

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.11.005

任朝颖, 高宣, 贺蝶, 等. 杂交鲟源鲁氏耶尔森菌的分离鉴定及致病性和药敏特性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(11): 54-66.

杂交鲟源鲁氏耶尔森菌的分离鉴定及致病性和药敏特性分析

任朝颖¹, 高宣¹, 贺蝶¹, 李杨¹, 李芳¹,
薛洋², 翟旭亮², 吕光俊¹, 朱成科¹

1. 西南大学 水产学院/淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 荣昌 402460;
2. 重庆市水产技术推广总站, 重庆 401120

摘要: 为鉴定重庆彭水某养殖场杂交鲟(西伯利亚鲟 *Acipenser. baerii* ♀ × 史氏鲟 *Acipenser. schrenckii* ♂)大量死亡的病原体, 从病症明显的杂交鲟肝脏中分离获得 1 株优势菌株 PSHS。通过对分离菌株的形态学特征、生理生化特征及 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* 和 *cpn60* 基因序列进行鉴定, PCR 检测毒力基因携带情况, 人工回归感染实验确定其致病性, K-B 纸片法对菌株进行耐药性测定, 并通过组织切片观察病理变化。结果表明: 优势菌株 PSHS 为鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*), 该菌含有 *yhlA*, *yrp1*, *yrpA*, *OmpF*, *ampC* 5 种毒力基因, 对杂交鲟的半数致死量(LD_{50})为 1.8×10^6 CFU/mL, 且发病症状与自然患病相似。药敏结果显示: 菌株 PSHS 对左氧氟沙星、氟苯尼考等 6 种药物表现出高度敏感; 对阿莫西林、杆菌肽等 21 种抗生素表现耐药。组织病理学观察表明: 杂交鲟肝、脾、肾、肠、鳃均有不同程度的损伤, 其中以肝细胞变性空泡化和肝血窦充血扩张、肾小球萎缩且炎性细胞浸润、肠绒毛坏死脱落及肌肉层充血表现最为明显。

关 键 词: 杂交鲟; 鲁氏耶尔森菌; 分离鉴定; 致病性; 药敏特性

中图分类号: S941.42 **文献标志码:** A

文 章 编 号: 1673-9868(2024)11-0054-13

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Identification and Pathogenicity Observation of *Yersinia ruckeri* from Hybrid Sturgeon (*Acipenser. baerii* ♀ × *Acipenser. schrenckii* ♂)

REN Chaoying¹, GAO Xuan¹, HE Die¹,
LI Yang¹, LI Fang¹, XUE Yang², ZHAI Xuliang²,
LYU Guangjun¹, ZHU Chengke¹

收稿日期: 2023-08-02

基金项目: 重庆市水产科技创新重点攻关项目(4322200160); 重庆市技术创新与应用发展项目(cstc2020jscx-lyjsAX0011); 重庆市生态渔业体系资助项目(4322190028).

作者简介: 任朝颖, 硕士研究生, 主要从事水产动物健康养殖研究.

通信作者: 朱成科, 副教授.

1. College of Fisheries, Southwest University / Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Rongchang Chongqing 402460, China;
2. Chongqing Fisheries Technical Extension Center, Chongqing 401120, China

Abstract: In order to identify the pathogenic bacteria causing massive death of hybrid sturgeon in a breeding farm in Pengshui, Chongqing, a dominant strain named PSHS was obtained from the liver of diseased hybrid sturgeon. The isolated strains were identified by morphological observation, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *cpn60* gene sequence analysis. The virulence gene was detected by PCR, pathogenicity was determined by recursive infection test, drug resistance was determined by K-B disk method, and pathological changes were observed by biopsy. The identification results showed that the dominant strain PSHS was *Yersinia ruckeri* based on morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics and molecular biological identification results. Virulence gene detection results show that the bacteria containing *yhlA*, *yrp1*, *yrpA*, *OmpF* and *ampC* 5 kinds of virulence genes by PCR assay. The recursive infection test showed that the LD_{50} of strain PSHS to hybrid sturgeon was 1.8×10^6 CFU/mL, and the symptoms were similar to those of natural disease. The results of antibiotic resistance test showed that strain PSHS was highly sensitive to levofloxacin, florfenicol and other six drugs. It was resistant to 21 kinds of antibiotics such as penicillin and erythromycin. Histopathological analysis showed that liver, spleen, kidney, intestine and gill of hybrid sturgeon had varying degrees of lesions, among which the most obvious lesions were hepatocyte degeneration and vacuolation, hepatic sinus congestion and dilatation, glomerular atrophy and inflammatory cell infiltration, intestinal villus necrosis and loss, and intestinal muscle layer congestion. This study reported that the strain of *Y. ruckeri* PSHS has strong pathogenicity to hybrid sturgeon, which provides a new reference for effective treatment of the disease caused by this strain and safe drug use in breeding and production.

Key words: hybrid sturgeon (*Acipenser. baerii* ♀ × *Acipenser. schrenckii* ♂); *Yersinia ruckeri*; isolation and identification; pathogenicity; antibiotic susceptibility

鲟隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲟形目(Acipenseriformes)、鲟科(Acipenseridae)、鲟属(*Acipenser*)，距今已有 2 亿年的历史，有“水中活化石”的称号^[1-2]。鲟鱼味道鲜美，肉质可口，骨可成胶，具有多种人体必需的氨基酸，同时具有极高的食用价值，而雌鱼卵所生产的鱼子酱更是富含多种微量元素、氨基酸和蛋白质，是被誉为“黑色黄金”的高档食品，也是“世界三大珍馐”之一^[2-3]。除食用价值外，鲟还具有药用和观赏价值，加之其对环境因素的高要求，使其成为了特色名优经济鱼类，深受广大消费者的青睐。2021 年我国鲟养殖产量为 121 875 t，较上一年增长 16.87%^[4]，养殖产量占世界产量的 85% 以上，在世界鲟养殖国家中，我国已位列第一^[2]，且产量呈现逐年上升的趋势。我国鲟养殖种类目前已有 10 余种。大力发展鲟绿色养殖，可助力水产养殖模式创新以及推动生产技术的提升，引领和助推乡村振兴，促进一、二、三产业的深度融合，实现鲟产业的可持续发展。近年来，由于鲟养殖产业设施化、规模化和集约化程度的不断提高，致使鲟养殖过程中病害频发，尤其以细菌性疾病的暴发最为突出，不仅造成巨大的经济损失，还严重阻碍了鲟产业的绿色健康可持续发展^[5]。目前已报道的鲟主要致病菌有气单胞菌属的致病菌^[6-8]，以及其他种属的致病菌^[9-12]。在致病菌的鉴定中，以具有高度保守性的 16S rRNA, *gyrB* 基因序列为模板的分子生物学鉴定方法因具有灵敏性高、准确性强等特点而被广泛运用，结合 *rpoB*, *cpn60* 这两种具有更强分辨力的管家基因进行鉴定，可有效避免扩增出现异质性，弥补同属近缘种间分辨不足的缺陷^[13]。

