

类志贺邻单胞菌的检测方法概述

陈美群,扎西拉姆,潘瑛子*

(西藏自治区农牧科学院水产科学研究所,西藏 拉萨 850032)

摘要:类志贺邻单胞菌是一种独特的革兰氏阴性、具极端鞭毛的人-兽共患病原菌,该菌可导致许多动物尤其鱼类等水生动物疾病频发,同时可引起腹泻、脑膜炎、败血症、蜂窝组织炎等人类疾病,具有较高的传染性和发病率。由于该菌不能及时鉴定而导致的延误治疗,不仅给水产养殖业造成重大经济损失,同时也给消费者带来重大安全隐患。为此快速、准确的鉴别出该病原菌,有针对性的开展药物防治尤为重要。本文对该菌的传统检测技术,免疫学诊断技术,分子生物学检测技术进行了详细概述,以期为该菌的快速、准确诊断提供详尽资料。

关键词:类志贺邻单胞菌;传统检测;免疫学诊断;分子生物学检测

中图分类号:S9643 文献标识码:A

Reaearch Progress of Detection Method of *Plesiomonas shigelloides*

CHEN Mei-qun, Zhaxilamu, PAN Ying-zi*

(Institute of Fisheries Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: *Plesiomonas shigelloides* is a unique gram-negative, ultra flagellum human-animal pathogen. *P. shigelloides* can cause many animals, especially fish and other aquatic animal diseases, and it also can cause diarrhea, meningitis, sepsis, hibritis and other human diseases, with high infectious and morbidity rates. Due to the delay of fail to identify *P. shigelloides* in time, it not only caused major economic losses to aquaculture industry, but also brought major safety hazards to consumers. Rapid and accurate identification of *P. shigelloides* was particularly important to prevention and control of it. In order to provide detailed information for the rapid and accurate diagnosis of *P. shigelloides*, the traditional detection techniques, immunology diagnosis techniques and molecular biology detection techniques were summarized in this paper.

Key words: *Plesiomonas shigelloides*; Traditional detection; Immunological diagnosis; Molecular biological detection

类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 是一种革兰氏阴性、氧化酶阳性的运动性杆菌,隶属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 邻单胞菌属 (*Plesiomonas* Habs and Schubert, 1962) 内唯一的一个种^[1]。该菌是一种全球性分布细菌,池塘、淡水,地表水等水体是其主要生活环境,而水生动物尤其鱼类是其主要宿主^[2-12]。同时,该菌是一种人-兽共患病原菌^[13],被认为是通过水和食物传播的胃肠道感染暴发的病原体^[14-15],该菌可引起急性肠胃炎、腹泻等症状,还可以引起脑膜炎、败血症、蜂窝组织炎、肺炎

等肠外感染症状^[16-24],为此受到国内外学者的广泛关注。引起鱼类患病的致病菌种类繁多,而且有些患病鱼类发病的相似症状是由不同病原菌引起的,此外同种致病性类志贺邻单胞菌在不同鱼种中发病的症状也会有差异,加之类志贺邻单胞菌引起鱼类发病愈加频繁,往往由于不能及时鉴定病原菌而延误治疗,不仅给水产养殖业造成了重大经济损失,而且也给消费者带来了一定的健康安全隐患。为此快速、准确的鉴别出病原菌,并有针对性的选择对症药物进行防治显得尤为重要。目前,对类志贺邻单胞菌的常用检测诊断方法主要分为以下三大类。

1 传统检测技术

1.1 选择性培养基法

Miller^[25]和 Levin^[26]比较了 2 种固体培养基 (PL 和 IBB) 对水生样品中类志贺邻单胞菌的分离

收稿日期:2019-09-08

基金项目:西藏自治区自然科学基金[XZ2019ZRG-80(Z)];西藏自治区自然科学基金项目(XZ2018ZRG-42);农业部财政专项“西藏重点水域渔业资源与环境调查”

作者简介:陈美群(1986-),女,硕士,助理研究员,主要从事鱼病防治研究工作,E-mail:cmq1986007@163.com,*为通讯作者;潘瑛子(1984-),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事鱼病学研究工作,E-mail:7303515@qq.com。

