在中国和美国引起鱼类气单胞菌败血症的流行株属于同一个序列分型^[16]。

2.2 回归感染及菌株毒力

经腹腔注射生理盐水的对照组团头鲂,没有死亡且生长状态良好;腹腔注射 LHW39 的团头鲂,三天内观察到 100% 的死亡率,并且表现出体表出血、鱼鳍溃烂、鳞片脱落、眼球突出、腹部积水的症状,与自然发病的鱼病症相似(图 1)。从

表 1 菌株 LHW39 的生理生化性状
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolate strain LHW39

特性 characteristics	LHW39	嗜水气单胞菌 ^[18] <i>Aeromonas hydrophila</i>
氧化酶 oxidase	+	+
鼠李糖 rhamnose	—	—
脲 urea	+	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	—	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+
肌醇 inositol	—	—
蛋白胨水 peptone water	+	+
甘露醇 mannitol	+	+
硫化氢 H ₂ S	+	+
山梨醇 sorbitol	—	d
阿拉伯糖 arabic candy	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+
蜜二糖 melibiose	—	d
蔗糖 sucrose	+	d
枸橼酸盐 citrate	—	—
苯丙氨酸 phenylalanine	—	—
明胶 gelatin	+	+
葡萄糖磷酸盐蛋白胨水 glucose phosphate peptone water	+	+

注：“+”，阳性反应；“—”，阴性反应；“d”，种间存在差异。
Note: “+”, positive control; “—”, negative control; “d”, significant difference.

实验感染的鱼肝脏分离的菌株，与 LHW39 具有相同的生理生化特性和 16S rDNA 基因序列。这些结果表明，LHW39 是引起本次团头鲂患病的病

原菌且具有较强的致病性。
为进一步鉴定菌株 LHW39 的毒力，我们参照 Pang 等^[22]对气单胞菌毒力评估方法，测定了 LHW39 对斑马鱼的半致死剂量。结果显示，注射生理盐水的斑马鱼全部存活，LHW39 的半致死剂量为 1.55×10^5 CFU/尾。数据表明，菌株 LHW39 确为高毒力菌株。

2.3 菌株 LHW39 的药敏性

依据 CLSI 药敏试验标准鉴定手册^[24]及《中华人民共和国兽药典》^[26]中予以公布的水产用药物，对菌株 LHW39 进行药敏实验。药敏试验结果如表 2 所示：该菌对哌拉西林-他唑巴坦、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松钠、头孢呋辛、氨曲南、四环素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、氯霉素、多西环素、氟苯尼考、磺胺异恶唑、恩诺沙星、诺氟沙星高度敏感；对美罗培南、丁胺卡那霉素、庆大霉素、新霉素中度敏感；对头孢噻吩耐药。

2.4 菌株 LHW39 的全基因组测序及注释

对菌株 LHW39 进行全基因组测序，得到其基因组完成图。结果显示：LHW39 基因组大小为 5099855 bp，GC 含量为 60.80%，共预测到 4572 个编码序列(CDS)。菌株 LHW39 基因组上传到 NCBI 获得 GenBank 登录号(CP050012)。COG 注释发现 LHW39 中共有 4314 个基因具有 COG 功能分类，分为 20 类(图 2)。其中，基因功能主要与氨基酸转运代谢、转录、信号转导机制、和能量生产转换相关；此外，19.07%的基因 COG 分类缺乏明显特征，功能尚不明确。



图 1 菌株 LHW39 回归感染团头鲂引起的症状
(a) 鳞片脱落; (b) 体表出血; (c) 眼球突出; (d) 腹部积水; (e) 鱼鳍溃烂。
Fig. 1 Artificial infection tests results of *Megalobrama amblycephala*
(a) scales fall off; (b) surface bleeding; (c) proptosis; (d) abdominal effusion; (e) fin fester.

表 2 分离菌株 LHW39 药敏实验结果
Tab. 2 Drug sensitive test of the isolate strain LHW39

抗生素分类 antimicrobial class	抗生素名称 antimicrobial agent	药物含量 disk content/ μg	抑菌圈标准和表型 zone diameter & phenotype/mm	抑菌圈直径判断标准 zone diameter interpretive criteria/mm		
			LHW39	S susceptible	I intermediate	R resistant
青霉素类和 β -内酰胺类/ β -内酰胺酶抑制剂组合 penicillins and β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor combination	哌拉西林-他唑巴坦 piperacillin-tazobactam	100/10	23 S	≥ 21	18–20	≤ 17
	头孢哌酮 cefepime	30	32 S	≥ 18	15–17	≤ 14
	头孢噻肟 cefotaxime	30	33 S	≥ 26	23–25	≤ 22
	头孢噻吩 cefoxitin	30	12 R	≥ 18	15–17	≤ 14
	头孢他啶 ceftazidime	30	26 S	≥ 21	18–20	≤ 17
	头孢曲松钠 ceftriaxone	30	33 S	≥ 23	20–22	≤ 19
单环 β -内酰胺类 monobactams	头孢唑肟钠 cefuroxime sodium	30	27 S	≥ 18	15–17	≤ 14
	氨曲南 aztreonam	30	33 S	≥ 21	18–20	≤ 17
	碳青霉烯类 carbapenems	10	14 I	≥ 16	14–15	≤ 13
氨基糖苷类 aminoglycosides	美罗培南 meropenem	10	14 I	≥ 17	15–16	≤ 14
	丁胺卡那霉素 amikacin	30	15 I	≥ 15	13–14	≤ 12
四环素类 tetracyclines	庆大霉素 gentamicin	10	14 I	≥ 15	12–14	≤ 11
	四环素 tetracycline	30	21 S	≥ 15	12–14	≤ 11
喹诺酮类 quinolones	环丙沙星 ciprofloxacin	5	27 S	≥ 21	16–20	≤ 15
	左氧氟沙星 levofloxacin	5	25 S	≥ 17	14–16	≤ 13
叶酸通路抑制剂 folate pathway inhibitors	复方新诺明 trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75	19 S	≥ 16	11–15	≤ 10
氯霉素类 phenicols	氯霉素 chloramphenicol	30	26 S	≥ 18	13–17	≤ 12
水产用抗生素 antibiotics for aquatic products	新霉素 neomycin	30	14 I	≥ 17	13–16	≤ 12
	多西环素 doxycycline	30	20 S	≥ 16	13–15	≤ 12
	氟苯尼考 florfenicol	30	29 S	≥ 18	13–17	≤ 12
	磺胺异恶唑 sulfagan	300	19 S	≥ 17	13–16	≤ 12
	恩诺沙星 enrofloxacin	5	25 S	≥ 21	16–20	≤ 15
	诺氟沙星 norfloxacin	10	23 S	≥ 17	13–16	≤ 12

