

草鱼源致病性维氏气单胞菌的鉴定及其黏附特性分析

李槿年, 马彤彤, 房 慧, 韩雨希, 刘心媛

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: 采用表型鉴定与细菌 16S rRNA 基因序列分析对从患病草鱼体内分离的病原菌株 16-1 进行分类鉴定, 综合该菌株的表型特征与 16S rRNA 基因序列, 确定其为维氏气单胞菌。随后, 对该菌株的细胞黏附特性及其携带的黏附素基因进行检测与分析。结果显示, 分离菌株能以聚集性方式黏附于鲤鱼上皮瘤细胞 (EPC) 周围, 平均黏附菌数随共孵育时间延长而增加, 90 min 达到峰值, 说明该分离株具有良好的细胞黏附性。黏附因子检测表明, 该菌株同时携带 *ompAI*、*ompAII* 和 *ahl13* 种黏附素基因, 这些黏附素基因在分离菌株与不同来源参考株之间的核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别介于 95.8%~99.5% 和 95.0%~100% (*ompAI*), 96.3%~99.1% 和 97.9%~100.0% (*ompAII*), 78.6%~99.6% 和 75.5%~99.4% (*aha1*), 说明所携带的 *ompAI* 和 *ompAII* 黏附素基因在不同来源的维氏气单胞菌之间具有较高的保守性。

关键词: 维氏气单胞菌; 鉴定; 黏附性; 黏附素基因

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)04-0603-07

Identification of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from grass carps (*Ctenopharyngodon idella*) and analysis of its adhesion characteristics

LI Jinnian, MA Tongtong, FANG Hui, HAN Yuxi, LIU Xinyuan

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The taxonomy of pathogenic strain 16-1 recovered from the diseased grass carps was identified by phenotype examination combined with 16S rRNA sequence analysis. The strain 16-1 was identified as *A. veronii* based on morphological and structure features, culture characteristics, physiological and biochemical characteristics, as well as 16S rRNA gene sequence. Subsequently, the adhesin-carrying genes and the adhesion characteristics to EPC cells of the strain were also detected. The results showed that the strain 16-1 carried three kinds of adhesin genes including *OmpAI*, *OmpAII* and *aha1*. The nucleotide and amino acid homology of the adhesin genes among strain 16-1 and different sources reference strains respectively ranged from 95.8% to 99.5% and 95.0% to 100% (*OmpAI*), 96.3% to 99.1% and 97.9% to 100.0% (*OmpAII*), 78.6% to 99.6% and 75.5% to 99.4% (*aha1*). The strain 16-1 could adhere to the EPC cells mainly in aggregative pattern, and the average adhesive bacterial number around each cell increased steadily with the extension of co-incubation time, peak value reached 51.77 ± 1.17 at 90 min post co-incubation, while cells almost completely ruptured and fell off due to the pathogenicity of bacteria at 120 min post co-incubation. These results indicated that the pathogenic *A. veronii* strain 16-1 isolated from the diseased grass carps exhibited a good adhesion capability to EPC cells. The adhesion genes *OmpAI* and *OmpAII* were highly conservative among different sources of *A. veronii*.

Key words: *Aeromonas veronii*; identification; adhesion; adhesin gene

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国主要养殖的淡水鱼种之一, 具有营养需求低、饲料源广泛、生长迅速和肉质鲜美等特点。然而, 随着池塘或水

库网箱养殖草鱼的规模逐年增大、养殖密度过大, 常常导致养殖环境恶化, 各种病害频发, 尤其是细菌性疾病最为严重, 制约了草鱼养殖业的健康发展。

收稿日期: 2018-11-05

基金项目: 国家级大创项目“草鱼源致病性维氏气单胞菌的鉴定及其黏附特性研究”资助。

共同第一作者: 李槿年, 教授, 博士生导师。E-mail: lijinnian2000@163.com; 马彤彤, 本科生。

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 广泛分布于水生环境, 属于气单胞菌科 (*Aeromonadaceae*) 气单胞菌属 (*Aeromonas*) [1]。该菌也是一种人-兽-水生动物共患病原菌, 不仅可感染包括人在内的哺乳动物, 引起严重的胃肠炎、败血症和脑膜炎等[2-3], 而且能感染多种水生生物, 引起以皮肤溃疡或溃烂, 脏器出血和严重腹水等主要症状的疾病, 给水产养殖业造成较大的经济损失[4-5]。