表 1 类志贺邻单胞菌的部分选择性分离培养基

Table 1 Partial selective separation medium of *Plesiomonas shigelloides*

培养基名称	配方(g/L)
PL 琼脂培养基	蛋白胨 1.0、氯化钠 5.0、酵母膏 2.0、甘露醇 7.5、阿拉伯糖 5.0、肌醇 1.0、赖氨酸 2.0、胆盐 3 号 1.0、酚红 0.08、琼脂 15.0、pH 7.4。
IBB 琼脂培养基	蛋白胨 10.0、牛肉膏 5.0、氯化钠 5.0、胆汁盐混合物 8.5、亮绿 0.00033、中性红 0.025、内消旋肌醇 10.0、琼脂 13.5、pH 7.2。
PDA 琼脂培养基	蛋白胨 7.5、牛肉膏 7.5、氯化钠 5.0、胆汁盐混合物 8.5、亮绿 0.00033、中性红 0.025、内消旋肌醇 10.0、琼脂 13.5、pH 7.4。
MSS 琼脂培养基	牛肉膏 5.0、胰胨 5.0、三号胆盐 3.5、肌醇 10.0、柠檬酸钠 8.5、硫代硫酸钠 8.5、10 % 柠檬酸铁溶液 10 mL、1 % 中性红溶液 2.5 mL、0.1 % 煌绿溶液 0.33 mL、琼脂 17.0、pH 7.0。
改良 DC 琼脂培养基	胰胨 1.0、牛肉膏 0.3、酵母浸膏 0.5、柠檬酸钠 2.0、柠檬酸铁铵 0.1、乳糖 1.0、甘露醇 1.0、去氧胆酸钠 0.5、琼脂 1.5、1 % BTB 1 mL、酸性复红 0.5、pH 7.4。

和恢复效果,研究发现在竞争微生物水平较低的样品或已受到低温、高温等损伤的样品中,使用 PL 培养基回收类志贺邻单胞菌效果较好;而对于杂菌高度污染的样品,使用 IBB 培养基对类志贺邻单胞菌的回收率会更高。Freund 等^[27]对 5 种不同的富集方法(革兰氏阴性肉汤、碱性蛋白胨水、无碘四硫酸盐肉汤和两种单胞菌肉汤)与淡水样品直接涂布法进行了比较,结果表明四硫酸盐肉汤对类志贺邻单胞菌的回收率明显高于其他四种肉汤($P < 0.05$),且也明显高于直接涂布法,建议在常规检测类志贺邻单胞菌时,在直接涂布前使用四硫酸盐肉汤在 40℃进行富集培养。Huq 等^[28]比较了 3 种培养基(PDA、IBB、MSS)在不同温度下对类志贺邻单胞菌和气单胞菌属细菌的分离效果,研究发现有气单胞菌存在的情况下,选择 PDA 培养基于 44℃孵育 24 h 后类志贺邻单胞菌分离效果较好。由于类志贺邻单胞菌与气单胞菌具有一些共同的特性,并且此二菌在一些肠道培养基上的菌落形态相似,难以区别,为了筛选出一种制作简单,便于观察,可提高类志贺邻单胞菌分离率及准确率的培养基,李瑾年^[29]比较了类志贺邻单胞菌和嗜水气单胞菌在 5 种不同培养基上的生长情况及菌落特性,发现改良去氧胆酸钠琼脂(改良 DC)分离效果最好。为了提高类志贺邻单胞菌的检出率,王素秋等^[30]选择了几种常用的增菌液和 4 种选择性分离用培养基,对该菌的检出效果进行了比较,结果表明使用双倍碱性胨水和氯化铋胨水两次增菌后,再用改良 DC 平板分离效果最佳,比常规检测法的检出率提高了几十倍,具有显著性意义。

1.2 生理生化鉴定技术

传统生理生化鉴定技术是依据《伯杰氏细菌系统分类学手册》或《常见细菌系统学鉴定手册》等,结合形态及一些生理生化反应特征来对细菌进行鉴定^[31]。传统生理生化鉴定技术结果准确、可信度较

