

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140508

黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性

刘杰^{1,2}, 黄艳华^{2,3}, 黄钧^{1,2}, 胡大胜^{2,4}, 梁静真^{1,2}, 彭亚^{1,2}, 龙苏^{1,2}, 牛志伟^{1,2}, 韩书煜^{2,4}, 植淇业^{1,2}

1. 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530005;

2. 广西水生动物病害诊断实验室, 广西 南宁 530005;

3. 梧州市水产技术推广站, 广西 梧州 543002;

4. 广西壮族自治区水产技术推广总站, 广西 南宁 530021

摘要: 为探明黄沙鳖(*Trionyx sinensis*)源嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)所携带毒力基因种类对其致病力的影响, 以从广西各地患病黄沙鳖中分离得到的嗜水气单胞菌为材料, 通过对黄沙鳖和小鼠进行人工感染测定试验菌株的致病力, PCR 检测供试菌株的 *hly*、*Aer*、*Alt*、*Act*、*ahal* 和 *ahp* 6 种毒力基因。结果表明, 47 株黄沙鳖源嗜水气单胞菌共包含 9 种毒力基因型, 48.94% 的菌株携带全部 6 种毒力基因, 基因型为 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺, 是主要的毒力基因型; 95.79% 的菌株携带 *hly* 基因, 均为有毒株; 嗜水气单胞菌对黄沙鳖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* 基因对菌株的致病力与其他毒力基因之间存在协同作用, *ahp* 基因缺失对菌株的致病力无影响; 将对黄沙鳖的致死率达到和超过 50% 的菌株判定为强毒株, 致死率不足 50% 判定为弱毒株时, 强毒株至少携带 4 种毒力基因, 并同时携带有 *hly* 和 *Act* 基因, 弱毒株只携带包括 *hly* 在内的 2 种或 3 种毒力基因, 本研究首次发现只携带 *Alt* 和 *ahal* 2 种毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠均无致病力; 在所检测的 6 种毒力基因中, 较易缺失的基因主要有 *Alt*、*ahal* 和 *ahp*; 在有毒株中, 不同基因型的菌株对黄沙鳖和对小鼠的平均致死率差异均为极显著($P < 0.01$), 当存在基因缺失现象时, 同一基因型的菌株对黄沙鳖的平均致死率也极显著高于对小鼠的致死率($P < 0.01$), 表明黄沙鳖源嗜水气单胞菌对黄沙鳖的致病力显著强于对小鼠的致病力。根据本研究结果, 可将 *hly* 基因作为嗜水气单胞菌有毒株的鉴定标准, 携带 *hly* 和 *Act* 基因并同时携带 *Aer*、*Alt*、*ahal*、*ahp* 中的 2 种或 2 种以上毒力基因作为强毒株的鉴定标准。

关键词: 黄沙鳖; 嗜水气单胞菌; 毒力基因; 致病力

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0698-09

中华鳖(*Trionyx sinensis*)的地理种群黄沙鳖(*Trionyx sinensis*)^[1], 因经济价值较高而在广西各地广泛养殖, 但近年来黄沙鳖细菌性疾病频发, 危害严重, 其致病菌目前已知有嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)^[2-6]和类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)^[7], 主要是嗜水气单胞菌。在淡水养殖中,

嗜水气单胞菌可引起鳖类和多种鱼类等水生动物近 10 种病症^[8], 对中华鳖和黄沙鳖均有很强的致病力^[2-4, 9], 在用橡皮塞密封的试管中, 4℃ 存放不超过 400 d 内致病力仍基本稳定^[9]。已知嗜水气单胞菌的致病力受其所携带毒力基因影响^[10-11]。有关嗜水气单胞菌的毒力基因以及毒力基因与菌株致病力关系, 国内外学者已进行了大量研究, Wong 等^[12]和

收稿日期: 2014-12-07; 修订日期: 2015-01-29.

基金项目: 广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018065); 广西水产畜牧兽医局专项项目(桂渔牧财[2011]52号, 桂渔牧财[2012]30号, 桂渔牧财[2013]35号); 南宁市科技局科技计划项目(南科发[2013]46号, 合同编号: 20132123).

作者简介: 刘杰(1989-), 女, 硕士, 专业方向: 水生动物病害防控技术. E-mail: 770449608@qq.com

通信作者: 黄钧, 教授, Tel: 0771-3235635, E-mail: hj1351@163.com; 胡大胜, 研究员, Tel: 0771-5829856, E-mail: 215173842@qq.com

