夏理海,罗　凯,李由申,等. 黑斑蛙“白内障(歪头)”病原诊断及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):174 – 176.
doi:10.15889/j. issn. 1002 – 1302. 2018. 08. 042

黑斑蛙“白内障(歪头)”病原诊断及药敏试验

夏理海[1], 罗　凯[1], 李由申[1], 韩盼盼[1], 黎　明[1], 郜卫华[1], 许巧情[1,2], 胡　伟[1,2]
(1. 长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心,湖北荆州 434025; 2. 长江大学动物科学学院,湖北荆州 434025)

摘要:为探明湖北松滋鑫满塘生态养殖公司患病黑斑蛙的致病病原,采用营养琼脂培养基分离纯化,并用 16S rRNA 基因序列分析方法及系统发育树分析方法对其进行细菌分离检测。同时,采用 10 种抗菌药物对其进行药敏试验。结果表明,从典型患病黑斑蛙中分离出 1 株菌株,经 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树综合分析,确定该菌株为肺炎克雷伯菌。该菌对诺氟沙星、头孢曲松、氧氟沙星、环丙沙星及丁胺卡纳等 5 种药物敏感;对多黏菌素 B 和四环素等 2 种药物中度敏感;对万古霉素、复方新诺明及多西环素 3 种药物耐药。研究确定该例黑斑蛙死亡原因为感染肺炎克雷伯菌,并以药敏试验提供参考,为养殖户下一年生产和病害防治提供可靠依据。

关键词:黑斑蛙;肺炎克雷伯菌;分离鉴定;16S rRNA;药敏试验
中图分类号:S947.2　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1002 – 1302(2018)08 – 0174 – 03

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)为革兰氏阴性菌,隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)克雷伯菌属(*Klebsiella*),由 Friendiander 于 1893 年从患大叶性肺炎病人的肺组织中首次分离到[1]。该细菌广泛分布于自然界,近年来成为仅次于大肠杆菌的最重要的条件致病菌[2-4]。该菌最适生长温度为 37 ℃,最适 pH 值为 7.0 ~ 7.6[1]。肺炎克雷伯菌可在全身各部位发生感染,可引起肺炎、脑膜炎、肝脓肿、眼内炎等,且发病死亡率极高[5]。

黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)俗称田鸡、青蛙,属蛙科侧褶蛙属的两栖动物,广泛分布于我国各地区(除海南、云南、台湾地区)[6]。野生黑斑蛙为国家二级保护动物,以稻田、水塘等水域为繁殖生存和捕食活动的主要场所[7]。目前,我国黑斑蛙人工养殖处于起步阶段,属于朝阳产业,市场前景广阔[8]。但随着养殖规模的扩大、集约化程度的不断提高,其疾病也频繁发生。已有报道称,藤黄葡萄球菌、浅黄假单胞菌和气单胞菌可引起牛蛙的歪头病和白内障病[9-10],布氏柠檬酸杆菌和脑膜炎败血金黄杆菌可引起棘胸蛙的白内障病和歪头病[11-12],脑膜炎败血黄杆菌可引起虎纹蛙的白内障病[13],金黄色葡萄球菌可引起棘腹蛙的白内障病等[14]。但是,对黑斑蛙相关疾病的研究少见报道。本研究采用 16S rRNA 基因同源性分析法和系统发育树分析法对湖北松滋鑫满塘生态养殖公司发病黑斑蛙进行病原菌分离、鉴定,旨在为该病的确诊和防治提供依据。

1　材料与方法

1.1　病蛙的来源

患病黑斑蛙于 2016 年 9 月 15 日从湖北松滋鑫满塘生态养殖公司稻、鳅、蛙连作基地取回,体质量为 100 ~ 150 g/只。

1.2　主要试剂

牛肉膏蛋白胨肉汤培养基(LB)、诺氟沙星、多粘菌素 B、头孢曲松、万古霉素、复方新诺明、氧氟沙星、四环素、多西环素、环丙沙星、丁胺卡纳等 10 种抗菌药物药敏纸片,购自杭州微生物有限公司;dNTP(2.5 mmol/L)、Easy*Taq* 酶(5 U/μL)、10 × Easy *Taq* Buffer(1.2 mL),均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3　细菌的分离与培养

