

文章编号: 1000-0615(2019)12-2554-13

DOI: 10.11964/jfc.20181011489

黑棘鲷内脏结节病病原的分离、鉴定及致病性研究

张鸿鹄¹, 袁娜¹, 傅超英¹, 贺洁²,
罗华明², 鲍佳伟³, 钱冬^{1*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315823;
2. 台州市水产技术推广总站, 浙江台州 318000;
3. 浙江宏野海产品有限公司, 浙江台州 318000)

摘要: 2017年4月, 浙江台州某海水养殖公司跑道式养殖池黑棘鲷大量发病, 病鱼活力下降、食欲减退、体表溃疡, 剖检可见肝脏、脾脏、肾脏肿大且有不同程度的白色结节, 同时伴随大量腹水。用胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)从典型结节病濒死黑棘鲷器官分离到革兰阴性短杆菌。分离病原菌AS15对健康黑棘鲷的致病力结果显示, AS15腹腔注射可使健康黑棘鲷发病死亡, 死亡黑棘鲷可出现自然发病症状, 在(24±1)°C的条件下, (25±2)g黑棘鲷的半数致死浓度(LD₅₀)为6.5×10⁴ CFU/尾。经API 20E鉴定, 分离菌株AS15生理生化特性与类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105和迟缓爱德华氏菌典型菌ATCC15947相似度为86.2%, 与杀鱼爱德华氏菌ETT883的相似度为82.8%; AS15的16S rDNA与杀鱼爱德华氏菌ET^T883同源性达99%, *gyrB*与类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105和杀鱼爱德华氏菌ET^T883同源性分别为100%和98%; 16S rDNA进化树显示, AS15与ET^T883、LADL05-105聚为一簇, *gyrB*进化树与LADL05-105、NCIM2056聚为一簇; 采用4种爱德华氏菌属种特异性引物对AS15进行PCR分析, 结果显示, AS15可扩增出类杀鱼爱德华氏菌的种特异性片段, 不能扩增出迟缓爱德华氏菌、鲑鱼爱德华氏菌、杀鱼爱德华氏菌的种特异性片段, 表明AS15属类杀鱼爱德华氏菌成员。分析了AS15的菌毛基因、*sodB*等毒力基因, 发现AS15具有*fimA*、*fimB*、*fimC*、*fimD*等4种菌毛基因和*sodB*、*citC*、*esrB*、*mukF*、*katB*等毒力基因。本实验首次从黑棘鲷上检出致病性类杀鱼爱德华氏菌, 该菌对黑棘鲷的发病机制和毒力机理还需进一步研究。

关键词: 黑棘鲷; 类杀鱼爱德华氏菌; 结节病; 致病性

中图分类号: S 941

文献标志码: A

黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Sparidae)、棘鲷属(*Acanthopagrus*), 是一种广泛分布于我国东南沿海及中国台湾、日本、东南亚等国家和地区的名贵经济鱼类。黑棘鲷生长迅速、肉质鲜嫩、营养价值高, 对温度和盐度的适应范围广、食谱杂、抗病力较强, 不作长距离洄游, 是人工养殖和沿海增殖放流的优良品种, 拥有广阔的市场前景^[1]。

随着黑棘鲷市场需求的增加, 人工养殖规

模和增长速度不断扩大。我国2003—2011年鲷养殖总产量由4.23万t增加到5.63万t, 年均增长3.69%; 2011—2016年鲷养殖年均增长5.12%, 其中2014—2016年期间年均增长率为12.08%。浙江省鲷养殖规模为全国第四, 是重要黑棘鲷养殖省^[2]。随着黑棘鲷养殖规模扩大和养殖密度提高, 各种疾病相继出现, 已报道了杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)引起的黑棘鲷尾鳍溃烂病^[3], 拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)引起

收稿日期: 2018-10-13 修回日期: 2018-12-24

资助项目: 台州市科技项目“大黄鱼主要流行病诊断与控制技术研究(1701ny)

通信作者: 钱冬, E-mail: qiandong@nbu.edu.cn

的黑棘鲷幼鱼腹水病^[4],恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)引起的黑棘鲷肠炎^[5]和迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)引起的黑棘鲷感染^[6]等。

2017年4月,浙江台州某海水养殖公司跑道式黑棘鲷养殖池发生严重疾病,累计死亡4 000尾以上,死亡率80%以上,造成极大经济损失。患病黑棘鲷出现剧烈游动、活力下降、食欲减退、体表溃疡等症状,病鱼剖检可见肝脏、脾脏、肾脏出现明显的白色结节,个别患病黑棘鲷脾脏、肾脏布满白色结节,同时伴随大量腹水。本实验对患病黑棘鲷进行了细菌分离,从典型内脏结节病濒死黑棘鲷的肝脏、脾脏、肾脏等组织分离到15株细菌(SA-1~SA-15),并对有较强致病力的AS15菌株进行了形态、生理生化性状、16S *rDNA*和*gyrB*序列鉴定、系统发育树分析、致病性和致病基因研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼及菌株 患病濒死黑棘鲷采自浙江台州某海水养殖公司,体质量(43±2)g;攻毒用健康黑棘鲷为浙江宏野海产品有限公司提供,购自福建省漳州市诏安县,体质量(25±2)g,于曝气人工海水中暂养7 d,每日虹吸换水30%以上,暂养期间水温维持在(24±1)°C,并保持充氧;用于种特异性引物鉴别的菌株AS15、AS12分离自不同患病黑棘鲷,其他参考菌株:迟缓爱德华氏菌59-T-S2、59-T-S3、1501-T及杀香鱼假单胞菌YC-17-02为本实验室分离保存。

实验试剂 细菌鉴定条API 20E试剂购自生物梅里埃中国有限公司;胰酪大豆胨培养液(TSB)和胰酪大豆胨琼脂(TSA)购自北京陆桥技术股份有限公司;革兰染色液购自杭州滨和微生物试剂有限公司;基因组DNA提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;Taq DNA聚合酶、2×Taq Mix购自北京康为世纪生物科技有限公司;引物合成和序列测定均委托上海华大基因科技有限公司。

1.2 患病黑棘鲷细菌分离

黑棘鲷自2017年4月初发病,于4月中旬在现场捞取反应迟缓、体表溃疡的患病黑棘鲷,用75%酒精棉球消毒鱼体表面,选择肝脏、脾脏、肾脏肿大和典型白色结节的病鱼,无菌环

境下取肝脏、脾脏、肾脏于TSA平板上划线分离。

1.3 分离菌株的人工感染

TSA平板分离菌28°C培养48 h后,肝脏、脾脏、肾脏均分离到直径为0.5~1 mm的灰白色菌落纯培养,5尾典型患病黑棘鲷共挑取15个单菌落,于TSA平板上划线纯化,从5尾病鱼肝脏、脾脏、肾脏共分离到15株菌株(SA1~SA15),用20%甘油TSB菌悬液保存于-80°C备用。