高,但是检测项目多、耗时长,不利于细菌性疾病的快速诊断与防治。为此,一些依赖于全部或部分测定生化反应指标的编码鉴定法以及自动化鉴定系统被逐渐开发出来。李瑾年^[32]采用国产革兰氏阴性杆菌编码鉴定系列培养基对 28 株分离自安徽省内养殖场发病鱼、鳖、蟹等水产动物体内的致病细菌进行鉴定,结果显示 2 株细菌未能得到鉴定外,其余 26 株细菌均可鉴定到属或种水平,可鉴定率为 92.86 %,该编码鉴定法比传统生理生化鉴定法操作更为简便、快速(24 ~ 48 h)和准确,同时又克服了自动化鉴定系统需要昂贵仪器的缺点,因此具有较高的实用价值。根据相关报道,目前主要应用 API 细菌鉴定系统^[33]、ID32E 微量多项试验鉴定系统^[34]、BD Phoenix™-100 全自动细菌鉴定/药敏系统^[35]、ATB 细菌鉴定仪^[36]、GYZ-15eV 生化检测试剂盒和 BI-OLOG 自动微生物鉴定系统^[37]等自动化鉴定系统对类志贺邻单胞菌进行生化鉴定,自动化鉴定系统具有快捷、准确、灵敏、高效等优点,但自动化鉴定仪价格昂贵,一般基层单位难以推广应用。

2 免疫学诊断技术

免疫学诊断技术主要是通过利用抗原抗体间的特异性反应而开发的一系列病原检测技术,由于该技术具有特异性强、灵敏度高、可快速检测病原等特点,在鱼类疾病诊断中得到广泛应用。张新艳^[38]研究制备了兔抗类志贺邻单胞菌血清,效价为 1:1.28 × 10⁵,并建立了间接 ELISA(酶联免疫吸附实验)检测方法,检测灵敏度为 1.0 × 10⁴ CFU · mL⁻¹,制备的多克隆抗体具有良好的检测特异性,与其它弧菌科水产常见病原菌均无交叉反应,可用于特异性检测类志贺邻单胞菌,为该菌的快速检测和疾病的早期诊断与治疗提供了研究基础。

3 分子生物学检测技术

分子生物学技术是通过鉴定病原核酸来确认病

原体,该方法具有快速、准确、灵敏度高等优点,而传统的细菌鉴定方法费时费力,试验结果稳定性和重复性较差,因此分子生物学检测技术可以起到很好的补充作用。随着 DNA 提取技术的完善、PCR 技术的日益成熟以及各种分子探针标记的发展,由此建立起的以聚合酶链式反应技术(PCR 技术)、核酸杂交技术、序列对比技术及荧光定量 PCR 技术等为代表的多种分子生物学检测方法的应用越发广泛。

DNA 酶和蛋白酶会降低 DNA 的扩增水平,据有关报道甲醛能破坏组织样本中的 DNA 酶和蛋白酶^[39-42]。在 PCR 反应中添加牛血清白蛋白(BSA)可提高 PCR 反应产物的扩增^[43-44],BSA 和 DNA 纯化均略有降低 PCR 抑制,但是,每个 PCR 反应中添加的 BSA 的量应该优化。Levin 等^[45]研究了不同的处理方法(添加甲醛、添加 BSA 和 DNA 纯化)对 PCR 定量检测蛤蚌和牡蛎中类志贺邻单胞菌的影响,研究表明在未富集的蛤蚌组织中检测到类志贺邻单胞菌的水平为 200 CFU/g,而在 PCR 反应或 DNA 纯化体系中加入 0.1% 牛血清白蛋白(BSA),检测水平降低到 60 CFU/g;未富集的牡蛎组织样本对 PCR 反应有明显抑制作用,类志贺邻单胞菌的检测水平为 6×10^5 CFU/g,在牡蛎组织匀浆中加入 4.0% 甲醛后,大大降低了 PCR 抑制,检测水平下降到 6×10^2 CFU/g;DNA 纯化或 BSA 均略微提高了 PCR 的灵敏度,检测水平下降到 2×10^5 CFU/g;甲醛 + BSA、甲醛 + DNA 纯化、甲醛 + BSA + DNA 纯化处理组合,牡蛎组织中类志贺邻单胞菌的检测水平均为 2×10^2 CFU/g。Levin 等^[46]又研究了通过甲醛处理牡蛎组织匀浆、差速离心和包埋有荧光假单胞菌的活性炭处理样品去除 PCR 抑制剂的创新方法,用于实时 PCR 定量检测牡蛎中类志贺邻单胞菌,结果表明甲醛或涂层炭处理牡蛎组织样品均可显著降低 PCR 抑制,先用甲醛处理样品,再用覆膜炭处理牡蛎样品,可进一步降低了 PCR 抑制,使每克样品的最低检测水平为 1×10^3 个基因组目标,相当于每 RT-PCR 检测水平为 25 个基因组目标。

