

文章编号: 1000-0615(2019)05-1359-10

DOI: 10.11964/jfc.20181011505

半滑舌鳎创伤弧菌分离鉴定及其荧光定量PCR方法的建立

胡秀彩¹, 王英杰¹, 吕爱军^{1*}, 孙敬锋¹, 王庆奎¹,
廉正义¹, 刘小雪¹, 宋亚娇²

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为确定患病半滑舌鳎的病原, 从其体内分离到3株革兰氏阴性菌, 将其分别命名为ST-1、ST-3和ST-6, 进行细菌理化特性、药敏试验、16S *rDNA*测序以及组织病理学观察等方面的研究, 并建立了外膜蛋白(OMP)基因的SYBR Green I荧光定量PCR检测方法。结果显示, 3株分离菌株的理化特性符合创伤弧菌特征, 16S *rDNA*与创伤弧菌标准菌株ATCC29307序列相似性达99%以上, 系统发育树分析显示, 3株分离株与创伤弧菌自然聚为一支, 最终鉴定为创伤弧菌; 药敏试验显示, 3株菌对头孢克肟、头孢哌酮、链霉素、亚胺培南和氟苯尼考等药物高度敏感。人工回归感染试验表明, 分离株具有致病性, 且半滑舌鳎、斑马鱼的临床症状与自然患病鱼症状相似; 组织病理学观察显示, 鳃丝上皮细胞增生, 鳃小片肿胀黏连、颗粒细胞和黏液细胞增多, 肝脏中央静脉淤血, 肾脏出血、坏死, 肠道黏膜固有层萎缩、黏液细胞增多等。进一步建立OMP基因的荧光定量PCR方法, 结果显示, 标准曲线的相关系数为0.995, 检测下限为 1.88×10^2 CFU/mL。以上结果可为半滑舌鳎弧菌病的致病机理、分子诊断和防治提供科学参考。

关键词: 半滑舌鳎; 创伤弧菌; 组织病理; 荧光定量PCR

中图分类号: Q 93-331; S 941.42

文献标志码: A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国特有的名贵经济海水鱼类之一, 随着工厂化养殖规模不断扩大, 多种细菌性传染病频繁发生, 其中弧菌病造成了巨大的经济损失^[1-2]。在弧菌属(*Vibrio*)中, 创伤弧菌(*V. vulnificus*)属于一种重要的传染性病原菌, 主要引起海水养殖鱼类感染发病^[3-4]。研究表明, 创伤弧菌对鱼类有很强的致病性, 曾引发欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)和日本鳗鲡(*A. japonica*)的出血性败血症, 并导致大量死亡^[5-6]。随后, 创伤弧菌在中国多地水产养殖业中暴发流行, 导致发病鱼的种类也逐渐增多, 主要有石鲮(*Kareius bicoloratus*)^[7]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[8]、黄姑鱼(*Nibea albifl-*

ora)^[9]、矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)^[10]、珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)^[11]和裸项栉虾虎鱼(*Ctenogobius gymnauchen*)^[12]等, 病鱼主要表现为皮肤溃烂、腹部积水、肠炎等临床症状。

关于半滑舌鳎创伤弧菌的分离鉴定、发病机制及诊治方法等相关研究, 目前尚未见文献报道。2016年天津某水产养殖公司的半滑舌鳎发病, 出现大量死亡、皮肤出血溃烂等疑似弧菌病症状。本研究首次从典型患病半滑舌鳎体内分离获得3株创伤弧菌, 并进行人工感染试验、组织病理学观察和药敏试验, 而且建立荧光定量PCR(qRT-PCR)的检测方法。这不仅为半滑舌鳎弧菌

收稿日期: 2018-10-24 修回日期: 2019-02-15

资助项目: 国家自然科学基金(31272692); 天津市自然科学基金(18JCYBJC29900, 16JCZDJC33500); 天津市水产产业技术体系创新团队(ITFRS2017009, ITFRS2019049); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金(TJAE201803); 天津农学院综投平台项目(J01009030638)

通信作者: 吕爱军, E-mail: lajand@126.com

病的致病机理和防治奠定基础, 而且为该病的分子诊断提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病半滑舌鳎于2016年10月采自天津市某养殖场。270尾健康半滑舌鳎购自天津某水产养殖公司, 平均体质量(100 ± 10)g, 在25 °C水温条件下持续曝气, 养殖水体盐度保持在12左右, 暂养2周, 确认健康活泼、无不良反应后, 用于人工感染试验。所用到的菌株均是由本实验室分离鉴定, 有哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)及3株创伤弧菌。LB琼脂、2216E培养基、TCBS培养基等购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 细菌生化管、药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司; SYBR Premix Ex Taq I (Tli RHaSeH Plus试剂盒)、DNA Marker DL2000、pMD18-T载体等购自宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌感受态细胞DH5a、细菌基因组DNA提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒等购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 病原菌的分离与生化鉴定