2017年10月, 安徽省怀远县某池塘养殖的草鱼突然大量发病死亡, 病鱼出现游动缓慢、体表脱鳞、鳃出血、肛门红肿和腹部肿胀等病症, 剖检可见腹腔积液、肠道出血、肝脏颜色变淡等病变。对濒死期草鱼进行病原学检查, 未分离到病毒, 但从多个病变脏器中分离得到一株优势菌(命名为菌株16-1), 经人工感染试验证实其为病原菌(对草鱼的LD₅₀为2.4×10⁷ CFU·mL⁻¹)。在此基础上, 本研究通过对菌株16-1进行表型特征与16S rRNA基因序列分析, 确定其分类地位, 并对该菌株携带黏附素基因及其细胞黏附特性进行检测, 以期为进一步研究维氏气单胞菌致病机制及其亚单位疫苗研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与细胞 菌株16-1由本实验室从濒死期草鱼脏器中分离并保存, 经人工感染试验证实为病原菌, 其对草鱼的LD₅₀为2.4×10⁷ CFU·mL⁻¹。维氏气单胞菌标准株 ATCC35624 购自普通微生物菌种保存中心。鲤鱼上皮瘤细胞 (EPC) 购自上海海洋大学农业部渔业动植物病原库。

1.1.2 主要试剂 分子生物学试剂(盒)购自上海生物技术科技有限公司。M199培养液及胎牛血清为Gibco公司产品。实验用培养基和细菌微量生化反应管均为杭州微生物试剂有限公司产品。

1.2 分离菌株的表型特征鉴定

1.2.1 形态与结构检查 将分离菌株16-1接种营养肉汤培养基, 30℃培养24h, 取菌液进行制片和革兰氏染色, 观察菌体的形态、排列方式及染色特性。同时, 按曹际等[6]报道的方法制备电镜观察样品, 于电镜下观察细菌的形态、大小与结构。

1.2.2 培养性状观察 将分离菌株16-1分别四区划线接种3种不同的培养基(营养琼脂平板、BHI平板和血琼脂平板), 30℃培养24h, 观察细菌在不同培养基上的培养性状。

1.2.3 生理生化特性测定 挑取分离菌株16-1的

单菌落接种于22种细菌微量生化反应管中, 30℃培养24h后, 观察细菌的生理生化特性, 并参照《常见细菌系统鉴定手册》[7]对待检细菌进行初步判定。

1.3 分离菌株的分子鉴定

1.3.1 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序 用基因组DNA提取试剂盒提取分离菌株16-1的基因组DNA作为模板, 以文献[8]报道的细菌16S rRNA基因通用引物(表1)PCR扩增16S rRNA。25 μL PCR反应体系为: 10×PCR buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol) 1.5 μL, dNTP (10 mmol) 0.5 μL, Taq 酶 (5 U·μL⁻¹) 0.3 μL, 上、下游引物 (10 μmol) 各 0.5 μL, 模板 2.0 μL, ddH₂O 17.2 μL。反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 52℃退火 50 s, 72℃延伸 100 s, 30个循环; 72℃再延伸 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物后, 委托通用生物系统(安徽)有限公司对目的基因进行克隆与序列测定。

表1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5'→3') Prime sequence (5'→3')	大小/bp Size	参考文献 Reference
16S rRNA	F:agagtttgatctggctcag R:tacggctacctgtttacgact	1 508	[8]
<i>aha1</i>	F:atgaaaagacaattctggct R:ttagaagtgtattgcagggc	1 038	[10]
<i>ompAI</i>	F:cgacactaaagttccccgc R:aacttctacgcgacgatccg	610	自行设计
<i>ompAII</i>	F:ggtgtttgctgaagggtggtg R:caaccaggaagtcggctacg	512	自行设计