Gonzalez-Rey 等^[47]研究发现类志贺邻单胞菌 23S rRNA 基因(C-906, G-1189)具有较高的变异性,针对该区域设计得两条引物能够区分类志贺邻单胞菌和变形杆菌、弧菌、气单胞菌等在基因上密切相关的细菌种类,利用该引物对水生环境、动物和人类腹泻病例中的类志贺邻单胞菌进行特异性检测效果较好。张新艳等^[48]通过比对已知类志贺邻单胞菌与弧菌属、气单胞菌属的 23S rRNA 序列,设计了类志贺邻单胞菌特异引物 PS23F(5'-CTCCGAAT-

ACCGTAGAGTGCTATCC-3'), PS23R (5'-CTC-CCCTAGCCCAATAACACCTAAA-3'),对类志贺邻单胞菌和弧菌科水产常见致病菌进行特异性扩增,只有类志贺邻单胞菌扩增结果为阳性、其他菌株扩增结果均为阴性。Herrera 等^[49]针对类志贺邻单胞菌 hugA 基因设计了一组特异性引物,研究表明该特异性引物扩增片段长度 435 bp,对鱼肉中类志贺邻单胞菌检测效果较好。孟双等^[50-51]以类志贺邻单胞菌 hugA 基因为靶点,设计了环介导的等温扩增(LAMP)方法,该方法可快速、特异、灵敏地检测类志贺邻单胞菌,对 33 株非类志贺邻单胞菌菌株均未检出,同时该方法的灵敏度比普通聚合酶链反应高 100 倍,是一种快速、灵敏的类志贺邻单胞菌检测方法。

荧光定量 PCR 是通过荧光标记的特异性探针或荧光染料,对 PCR 产物进行标记跟踪,实时在线监控反应过程,结合相应的软件可以对产物进行分析,计算待测样品模板的初始浓度。孟双等^[52]于 2011 年将荧光探针运用到类志贺邻单胞菌的检测,根据类志贺邻单胞菌特异性较高的 23S rRNA 基因 5'端序列设计了 TaqMan 探针,建立了类志贺邻单胞菌实时荧光 TaqMan PCR 快速检测方法,该方法对类志贺邻单胞菌基因组的检测灵敏度为 3×10^{-2} pg/反应体系,该检测体系在检测 30 种其他肠道致病菌时均未产生特异性扩增,该实时荧光 TaqMan PCR 检测体系具有灵敏度高、特异性好、快速等优点。陈智瑾等^[53]采用高灵敏度、低 PCR 抑制性的 EVAGreen 染料代替传统的 SYBR Green I 荧光染料,通过采用自制的选择性增菌液(煌绿肌醇胆盐肉汤)对样品进行短时间前增菌处理后,大大提高了检测灵敏度(达到 25 cfu/10 mL),该方法具有快速、高灵敏度和高特异性以及可应用于复杂样品的优点。严寒秋等^[54]对 31 株经传统生化鉴定为类志贺邻单胞菌的菌株,利用特异性引物和探针对这 31 株菌株的 23S rRNA 基因进行荧光定量 PCR 检测,结果经荧光定量 PCR 检测只有 28 株为类志贺邻单胞菌,研究表明通过生化鉴定和荧光定量 PCR 分子水平鉴定两者的有机结合,不仅能提高类志贺邻单胞菌鉴定的准确性,还能提高其检出率。

4 小 结

由于病原菌种类繁多,形态结构(如有无荚膜和鞭毛)和生理生化特性(如产酸产气等特性)变化较大,因此难以建立一套能针对所有病原菌的检测方法。普遍做法是在分离纯化出病原菌之后,首先