González-Serrano 等^[13]检测并预测携带 *hly* 和 *Aer* 基因的嗜水气单胞菌为毒力菌株; 已经查明, 鱼源嗜水气单胞菌的毒力和致病性与其携带的毒力基因存在相关性^[10, 14-15]; Wang 等^[16]和 Heuzenroeder 等^[17]认为通过检测毒力基因 *hly* 和 *Aer* 可鉴定嗜水气单胞菌的潜在致病性; 黄艳华等^[3]和黄钧等^[4]分别对黄沙鳖源嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的 6 种毒力基因分布进行了研究; 王志铮等^[11]检测了鳖源致病性嗜水气单胞菌的 4 种毒力基因; 方兵等^[18]分析了 6 株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因序列并进行了克隆。以上研究大多仅限于少数菌株或少数毒力基因, 菌株来源多为鱼类, 对黄沙鳖源嗜水气单胞菌毒力基因的分布及其与致病力的相关性仍缺乏全面深入了解。本研究在原有的工作基础上^[3-4], 对 2010 年和 2011 年从广西各地分离鉴定的 47 株黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力及其携带的溶血素基因 *hly* (Hemolysin gene)、气溶素基因 *Aer* (Aerolysin gene)、细胞兴奋性肠毒素基因 *Alt* (Cytotoxic enterotoxin gene)、细胞毒性肠毒素基因 *Act* (Cytotoxic enterotoxin gene)、黏附素基因 *ahal* (Major adhesin gene) 和丝氨酸蛋白酶基因 *ahp* (Serine protease gene) 6 种毒力基因作进一步研究, 以全面了解这 6 种毒力基因在黄沙鳖源嗜水气单胞菌中的分布情况和菌株毒力基因型与致病力的相关性, 为致病性嗜水气单胞菌分子流行病学等领域的深入研究、建立相应的快速检测技术、相关疫苗的研发以及对由嗜水气单胞菌引起黄沙鳖病害的有效防控提供参考, 并为嗜水气单胞菌的致病力鉴定和毒力分型提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验菌株为本实验室从广西各地患病黄沙鳖中分离鉴定并保存于 -80°C 超低温冰箱中的 47 株嗜水气单胞菌。健康黄沙鳖购自南宁市某养鳖场, 个体重 (41.3 ± 3.1) g, 于广西大学水产养殖科研基地暂养 15~20 d 无异常后用于人工感染试验。2 周龄小白鼠购于广西医科大学动物试验中心, 饲

养一周后用于致病性试验。

Taq DNA 聚合酶, 10×PCR 缓冲液, MgCl_2 , dNTPs, 均购自 TaKaRa 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物公司; 琼脂糖购自 introvigen 公司。

试验用引物均由上海生工生物工程技术公司合成, 以超纯水稀释后, -20°C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 细菌的致病力试验

菌悬液的配制: 将各菌株分别接种于普通营养琼脂培养基上, 在 37°C 条件下经 3 次传代培养后, 取新鲜培养物用无菌生理盐水洗下, 采用参照 MCF 麦氏比浊管和平板稀释活菌计数相结合的方法确定菌悬液的细菌浓度。

人工感染黄沙鳖: 采用后腿基部肌肉注射法, 试验组(10 只/组)注射菌悬液 0.2 mL/只, 对照组(10 只/组)注射等量无菌生理盐水, 各组试验鳖经人工感染注射后分别置于不同水族箱中连续饲养观察 15 d, 每天 1 次记录各组受试鳖的发病、死亡情况并进行投喂和换水。试验期间水温 $24\sim 30^{\circ}\text{C}$, 试验共进行 2 次, 结果取平均值。

人工感染小鼠: 采用腹腔注射法, 实验小鼠 8 只为 1 组, 试验组注射各分离菌株菌悬液, 注射量为 0.3 mL/只, 对照组注射等量无菌生理盐水, 注射后按组分笼正常饲养 15 d, 每天 1 次观察其发病和死亡情况并进行投喂。试验共进行 2 次, 结果取平均值。

菌株致病力的评定: 以人工感染后 15 d 的致死率为指标对菌株的致病力进行评定。

1.2.2 菌株毒力基因的检测

细菌基因组 DNA 的抽提: 按参考文献[4]的方法, 将菌株接种于 4 mL 的 LB 培养基中, 28°C 、200 r/min 振荡培养 16 h, 取 0.8 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。按“TIANamp Bacterial DNA Kit”试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA, -20°C 保存备用。

PCR 检测: 根据已有报道, 选择特异性引物分别对 *hly*^[17]、*Aer*^[19]、*Alt*^[20]、*Act*^[21]、*ahal*^[18]和 *ahp*^[22] 6 种毒力基因进行 PCR 扩增。引物序列、

退火温度及片段大小按参考文献[4]。

反应体系(25 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ L, 25 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U)0.3 μ L, DNA 模板 3 μ L, 用 ddH₂O 补足余下体积。PCR 反应结束后以 1.0%琼脂糖凝胶电泳方法(100 V 电压下电泳 35 min)进行鉴定, 凝胶成像系统中观察, 根据电泳条带确定并记录结果。