1.3.2 系统发育树的构建 通过测得的16S rRNA基因序列在GenBank中进行Blast分析, 调出与该序列相关性较高的核苷酸序列, 再利用MEGA 6.0软件中Neighbour-Joining法构建细菌16S rRNA基因序列发育进化树, 并通过1 000次Bootstrap检验置信度。

1.4 分离菌株的细胞黏附特性检测

将浓度为1×10⁶个·mL⁻¹的EPC细胞接种于5个预先置有细胞爬片的细胞培养皿中, 使用含10%胎牛血清的M199培养液于28℃, 5%CO₂条件下培养EPC细胞。待80%细胞长至单层后, 用无菌PBS洗3次, 向4个培养皿中各加入1 mL浓度为5×10⁷ CFU·mL⁻¹的16-1菌液, 28℃分别孵育30 min、60 min、90 min和120 min, 每一时间点设置3个重复; 第5个细胞培养皿中加入等体积的PBS, 28℃孵育120 min作为细胞对照。孵育结束取出细胞爬片, 依次进行PBS漂洗、干燥、固定和染色, 油镜

下随机选择 30 个细胞, 逐个计数黏附菌数。根据文献[9]报道, 若每一细胞周围的平均黏附菌数大于 10, 则判定为黏附阳性菌。

1.5 分离菌株携带的黏附素基因检测

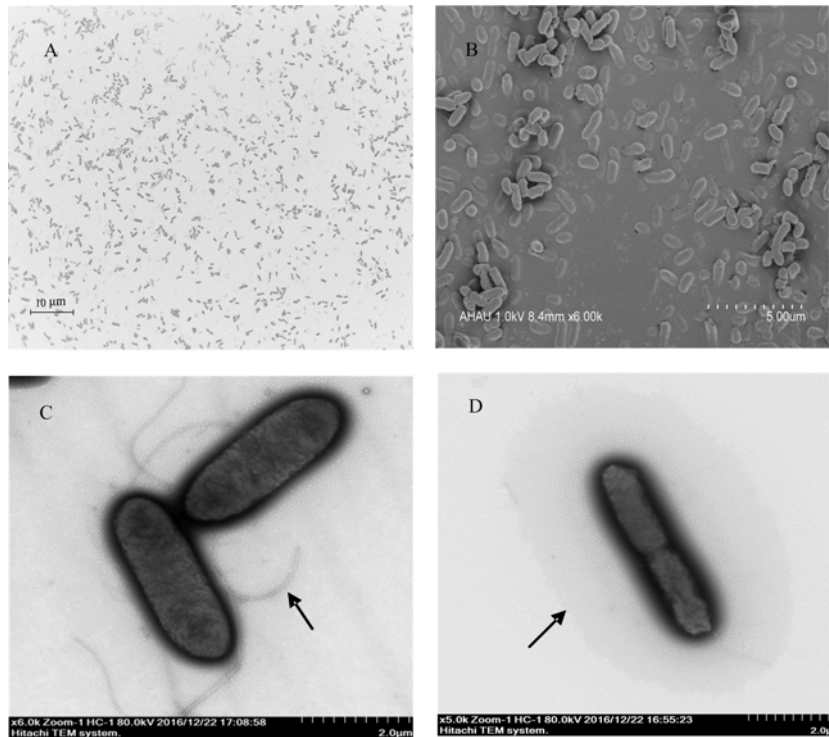
根据 GenBank 中收录的维氏气单胞菌 *ompAI* 基因序列 (accession No. CP002607.1) 和 *ompAII* 基因序列 (accession No. CP024930.1) 设计并合成二对特异性引物, 同时合成文献报道^[10]的维氏气单胞菌 *aha1* 基因引物 (表 1), 以细菌基因组 DNA 作为模板, PCR 检测菌株 16-1 是否携带上述 3 种黏附素基因。PCR 反应体系同前述 16S rRNA 扩增, PCR 循环条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C (*ompAI/aha1*) 或 62 °C (*ompAII*) 退火 1 min、

72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min, PCR 产物经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托通用生物系统 (安徽) 有限公司对目的基因进行克隆与序列测定。所测序列使用 BLAST 软件进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态与结构特征