选取脾脏白色结节最典型的5号患病黑棘鲷脾脏分离菌株AS15于胰酪大豆肉汤(TSB)28°C振荡培养24 h;7 000 r/min离心10 min, pH 7.4灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,制成菌悬液,以 8×10^8 、 8×10^7 、 8×10^6 、 8×10^5 、 8×10^4 CFU/mL菌悬液按0.1 mL/尾腹腔注射健康黑棘鲷,空白对照注射等体积灭菌PBS缓冲溶液。水族箱(24±2)°C充气养殖,每日记录发病和死亡情况,分离濒死或死亡黑棘鲷细菌。LD₅₀采用karber法计算^[7]。

1.4 分离菌株AS15的鉴定

形态和生理生化鉴定 挑取28°C培养18~24 h纯化AS15单菌落,制备菌涂片,革兰染色,观察菌体形态;同时取AS15单菌落,制成菌悬液,接种至API 20E细菌鉴定条中,恒温培养24~48 h,按鉴定操作说明显色并记录结果,按梅里埃细菌鉴定软件及《伯杰氏系统细菌手册》第2版进行鉴定。

分子鉴定 挑取纯化AS15单菌落,双蒸水混匀,100°C煮沸10 min,冰浴5 min,12 000 r/min离心2 min,取上清液作为模板进行PCR扩增;16S *rDNA*扩增引物:27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3',1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'^[8];50 μL PCR反应体系:27F、1492R正反引物(10 μmol/L)各1 μL,模板2 μL,2×mix 25 μL,双蒸水补足体积,PCR扩增条件:预变性94°C 5 min;变性94°C 30 s,退火54°C 30 s,延伸72°C 90 s,35个循环;72°C终延伸10 min^[9]; *gyrB* PCR引物: *gyrB*-F 5'-GGATAACGCGATTGACGAA G-3', *gyrB*-R 5'-GCCGTGARCAAARTCRAA-3'^[10],50 μL PCR反应体系: *gyrB*-F、*gyrB*-R正反引物(10 μmol/L)各1 μL,模板2 μL,2×mix 25 μL,双蒸水补足体积,扩增条件:预变性94°C 5 min;变性95°C 30 s,退火55°C 30 s,延伸72°C 2 min,45个循环;72°C终延伸7 min^[10]。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,PCR产物测序后BLAST分析。

系统进化树杀鱼 将16S *rDNA*、*gyrB*序列通过NCBI数据库BLAST比对分析,采用MEGA7.0软件基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ),对AS15 16S *rDNA*基因和*gyrB*基因同源性较高的迟缓爱德华氏菌、杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)、类杀鱼爱德华氏菌(*E. piscicida*-like)、鲑鱼爱德华氏菌(*E. ictaluri*)、保科爱德华氏菌(*E. hoshinae*)等菌株构建系统进化树^[11]。

1.5 AS15的爱德华氏菌种特异性引物检测

参考文献合成爱德华氏菌属内种特异性引物,对用于AS15的种鉴别。各引物序列:迟缓爱德华氏菌(ET)、鲑鱼爱德华氏菌(ESC)、杀鱼爱德华氏菌(EP)^[10]、类杀鱼爱德华氏菌(EPL)^[10](表1);鉴别用菌株参见“实验鱼及菌株”部分;PCR条件:预变性95 °C 5 min;变性95 °C 15 s,退火58 °C 15 s,延伸72 °C 15 s, 35个循环;72 °C终延伸5 min^[10]。

表 1 特异性引物序列

引物 primers	引物序列 primer sequences	参考文献 references
ET-F	CAGTGATAAAAAGGGGTGGA	[10]
ET-R	CTACACAGCAACGACAACG	
ESC-F	ACTTATCGCCCTCGCAAC	[10]
ESC-R	GCCTCTGATAAGTGGTTTCG	
EP-F	CTTTGATCATGGTTGCGGAA	[10]
EP-R	CGGCGTTTTCTTTCTCTCG	
EPL-F	TTTGATCGGGTACGCTGT	[10]
EPL-R	AATTGCTCTATACGCACGC	

1.6 AS15菌株致病基因的检测

对分离菌株AS15侵袭相关的菌毛基因*fimA*、*fimB*、*fimC*、*fimD*和毒力相关*sodB*、*citC*、*esrB*、*godB*、*mukF*和*katB*进行分析,各致病基因引物见表2。

表 2 AS15致病基因检测用PCR引物

Tab. 2 PCR primers for pathogenic gene of AS15

目的基因 target genes	引物序列 primer sequences	参考文献 references
<i>fimA</i>	<i>fimA</i> -F: CGGTAAAGTTGAGTTACGGGTG	[12]
	<i>fimA</i> -R: TGTAACCGTGTGGCGTAAG	
<i>fimB</i>	<i>fimB</i> -F: CTATATGGTGCAGACCTG	[12]
	<i>fimB</i> -R: GCTGAAGGAGACTGTATTG	
<i>fimC</i>	<i>fimC</i> -F: AACACCGGTATCAGCGGAAC	[12]
	<i>fimC</i> -R: GTTGAATCGGTATGGCGTC	
<i>fimD</i>	<i>fimD</i> -F: GGTAACCTGATTTGGCGTTC	[12]
	<i>fimD</i> -R: GGATCACCTGGATCTTATCC	
<i>sodB</i>	<i>sodB</i> -F: ATGTCATTTCGAATTACCTGC	[13]
	<i>sodB</i> -R: TCGATGTAATAAGCGTGTCCCA	
<i>citC</i>	<i>citC</i> -F: TTTCCGTTTGTGAATCAGGTC	[14]
	<i>citC</i> -R: AATGTTTCGGCATAGCGTTG	
<i>esrB</i>	<i>esrB</i> -F: GATCATGCCTTGTCTAGCC	[15]
	<i>esrB</i> -R: TCGGCGACCAGCTTGAGA	
<i>godB</i>	<i>godB</i> -F: ATTCCCGCTTTGGTTCAGA	[16]
	<i>godB</i> -R: GAGGAGCCGATAGTATTGGTA	
<i>mukF</i>	<i>mukF</i> -F: TTTGGACGGTGAAATGAGC	[16]
	<i>mukF</i> -R: CGTTGCGGTGCCAGTGAA	
<i>katB</i>	<i>katB</i> -F: GATGCGATCAAGTCCCGGA	[17]
	<i>katB</i> -R: ACCTGGATGTACAGATCCCAT	

2 结果

2.1 患病黑棘鲷症状及解剖观察

2017年4月初, 跑道式养殖池患病黑棘鲷出现剧烈游动, 随后活力下降、食欲减退, 鱼体

表面出现溃疡, 并陆续死亡。黑棘鲷剖检可见肝脏、脾脏、肾脏有白色结节, 严重者肝脏充血并肿大, 脾脏表面及内部布满白色肉芽肿结节, 且伴随大量腹水; 解剖镜下可见白色结节紧密排列分布于脾脏内外(图版)。



图版 自然发病黑棘鲷症状

1. 患病黑棘鲷; 2. 脾白色肉芽肿、黄色黏液; 3. 肝肿大充血; 4. 解剖镜下的脾白色肉芽肿($\times 10$)

