

# ỨNG DỤNG SO SÁNH GENOME TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH THỦY SẢN

Nguyễn Thành Luân<sup>1</sup>

## APPLICATION OF COMPARATIVE GENOME IN AQUACULTURE DISEASES DIAGNOSIS

Nguyen Thanh Luan<sup>1</sup>

**Tóm tắt** – Sự phát triển bền vững của ngành nuôi trồng thủy sản đóng vai trò rất quan trọng đối với an ninh lương thực toàn cầu và phúc lợi kinh tế. Tuy nhiên, sự phát triển đa dạng của các nhóm vi khuẩn gây bệnh đang đặt ra một thách thức lớn cho sự phát triển các phương pháp kiểm soát sinh học bền vững. Những tiến bộ gần đây trong công nghệ giải trình tự bộ gen kết hợp với kỹ thuật sinh tin học đang trở thành một công cụ hiệu quả ứng dụng cho các nghiên cứu về bệnh thủy sản. Do đó, việc sử dụng các phương pháp so sánh bộ gen thường quy sẽ cung cấp thông tin đa dạng về sự phát sinh loài và xu hướng tiến hóa có thể của các tác nhân vi sinh gây bệnh thủy sản, làm sáng tỏ các cơ chế gây bệnh, cũng như khảo sát các cơ chế lây truyền mầm bệnh qua các thang dịch tễ học. Trong phân tích này, chúng tôi tổng hợp các kết quả và ứng dụng các phương pháp so sánh genome thao tác trên dữ liệu

vi khuẩn gây bệnh thủy sản, bao gồm chi *Vibrio* và *Edwardsiella* với mục tiêu hướng đến các phương pháp phân tích hiện đại trong kiểm soát bệnh do vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Cụ thể, việc thực hiện so sánh bộ gen của các nhóm vi khuẩn gây bệnh thủy sản có thể: (i) xác định lại các chủng vi khuẩn trước đây đã định danh sai với độ chính xác cao và phát hiện các phân lập mới có liên quan đến độc lực gây chết cao; (ii) phát triển phương pháp thường quy pan-PCR dựa vào biomarkers có khả năng nhận diện chính xác các phân lập từ mẫu lâm sàng; và cuối cùng (iii) phục vụ cho các nghiên cứu vaccine theo công nghệ vaccine đảo ngược hướng tới phòng ngừa nhiều bệnh trên động vật thủy sản.

**Từ khóa:** bệnh thủy sản, dịch tễ học, genome, kháng kháng sinh, phylogenomics.

**Abstract** – The sustainability of aquaculture industry is critical both for global food security and economic welfare. However, the massive wealth of pathogenic bacteria poses a key challenge to the development of a sustainable bio-control method. Recent advances in genome sequencing study combined

<sup>1</sup>Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Trường Đại học Công nghệ TP.HCM

Ngày nhận bài: 23/9/2020; Ngày nhận kết quả bình duyệt: 25/12/2020; Ngày chấp nhận đăng: 30/12/2020

Email: [nt.luan@hutech.edu.vn](mailto:nt.luan@hutech.edu.vn)

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Institute of Applied Science, Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH)

Received date: 23<sup>rd</sup> September 2020; Revised date: 25<sup>th</sup> December 2020; Accepted date: 30<sup>th</sup> December 2020

with pan-genome analysis can be an efficacious management applied to numerous aquatic pathogens. Thus, routine comparative genome analyses of aquatic pathogens will deduce the phylogenomic diversity and possible evolutionary trends of aquatic bacterial pathogen strains, elucidate the mechanisms of pathogenesis, as well as estimate patterns of pathogen transmission across epidemiological scales. This study also reviews comparative pan-genome analysis with a particular focus on controlling aquatic diseases, especially for: (i) re-identifying the previously misidentified strain with high accuracy and discovering novel isolates that may be associated with high rate of fish mortalities, (ii) developing routine pan-PCR based on highly informative identified genetic targets that are capable of distinguishing all the clinical isolates, and finally (iii) studying the multivalent vaccine following reverse vaccinology towards the prevention of numerous aquatic animal diseases.