菌株 16-1 在油镜下呈 G⁻长短不一的杆菌、多散在排列 (图 1A); 扫描电镜下观察可见菌体呈杆状、两端钝圆, 大小约为 (0.8~1.5) μm × (2.3~5.3) μm (图 1B); 透射电镜下观察可见该菌株产生了鞭毛和荚膜 (图 1C, D)。



A: 光镜照片(1 000×); B: 扫描电镜照片(6 000×); C: 透射电镜照片(6 000×), 箭头示鞭毛; D: 透射电镜照片(5 000×), 箭头示荚膜。

A: Light micrograph (1 000×); B: Scanning electron micrograph(6 000×); C: Transmission electron micrograph (6 000×), arrow shows flagellum; D: transmission electron micrograph (5 000×), arrow shows capsule.

图 1 菌株 16-1 的形态与结构

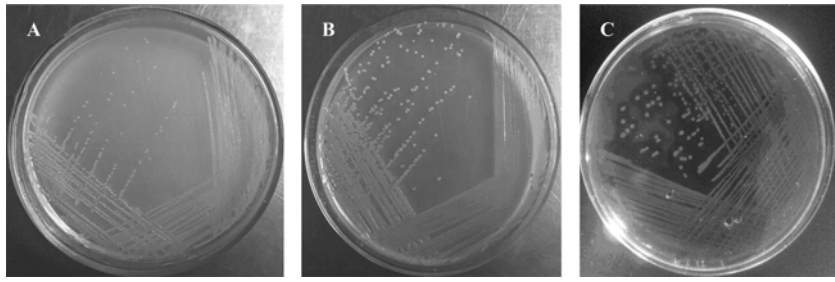
Figure 1 Morphology and structure of the strain 16-1

2.2 分离菌株的培养性状与生化特性

菌株 16-1 在营养琼脂平板上生长一般, 形成直径约为 1.5 mm 的无色圆形菌落, 菌落表面光滑湿润、中央略凸起、边缘整齐 (图 2A); 在 BHI 琼脂平板上生长良好, 菌落直径增至 1.8~2.0 mm, 菌落中央凸起 (图 2B); 在血琼脂平板上生长很好, 菌落直径可达到 2.5 mm, 菌落四周有溶血环。

菌株 16-1 的生化特性如表 2 所示。该菌株可发

酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇和蔗糖, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、吲哚试验、V-P 试验以及硝酸盐还原试验均呈阳性, 但乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、蜜二糖、山梨醇、卫茅醇、水杨苷、尿素、硫化氢、丙二酸盐、苯丙氨酸脱氨酶和柠檬酸盐利用试验等 12 项试验结果为阴性, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7], 初步认为菌株 16-1 为维氏气单胞菌。



A: 营养琼脂培养基; B: BHI 培养基; C: 血琼脂培养基 A: Nutrient agar medium ; B: BHI agar medium; C: Blood agar medium

图 2 菌株 16-1 在不同培养基上的培养性状

Figure 2 The culture characteristics of the strain 16-1 on different mediums

表 2 菌株 16-1 的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain 16-1

测定项目 Test items	菌株 16-1 Strain 16-1	维氏气单胞菌 ATCC 35624 <i>A. veronii</i> ATCC 35624	测定项目 Test items	菌株 16-1 Strain 16-1	维氏气单胞菌 ATCC 35624 <i>A. veronii</i> ATCC 35624
葡萄糖 GLU	+	+	硫化氢 H ₂ S	-	-
乳糖 LAC	-	-	吲哚 IND	+	+
麦芽糖 MAL	+	+	尿素酶 URE	-	-
甘露醇 MAN	+	+	丙二酸盐 MAL	-	-
蔗糖 SAC	+	+	硝酸盐还原 NIT	+	+
D-山梨醇 SOR	-	-	柠檬酸盐利用 CIT	-	-
卫茅醇 DUL	-	-	V-P 试验 V-P test	+	+
L-阿拉伯糖 ARA	-	-	苯丙氨酸脱氨酶 PHD	-	-
D-蜜二糖 MEL	-	-	赖氨酸脱羧酶 LDC	+	+
水杨苷 SAL	-	-	鸟氨酸脱羧酶 ODC	-	+
鼠李糖 RHA	-	-	精氨酸双水解酶 ADH	+	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。Notes: “+” means positive; “-” means negative.