取典型白内障病黑斑蛙,在无菌环境中分别从其皮肤、眼、肝、肺、胃、肠和心取材,并置于 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL LB 液体培养基,用组织匀浆机将样品搅碎,1 200 r/min 短暂离心取上清进行 LB 培养基平板划线分离,37 ℃、200 r/min 培养 12 ~ 24 h,挑选单菌落进行纯化培养和鉴定。

收稿日期:2016 – 11 – 25
基金项目:湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题(编号:KF201608)。
作者简介:夏理海(1992—),男,湖北孝感人,硕士,主要从事名特水产养殖研究。E – mail:Laoxia_1993@163. com。
通信作者:胡　伟,男,博士,讲师,研究方向为鱼类营养与免疫学。E – mail:huwei19872006@163. com。

[17] Lordelo M M, Calhoun M C, Dale N M, et al. Relative toxicity of gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens[J]. Poultry Science, 2007, 86(3): 582 – 590.
[18] 于金鑫. 一起鸡棉粕中毒的诊疗过程和体会[J]. 新农业, 2016(5): 40.
[19] Lordelo M M, Davis A J, Calhoun M C, et al. Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers[J]. Poultry Science, 2005, 84(9): 1376 – 1382.
[20] Nie C X, Zhang W J, Wang Y Q, et al. Tissue lipid metabolism and hepatic metabolomic profiling in response to supplementation of fermented cottonseed meal in the diets of broiler chickens[J]. Journal of Zhejiang University – Science B, 2015, 16(6): 447 – 455.
[21] 周媛媛, 朱　泉, 陈生琴, 等. 瘤胃微生物发酵棉粕对肉鸭生产性能的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(7): 24 – 28.
[22] 刘长忠, 刘兴友, 胡建和, 等. 发酵棉仁粕对生长鹅生长性能和消化酶活性的影响[J]. 中国家禽, 2015, 37(11): 27 – 31.

1.4　病原菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

在无菌环境下，挑取单克隆到 1.5 mL EP 管中并加入 1 mL LB 液体培养基，37 ℃、200 r/min 培养 12～24 h，待菌液浑浊后于 1 200 r/min 短暂离心弃上清，以 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增，扩增体系采用 25 μL 的反应体系，其扩增程序如下：95 ℃ 10 min；95 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min 30 s，共进行 32 个循环；72 ℃ 延伸 10 min，4 ℃ 保存。PCR 扩增产物使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后交由武汉擎科生物工程有限公司进行序列测定。将测序得到的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析，选取同源性较高的序列在 MEGA 5.1 软件上完成序列的比对和系统发育树的构建。

1.5　病原菌的特异性检测

病原菌测序得到的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析后，使用特异性引物 khe 对其进行特异性检测和验证。

1.6　药敏试验

测序鉴定后，吸取适量菌液均匀地涂布于 LB 培养基平板上，用无菌镊子取待测药敏纸片（直径 6 mm），将其紧贴于 LB 培养基表面，并将平板置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h，记录各药敏纸片的抑菌圈直径（mm）[15]。

1.7　PCR 引物的设计与合成

16S RNA 细菌引物序列由中国农业科学院饲料研究所提供，特异引物 khe 参照艾克特等的方法[16]进行设计，均由擎科生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1　PCR 扩增用引物

名称	引物序列	产物长度（bp）
27F－1492R	F：5′－AGAGTTTGATCCTGGCTCAG－3′ R：5′－GGTTACCTTGTTACGACTT－3′	1 400
khe	F：5′－TGATTGCATTCGCCACTGG－3′ R：5′－GGTCAACCCAACGATCCTG－3′	475