**Keywords:** antibiotic resistance, epidemiology, aquaculture diseases, genome, phylogenomics.

## I. DỮ LIỆU TRÌNH TỰ BỘ GEN PHÂN LẬP TỪ VI KHUẨN THỦY SẢN

Theo các báo cáo gần đây, các nhóm vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ môi trường thủy sản đang thu hút sự tham gia của các nghiên cứu sinh tin học. Hai nhóm vi khuẩn gây bệnh chính đã được xác định là nguyên nhân gây bệnh cho động vật thủy sản. Các nhóm vi khuẩn Gram âm gồm *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Photobacterium*, *Piscirickettsia*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Weisella* và *Yersinia*. Đây là

tác nhân gây bệnh chính đến ngành nuôi trồng thủy sản. Các vi khuẩn Gram dương thường được tìm thấy trong bệnh thủy sản bao gồm các chi: *Lactococcus*, *Streptococcus* và *Renibacterium salmoninarum*, một thành viên của họ Micrococcaceae [1], [2]. Tác nhân gây bệnh của những vi khuẩn gây bệnh này được mô tả trong các nghiên cứu tổng quan gần đây [3], [4]. Khả năng gây bệnh do vi khuẩn tồn tại trong môi trường nước độc lập với vật chủ, đặc biệt, khi nhiệt độ nước tăng. Các vi khuẩn không triệu chứng này là một phần của hệ vi sinh vật bình thường (sự cân bằng hệ vi sinh vật) và có thể xảy ra ở các loài cá nuôi. Điều này dẫn đến việc theo dõi và quản lý dịch bệnh rất phức tạp. Hơn nữa, hầu hết các mối đe dọa và thách thức đối với sức khỏe và an ninh quốc gia là do các vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh gây ra. Do đó, các hợp chất kháng khuẩn mới cần phải thường xuyên được thay thế trong quá trình phát triển hóa trị liệu. Vì vậy, các chiến lược bền vững để kiểm soát nhiễm do vi khuẩn cần tập trung vào cả việc giảm thiểu sự lây lan và tránh các điều kiện kích hoạt quá trình chuyển đổi gây mất cân bằng hệ sinh vật [5]. Các phương pháp kết hợp trong quản lý hoặc tăng cường để bảo vệ các vật chủ dưới nước cần ưu tiên phát triển. Ví dụ, việc sử dụng các hợp chất/yếu tố ức chế sự biểu hiện gene độc lực hoặc làm gián đoạn các con đường dẫn truyền tín hiệu của tác nhân gây bệnh sẽ là liệu pháp bền vững tương lai [6]. Do đó, những hiểu biết sâu sắc về độc lực và cơ chế phân tử của tác nhân có khả năng gây bệnh là thông tin rất quan trọng.

Việc công bố dữ liệu trình tự bộ gen vi khuẩn có nguồn gốc từ thủy sản đã tạo ra một cuộc cách mạng và đóng một vai

trò quan trọng trong việc kiểm soát sự lây lan của bệnh truyền nhiễm cũng như phát triển các phương pháp điều trị vi khuẩn kháng kháng sinh. Trình tự bộ gen đã cho phép xác định nhanh chóng và chính xác các tác nhân gây bệnh như *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* [7], *E. tarda* [8] và *V. anguillarum* [9], cũng như cung cấp những hiểu biết sâu sắc về các con đường tiến hóa và thích nghi với vật chủ. Ngoài ra, các công cụ so sánh bộ gen có thể phân biệt mức độ đa dạng của vi khuẩn phân lập từ các nguồn gốc khác nhau [10]. Do đó, sự phát triển của công cụ tin sinh học góp phần quan trọng vào nghiên cứu phân loại, ví dụ *Aeromonas* và *Vibrio* là một chi đặc biệt thách thức về mặt phân loại với nhiều tác nhân gây bệnh thủy sản [11], [12].