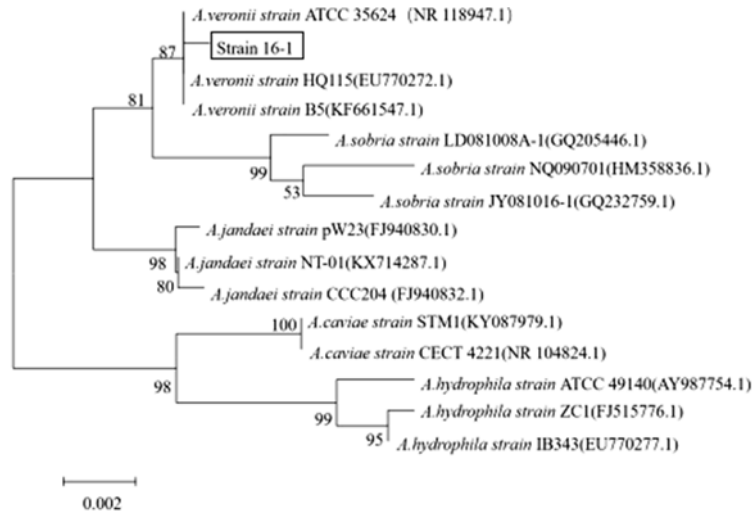


图 3 菌株 16-1 的 16S rRNA 基因序列发育进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of the strain 16-1

2.3 分离菌株的 16S rRNA 基因序列与发育进化树分析

测序结果显示菌株 16-1 的 16S rRNA 基因长度为 1 508 bp。Blast 检索发现其与气单胞菌属细菌的

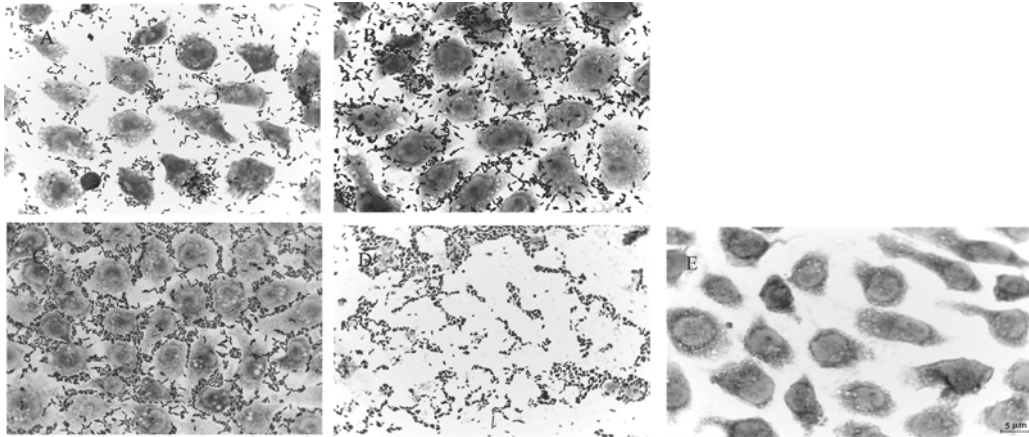
相应基因序列自然聚类,从中选取 14 条参考菌株序列进行发育进化树分析。如图 3 所示,菌株 16-1 与维氏气单胞菌模式菌株 ATCC35624 (*A. veronii* standard strain ATCC 35624) 自然聚为一分支,并且

两者的 16S rRNA 序列相似性高达 99.9%。综合菌株 16-1 的形态结构特征、培养性状以及生理生化特性, 确定菌株 16-1 为维氏气单胞菌。

2.4 分离菌株的细胞黏附特性

采用细胞黏附试验检测维氏气单胞菌株 16-1 对 EPC 细胞的黏附特性, 结果如图 4 所示。菌株 16-1 与 EPC 细胞共孵育 30 min 后, 即可见到细菌以聚集方式黏附在细胞周围 (图 4A), 每个细胞周围平均黏附菌数为 (16.03 ± 1.30) 个, 根据判定标