2022 年 7 月, 重庆市彭水县某大型养殖场出现养殖杂交鲟发病现象, 其主要行为及体表特征表现为游动缓慢, 摄食量下降, 嘴部、下颌、胸鳍、腹鳍及泄殖孔附近有明显的出血点或血斑, 剖检可见淡红色血水充满腹腔、鱼体壁肌肉充血、肠道可见明显红肿, 发病时水温 20.5 °C, 发病率高达 45%, 死亡率约为 15%。为探究造成养殖鲟发病死亡的病因, 本研究从患病杂交鲟的肝脏中分离得到优势菌株并命名为 PSHS, 其致病性通过人工回归感染实验进行验证, 同时根据形态学特征、生理生化特性及 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *cpn60* 基因序列同源性分析结果进行综合鉴定, 之后进行药敏实验、毒力基因分析及组织病理学研究, 旨在为该致病菌引起的杂交鲟疾病的准确诊断提供参考依据, 也为有效防治该疾病提供科学指导和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

具有典型患病症状的杂交鲟取自重庆彭水某鲟养殖场, 养殖水温 20.0~21.0 °C, pH 值为 7.6~8.2, 溶氧为 6.1~8.2 mg/L, 病鱼体质量为 187.22±5.78 g。人工回归感染实验所需健康杂交鲟从四川成都某养殖场购买所得, 体质量为 116.56±2.16 g, 于西南大学实训基地的室内可控温养殖池进行暂养, 1 周后进行实验, 暂养期间水温为 21.0±1.0 °C, pH 值为 6.8~8.7, 溶氧为 7.3~9.1 mg/L, 每天换水 1/3, 暂养期间正常投饵。

1.2 主要试剂及仪器

试剂: 细菌 DNA 提取试剂盒, 北京天根; 细菌微量生化反应管、药敏纸片, 杭州微生物试剂; 2×FineTaqTM PCR SuperMix, EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit 试剂盒, 北京全氏金; 细菌革兰氏染色试剂盒, 北京索莱宝; HE 染色试剂盒, 上海碧云天; pMD19-T, DH5 α , 北京宝日医生物等。

仪器: 电泳仪, 北京六一仪器厂; PCR 仪、凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad; 离心机(5810R)、移液枪, 德国 Eppendorf; 核酸定量仪 NanoDrop One, 美国 Thermo scientific; 自动包埋机、组织切片机、光学显微镜, 德国 Leica 等。

1.3 病原菌的分离与纯化

取具有典型症状的濒死病鱼, 对病鱼体表用酒精喷洒后观察。对鳃、皮肤黏液、肝脏、肾脏和脾脏的样本进行标准化的病毒学和寄生虫学分析。取鳃、皮肤黏液制作水封片用普通光学显微镜检测寄生虫。取肝、脾、肾加入组织质量 5 倍的 PBS 缓冲液匀浆, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 进行病毒检测。在超净工作台中用手术剪剖开鱼腹部, 观察患病鱼的实质器官, 用灼烧冷却后的接种环从肝脏、脾脏、肾脏通过划线法接种于 BHI 培养基上, 病原菌培养条件为 28 °C, 24 h, 根据菌落特征的不同, 挑取优势菌株重复 3 次划线培养, 从患病杂交鲟肝脏中分离纯化获得 1 株优势菌株, 编号为 PSHS。观察纯化后单菌落形态特征, 按照甘油冷冻法的步骤于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.4 病原菌的鉴定

分离菌株革兰氏染色: 参照试剂盒规定的方法, 在无菌条件下染色, 光学显微镜下进行形态学观察。

分离菌株生理生化鉴定: 参照细菌生化微量鉴定管说明书和《水产养殖动物病原细菌学》^[14]《伯杰氏细菌鉴定手册》^[15]对病原菌进行生理生化特性鉴定。

1.5 病原菌 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* 和 *cpn60* 基因扩增和测序

PCR 反应的 DNA 模板来源于通过试剂盒提取方法获得的总 DNA, 采用 50 μL 反应体系^[13, 16], 即模板 1 μL , 2×FineTaqTM PCR SuperMix 25 μL , 引物 1 μL (表 1), ddH₂O 补足余量。PCR 反应程序: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 退火温度(表 1)30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经电泳检测后, 根据胶回收试剂盒说明书回收、纯化目的片段, 4 °C 条件下与 pMD19-T 载体过夜连接后转

化进 DH5 α 中, 在平板上涂布培养后, 无菌条件下挑选阳性克隆用液体培养基扩大培养后, 送至华大基因进行测序。测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对分析, 从比对结果中选取排序靠前的菌株序列, 通过 ClustalW 2.1 和 MEGA10.0 使用邻接法, Bootstrapping 检测设置为 1 000 次, 构建系统发育树。

表 1 菌株 PSHS 管家基因及毒力基因引物

基因	引物	序列(5'-3')	产物大小/bp	退火温度/℃
<i>16S rRNA</i>	<i>16S rRNA</i> -F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 413	56
	<i>16S rRNA</i> -R	TGCGGCTGGATCACCTCCTT		
<i>gryB</i>	<i>gryB</i> -F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1 084	56
	<i>gryB</i> -R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -F	GCAGTGAAAGARTTCTTGGTTC	540	56
	<i>rpoB</i> -R	GTTGCATGTTNGNACCCAT		
<i>cpn60</i>	<i>cpn60</i> -F	GAAATYGAAGTGAAGACAA	743	58
	<i>cpn60</i> -R	GTYGCTTTTCCAGCTCC		
<i>yhlA</i>	<i>yhlA</i> -F	CGGCTAATAACGCATTGGAT	623	56
	<i>yhlA</i> -R	GCTGTTCCGGTTGTCAGTATGT		
<i>yrp1</i>	<i>yrp1</i> -F	TTCCTGGATCAGGTCAGC	1 034	54
	<i>yrp1</i> -R	CCTTTATTGCCCGAGTTA		
<i>yrpA</i>	<i>yrpA</i> -F	AAGCTGCAAGAACGCCGTTAA	805	60
	<i>yrpA</i> -R	AACCCAACGTGTTCCATCCAC		
<i>OmpF</i>	<i>OmpF</i> -F	GCGAAACCCAAATTACTG	717	58
	<i>OmpF</i> -R	CGCCGAACAGATCCTTAC		
<i>ampC</i>	<i>ampC</i> -F	ACGCAGCAGACGTTATTG	553	58
	<i>ampC</i> -R	TCATGTTAGCCCGCACCC		

1.6 病原菌的毒力基因检测

按照文献选取并合成鲁氏耶尔森菌 *yhlA*^[17], *yrp1*^[18], *yrpA*^[19], *OmpF*^[20-21], *ampC*^[22] 5 种毒力基因引物(表 1), 反应体系和反应条件同 1.5.