## II. SO SÁNH BỘ GEN CỦA CÁC LOÀI THUỘC CHI VIBRIO

Holm et al. [13] gần đây đã giải trình tự bộ gen cho 07 chủng *Vibrio anguillarum*, một loại vi khuẩn gây bệnh tụ huyết trùng (hay Vibriosis) ở các loài thủy sản biển, bao gồm cá, động vật thân mềm và giáp xác [14]. Loài gây bệnh này chứa các cụm gen lặp lại (VAR: *Vibrio anguillarum repeats*) rất đa dạng. Các cụm gen này hầu hết có chức năng không rõ, nhưng cũng giống như vi khuẩn gây bệnh tả *Vibrio cholera*, chúng có thể tham gia vào quá trình biến đổi cơ chất hoặc tương tác với các yếu tố độc lực và biến đổi DNA [15].

Để làm sáng tỏ các đặc điểm gây bệnh của *A. veronii* 17ISAe, các đồng nghiệp của chúng tôi gần đây đã tiến hành so sánh bộ gen của chủng 17ISAe [16]. Chủng này được phân lập từ cá cảnh bị bệnh nhập khẩu và mang các gen kháng kháng sinh (ARG). Các gen này được phân lập bằng

cách sử dụng bộ định danh gen kháng thuốc thông qua cơ sở dữ liệu về các gen kháng kháng sinh và phân tích chú giải gen độc lực dựa trên cơ sở dữ liệu các yếu tố độc lực (VFDB). Nghiên cứu chỉ ra rằng, chủng 17ISAe được xác định là nguồn lây truyền ARG nguy hiểm cho các loài vi khuẩn “bản địa” vì chúng mang các ARG khác nhau như class 1 integrons, class 1 transposons và các gen độc lực tích hợp vào bộ gen của chúng. Rõ ràng, độc lực và đặc điểm kiểu gen không phải lúc nào cũng liên quan đến đặc điểm kiểu hình của các loài gây bệnh như *V. anguillarum* [17].

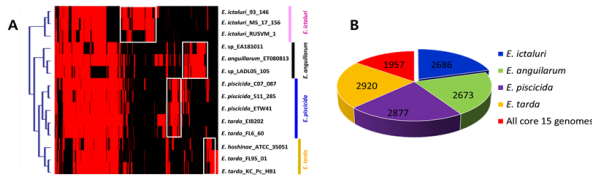
Độc lực ở *V. anguillarum* được định nghĩa là “đa yếu tố” vì nó không thể được quy cho một hoặc một vài yếu tố độc lực [18]. Không có sự khác biệt về số lượng gen mã hóa các sản phẩm liên quan đến hệ thống “virulence, disease and defence” trong phân tích RAST, một công cụ chú giải chức năng gen, được phát hiện ra các chủng vi khuẩn gây độc hoặc không độc lực của 15 loài *Vibrio anguillarum*. Tuy nhiên, một số khác biệt được tìm thấy khi so sánh bộ gen của các chủng *V. anguillarum*, bao gồm các gen mã hóa cho các sản phẩm của hệ thống bơm đẩy đa kháng thuốc (43 – 47 trong số 65 – 73 gen thuộc về “độc lực, gây bệnh và hệ phòng thủ”) và các gen thuộc hệ thống phụ “toxins and super antigens”. Những gen này phù hợp với các phát hiện liên quan đến sự kháng kháng sinh phổ rộng của các chủng *V. anguillarum* [14]. Việc so sánh bộ gen cho thấy rằng, cả hai chủng *V. anguillarum* độc lực (CNEVA NB11008 avir, VIB113 vir và JLL143 vir) và không độc lực (VIB12avir) đều mang các gen liên quan đến việc hấp thu và sử dụng nhân heme. Do đó, sự hiện diện của

các gen độc lực đặc hiệu có thể không giải thích cho độc lực ở một số chủng *V. anguillarum* [18]. So sánh bộ gen có vai trò rất quan trọng trong việc làm sáng tỏ sự hiện diện/vắng mặt của các gen trong các chủng phân tích. Cách tiếp cận này cũng có thể giúp phân biệt giữa các đặc điểm kiểu hình và kiểu gen của các chủng gây bệnh, cho phép hiểu sâu hơn về cơ chế độc lực và sự biểu hiện của các gen tương ứng thông qua phiên mã, di truyền học biểu sinh về sự tương tác giữa vật chủ và tác nhân gây bệnh hoặc hiểu rõ vùng khởi động của chúng.