2　结果与分析

2.1　黑斑蛙白内障病的主要症状

白内障病是目前黑斑蛙养殖过程中常见的流行病，病蛙厌食懒动，应急能力差，身体失去平衡，游动时身体打转，最明显的症状为眼球发白，头部歪曲。此外经解剖后，由图 1 可知，病蛙出现肝花白或充血，肺肿大等病变。

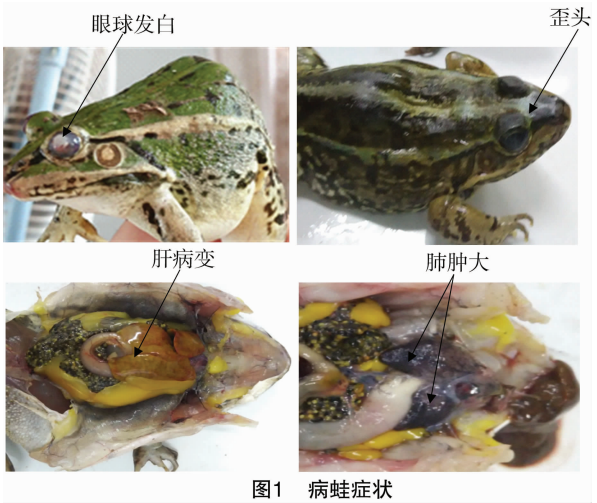


图1　病蛙症状

2.2　16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析结果

PCR 扩增分离细菌的 16S rRNA 基因，得到的片段长度约为 1 400 bp，与预期目标产物的大小一致，电泳结果见图 2。PCR 产物经武汉擎科生物公司测序后，用 Blast 对分离细菌的 16S rDNA 序列进行比对，结果表明，分离菌株与肺炎克雷伯菌相似性为 99%。选取同源性较高的菌株，以维氏气单胞菌（*Aeromonas veronii*）作为外类群，构建系统发育树（图 3）。这些细菌聚为 3 组，1 组是肺炎克雷伯菌，1 组是产酸克雷伯菌（*Klebsiella oxytoca*），1 组是维氏气单胞菌。分离的菌株与肺炎克雷伯菌处于同一分支上，亲缘关系最近，命名为 9HeiBan Frog Heart。经 16S rRNA 测序与系统聚类鉴定表明，该病原菌为肺炎克雷伯菌属，使用肺炎克雷伯菌特异引物 khe 对其进行特异性扩增，得到片段大小为 475 bp，与目标产物大小一致，电泳结果见图 4，进一步确定该菌株为肺炎克雷伯菌。

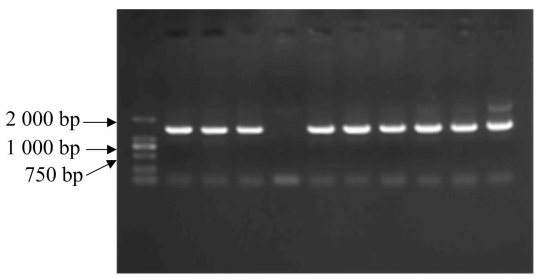


图2　PCR 扩增产物

2.3　药敏试验结果

用 10 种水产常用抗菌药物的药敏纸片做敏感性试验，表 2 结果显示，肺炎克雷伯菌对诺氟沙星、头孢曲松、氧氟沙星、

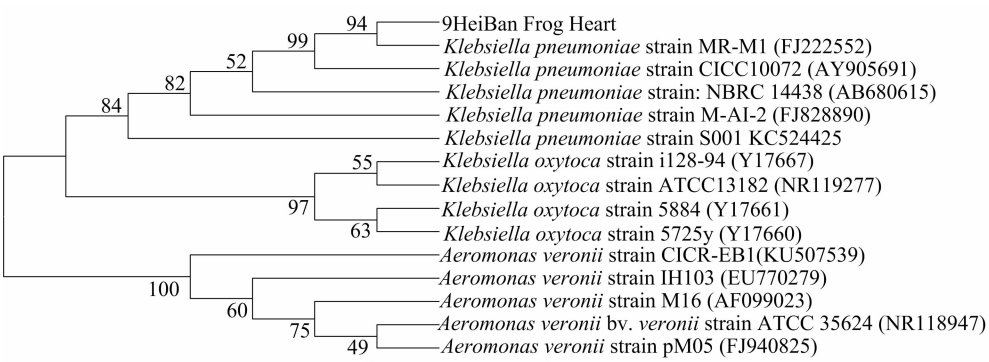


图3　细菌的 16S rDNA 系统发育树

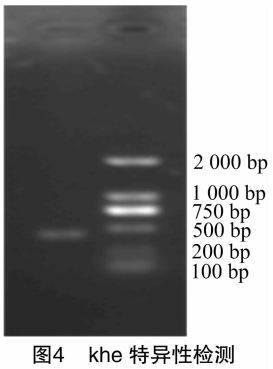


图4　khe 特异性检测

表 2　药敏试验结果

抗菌药物	每片药量（μg）	抑菌圈直径（mm）	药物敏感性
诺氟沙星	10	24	S
多黏菌素 B	300IU	13	I
头孢曲松	30	23	S
万古霉素	30	0	R
复方新诺明	25	0	R
氧氟沙星	5	24	S
四环素	30	14	I
多西环素	30	8	R
环丙沙星	5	16	S
丁胺卡纳	30	20	S

注：抑菌圈直径 $d>15$ mm，敏感（S）；抑菌圈直径 10 mm $<d<$ 15 mm，为中度敏感（I）；抑菌圈直径 $d<10$ mm，为不敏感（R）。

环丙沙星及丁胺卡纳等 5 种药物敏感；对多黏菌素 B 和四环素等 2 种药物中度敏感；对万古霉素、复方新诺明及多西环素 3 种药物耐药。

3　讨论与结论

3.1　黑斑蛙“白内障（歪头）”病的命名

黑斑蛙“白内障（歪头）”病是以患病黑斑蛙眼球发白、头向一侧歪斜这一明显症状而命名的，如已报道的牛蛙“白内障”病[10]、棘胸蛙“白内障”病[11]、虎纹蛙“白内障”病[13]、牛蛙“歪头”病[9]、牛蛙“腹水”病[17]等均是细菌性疾病，同样，在养殖鱼类中也存在“白内障”这一说法，但鱼类“白内障”病却是由寄生引起的[18]。虽然致病病原不一样，但均有某一明显症状，研究者以该症状对其进行命名。故此，本研究也以同样的方法将黑斑蛙所患疾病命名为“白内障（歪头）”病。

3.2　肺炎克雷伯菌对黑斑蛙的影响

肺炎克雷伯菌为革兰氏阴性菌，兼性厌氧，广泛存在于水和土壤等微生态环境中，可感染全身各部[19]。本研究从病蛙多部位分离细菌经测序分析为同一种细菌——肺炎克雷伯菌。根据患病黑斑蛙的外观症状及测序结果可知，肺炎克雷伯菌对黑斑蛙的感染是多部位的，并非局部感染，产生的病症也多样化。同时，该病菌对水生动物健康和实践生产的危害也是巨大的。

3.3　病原菌的耐药性

目前，对于水产养殖动物疾病大多仍采用抗菌药物来控制其发生和流行[20]，由于肺炎克雷伯菌流行广泛，人们大量使用抗生素造成肺炎克雷伯菌耐药性普遍存在[1]。本研究以 10 种常用抗菌药物对从患病黑斑蛙各组织分离培养出来的细菌进行药物敏感性检测，结果表明，肺炎克雷伯菌对诺氟沙星、头孢曲松、氧氟沙星、环丙沙星及丁胺卡纳等 5 种药物敏感；对多黏菌素 B 和四环素等 2 种药物中度敏感；对万古霉素、复方新诺明及多西环素 3 种药物耐药。该结果与周蓉等的结果[21-22]差异较大。由于肺炎克雷伯菌临床分离的菌株数量繁多，可能是由于分离的菌株之间存在差异而造成的，还可能与细菌的来源和区域及感染对象的分布不同有关。因此，用药时应在相应病原菌药敏测定后，有针对性地选择药物用于黑斑蛙的养殖生产。

参考文献：

[1]贾　艳，孙长江，韩文瑜，等. 肺炎克雷伯菌研究进展[J]. 微生物学杂志，2006，26(5)：75－78.