对其进行生理生化特征鉴定,随后再根据之前的结果进行微生物系统和分子生物学检测,综合各项结果才能给出比较信服的结论。笔者于2017年从在西藏拉萨国家农业科技园区水产养殖基地(水温12℃)人工驯养的患病异齿裂腹鱼中也分离到类志贺邻单胞菌。目前对从鱼源类志贺邻单胞菌致病机理的研究较少,但近年来由该菌引起的养殖鱼类患病愈加频繁^[55],给消费者带来了重大的安全隐患,因此在今后有必要在患病鱼类中快速准确鉴定出致病性类志贺邻单胞菌的基础上,还要深入开展该菌致病机理等方面的后续研究,这对明确该菌对鱼类的致病性并控制其传播具有重要意义。在水产养殖中,目前抗生素经常被用来控制微生物性传染病,但抗生素长期大量反复使用,容易造成微生物产生耐药性^[56]。笔者从西藏土著鱼中还分离出 *Micrococcus* sp.、*Microbacterium* sp.、*Penicillium* sp.、*Exiguobacterium* sp.、*Arthrobacter* sp.、*Rhizopus* sp.、*Leptosphacteria* sp.、*Microsphaeropsis* sp.、*Acremonium* sp. 等益生菌^[57],计划后期开展这些菌株对类志贺邻单胞菌的拮抗作用,提取上述分离微生物的次级代谢产物并开展其抑菌活性分析,以期找到对类志贺邻单胞菌具有较好抑制作用的新型活性物质,为传统鱼类抗生素药物的替代及该菌的防治提供研究基础。

参考文献:

- [1] George M G, Julia A B, Timothy G L. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition [M]. New York Berlin Heidelberg: Springer, 2004.
- [2] Carlos G R. Studies on *Plesiomonas shigelloides* Isolated from Different Environments[D]. Uppsala Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.
- [3] 陆文浩, 杨家新, 陈辉, 等. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定[J]. 淡水渔业, 2009, 39(2): 48-53.
- [4] Aquilini E, Merino S, Tomás J M. The *Plesiomonas shigelloides* *wb₀₁* Gene Cluster and the Role of O1-antigen LPS in Pathogenicity [J]. Microbial Pathogenesis, 2013, 63:1-7.
- [5] DE Mindino S S, Marly P N, Ilvan D R. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in Water Environments of Rio de Janeiro city [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1995, 90(1):1-4.
- [6] Krovacek K, Eriksson LM, González-Rey C, et al. Isolation, Biochemical and Serological Characterization of *Plesiomonas shigelloides* from Freshwater in Northern Europe [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2000, 23:45-51.
- [7] 刘志刚, 可小丽, 卢近新, 等. 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 的分离鉴定及其病理学观察 [J]. 微生物学报, 2015, 55(1):96-106.
- [8] 陈霞, 邓泽夷, 陈拱立. 1043 份市售食品类志贺邻单胞菌污染情况调查 [J]. 中国食品卫生杂志, 1991, 4(2): 48-50.
- [9] 张效平, 杨星, 李小义, 等. 江鲢类志贺邻单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 水产科学, 2018, 37(4): 533-538.
- [10] Miller W A, Miller M A, Gardner I A, et al. *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens* and *Plesiomonas shigelloides* in Marine and Freshwater in Vertebrates from Coastal California ecosystems [J]. Microbial Ecology, 2006, 52(2): 198-206.
- [11] 尹昌宏, 黎显明, 徐玉凤, 等. 鱼类中类志贺邻单胞菌携带状况调查 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(1): 40-41.
- [12] 胡钱东, 林强, 石存斌, 等. 草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 2014, 54(2): 229-235.