2 结果与分析

2.1 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力

经 15 d 的试验观察, 人工注射菌悬液后大部分菌株均能在 2~15 d 内引起试验动物不同程度死亡, 对照组活动、摄食正常, 均无一发病和死亡现象。47 株分离菌株中, 对黄沙鳖和小鼠的平均致死率超过 60%的菌株分别为 40 株和 34 株, 其中有 29 株对黄沙鳖和小鼠的平均致死率均超过 80%, 致病力最强。WMG3、CZG5、GPDY2 3 株菌株对黄沙鳖的平均致死率 15%~20%, 但对小鼠无致病力。GGX23 和 GGY23 2 株菌株对黄沙鳖和小鼠均无致病力。人工感染结果见表 1。

2.2 毒力基因分布和毒力基因型

47 株供试菌株的基因组 DNA 经 PCR 扩增后, 均扩增到与预期片段大小相吻合的 6 种毒力基因片段。扩增结果见图 1, 毒力基因的检测结果见表 2。

根据表 2, 6 种毒力基因的阳性率分别为 *hly* 95.79%, *Aer* 87.23%, *Alt* 76.60%, *Act* 89.36%, *ahal*

72.34%, *ahp* 70.12%。毒力基因型共 9 种, 在 47 株试验菌株中的分布情况为: *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 23 株(占 48.94%), *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁻ 9 株(19.15%), *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁻*ahp*⁺ 7 株(14.89%), *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁻*ahal*⁻*ahp*⁻ 和 *hly*⁻*Aer*⁻*Alt*⁺*Act*⁻*ahal*⁺*ahp*⁻ 各 2 株(各 4.26%), *hly*⁺*Aer*⁻*Alt*⁺*Act*⁻*ahal*⁻*ahp*⁺、*hly*⁺*Aer*⁻*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁻*ahp*⁺、*hly*⁺*Aer*⁻*Alt*⁻*Act*⁻*ahal*⁻*ahp*⁺ 和 *hly*⁺*Aer*⁻*Alt*⁻*Act*⁺*ahal*⁻*ahp*⁻ 各 1 株(各 2.13%)。

2.3 菌株的毒力基因型与致病力相关分析

根据表 1 和表 2 的结果, 将各毒力基因型菌株与对黄沙鳖致死率的关系进行统计(表 3)。

统计结果表明, 不同毒力基因型的嗜水气单胞菌对黄沙鳖和小鼠的致病力不同, 毒力基因型为 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 的菌株致病力最强, 对黄沙鳖和小鼠的致死率均为 100%; 其次是 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁻*ahp*⁺ 基因型的菌株, 对黄沙鳖的平均致死率 95.00%, 对小鼠的平均致死率 85.73%; 携带 *hly*、*Aer*、*Act*、*ahal* 4 种毒力基因的菌株对黄沙鳖的平均致死率 70.56%, 对小鼠的平均致死率 59.04%; 对此 3 种毒力基因型菌株致病力的比较结果, 不同基因型的菌株对黄沙鳖和对小鼠的平均致死率差异均为极显著($P < 0.01$), 同一基因型的菌株对黄沙鳖的平均致死率也极显著高于对小鼠的致死率($P < 0.01$)。携带 *hly*、*Alt*、*Act*、*ahp* 4 种毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠的致死率分别为 60.00%和 37.75%; 携带 *hly*、*Aer*、*Alt* 3 种毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠的平均致死率分别为 30.00%和 12.53%; 携带 *hly*、*Alt*和 *ahp* 3 种毒力基因的菌株对黄沙鳖的致病率为 20.00%, 对小鼠无致病力; 携带 *hly*、*Act*、*ahp* 3 种毒力基因和携带 *hly*、*Act* 2 种毒力基因的菌株对黄沙鳖的致病率均为 15.00%, 对小鼠均无致病力; 只携带 *Alt* 和 *ahal* 毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠均无致病力。

3 讨论

嗜水气单胞菌的胞外产物含有多种毒力因子, 是其致病的必要条件, 但嗜水气单胞菌的毒力基

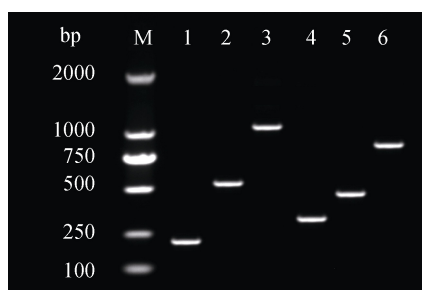


图 1 47 株嗜水气单胞菌 6 种毒力基因片段在琼脂糖凝胶电泳上的大小分布

M: Marker; 1: *Act*; 2: *hly*; 3: *ahal*; 4: *Aer*; 5: *Alt*; 6: *ahp*
Fig. 1 Distribution of six virulence gene segments in gel electrophoresis of forty-seven *Aeromonas hydrophila*
M: Marker; 1: *Act*; 2: *hly*; 3: *ahal*; 4: *Aer*; 5: *Alt*; 6: *ahp*