分别取具有典型临床症状的濒死半滑舌鳎数尾, 无菌操作取肝脏、脾脏、肾脏组织块分别涂布于2216E固体培养基上划线接种, 置28 °C恒温培养箱培养18 h后, 挑取菌落形态特征相近的优势菌继续划线纯化, 连续纯化至少3次后接种TCBS平板观察菌落形态特征, 革兰氏染色观察菌体形态。将纯化后的菌落接种于2216E液体培养基中, 培养18 h后, 加入终浓度为15%的甘油后, 置于-80 °C冰箱中保藏。

细菌生理生化和药敏试验按常规方法进行, 包括葡萄糖、麦芽糖、赖氨酸脱羧酶、ONPG、

MR、VP、尿素、KCN、精氨酸双水解酶、氧化酶、0、3%、6%、8%和10% NaCl胨水等生化试验在28 °C条件下进行, 连续观察72 h, 并记录实验结果。采用标准K-B纸片扩散法对分离菌株进行30种抗菌药物的敏感性检测, 涂布法接种分离菌株于LB平板上, 28 °C培养24 h后测量抑菌圈直径, 重复3次计算平均值, 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标。

1.3 人工感染试验和组织切片制备

人工感染试验、半数致死量(LD₅₀)、组织切片制备等参照已有文献^[13]进行。将半滑舌鳎平均分成18组, 每6组感染一种菌株, 每15尾设置3个重复(5尾/重复)。采用平板计数法确定原菌悬液浓度, 并将菌液稀释为10⁹、10⁸、10⁷、10⁶和10⁵ CFU/mL等浓度梯度, 腹腔注射每尾剂量为200 μL, 对照组注射等量的生理盐水。斑马鱼(*Danio rerio*) [体质量(0.8±0.05) g]感染试验每组20尾, 腹腔注射菌悬液剂量为10 μL。每天观察并记录发病症状与死亡情况, 并对濒死鱼及时解剖和致病原菌的再分离鉴定。分别取病鱼鳃、肾脏、肝胰脏和肠道等组织, 将其立即用Bouin试液固定8 h, 脱水与浸蜡、包埋与切片、H.E染色和AB-PAS染色, 用显微镜BX51(Olympus)拍照。

1.4 细菌的16S rDNA、OMP基因克隆、序列分析和系统发育树构建

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌DNA, 对3株分离菌进行16S rDNA基因扩增, 将测序所得16S rDNA序列, 与GenBank数据库中的已知核酸序列进行BLAST分析, 采用MEGA 5.1软件的邻接法(Neighbor-Joining)进行多序列比对和系统发育树构建。根据GenBank查找并下载创伤弧菌外膜蛋白(OMP)基因序列, 运用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物序列(表1), 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 条带大小与预期基因片

表1 16S rDNA与OMP基因的引物序列设计

Tab. 1 Primers sequences for amplification of 16S rDNA and OMP genes

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primers	片段长度/bp size	退火温度/°C annealing temperature
16S rDNA	27F: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'	1 500	56
OMP	OMP-F1: CTCAGCGTAAACTTGGGAA OMP-R1: TCTCTCTTTGGAAGGGGTG	1 838	56
	OMP-F2: ACAGCCGAGACACAAAAG OMP-R2: GCGACTGCGAGAAAAAGAG	176	60

段大小相近, 产物经纯化试剂盒纯化, 克隆到pMD18-T载体中, 转化大肠杆菌感受态细胞DH5a, 送金唯智生物工程有限公司测序。

1.5 qRT-PCR扩增体系的建立

将分离菌DNA模板按10倍比稀释为不同浓度进行普通PCR和qRT-PCR, 其中普通PCR反应体系为25 μ L, PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测OMP基因片段大小。qRT-PCR采用20 μ L PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq I 10 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各0.5 μ L, 模板2 μ L, 其余用ddH₂O补足至20 μ L。PCR循环参数: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 经40个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸2 min。qRT-PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 53~63 $^{\circ}$ C退火30 s, 重复40个循环; 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s获得熔解曲线, 退火时设置荧光信号采集。qRT-PCR进行引物浓度和退火温度的优化, 以确定最佳反应条件, 然后以10倍梯度稀释为DNA模板, 绘制标准曲线。以哈维氏弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌的DNA模板为阴性对照, 验证引物的特异性。灵敏度检测采用最佳反应条件, 对已知数量(1.88×10^8)的创伤弧菌提取DNA进行10倍梯度稀释, 测定所建立方法的最低检测限, 计算检出的最低菌体量。分别以不同稀释倍数的DNA作为模板, 设置10个重复检测, 分析C_t值, 计算其变异系数。

2 结果

2.1 半滑舌鲷病原菌的分离及生理生化特征

2016年天津某养殖场半滑舌鲷出现发病死亡现象, 主要表现为体表鳞片脱落, 腹部膨大, 皮肤出血溃疡, 鳍部出血。经解剖观察腹水无色, 胆囊异常肿大、呈半透明状, 肠道内含大量水样液体, 有少量白色粪便(图1)。从典型症状病鲷肝脏、脾脏和肾脏组织分离到3株细菌, 分别命名为ST-1、ST-3和ST-6, 分离菌均为革兰氏阴性菌, 弧形或月牙形。菌株在2216E固体培养基上28 $^{\circ}$ C培养18 h后的菌落形态为圆形、光滑、中间隆起、边缘整齐、淡黄色; 在TCBS固体培养基上28 $^{\circ}$ C培养18 h的菌落形态为圆形、光滑、中间隆起、边缘整齐、绿色。分离菌株的生理生化结果表明ST-1、ST-3和ST-6均为葡萄糖发酵型, 还原硝酸盐, 在3%NaCl、6%NaCl蛋