准确定菌株 16-1 为黏附阳性菌。随着共孵育时间延长, 平均黏附菌数不断增加。当共孵育 60 (图 4B) 和 90 min (图 4C) 时, 平均黏附菌数分别达到 (34.43 ± 1.36) 个和 (51.77 ± 1.17) 个; 而当共孵育 120 min 时, 由于细菌对 EPC 细胞呈现致病作用, 细胞几乎全部破裂、脱落, 仅见有大量聚集存在的细菌 (图 4D)。PBS 对照组 EPC 细胞形态完好, 无细菌黏附 (图 4E)。

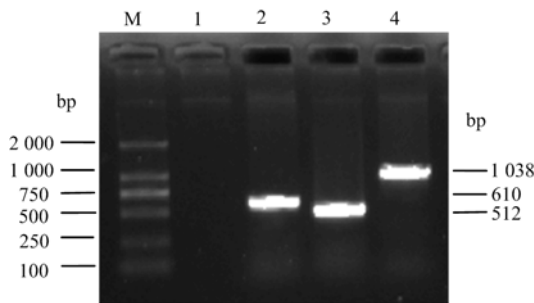


A: 菌株 16-1 与 EPC 细胞共孵育 30 min; B: 菌株 16-1 与 EPC 细胞共孵育 60 min; C: 菌株 16-1 与 EPC 细胞共孵育 90 min; D: 菌株 16-1 与 EPC 细胞共孵育 120 min; E: EPC 细胞对照

A-D represent the coincubation of EPC cells with the strain 16-1 for 30, 60, 90 and 120 min; E: EPC cells control.

图 4 菌株 16-1 对 EPC 细胞的黏附 (1 000×)

Figure 4 Adhesion of the strain 16-1 to EPC cells (1 000×)



M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: *OmpAI* 的 PCR 产物; 3: *OmpAII* 的 PCR 产物; 4: *aha1* 的 PCR 产物

M: DNA Marker; 1: Negative control; 2: PCR product of *OmpAI*; 3: PCR product of *OmpAII*; 4: PCR product of *aha1*

图 5 菌株 16-1 黏附素基因的 PCR 检测

Figure 5 PCR detection of adhesion genes from the strain 16-1

2.5 分离菌株携带的黏附素基因及其序列同源性分析

PCR 检测维氏气单胞菌菌株 16-1 携带黏附素基因情况, 结果如图 5 所示, 在 500 bp、600 bp 和 1 000 bp 附近出现 3 条清晰 DNA 条带。委托生物公司对扩增的目的基因进行克隆、测序, 结果显示它

们的长度分别为 610 bp、512 bp 和 1 038 bp, 与预期扩增的 *ompAI* 基因片段、*ompAII* 基因片段和 *aha1* 全长基因大小一致, 说明该菌株同时携带 3 种黏附素基因。序列同源性分析发现, *ompAI* 基因片段在菌株 16-1 与 GenBank 中收录的不同来源维氏气单胞参考株 (X11/CP024930.1/武昌鱼, X12/CP024933.1/武昌鱼, CB51/CP015448.1/草鱼, B565/CP002607.1/池塘淤泥和 AVNIH1/CP014774.1/人) 彼此间的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列相似性分别介于 95.8%~99.5% 和 95.0%~100%。*ompAII* 基因片段在菌株 16-1 与上述参考株之间的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列相似性分别介于 96.3%~99.1% 和 97.9%~100.0%。*aha1* 全长基因在菌株 16-1 与 GenBank 中仅收录的 4 个不同来源维氏气单胞参考株 (CA4/JQ946881.1/草鱼, LA2/JQ946888.1/白鲢, MM1508/KU877437.1/大鳍鲩和 TH0426/CP012504.1/黄颡鱼) 彼此之间的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列相似性分别介于 78.6%~99.6%