2.5 菌株 LHW39 中的毒力基因及其与 ST251 型菌株的比较

为分析 LHW39 与其他 ST251 型嗜水气单胞菌全基因组特征的异同, 本研究将 LHW39 全基因组与其他已知 ST251 型的嗜水气单胞菌菌株 J-1、NJ-35 和 D4 等 9 个菌株全基因组一起进行比较基因组学分析。这 10 个菌株中, LHW39、D4、JBN2301 和 ZYAH72 来自湖北(LHW39 和 D4 分离自患病团头鲂, JBN2301 和 ZYAH72 分离自患病鲫); J-1 和 NJ-35 来自江苏(均分离自患病鲤); GYK1 来自广东(分离自患病鳊)。J-1 和 NJ35 为中国江苏地区流行株^[22,27], AL09-71、ML09-119

和 pc104A 为美国流行株^[28-32]。菌株及其基因组相关信息见表 3。这些菌株基因组大小介于 4.95~5.28 Mb, GC 含量介于 60.51%~60.90%, 基因数量介于 4415~4774。每个菌株的基因组中都含有 31 个 rRNA, 这些数量较多的 rRNA 可能与菌株对环境条件改变的快速适应能力有关系^[33]。

为探究菌株 LHW39 中的毒力相关基因与 ST251 型其他菌株的异同, 本研究对这 10 株菌株的分泌系统、黏附因子、毒素和群体感应系统等在基因组中的分布进行了比较和聚类。如图 3 所示, 在 10 株 ST251 型嗜水气单胞菌中都含有 II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS), 不含 T3SS,