表 1 47 株嗜水气单胞菌对黄沙鳖和小鼠的致死率
Tab. 1 Fatality rates of yellow sand turtles and mice injected by 47 strains of *Aeromonas hydrophila*

菌株 strain	黄沙鳖 <i>Truogx sinensis</i>												平均致死率 /% average fatality rate						
	第 1 次试验 the first batch				第 2 次试验 the second batch				平均致		第 1 次试验 the first batch				第 2 次试验 the second batch				
	菌液浓度 /(cfu·mL ⁻¹)	死亡数/只 fatality number	致死率 /% fatality rate	菌液浓度 /(cfu·mL ⁻¹)	死亡数/只 fatality number	致死率 /% fatality rate	死亡率/% average fatality rate	菌液浓度 /(cfu·mL ⁻¹)	死亡数/只 fatality number	致死率 /% fatality rate	菌液浓度 /(cfu·mL ⁻¹)	死亡数/只 fatality number		致死率 /% fatality rate	死亡率/% average fatality rate				
BYHF	1.30×10 ⁷	10	100	3.30×10 ⁶	10	100	100	1.30×10 ⁷	8	100	3.30×10 ⁶	8	100	100					
BYHG	4.00×10 ⁷	8	80.0	1.00×10 ⁶	7	70.0	75.0	4.00×10 ⁷	4	50.0	1.00×10 ⁶	4	50.0	50.0					
BYY	2.00×10 ⁷	10	100	3.30×10 ⁶	10	100	100	2.00×10 ⁷	8	100	3.30×10 ⁶	8	100	100					
NNG3	1.57×10 ⁷	10	100	2.43×10 ⁶	10	100	100	1.57×10 ⁷	8	100	2.43×10 ⁶	8	100	100					
NNG4	1.97×10 ⁷	10	100	2.46×10 ⁶	10	100	100	1.97×10 ⁷	8	100	2.46×10 ⁶	8	100	100					
NNG7	2.33×10 ⁷	7	70.0	2.00×10 ⁶	7	70.0	70.0	2.33×10 ⁷	5	62.5	2.00×10 ⁶	5	62.5	62.5					
NNX3	2.23×10 ⁷	10	100	2.37×10 ⁶	9	90.0	95.0	2.23×10 ⁷	7	87.5	2.37×10 ⁶	6	75.0	81.3					
NNX4	4.17×10 ⁷	10	100	3.37×10 ⁶	10	100	100	4.17×10 ⁷	8	100	3.37×10 ⁶	8	100	100					
NNX7	2.00×10 ⁷	7	70.0	4.36×10 ⁶	7	70.0	70.0	2.00×10 ⁷	5	62.5	4.36×10 ⁶	5	62.5	62.5					
NNX8	4.03×10 ⁷	10	100	4.00×10 ⁶	10	100	100	4.03×10 ⁷	8	100	4.00×10 ⁶	8	100	100					
WMF1	1.90×10 ⁷	10	100	4.70×10 ⁶	10	100	100	1.90×10 ⁷	7	87.5	4.70×10 ⁶	7	87.5	87.5					
WMF16	3.57×10 ⁷	6	60.0	4.03×10 ⁶	6	60.0	60.0	3.57×10 ⁷	4	50.0	4.03×10 ⁶	3	37.5	43.8					
WMF3	3.03×10 ⁷	10	100	2.13×10 ⁶	10	100	100	3.03×10 ⁷	8	100	2.13×10 ⁶	8	100	100					
WMG1	1.67×10 ⁷	10	100	2.00×10 ⁶	10	100	100	1.67×10 ⁷	8	100	2.00×10 ⁶	8	100	100					
WMG3	3.67×10 ⁷	1	10.0	3.53×10 ⁶	2	20.0	15.0	3.67×10 ⁷	0	0	3.53×10 ⁶	0	0	0					
WMX1	2.67×10 ⁷	10	100	3.67×10 ⁶	10	100	100	2.67×10 ⁷	8	100	3.67×10 ⁶	8	100	100					
CZG5	3.33×10 ⁷	2	20.0	2.00×10 ⁶	2	20.0	20.0	3.33×10 ⁷	0	0	2.00×10 ⁶	0	0	0					
DAS	3.00×10 ⁷	10	100	3.70×10 ⁶	10	100	100	3.00×10 ⁷	8	100	3.70×10 ⁶	8	100	100					
DAY	2.00×10 ⁷	7	70.0	4.70×10 ⁶	7	70.0	70.0	2.00×10 ⁷	5	62.5	4.70×10 ⁶	4	50	56.3					
GGF14	1.67×10 ⁷	6	60.0	3.70×10 ⁶	7	70.0	65.0	1.67×10 ⁷	4	50.0	3.70×10 ⁶	4	50.0	50.0					
GGF2	2.33×10 ⁷	7	70	3.33×10 ⁶	7	70.0	70.0	2.33×10 ⁷	5	62.5	3.33×10 ⁶	5	62.5	62.5					
GGG23	3.67×10 ⁷	10	100	3.00×10 ⁶	10	100	100	3.67×10 ⁷	8	100	3.00×10 ⁶	8	100	100					
GGX1	2.67×10 ⁷	9	90.0	1.23×10 ⁶	9	90.0	90.0	2.67×10 ⁷	7	87.5	1.23×10 ⁶	6	75.0	81.3					
GGX23	3.55×10 ⁷	0	0	3.30×10 ⁶	0	0	0	3.55×10 ⁷	0	0	3.30×10 ⁶	0	0	0					
GGY1	3.70×10 ⁷	10	100	3.13×10 ⁶	10	100	100	3.70×10 ⁷	8	100	3.13×10 ⁶	8	100	100					
GGY2	2.07×10 ⁷	2	20.0	3.67×10 ⁶	3	30.0	25.0	2.07×10 ⁷	1	12.5	3.67×10 ⁶	0	0	6.3					
GGY23	1.70×10 ⁷	0	0	1.33×10 ⁶	0	0	0	1.70×10 ⁷	0	0	1.33×10 ⁶	0	0	0					
GPAG	1.10×10 ⁷	6	60.0	4.67×10 ⁶	8	80.0	70.0	1.10×10 ⁷	5	62.5	4.67×10 ⁶	5	62.5	62.5					

（待续 to be continued）

(持续 to be continued)

表 2 47 株嗜水气单胞菌 6 种毒力基因的检测结果
Tab. 2 Detection results of 6 virulence gene segments in 47 strains of *Aeromonas hydrophila*

菌株 strain	毒力基因 virulence gene						菌株 strain	毒力基因 virulence gene					
	<i>hly</i>	<i>Aer</i>	<i>Alt</i>	<i>Act</i>	<i>ahal</i>	<i>ahp</i>		<i>hly</i>	<i>Aer</i>	<i>Alt</i>	<i>Act</i>	<i>ahal</i>	<i>ahp</i>
MSAX	+	+	+	+	+	+	GPAG	+	+	-	+	+	-
MSAF	+	+	+	+	+	+	PNBF	+	+	-	+	+	-
MSBG	+	+	+	+	+	+	GGF2	+	+	-	+	+	-
GGY1	+	+	+	+	+	+	BYHG	+	+	-	+	+	-
BYY	+	+	+	+	+	+	LZBX	+	+	-	+	+	-
BYHF	+	+	+	+	+	+	DAY	+	+	-	+	+	-
WMG1	+	+	+	+	+	+	NNX7	+	+	-	+	+	-
WMX1	+	+	+	+	+	+	NNG7	+	+	-	+	+	-
WMF3	+	+	+	+	+	+	MSAG	+	+	+	+	-	+
GGG23	+	+	+	+	+	+	GPG10	+	+	+	+	-	+
LZG13	+	+	+	+	+	+	WMF1	+	+	+	+	-	+
LZX13	+	+	+	+	+	+	YFG	+	+	+	+	-	+
LZG14	+	+	+	+	+	+	NNX3	+	+	+	+	-	+
LZX14	+	+	+	+	+	+	GGX1	+	+	+	+	-	+
LZY14	+	+	+	+	+	+	LZAX	+	+	+	+	-	+
HZG9	+	+	+	+	+	+	WMF16	+	-	+	+	-	+
DAS	+	+	+	+	+	+	GGY2	+	+	+	-	-	-
NNG3	+	+	+	+	+	+	LZY	+	+	+	-	-	-
NNX4	+	+	+	+	+	+	GPDY2	+	-	-	+	-	+
NNG4	+	+	+	+	+	+	CZG5	+	-	+	-	-	+
LZG2	+	+	+	+	+	+	WMG3	+	-	-	+	-	-
LZG5	+	+	+	+	+	+	GGY23	-	-	+	-	+	-
NNX8	+	+	+	+	+	+	GGX23	-	-	+	-	+	-
GGF14	+	+	-	+	+	-							

表 3 47 株嗜水气单胞菌的毒力基因型与致病力的关系
Tab. 3 Correlation of virulence genotypes and pathogenicity of 47 strains of *Aeromonas hydrophila*

毒力基因型 virulence genotype	菌株数/株 number of strains	对黄沙鳖的致死率/% fatality rate of yellow sand turtles		对小鼠的致死率/% fatality rate of mice	
		范围值 range value	平均值 average value	范围值 range value	平均值 average value
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁺ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁺ <i>ahp</i> ⁺	23	100	100	100	100
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁺ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁻ <i>ahp</i> ⁺	7	90.0~100	95.00	75.0~87.5	85.73
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁺ <i>Alt</i> ⁻ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁺ <i>ahp</i> ⁻	9	60.0~80.0	70.56	50.0~75.0	59.04
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁻ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁻ <i>ahp</i> ⁺	1	60.0	60.00	37.5~50.0	37.75
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁺ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁻ <i>ahal</i> ⁻ <i>ahp</i> ⁻	2	20.0~40.0	30.00	0~25.0	12.53
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁻ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁻ <i>ahal</i> ⁻ <i>ahp</i> ⁺	1	20.0	20.00	0	0
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁻ <i>Alt</i> ⁻ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁻ <i>ahp</i> ⁺	1	10.0~20.0	15.00	0	0
<i>hly</i> ⁺ <i>Aer</i> ⁻ <i>Alt</i> ⁻ <i>Act</i> ⁺ <i>ahal</i> ⁺ <i>ahp</i> ⁻	1	10.0~20.0	15.00	0	0
<i>hly</i> ⁻ <i>Aer</i> ⁻ <i>Alt</i> ⁺ <i>Act</i> ⁻ <i>ahal</i> ⁺ <i>ahp</i> ⁻	2	0	0	0	0

因的种类及数量在不同菌株间存在差异。研究证明,嗜水气单胞菌的毒力与其所携带的毒力基因密切相关^[10, 14]。本研究的 47 株黄沙鳖源嗜水气单胞菌广西分离株 6 种毒力基因中,检出率最高

的是 *hly* 基因(95.79%), 最低的是 *ahp*(70.12%), 表明所检的 6 种毒力基因在黄沙鳖源嗜水气单胞菌中广泛存在, 但这些毒力基因在嗜水气单胞菌的致病过程中所起的作用不完全相同。根据本研究结果, 所有携带 *hly* 基因的嗜水气单胞菌菌株对黄沙鳖都有致病力, 均为有毒株, 部分携带 *hly* 基因的菌株对小鼠无致病力。同时携带有 *hly*、*Aer*、*Alt*、*Act*、*ahal*、*ahp* 6 种毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠致病力最强, 当 *ahal* 基因缺失时, 菌株的致病力极显著降低($P<0.01$); 缺失 *Alt*、*ahp* 2 种基因的菌株比只缺失 *ahal* 基因的菌株其致病力显著降低($P<0.01$)。在毒力基因型为 $hly^+Aer^-Alt^+Act^+ahal^-ahp^+$ 和 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^-ahp^+$ 的菌株当中, 由于 *Aer* 基因的缺失, 菌株对黄沙鳖和小鼠致死率均大幅度下降。由于 *Act* 基因的缺失, 毒力基因型为 $hly^+Aer^-Alt^+Act^+ahal^-ahp^+$ 菌株的致病力强于 $hly^+Aer^-Alt^+Act^-ahal^-ahp^+$ 基因型的菌株。对黄沙鳖的致病率为 15.00%~20.00%、对小鼠无致病力的 3 株菌株均缺失 *Aer* 基因。根据基因型分别为 $hly^+Aer^-Alt^-Act^+ahal^-ahp^+$ 和 $hly^+Aer^-Alt^-Act^+ahal^-ahp^-$ 2 株菌株对黄沙鳖的致死率结果, 认为当菌株只携带 *hly* 和 *Act* 基因时, *ahp* 基因的缺失与否对菌株的致病力没有影响。只携带 *Alt* 和 *ahal* 2 种毒力基因的菌株对黄沙鳖和小鼠均无致病力。由此可见, 嗜水气单胞菌对黄沙鳖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* 基因和 *ahal* 基因对菌株的致病力与其他毒力基因之间存在协同作用, *ahp* 基因缺失对菌株的致病力无影响, 这一结果与很多学者在水生动物源嗜水气单胞菌中的研究结果基本吻合, 但与 Aslani 等^[23]在人类医学中 *hly* 基因与菌株的致病力无关的研究结果不同, 与朱大玲等^[10] *ahpA* 阳性菌株皆为毒力株的结果也不一致。结合生产实际, 将对黄沙鳖的致死率达到和超过 50% 的菌株判定为强毒株, 致死率不足 50% 判定为弱毒株时, 毒力基因型为 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^+ahp^+$ 、 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^-ahp^+$ 、 $hly^+Aer^+Alt^-Act^+ahal^+ahp^-$ 和 $hly^+Aer^-Alt^+Act^+ahal^-ahp^+$ 的菌株均为强毒株, 毒力基因型为 hly^+Aer^+

$Alt^+Act^-ahal^-ahp^-$ 、 $hly^+Aer^-Alt^+Act^-ahal^-ahp^+$ 、 $hly^+Aer^-Alt^-Act^+ahal^-ahp^+$ 、 $hly^+Aer^-Alt^-Act^+ahal^-ahp^-$ 的菌株为弱毒株, 毒力基因型为 $hly^-Aer^-Alt^+Act^-ahal^+ahp^-$ 的菌株为无毒株。本研究中, 对黄沙鳖而言, 所有携带 *hly* 基因的菌株均为有毒株, 强毒株均携带至少 4 种毒力基因并同时携带 *hly* 和 *Act* 基因, 弱毒株只携带包括 *hly* 在内的 2 种或 3 种毒力基因, 本研究首次检测到 2 株只携带 *Alt* 和 *ahal* 基因的菌株为无毒株, 因此, 可将 *hly* 基因作为嗜水气单胞菌有毒株的鉴定标准, 携带 *hly* 和 *Act* 基因并同时携带 *Aer*、*Alt*、*ahal*、*ahp* 中的 2 种或 2 种以上毒力基因作为强毒株的鉴定标准。

