

罗非鱼创伤弧菌的分离鉴定和药敏试验

黎炯^{1,2}, 叶星^{1,2*}, 卢迈新^{1,2}, 邓国成¹, 高风英¹, 可小丽¹, 朱华平¹, 黄樟翰¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 2010年春季广东、海南的养殖罗非鱼苗种出现较大范围的死亡现象, 在广东珠海某罗非鱼养殖场的发病罗非鱼体上分离到一株病原菌 ZH1。人工感染试验显示该分离菌株具有较强毒力, 该病原菌经 ATB 32E 细菌鉴定系统鉴定和 16S rRNA 基因序列分析, 确定为创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)。药敏试验结果显示, 该菌株对诺氟沙星、头孢克洛、氧氟沙星和壮观霉素等 19 种试验药物敏感。本研究病原的鉴定与药物敏感性试验结果为罗非鱼病害的有效防控提供参考。

关键词: 罗非鱼; 创伤弧菌; 分离; 鉴定; 药物; 敏感性

中图分类号: S965.125 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0965-06

Isolation and Identification of *Vibrio vulnificus* from Infected Tilapia and Its Drug-sensitivity Analysis

LI Jiong^{1,2}, YE Xing^{1,2*}, LU Mai-xin^{1,2}, DENG Guo-cheng¹,
GAO Feng-ying¹, KE Xiao-li¹, ZHU Hua-ping¹, HUANG Zhang-han¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries & Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In Spring of 2010, large-ranging diseases occurred in tilapia farms in Guangdong and Hainan provinces. A Gram-negative pathogenic bacterial strain ZH1 was isolated from diseased tilapia fry cultured in a farm in Zhuhai, Guangdong. Artificial infection experiments showed that the isolated strain possessed strong virulence. This isolated strain was identified as *Vibrio vulnificus* using ATB 32E identification and 16S rRNA sequence analysis. The drug-sensitivity test of a total of 29 antimicrobial agents showed that the strain ZH1 was highly sensitive to 18 agents such as Norfloxacin, Cefaclor, Ofloxacin and Spectinomycin. The results of pathogen identification and drug-sensitivity test will be helpful for effective prevention of fish diseases.

Key words: tilapia; *Vibrio vulnificus*; isolation; identification; drug; sensitivity

罗非鱼隶属于鲈形目、鲈形亚目、丽鱼科、罗非鱼属(亦称丽鲷科、丽鲷属)。该属鱼类原产非洲, 现已成为世界性养殖品种。目前世界上有 85 个国家和地区养殖罗非鱼, 2010 年养殖产量达 280 万 t。我国罗非鱼养殖业发展迅速, 产量以平均每年 8% 左右的速度递增, 稳居世界首位。2010 年我国罗非鱼产量为 120 万 t。广东省是我国养殖罗非鱼最早、养殖面积最多和产量最高的地区, 产量约占全国总产

收稿日期: 2011-01-20 修回日期: 2011-07-10

基金项目: 国家 863 专项(2011AA100404)、现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-49)、广东省农业攻关项目(2009B020201003)和广东省海洋渔业科技推广专项(A201001C05)资金资助

作者简介: 黎炯(1985-)男, 硕士生, 主要从事水产生物技术研究, E-mail: gzlijiong@163.com; * 通讯作者: 叶星, 研究员, 博士, E-mail: gzyexing@163.com。

量的 48%^[1]。抗病力强是罗非鱼被广泛养殖的一个重要因素。但近年来罗非鱼的病害日趋严重 2009 年广东海南养殖罗非鱼链球菌病的暴发造成了巨大损失,病害已成为制约罗非鱼健康养殖发展的一个关键因素,因此有必要对养殖罗非鱼的病害进行严密监控。