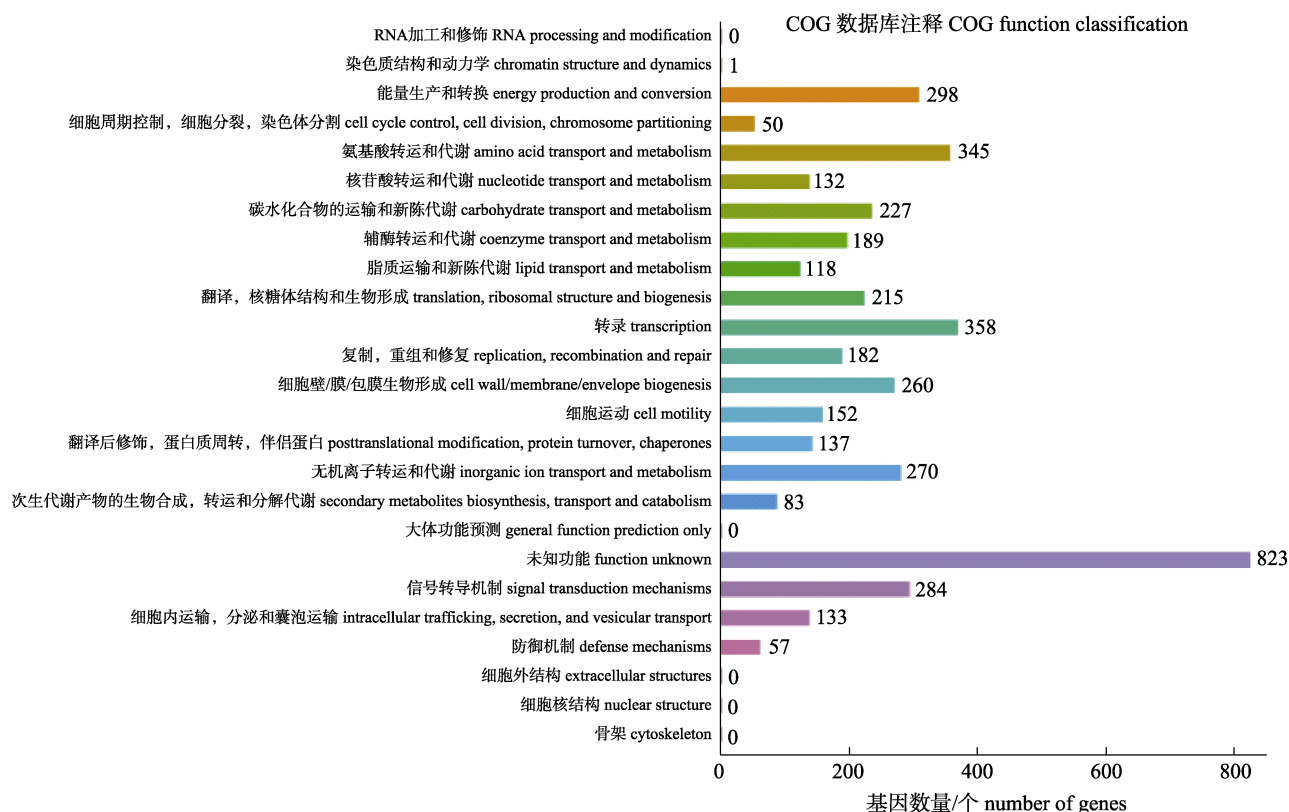


图 2 LHW39 的 COG 功能分类

Fig. 2 Gene distribution based on COG classification of strain LHW39

部分含有 T6SS。感染宿主时发挥定殖功能的极生鞭毛和参与细菌黏附与毒力过程的 IV 菌毛在 10 株菌中均存在。毒力直接相关的毒素气溶素、细胞毒性肠毒素、热稳定细胞兴奋性肠毒素、热不稳定细胞兴奋性肠毒素、胞外溶血素、溶血素和重复毒素等在 10 株 ST251 型嗜水气单胞菌中均存在。在 10 株菌中都含有能够显著影响细菌毒力的铁蛋白、铁转运蛋白和铁摄取调节因子以及能够增强细菌在不同环境的生存能力群体感应系统。毒力相关基因聚类结果显示, 3 株美国菌株 (AL09-71、ML09-119 和 pc104A) 和中国广东菌株 GYK1 聚为一类, 不含有 T6SS; 其他 4 株中国湖北 (包括 LHW39) 和 2 株中国江苏菌株聚为一类, 含有 T6SS (图 3)。

2.6 菌株 LHW39 中的原噬菌体及其与 ST251 型菌株的比较

对 LHW39 中的原噬菌体序列进行预测, 结果显示 LHW39 中共含有 6 个原噬菌体序列, 其中 1 个完整, 命名为 phAhLHW39, 其余 5 个为不完整 (表 4)。比较基因组分析发现, 该完整的原噬菌

体 phAhLHW39 在其他 9 个 ST251 型嗜水气单胞菌中全部存在, 并且彼此间一致性高达 99.99%~100%, 表明 phAhLHW39 在 ST251 型嗜水气单胞菌中高度保守; 另外还发现, 在 NCBI 数据库中, phAhLHW39 仅高度保守存在于 ST251 型嗜水气单胞菌菌株中 (图 4), 表明 phAhLHW39 为 ST251 型嗜水气单胞菌菌株所特有。BLAST 分析时发现, 在 NCBI 数据库中, 除了高度保守的 ST251 型嗜水气单胞菌菌株, 与 phAhLHW39 一致性最高的嗜水气单胞菌原噬菌体序列来自菌株 GSH8-2 (命名为 phAhGSH8-2), 二者的碱基一致性为 59.76%; 同时, 分析发现菌株 GSH8-2 属于 ST558 型, 其分离自日本东京的污水处理厂。基因组比较分析发现, 两个原噬菌体具有较好的共线性关系, 两个基因组只有 1 处局部共线性且反向比对完全匹配; phAhGSH8-2 基因组长度 (35870 bp) 稍长于 phAhLHW39 (30211 bp), 相对于 phAhLHW39 而言, phAhGSH8-2 在末尾段多出 2 个噬菌体形态结构相关和 3 个未知功能 CDS (图 5)。

表 3 10 株 ST251 型嗜水气单胞菌基因组概况
Tab. 3 Genome characteristics of 10 ST251 strains of *Aeromonas hydrophila*

菌株 strain	LHW39	D4	JBN2301	ZYAH72	J-1	NJ-35	GYK1	AL09-71	ML09-119	pc104A
GenBank 登录号 accession number	CP050012	CP013965	CP013178	CP016989	CP006883	CP006870	CP016392	CP007566	NC_021290	CP007576
分离时间 date of isolation	2018	2012	2009	2015	1989	2010	2001	2009	2009	2010
分离地点 country of isolation	中国湖北 Hubei, China	中国湖北 Hubei, China	中国湖北 Hubei, China	中国湖北 Hubei, China	中国江苏 Jiangsu, China	中国江苏 Jiangsu, China	中国广东 Guangdong, China	美国 America	美国 America	美国 America
分离源 source	患病团头鲂 diseased <i>Megalobrama amblycephala</i>	患病团头鲂 diseased <i>Megalobrama amblycephala</i>	患病鲫鱼 Diseased crucian	患病鲫鱼 diseased crucian	患病鲤 diseased cyprinid fish	患病鲤 diseased cyprinid fish	患病鲮 diseased mandarin fish	患病斑点叉尾鲷 diseased <i>Ictalurus punctatus</i>	患病斑点叉尾鲷 diseased <i>Ictalurus punctatus</i>	池塘底泥 pond sediment
基因组大小/bp genome size	5099855	5100520	5127362	5159182	5000814	5279644	4951765	5023861	5024500	5023829
GC 含量/% G+C content	60.80	60.80	60.77	60.68	60.90	60.51	60.80	60.80	60.80	60.80
基因数量 number of genes	4718	4774	4646	4617	4462	4716	4415	4492	4577	4493
CDS 数量 number of CDS	4572	4619	4438	4456	4268	4526	4262	4297	4434	4300
rRNA 数量 number of rRNA	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
tRNA 数量 number of tRNA	108	117	129	123	110	102	114	111	112	111
共有保守前噬菌体区域 /bp location of the shared and conservative prophage regions	3461552- 3491762	3420298- 3450508	3458467- 3488677	3481765- 3511975	3344830- 3375040	3414289- 3444499	3304887- 3335097	1726312- 1773249	173362- 1771405	1726311- 1773248