- [13] Gonzalez R C, Siitonen A, Pavlova A, et al. Molecular Evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a Possible Zoonotic agent [J]. Folia Microbiol, 2011, 56: 178-184.
- [14] Anna M, Jolanta L, Marta K, et al. Core Oligosaccharide of *Plesiomonas shigelloides* PCM 2231 (serotype O17) Lipopolysaccharide—Structural and Serological Analysis [J]. Marine Drugs, 2013, 11(2): 440-454.
- [15] Stock I. *Plesiomonas shigelloides*: An Emerging Pathogen with Unusual Properties [J]. Rev Med Microbiol, 2004, 15: 129-139.
- [16] Kain K C, Kelly M T. Clinical Features, Epidemiology and Treatment of *Plesiomonas shigelloides* Diarrhea [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(5): 998-1001.
- [17]  rjan O, Kaye W, Bradford K, et al. Laboratory Observations on *Plesiomonas shigelloides* Strains Isolated from Children with Diarrhea in Peru [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(5): 886-889.
- [18] Shah N, DuPont H L, Ramsey D J. Global Etiology of Travelers' Diarrhea; Systematic Review from 1973 to the Present [J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2009, 80(4): 609-614.
- [19] Khan A M, Faruque A S G, Hossain M S, et al. *Plesiomonas shigelloides*-associated Diarrhea in Bangladeshi Children: a hospital-based Surveillance Study [J]. Journal of Tropical Pediatrics, 2004, 50(6): 354-356.
- [20] Mandal B K, Whale K, Morrison B C. Acute Colitis Due to *Plesiomonas shigelloides* [J]. British Medical Journal, 1982, 285:1539-1540.
- [21] Billiet J, Kuypers S, Van Lierde S, et al. *Plesiomonas shigelloides* Meningitis and Septicaemia in a Neonate; Report of a Case and Review of the Literature [J]. The Journal of Infection, 1989, 19(3): 267-271.
- [22] Ozdemir O, Sari S, Terzioğlu S, et al. *Plesiomonas shigelloides* sepsis and meningoencephalitis in a surviving neonate [J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2010, 43(4): 344-346.
- [23] Delforge M L, Devriendt J, Glupczynski Y, et al. *Plesiomonas shigelloides* Septicemia in a Patient with Primary Hemochromatosis [J]. Clinical Infectious Diseases, 1995, 21(3): 692-693.
- [24] Schneider F, Lang N, Reibke R, et al. *Plesiomonas shigelloides* Pneumonia [J]. Medecine et Maladies Infectieuses, 2009, 39(6): 397-400.
- [25] Miller M L, Koburger J A. Evaluation of Inositol Brilliant Green Bile Salts and *Plesiomonas* Agars for Recovery of *Plesiomonas shigelloides* from Aquatic Samples in a Seasonal Survey of the Suwannee river Estuary [J]. Journal of Food Protect, 49(4): 274-277.
- [26] Levin R E. *Plesiomonas shigelloides*-An Aquatic Food Borne Patho-