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)广泛存在于近海及河口环境中,是一种呈逗点状、单极端单鞭毛、无芽孢、无异染颗粒的嗜盐性革兰氏阴性条件致病菌,在牡蛎、蛤、螃蟹、贻贝、扇贝、虾、鱼等水产动物以及浮游生物、沉积物中可分离到此菌^[2],它可通过创口、食用污染的海产品或水源引起感染^[3],是水产养殖中危害较大的一种细菌性病原。1970 年 Roland^[4]首先报道其感染可引起人小腿坏疽和内毒素性休克,但直到 1976 年 Hollis 等^[5]才从血液中培养分离出该细菌,并鉴定为乳酸阴性嗜盐弧菌。1979 年 Farmer^[6]将其正式命名为创伤弧菌。研究发现创伤弧菌是“人鱼共患病”的重要致病菌^[7]。致病机理研究表明创伤弧菌的荚膜多糖及所产生的多种酶类均与毒力相关,其中卵磷脂酶具有溶解线粒体膜的功能,而金属蛋白酶(metaprotease)不但具有固定血浆中的铁离子、刺激细菌快速增长的能力且可插入血浆中蛋白酶抑制因子 a 链(aM),引起大量内源性蛋白、胶原蛋白等的溶解^[8-9]。由于其对人类的重大威胁,2006 年创伤弧菌被列入最危险的细菌之列^[10]。2003 年欧盟要求对我国出口水产品检测创伤弧菌^[11]。

创伤弧菌对鳗鲡具有较强的专一感染特性,曾造成日本、台湾地区、西班牙等地养殖的鳗鲡大量死亡^[12-14]。此外创伤弧菌也是石斑鱼、军曹鱼、对虾、罗氏沼虾等的病原菌^[15-18]。2005 年,在我国广东阳江市报道了创伤弧菌感染金鲳鱼(*Trachinotus Ovatus*)并造成了重大经济损失^[19]。2007 年浙江省乐清湾网箱养殖的黄姑鱼由于创伤弧菌感染而发生大量死亡^[20]。创伤弧菌也是罗非鱼养殖中危害性较大的细菌性致病原之一。1988 年日本的一个滨海罗非鱼养殖区,由于创伤弧菌的感染使罗非鱼死亡率高达 10%~20%,造成了巨大经济损失^[21]。台湾的罗非鱼养殖业近年来也一直受到创伤弧菌的困扰^[22]。孟加拉国的罗非鱼的咸淡水养殖区也均受过创伤弧菌的感染^[23]。近年来世界各地由于接触创伤弧菌感染的罗非鱼而导致人类的感染甚至死亡也屡见报道,如台湾、加拿大、以色列、西班牙等地均有关于人类接触感染创伤弧菌的罗非鱼而致病甚至死亡的报道^[24-28]。

2010 年 3—5 月广东有些罗非鱼养殖场放养的罗非鱼苗种出现死亡。发病鱼出现的病症主要为肠道肿大、有积液,肌肉轻微出血等,有别于链球菌病的症状。本课题组对广东珠海某罗非鱼养殖场的发病罗非鱼进行了病原菌的分离、鉴定与药物敏感性试验,以便为病害的有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发病罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GIFT strain)样本采自广东珠海某罗非鱼养殖场,每尾体质量约 0.5 g。感染试验用的健康罗非鱼与发病罗非鱼为同一品系,由台山某罗非鱼养殖场提供,体质量约 0.5 g。PCR 仪为 EDC-810(广州东胜创新生物科技有限公司)。ATB 细菌鉴定系统及生化鉴定试剂条 ID 32E 均为法国 Biomerieux 公司产品,细菌基因组提取试剂盒购自广州铂尔生物科技有限公司,药敏试验所用的抗生素药物购自杭州天和微生物试剂有限公司,PCR 反应体系产品购自 Takara 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 病原菌的分离与培养

发病罗非鱼的主要症状为肠道肿大、有积液,肌肉轻微出血。现场用 75%(v/v)的酒精对采样病鱼体表进行消毒,无菌操作取病鱼的肝、脑、肾和肠组织,划线接种于血琼脂平板。28℃培养 24 h 后,挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养,纯化后的细菌用于人工感染试验和生化及分子鉴定。

1.3 病原菌的人工感染试验

分离、纯化到的多个菌株均具有相似的菌落特征,取其中的 1 个菌株接种于琼脂平板、培养 24 h 后收集菌体,经质量分数为 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液,稀释成所需菌液浓度用于浸泡感染试验。