Plate Symptoms of naturally infected black *A. schlegelii*

1. diseased *A. schlegelii*; 2. spleen granulomata and yellow mucus; 3. hyperemic and edematous liver; 4. granulomata in spleen by dissection microscope($\times 10$)

2.2 AS15对黑棘鲷的LD₅₀

分离菌株AS15腹腔注射感染健康黑棘鲷, 注射2 d后黑棘鲷呈食欲减退、反应迟钝, 濒死黑棘鲷沿水簇箱快速转圈、头朝上漂浮, 陆续死亡。最高浓度组注射第2天开始死亡, 感染2~6 d死亡黑棘鲷脾脏肿大、内脏无明显结节症状; 第7天后死亡黑棘鲷肉眼可观察到脾脏出现与自然发病黑棘鲷相同的白色结节(图1), 第8天后发病和死亡鱼脾脏可见明显白色结节, 第11天后不再出现死亡, 对照组未出现死亡。攻毒发病所分离菌株菌体形态、菌毛基因等与AS15相同, 表明AS15可引起健康黑棘鲷发病并出现自然发病症状。用寇氏法计算出AS15对黑棘鲷的半数致死浓度为 6.5×10^4 CFU/尾(表3)。

2.3 黑棘鲷分离菌株AS15的鉴定

菌落和菌体形态 AS15 TSA培养基28 °C 培养24~48 h可形成圆形、微隆起、光滑、湿

润、半透明、直径0.5~1 mm灰白色菌落(图2-a); 菌体为短杆状菌体, 无荚膜, 不形成芽孢, 革兰染色呈阴性(图2-b)。

生理生化鉴定 采用API 20E生化鉴定条对AS15进行鉴定, 分离菌株氧化酶为阴性, 葡



图1 AS15攻毒后濒死黑棘鲷症状
解剖镜下脾白色肉芽肿性结节($\times 10$)

Fig. 1 The symptoms of infected *A. schlegelii*
Granulomatous nodules in spleen by dissection microscope ($\times 10$)

表3 人工感染实验结果

Tab. 3 Results of artificial infection experiment

注射浓度/(CFU/mL) injection concentration	死亡鱼数/(尾/d) mortality number														累计死亡数/尾 total mortality	死亡率/% mortality rate
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
8×10^8	0	2	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	13	100
8×10^7	0	1	2	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	12	92
8×10^6	0	0	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	10	77
8×10^5	0	0	0	1	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	7	54
8×10^4	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	5	38
对照 control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

注: 注射剂量0.1 mL/尾

Notes: the injection dose was 0.1 mL/ind.

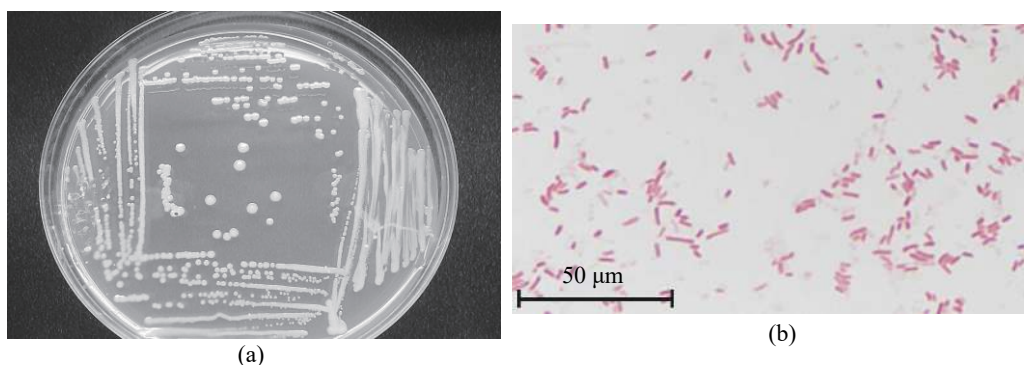


图2 黑棘鲷分离菌AS15的菌落及菌体形态

(a) AS15在TSA的菌落; (b) 革兰染色的AS15菌体($\times 100$)Fig. 2 The morphology and bacteria of AS15 isolated from *A. schlegelii*(a) colony of AS 15 on TSA; (b) rods of AS15 by gram staining ($\times 100$)

葡萄糖发酵, 赖氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、 H_2S 、枸橼酸、明胶液化、葡萄糖产酸、硝酸盐还原、甲基红等呈阳性, 尿素酶呈弱阳性, 半乳糖苷、精氨酸、吡啶、VP反应、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李醇、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖等呈阴性(表4), 与类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105和迟缓爱德华氏菌典型菌ATCC15947相似度为86.2%, 与杀鱼爱德华氏菌ET^T883的相似度为82.8%。

16S rDNA序列 测定了AS15 16S rDNA全序列, 经NCBI数据库BLAST比对, 序列相似度为99%, 排前5位菌株分别为迟缓爱德华氏菌Ya-1(KF032624)和N1(KJ725306)、鲑爱德华氏菌GYQ(KF952599)、类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105(CP011516)和EA181011(CP011364)。

2.4 系统进化树分析

为确定AS15的分类地位, 测定了16S rDNA和

*gyrB*基因全序列, 分别得到1 438 bp和1 792 bp的序列。系统进化树分析结果显示, AS15的16S rDNA序列在系统进化树上与杀鱼爱德华氏菌ET^T883^[11](KC202809)和类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105^[9](JX 866968)聚为一簇, 同源率为99%; *gyrB*基因序列与类杀鱼爱德华氏菌NCIM2056^[10](JN700741)和LADL05-105 (JX867004)同源性达100%, 与杀鱼爱德华氏菌ET^T883(JN700725)同源性达97%(图3, 4)。