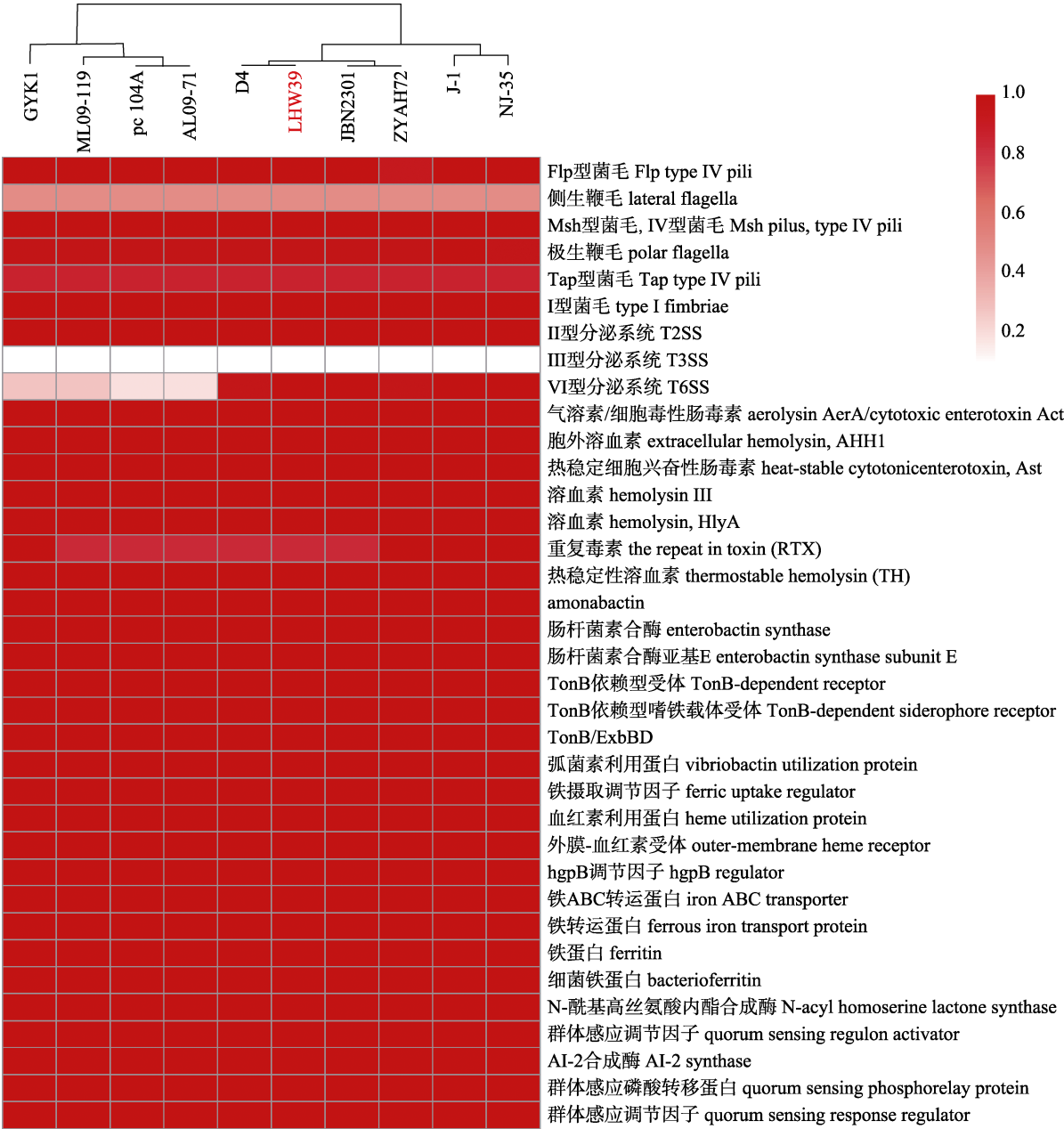


图 3 10 株 ST251 型嗜水气单胞菌菌株毒力因子比较热图

Fig. 3 Heatmap chart generated from distances calculated based on the presence or absence of virulence-related genes in 10 ST251 type *Aeromonas hydrophila* strains

表 4 菌株 LHW39 前噬菌体特征

Tab. 4 Prophages characteristics of strain LHW39

前噬菌体序列 prophage region	完整性 completeness	序列长度/kb region length	CDS 数量 number of CDS	GC 含量/% CG content	前噬菌体在全基因组的位置 region position
1	不完整 incomplete	21.8	12	51.14	154276-176095
2	不完整 incomplete	25.1	33	56.84	2518561-2543721
3	完整 intact	30.2	37	56.56	3461552-3491762
4	不完整 incomplete	21.8	12	52.70	3630995-3652875
5	不完整 incomplete	15.7	19	57.63	4080361-4096123
6	不完整 incomplete	30.1	24	52.07	4095079-4125276