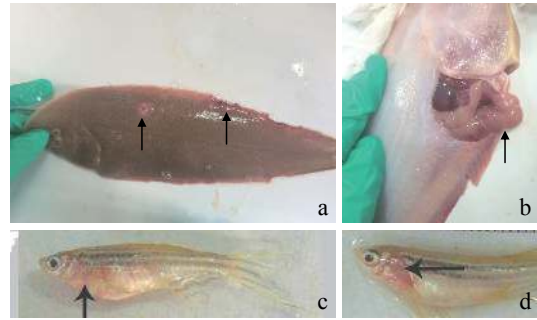


图1 患病半滑舌鲷和感染斑马鱼的主要临床症状

a. 体表溃烂, 鳍部出血; b. 腹水无色, 肠道内有水样液体; c. 腹部膨大, 腹水严重; d. 胸鳍部皮肤出血

Fig. 1 The typical clinical signs of diseased *Cynoglossus semilaevis* and infected *D. rerio*

a. ulceration on the surface of body and fin hemorrhage; b. colorlessness of ascites in the abdomen, water-like fluid in the intestine; c. abdominal enlargement and ascites; d. hemorrhage on pectoral fin

白胨水中生长, 在0 NaCl、8% NaCl、10% NaCl蛋白胨水不能生长, 氧化酶、赖氨酸脱羧酶和甲基红(MR)等结果为阳性, ONPG、VP、尿素、KCN、精氨酸双水解酶、鼠李糖、肌醇、蔗糖、阿拉伯糖等结果为阴性, 符合创伤弧菌特征(表2)。进一步采用30种抗生素进行药敏试验, 结果显示, ST-1、ST-3和ST-6分离株对头孢克肟、头孢哌酮、链霉素、亚胺培南和氟苯尼考高度敏感(表3)。

2.2 分离菌株的16S rDNA与OMP基因鉴定

进一步以分离菌株基因组DNA为模板, 采用PCR方法扩增16S rDNA序列, 结果显示, ST-1、ST-3和ST-6菌株的16S rDNA序列片段大小约为1 500 bp, 将其亚克隆至pMD18-T载体中, 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)中测序后片段大小分别为1 463、1 466和1 455 bp。在GenBank数据库比对后与创伤弧菌标准菌株ATCC 29307(登录号: X74727)的16S rDNA序列相似性分别为99.01%、99.09%和99.51%; 构建系统发育树分析结果显示, 分离菌ST-1、ST-3和ST-6与创伤弧菌标准菌株ATCC 29307亲缘关系最近, 自然聚为一支(图2), 最终判定ST-1、ST-3和ST-6菌株为创伤弧菌。同时, PCR扩增分离菌株ST-6的OMP得到一条特异性目的条带, 测序获得目的基因片段为1 221 bp, 推测其开放阅读框(ORF)编码319 aa, 与创伤弧菌(登录号: AIL69494)的OMP蛋白亲缘性最近, 同源性高达99.06%。进一步采用OMP基因的特异性荧光PCR引物扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测获得预期目的片段, 与预期大小一致, 而且无非特

表2 ST-1、ST-3和ST-6菌株的生理生化鉴定结果

Tab. 2 Biochemical characteristics of ST-1, ST-3 and ST-6 strains

项目 items	ST-1/ST-3/ST-6 strains	项目 items	ST-1/ST-3/ST-6 strains
葡萄糖 glucose	+	DNA酶 dnase	-
麦芽糖 maltose	+	赤藓糖 erythritol	-
七叶苷 esculin	+	硝酸盐 nitrate reduction	+
甘露醇 mannitol	-	蔗糖 sucrose	-
甘露糖 mannose	+	阿拉伯糖 arabinose	-
山梨醇 sorbitol	-	β -半乳糖苷酶试验 ONPG	-
鼠李糖 rhamnose	-	甲基红试验 MR test	+
棉子糖 raffinose	-	VP试验 VP test	-
肌醇 inositol	-	卫矛醇 dulcitol	-
乳糖 lactose	-	氧化酶 oxidase	+
半乳糖 galactose	+	丙二酸盐 malonate	-
蜜二糖 melibiose	-	尿素 urea	-
木糖 xylose	-	KCN生长 growth in KCN	-
酒石酸盐 tartaric acid salt	-	不含NaCl 蛋白胨水 at none of NaCl peptone water	-
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	-	3%NaCl 蛋白胨水 at 3% of NaCl peptone water	+
枸橼酸 simmons citrate	-	6%NaCl 蛋白胨水 at 6% of NaCl peptone water	+
硫化氢 hydrogen sulfide	-	8%NaCl 蛋白胨水 at 8% of NaCl peptone water	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	10%NaCl 蛋白胨水 at 10% of NaCl peptone water	-

注: +. 阳性; -. 阴性

Notes: +. positive; -. negative

异性杂带, 可用于荧光定量PCR检测。

2.3 人工感染试验与病理变化

人工感染半滑舌鲷和斑马鱼的主要症状与自然发病鱼症状基本一致(图1), 分离菌株ST-6的毒力高于ST-1和ST-3, 其中ST-6对半滑舌鲷和斑马鱼的半数致死量(LD₅₀)分别为 5.10×10^3 、 3.37×10^4 CFU/g。从人工感染死亡鱼体内再分离的致病菌, 经过16S *rDNA*和生理生化鉴定仍为创伤弧菌。人工感染15 d后, 对照组鱼无死亡现象。

患病半滑舌鲷病理组织学观察结果显示, 鳃丝上皮细胞增生和融合, 充满颗粒细胞, 鳃小片肿胀黏连、颗粒细胞和黏液细胞增多; 肝脏小叶充血、出血, 中央静脉淤血严重, 个别血窦可见局灶性溃烂; 肾脏弥漫性出血、局灶性坏死, 肾小管上皮细胞坏死; 肠道黏膜固有层萎缩, 肠绒毛中淋巴细胞、黏液细胞增多等病变(图3)。

2.4 qRT-PCR检测OMP基因及条件优化

采用SYBR Green I qRT-PCR进行OMP基因特异性引物优化, 结果显示, qRT-PCR反应体系最优条件为10 μ mol/L上下游引物体积0.8 μ L, 退火温度58.3 $^{\circ}$ C。OMP基因扩增后的熔解曲线仅有一条特异单峰, 扩增所得标准曲线为 $y = -3.520x + 37.89$, 相关系数为0.995, 线性梯度的检测标准曲线呈等距性和平行性。用qRT-PCR检测哈维氏弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌, 结果显示仅3株创伤弧菌出现特异性扩增, 而其他菌与阴性对照均无扩增曲线。以10倍梯度稀释的标准品为模板, 结果显示, OMP的qRT-PCR检测下限的稀释浓度梯度为 10^{-6} , 即对应的菌液浓度为 1.88×10^2 CFU/mL。qRT-PCR结果显示, OMP的各组重复实验变异系数在0.040%~0.260%, 表明建立的方法具有很好的重复性(表4)。

表 3 ST-1、ST-3和ST-6菌株的药敏结果

Tab. 3 Antimicrobial susceptibility results of ST-1, ST-3 and ST-6 strains

药物名称 antibiotics	规格/ μg dosage	ST-1抑菌圈直径/mm/敏感性 inhibition diameter/sensitivity	ST-3抑菌圈直径/mm/敏感性 inhibition diameter/sensitivity	ST-6抑菌圈直径/mm/敏感性 inhibition diameter/sensitivity
头孢克肟 cefixime	5	26/S	30/S	27/S
头孢氨苄 cephalixin	30	17/S	15/R	11/R
头孢噻肟 cefotaxime	30	23/S	22/S	20/S
头孢哌酮 cefoperazone	75	30/S	28/S	29/S
氨苄西林 ampicillin	20	22/S	25/S	24/S
阿莫西林 amoxicillin	10	25/S	26/S	26/S
亚胺培南 imipenem	10	30/S	28/S	26/S
美罗培南 meropenem	10	25/S	24/S	27/S
左氟沙星 levofloxacin	5	25/S	22/S	26/S
恩诺沙星 enrofloxacin	5	24/S	23/S	23/S
诺氟沙星 norfloxacin	10	14/R	15/R	16/S
萘啶酸 nalidixic acid	30	12/R	11/R	14/R
红霉素 erythromycin	15	25/S	23/S	22/S
阿奇霉素 azithromycin	15	25/S	21/S	26/S
庆大霉素 gentamicin	10	20/S	23/S	22/S
阿米卡星 amikacin	30	23/S	20/S	25/S
新霉素 neomycin	30	16/S	17/S	14/R
卡那霉素 kanamycin	30	16/S	19/S	15/R
链霉素 streptomycin	10	27/S	25/S	30/S
氯霉素 chloramphenicol	30	30/S	28/S	25/S
万古霉素 vancomycin	30	15/R	14/R	11/R
利福平 rifampicin	5	23/S	20/S	22/S
氟苯尼考 florfenicol	30	28/S	30/S	25/S
复方新诺明 cotrimoxazole	25	25/S	23/S	28/S
磺胺异恶唑 sulfamethazole	300	0/R	8/R	2/R
甲氧嘧啶 trimethoprim	5	0/R	0/R	0/R
四环素 tetracycline	30	26/S	24/S	23/S
呋喃唑酮 furazolidone	300	17/S	13/R	16/S
呋喃妥因 nitrofurantoin	300	25/S	22/S	24/S
克林霉素 clindamycin	20	10/R	11/R	9/R

注: S.敏感; R.耐药

Notes: S.susceptible; R.resistant

3 讨论

近年来, 半滑舌鳎细菌性疾病危害较大, 是导致其大量死亡及经济损失的主要原因^[1-2]。创伤弧菌是一种嗜盐革兰氏阴性弧菌, 其致病性

已对水产养殖业造成严重威胁^[14-15]。迄今, 创伤弧菌主要分离自人(*Homo*)、鱼、虾和贝类体内^[4,15-16]。本实验首次从患病的半滑舌鳎体脏器进行分离纯化优势病菌, 经生理生化、16S *rDNA*、外膜蛋白(OMP)基因鉴定ST-1、ST-3和ST-6菌株均为

创伤弧菌，并且分离菌株的主要生理生化特征，与《伯杰细菌鉴定手册》等文献报道一致^[9, 17-18]。此外，进行组织病理学观察、SYBR Green I荧光定量PCR检测、药敏试验等相关研究，这不仅为深入阐明半滑舌鳎创伤弧菌病的致病机理奠定基础，而且为该病诊断方法和防治措施等提供科学依据。

研究表明，致病性创伤弧菌主要感染欧洲鳗鲡^[6]、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[19]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[20]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[21]、绯海鲷(*Pagellus erythinus*)^[22]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[23]等海水类养殖动物，临床症状主

要表现为体表出血和皮肤溃疡，肠道出血，脾脏和肾脏结节性病变等。在淡水鱼类中，罗非鱼(*Oreochromis sp.*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)等均发现创伤弧菌感染并伴有局部性溃疡和出血症状^[15, 24-25]。最近，从我国海水养殖的裸项栉虾虎鱼体内分离到一株创伤弧菌，临床主要表现为鳃、尾部充血和肾脏肿大、糜烂等^[12]。刘秀珍等^[26]报道创伤弧菌强毒株感染石斑鱼大量发病死亡率高达80%，毕可然等^[10]从矛尾复虾虎鱼分离得到的创伤弧菌LD₅₀为1.63×10⁶ CFU/g。本研究半滑舌鳎感染创伤弧菌的临床症状、组

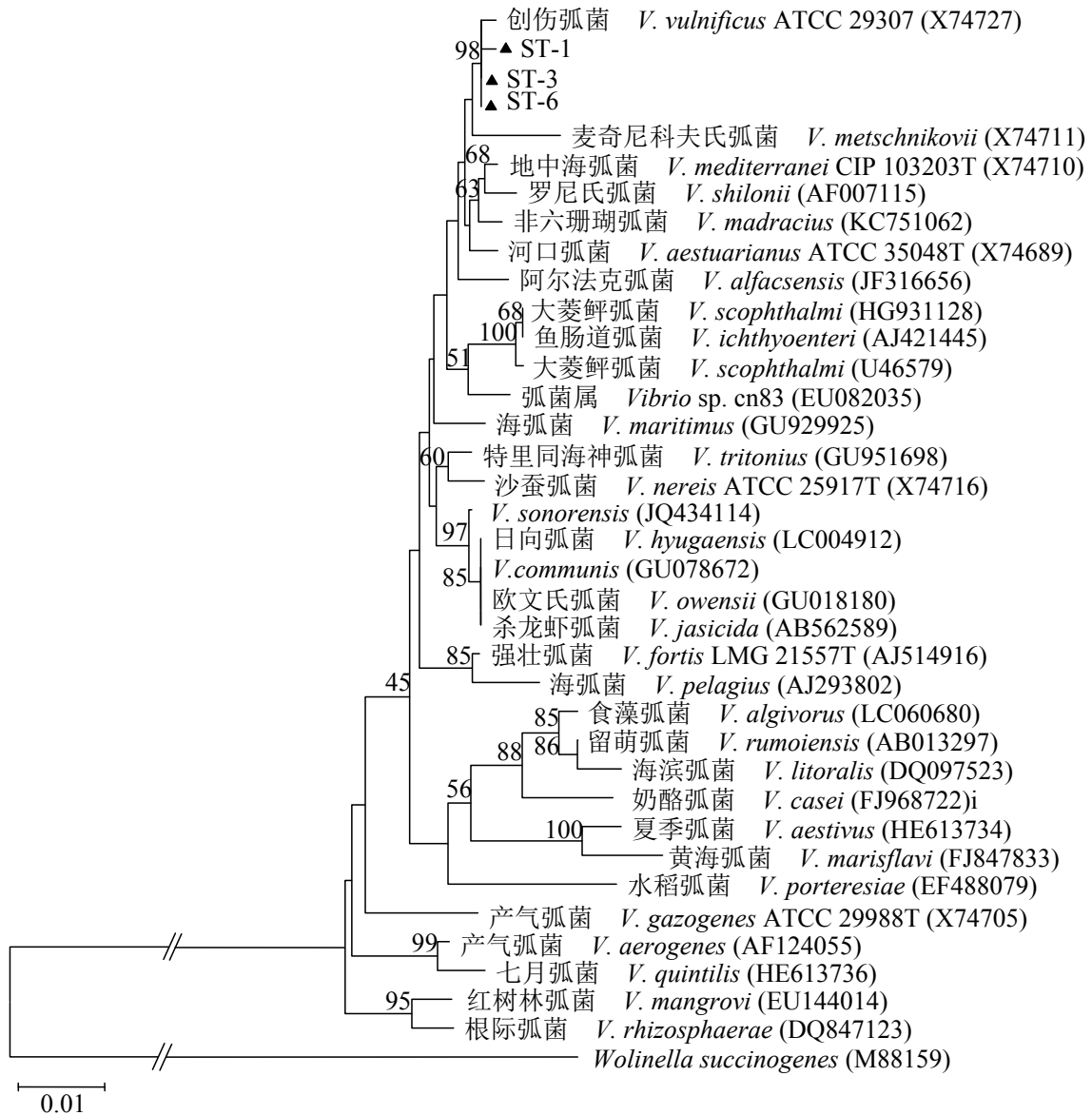


图2 分离菌16S rDNA序列构建系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of ST-1, ST-3 and ST-6 strains based on 16S rDNA sequences

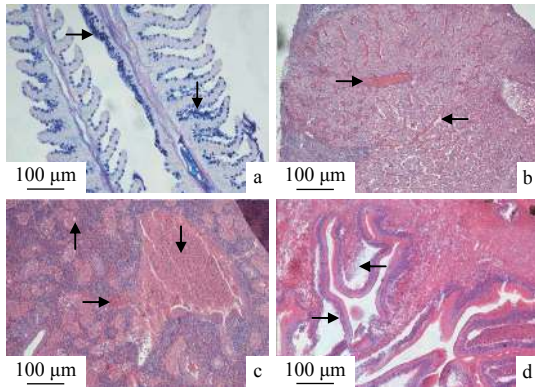


图 3 半滑舌鲷感染ST-6菌株后的病理变化

a. 黏液细胞增多(箭头向右), 鳃小片肿胀黏连(箭头向下), AB-PAS法); b. 肝脏中央静脉淤血严重(箭头向右), 肝血窦变大(箭头向左); c. 肾脏出血、坏死(箭头向下), 肾小管上皮细胞坏死(箭头向上), 红细胞和淋巴样细胞增多(箭头向右); d. 肠道黏膜固有层萎缩(箭头向右), 黏膜层脱落(箭头向左)

Fig. 3 Histological changes of *C. semilaevis* infected with the isolated strain ST-6

a. the increase of the number of the mucus cells (arrows right), the swelling of the secondary lamella (arrows to the down, AB-PAS method); b. the severe congestion of the central venous (arrows to the right), the larger hepatic sinusoid (arrows to the left); c. bleeding and necrosis of kidney (arrows down), necrosis of the tubular epithelial cells (arrows up), the increase of the number of the blood cells and the lymphoid cells-like (arrows to the right); d. the atrophy of the lamina propria in the intestine (arrows to the right) and the mucous membranes fall off (arrows to the left)

表 4 OMP基因的重复性实验

Tab. 4 Repeatability test of OMP gene by qRT-PCR

样品含量/(CFU/mL) sample content	C _t 值/(n=10) cycle threshold	变异系数/% coefficient of variation
1×10 ⁷	16.14±2.49	0.154
1×10 ⁶	20.60±4.12	0.200
1×10 ⁵	24.77±6.44	0.260
1×10 ⁴	29.97±7.22	0.241
1×10 ³	33.45±1.34	0.040

织病理学结果, 与已有报道的鳗鲡、鲟和罗非鱼等鱼类感染创伤弧菌的症状和病变等基本一致^[6, 24-25], 其中ST-6菌株对半滑舌鲷的LD₅₀为5.10×10³ CFU/g, 由此可见, 创伤弧菌对海水鱼类有较强致病性。此外, 最近报道从发病草鱼分离到致病性创伤弧菌, LD₅₀为7.53×10³ CFU/g^[13]。目前, 关于半滑舌鲷感染创伤弧菌仍未见文献报道, 其发病机理值得进一步研究。

近几年, 荧光定量PCR技术通过SYBR荧光

染料或TaqMan特异性探针, 具有操作简便、检测周期短、灵敏性高及重复性好等优点, 被广泛用于多种水产细菌和病毒的快速鉴定应用^[27-28]。水产品检疫中, 根据创伤弧菌*VvhA*基因序列设计TaqMan探针进行荧光定量PCR检测, 灵敏度达1.4 CFU/mL^[27]。霍乱弧菌外膜蛋白*OMP*基因用于PCR检测具有特异性, 可作为候选基因标志之一^[28-29]。凌娇等^[29]根据霍乱弧菌*ompW*基因和副溶血弧菌*toxR*基因, 建立TaqMan探针双重荧光定量PCR方法, 结果显示, 霍乱弧菌的最低检测限达到10 CFU/mL。但是, 尚未有SYBR Green qPCR检测创伤弧菌外膜蛋白*OMP*基因报道。因此, 本实验采用荧光染料SYBR Green I, 基于创伤弧菌的毒力外膜蛋白*OMP*基因序列设计引物, 优化反应体系和条件, 对特异性、敏感性及重复性进行验证, 建立了荧光定量PCR检测方法, 检测下限为1.88×10² CFU/mL。此外, 本实验获得创伤弧菌*OMP*基因片段大小为1 228 bp, 经生物信息学预测发现TamA结构域(COG 0729), 已报道TamA结构域为细菌表面抗原, 值得进一步研究其免疫原性与功能。

从患病半滑舌鲷体内分离到3株致病性创伤弧菌, 通过病理组织学观察表明鳃上皮细胞增生、黏液细胞增多, 肝脏中央静脉淤血, 肾脏出血、坏死, 肠道黏膜固有层萎缩、黏液细胞增多, 脾脏淤血等病变。进一步建立*OMP*基因进行荧光定量PCR方法检测创伤弧菌下限为1.88×10² CFU/mL。本研究结果不仅为半滑舌鲷弧菌病的致病机理和防治奠定基础, 而且为该病的分子诊断提供科学参考。

参考文献:

- [1] Han Z R, Sun J F, Lv A J, *et al.* Isolation, identification and characterization of *shewanella algae* from reared tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 356-362.
- [2] 徐晓丽, 叶红梅, 侯纯强, 等. 半滑舌鲷弧菌病原的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(8): 86-90.
Xu X L, Ye H M, Hou C Q, *et al.* Isolation and identification of pathogen responsible for the vibriosis in cultured *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(8): 86-90(in Chinese).
- [3] Lee K H, Heo S T, Kim Y R, *et al.* Isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and emerging *Vibrio vulnificus*

- septicemia on Jeju Island[J]. *Infect Chemother*, 2014, 46(2): 106-109.
- [4] Baker-Austin C, Oliver J D, Alam M, *et al.* *Vibrio* spp. infections[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 8.
- [5] Chuang Y C, Yuan C Y, Liu C Y, *et al.* *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1992, 15(2): 271-276.
- [6] Fouz B, Amaro C. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1-4): 667-682.
- [7] 沈志强, 刘吉山, 李峰, 等. 石鲮鱼创伤弧菌病的病原分离鉴定与防治[J]. *中国兽医科学*, 2001, 31(10): 22-23.
- Shen Z Q, Liu J S, Li F, *et al.* Isolation and identification of pathogen in stone flounder with *Vibrio vulnificus* infection as well as treatment and prevention for the disease[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2001, 31(10): 22-23(in Chinese).
- [8] 简纪常, 吴灶和, 陈刚, 等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病病原的分离及其特性[J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(4): 329-330.
- Jian J C, Wu Z H, Chen G, *et al.* Isolation and characteristics of pathogen of Vibriosis in Cobia (*Rachycentron canadum*) maricultured in cage[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, 23(4): 329-330(in Chinese).
- [9] 马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(10): 960-964.
- Ma A M, Yan M C, Chang W S, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from diseased *Nibea albiflora*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, 24(10): 960-964(in Chinese).
- [10] 毕可然, 张晓君, 梁利国, 等. 矛尾复虾虎鱼溃疡病病原创伤弧菌的鉴定[J]. *海洋科学*, 2011, 35(7): 20-25.
- Bi K R, Zhang X J, Liang L G, *et al.* Identification of *Vibrio vulnificus* from *Synechogobius hasta* with canker disease[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(7): 20-25(in Chinese).
- [11] 辜良斌, 徐力文, 王雨, 等. 从珍珠龙躄体内分离的1株创伤弧菌的鉴定及耐药性分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(2): 162-167.
- Gu L B, Xu L W, Wang Y, *et al.* Identification and drug sensitivity of a pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from pearl gentian, a hybrid of brownmarbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(2): 162-167(in Chinese).
- [12] 罗琴芳, 黄文科, 袁文, 等. 裸项栉鰕虎鱼感染创伤弧菌初报[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(2): 225-228.
- Luo Q F, Huang W K, Yuan W, *et al.* A report of *Vibrio* sp. *GDLAMI-1210*, isolated from *Ctenogobius gymnauchen* cultured in seawater[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2017, 25(2): 225-228(in Chinese).
- [13] Liu R R, Lian Z Y, Hu X C, *et al.* First report of *Vibrio vulnificus* infection in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* in China[J]. *Aquaculture*, 2018, 499: 283-289.
- [14] Horseman M A, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010, 15(3): e157-e166.
- [15] Amaro C, Sanjuán E, Fouz B, *et al.* The fish pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2: epidemiology, phylogeny, and virulence factors involved in warm-water vibriosis[J]. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(3), DOI: 10.1128/microbiolspec.
- [16] Ripabelli G, Sammarco M L, McLaughlin J, *et al.* Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from Mussels (*Mytilus galloprovincialis*)[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(1): 119-126.
- [17] Bowman J P, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2, Part B[M]//Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Michigan State University, MI, USA: Springer, 2005: 494-546.
- [18] 郑芳艳, 石存斌, 潘厚军, 等. 鳊鲃溃烂病病原的分离与鉴定[J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14(3): 242-247.
- Zheng F Y, Shi C B, Pan H J, *et al.* Isolation and identification of pathogen from diseased *Anguilla anguilla*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, 14(3): 242-247(in Chinese).
- [19] Li G F, Zhao D H, Huang L, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 17-25.
- [20] Uzun E, Ogut H. The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the

- Southeastern Black Sea[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 30-37.
- [21] Lunder T, Sørum H, Holstad G, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(2): 427-450.
- [22] Eissa A E, Altakaly M B, Abolghait S K, *et al.* Detection of the most common *Vibrios* affecting common pandora (*Pagellus erythinus*) from the coasts of Tripoli, Libya[J]. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2017, 12(6): 253-263.
- [23] Tao T, Liang L G, Chen K, *et al.* Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186135.
- [24] Chen C Y, Chao C B, Bowser P R. Infection of tilapia *Oreochromis* sp. by *Vibrio vulnificus* in freshwater and low-salinity environments[J]. *Journal of the world Aquaculture society*, 2006, 37(1): 82-88.
- [25] 司力娜, 李绍戊, 王荻, 等. 养殖鲟鱼暴发病病原菌分离及药敏实验[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(4): 18-22.
- Si L N, Li S W, Wang D, *et al.* The isolation and drug sensitive tests of pathogens found in sturgeon epizootic disease[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(4): 18-22(in Chinese).
- [26] 刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕, 等. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究[J]. *热带海洋*, 1994, 13(1): 81-86.
- Liu X Z, Zou X L, Mo X Y, *et al.* A study on the pathogen of vibriosis isolated from diseased *Epinephelus* sp. In cage mariculture[J]. *Tropic Oceanology*, 1994, 13(1): 81-86(in Chinese).
- [27] 潘军航, 金大智, 梅玲玲, 等. 实时荧光定量PCR快速检测创伤弧菌的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(6): 1314-1318.
- Pan J H, Jin D Z, Mei L L, *et al.* Application of a real-time PCR method for rapid detection of *Vibrio vulnificus* in oyster[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2010, 20(6): 1314-1318(in Chinese).
- [28] Nandi B, Nandy R K, Mukhopadhyay S, *et al.* Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(11): 4145-4151.
- [29] 凌娇, 王权, 万莹, 等. 副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量PCR快速检测方法的建立与应用[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(4): 93-99.
- Ling J, Wang Q, Wan Y, *et al.* Establishment and application of the duplex real-time PCR of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(4): 93-99(in Chinese).

Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from *Cynoglossus semilaevis* and establishment of fluorescence quantitative PCR technique

HU Xiucui¹, WANG Yingjie¹, LÜ Aijun^{1*}, SUN Jingfeng¹, WANG Qingkui¹,
LIAN Zhengyi¹, LIU Xiaoxue¹, SONG Yajiao²

(1. Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to investigate the pathogen of the diseased tongue sole *Cynoglossus semilaevis*, three strains of Gram-negative bacteria isolated from diseased *C. semilaevis* were tentatively named strains ST-1, ST-3 and ST-6, which were identified by physiological and biochemical characteristics, antimicrobial susceptibility test, 16S *rDNA* gene sequences analysis and histopathology examination. Furthermore, the SYBR Green quantitative real-time PCR (qRT-PCR) targeting the outer membrane protein (OMP) gene was established. The biochemical results of the isolate ST-1, ST-3 and ST-6 were consistent with the properties of *V. vulnificus*. The BLAST alignments of the 16S *rDNA* gene sequence showed that the isolates ST-1, ST-3 and ST-6 shared the identities above 99% with type strain *Vibrio vulnificus* ATCC 29307 (X74727). The phylogenetic tree indicated the isolates clustered with *V. vulnificus* ATCC 29307. The isolates were eventually identified as *V. vulnificus*. Antimicrobial susceptibility testing showed that the isolates were highly susceptible to cefixime, cefoperazone, streptomycin, imipenem and florfenicol. The challenge experiments showed that the isolated strains were pathogenic on *C. semilaevis* and zebrafish (*Danio rerio*), and similar symptoms were observed with the natural infection. Histopathology examination revealed the hyperplasia of the epithelial cells in the primary lamella, the swelling of the secondary lamella and the increase of the number of granulosa cells and mucus cells, hepatic sinusoid and the congestion of central vein in the liver, hemorrhagic-necrotic lesion in the kidney, the atrophy of the lamina propria and the increase of the number of mucus cells in the intestine. The SYBR Green I quantitative PCR (qPCR) method based on the OMP gene was further established and the results showed that the correlation coefficient of standard curve was 0.995 and the lowest limit of detection was 1.88×10^2 CFU/mL. The results of this study will lay a foundation for the pathogenesis and prevention of *C. semilaevis* vibriosis, which can provide scientific reference for the molecular diagnosis of the disease.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio vulnificus*; histopathology; fluorescence quantitative PCR

Corresponding author: LÜ Aijun. E-mail: lajand@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272692); Natural Science Foundation of Tianjin City (18JCYBJC29900, 16JCZDJC33500); Innovation Team of Tianjin Fisheries Research System (ITFRS2017009, ITFRS2019049); Open Fund of Tianjin Key Lab of Aquatic Ecology and Aquaculture (TJAE201803); Tianjin Agricultural University Key Laboratory of Aqua-ecology Platform Project (J01009030638)