浸泡组分 2 组,菌液浓度分别为 6×10^8 cfu/mL 和 6×10^7 cfu/mL,另设对照组。每组放养健康罗非鱼 20 尾。试验期间水温 29~31℃,浸泡 20 min。连续 7 d 观察,记录试验鱼的症状和死亡尾数。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 生理生化鉴定 取琼脂平板上培养 24 h 的菌体,经涂片、固定、革兰氏染色后显微镜下观察菌

体形态。采用法国 ATB 细菌鉴定系统进行生化鉴定。

1.4.2 分子鉴定 纯化的菌株接种于液体 LB 培养基 28 °C 摇床过夜培养,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒并按照其说明提取细菌基因组, Eppendorf 分光光度计测定 DNA 浓度。根据文献 [29] 合成 1 对细菌 16S rRNA 通用引物, 预期扩增长度 1 500 bp 左右。上下游引物序列分别为: AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG 和 TACGGCTACCTTGTTACGACTT。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。20 μ L PCR 反应体系中含有: 10 \times Ex taq PCR 缓冲液 2 μ L, 4 \times dNTP 混合物 0.4 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L (20 μ mol/L) 灭菌双蒸水 15.65 μ L, 模板 1 μ L (约 60 ng), Ex taq 酶 0.15 μ L (5 U/ μ L)。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 然后进入循环: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 50 s, 共 32 个循环, 最后一个循环结束时 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应结束后, 产物经 15 mg/g 琼脂糖凝胶电泳检测并用胶回收试剂盒回收 (Omega 公司产品)。回收片段采用 pMD18-T Easy Vector Systems (TaKaRa 公司产品) 进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, PCR 鉴定挑选阳性克隆并送上海英骏生物技术有限公司进行测序。采用 Vector NTI suite 9.0 软件和 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列同源性分析。

1.5 药敏试验

以涂布法接种纯化培养 24 h 的病原菌于琼脂培养基平板上, 贴上药敏纸片, 共 29 种。于 28 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。按照产品说明书判断菌株对药物的敏感性。

2 结 果

2.1 病原菌的致病性

人工浸泡感染试验结果表明, 浸泡感染 7 d 2 种菌液浓度均能引起罗非鱼死亡。菌液浓度为 6×10^8 cfu/mL 组的死亡率为 75% (15/20); 菌液浓度为 6×10^7 cfu/mL 组的死亡率为 45% (9/20)。从感染濒死的病鱼再次分离出的菌株均获得与初次分离的菌株相似的感染结果, 由此证实该分离菌株为致病菌株。

2.2 病原菌的生化鉴定结果

分离菌株经革兰氏染色确定为阴性菌 (G-), 再用 ATB 细菌鉴定系统和 ID 32 E 试剂条进行鉴定, 结果见表 1。

表 1 ATB 32E 生理生化鉴定结果

Tab. 1 Identification of the isolated strain by ID 32 E

项目 Item	菌株 Strain	项目 Item	菌株 Strain
d - 葡萄糖 Glucose	+	5 酮基葡萄糖酸盐 5 Ketogluconate	-
脂酶 Lipase	+	赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-
L - 阿拉伯醇 L - arabitol	-	L - 阿拉伯糖 L - arabinose	-
d - 甘露醇 Mannitol	-	肌醇 Indole	+
丙二酸盐 Malonate	-	d - 半乳糖酸盐同化 Galacturonate	-
D - 阿拉伯醇 D - arabitol	-	d - 纤维二糖 Cellobiose	+
L 天冬氨酸芳胺酶 Acide L - aspartique arylamidase	-	侧金盏花醇 Adonitol	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	肌醇 Indole	-
d - 海藻糖 Trehalose	+	β 葡萄糖醛酸酶 β Glucuronidase	-
β - 葡萄糖苷酶 β GlucURonidase	+	β - 半乳糖苷酶 β Glucuronidase	+
α - 麦芽糖 α Maltosidase	+	α - 葡萄糖苷酶 α Glucosidase	-
d - 麦芽糖 Maltose	+	尿素酶 Urease	-
β N 乙酰葡萄糖胺 N - Acetyl - β - Glucosaminidase	-	d - 山梨醇 Sorbitol	-
蔗糖 Saccharose	-	酚红 Rouge de phenol	+
L - 鼠李糖 Rhamnose	-	古老糖 Palatinose	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	α - 半乳糖苷酶 α Galactosidase	+

+: 阳性反应, -: 阴性反应; +: Denotes positivity; -: Denotes negativity.