根据生化鉴定指标、16S rDNA、*gyrB*基因全序列分子系统进化树分析结果, AS15可鉴定初步为类杀鱼爱德华氏菌成员^[18]。

2.5 AS15对爱德华氏菌种特异性引物的PCR结果

采用迟缓爱德华氏菌、鲑鱼爱德华氏菌、杀鱼爱德华氏菌和类杀鱼爱德华氏菌种特异性引物, 对本次发病黑棘鲷分离菌株、人工感染

表 4 菌株AS15的生化鉴定

Tab. 4 Biochemical identification of strain AS15

生化项目 biochemical items		实验菌株 experimental strains				生化项目 biochemical items		实验菌株 experimental strains			
		AS15	LADL05-105 ^[10]	ET883 ^[10]	ATCC 15947 ^[4]			AS15	LADL05-105 ^[10]	ET883 ^[10]	ATCC 15947 ^[4]
革兰染色 gram stain	Gram	-	-	-	-	甲基红 methlred	MR	+	+	+	+
氧化酶 oxidase	OX	-	-	-	-	葡萄糖 glucose	GLU	+	+	+	+
葡萄糖发酵 glucose	GLU O/F	F	F	F	F	甘露醇 mannitol	MAN	-	-	-	-
运动性 motility	MOV	+	+	+	+	肌醇 inositol	INO	-	-	-	-
半乳糖苷 galactoside	ONPG	-	+	+	-	山梨醇 sorbitol	SOR	-	-	-	-
精氨酸 arginine	ADH	-	-	-	-	鼠李醇 rhamnol	RHA	-	-	-	-
赖氨酸 lysine	LDC	+	+	+	+	蔗糖 sucrase	SAC	-	+	+	+
鸟氨酸 ornithine	ODC	+	+	+	+	蜜二糖 melibiose	MEL	-	-	-	-
苯丙氨酸 phenylalanine	TDA	-	-	-	-	苦杏仁苷 amygdalin	AMY	-	-	-	-
枸橼酸 citric acid	CIT	+	+	-	-	阿拉伯糖 arabinose	ARA	-	-	-	-
硫化氢 hydrothion	H ₂ S	+	+	+	+	硝酸盐还原 nitrate reduction	NO ₂	+	+	+	+
尿素 carbamide	URE	±	-	-	-	亚硝酸盐还原 nitrite reduction	N ₂	-	-	-	-
吲哚 indole	IND	+	+	+	+	麦康凯琼脂 MacConkey agar	McC	+	+	+	+
丙酮酸盐 pyruvate	VP	-	-	-	-	SS琼脂 SS agar	SS-gar	+	+	+	+
明胶 gelatin	GLN	+	-	-	-						

注: +, 阳性; -, 阴性; 下同

Notes: +, positive; -, negative; the same below

再分离株及实验室保存迟缓爱德华氏菌分离菌株进行种特异性PCR鉴定(表5), 实验室保存的迟缓爱德华氏菌株可用ET特异引物扩增出大小为114 bp特异性条带; 发病黑棘鲷分离株AS12、AS15以及人工感染后再次分离的菌株AS15-2可用类杀鱼爱德华氏菌种特异引物扩增出128 bp特异性条带, 用迟缓爱德华氏菌、鲑鱼爱德华氏菌和杀鱼爱德华氏菌的种特异引物未扩增出相应条带; 对照菌株大黄鱼内脏白色结节病病原杀香鱼假单胞菌YC-17-02采用4对爱德华氏菌种特异性引物均未扩增出相应条带。结果提示, 本次分离的菌株AS15为类杀鱼爱德华氏菌(图5)。

2.6 分离株AS15的致病基因检测

对分离株AS15的致病基因进行了检测, 菌毛基因检测结果显示, AS15的重要菌毛基因 *fimA*、*fimB*、*fimC*和*fimD*等与爱德华氏菌侵袭和致病相关的菌毛基因均为阳性(图6-a), 对4个菌毛基因的PCR产物进行测序在NCBI数据库序列

比对, 结果发现, *fimA*、*fimB*和*fimC*基因与杀鱼爱德华氏菌LADL05-105(CP011516.1)和EA181011(CP011364.1)相似性高达98%, *fimD*基因与爱德华氏菌S11-285(CP016044.1)相似性为99%, 表明AS15有较强的侵袭力; 对*sodB*、*citC*、*esrB*、*mukF*、*katB*和*gadB*等6个致病基因进行了PCR检测, 结果显示, AS15对*sodB*、*citC*、*esrB*、*mukF*和*katB*均为阳性, NCBI数据库中比对发现, *sodB*基因与杀鱼爱德华氏菌WFE 1(MG225525)相似性高达97%, *citC*基因与杀鱼爱德华氏菌ETW41 (CP019440)相似性高达99%, *esrB*、*katB*和*mukF*基因与杀鱼爱德华氏菌LADL05-105(CP011516)相似性分别高达98%、99%和96%。

3 讨论

爱德华氏菌是多种鱼类、爬行类和其他经济动物的病原, 也可引起人类疾病, 是人鱼共患病的潜在病原。爱德华氏菌可感染石斑鱼(*Epinephelus* sp.)、罗非鱼(*Oreochromis* spp.)、尖吻鲈(*Lates*

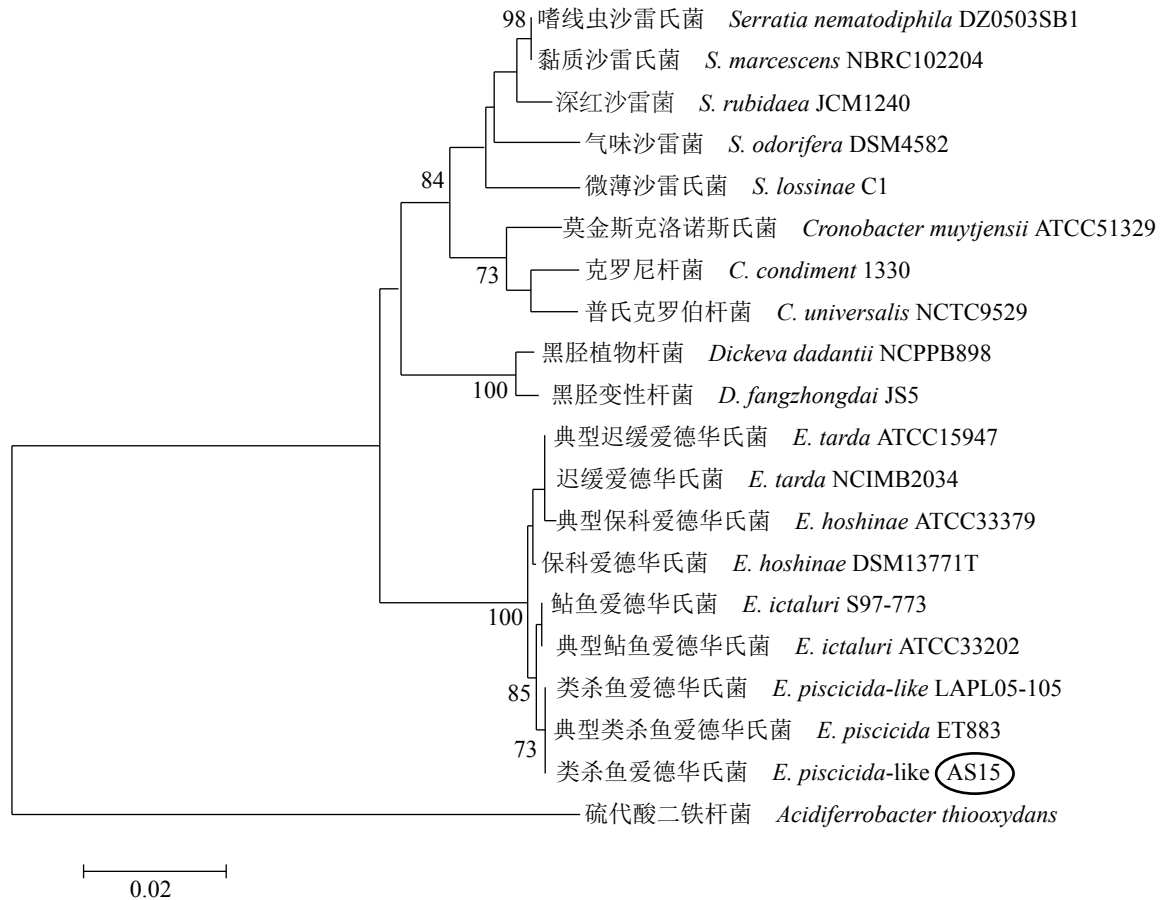


图3 菌株AS15的16S rDNA系统发育树分析

嗜线虫沙雷氏菌DZ0503SBS1 (基因登录号: NR044385)、黏质沙雷氏菌NBRC102204 (NR114043)、深红沙雷菌JCM1240 (NR024644)、气味沙雷菌DSM4582 (AF286870)、微薄沙雷氏菌C1 (NR116806)、莫金斯克洛诺斯氏菌ATCC51329 (MF118620)、克罗尼杆菌1330 (FN539031)、普氏克罗伯杆菌NCTC9529 (MF118669)、黑胫植物杆菌NCPPB898 (KY231142)、黑胫变性杆菌JS5 (NR151914)、迟缓爱德华氏菌ATCC15947 (AB050827)、迟缓爱德华氏菌NCIMB2034 (KC138728)、保科爱德华氏菌ATCC33379 (AB050825)、保科爱德华氏菌DSM13771T (MF034728)、鲑鱼爱德华氏菌S97-773 (JX866969)、鲑鱼爱德华氏菌ATCC33202 (AB050826)、类杀鱼爱德华氏菌LADL05-105 (JX866968)、类杀鱼爱德华氏菌ET883 (KC202809)、类杀鱼爱德华氏菌(菌株AS15)、硫代酸二铁杆菌 (NR114629)

Fig. 3 Phylogenetic tree and analysis for 16S rDNA sequence of AS15

NR114629NR114629*S. nematodiphila* DZ0503SBS1 (GenBank accession number: NR044385)、*S. marcescens* NBRC102204 (NR114043)、*S. rubidaea* JCM1240 (NR024644)、*S. odorifera* DSM4582 (AF286870)、*S. lossinae* C1(NR116806)、*C. muytjensii* ATCC51329 (MF118620)、*C. condiment* 1330 (FN539031)、*C. universalis* NCTC9529 (MF118669)、*D. dadantii* NCPPB898 (KY231142)、*D. fangzhongdai* JS5 (NR151914)、*E. tarda* ATCC15947 (AB050827)、*E. tarda* NCIMB2034 (KC138728)、*E. hoshinae* ATCC33379 (AB050825)、*E. hoshinae* DSM13771T (MF034728)、*E. ictaluri* S97-773 (JX866969)、*E. ictaluri* ATCC33202 (AB050826)、*E. piscicida* LADL05-105 (JX866968)、*E. piscicida* ET883 (KC202809)、*E. piscicida-like* AS15、*A. thiooxydans* (NR114629)

calcarifer)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、狭鳞庸鲽(*Hippoglossus stenolepis*)等海水鱼类^[18-24]及斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、斑头红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)、养殖鲤科鱼等^[25-32]淡水鱼类,还可感染海参和龟鳖类^[10],造成极大经济损失。本实验对引起海水跑道式养殖黑棘鲷暴发疾病的病原菌进行了研究,将从典型症状的患病黑棘鲷分离株AS15进行人工感染健康

黑棘鲷后可引发内脏白色结节,半数致死浓度为 6.5×10^4 CFU/尾,表现出极强毒力;该菌株经形态、生理生化鉴定、16S rDNA和gyrB基因系统进化树分析,其16S rDNA与杀鱼爱德华氏菌代表株ET⁺883等聚为一簇,gyrB进化树显示与类杀鱼爱德华氏菌NCIM2056等聚为一簇;通过爱德华氏菌属种特异性引物鉴定,AS15可用类杀鱼爱德华氏菌EPL扩增出128 bp特异性片段,序列分析证实为类杀鱼爱德华氏菌片段,表明该分离

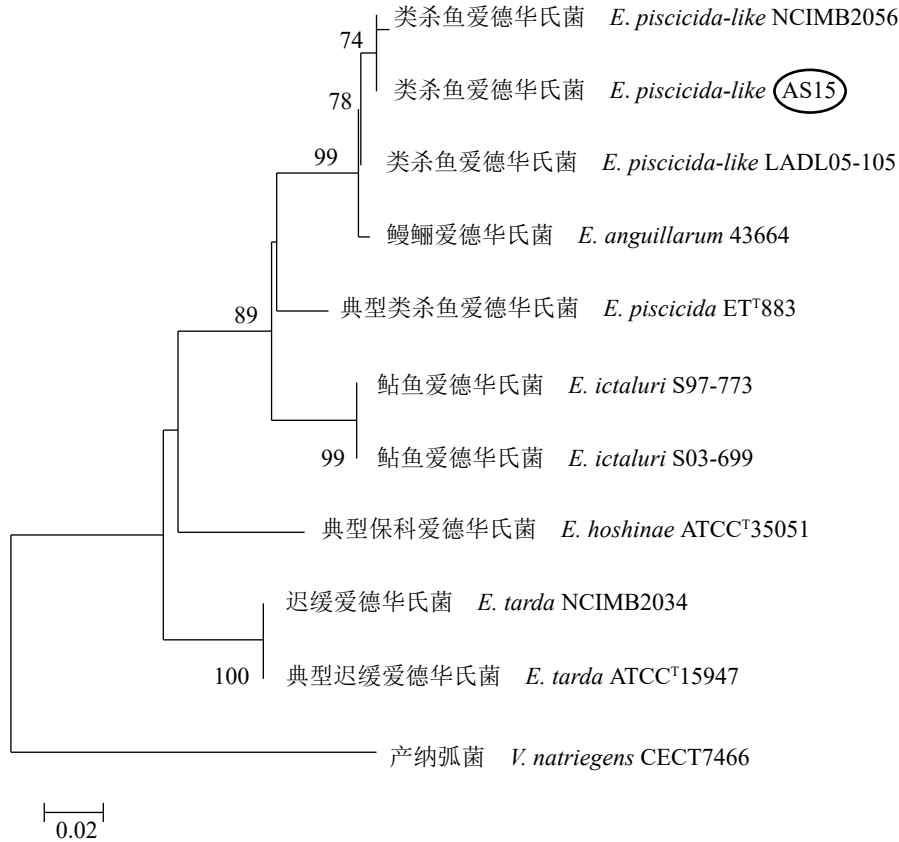


图 4 菌株AS15的gyrB系统发育树分析

杀鱼爱德华氏菌NCIMB2056 (基因登录号: JN700741)、杀鱼爱德华氏菌LADL05-105 (JX867004)、鳎鲷爱德华氏菌43664 (MG225462)、杀鱼爱德华氏菌ET883 (JN700725)、鲑鱼爱德华氏菌S97-773 (KM660684)、鲑鱼爱德华氏菌S03-699 (KM660683)、保科爱德华氏菌ATCC35051 (KM660678)、迟缓爱德华氏菌NCIMB2034 (EU259314)、迟缓爱德华氏菌ATCC15947 (JX866988)、产纳弧菌CECT7466 (FM999819)