- gen: a Review of Its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, and Molecular Detection[J]. Food Biotechnology, 2008, 22:189–202.
- [27] Freund S M, Koburger J A, Wei C I. Enhanced Recovery of *Plesiomonas shigelloides* Following an Enrichment Technique[J]. Journal of Food Protection, 1988, 51(2):110–112.
- [28] Huq A, Akhtar A, Chowdhury M A, et al. Optimum Growth Temperature for the Isolation of *Plesiomonas shigelloides* Using Various Selective and Differential Agars[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1991, 37:800–802.
- [29] 李槿年. 类志贺邻单胞菌分离培养的研究[J]. 肉品卫生, 1996(9):1–3.
- [30] 王素秋, 杨桂文, 周正亮, 等. 类志贺邻单胞菌检测的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1993, 3(5):291–293.
- [31] 杨芳园. 养殖花鳗鲡与太平洋双色鳗鲡主要病原菌的研究[D]. 厦门:集美大学, 2013:7.
- [32] 李槿年, 江定丰, 李琳, 等. 28株水产动物致病菌的编码鉴定[J]. 水利渔业, 2004, 24(2):62–64.
- [33] 吕小丽, 邓小红, 牛志伟, 等. 养殖型吉富罗非鱼暴发性死亡的病原菌分离鉴定及药敏测定[J]. 广西畜牧兽医, 2016, 32(5):230–233.
- [34] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病原菌的分离检测及其致病性研究[D]. 上海:东华大学, 2014:23.
- [35] 时少坤, 冯卫权, 邓国华, 等. 黑莓鲈一种致病菌的发现及分离鉴定[J]. 水产养殖, 2016, 46(13):126–128.
- [36] 曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 等. 鲟细菌性败血综合征致病菌的初步研究[J]. 淡水渔业, 2007, 37(2):53–56.
- [37] 赖晓健, 杨方园, 李忠琴. 太平洋双色鳗鲡(*Anguilla bicolor pacifica*)致病性类志贺邻单胞菌的鉴定和中药敏感性研究[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6):1185–1192.
- [38] 张新艳. 类志贺邻单胞菌间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 福建水产, 2014, 36(4):253–257.
- [39] O'Leary T J. Reducing the Impact of Endogenous Ribonucleases on Reverse Transcription-PCR Assay Systems[J]. Clinical Chemistry, 1999, 45(4):449–450.
- [40] Bak P M, Panos R J. Protease Antigen Recovery Decreases the Specificity of Bromodeoxyuridine Detection in Formalin-fixed Tissue[J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1997, 45(8):1165–1170.
- [41] Hubal E A, Schlosser P M, Conolly R B, et al. Comparison of Inhaled Formaldehyde Dosimetry Predictions with DNA-protein cross-link Measurements in the Rat nasal Passages[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1997, 143(1):47–55.
- [42] Toth J, Biggin M D. The Specificity of Protein-DNA Cross-linking by Formaldehyde: in vitro and in *Drosophila* Embryos[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(2):e4.
- [43] Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(12):4463–4470.
- [44] Forbes B A, Hicks K E. Substances Interfering with Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by PCR: Effects of Bovine Serum Albumin[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(9):2125–2128.
- [45] Gu W M, Levin R E. Quantitative Detection of *Plesiomonas shigelloides* in Clam and Oyster Tissue by PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(1):81–86.
- [46] Gu W M, Levin R E. Innovative Methods for Removal of PCR Inhibitors for Quantitative Detection of *Plesiomonas shigelloides* in oysters by Real-Time PCR[J]. Food Biotechnology, 2008, 22(1):98–113.
- [47] González-Rey C, Svenson S B, Bravo L, et al. Specific Detection of *Plesiomonas shigelloides* Isolated from Aquatic Environments, Animals and Human Diarrhoeal Cases by PCR Based on 23S rRNA gene[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2000, 29(2):107–113.
- [48] 张新艳, 樊海平, 曾占壮. 草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分子鉴定及快速检测[J]. 福建农业学报, 2013, 28(7):634–638.
- [49] Herrera F C, Santos J A, Otero A, et al. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in Displayed Portions of Saltwater Fish Determined by a PCR Assay Based on the *hugA* gene[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(2):233–238.
- [50] Meng S, Xu J G, Xiong Y W, et al. Rapid and Sensitive Detection of *Plesiomonas shigelloides* by Loop-mediated Isothermal Amplification of the *hugA* Gene[J]. PloS One, 2012, 7(10):e41978.
- [51] Meng S, Wang Y, Wang Y, et al. Rapid and Sensitive Detection of *Plesiomonas shigelloides* by Cross-priming Amplification of the *hugA* Gene[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(6):5443–5450.
- [52] 孟双, 王艳, 白雪梅, 等. 类志贺邻单胞菌实时荧光 TaqMan PCR 快速检测体系的建立[J]. 疾病监测, 2011, 26(11):906–910.
- [53] 陈智瑾, 廖虹瑜, 杨晶艳, 等. EVAGreen 实时荧光定量 PCR 检测类志贺邻单胞菌的方法建立[J]. 现代预防医学, 2012, 39(23):6234–6237.
- [54] 严寒秋, 张新, 黄瑛, 等. 类志贺邻单胞菌的荧光定量 PCR 检测及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(20):2889–2891+2895.
- [55] Pekala S A. Contemporary Threats of Bacterial Infections in Freshwater Fish[J]. Journal of Veterinary Research, 2018, 62(3):261–267.
- [56] Saenz J S, Marques T V, Barone R S C, et al. Oral Administration of Antibiotics Increased the Potential Mobility of Bacterial Resistance Genes in the Gut of the Fish *Piaractus mesopotamicus*[J]. Microbiome, 2019, 7(1):24–37.
- [57] 陈美群, 潘瑛子, 牟振波, 等. 西藏 3 种冷水鱼皮肤病灶中潜在病原微生物分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(9):2245–2252.