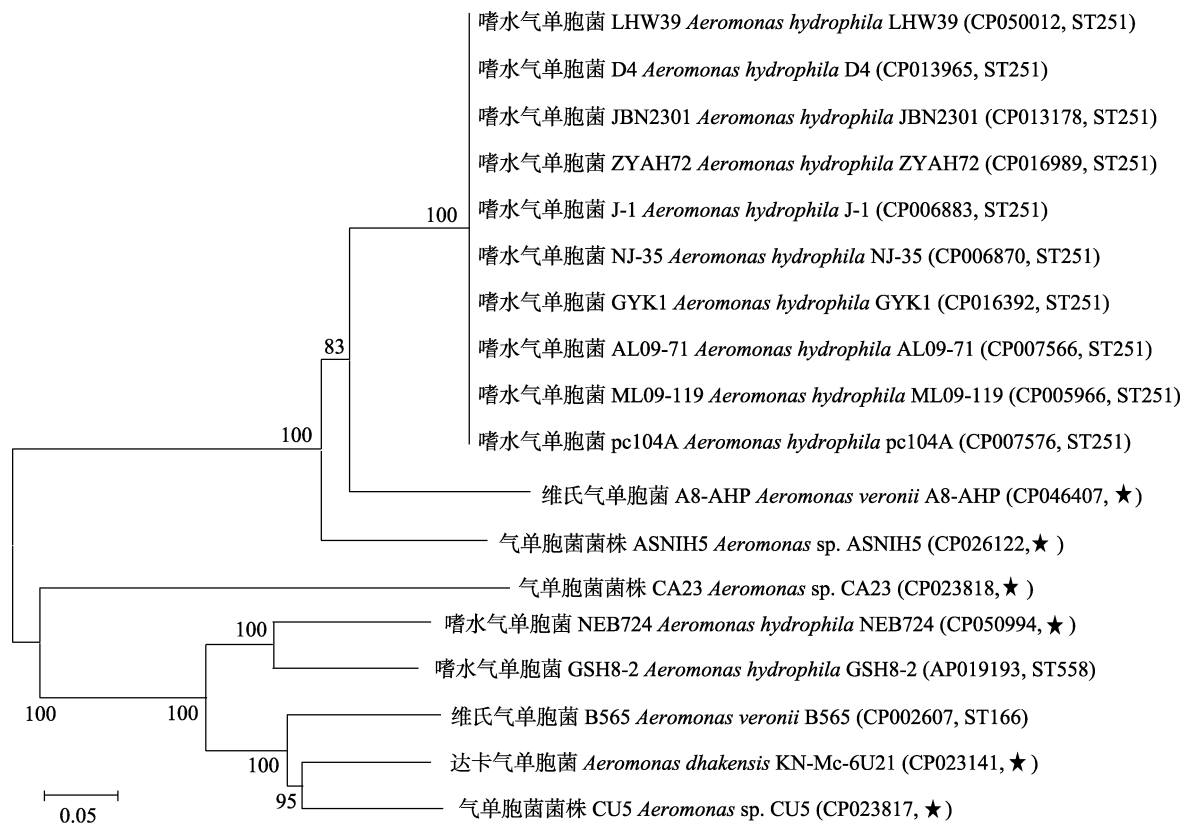


图 4 phAhLHW39 进化树的构建
★ 表示在 MLST 数据库中未能找到相应 ST 型。
Fig. 4 Phylogenetic tree of phAhLHW39
★ means that the corresponding ST type could not be found in the MLST database.

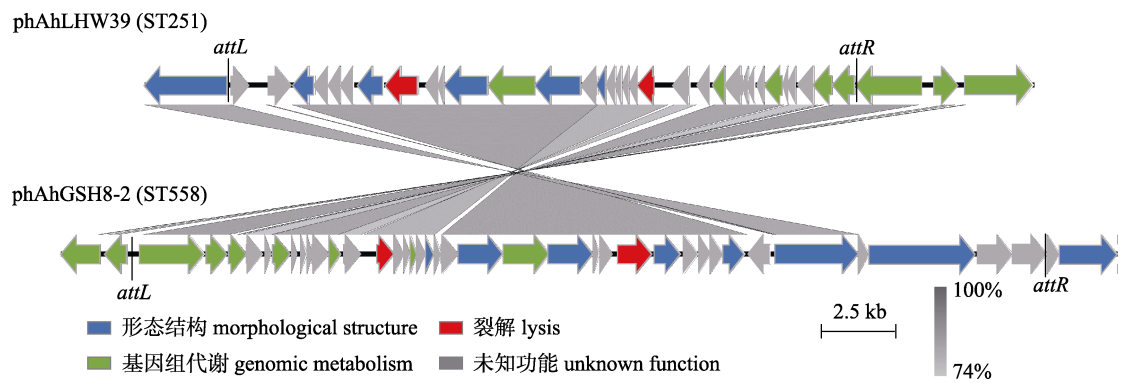


图 5 原噬菌体 phAhLHW39 与 phAhGSH8-2 共线性比较
Fig. 5 Genome comparison between prophage phAhLHW39 and phAhGSH8-2

2.7 菌株 LHW39 中的耐药基因及其与 ST251 型菌株的比较

为深入研究 LHW39 的耐药特征，本研究对 LHW39 的主要耐药基因进行了筛选(表 5)。结果显示，LHW39 基因组中含有与抗磺胺类、阿尔法霉素、头孢菌素、碳青霉烯和氟喹诺酮抗生素等相关基因，并且氨基酸一致性较高(43.11%~

98.82%)。这些基因中，基因 G9455_05385、G9455_01715 通过改变抗生素靶点来对磺胺类抗生素和阿尔法霉素产生耐药性；基因 G9455_00060、G9455_20055 通过使抗生素失活直接对头孢菌素和碳青霉烯产生耐药性；基因 G9455_07190、G9455_16575 通过将抗生素外排对氟喹诺酮类抗生素产生耐药性。

表 5 菌株 LHW39 中的主要耐药基因

Tab. 5 The main antibiotic resistance genes from strain LHW39

基因 gene	所属的抗微生物耐药性基因家族 AMR gene family	抗生素分类 drug class	抗性机制 resistance mechanism	氨基酸一致性 /% identity
G9455_05385	抗磺胺二氢叶酸合成酶 FolP sulfonamide resistant dihydropteroate synthase FolP	磺胺类抗生素 sulfonamide antibiotic	抗生素靶点改变 antibiotic target alteration	48.34
G9455_01715	抗阿罗法霉素 EF-Tu elfamycin resistant EF-Tu	阿罗法霉素 elfamycin antibiotic	抗生素靶点改变 antibiotic target alteration	87.51
G9455_00060	OXA β-内酰胺酶 OXA-724 beta-lactamase OXA-724	头孢菌素 cephalosporin	抗生素失活 antibiotic inactivation	97.73
G9455_20055	CphA β-内酰胺酶 CphA3 CphA beta-lactamase CphA3	碳青霉烯 carbapenem	抗生素失活 antibiotic inactivation	98.82
G9455_07190	RND 抗生素外排泵 AdeF resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump AdeF	氟喹诺酮类抗生素, 四环素类 antibiotic fluoroquinolone antibiotic, tetracycline antibiotic	抗生素外排 antibiotic efflux	48.44
G9455_16575	RND 抗生素外排泵 AdeF resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump AdeF	氟喹诺酮类抗生素, 四环素类 antibiotic fluoroquinolone antibi- otic, tetracycline antibiotic	抗生素外排 antibiotic efflux	43.11