参考文献:

- [1] Huang X Z, Qian G Y, Li C Y. The genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop region of three geographical populations in *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 17-24. [黄雪贞, 钱国英, 李彩燕. 中华鳖 3 个地理群体线粒体基因 D-loop 区遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 17-24.]
- [2] Zhou L Q, Tong G X, Li X Z, et al. Pathogenic bacterium identification, prevention and cure of "red neck disease" in *Truogx sinensis*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011(10): 106-108. [周靓婧, 童桂香, 黎小正, 等. 一例黄沙鳖红脖子病的病原菌鉴定与防治[J]. 广东农业科学, 2011(10): 106-108.]
- [3] Huang Y H, Huang J, Hu D S, et al. Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenetic bacteria from *Trionyx sinensis* with red abdominal shell disease[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2013, 26(5): 2116-2121. [黄艳华, 黄钧, 胡大胜, 等. 黄沙鳖红底板病原菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 2116-2121.]
- [4] Huang J, Huang Y H, Hu D S, et al. Characterization of white plastron disease pathogens and detection of six known virulence genes in *Truogx sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 844-854. [黄钧, 黄艳华, 胡大胜, 等. 黄沙鳖白底板病原菌的分离鉴定及 6 种毒力基因检测[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 844-854.]
- [5] Tong G X, Wei X X, Li X Z, et al. Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas sobria* from *Truogx sinensis*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010(12): 124-126. [童桂香, 韦信贤, 黎小正, 等. 黄沙鳖温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 广东农业科学, 2010(12): 124-126.]

- [6] Peng Y, Liu J, Hu D S, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of pathogenic bacteria from *Trionyx sinensis* with scabies[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(8): 1296–1301. [彭亚, 刘杰, 胡大胜, 等. 黄沙鳖疥疮病的病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2014, 45(8): 1296–1301.]
- [7] Huang Y H, Huang J, Hu D S, Shi J G, Peng M Y, Peng Y. 2013. Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic bacteria from *Trionyx sinensis* with red abdominal shell disease [J]. Southwest China Journal of Agricultural Science, 26(5): 2116–2121. [罗华平, 施金谷, 彭民毅, 等. 黄沙鳖幼鳖类志贺邻单胞菌病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2013, 44(4): 681–686.]
- [8] Lu C P, Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish disease 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[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282–288.]
- [9] Yang X L, Ke F E, Zhou J G, et al. Virulence of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*[J]. Chinese Academy of Fishery Sciences, 1999, 6(1): 117–121. [杨先乐, 柯福恩, 周剑光, 等. 嗜水气单胞菌对中华鳖致病力的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 117–121.]
- [10] 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[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 82–85.]
- [11] Wang Z Z, Zhao B B, Wang Z F, et al. Phenotype and molecular identification of virulence genes for four pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from a dying *Trionyx sinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 776–783. [王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发, 等. 四株鳖源致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的表型、分子鉴定及其毒力基因检测[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 776–783.]
- [12] Wong C Y F, Heuzenroeder M W, Flower R L. Inactivation of two hemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model[J]. Microbiology, 1998, 144(2): 291–298.
- [13] Gounzález-Serrano C J, Santos J A, García-López M L, et al. Virulence marker in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case[J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(3): 414–419.
- [14] Fu Q F, Qiu J Q, Hu K, et al. The Analyse of virulence factors-pathogenicity relationships of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from China[J]. Journal of Biology, 2011, 28(6): 53–57. [付乔芳, 邱军强, 胡鲲, 等. 嗜水气单胞菌国内分离株的毒力因子分布与致病性相关性分析[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 53–57.]
- [15] 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]. J Appl Microbiol, 2011, 110(3): 823–830.
- [16] Wang G H, Clark C G, Liu C Y, et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1048–1054.
- [17] Heuzenroeder M W, Wong C Y F, Flower L P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 174: 131–136.
- [18] Fang B, Li J N, Wang T J, et al. Cloning and sequence analysis of virulence genes of six *Aeromonas* strains isolated from aquatic animals in Anhui[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 966–972. [方兵, 李瑾年, 汪天杰, 等. 6株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 966–972.]
- [19] Singh V, Rathore G, Kapoor D, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water[J]. Ind J Microbiol, 2008, 48(4): 453–458.
- [20] Granum P E, O'Sullivan K, Tomás J M, et al. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water[J]. FEMS Immunol Med Mic, 1998, 21: 131–137.
- [21] Kingombe C I B, Huys G, Tonolla M, et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.[J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(12): 5293–5302.
- [22] Chu W H, Lu C P. Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 84–88. [储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 84–88.]
- [23] Aslani M M, Hamzeh H S. Characterization and distribution of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from fecal samples of diarrheal and asymptomatic healthy persons, in Ilam, Iran[J]. Iran Biomed J, 2004, 8(4): 199–203.