Fig. 4 Phylogenetic tree and analysis for gyrB sequence of AS15

E. piscicida NCIMB2056 (GenBank accession number: JN700741), *E. piscicida* LADL05-105 (JX867004), *E. anguillarum* 43664 (MG225462), *E. piscicida* ET883 (JN700725), *E. ictaluri* S97-773 (KM660684), *E. ictaluri* S03-699 (KM660683), *E. hoshinae* ATCC35051 (KM660678), *E. tarda* NCIMB2034 (EU259314), *E. tarda* ATCC15947 (JX866988), *V. natriegens* CECT7466 (FM999819)

表 5 不同爱德华氏菌分离株对种特异性引物测定结果

Tab. 5 *Edwardsiella* spp. isolates from different fish identified by species-specific primers

编号 no.	菌株名 name	分离时间 isolation time	分离地区 location	分离宿主 host	种特异性引物 species-specific PCR			
					ET	EP	ESC	EPL
1	59-T-S2	2015年9月	余姚	黄颡鱼	+	-	-	-
2	59-T-S3	2013年9月	余姚	黄颡鱼	+	-	-	-
3	1501-T	2015年4月	新昌	鲟鱼	+	-	-	-
4	YC-17-02	2017年5月	椒江	大黄鱼	-	-	-	-
5	AS12	2017年4月	临海	发病黑棘鲷4	-	-	-	+
6	AS15	2017年4月	临海	发病黑棘鲷5	-	-	-	+
7	AS15-2	2018年6月	宁波	攻毒发病黑棘鲷	-	-	-	+

株为类爱德华氏菌成员。分离菌株AS15具有 *fimA*、*fimB*、*fimC*、*fimD*等菌毛基因和 *sodB*、

citC、*esrB*、*mukF*、*katB*等毒力基因, 致病力强, 是引起本次黑棘鲷疾病暴发的病原。

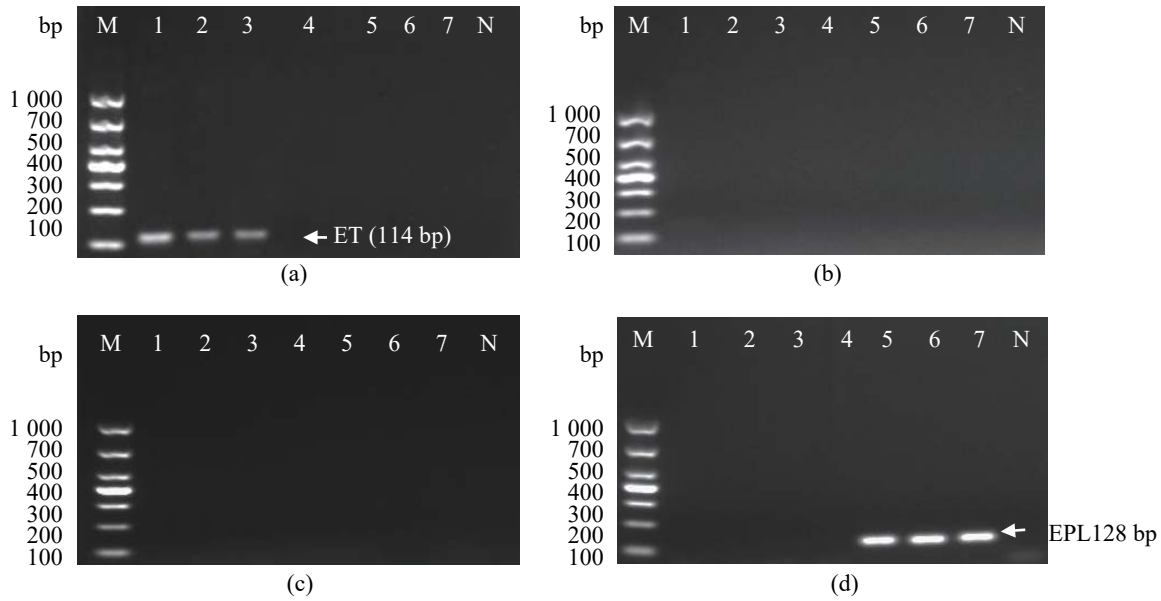


图 5 种特异性引物对爱德华氏菌分离株的鉴别

(a) 迟缓爱德华氏菌引物; (b) 鲇爱德华氏菌引物; (c) 杀鱼爱德华氏菌引物; (d) 类杀鱼爱德华氏菌引物; 菌株编号: M. marker; 1. 59-T-S2; 2. 59-T-S3; 3. 1501-T; 4. YC-17-02; 5. AS12; 6. AS15; 7. AS15-2; N. 对照

Fig. 5 Identification of *Edwardsiella* isolates by species-specific primers

(a) primer of *E. tarda*; (b) primer of *E. ictaluri*; (c) primer of *E. piscicida*; (d) primer of *E. piscicida*-like, lanes 1-7 *Edwardsiella* isolates, 1. 59-T-S2; 2. 59-T-S3; 3. 1501-T; 4. YC-17-02; 5. AS12; 6. AS15; 7. AS15-2; N. control

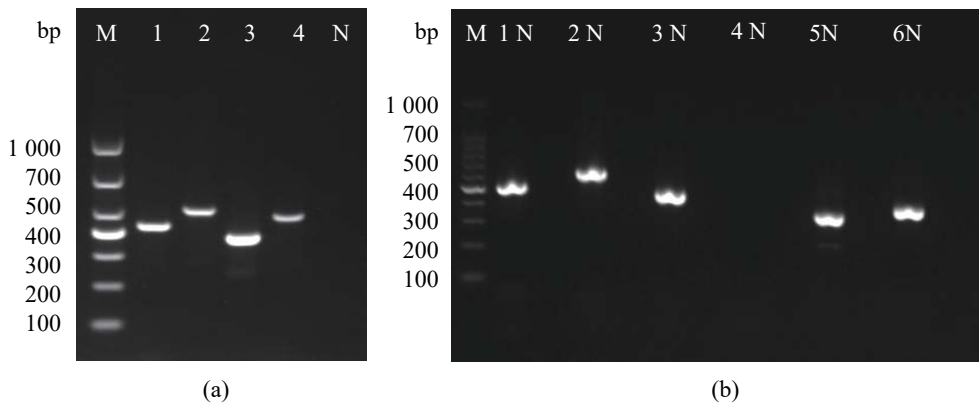


图 6 AS15主要致病基因的PCR检测

(a)菌毛基因, 1~4. *fimA*(415 bp)、*fimB*(493 bp)、*fimC*(357 bp)、*fimD*(445 bp); N-对照; (b)其他致病基因, 1~6. *sodB*(490 bp)、*citC*(553 bp)、*esrB*(454 bp)、*mukF*(303 bp)、*katB*(377 bp); N-对照

Fig. 6 Main pathogenic gene detection of AS15 with PCR

(a) fimbrial gene, lane 1-4. *fimA*(415 bp), *fimB*(493 bp), *fimC*(357 bp), *fimD*(445 bp); (b) other pathogenic genes, lane 1-6. *sodB*(490 bp), *citC*(553 bp), *esrB*(454 bp), *mukF*(303 bp), *katB*(377 bp); N-control