将以上基因级联, 在气单胞菌菌株中进行比
对并构建了系统进化树。结果显示, 以上基因在
10 株 ST251 型菌株中均存在, 且碱基一致性为
100%, 在其他 ST 型菌株中则存在差异(图 6), 表
明这些耐药基因在 ST251 型菌株中高度保守。

3 讨论

嗜水气单胞菌是水产养殖近年来暴发大规模
流行性病害最为严重的病原菌, 常常导致养殖鱼
类大批死亡, 给水产养殖业带来了巨大的损失。本



图 6 菌株 LHW39 中耐药基因进化树的构建

★表示在 MLST 数据库中未能找到相应 ST 型。

Fig. 6 Phylogenetic tree of resistant genes of strain LHW39

★ means that the corresponding ST type could not be found in the MLST database.

研究从湖北仙桃一团头鲂专养池塘患病团头鲂肝脏中分离获得了20余株菌株,经鉴定均为嗜水气单胞菌;以优势菌株LHW39作为本研究的病原研究对象。

多序列分型可以实现精确的菌株基因分型,是对流行性病原菌鉴定溯源的有力工具^[21]。本研究多序列分型表明,菌株LHW39与嗜水气单胞菌美国流行株和中国流行株亲缘关系密切,均属于ST251型克隆群。嗜水气单胞菌克隆群ST251引起的MAS在鱼类中的暴发已引起全世界的广泛关注。该ST251克隆群在华中地区池塘养殖的鲤科鱼类中引起了MAS的暴发^[16]。根据ST251克隆群的地理和生物资源分布,ST251克隆群被认为是嗜水气单胞菌的高危克隆群,可能是导致中国和美国东南部MAS暴发的原因^[17]。有研究表明,亚洲草鱼来源的属于ST251克隆群的嗜水气单胞菌毒株,可能导致了美国养殖的斑点叉尾鲂(*Ictalurus punctatus*)疾病的流行^[28]。本研究中,LHW39属于ST251型克隆群,与中国江苏地区的嗜水气单胞菌流行株亲缘关系密切且具有较高毒力,极可能是此次湖北仙桃一团头鲂专养池塘暴发败血症的主要原因。

对嗜水气单胞菌LHW39全基因组测序以及ST251型克隆群菌株之间的基因组比较分析有助于更好的分析其毒力因子特征。结果显示,LHW39基因组中含有丰富的毒力因子(图3)。ST251型克隆群菌株间毒力因子比对表明,有助于细菌运动和定殖的菌毛和鞭毛合成基因、主要的毒素相关蛋白基因、铁代谢相关基因以及T2SS等,在10株ST251型菌株中均存在,且高度保守(图3)。T2SS是在嗜水气单胞菌中负责气溶素、淀粉酶和蛋白酶等多种蛋白质从细胞质到细胞外环境的跨膜运输的一般分泌途径,是革兰氏阴性菌中最常见的蛋白质跨膜运输途径^[34]。可见T2SS在ST251型菌株中发挥致病能力起着不可替代的作用。图3毒力因子比对热图结果也表明,10株ST251型菌株中均不存在T3SS,表明T3SS并不是ST251型菌株所必需的毒力因子。T6SS在ST251型菌株之间则存在差异。T6SS在革兰氏阴性菌中的主要作用是增强细菌对外界环境的适应性,是细菌对宿主细胞的致病力的媒介^[35-36]。T6SS作为近几年来

新发现的并且研究比较热门的分泌系统,拥有T6SS的菌株对于外界的适应能力具有更优越的条件。在本研究中,来源于美国的3株流行株(AL09-71、ML09-119和pc104A;分离自斑点叉尾鲂,鲴科(Ictaluridae)和中国广东的GYK1(分离自鲮 *Siniperca chuatsi*, 真鲈科 Percichthyidae)均不存在T6SS,其他6株来源于中国湖北和江苏的流行株(均分离自鲤科 Cyprinidae 鱼类)则均存在T6SS,表明在ST251型菌株的进化过程中,T6SS可能与菌株分离的地理位置和感染的宿主有一定的关联。图3的毒力相关基因聚类结果显示,分离自中国湖北的4个菌株聚为一类,分离自中国江苏的2个菌株聚为一类,分离自中国广东的GYK1和3株美国菌株位于同一分支,进一步表明ST251克隆群中菌株毒力相关基因的进化可能与菌株分离的地理位置和感染的宿主存在关联。

原噬菌体能提高宿主细菌的毒力和耐药性,并帮助细菌在体内感染时逃避宿主免疫系统的攻击^[37-39]。Pang等^[17]在对嗜水气单胞菌中国流行株NJ-35和J-1进行全基因组测序及比较分析时,发现了前噬菌体、O抗原等27个基因组适应区域。本研究进一步分析发现,在10株ST251型嗜水气单胞菌中存在一个完整且共有、甚至是ST251型菌株所特有的原噬菌体序列phAhLHW39。嗜水气单胞菌美国流行株的比较基因组学分析表明,嗜水气单胞菌流行株中存在基因水平转移现象,而这些现象可能与流行株的进化有关^[29]。phAhLHW39在ST251型菌株中相当保守,原噬菌体作为水平转移原件,其可能与ST251克隆群菌株的进化有关。原噬菌体phAhLHW39中存在与基因序列整合、转移相关的整合酶和转座酶基因,以及噬菌体必不可少的与裂解相关的裂解酶基因。此外,在phAhLHW39所预测的37个CDS中,存在21个未知功能的CDS,其中是否存在与细菌毒力和耐药相关的CDS,还有待后续进一步研究。