Studies on the correlation with pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* by *Truogx sinensis*

LIU Jie^{1,2}, HUANG Yanhua^{2,3}, HUANG Jun^{1,2}, HU Dasheng^{2,4}, LIANG Jingzhen^{1,2}, PENG Ya^{1,2}, LONG Su^{1,2}, NIU Zhiwei^{1,2}, HAN Shuyu^{2,4}, ZHI Qiye^{1,2}

1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;
2. Aquatic Animal Diseases Diagnosis Laboratory, Nanning 530005, China;
3. Wuzhou Aquaculture Technology Extending Stations, Wuzhou 543002, China;
4. Guangxi Aquaculture Technology Popularization Station, Nanning 530021, China

Abstract: This study aims to investigate the correlation of the pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Huangsha soft shelled turtle *Truogx sinensis* in different areas of Guangxi Zhuang Autonomous Region. An artificial infection test in Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* and in mice *Mus musculus* was measured on the pathogenicity of the isolated *A. hydrophila* strains, including a PCR assay of detecting the bacterial strains of 6 kinds of virulence genes including *hly*, *Aer*, *Alt*, *Act*, *ahal* and *ahp*. The results were as follows. Forty seven strains of pathogenic *A. hydrophila* isolated from diseased Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* contained 9 kinds of bacterium virulence genotypes in all, including $hly^+ Aer^+ Alt^+ Act^+ ahal^+ ahp^+$, $hly^+ Aer^+ Alt^+ Act^+ ahal^+ ahp^-$, $hly^+ Aer^+ Alt^+ ahal^+ Act^- ahp^+$, $hly^+ Aer^+ Alt^+ Act^- ahal^- ahp^-$, $hly^- Aer^- Alt^+ Act^- ahal^+ ahp^-$, $hly^+ Aer^- Alt^+ Act^+ ahal^- ahp^+$, $hly^+ Aer^- Alt^+ Act^+ ahal^- ahp^+$, $hly^+ Aer^- Alt^+ Act^- ahal^- ahp^+$ and $hly^+ Aer^- Alt^+ Act^+ ahal^- ahp^-$. Around 48.94 percent of the *A. hydrophila* strains carried all the 6 kinds of virulence gene detected, and the genotype of $hly^+ Aer^+ Alt^+ ahal^+ ahp^+$ Act^+ was the main virulence genotype. About 95.79 percent of the *A. hydrophila* strains carried gene *hly*, and all of them were the virulence strains. Our results also showed that pathogenicity of *A. hydrophila* to Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* was the outcome of combined action of multiple virulence genes, among which gene *hly* and *Act* were the key virulence genes, gene *Alt* and *ahal* of the isolated strains had correlated action with other virulence genes, whereas the absence of gene *ahp* had no effect on the pathogenicity of the isolated *A. hydrophila* strains to Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* or to mice *M. musculus* based on the artificial infection test. Strain which caused a fatality rate at or above 50 percent in Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* was determined to be a particularly virulent strain, whereas the one caused a fatality rate below 50 percent was determined to be a low virulent strain. Particularly virulent strains carried at least 4 kinds of virulence genes according to our study, and at the same time *hly* and *Act* genes were both present. Low virulent strains carried only two or three virulence genes besides gene *hly*. The study found for the first time that strains which carried only *Alt* and *ahal* genes have no pathogenicity to mice *M. musculus* or to Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis*. In the detection of the 6 kinds of virulence genes, genes *Alt*, *ahal* and *ahp* were prone to missing. Among all the virulent strains, the strains with different genotypes varied significantly in causing fatalities rates in Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* and in mice *M. musculus* ($P < 0.01$). When any virulence gene is absent, the pathogenicity of the strains with the same genotype contributing to Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* was significantly stronger than to mice *M. musculus* ($P < 0.01$), which indicates that pathogenic *A. hydrophila* isolated from diseased Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* contributes significantly stronger pathogenicity to Huangsha soft shelled turtle *T. sinensis* than to mice *M. musculus*. According to the results of this study, a PCR detection of the virulence gene *hly* could be recommended to infer whether a strain is virulent or not, and the co-existence of virulence genes *hly* and *Act*, as well as two or more virulence genes among *Aer*, *Alt*, *ahal* together with *ahp*, could be considered as a reasonable predictor of the particularly virulent strains.

Key words: *Truogx sinensis*; *Aeromonas hydrophila*; bacterium virulence genes; pathogenicity

Corresponding author: HUANG Jun, E-mail: hj1351@163.com; HU Dasheng, E-mail: 215173842@qq.com