### III. ỨNG DỤNG SO SÁNH BỘ GEN EDWARDSIELLA: PHÁT HIỆN NHANH VÀ SẢN XUẤT VACCINE

Dựa trên kết quả phân tách các nhóm gen trong phân tích pan-genome (như Hình 1), các chú thích chức năng gen mục tiêu có thể được phân tích riêng với cơ sở dữ liệu về độc lực (Virulence Factors Database – VFDB), nhóm chức năng gen (Clusters of Orthologous Groups – COG), con đường chuyển hóa (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG) và kháng kháng sinh (Antibiotic Resistance Genes Database – ARGB). Ngoài ra, các nhóm gen phân tách có thể được sử dụng cho các phân tích về cấu trúc protein sản phẩm như bề mặt tế bào (SEP), bao gồm các protein màng ngoài và protein ngoại bào. Các gen dự đoán này đóng vai trò là vaccine ứng cử viên trong mô hình động vật (được gọi là vaccine đảo ngược) [19]. Trong nuôi trồng thủy sản, SEPs từ tác nhân gây bệnh bao gồm một số yếu tố độc lực chính đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh bệnh của vi khuẩn và phản ứng miễn dịch của vật chủ. Ví

dụ, sự biểu hiện của *esa1* từ *Edwardsiella tarda*, một kháng nguyên bề mặt giống D15, trong mô hình cá bơn Nhật Bản kích thích sự biểu hiện của một loạt gen liên quan đến cả khả năng miễn dịch tự nhiên và đặc hiệu, cũng như tăng cao khả năng sống của cá và tạo ra các kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh [20], [21]. Tiêm vaccine có thành phần SEPs có tác dụng bảo vệ chống lại nhiễm *A. hydrophila* [22], [23], *Flavobacterium columnare* [24], [25], *Pseudomonas putida* [26], và *Edwardsiellosis* [27] - [29]. Nghiên cứu gần đây của Zeng et al. [30] đã triển khai kết hợp so sánh hệ gen để sàng lọc các gen SEPs từ 17 chủng *Leptospira* đại diện cho các kiểu huyết thanh dịch tễ từ khắp nơi trên thế giới. Kết quả xác định được 118 kháng nguyên ứng viên mới cùng với một số kháng nguyên protein màng ngoài và lipoprotein đã biết. Với sự gia tăng nhanh chóng về số lượng trình tự bộ gen của các tác nhân gây bệnh thủy sản, chúng sẽ cho phép các nhà nghiên cứu phát triển các quy trình kiểm soát nhiễm khuẩn nhằm phản ứng nhanh với dịch bệnh. Cụ thể, so sánh hệ gen kết hợp thực hiện công nghệ phát triển vaccine là một xu hướng tiềm năng để nghiên cứu vi khuẩn gây bệnh thủy sản, cải thiện hiệu quả phòng bệnh của các vaccine trên cá nuôi thông qua việc phản ứng chéo với các kiểu huyết thanh khác nhau của tác nhân gây bệnh và ngăn chặn sự bùng phát dịch bệnh khi kết hợp thực hiện phân tích bộ gen.



Hình 1: Hình biểu diễn kết quả so sánh hệ gen của các loài trong chi *Edwardsiella* (A) và các gene lõi tách ra từ kết quả phân tích so sánh hệ gen (B)