2.3 病原菌 16S rRNA 基因序列及系统进化关系分析

使用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增获得长度约 1 500 bp 的片段 (图 1), 克隆、测序获得 1 506 bp 的 DNA 片段。通过 NCBI 的 Blast 程序进行同源性分析, 发现与 ZH1 菌株基因序列同源的前 7 个物种均为创伤弧菌 (*V. vulnificus*), 同源性在 96% 以上。根据 16S rRNA 序列采用邻接法 (Neighbor - Joining) 所构建的系统进化树上, ZH1 菌株首先与创伤弧菌聚类, 然后再与其它弧菌种类聚类, 因此可进一步确认该分离菌为创伤弧菌 (图 2)。

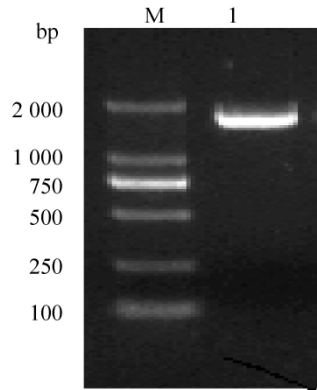
2.4 药敏试验结果

以涂布法对分离菌株进行常规药物敏感性检测, 在 29 种药物中, 该菌株对红霉素、头孢曲松和米诺四环素等 19 种药物敏感; 对乙酰螺旋霉素、头孢噻吩、麦迪霉素和四环素等 5 种药物中度等敏感; 对青霉素、阿莫西林和氨苄青霉素等 5 种药物具有耐药性 (表 2)。

3 讨论

本研究从患病罗非鱼鱼苗中分离到致病菌株, 挑取其中的一株并命名为 ZH1, 经 ATB 细菌鉴定系统鉴定为创伤弧菌, 其中 ID (鉴定百分率) 为 99.9%, T 值 (与同一类型细菌的相似程度)

为 0.98。该菌株 16S rRNA 基因序列的同源性分析显示与创伤弧菌的同源性最高 (>96.0%)。在系统



M: DNA Marker (DL 2000); 1: ZH1 株 16S rRNA 扩增产物。 Lane M, DNA Marker; Lane 1, 16S rRNA amplified product of ZH1 strain.

图 1 分离株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of 16S rRNA gene of the isolated strain