1.7 人工感染实验及半数致死量(LD_{50})确定

为验证 1.3 中分离到的细菌为此次杂交鲟发病的病原菌, 在无菌 BHI 液体培养基中接种 PSHS, 28 ℃恒温震荡培养 24 h, 参照麦氏比浊法调整菌悬液浓度分别为 1.0×10^9 , 1.0×10^8 , 1.0×10^7 , 1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 CFU/mL。取暂养结束的健康杂交鲟 112 尾, 体质量为 116.56 ± 2.16 g, 分为 6 个实验组和 1 个对照组, 每组 16 尾, 继续饲养于流水养殖池中(养殖池规格为 $1.2\text{ m} \times 1.0\text{ m} \times 0.8\text{ m}$, 水深 0.6 m), 实验期间水温保持在 21.0 ± 1.0 ℃, 各水箱每天换水 1/3, 利用增氧机保证溶氧充足。采用腹腔注射进行人工感染, 实验组每尾注射 0.2 mL 的菌液, 对照组注射等量的生理盐水。注射后以 8 h/次的频率观察记录鲟病变情况和病死数量, 根据改良寇氏法计算本次人工回归感染实验的半数致死量(LD_{50})^[8]。及时挑取濒死鲟进行剖检, 观察病理变化, 同时按上述步骤对病原菌再次进行分离、纯化及鉴定。另取一组健康杂交鲟, 将 1.3 中组织匀浆的滤液通过腹腔注射感染进行病毒学检测。

1.8 药物敏感实验

参照文献[23-24]的方法运用 K-B 纸片扩散法检测细菌的耐药性。挑取纯化单菌落进行扩大培养，恒温摇床培养条件 28 °C, 180 r/min, 用分光光度法调整菌液浓度约为 1.5×10^8 CFU/mL, 取 100 μL 菌悬液均匀涂布于平板上($d = 9.0$ cm), 用无菌镊子夹取药敏纸片等距放置于平板上, 每个平板贴 2 片, 1 片不含药物纸片为空白对照。培养条件同 1.3 中所述, 培养结束后用数显游标卡尺逐一测量, 记录抑菌圈直径, 再根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)抗菌药物敏感性实验执行标准(CLSI-M100-S19)判断菌株对各药物的敏感程度。

1.9 组织病理观察

参照文献[25-26]的方法, 采用常规组织石蜡切片和常规 HE 染色技术, 取濒死杂交鲟包括肝脏、脾脏、肾脏、中肠、鳃在内的病变组织, 用现配的波恩氏液固定样本组织 24 h 后, 按照步骤进行脱水、透明, 置于自动包埋机中进行浸蜡、包埋。待冷却 24 h 后用旋转式切片机切片, 厚度为 5 μm, 经展片、脱蜡、复水、苏木精染色、水洗、脱水、伊红复染、脱水、透明后, 用中性树脂封片, 在 37 °C 条件下烘片 48 h 后在 Leica 显微镜下拍照、观察。

2 结果与分析

2.1 患病杂交鲟症状

患病杂交鲟表现为游动迟缓、摄食量下降, 长时间停留在水面, 或腹部向上, 泄殖孔红肿外突, 患病严重的在腹部或头部可见出血点或血斑。剖检可见腹腔血水充盈, 体壁及肌肉有出血点; 肝脏颜色变浅、略有肿大, 有出血点或出血斑(图 1a); 脾脏轻微肿大, 呈紫黑色; 肠道明显充血、红肿(图 1b)。



a. 肝脏肿大



b. 肠道红肿、腹腔积水

图 1 患病杂交鲟主要临床症状

2.2 病原菌形态特征及革兰氏染色

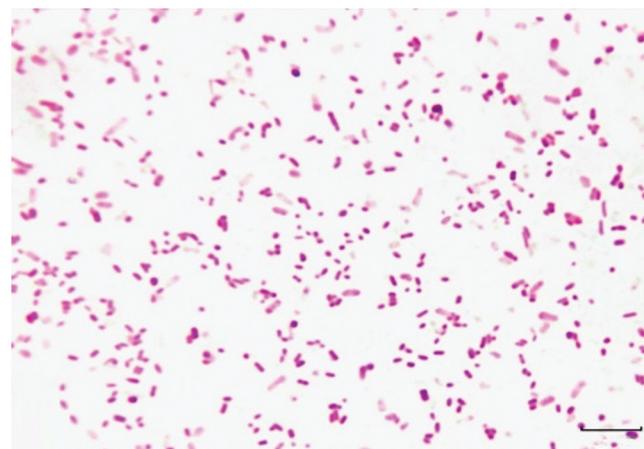
菌株 PSHS 在 BHI 平板上培养后, 形成肉眼可见的直径为 0.8~1.6 mm、颜色为乳白色、表面光滑湿润、微隆起、边缘整齐的单菌落(图 2a)。经革兰氏染色后镜检发现该菌株为革兰氏阴性短杆菌, 直径约为 0.75 μm, 长度约为 1.7~2.5 μm, 两端钝圆、单个或成对存在(图 2b)。

2.3 生理生化鉴定

生理生化鉴定结果显示(表 2), 菌株 PSHS 能发酵果糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、蜜二糖, 不能发酵乳糖等 7 种糖; 具有鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶活性, 不具有氧化酶、苯丙氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶活性; 能够利用枸橼酸盐、D-甘露醇, 不能利用水杨昔、D-山梨醇、肌醇; 明胶实验为阳性, 咪唑实验等 5 项为阴性。对结果进行分析, 结合文献[17-18]的标准判断细菌种类, 此结果与参考菌株的生理生化实验结果基本一致, 初步判定菌株 PSHS 为鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)。