目前,气单胞菌已经产生了严重的耐药性。李世荣等^[40]对分离出的46株气单胞菌进行耐药性分析结果显示,气单胞菌对大部分抗菌药物如:头孢他啶、氨基糖苷、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、复方磺胺甲恶唑、哌拉西林-他唑巴坦和头

孢吡肟已经产生了不同程度的耐药。在本研究中, LHW39 对磺胺类、喹诺酮类和四环素类等药物敏感, 对头孢类中的头孢噻吩表现为耐药, 对碳青霉烯类的美罗培南表现为中度耐药(表 2)。对 LHW39 全基因组分析发现, LHW39 中含有抗磺胺类、喹诺酮类、四环素类、头孢类和碳青霉烯类等抗生素的相关基因(表 5), 并且这些基因在 ST251 型菌株中高度保守。有研究表明, 将细菌基因组分析的耐药基因结果与实验确定的细菌抗菌药物敏感性数据联系起来是困难的^[41]。本研究的药物敏感性结果与基因组分析得到的耐药基因结果对比发现, LHW39 基因组中存在的抗磺胺类、喹诺酮类和四环素类的基因可能不是起主要作用的耐药基因。Blair 等^[42]的研究表明, 细菌抗生素外排系统(antibiotic efflux)的不同表达水平很可能影响了最终细菌对相应抗生素的耐药表型。根据基因组分析结果与药敏试验结果, 能够更明确地对病原菌进行防治, 做到有针对性地筛选合适的药物来治疗该菌引起的病害。

参考文献:

- [1] Grim C J, Kozlova E V, Sha J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes[J]. mBio, 2013, 4(2): e00064-13.
- [2] Liang T, Wang D D, Zhang G R, et al. Molecular cloning and expression analysis of two β -defensin genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 166(1): 91-98.
- [3] Li J, Cao J L, Wang X, et al. *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(16): 6459-6471.
- [4] Zhai Z Y, Chen H D, Yu H X, et al. Studies on hemorrhagic septicemia of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Fisheries Science & Technology Information, 1993, 20(3): 105-108. [翟子玉, 陈慧达, 俞豪祥, 等. 团头鲂、鲫鱼出血性败血病的研究[J]. 水产科技情报, 1993, 20(3): 105-108.]
- [5] Teng T, Liang L G, Xie J, et al. Isolation and identification of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* from *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Hydroecology, 2016, 37(6): 95-100. [滕涛, 梁利国, 谢骏, 等. 团头鲂源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 水生态学杂志, 2016, 37(6): 95-100.]
- [6] Zhang D X, Kang Y H, Zhang H Y, et al. Isolation, identification and drug susceptibility of the pathogenic *Aeromonas veronii* from *Megalobrama amblycephala*[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(10): 1300-1307. [张冬星, 康元环, 张海月, 等. 团头鲂致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(10): 1300-1307.]
- [7] Ren Y L, Li Y, Han G, et al. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(5): 759-765. [任亚林, 李耘, 韩刚, 等. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 759-765.]
- [8] Sun Q H, Sun P F, Jin L H, et al. On the pathogenic bacteria of the hemolytic ascites of allogynogenetic crucian carp[J]. Journal of Fisheries of China, 1991, 15(2): 130-139. [孙其焕, 孙佩芳, 金丽华, 等. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 130-139.]
- [9] Cai L J, Xu B Q, Lin Q C. Comparison and analysis of drug resistance to moribund bacterium *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. Fisheries Science, 2011, 30(1): 42-45. [蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 42-45.]
- [10] Liang L G, Xie J. Isolation and identification, virulence factor detection, and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Mylopharyngodon piceus*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(12): 3236-3242. [梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定、毒力因子检测及药敏试验[J]. 生态学杂志, 2013, 32(12): 3236-3242.]
- [11] Zhang S H, Xu Q Q, Boscarri E, et al. Characterization and expression analysis of g- and c-type lysozymes in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 260-265.
- [12] Zong Q K, Xu L J, Lü L Q. Medication regimen of Saramoxacin against *Aeromonas hydrophila* infection in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(6): 46-52. [宗乾坤, 徐丽娟, 吕利群. 嗜水气单胞菌性鲫败血症的盐酸沙拉沙星用药方案研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 46-52.]
- [13] Tian T, Hu H G, Chen C F. Identification and pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak of bacterial disease of bluntnose black bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(3): 341-345. [田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 341-345.]
- [14] Hu A D, Zhang M Y, Zhang P, et al. Isolation, identification, drug resistance and virulence genes detection of *Aeromonas*