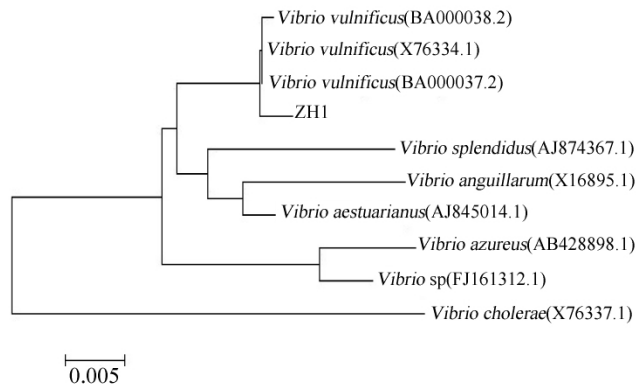


图 2 根据 16S rRNA 序列构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of ZH1

表 2 分离菌株对 29 种药物的敏感性

Tab.2 Antibiotic sensitivities of the isolated strain

抗菌药物 Antibiotics	含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Antibacterial circle diameter	药物敏感性 Sensitivity	抗菌药物 Antibiotics	含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Antibacterial circle diameter	药物敏感性 Sensitivity
红霉素 Erythromycin	15	25	S	恩诺沙星 Baytril	5	29	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	31	S	阿莫西林 Amoxicillin	10	0	R
米诺四环素 Minocycline	30	22	S	萘啶酮酸 Nalidixic acid	30	29	S
乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin	30	14	I	氨苄青霉素 Ampicillin	10	0	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10	28	S	壮观霉素 Spectinomycin	100	26	S
头孢克洛 Cefaclor	30	20	S	四环素 Tetracycline	30	19	I
苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	S	洛美沙星 Lomefloxacin	10	34	S
青霉素 Penicillin	1	13	R	链霉素 Streptomycin	10	22	S
头孢唑啉 Cefazolin	30	29	S	阿米卡星 Amikacin	30	15	I
先锋必素 Cefobis	75	26	S	新霉素 Necmycin	30	15	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	30	S	妥布拉霉素 Tobramycin	10	17	S
头孢噻吩 Cefalothin	30	17	I	庆大霉素 Gentamicin	10	17	S
麦迪霉素 Midecamycin	30	16	I	依诺沙星 Enoxacin	10	30	S
罗红霉素 Roxithromycin	15	21	S	氟罗沙星 Fleroxacin	5	30	S
头孢氨苄 Cefalexin	30	13	R				

R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感。

R: denotes low or no sensitivity; I: denotes moderate sensitivity; S: denotes high sensitivity.

进化树上该分离株与创伤弧菌聚为一簇。因此综合生化鉴定,16S rRNA 序列的鉴定结果可确定该分离菌株 ZH1 为创伤弧菌。人工浸泡感染试验显示该分离菌株具有致病力,可单独感染、引起罗非鱼鱼苗的发病与死亡,因此可认为该分离菌株为此次诱发罗非鱼发病与死亡的病原菌。鉴于已有创伤弧菌引发罗非鱼病害、导致日本等罗非鱼产业遭受重大损失的报道^[21-26],因此在罗非鱼养殖过程中应重视创伤弧菌病的防控。

药敏分析显示该分离菌株对红霉素、头孢曲松、米诺四环素、诺氟沙星等药物敏感,对青霉素、头孢氨苄、氨苄青霉素则具有耐药性。在人和其它鱼类分离的创伤弧菌药敏试验结果与本试验相同,但阿莫西林、头孢噻吩、四环素在文献报道中为创伤弧菌敏感性药物^[30-34],但在本试验中阿莫西林已显示为耐药性,而头孢噻吩和四环素均为中度敏感,因此在实际防治过程中既要根据菌株对药物的敏感性,合理选择用药,也应尽量减少同种药物的反复使用,以避免耐药菌株形成,从而提高防治效果。在使用药物进行创伤弧菌等病菌感染的防治时也要严格遵守有关水产安全用药的规定,以保证养殖产品的质量安全。

本次病害发生的季节是五月份,水温约 25 °C。有研究认为当水温达到 18 ~ 20 °C 时,创伤弧菌的感染力已非常强^[21],并且在咸淡水中对罗非鱼均有较强感染性^[23]。但当温度低于 10 °C 时,创伤弧菌就会进入非可培养状态(UN-BC)^[35],在水温低于 8 °C 的环境中该菌已不能生长^[2],可见温度对创伤弧菌条件致病性影响很大。所以对病害的防治应时刻注意气候的变化。同时高密度养殖与水质环境的恶化也是罗非鱼易感染此菌的重要因素^[36]。创伤弧菌对罗非鱼的感染所带来的危害,不仅仅是对罗非鱼产业会造成影响,而且对人类的生命安全也是一个威胁。因此更应该在罗非鱼养殖过程中加强科学管理,保持养殖过程的合理密度及良好的养殖水环境等以减少其病害发生,以实现罗非鱼的健康养殖。

参考文献:

- [1] 李来好, 吴燕燕, 李凤霞, 等. 广东省罗非鱼及其养殖环境中食源性致病细菌相分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 823-831.
- [2] Wright A C, Hill R T, Johnson J A, et al. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 717-724.
- [3] Chung P H, Chusng S K, Tsang T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8): 1302-1303.
- [4] Fredy P, Roland M D, Leg Gangrene, et al. Endotoxin shock due to *Vibrio parahaemolyticus* - An infection acquired in New England coastal waters[J]. N Engl J Med, 1970, 282(23): 1306.
- [5] Hollis D G, Weaver R E, Baker C N, et al. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 1976, 3(4): 425-431.
- [6] Farmer J J. *Vibriid* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicaemia, and the sea[J]. Lancet, 1979, 314(8148): 903.
- [7] Amaro C, Bosca E G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1454-1457.
- [8] Hlady W G, Klontz K C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981 - 1993[J]. J Infect Dis, 1996, 173(5): 1176-1183.
- [9] Miyoshi S L, Narukawa H, Tomochika K I. Actions of *Vibrio vulnificus* metalloprotease on human plasma proteinase - proteinase inhibitor systems: a comparative study of native protease with its derivative modified by polyethylene glycol[J]. Microbiol Immunol, 1995, 39(12): 959-966.
- [10] Inoue H. *Vibrio vulnificus* infection of the hand[J]. J Orthop Sci, 2006, 11(1): 85-87.
- [11] 吴斌, 马杰, 林维宣. 水产品中致病性弧菌的分离与鉴定[J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(1): 47-49.
- [12] Biosca E G, Amaro C, Rsreve C, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla*[J]. Fish Diseases, 1991, 14(1): 103-109.
- [13] Belen F, Carmen A. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms[J]. Aquaculture, 2003, 217(1): 677-682.
- [14] Muroga K, Jo Y, Nishibuchi M. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. 1. Characteristics and taxonomic status[J]. Fish Pathology, 1976, 11(10): 141-145.

- [15] Song Y L, Cheng W, Shen C H, et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infection in cultured shrimp and eels in Taiwan [J]. Nat Sci Coun Synp Ser (Taipei), 1990, 16(1): 172-179.
- [16] 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.
- [17] 简纪常, 吴灶和, 陈刚, 等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原的分离及其特性 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 329-330.
- [18] Sharshar K M, Azab E A. Studies on diseased freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* infected with *Vibrio vulnificus* [J]. Pak J Biol Sci, 2008, 11(17): 2092-2010.
- [19] Lia 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, 26(1): 17-25.
- [20] 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.
- [21] Sakata T, Hattori M. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia [J]. Fish Pathol, 1988, 23(1): 33-40.
- [22] Hsieh J C, Pan C Y, Chen J Y. Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(3): 430-439.
- [23] Zahid H M, Anita C W, Shankar C M, et al. Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains from tilapia aquaculture in Bangladesh [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(14): 4890-4895.
- [24] Hsueh R P, Lin C Y, Tang H J, et al. *Vibrio vulnificus* in Taiwan [J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(8): 1363-1367.
- [25] Donald C V, Samira M, Bunmi F, et al. *Vibrio vulnificus* septicemia after handling Tilapia species fish: A Canadian case report and review [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2006, 17(2): 129-132.
- [26] Nudelman A, Edelson G, Linden A, et al. Infection by *Vibrio vulnificus* after a prick from the spine of a Tilapia [J]. Harefuah, 1997, 133(10): 444-445.
- [27] Ronit Z, Chantal S, Larisa L, et al. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(12): 1875-1882.
- [28] Torres L, Escobar S, Lopez A I, et al. Wound infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(7): 537-538.
- [29] Messick J B, Berent L M, Cooper S K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis [J]. J Clinical Microbiology, 1998, 36(2): 462-466.
- [30] 王志刚, 邵平扬, 吴晓燕, 等. 创伤弧菌的培养鉴定及其对抗菌药物的敏感性 [J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(5): 293-296.
- [31] 赵典惠, 孙际佳, 王海芳, 等. 创伤弧菌的药物敏感性 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12): 1207-1211.
- [32] 尤荣开, 陈秀平, 邵朝朝, 等. 创伤弧菌对常用抗菌药物的敏感性 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(10): 1312-1313.
- [33] 杜大海, 马志强, 殷萌, 等. 创伤弧菌抗菌药物药敏实验及结果分析 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(13): 2473-2475.
- [34] 郑芳艳, 石存斌, 潘厚军, 等. 鳗鲡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.
- [35] 何闪闪, 薛长湖. 水产品中创伤弧菌的快速检测与分离 [J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 85-90.
- [36] Belen F, Elena A, Rodolfo B, et al. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E) [J]. Aquaculture, 2002, 212(4): 21-30.