Hơn nữa, việc phân tích sự đa hình của các gen phân tán giữa các chủng khảo sát (ví dụ *Edwardsiella*, Hình 1) sẽ cung cấp thông tin rất có giá trị về các biện pháp kiểm soát đặc hiệu của loài đối với bệnh. Ví dụ, sự hiện diện/vắng mặt của gen (khung trắng trong Hình 2A) có thể chỉ ra những dữ liệu phân tử cho các phương pháp định danh chính xác tác nhân gây bệnh, đặc biệt trong phân biệt các loài mới (*E. tarda* [31], [32]). Trong các phân tích tiếp theo, sự kết hợp giữa định danh theo kiểu hình, kiểu huyết thanh bằng kháng huyết thanh và sự khác biệt về các gen thành phần bằng các phân tích bổ sung như phân tích KEGG/COG, VFDB, ARG và hệ thống RAST sẽ giúp tìm ra những hiểu biết mới về sự tiến hóa của quá trình phát sinh bệnh cũng như khảo sát các mục tiêu đặc hiệu trong phát triển thuốc theo loài gây bệnh. Cuối cùng, một phương pháp PCR thường quy sử dụng các mục tiêu di truyền tính phân biệt cao (pan-PCR) được xác định qua phân tích tính đa hình của gen phân tán [33]. Đây sẽ là một công cụ thường xuyên và hiệu quả trong phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh thủy sản.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Austin B, Austin DA. *Bacterial fish pathogens - disease of farmed and wild fish*. 5th ed. Dordrecht: Springer; 2012.
- [2] Henrik Hasman, Dhany Saputra, Thomas Sicheritz-Ponten, Ole Lund, Christina Aaby Svendsen, Niels Frimodt-Moller, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52(8):3136. DOI: 10.1128/JCM.01369-14.
- [3] Sion C. Bayliss, David W. Verner-Jeffreys, Kerry L. Bartie, David M. Aanensen, Samuel K. Sheppard, Alexandra Adams, Edward J. Feil. The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Front Microbiol*. 2017; 8:121. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00121.
- [4] Pridgeon Julia W, Phillip H Klesius. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*. 2012. DOI: 10.1079/PAVSNNR20127048.
- [5] Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015; 26:26191. DOI: 10.3402/mehd.v26.26191.
- [6] Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14(3):251–8. DOI: 10.1016/j.mib.2011.03.004.

- [7] Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, et al. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*. 2008; 9:427. DOI: 10.1186/1471-2164-9-427.
- [8] Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y, et al. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS One*. 2009; 4(10):e7646. DOI: 10.1371/journal.pone.0007646.
- [9] Naka H, Dias GM, Thompson CC, Dubay C, Thompson FL, Crosa JH. Complete genome sequence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* harboring the pJM1 virulence plasmid and genomic comparison with other virulent strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. *Infect Immun*. 2011; 79(7):2889–900. DOI: 10.1128/IAI.05138-11.
- [10] Chaudhry V, Prabhu BP. Genomic investigation reveals evolution and lifestyle adaptation of endophytic *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific Reports*. 2016; 6: 19263. DOI:10.1038/srep19263.
- [11] Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *mBio*. 2014; 5(6):e02136. DOI: 10.1128/mBio.02136-14.
- [12] Antony T Vincent, Mélanie V Trudel, Luca Freschi, Vandana Nagar, Cynthia Gagné-Thivierge, Roger C Levesque, et al. Increasing genomic diversity and evidence of constrained lifestyle evolution due to insertion sequences in *Aeromonas salmonicida*. *BMC Genomics*. 2016; 17:44. DOI:10.1186/s12864-016-2381-3.
- [13] Holm KO, Bækkedal C, Söderberg JJ, Haugen P. Complete Genome Sequences of Seven *Vibrio anguillarum* Strains as Derived from PacBio Sequencing. *Genome Biology and Evolution*. 2018; 10(4):1127–1131. DOI:10.1093/gbe/evy074.
- [14] Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*. 2011; 34(9):643–61.
- [15] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Biskri L, Bouige P, Mazel D. Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae*. *Genome Res*. 2003;13(3):428–442. DOI:10.1101/gr.617103.
- [16] Roh HJ, Kim BS, Kim A, Kim NE, Lee Y, Chun WK, et al. Whole-genome analysis of multi-drug-resistant *Aeromonas veronii* isolated from diseased discus (*Symphysodon discus*) imported to Korea. *Journal of Fish Diseases*. 2019; 42(1):147–153. DOI: 10.1111/jfd.12908.
- [17] Ingeborg Frans, Kristof Dierckens, Sam Crauwels, Ado Van Assche, Jorgen Leisner, Marianne H. Larsen, et al. Does virulence assessment of *Vibrio anguillarum* using sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae correspond with genotypic and phenotypic characterization?. *PLoS One*. 2013; 8(8):e70477. DOI: 10.1371/journal.pone.0070477
- [18] Busschaert P, Frans I, Crauwels S, Zhu