[2]Ronald A. The etiology of urinary tract infection：traditional and emerging pathogens[J]. Dis Mon：DM，2003，49(2)：71－82.

[3]Craven D E. What is healthcare－associated pneumonia，and how should it be treated? [J]. Current Opinion in Infectious Diseases，2006，19(2)：153－160.

[4]Gupta A. Hospital－acquired infections in the neonatal intensive care unit－*Klebisiella pneumonia*[J]. Seminars in Perinatology，2002，26(5)：340－345.

[5]Hooi S H，Hooi S T. Culture－proven bacterial keratitis in a Malaysian general hospital[J]. The Medical Journal of Malaysia，2005，60(5)：614－623.

[6]郭　静，侯国宾，孟庆雄，等. 黑斑侧褶蛙抗菌肽 Pelophylaxin 2PG 的 cDNA 筛选与性质研究[J]. 昆明理工大学学报（自然科学版），2012，37(3)：64－68.

[7]王丹丹，赵尔宓. 阿维菌素对黑斑侧褶蛙毒理效应的研究[J]. 四川动物，2013，32(3)：334－342.

[8]杨尚昆，陈金辉，潘丽婷，等. 黑斑蛙高效生态养殖新型技术[J]. 安徽农业科学，2015，43(29)：52－53.

[9]杨春浩. 牛蛙歪头病病原、病理及敏感药物研究[D]. 长沙：湖南农业大学，2010.

[10]纪荣兴，邹文政，莫英军. 牛蛙“白内障”病病原的初步研究[J]. 集美大学学报（自然科学版），2003，8(1)：8－11.

[11]程晓云，郑芊芷，宋婷婷，等. 棘胸蛙白内障病原鉴定及药敏试验[J]. 浙江农业科学，2016，57(7)：1141－1151.

[12]李　明，宋婷婷，郑荣泉，等. 棘胸蛙歪头病病原分离·鉴定与药敏试验[J]. 安徽农业科学，2016，44(3)：64－66.

[13]周永灿，朱传华，陈国华，等. 虎纹蛙白内障病病原的分离鉴定及其免疫防治[J]. 上海水产大学学报，2001，10(1)：16－21.

[14]廖冰洁，樊汶樵，周　莉，等. 一例棘腹蛙“白内障”的病原分离鉴定[J]. 湖北畜牧兽医，2014，35(8)：8－10，11.

[15]沈文英，李卫芬，高　研. 中华鳖病原性维隆气单胞菌的分离及药敏试验[J]. 水生生物学报，2010，34(5)：1060－1064.

[16]艾克特，徐　佩，周静文，等. 5 种淡水细菌的多重 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 水产科学，2015，34(5)：321－326.

[17]于　喆，肖克宇，钟　蕾，等. 牛蛙腹水病病原鉴定和药敏试验[J]. 淡水渔业，2013，43(1)：50－54.

[18]叶尚明，张人铭，高爱刘，等. 扁吻鱼双穴吸虫病的防治[J]. 中国水产，2004(12)：52－53.

[19]周　蓉，朱卫民. 肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制研究进展[J]. 国外医药：抗生素分册，2012，33(1)：1－5，42.

[20]夏　飞，梁利国，谢　骏. 异育银鲫病原维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业，2012，42(5)：22－26.

[21]周　蓉，朱卫民，黄文祥，等. 855 株肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志，2013，38(5)：363－369.

[22]刘卫国. 肺炎克雷伯菌临床分布及耐药性分析[J]. 实用中医药杂志，2011，27(3)：192－193.