a. 菌落形态



b. 微观形态

图 2 病原菌菌落形态特征

表 2 菌株 PSHS 微量生化反应管实验结果

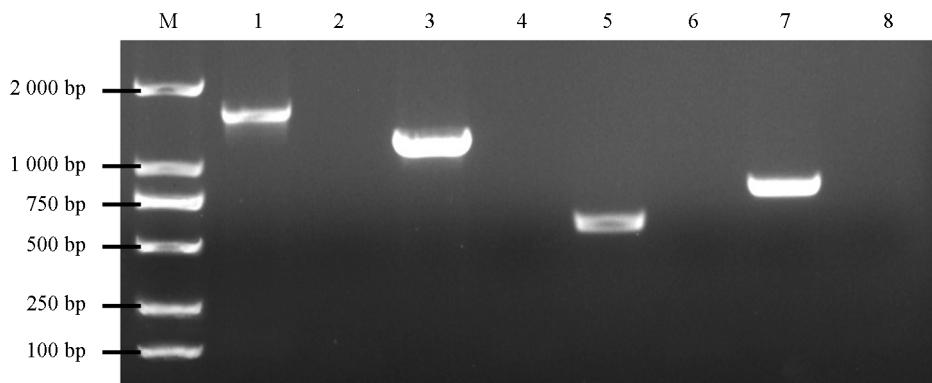
测试项目	PSHS	<i>Y. ruckeri</i> 标准株 ^[14]	测试项目	PSHS	<i>Y. ruckeri</i> 标准株 ^[14]
氧化酶	—	—	乳糖	—	—
赖氨酸脱羧酶	+	+	D-葡萄糖	—	—
精氨酸双水解酶	—	—	D-甘露醇	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	D-山梨醇	—	—
苯丙氨酸脱羧酶	—	—	D-木糖	—	—
吲哚实验	—	—	阿拉伯糖	—	—
VP 实验	—	—	果糖	+	+
硫化氢	—	—	蔗糖	+	—
尿素	—	—	麦芽糖	+	+
枸橼酸盐	+	+	海藻糖	+	+
明胶	+	+	蜜二糖	+	—
果胶	—	—	棉子糖	—	—
水杨苷	—	—	纤维二糖	—	—
肌醇	—	—	鼠李糖	—	—

注: “+”为阳性, “—”为阴性。

2.4 PCR 反应扩增及系统发育树

对菌株 PSHS 的 4 个保守序列, 即 *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *cpn60* 基因序列进行 PCR 反应, 经凝胶电泳可见大小约为 1 500 bp, 1 000 bp, 500 bp, 750 bp 的片段, 以蒸馏水为模板的空白对照未扩增出相应大小的条带(图 3), 与预期结果相符。阳性克隆产物测序结果表明, 菌株 PSHS 的 *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *cpn60* 的片段大小依次为 1 413 bp, 1 084 bp, 540 bp, 743 bp, 与 GenBank 登录号为 MK290740, CP009539, NC011078, CP071802 的鲁氏耶尔森菌的对应序列相似性分别高达 99.59%, 99.78%, 99.69%, 99.89%。

由菌株 PSHS 基于 *16S rRNA* 序列构建的系统发育树(图 4), 以及基于 *gyrB*, *rpoB*, *cpn60* 这 3 种基因序列构建的联合系统发育树(图 5)可知, 本实验分离菌株 PSHS 与鲁氏耶尔森菌聚为一类, 即归属在同一分支里, 实验结果综合判定分离菌株为鲁氏耶尔森菌(*Y. ruckeri*)。



M 为 DNA Marker2000, 1 为 *16S rRNA* 基因, 3 为 *gyrB* 基因, 5 为 *rpoB* 基因, 7 为 *cpx60* 基因; 2, 4, 6, 8 为阴性对照.

图 3 菌株 *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *cpx60* 基因扩增结果图

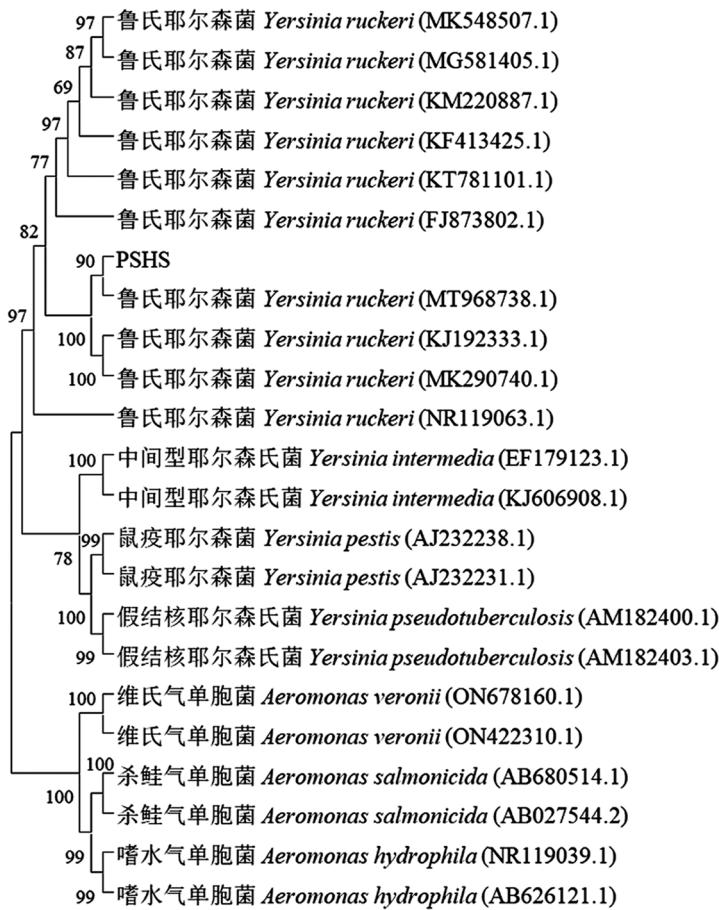


图 4 菌株 PSHS 基于 *16S rRNA* 基因构建的系统发育树

2.5 回归感染实验及 LD_{50} 值的确定

回归感染实验结果表明, 注射组织匀浆滤液的杂交鲟无明显异常, 再次解剖未分离到病原菌。健康杂交鲟注射分离菌株后, 表现出反应迟钝、摄食量减少、游动缓慢等症状, 临床表现和主要病理变化与自然发病所产生的情况基本相同。将濒死病鱼及时捞出检查, 可见下颌、胸鳍及腹部有明显的出血, 泄殖孔红肿外突。剖检发现腹腔充满淡红色血水, 肝脏颜色变淡, 有出血点或血斑, 脾脏略微变得肿大, 肠道充血、红肿, 但肌肉未见出血或充血。从人工回归感染发病的濒死鱼体内再次重复上述分离鉴定步骤后, 获得与分离株 PSHS 形态、生理生化特性及 *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *cpx60* 基因序列一致的病原菌, 表明鲁氏耶尔森菌 PSHS 菌株是造成此次养殖鲟患病的致病菌。根据改良寇氏法计算得到菌株 PSHS 对杂交鲟的 LD_{50} 为 1.8×10^6 CFU/mL(表 3)。

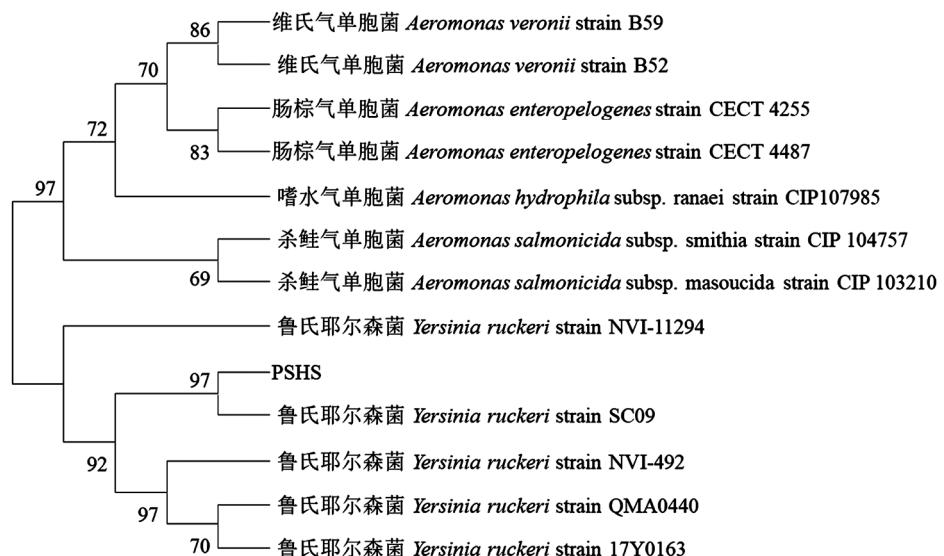
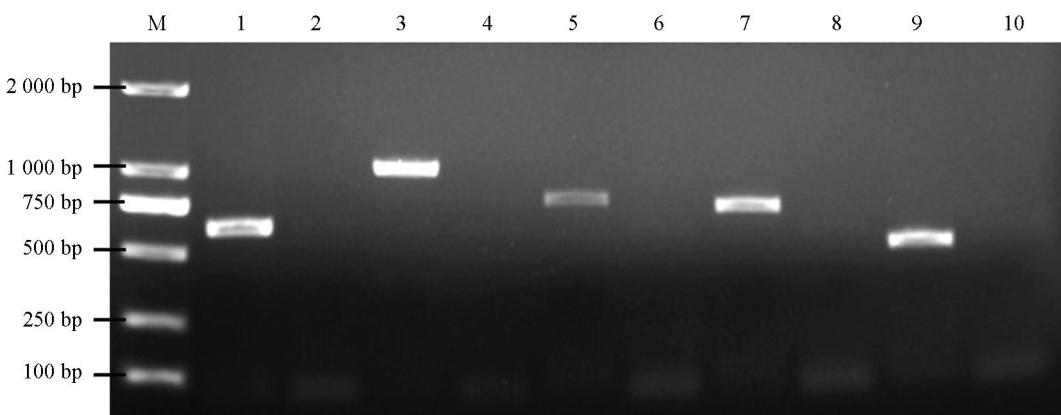
图 5 菌株 PSHS 基于 *gyrB*, *rpoB*, *cpn60* 联合基因构建的系统发育树

表 3 人工回归感染实验

菌液/(CFU·mL ⁻¹)	实验鱼/条	感染天数/d							死亡数/条	死亡率/%	半数致死量/(CFU·mL ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7			
1×10 ⁹	16	1	9	6	0	0	0	0	16	100.00	
1×10 ⁸	16	1	7	3	3	0	0	0	14	87.50	
1×10 ⁷	16	1	4	4	2	1	1	0	13	81.25	
1×10 ⁶	16	0	2	2	1	1	0	0	6	37.50	1.8×10 ⁶
1×10 ⁵	16	0	1	0	1	0	0	0	2	12.50	
1×10 ⁴	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.65% NaCl	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

2.6 细菌的毒力基因

通过 PCR 扩增和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可见大小约为 600 bp, 1 000 bp, 800 bp, 700 bp, 500 bp 的片段, 目的片段经胶回收纯化、4 ℃过夜连接和转化进入 DH5 α 细胞中, 进行挑单克隆操作, 选取阳性扩大培养后送至公司测序。测序结果在 NCBI 中经 Blast 比对可知, 该菌株携带有 *yhlA* (623 bp), *yrlp1* (1 034 bp), *yrlpA* (805 bp), *OmpF* (717 bp), *ampC* (553 bp) 5 种毒力基因(图 6)。



M 为 DNA Marker 2000, 1 为 *yhlA* 基因, 3 为 *yrlp1* 基因, 5 为 *yrlpA* 基因, 7 为 *OmpF* 基因, 9 为 *ampC* 基因; 2, 4, 6, 8, 10 为阴性对照。

图 6 分离菌株毒力基因检测

2.7 药敏结果

根据K-B纸片扩散法检测菌株PSHS对32种抗生素药物纸片的耐药性实验,结果表明:菌株PSHS对氟苯尼考、左氧氟沙星、新霉素等6种药物表现出高度敏感;对恩诺沙星、米诺环素、磺胺甲基异恶唑等5种药物表现出中度敏感;对阿莫西林、四环素、杆菌肽等21种抗生素表现出耐药(表4)。

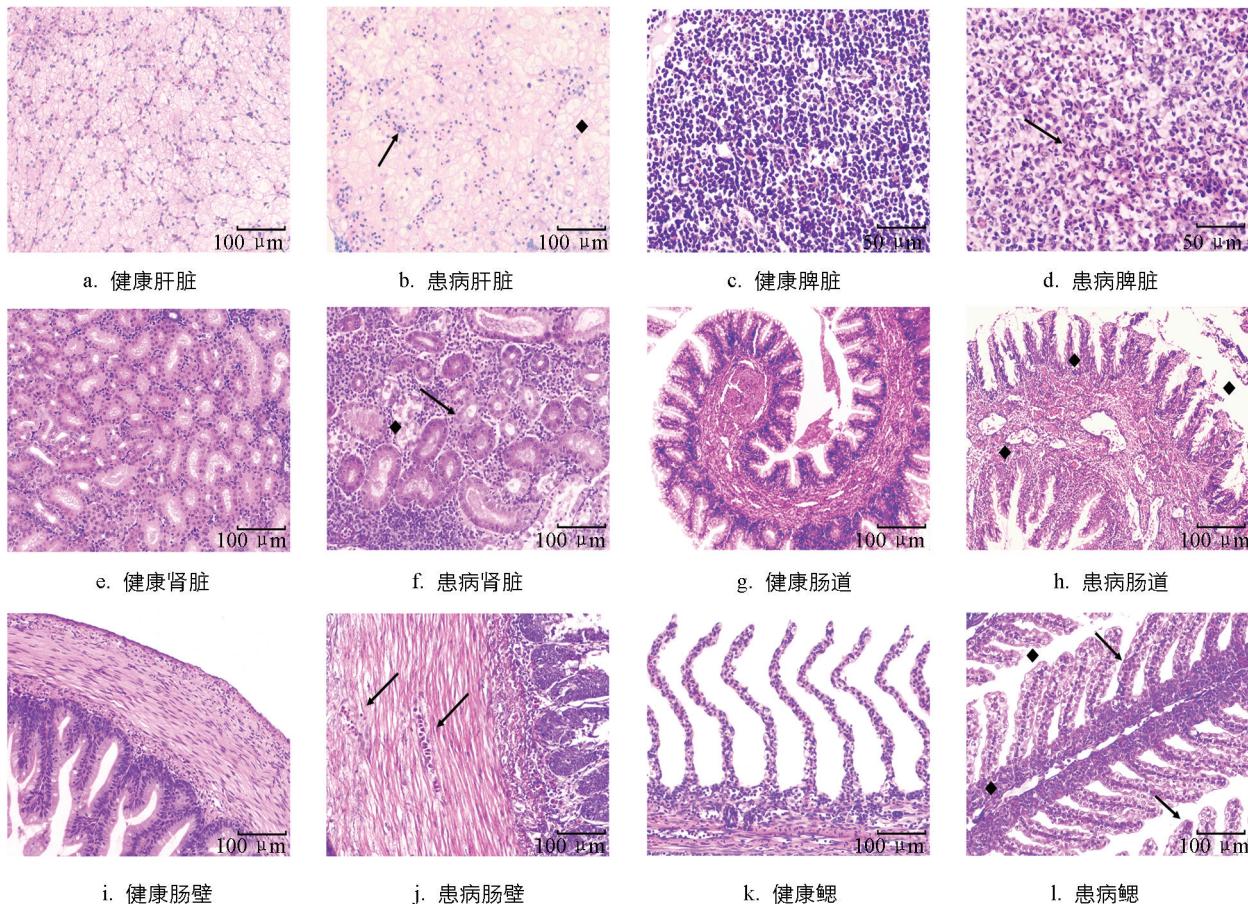
表4 PSHS菌株药敏实验

药物名称	药物量/ μg	判断标准			PSHS抑菌圈 直径/mm	敏感性
		R	I	S		
氟苯尼考	30	≤12	(12~18)	≥18	27.28	S
左氧氟沙星	30	≤13	(13~17)	≥17	20.00	S
红霉素	15	≤13	(13~23)	≥23	0	R
麦迪霉素	15	≤13	(13~23)	≥23	0	R
吉他霉素	15	≤21		≥31	0	R
头孢他啶	30	≤14	(14~18)	≥18	12.26	R
头孢哌酮	75	≤15	(15~21)	≥21	14.18	R
青霉素	10	≤19	(19~28)	≥28	10.34	R
羧苄西林	100	≤19	(19~23)	≥23	11.20	R
氨苄西林	10	≤13	(13~17)	≥17	12.68	R
阿莫西林	10	≤18	(18~26)	≥26	0	R
四环素	30	≤14	(13~21)	≥21	13.92	R
恩诺沙星	10	≤12	(12~17)	≥17	14.36	I
米诺环素	30	≤14	(14~18)	≥18	15.42	I
复方新诺明	23.75	≤23	(22~33)	≥33	22.74	R
磺胺甲基异恶唑	250	≤14	(14~24)	≥24	15.46	I
庆大霉素	10	≤12	(12~15)	≥15	10.26	R
妥布霉素	10	≤12	(12~15)	≥15	0	R
新霉素	30	≤12	(12~17)	≥17	17.30	S
卡那霉素	30	≤13	(13~18)	≥18	9.98	R
培氟沙星	10	≤23	(23~26)	≥26	18.58	R
呲哌酸	30	≤21	(21~29)	≥29	12.20	R
氧氟沙星	5	≤12	(14~16)	≥16	14.32	I
林可霉素	2	≤23	(23~31)	≥31	0	R
多粘霉素	300	≤8	(8~12)	≥12	11.50	I
杆菌肽	10	≤8	(8~13)	≥13	0	R
头孢唑林	30	≤14	(14~18)	≥18	21.60	S
丁胺卡娜	30	≤14	(14~17)	≥17	10.70	R
环丙沙星	5	≤15	(15~21)	≥21	12.82	R
链霉素	10	≤11	(11~15)	≥15	7.74	R
哌拉西林	100	≤17	(17~21)	≥21	22.08	S
氨曲南	30	≤15	(15~22)	≥22	30.20	S

注:“S”为高度敏感,“I”为中度敏感,“R”为耐药。

2.8 病理组织切片

病理组织观察结果表明: 感染后杂交鲟的肝脏、脾脏、肾脏、中肠、鳃与健康组织对比可观察到不同程度的病理变化。健康杂交鲟肝细胞核明显、轮廓清晰、肝索排列整齐、肝血窦正常(图 7a); 患病杂交鲟大量肝细胞排列紊乱、呈空泡化变性、细胞核溶解或碎裂, 内含大小不一的空泡, 肝血窦、主静脉肿胀充血、伴有炎性细胞浸润, 肝细胞之间界限不清、轮廓结构模糊(图 7b)。与健康杂交鲟脾脏相比(图 7c), 患病杂交鲟脾脏网状内皮细胞增生、淋巴细胞坏死、免疫细胞浸润, 脾髓窦浸润大量红细胞、出现淤血或出血(图 7d)。健康杂交鲟肾脏组织结构完整(图 7e), 而患病杂交鲟肾小球毛细血管肿胀、充血, 包括中性粒细胞、巨噬细胞等在内的炎性细胞浸润组织, 肾小管发生颗粒变性或者坏死, 部分肾小球萎缩变小、细胞核裂解, 造血组织坏死(图 7f)。与健康杂交鲟肠道相比(图 7g, 7i), 患病杂交鲟肠绒毛上皮坏死脱落、纹状缘结构破坏, 肠壁和肠绒毛有红细胞浸润(图 7h, 7j)。健康杂交鲟鳃丝细胞形态结构正常(图 7k), 而患病杂交鲟鳃丝上皮细胞大量增生或充血、末端肿大, 鳃小片发生充血、坏死或脱落, 增生处有淋巴细胞浸润(图 7l)。



b 图中肝血窦充血(↑), 肝细胞变性呈空泡化(◆), 细胞轮廓模糊。d 图中脾髓窦浸润大量红细胞(↑)、淋巴细胞坏死。f 图中肾小球萎缩(◆)、细胞核裂解(↑)。h 图中肠绒毛坏死脱落(◆)。j 图中肠壁充血(↑)。l 图中鳃小片部分上皮细胞增生(◆), 红细胞浸润(↑)。

图 7 杂交鲟健康对照与病理组织学观察结果

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究从发病濒死杂交鲟肝脏中分离得到 1 株 PSHS 优势菌株, 经革兰氏染色镜检为阴性, 生理生化反应鉴定结果与鲁氏耶尔森菌极为相似, 但蜜二糖和蔗糖 2 个指标与标准菌株略有不同, 这与杨昆明等^[27]获得的分离株理化特性不同, 其原因可能是地区不同所引起的环境因素不同而导致菌株在为了生存的过程

中产生了微小的理化特性差异,因此仅将其初步鉴定为鲁氏耶尔森菌。目前,表型和分子遗传学是最主要的两大类细菌鉴定方法^[28],而表型鉴定中的生理生化特性鉴定通常会由于生化反应过度、反应不完全、结果判断差异等因素对结果的准确性产生影响。在此基础上,分子遗传学鉴定法具有灵敏性高、准确性强等特点,通过对 16S rRNA 等高度保守基因序列的扩增测序,结果进行 Blast 比对后可快速进行鉴定。有“分子化石”之称的 16S rRNA 基因因其在漫长的进化过程中具有高度保守性可用于区别不同种属,而 *gyrB*, *rpoB* 和 *cpn60* 管家基因可弥补同属近缘种间分辨不足的缺陷^[29]。为进一步确定 PSHS 的分类地位,本研究选用上述 4 种基因同时进行鉴定。经人工回归感染后,泄殖孔红肿外突,剖解发现内脏有不同程度的损伤,同时从肝脏、肾脏分离得到与 PSHS 形态特征、理化特性、分子生物学鉴定一致的菌株,结合本实验所有结果,综合判定 PSHS 为鲁氏耶尔森菌。

鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)是肠杆菌科的一种兼性厌氧革兰氏阴性菌,鲑鳟鱼类常见疾病肠炎红嘴病的病原菌即是该菌^[14]。自 20 世纪 50 年代在美国人工养殖的虹鳟中首次发现该菌以来^[30],已在世界范围内大量传播,对斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)^[31]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[32]、鲤(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)^[33]等易感品种具有广泛的致病性。不同鱼类感染鲁氏耶尔森菌后会表现出下颌出血、泄殖腔充血外突、内脏出血或充血等与虹鳟相似的症状^[34]。研究表明,在感染患病杂交鲟中也存在类似表征,这可能与鲑鳟鱼类在生活习性上相似有关。不同水域、不同物种及环境条件会导致该菌的致病性有一定差异,影响致病力强弱的因素还包括温度、盐度等环境因素,所表现出的症状也略有不同。

目前鲁氏耶尔森菌的现有研究多集中在生物被膜、不同血清型及环境因素对菌体毒力的影响方面^[34],对毒力相关基因、调控途径、致病机制的认识还比较缺乏,仍需进行大量的研究。前人研究表明,胞外产物如蛋白酶、脂肪酶和外毒素等参与了致病过程,如 *yhlA* 基因主要编码溶血素,而 *yhlB* 则参与溶血素的分泌与激活^[35]。鲁氏耶尔森菌的毒力更是与蛋白酶 *yrlp1* 的活性密切相关^[18],*yrlpA* 可能在肠道组织中表达,其缺失突变体毒力明显减弱^[19],*OmpF* 在营养获取、生存、相互作用中发挥重要作用^[21],*ampC* 编码的头孢菌素酶,对许多种抗生素均耐受^[22]。此外,在对胭脂鱼的人工感染研究中发现,维氏气单胞菌携带的毒力因子是其感染该鱼后所表现的诸多病理现象出现的原因^[26]。本研究通过 PCR 技术对 *yhlA*, *yrlp1*, *yrlpA*, *OmpF*, *ampC* 进行扩增,证明了 PSHS 携带上述 5 种毒力基因。结合人工感染实验,依据病理组织切片结果发现,该菌株具有较强的致病性,造成杂交鲟肝、脾、肾、肠、鳃产生不同程度的病变,其中以肝细胞变性空泡化和肝血窦充血扩张、肾小球萎缩且炎性细胞浸润、肠绒毛坏死脱落及肌肉层充血表现最为明显,以上研究为从分子方面探究鲁氏耶尔森菌的致病机制提供了科学依据。此外,已有研究表明鲁氏耶尔森菌的主要毒力基因还包括 *invF*, *traC*, *traL*, *traN* 等^[17],本研究虽未进行检测,但结合已有研究^[36-37],含有不同组合的毒力基因的致病株亦能引起发病,在养殖过程中需要引起高度重视,从改善养殖环境、投喂优质饲料、增加巡检频率方面加强对该病的防控。

药敏实验结果表明,本实验分离得到的鲁氏耶尔森菌 PSHS 菌株对氟苯尼考、左氧氟沙星、新霉素、哌拉西林等 6 种药物表现出高度敏感,可为该病的早期预防和及时治疗提供数据参考和科学依据。在防治方面应在执业兽医的专业指导下,结合具体养殖场的药物敏感实验结果优先使用国家规定允许的敏感药物,防止因不科学用药造成病原菌耐药或药物残留。此次实验结果与杨昆明等^[27]、方莘等^[33]、陶莎等^[38]在杂交鲟、鲤鳙、斑点叉尾鮰体内分离到的鲁氏耶尔森菌的药敏实验结果有所差异,其原因可能是为了防治疾病而不规范、不科学的用药导致菌株产生了多重耐药性^[39]。值得注意的是,王荻^[32]对减毒活疫苗的研究、阳磊等^[40]对口服微球疫苗的研究以及冯淇元等^[41]对中草药添加剂的研究为鲁氏耶尔森菌的防治提供了新思路。下一步可以依靠基因组学、蛋白质组学、转录组学,通过对毒力基因、耐药基因、生物型、血清型以及耐药性的研究,为有效防治养殖过程中鲟鲁氏耶尔森菌病提供基础和依据。

3.2 结论

本实验从患病杂交鲟肝脏中分离获得致病性鲁氏耶尔森菌 1 株, 其对杂交鲟半数致死量为 1.8×10^6 CFU/mL。感染该菌能导致杂交鲟肝、脾、肾、肠、鳃产生不同程度的病变, 其中以肝细胞变性空泡化和肝血窦充血扩张、肾小球萎缩且炎性细胞浸润、肠绒毛坏死脱落及肌肉层充血表现最为明显。该菌株携带有 *yhlA*, *yrlp1*, *yrlpA*, *OmpF* 以及 *ampC* 5 种毒力基因, 对氟苯尼考、左氧氟沙星、新霉素等 6 种药物表现出高度敏感。本研究报道了杂交鲟鲁氏耶尔森菌的致病性, 可为养殖生产中有效治疗由此菌引起的疾病及安全用药提供新的参考依据。

参考文献:

- [1] 张颖, 孙大江, 王斌, 等. 杂交鲟“鲟龙 1 号” [J]. 中国水产, 2017(5): 62-67.
- [2] 陈细华, 李创举, 杨长庚, 等. 中国鲟鱼产业技术研发现状与展望 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(6): 108-112.
- [3] XIE Q S, LIU Y R. Comparative Analysis of the Nutrient Components in the Muscle and Skin Tissues of Hybrid Sturgeon (*Acipenser baerii* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂) of Different Sizes [J]. Aquaculture Research, 2022, 53(17): 6124-6134.
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [5] 商宝娣, 陶莎, 杨星, 等. 鲟源嗜麦芽窄食单胞菌的分离鉴定及药敏特性分析 [J]. 水产科学, 2020, 39(5): 694-701.
- [6] 叶彩燕, 汪开毓, 刘韬, 等. 西伯利亚鲟致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(3): 195-199.
- [7] 邸军. 鲟细菌性败血症病原学及其防治研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [8] 张飘, 杨霞, 胡安东, 等. 杀鲑气单胞菌对鲟的杂交致病性及病理变化分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(2): 58-64.
- [9] 孔杰, 李小义, 周洲, 等. 鲟源迟钝爱德华氏菌的分离鉴定与药敏特性研究 [J]. 水产科学, 2018, 37(2): 187-192.
- [10] 麻强生, 焦世璋, 张小丽, 等. 鲟源海豚链球菌分离鉴定及药敏试验 [J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(4): 14-21.
- [11] 张明洋, 曾茂芹, 刘妍罕, 等. 类志贺邻单胞菌感染杂交鲟肠道组织转录组分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(9): 2732-2740.
- [12] 杨圆圆, 杨移斌, 曹海鹏, 等. 杂交鲟源恶臭假单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 浙江农业学报, 2017, 29(12): 1978-1985.
- [13] 杨成年, 李芳, 朱成科, 等. 杂交鲟出血病病原的分离鉴定与组织病理学观察 [J]. 浙江农业学报, 2021, 33(12): 2275-2285.
- [14] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [15] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [16] 朱成科, 刘桂嘉, 张争世, 等. 岩原鲤致病性维氏气单胞菌的分离与鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(6): 526-534.
- [17] FERNÁNDEZ L, PRIETO M, GUIJARRO J A. The Iron- and Temperature-regulated Haemolysin *YhlA* is a Virulence Factor of *Yersinia ruckeri* [J]. Microbiology, 2007, 153(2): 483-489.
- [18] 连海. 鲈氏耶尔森氏菌 *p1* 基因的克隆、分子特性分析及原核表达 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [19] NAVAI R, MÉNDEZ J, PÉREZ-PASCUAL D, et al. The *yrlpA B* Operon of *Yersinia Ruckeri* Encoding Two Putative U32 Peptidases is Involved in Virulence and Induced under Microaerobic Conditions [J]. Virulence, 2014, 5(5): 619-624.
- [20] ORMSBY M J, DAVIES R L. Diversification of *OmpA* and *OmpF* of *Yersinia ruckeri* is Independent of the Underlying Species Phylogeny and Evidence of Virulence-related Selection [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3493.
- [21] 王二龙, 秦振阳, 汪开毓, 等. 鲈氏耶尔森氏菌外膜蛋白 *ompF* 基因的分子克隆、生物信息学与免疫原性分析 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(3): 24-34.

- [22] GUIJARRO J A, GARCÍA-TORRICOA I, CASCALES D, et al. The Infection Process of *Yersinia ruckeri*: Reviewing the Pieces of the Jigsaw Puzzle [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018(8): 218.
- [23] 韩璐璐, 杨成年, 李芳, 等. 翘嘴鮊源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理观察 [J]. 渔业科学进展, 2022, 43(6): 216-227.
- [24] 董忠典, 周芬娜, 袁颜颜, 等. 尼罗罗非鱼致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 110-115.
- [25] 李芳, 刘小红, 黄静, 等. 维氏气单胞菌感染胭脂鱼的组织病理学研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(2): 86-95.
- [26] LI F, WU D, GUH R, et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* Cause Motile Aeromonas Septicaemia in the Cultured Chinese Sucker, *Myxocyprinus asiaticus* [J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(5): 1515-1526.
- [27] 杨昆明, 张文润, 马江霞, 等. 鲢源致病性鲁氏耶尔森菌的分离、鉴定及药敏研究 [J]. 水产科学, 2019, 38(1): 48-54.
- [28] 郝云婕, 韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用 [J]. 生物技术通报, 2008, 24(2): 39-41.
- [29] KOCHER T D, THOMAS W K, MEYER A, et al. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(16): 6196-6200.
- [30] EWING W H, ROSS A J, BRENNER D J, et al. *Yersinia ruckeri* sp. Nov., the Redmouth (RM) Bacterium [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1978, 28(1): 37-44.
- [31] 蒋洁. 斑点叉尾鮰源鲁氏耶尔森氏菌三个鞭毛蛋白克隆表达及其免疫调节作用研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- [32] 王荻. 虹鳟源鲁氏耶尔森菌主要生物学特性及减毒活疫苗研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [33] 方萍, 丁彩霞, 吴亚锋, 等. 鲢鱼、鳙鱼源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析 [J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2017, 26(2): 84-87.
- [34] WROBEL A, LEOJ C, LINKE D. Overcoming Fish Defences: The Virulence Factors of *Yersinia ruckeri* [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 700.
- [35] FERNÁNDEZ L, MÁRQUEZ I, GUIJARRO J A. Identification of Specific in Vivo-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5199-5207.
- [36] 王巧煌, 林楠, 元丽花, 等. 大口黑鲈鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定、主要毒力基因及致病性研究 [J]. 水产学报, 2022, 46(5): 825-835.
- [37] 闵洁, 汪开毓, 刘韬, 等. 鲁氏耶尔森菌 *invF* 基因无痕缺失突变株的构建及生物学特性 [J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1858-1866.
- [38] 陶莎, 姚俊杰, 商宝娣, 等. 斑点叉尾鮰致病菌株的分离鉴定与药敏特性 [J]. 贵州农业科学, 2019, 47(12): 76-81.
- [39] 黎小正, 童桂香, 吴祥庆, 等. 2011—2012年广西罗非鱼食源性致病菌及其药敏特性调查 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1914-1918.
- [40] 阳磊, 汪开毓, 周燕, 等. 鲁氏耶尔森氏菌口服微球疫苗特性分析及免疫效果研究 [J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1142-1149.
- [41] 冯淇元, 陆绍霞, 徐喆, 等. 中草药添加剂对鲁氏耶尔森菌感染虹鳟血液生化指标的影响 [J]. 淡水渔业, 2020, 50(2): 60-66.

责任编辑 周仁惠