传统上爱德华氏菌属分为迟缓爱德华氏菌, 鲇爱德华氏菌、保科爱德华氏菌^[33]3个种, 以迟缓爱德华氏菌分布和感染宿主最为广泛^[34], 又分为两个生物群, 其中1型为典型的迟缓爱德华氏菌, 表现为对阿拉伯糖、蔗糖、海藻糖和甘露醇等多种糖类不利用。2012年根据迟缓爱德

华氏菌株毒力的不同, 又提出EdwG I型和EdwG II型两个不同基因型^[35], EdwG I型含有III型分泌系统(T3SS)和VI型分泌系统(T6SS), 对鱼类具有更强致病性, 该型迟缓爱德华氏菌现命名为杀鱼爱德华氏菌, 以分离自欧洲鳗的ET^T883为代表菌株^[11], 原迟缓爱德华氏菌中无T3SS或T6SS菌

株仍称为迟缓爱德华氏菌, 以 ATCC^T15947 为代表菌株(分离自病人)^[36]。随后又将杀鱼爱德华氏菌分为杀鱼爱德华氏菌和类杀鱼爱德华氏菌 2 个种^[18], 两者序列存在差异, 生化性状上, 现报道的迟缓爱德华氏菌和杀鱼爱德华氏菌枸橼酸多为阴性, 而类杀鱼爱德华氏菌枸橼酸反应多为阳性, 两者还可通过特异的种鉴定性引物加以区分。本实验报道的黑棘鲷 AS15 菌株, 可引起黑棘鲷内脏结节症状, 与引起大口黑鲈鱼心脏、肝脏、肾脏肉芽肿结节的杀鱼爱德华氏菌相似^[18], 生化性状与迟缓爱德华氏菌典型菌和类杀鱼爱德华氏菌相似度为 86.2%, 与杀鱼爱德华氏菌相似度为 82.8%; 16S *rDNA* 进化树分析表明, AS15 与杀鱼爱德华氏菌 ET^T883 和类杀鱼爱德华氏菌 LADL05-105 聚为一簇; *gyrB* 进化树与类杀鱼爱德华氏菌 NCIM2056(JN700741) 和 LADL05-105(JX867004) 同源性为 100%, 与杀鱼爱德华氏菌 ET^T883(JN700725) 同源性达 97%; 爱德华氏菌属种特异性引物 PCR 分析表明, AS15 仅对类杀鱼爱德华氏菌(EPL)有扩增条带。综上分析, 确定 AS15 属类杀鱼爱德华氏菌。这是我国首次从海水鲷科鱼类中检出致病性类杀鱼爱德华氏菌。

对于爱德华氏菌的致病因子已开展大量研究, 发现了皮肤毒素^[37]、溶血素^[38]、保护细菌在巨噬细胞增殖的抗调理因子^[39]、血凝素^[33]、细胞侵袭因子^[40]等多种毒力因子, 这些因子包括逃避机体免疫、增强细菌入侵能力的侵袭因子, 也包括可在体内破坏机体组织和细胞的溶血系等因子^[41]。菌毛基因与迟缓爱德华氏菌的致病性存在很强的相关性, Sakai 等^[12]研究发现, 17 株致病性菌株中可检测到 4 种菌毛基因, 而 14 株非致病性菌株中 13 株未检出任何菌毛基因^[12]。本实验对黑棘鲷分离株 AS15 的 4 种菌毛基因进行了检测, 表明 4 种菌毛基因均为阳性, 此外还检测了抵抗因子基因(*sodB*)、柠檬酸裂解酶基因(*citC*)、毒力启动因子基因(*esrB*)、杀伤因子基因(*mukF*)、过氧化氢酶基因(*katB*)和谷氨酸脱竣酶同工酶基因(*gadB*)等 6 个致病基因, 结果显示, AS15 的 *sodB*、*citC*、*esrB*、*mukF*、*katB* 等 5 个毒力基因均为阳性, 其中包括 T3SS 分泌系统调节基因 *esrB*^[15]。综上分析, 为 AS15 致病机理的深入研究奠定了基础, 同时为该菌毒力的判断提供了依据。

参考文献:

- [1] Hong W S, Zhang Q. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1-4): 305-318.
- [2] 郭云峰, 赵云武. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Guo Y F, Zhao Y W. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017(in Chinese).
- [3] 乔毅, 沈辉, 万夕和, 等. 1 株黑鲷致病性假交替单胞菌的鉴定及毒力基因分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 229-233.
Qiao Y, Shen H, Wan X H, et al. Identification and virulence gene analysis of a pathogenicity *Pseudomonas alternatus* strain of *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(4): 229-233(in Chinese).
- [4] 王国良, 郑天伦, 金珊, 等. 黑鲷幼鱼腹水病病原菌[J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(1): 33-35.
Wang G L, Zheng T L, Jin S, et al. Preliminary studies on pathogen of ascites disease of cultured *Sparus macrocephalus*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, 23(1): 33-35(in Chinese).
- [5] 毛芝娟, 王美珍, 陈吉刚, 等. 黑鲷肠炎病原恶臭假单胞菌的分离和鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 23-28.
Mao Z J, Wang M Z, Chen J G, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida*, a causative agent of gastroenteritis in black sea bream, *Sparus macrocephalus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 23-28(in Chinese).
- [6] 闫茂仓, 王雪鹏, 丁雷. 养殖黑鲷迟缓爱德华菌的分离鉴定[J]. *山东畜牧兽医*, 2010(4): 19, 22.
Yan M C, Wang X P, Ding L. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from cultured *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Shandong Journal of Animal Husbandry and Veterinary Science*, 2010(4): 19, 22(in Chinese).
- [7] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC₅₀[J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 414-417.
Jia C S. Calculating the LC₅₀ of insecticides with software SPSS[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2006, 43(3): 414-417(in Chinese).
- [8] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J].