- hydrophila* from carp[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(7): 2167-2175. [胡安东, 张明洋, 张飘, 等. 鲤源嗜水气单胞菌分离鉴定、耐药性及毒力基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 2167-2175.]
- [15] Jiang X Y, Zhang C, Zhao Y J, et al. Immune effects of the vaccine of live attenuated *Aeromonas hydrophila* screened by rifampicin on common carp (*Cyprinus carpio* L)[J]. Vaccine, 2016, 34(27): 3087-3092.
- [16] Zhang X J, Yang W M, Wu H, et al. Multilocus sequence typing revealed a clonal lineage of *Aeromonas hydrophila* caused motile *Aeromonas* septicemia outbreaks in pond-cultured cyprinid fish in an epidemic area in central China[J]. Aquaculture, 2014, 432: 1-6.
- [17] Pang M D, Jiang J W, Xie X, et al. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9833.
- [18] Holt J G. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- [19] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish[M]. New York: Halsted Press, 1999.
- [20] Clarridge J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(4): 840-862.
- [21] 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 Environmental Microbiology, 2011, 77(14): 4986-5000.
- [22] Pang M D, Lin X Q, Hu M, et al. Tetrahymena: an alternative model host for evaluating virulence of *Aeromonas* strains[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48922.
- [23] Zhang C H, Lu J S, Zhao B. The concept of the *Yersinia pestis* virulence test and the discussion of computation formula[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2010, 25(2): 115-116. [张春华, 吕景生, 赵斌. 鼠疫菌毒力测定概念及计算公式的研讨[J]. 中国地方病防治杂志, 2010, 25(2): 115-116.]
- [24] Jean B P, Melvin P W, George M F, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 27th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017: 42-44.
- [25] Liu B, Zheng D D, Jin Q, et al. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D687-D692.
- [26] Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015. [中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.]
- [27] Chen H Q, Lu C P. Study on the pathogen of epidemic septicemia occurred in cultured cyprinoid fishes in southeastern China[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1991, 14(4): 87-91. [陈怀青, 陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 87-91.]
- [28] Hossain M J, Sun D W, McGarey D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish[J]. mBio, 2014, 5(3): e00848-14.
- [29] Hossain M J, Waldbieser G C, Sun D W, et al. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80943.
- [30] Pridgeon J W, Klesius P H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 94(3): 249-253.
- [31] Pridgeon J W, Zhang D H, Zhang L. Complete genome sequence of the highly virulent *Aeromonas hydrophila* AL09-71 isolated from diseased channel catfish in west Alabama[J]. Genome Announcements, 2014, 2(3): e00450-14.
- [32] Pridgeon J W, Klesius P H. Virulence of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 95(3): 209-215.
- [33] Lee Z M P, Bussema C, Schmidt T M. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl_1): D489-D493.
- [34] Korotkov K V, Sandkvist M, Hol W G J. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(5): 336-351.
- [35] Li J, Yu Y, Wang H J. Advances in bacterial type VI secretion system—A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(3): 291-296. [李俊, 俞盈, 王豪举. 细菌 VI 型分泌系统的研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 291-296.]
- [36] Corbitt J, Yeo J S, Davis C I, et al. Type VI secretion system dynamics reveals a novel secretion mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(11): e00744-17.
- [37] Wang X X, Kim Y, Ma Q, et al. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments[J]. Nature Communications, 2010, 1: 147.
- [38] Baba T, Bae T, Schneewind O, et al. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(1): 300-310.

- [39] Bae T, Baba T, Hiramatsu K, et al. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(4): 1035-1047.
- [40] Li S R, Jiang X F. Epidemiological distribution and drug resistance of *Aeromonas* and *Plesiomonas* in the intestine infection[J]. *Laboratory Medicine*, 2018, 33(8): 707-710. [李世荣, 蒋晓飞. 肠道感染气单胞菌、邻单胞菌的流行病学分布与耐药性分析[J]. *检验医学*, 2018, 33(8): 707-710.]
- [41] Cullen L, Weiser R, Olszak T, et al. Phenotypic characterization of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: Strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains[J]. *Microbiology*, 2015, 161(10): 1961-1977.
- [42] Blair J M A, Webber M A, Baylay A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42-51.

Aetiology characteristics of a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Megalobrama amblycephala* and genomic characterization with the epidemic ST251 clones

WANG Chaojie¹, WANG Zhicheng¹, KANG Xingyu¹, LI Jie¹, LIU Naiyu¹, WANG Weimin¹, LUO Yi^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

Abstract: In order to determine the pathogen and pathogenic characteristics of diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a farm in Hubei Province, as well as to analyze the virulence and drug-resistance characteristics of the pathogen through the whole genome, a strain of pathogenic bacteria (LHW39) was isolated from the liver lesions of the diseased blunt snout bream. Based on 16S rRNA identification and physiological and biochemical characteristics, LHW39 was identified as *Aeromonas hydrophila*. Multi-sequence typing showed that LHW39 belongs to the ST251 clonal group, the epidemic strain group causing the outbreak of motile *Aeromonas* septicemia (MAS) in China and the USA. Artificial infection tests confirmed its pathogenicity to blunt snout bream. The median lethal concentration of LHW39 to zebrafish (*Danio rerio*) was 1.55×10^5 CFU/fish, suggesting that LHW39 is highly virulent. Drug susceptibility tests demonstrated that LHW39 was resistant to cephalothin. Whole genome sequencing results showed that strain LHW39 contained a chromosome of 5,099,855 bp with an average G+C content of 60.80% and 4,572 coding sequences (CDS). Its complete genome has been deposited at GenBank under the accession number CP050012. Genomic comparative analysis suggested that the virulence genes of LHW39 are plentiful and highly similar to those of other ST251 strains. LHW39 also contains a type VI secretion system (T6SS). In addition, a heat map suggests that the evolution of the virulence-related genes of strains in the ST251 clonal group might be related to the geographical locations or the infected hosts of the isolates. A complete prophage named phAhLHW39 (30.2 kb) is presented in the LHW39 genome, which is highly conserved among ST251 strains and is unique to ST251. Analysis of drug-resistance genes showed that LHW39 contained resistance genes related to antibiotics such as sulfonamides, quinolones, tetracyclines, cephalosporins, and carbapenems, all of which were highly conserved among ST251 strains. In this study, pathogenic and genome-wide comparative analysis of the pathogenic *A. hydrophila* strain LHW39 was carried out, which provides references for the prevention and control of fish diseases caused by *A. hydrophila*.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *Aeromonas hydrophila*; ST251; whole genome; virulence; drug resistance; prophage

Corresponding author: LUO Yi. E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn