

余露军,李建军,蔡磊,等. 诸氏鲮虾虎鱼出血病病原鉴定及传播途径分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 29-35.

Yu LJ, Li JJ, Cai L, et al. Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae* and its transmission routes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 29-35.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.005

诸氏鲮虾虎鱼出血病病原鉴定及传播途径分析

余露军,李建军,蔡磊,黄韧*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 分离鉴定诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)出血病病原,并探讨其传播途径,为虾虎鱼微生物质量控制提供技术依据。**方法** 从患出血病虾虎鱼肝脏取样分离病原菌,经菌落形态、生化特性和分子特征鉴定细菌,回归感染确定其致病性,并采用双重 PCR 方法对虾虎鱼、轮虫、卤虫、水进行嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)检测。**结果** 分离到 1 株优势菌 PYMc15-1,该菌株 API 生化反应结果与嗜水气单胞菌一致,*gryB* 序列与 GenBank 上的嗜水气单胞菌相应基因序列同源性最高;根据已知序列构建 *gryB* 分子系统进化树,分离株 PYMc15-1 与嗜水气单胞菌聚类;分离株 PYMc15-1 溶血素基因(*hlyA*)和气溶素基因(*aerA*)检测结果阳性,对虾虎鱼半致死剂量(median lethal dose,LD₅₀)为每尾 1.2×10⁴cfu。野生虾虎鱼、卤虫和野生轮虫致病性嗜水气单胞菌检测出现阳性结果,虾虎鱼封闭群、室内培育的轮虫以及海水样品致病性嗜水气单胞菌检测均为阴性。**结论** 嗜水气单胞菌可自然感染虾虎鱼;野生虾虎鱼和生物饵料是其潜在传播媒介,引进虾虎鱼和生物饵料时应检测该病原。

【关键词】 诸氏鲮虾虎鱼;嗜水气单胞菌;生物饵料;传播途径

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0029-07

Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae* and its transmission routes

YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, HUANG Ren*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 Objective To isolate and identify the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae*, and to investigate its route of transmission, providing a technical basis for microbial quality control in *M. chulae*. **Methods** The pathogen was isolated from the liver of diseased *M. chulae*. The morphological, biochemical, and molecular characteristics were used to identify the isolated bacteria. An artificial infection experiment was carried out to assess the pathogenicity of isolated strains. Double PCR of *Aeromonas hydrophila* virulence genes was used to screen samples of *M. chulae*, *Brachionus plicatilis*, *Artemia* nauplii, and water. **Results** The dominant strain PYMc15-1 was isolated from diseased *M. chulae*. The characteristics (API ID32E) of PYMc15-1 corresponded to *A. hydrophila*. The gyrase subunit B (*gryB*) gene sequence of the strain possessed high similarity with those of *A. hydrophila* registered in GenBank. Phylogenetic tree analysis of *Aeromonas* based on the *gryB* gene showed that strain PYMc15-1 clustered together with *A. hydrophila*. The hemolysin (*hlyA*) and gas lysin (*aerA*) genes could be amplified from the strain PYMc15-1, and the

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).

[作者简介] 余露军(1982—),男,硕士,工程师,研究方向:水生实验动物微生物学。Email: ljyu1212@163.com

[通信作者] 黄韧(1959—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

median lethal dose (LD_{50}) of PYMc15-1 to healthy *M. chulae* was 1.2×10^4 cfu/fish. Wild *M. chulae*, *Artemia* nauplii, and wild *B. plicatilis* were positive for pathogenic *A. hydrophila*, while the closed colony of *M. chulae*, indoor cultured *B. plicatilis*, and seawater samples were negative for pathogenic *A. hydrophila*. **Conclusions** *A. hydrophila* can naturally infect *M. chulae*. For wild *M. chulae*, living feeds are potential vectors of *A. hydrophila*. *A. hydrophila* should be tested when introducing *M. chulae* and living feeds.

[Keywords] *Mugilogobius chulae*; *Aeromonas hydrophila*; living feeds; transmission routes

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

诸氏鲮虾虎鱼 (*Mugilogobius chulae*) 属于鲈形目 (Perciformes)、虾虎鱼亚目 (Gobioidei)、虾虎鱼科 (Gobiidae)、鲮虾虎鱼属 (*Mugilogobius*), 在我国南海、东海等西太平洋近海海域广泛分布, 是我国实验动物化水平最高的本土海洋实验鱼类, 具有体形小、胚胎透明、繁殖量大、繁殖周期短等特点^[1]。虾虎鱼已在海洋环境重金属^[2]、多环芳烃^[3]等多种污染物的毒性评价和疾病模型研究^[4]中广泛应用, 显示出良好的应用前景。

广东省实验动物监测所先后开展虾虎鱼全人工繁殖、封闭群和近交系培育, 以及种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料及环境设施等质量控制标准体系研究^[1], 其中病原项目是虾虎鱼质量控制的重要内容。目前, 已有迟缓爱德华菌^[5]、创伤弧菌^[6]感染引起虾虎鱼“溃烂病”和“败血症”的研究报道, 而对虾虎鱼“出血病”的病原研究尚未见报道。石斑鱼、对虾等多种水生经济动物研究表明, 外来动物个体、生物饵料、水源是水生动物病原传播的主要途径^[7-8]。相对经济鱼类而言, 实验鱼的养殖条件相对封闭和可控, 病原传播途径和风险也可能有所不同, 但相关研究鲜有报道。本文对野外采样的患出血病虾虎鱼进行病原分析, 并对不同来源的海水、生物饵料、鱼体等样品进行了病原检测, 探讨实验鱼病原传播途径, 为虾虎鱼微生物质量控制及病原防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

患病诸氏鲮虾虎鱼体长 2.5 ~ 3.5 cm, 取自深圳大鹏湾野生群。回归感染实验用诸氏鲮虾虎鱼为本实验室封闭群子 14 代, 4 ~ 5 月龄, 体长 2.5 ~ 3.0 cm, 循环水养殖, 盐度 20 ~ 22, 温度 25 ~ 27℃, 光照: 黑暗时间为 14 h: 10 h。

1.1.2 试剂与仪器

脑心浸液培养基 (Brain Heart Infusion Medium, BHI) (广州环凯公司, 中国); 细菌基因组试剂盒 (天根公司, 中国); Taq 酶 (TaKaRa, 日本)。

生物显微镜 (Nikon Ci-S, 日本); 电子天平 (常熟双杰测试仪器厂, 中国); ATB 全自动细菌鉴定仪 (梅里埃公司, 法国); PCR 扩增仪 (Techne Prime, 英国); 凝胶电泳仪和成像系统 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化

挑选腹部红肿的个体, 无菌操作解剖病鱼, 并从肝脏部位取样划线接种于 BHI 平板, 28℃ 恒温培养 24 h 后, 挑取优势菌落在同样条件下进行纯化培养, 用于细菌鉴定。

1.2.2 细菌鉴定

(1) 生化鉴定: 观察分离纯化的菌落形态, 并通过革兰氏染色、氧化酶试验以及 API ID32E 试剂条进行鉴定。

(2) 分子生物学鉴定: 按细菌基因组试剂盒说明书提取新鲜培养菌液的 DNA, 按 Zhang 等^[9]的方法对嗜水气单胞菌 *gryB* 基因进行 PCR 扩增, 参照饶静静等^[10]的方法对嗜水气单胞菌溶血素基因 (*hlyA*) 和气溶素基因 (*aerA*) 进行双重 PCR 扩增 (引物浓度 1:3), 引物序列见表 1。 *gryB* 基因 PCR 反应条件为: 95℃ 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。 *aerA* 和 *hlyA* 基因双重 PCR 反应条件为: 95℃ 4 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。 *gryB* 基因 PCR 产物纯化后送上海生工进行序列测定, 测序结果在 NCBI 进行 Blast 分析, 选取相似序列 MEGA 4 软件构建系统发育树。

1.2.3 回归感染

挑取优势菌纯化后的单菌落接种于 BHI 液体

表 1 试验所用引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增产物(bp)
Gene name	Primer sequence(5'-3')	Size of products(bp)
<i>gryB</i>	GCCGAGCCCGACCATCTTCAG AGATCATCTTGTGCAACGGGC	875
<i>hlyA</i>	ACCTCAACGTCAACCGCAAGAT GTCTGCGCTTGTCCGGTATCCTC	876
<i>aerA</i>	GCAGAGCCCGTCTATCCAGA CTCCAGCCTCAGGCCTTGAC	1332

培养基,28℃、180 r/min 震荡培养 24 h,新鲜培养的菌液 6000 r/min 离心 3 min 后,弃上清,无菌生理盐水重悬,用 ATB 比浊仪将菌液等比稀释至 $1.8 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^4$ cfu/mL。选取健康诸氏鲮虾虎鱼封闭群个体,每组 10 尾,腹腔注射,每尾注射 0.02 mL 菌液,同时设置生理盐水对照组。人工感染期间不投喂,静水养殖,水温 25 ~ 26℃,盐度 20 ~ 22,每天记录死亡数量并及时捞出死鱼,连续观察 10 d。按周一平^[11]的方法计算半致死量(median lethal dose, LD₅₀)。从感染后症状明显的个体肝脏组织再次进行细菌分离和回归感染。

1.2.4 病原传播途径分析

(1)样品采集

2016 年 3 月 ~ 6 月,先后从深圳大鹏湾、番禺南沙以及惠州大亚湾采集野生虾虎鱼(共 3 批次),3、5、8 月分别取本实验室培育的虾虎鱼封闭群(4 ~ 5 月龄,体长 2.5 ~ 3.0 cm,共 3 批次);从海南琼海、福建漳州、惠州大亚湾购买野生轮虫(各 2 批次),3、5、8 月分别取本室内培育轮虫(共 3 批次);从广州芳村花鸟鱼虫市场购买市售 6 个商品化的卤虫卵;3、5、8 月分别取购买的天然海水和封闭群养殖水样品(各 3 批次)。各批次样品取样方法如下:

鱼:随机取 3 尾虾虎鱼的肝、脾组织混合为一个样品;卤虫:卤虫卵在实验条件下[漂白水消毒处理的洁净海水盐度 28 ± 2 ,水温 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照 2000 Lux]孵化 24 h 后,新孵出的卤虫无节幼体经洁净海水清洗 3 次,取 0.1 mg(鲜重)卤虫无节幼体作为一个样品;轮虫:轮虫用 300 目纱绢网收集,并用洁净海水清洗 3 次,取 0.1 mg(鲜重)轮虫作为为一个样品;水:随机取新购天然海水和虾虎鱼封闭群养殖水各 10 mL 为一个样品。

(2)样品处理

无菌条件下,将鱼的肝脾组织、卤虫、轮虫匀浆后,按体积比 1:9 加入灭菌碱性蛋白胍水;水样 8000 r/min 离心 3 min 后,弃上清,用 10 mL 灭菌碱性蛋

白胍水重悬;28℃、150 r/min 增菌培养 12 h 后,取 2 mL 增菌液 12000 r/min 离心收集细菌,采用细菌基因组试剂盒提取总 DNA。

(3)样品检测

按 1.2.2(2)的方法对嗜水气单胞菌毒力基因 *hlyA* 和 *aerA* 进行双重 PCR 扩增,检测致病性嗜水气单胞菌。

2 结果

2.1 诸氏鲮虾虎鱼出血病症状

患病虾虎鱼身体发黑,聚群沉底,活力下降,反应迟钝;腹部(尤其是肛门处)红肿充血;下颌及胸鳍、腹鳍基部出血,鳍条缺损;剖检可见腹腔有积水,肠系膜有出血点,并附着淡红色粘液。