- B, Willems K, Bossier P, et al. Comparative genome sequencing to assess the genetic diversity and virulence attributes of 15 *Vibrio anguillarum* isolates. *Journal of Fish Diseases*. 2015; 38(9):795–807. DOI: 10.1111/jfd.12290.
- [19] Domenico Maione, Immaculada Margarit, Cira D. Rinaudo, Vega Masignani, Marirosa Mora, Maria Scarselli, et al. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*. 2005; 309(5731):148–150. DOI: 10.1126/science.1109869.
- [20] Sun Y, Liu C, Sun L. Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding a D15-like surface antigen. *Fish Shellfish Immunol*. 2011; 30(1):273–9. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.10.020
- [21] Sun Y, Liu CS, Sun L. Identification of an *Edwardsiella tarda* surface antigen and analysis of its immunoprotective potential as a purified recombinant subunit vaccine and a surface-anchored subunit vaccine expressed by a fish commensal strain. *Vaccine*. 2010; 28(40):6603–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.050.
- [22] Khushiramani RM, Maiti B, Shekar M, Girisha SK, Akash N, Deepanjali A, et al. Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. *Res Microbiol*. 2012; 163(4):286–91. DOI: 10.1016/j.resmic.2012.03.001.
- [23] Maiti B, Shetty M, Shekar M, Karunasagar I, Karunasagar I. Evaluation of two outer membrane proteins, Aha1 and OmpW of *Aeromonas hydrophila* as vaccine candidate for common carp. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012; 149(3-4):298–301. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.07.013.
- [24] Luo Z, Fu J, Li N, Liu Z, Qin T, Zhang X, et al. Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture and Fisheries*. 2016; 1:1–8. DOI: 10.1016/j.aaf.2016.10.002
- [25] Luo Z, Liu Z, Fu J, Zhang Q, Huang B, Nie P. Immunogenicity and protective role of antigenic regions from five outer membrane proteins of *Flavobacterium columnare* in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Chin J Oceanol Limnol*. 2016; 34(6):1247–57. DOI: 10.1007/s00343-016-5096-z
- [26] Mao Z, Ye J, Li M, Xu H, Chen J. Vaccination efficiency of surface antigens and killed whole cell of *Pseudomonas putida* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol*. 2013; 35(2):375–81. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.030.
- [27] Castro N, Toranzo AE, Núñez S, Magariños B. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2008; 25(3):208–212. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.05.008.
- [28] Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*. 2004; 22(25-26):3411–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.026.
- [29] Seong Bin Park, Ho Bin Jang, Seong Won

- Nho, In Seok Cha, Jun-ichi Hikima, Maki Ohtani, et al. Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17629. DOI: 10.1371/journal.pone.0017629.
- [30] LingBing Zeng, Dongliang Wang, NiYa Hu, Qing Zhu, Kaishen Chen, Ke Dong, et al. A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis. *Front Microbiol*. 2017; 8:396. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00396.
- [31] Buján N, Mohammed H, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Arias CR, et al. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Syst Appl Microbiol*. 2018; 41(1):30–37. DOI: 10.1016/j.syapm.2017.09.004.
- [32] Fogelson SB, Petty BD, Reichley SR, Ware C, Bowser PR, Crim MJ, et al. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2016; 28(3):338–44. DOI: 10.1177/1040638716637639.
- [33] Joy Y. Yang, Shelise Brooks, Jennifer A. Meyer, Robert R. Blakesley, Adrian M. Zelazny, Julia A. Segre, et al. Pan-PCR, a computational method for designing bacterium-typing assays based on whole-genome sequence data. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(3):752–758. DOI: 10.1128/JCM.02671-12.