和 75.5%~99.4%。结果表明黏附素蛋白 OmpAI 和 OmpAII 在不同来源维氏气单胞菌之间的保守性较高, Aha1 蛋白的保守性较低。

3 讨论

近年来有关维氏气单胞菌感染所引起的水产养殖动物疾病报道日益增多, 症状也各有差异^[5,11-12]。2017 年安徽省怀远县某池塘养殖的草鱼突然大量发病死亡, 本研究团队从濒死期草鱼病变组织中分离到一株优势菌, 并经人工感染试验证实其为病原菌。本研究首先通过革兰染色、透射电镜和扫描电镜对分离菌株进行形态与染色特性观察, 并经培养性状及生化特性检测, 初步认定分离菌株是维氏气单胞菌。进一步对该菌株的 16S rRNA 基因序列进行分析发现, 该分离株与维氏气单胞菌模式菌株 ATCC 35624 的同源性高达 99.9%, 在系统进化树中两者自然聚为一分支。综合上述鉴定结果, 确定分离菌株为维氏气单胞菌。

细菌黏附是病原菌引发感染的起始环节, 其本质是细菌黏附素与宿主受体之间的相互作用, 使病原菌选择性地黏附定植于宿主细胞表面, 进而生长繁殖, 产生毒素, 损伤组织细胞, 导致疾病发生^[13]。EPC 细胞是研究鱼类病原菌黏附与侵袭特性的理想细胞模型。顾天钊等^[14]使用 EPC 细胞研究鲍氏不动杆菌 MF1 株的黏附特性; Ling 等^[15]利用 EPC 细胞研究了迟缓爱德华氏菌的侵袭特性; Ormonde 等^[16]研究了鳃弧菌对 EPC 细胞的黏附与侵袭特性; 朱兴国等^[17]以 EPC 细胞为细胞模型对嗜水气单胞菌 J-1 株黏附素进行了研究; 王薇等^[18]用 EPC 细胞研究了拟态弧菌的黏附特性。考虑到维氏气单胞菌 16-1 菌株是从患病草鱼体内分离获得, 以及草鱼原代细胞黏附模型不稳定, 故本研究也利用 EPC 细胞研究 16-1 菌株的细胞黏附特性。结果发现该菌株是黏附阳性菌, 能良好地黏附在 EPC 细胞四周, 并且随着孵育时间延长, 平均黏附菌数逐渐增加, 直至细胞完全破裂和脱落。

已知病原菌通常具有多种黏附素, 有文献报道 Aha1 蛋白和外膜蛋白 A (OmpAI 和 OmpAII) 是维氏气单胞菌的主要黏附素^[20-21]。OmpA 家族蛋白是一系列存在于革兰氏阴性菌细胞外膜表面、遗传关系相近的高拷贝膜蛋白或孔蛋白。它们一方面是大多数病原菌的毒力因子, 通过介导细菌黏附宿主细胞而发挥致病作用; 另一方面由于 OmpA 蛋白暴露在细菌外膜表面, 易于被免疫细胞识别, 常作为疫苗候选抗原^[22]。Maiti 等^[23]用迟缓爱德华菌重组

OmpA 蛋白疫苗免疫实验鱼后机体产生了高水平抗体, 并获得良好的免疫保护率; Kurupati 等^[24]构建的 OmpA 核酸疫苗可引起小鼠产生较强的体液免疫应答, 攻毒后对小鼠有较好的保护率。有关维氏气单胞菌 OmpA 蛋白的研究, Namba 等^[22]首次报道鲤鱼源维氏气单胞菌 CWP11 菌株产生的 OmpA 是一种黏附因子, 经基因克隆与生物信息学分析发现维氏气单胞菌 OmpA 存在 OmpAI 与 OmpAII 两个同系物。王惠^[25]检测到 WL161 株(乌鳢源)、NJ4112-4 株(鲫鱼源)、NC4122-3 株(草鱼源)和 NN725 株(鲢鱼源)等不同来源的维氏气单胞菌均携带 OmpAI 基因。本研究结果显示草鱼源维氏气单胞菌菌株 16-1 同时携带 *ompAI*、*ompAII* 和 *aha1* 3 种黏附素基因, 其中 *ompAI* 和 *ompAII* 的核苷酸序列及其所编码氨基酸序列在不同来源的维氏气单胞菌间均具有较高的保守性。后期研究中我们将进一步克隆表达鱼源维氏气单胞菌重组 OmpAI 和 OmpAII 蛋白, 并通过免疫动物攻毒试验检测其免疫保护性, 以确定它们是否可作为疫苗靶点。