2.2 分离株形态与生化特性

从临床症状典型个体的肝脏部位分离获得优势菌(编号 PYMc15-1),BHI 平板 28℃ 培养 24 h 后,PYMc15-1 菌落呈圆形凸起、淡黄色、半透明、表面光滑、直径约 1.0 ~ 1.5 mm,有特殊气味。革兰氏染色显示为阴性、杆菌,氧化酶反应为阳性。ATB 全自动细菌鉴定仪鉴定为嗜水气单胞菌,鉴定结果 ID:99.9%,T 值:0.72,详细生化结果见表 2。回归感染后二次分离的优势菌 PYMc15-1' 生化特性与 PYMc15-1 一致。

2.3 gryB 基因序列分析

菌株 PYMc15-1 经嗜水气单胞菌 *gryB* 基因引物 PCR 扩增获得 800 bp 左右目的片段, *hlyA* 和 *aerA* 基因双重 PCR 扩增获得 800 bp 和 1300 bp 左右目的片段(图 1)。*gryB* 产物序列 Blast 分析结果显示,菌株 PYMc15-1 与 GenBank 上登陆的嗜水气单胞菌(登录号 KX822741) 同源性最高(98.5%)。菌株 PYMc15-1 *gryB* 序列聚类分析显示,PYMc15-1 与嗜水气单胞菌自然聚类(图 2)。上述结果表明,菌株 PYMc15-1 为嗜水气单胞菌,并具有潜在的致病性。

2.4 人工感染

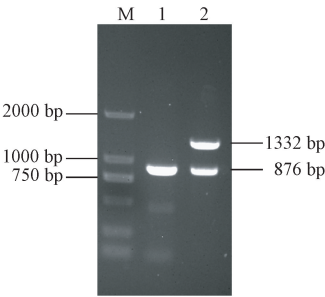
人工感染健康虾虎鱼后第 2 天开始出现死亡,第 3 天、第 4 天为高峰,死亡个体腹部和肛门红肿充血,腹腔有大量积水。从第 4 天死亡个体肝脏部位分离细菌,获得优势菌 PYMc15-1,再次回归感染健康虾虎鱼,出现相似症状,表明本次试验分离的优势菌 PYMc15-1 为虾虎鱼出血病病原。

表 2 菌株 PYMc15-1 生化鉴定结果

Table 2 Results of biochemical identification of strain PYMc15-1

生化指标 Biochemical indicator	结果 Result	生化指标 Biochemical indicator	结果 Result
柠檬酸盐利用 Citrate assimilation	+	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+
衣康酸盐同化 Itaconate assimilation	-	肌醇 Inositol	-
2-酮基-葡萄糖 2-Keto-Gluconate glucose	-	5-酮基-葡萄糖 5-Keto-Gluconate	-
组氨酸同化 Histidine assimilation	+	糖原 Glycogen	+
麦芽糖 Maltose	+	L-岩藻糖 L-Fucose	-
甘露醇 d-Mannitol	+	葵酸盐 Kelly	+
丙氨酸同化 Alanine assimilation	+	乙酸盐 Acetate	+
3-羟基-丁酸盐 3-Hydroxy-Butyrate	-	d-葡萄糖 D-Glucose	+
DL-乳酸盐同化 DL-Lactate assimilation	+	辛二酸盐同化 Suberate assimilation	-
鼠李糖 Rahnnose	-	山梨醇 Sorbitol	-
丙酸盐同化 Propionate assimilation	+	丝氨酸同化 Serine assimilation	+
水杨素 Salicin	+	蔗糖 Saccharose	+
戊酸盐同化 Valerate assimilation	+	脯氨酸 Proline	+
4-羟基-苯甲酸盐同化 4-Hydroxy-Benzoate assimilation	-	N-乙酰葡萄糖胺 N-Acetylglucosamine	+
丙二酸 Malonic acid	-	d-核糖 D-ribose	+
d-蜜二糖 D-Honey disaccharide	-	3-羟基-苯甲酸盐同化 3-Hydroxy-Benzoate assimilation	-

注：“+”阳性；“-”阴性。
Note. “+” is positive; “-” is negative.



注:M 为 DL2000 bp Marker; 1 为 gryB 基因 PCR 产物;2 为 aerA 基因和 hlyA 基因双重 PCR 产物。

图 1 菌株 PYMc15-1 gryB 基因、aerA 基因和 hlyA 基因 PCR 检测电泳图

Note. M, DNA Marker DL 2000. 1, PCR product of gryB gene. 2, PCR products of aerA gene and hlyA gene.

Figure 1 Electropherogram of strain PYMc15-1 gryB gene, aerA gene and hlyA gene of detected by PCR

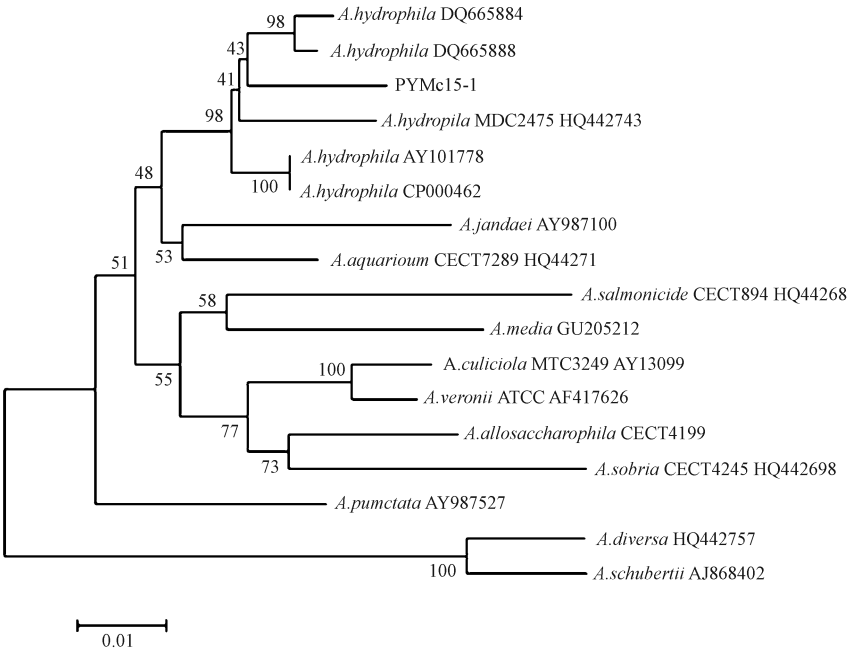
不同浓度的 PYMc15-1 菌液人工感染试验结果显示,2.1×10⁸ cfu/mL 浓度组实验鱼全部死亡,生理盐水对照组实验鱼无死亡,菌株 PYMc15-1 对虾虎鱼的 LD₅₀为每尾 1.2×10⁴ cfu(表 3)。

2.5 虾虎鱼、生物饵料及水的致病性嗜水气单胞菌检测

PCR 检测结果显示,野生虾虎鱼(1/3)、卤虫无节幼体(1/6)和野生轮虫(2/6)分别检出致病性嗜水气单胞菌,室内培育的轮虫以及天然海水、虾虎鱼封闭群养殖水均未检出致病性嗜水气单胞菌。

3 讨论

本研究从患病虾虎鱼肝脏分离到优势菌株 PYMc15-1,经生物学特性、生化鉴定和 gryB 基因序列同源性分析,鉴定为嗜水气单胞菌,并通过回归感染确定为虾虎鱼出血病病原,对虾虎鱼具有较强的致病性(LD₅₀为每尾 1.2×10⁴ cfu),为我国海水实验鱼——虾虎鱼感染嗜水气单胞菌的首次报道。嗜水气单胞菌属弧菌科、气单胞菌属,广泛存在于水体、淤泥等环境中,具有广泛的致病性,可引起多种海、淡水水生动物爆发性出血病,常造成水产养殖重大的经济损失^[12-13]。嗜水气单胞菌也是我国农业部《一、二、三类动物疫病病种名录》(2008 年)规定的二类疫病病原,需要采取严格控制、扑灭等措施,防止扩散的病原^[14]。同时,我国淡水实验鱼斑马鱼和剑尾鱼已有嗜水气单胞菌感染导致细菌性败血症的报道^[15-16];国内 19 家斑马鱼实验室调研结果发现,斑马鱼竖鳞、腹水是常见病害症状,虽然其病原尚未研究证实,但由于该症状与嗜水气单胞菌感染鱼类引起的临床症状类似^[17-18],因此斑马鱼“竖鳞病”、“腹水病”很可能与嗜水气单胞菌感染有关。上述结果表明,嗜水气单胞菌对虾虎鱼、斑马鱼等海、淡水实验鱼均具有严重危害,在实验鱼生产和实验过程中应引起足够的重视并加以控制。



注：节点处数值为自展重复 1000 次的置信值。

图 2 基于气单胞菌属 *gryB* 基因序列的系统发育树

Note. The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1000 repetitions).

Figure 2 Phylogenetic tree based on *gryB* gene sequences of *Aeromonas*

表 3 菌株 PYMc15-1 对虾虎鱼攻毒试验结果

Table 3 Results of of challenge test with strain PYMc15-1 in *M. chulae*

菌液浓度 (cfu/mL) Bacterial concentration (cfu/mL)	试验鱼数 (尾) Number of test fish	死亡数 (尾) Number of deaths	半致死浓度 (cfu/fish) LD ₅₀ (cfu/fish)
2.1 × 10 ⁸	10	10	1.2 × 10 ⁴
2.1 × 10 ⁷	10	7	
2.1 × 10 ⁶	10	5	
2.1 × 10 ⁵	10	4	
2.1 × 10 ⁴	10	3	
生理盐水 Physiological saline	10	0	

gyrB 是普遍存在于细菌中编码 DNA 促旋酶亚基 B 蛋白的单拷贝基因,每 100 万年的平均碱基替换率为 0.7% ~ 0.8%,其进化速率较 16S rRNA 快,且不发生水平转移,特别适用于气单胞菌、芽孢杆菌等近缘种的区别和鉴定^[19-20]。气单胞菌属中常见的鱼类病原菌多达 20 余种,其中多个菌种亲缘关系接近,通过 16S rRNA 基因序列分析无法有效区分^[21]。本研究对生化鉴定为嗜水气单胞菌的分离株 PYMc15-1 进行 *gyrB* 基因测序分析,其序列与已知的嗜水气单胞菌(登录号 KX822741)同源性达 98.5%,与同属不同种的温和气单胞菌(HQ442698)同源性则低于 91.7%,显示出较高的分辨率,可判定分离株 PYMc15-1 为嗜水气单胞菌。值得注意的是,嗜水气单胞菌有致病性菌株和非致病性菌株之分,朱大玲等^[22]、王远微等^[23]研究发现,只有致

病性嗜水气单胞菌 *aerA* 基因呈阳性扩增;饶静静等^[10]在致病性嗜水气单胞菌中至少扩增到 *aerA* 或 *hlyA* 基因的一种,可见 *aerA* 基因和 *hlyA* 基因是致病性嗜水气单胞菌最为关键的毒力基因。本实验对分离株 PYMc15-1 *aerA* 基因和 *hlyA* 基因进行检测,结果显示为阳性;回归感染试验也表明该菌株对虾虎鱼具有致病性,表明分离株 PYMc15-1 为致病性嗜水气单胞菌。

PCR 检测方法已成为国外大型实验动物机构在实施实验动物质量监测和病原体诊断中的重要手段,在我国啮齿类实验动物病原检测中已有较多应用^[24-25]。病原的传播主要有水平传播和垂直传播两种途径,大多数水生动物病原的传播以水平传播为主^[26]。本研究采用嗜水气单胞菌 *hlyA* 基因和 *aerA* 基因特异性引物对虾虎鱼养殖过程相关的鱼、

生物饵料、水等样品进行致病性嗜水气单胞菌检测,结果发现,野生虾虎鱼、卤虫和野生轮虫部分样品检出阳性,表明野生鱼体、卤虫和野生轮虫是嗜水气单胞菌潜在的传播媒介,这与 Yan 等^[27]、Zhang 等^[28]、宋晓玲等^[29] 研究结果一致。本实验中虾虎鱼封闭群及其养殖水、室内净化培育的轮虫均未检出致病性嗜水气单胞菌,说明通过鱼体隔离净化、水体消毒以及轮虫净化培育能有效控制病原的传播。不同来源、不同批次的 6 个卤虫样品检测中,有 1 个样品检出致病性嗜水气单胞菌,表明通过病原检测筛选合格的卤虫是必要的。鉴于生物饵料可能携带病原的情况,建议使用生物饵料时应采用净化培育、消毒等处理措施,并对各批次生物进行病原检测,以控制其病原微生物质量。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李建军, 余露军, 蔡磊, 等. 诸氏鲮虾虎鱼实验动物化研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 493-498.
Li JJ, Yu LJ, Cai L, et al. Advances in research on *Mugilogobius chulae*, a laboratory marine fish resource[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 493-498.
- [2] Guo Z, Gao N, Wu Y, et al. The simultaneous uptake of dietary and waterborne Cd in gastrointestinal tracts of marine yellow stripe goby *Mugilogobius chulae*[J]. Environ Pollut, 2017, 223(4): 31-41.
- [3] Cai L, Li JJ, Yu LJ, et al. De novo transcriptome assembly of the new marine fish model of goby, *Mugilogobius chulae* [J]. Mar Genomics, 2018, 2018: 18-20.
- [4] 余露军, 李建军, 魏远征, 等. GFP 标记的迟缓爱德华菌感染诸氏鲮虾虎鱼后组织分布研究 [J]. 海洋科学, 2018, 42(6): 57-62.
Yu LJ, Li JJ, Wei YZ, et al. Infection kinetics of GFP-labeled *Edwardsiella tarda* in *Mugilogobius chulae* [J]. Mar Sci, 2018, 42(6): 57-62.
- [5] 余露军, 苗宗余, 蔡磊, 等. 诸氏鲮虾虎鱼“溃烂病”病原及其致病影响因子分析[J]. 南方水产科学, 2018, 14(5): 45-52.
Yu L, Miao ZY, Cai L, et al. Pathogenicity and impact factors of pathogen causing ulcer disease on *Mugilogobius chulae*[J]. South Chin Fish Sci, 2018, 14(5): 45-52.
- [6] 余露军, 蔡磊, 陈小曲, 等. 诸氏鲮虾虎鱼致病性创伤弧菌的分离与鉴定[J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 51-54.
Yu LJ, Cai L, Chen XQ, et al. Isolation and identification of pathogenic *Vibrio vulnificus* from diseased *Mugilogobius chulae* [J]. Prog Vet Med, 2015, 36(9): 51-54.
- [7] 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究[J]. 福建水产, 2011, 33(5): 15-19.
Lin KB, Fang QS, Wu JS, et al. Preliminary study on breaking transmission of NNV *Epinephelus coioides* [J]. Fujian Fish, 2011, 33(5): 15-19.
- [8] Yan DC, Dong SL, Huang J, et al. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish [J]. J Invertebr Pathol, 2007, 94(2): 144-148.
- [9] Zhang D, Zhang Q, Li A, et al. Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria [J]. Lett Appl Microbiol, 2014, 59(5): 471-478.
- [10] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-755.
Rao JJ, Li SS, Huang KH, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *aeromonas hydrophila* and its preliminary application [J]. J Fish Sci Chin, 2007, 14(5): 749-755.
- [11] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. 药学进展, 2003, 27(5): 314-316.
Zhou YP. The calculation of LD50 in new drugs with software SPSS [J]. Prog Pharm Sci, 2003, 27(5): 314-316.
- [12] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2008, 27(1): 78-86.
Shen JY. Research progress on *Aeromonas hydrophila* [J]. J Zhejiang Ocean Univ, Nat Sci, 2008, 27(1): 78-86.
- [13] 徐阳, 姚洪, 乔帆, 等. 养殖大菱鲆感染嗜水气单胞菌的分离、毒力分析及 ERIC-PCR 分型 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(4): 430-434.
Xu Y, Yao H, Qiao K, et al. Isolation, virulence and ERIC-PCR genotyping of *Aeromonas hydrophila* in farmed turbot *Scophthalmus maximus* [J]. J Dalian Ocean Univ, 2018, 33(4): 430-434.
- [14] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 淡水鱼细菌性败血症 [J]. 中国水产, 2011, 38(3): 54-55.
Chen AP, Jiang YL, Qian D, et al. Freshwater fish bacteria septicemia [J]. J Fish Chin, 2011, 38(3): 54-55.
- [15] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病原菌的分离检测及其致病性研究 [D]. 上海: 东华大学; 2014.
Yang C. Isolation and detection of common pathogenic bacteria and associated pathogenic research in laboratory zebrafish [D]. Shanghai: Donghua University; 2014.
- [16] 潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.
Pan HJ, Wu SQ, Li KB, et al. Application of *Xiphophorus helleri* to detection of virulence of fish pathogenic bacteria [J]. J Fish Chin, 2000, 24(5): 467-471.
- [17] 罗辉, 杨月静, 向梦斌, 等. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血液生化指标与组织病理学研究 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(4): 44-50.
Luo H, Yang YJ, Xiang MB, et al. Blood biochemical indices and histopathology of the *Schizothorax prenanti* during early stage of infection by *Aeromonas hydrophila* [J]. Freshwater Fish, 2017, 47(4): 44-50.
- [18] 黄钧, 施金谷, 黄艳华, 等. 罗非鱼竖鳞病病原菌的分离鉴

- 定及药敏试验 [J]. 南方农业学报, 2012, 43(8): 1230-1234.
- Huang J, Shi JG, Huang YH, et al. Isolation and identification of lepidorthosis pathogenic bacteria in tilapia and its drug sensitivity test [J]. J South Agric, 2012, 43(8): 1230-1234.
- [19] 李猷梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶 (gyrase) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用 [J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
- Li XM, Wang XF, Yang HY, et al. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria—A review [J]. Acta Microbio Sin, 2008, 48(5): 701-706.
- [20] Wang L, Lee F, Tai C, et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(8): 1846-1850.
- [21] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1170-1177.
- Deng GC, Jiang XY, Ye X, et al. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic grass carp [J]. Microbiol Chin, 2009, 36(8): 1170-1177.
- [22] 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.
- Zhu DL, Li AH, Wang JG, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni, Nat Sci, 2006, 45(1): 82-85.
- [23] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 [J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
- Wang YW, Tang C, Yu XH, et al. Detecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish by triplex PCR [J]. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(7): 947-951.
- [24] 戴方伟, 宋晓明, 卢领群, 等. PCR-测序法对嗜齿类动物汉坦病毒的检测和基因分型 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 44-49.
- Dai FW, Song XM, Lu LQ, et al. PCR sequencing for detection and gene typing of hantavirus isolated from rodents [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 44-49.
- [25] 范薇, 隋丽华, 刘大伟, 等. 实验动物 CAR 杆菌 16SrRNA 基因 PCR 监测方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(4): 308-311.
- Fang W, Sui LH, Liu DW, et al. Establishment of a PCR assay for detection of cilia-associated respiratory bacillus in laboratory animals based on 16SrRNA gene fragment sequence [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(4): 308-311.
- [26] 刘萍, 孔杰, 孟宪红, 等. 白斑综合症病毒 (WSSV) 在对虾养殖过程中传播途径的调查 [J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3): 9-12.
- Liu P, Kong J, Meng XH, et al. Investigation of the transmission route during the artificial culture of shrimps with the white spot syndrome virus [J]. Prog Fish Sci, 2000, 21(3): 9-12.
- [27] Yan DC, Feng SY, Huang J, et al. Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 423-426.
- [28] Zhang J, Dong S, Dong Y, et al. Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission [J]. Vet Res Commun, 2010, 34(1): 25-32.
- [29] 宋晓玲, 史成银, 黄健, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 36-40.
- Song XL, Shi CY, Huang J, et al. Investigation and study on carrying status of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in shrimps and other aquatic animals by dot-blot hybridization [J]. J Fish Sci Chin, 2001, 8(4): 36-40.

[收稿日期] 2019-12-03