- [Journal of Bacteriology](#), 1991, 173(2): 697-703.
- [9] Shafiei S, Viljamaa-Dirks S, Sundell K, *et al.* Recovery of *Edwardsiella piscicida* from farmed whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), in Finland[J]. [Aquaculture](#), 2016, 454: 19-26.
- [10] Griffin M J, Ware C, Quiniou S M, *et al.* *Edwardsiella piscicida* identified in the Southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR[J]. [Diseases of Aquatic Organisms](#), 2014, 108(1): 23-35.
- [11] Abayneh T, Colquhoun D J, Sørum H. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish[J]. [Journal of Applied Microbiology](#), 2013, 114(3): 644-654.
- [12] Sakai T, Iida T, Osatomi K, *et al.* Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR[J]. [Fish Pathology](#), 2007, 42(2): 115-117.
- [13] Yamada Y, Wakabayashi H. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of *sodB*[J]. [Fish Pathology](#), 2009, 34(3): 145-150.
- [14] 江云, 李寿崧, 王寿昆, 等. 致病性迟钝爱德华氏菌毒力基因的PCR检测[J]. [中国食品学报](#), 2008, 8(4): 123-129.
- Jiang Y, Li S S, Wang S K, *et al.* Detection of the virulence genes of pathogenic *Edwardsiella tarda* by PCR assay[J]. [Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology](#), 2008, 8(4): 123-129(in Chinese).
- [15] Tan Y P, Zheng J, Tung S L, *et al.* Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence[J]. [Microbiology](#), 2005, 151(7): 2301-2313.
- [16] 程俊茗, 万明月, 周晋扬, 等. 鲫源迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其毒力基因的检测[J]. [微生物学通报](#), 2017, 44(10): 2380-2390.
- Cheng J M, Wan M Y, Zhou J Y, *et al.* Identification and virulence genes detection of *Edwardsiella tarda* isolated from *Carassius auratus gibelio*[J]. [Microbiology China](#), 2017, 44(10): 2380-2390(in Chinese).
- [17] Han H J, Kim D H, Lee D C, *et al.* Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel)[J]. [Journal of Fish Diseases](#), 2006, 29(10): 601-609.
- [18] Ucko M, Colorni A, Dubytska L, *et al.* *Edwardsiella piscicida*-like pathogen in cultured grouper[J]. [Diseases of Aquatic Organisms](#), 2016, 121(2): 141-148.
- [19] Reichley S R, Waldbieser G C, Lawrence M L, *et al.* Complete genome sequence of an *Edwardsiella piscicida*-like species, recovered from Tilapia in the United States[J]. [Genome Announcements](#), 2015, 3(5): e01004-15.
- [20] Iveson J B. Strontium chloride B and E. E. enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and *Arizona* species from tiger snakes[J]. [Journal of Hygiene](#), 1971, 69(3): 323-330.
- [21] White F H, Simpson C F, Williams Jr L E. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida[J]. [Journal of Wildlife Diseases](#), 1973, 9(3): 204-208.
- [22] Kusuda R, Itami T, Munekiyo M, *et al.* Characteristics of a *Edwardsiella* sp. from an epizootic of cultured sea breams[J]. [Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries](#), 1977, 43(2): 129-134.
- [23] Matsuyama T, Kamaishi T, Ooseko N, *et al.* Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish[J]. [Fish Pathology](#), 2005, 40(3): 133-135.
- [24] Nougayrede P H, Vuillaume A, Vigneulle M, *et al.* First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay[J]. [Bulletin of the European Association of Fish Pathologists](#), 1994, 14: 128-129.
- [25] Thune R L, Stanley L A, Cooper R K. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish[J]. [Annual Review of Fish Diseases](#), 1993, 3: 37-68.
- [26] Sahoo P K, Mukherjee S C, Nayak S K, *et al.* Pathology of mixed infections of saprolegniasis-myxosporidiosis in Indian major carp (*Catla catla* Ham)[J]. [Bangladesh Journal of Fisheries Research](#), 2000, 4(2): 171-177.
- [27] Swain P, Nayak S K. Comparative sensitivity of different serological tests for seromonitoring and surveillance of *Edwardsiella tarda* infection of Indian major carps[J]. [Fish & Shellfish Immunology](#), 2003, 15(4): 333-340.
- [28] Amandi A, Hiu S F, Rohovec J S, *et al.* Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. [Applied and](#)

- Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1380-1384.
- [29] Uhland F C, Hélie P, Higgins R. Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 74-77.
- [30] Sae-Oui D, Muroga K, Nakai T. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*[J]. *Fish Pathology*, 1984, 19(3): 197-199.
- [31] Van Damme L R, Vandepitte J. Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(3): 475-479.
- [32] Hawke J P, McWhorter A C, Steigerwalt A G, et al. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1981, 31(4): 396-400.
- [33] Janda J M, Abbott S L, Kroske-Bystrom S, et al. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(9): 1997-2001.
- [34] Park S B, Aoki T, Jung T S. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43: 67.
- [35] Yang M J, Lv Y Z, Xiao J F, et al. *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36987.
- [36] Shao S, Lai Q L, Liu Q, et al. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813^T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(1): 36-47.
- [37] Ullah M A, Arai T. Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*[J]. *Fish Pathology*, 1983, 18(2): 65-70.
- [38] Hirano I, Tange N, Aoki T. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(4): 851-856.
- [39] Srinivasa Rao P S, Lim T M, Leung K Y. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(9): 5689-5697.
- [40] Ling S H M, Wang X H, Xie L, et al. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* *in vivo* and *in vitro* fish models[J]. *Microbiology*, 2000, 146(1): 7-19.
- [41] Ling S H M, Wang X H, Lim T M, et al. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 194(2): 239-243.

Isolation, identification and pathogenicity studies on visceral granulomatous disease in *Acanthopagrus schlegelii*

ZHANG Honghu¹, YUAN Na¹, FU Chaoying¹, HE Jie²,
LUO Huaming², BAO Jiawei³, QIAN Dong^{1*}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China;

2. Taizhou Extension Station for Fishery Technique, Taizhou 318000, China;

3. Zhejiang Hongye Seafood Company, Taizhou 318000, China)

Abstract: A serious disease occurred in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*, cultivated in runway fish culture pond of mariculture farm in Taizhou, Zhejiang province, in April, 2017. The diseased fish showed sluggish swimming, anorexia and ulceration on surface. Moribund fish were dissected with symptoms of massive ascites and swelling of liver, spleen and kidney, with white granulomatous nodules, especially in spleen. The bacteria were isolated with tryptone soybean agar, and all the fish with typical symptoms showed the pure culture of grayish white colony with Gram negative rods. The bacterial strain AS15, from the spleen of fish with most serious granulomatous, was chosen for challenging test to healthy black seabream by injection intraperitoneally. Mortality was recorded with similar symptoms to native infected seabream, with the median death dose of 6.5×10^4 CFU/ind. AS15 was identified as *Edwardsiella tarda* with API 20E biochemical bacteria identification system as well as 16S *rDNA* sequences blasted on NCBI, with 99% similarity to reference strains. With phylogenetic analysis for 16S *rDNA*, AS15 belonged to the same cluster with ET^T883, LADL05-105, *E. piscicida* according to new classification for genus *E. dsiella*, and same cluster to LADL05-105 and NCIM2056, *E. piscicida*-like, the new recommended species of the genus, with 100% similarity on *gyrB* phylogenetic tree. The species-specific primers for genus *E. dsiella* were used for PCR test, and AS15 showed positive to EPL, the species primer for *E. piscicida*-like, and PCR negative to all other three primers of *E. tarda*, *E. piscicida* and *E. ictalur*. Ten pathogenic genes, including four fimbrial genes, and *sodB*, *citC*, *esrB*, *mukF*, *katB*, the related virulence genes were analyzed by PCR. The strain AS15 showed positive to all four fimbrial genes and other virulence genes except gene *gadB*. It could be considered that AS15, *E. piscicida*-like bacteria, the first pathogenic strain isolated and reported from marine cultivated seabream, was the pathogen of serious outbreak case of visceral granulomatous disease in black seabream in runway pond culture system.

Key words: *Acanthopagrus schlegelii*; *Edwardsiella piscicida*-like; visceral granulomatous disease; pathogenicity

Corresponding author: QIAN Dong. E-mail: qiandong@nbu.edu.cn

Funding projects: Research Project of Taizhou Municipal Bureau of Science and Technology Finance(1701ny)