综上所述, 从患病草鱼体内分离的病原菌株 16-1 为维氏气单胞菌。该菌株具有良好的细胞黏附性, 同时携带 *ompAI*、*ompAII* 和 *aha1* 3 种黏附素基因, 其中编码 OmpAI 和 OmpAII 蛋白的基因在不同来源的维氏气单胞菌之间具有较高的保守性。

参考文献:

- [1] SILVER A C, WILLIAMS D, FAUCHER J, et al. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16751.
- [2] ROBERTS M T M. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(2): 241-243.
- [3] MENCACCI A. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(8): 727-730.
- [4] SONG Y J, HU X C, LU A J, et al. Isolation and characterization of *Aeromonas veronii* from Ornamental Fish Species in China[J]. Isr J Aquacult-Bamid, 2017, 69, 1446-1457.
- [5] DONG H T, TECHATANAKITARNAN C, JINDAKITTIKUL P, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. J Fish Dis, 2017, 40(10): 1395-1403.
- [6] 曹际, 马林, 张文畅, 等. 大黄鱼源溶藻弧菌的鉴定及其菌蜕制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 129-137.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 348-392.

- [8] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697-703.
- [9] 李峰, 刘端, 孟凡亮, 等. 霍乱弧菌 TCP 菌毛粘附作用的研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2001, 2(3): 194-197.
- [10] WANG W, WANG L, LI J N, et al. Cloning and sequence analysis of *ahal* gene encoding major adhesin protein from *Aeromonas* sp. isolated from aquaculture animals with haemorrhagic septicemia[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(21): 3908-3913.
- [11] YU J H, HAN J J, KIM H J, et al. First report of *Aeromonas veronii* infection in farmed Israeli carp *Cyprinus carpio* in Korea[J]. *J fish pathol*, 2010, 23(2): 165-176.
- [12] CAI S H, WU Z H, JIAN J C, et al. Characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* bv. *veronii* associated with ulcerative syndrome from Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris Günther*)[J]. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(1): 382-388.
- [13] DONG H T, TECHATANAKITARNAN C, JINDAKITTIKUL P, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. *J Fish Dis*, 2017, 40(10): 1395-1403.
- [14] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Bacterial adhesion and entry into host cells[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 715-727.
- [15] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌 MF1 株的粘附特性[J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(3): 65-68.
- [16] LING S H M, XIE L, LIM T M, et al. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models[J]. *Microbiology*, 2000, 146(1): 7-19.
- [17] ORMONDE P, HÖRSTEDT P, O'TOOLE R, et al. Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(8): 2326-2328.
- [18] 朱兴国, 范红结, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌 J-1 株粘附素及其受体分析[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 82-84.
- [19] 王薇, 胡丹丹, 李槿年, 等. 拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能及所介导的致病作用[J]. *水产学报*, 2014, 38(5): 731-740.
- [20] 许瑞, 田佳鑫, 张冬星, 等. 维氏气单胞菌 TH0426 株主要黏附素基因的克隆、生物信息学分析及原核表达[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(11): 2141-2146.
- [21] CONFER A W, AYALEW S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 163(3/4): 207-222.
- [22] NAMBA A, MANO N, TAKANO H, et al. OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an optimistic pathogen that habituates in carp intestinal tract[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(5): 1441-1451.
- [23] NAMBA A, MANO N, TAKANO H, et al. OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an optimistic pathogen that habituates in carp intestinal tract[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(5): 1441-1451.
- [24] MAITI B, SHETTY M, SHEKAR M, et al. Recombinant outer membrane protein A (OmpA) of *Edwardsiella Tarda* a potential vaccine candidate for fish, common carp[J]. *Microbiol Res*, 2011, 167(1): 1-7.
- [25] KURUPATI P, RAMACHANDRAN N P, POH C L. Protective efficacy of DNA vaccines encoding outer membrane protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(1): 82-88.
- [26] 王惠. 不同动物源性维氏气单胞菌的生物特性及四种毒力基因比较研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2014.