

李成伟,王 均,苏 航,等. 黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):174-178.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.034

黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究

李成伟¹,王 均²,苏 航²,耿 毅³

(1. 成都农业科技职业学院,四川成都 611130; 2. 内江师范学院,四川内江 641100; 3. 四川农业大学动物医学院,四川成都 611130)

摘要:为了解黑斑蛙养殖场大规模暴发腐皮病的病原,从患病蛙肝脏中分离获得 1 株革兰氏阴性杆菌(编号:QW),对其培养特性、生理生化特性、16S rRNA 和 *gyrB* 基因检测、致病性及药物敏感性进行分析。结果表明,菌株 QW 表型特征和理化特性与洛菲不动杆菌相似,16S rRNA 和 *gyrB* 基因在系统发育树上与洛菲不动杆菌聚集为一族,最终判定该菌为洛菲不动杆菌,是黑斑蛙上的一种新病原;致病性研究表明,该菌能够通过浸泡的方式感染黑斑蛙,具有较强的致病性,发病症状主要表现为皮肤溃烂和内脏器官出血,与自然发病症状一致;药敏试验表明,洛菲不动杆菌仅对四环素、氧氟沙星和氟苯尼考 3 种抗生素敏感。本研究鉴定出引起黑斑蛙腐皮病的病原为洛菲不动杆菌,并对其致病性进行研究,同时检测了其药物敏感范围,为该病临床防治用药提供理论依据。

关键词:黑斑蛙;洛菲不动杆菌;分离鉴定;致病性;药物敏感

中图分类号:S947.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0174-05

黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)属无尾目蛙科侧褶蛙属,在我国华北、华中、华南地区的平原和丘陵分布较广泛,也是我国近年来养殖蛙类中的主要品种之一。由于该品种是近年来扩大的养殖规模^[1],相对于其他传统养殖蛙类如牛蛙、虎纹蛙、美国青蛙的规模化养殖历程较短,疾病研究相对较少,发病后只能参考其他蛙类疾病进行比较处理,但水生动物不同种属间具有同病不同症、同症不同

病的特征。如牛蛙、虎纹蛙上常见的白内障、歪脖子疾病,这此疾病已报道的病原有气单胞菌、脑膜败血伊丽莎白菌、浅黄假单胞菌等^[2-3],而在黑斑蛙上的相同症状,病原却出现了肺炎克雷伯菌^[4]。因此,应对不同品种、病原进一步区分研究。对于蛙类的腐皮症,已报道的有牛蛙和棘胸蛙由奇异变形杆菌感染引起^[5-6],但黑斑蛙的腐皮病未见相关报道。2019 年 6 月,四川省内江市某黑斑蛙养殖场出现黑斑蛙大面积死亡,主要表现为头部、背部及四肢出现不同程度的腐烂,剖解可见肝脏肿大、肾脏及肺部出血。本研究对其病原进行分离,并通过病原菌的形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因测序与系统发育分析进行鉴定,确定该病原菌的种属地位;然后通过人工感染试验确定该病原菌的致病性;最后通过药物敏感试验分析该病原

收稿日期:2019-09-10

基金项目:四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目(编号:2017SICAD003)。

作者简介:李成伟(1986—),男,四川泸州人,硕士,讲师,研究方向为水产动物疾病与免疫学。E-mail:lcw304@163.com。

通信作者:王 均,博士研究生,讲师,研究方向为水产动物疾病与免疫学。E-mail:wangjunzl@126.com。

羊的分子选育。

参考文献:

- [1] 储明星,冯 涛,赵有璋,等. 神经肽 Y-Y1 受体基因(NPY-Y1R)多态性及其与山羊繁殖性能关系[J]. 农业生物技术学报,2009,17(6):960-966.
- [2] 樊 奇. 中国西南地区山羊繁殖性能相关候选基因的研究[D]. 重庆:重庆大学,2012.
- [3] Gonzales C, Voirol M J, Giacomini M, et al. The neuropeptide Y Y1 receptor mediates NPY-induced inhibition of the gonadotrope axis under poor metabolic conditions[J]. The FASEB Journal, 2004, 18

(1):137-139.

- [4] Gamba M, Pralong F P. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors; the role of leptin and insulin[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 254:133-139.
- [5] Eva C, Serra M, Mele P, et al. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2006, 27(3):308-339. 9.
- [6] Pelliex C, Sauthier T, Domenighetti A, et al. Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y5 receptors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(4):1595-1600.

菌的药物敏感范围,旨在为该病的临床防治用药提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验对象

四川省内江市某黑斑蛙养殖场的发病黑斑蛙(25~50 g)头部、背部及四肢出现不同程度腐烂,剖解可见肝脏肿大出血、肾脏及肺部出血。采集患病典型的黑斑蛙进行实验室细菌接种;健康黑斑蛙采集于另一黑斑蛙养殖场,实验室暂养 15 d 确定健康无病后用于人工感染试验。

1.2 主要试剂

牛脑心浸液培养基(BHI,美国 BD 公司),细菌生化微量鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司),PCR 所用试剂、特异性引物及细菌基因组 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司),药敏试验纸片(杭州微生物试剂有限公司)。

1.3 病原菌的分离

无菌操作接种患病黑斑蛙的肝、脾、肾脏组织划线于 BHI 培养基上,于 28 ℃ 生化培养箱中培养 24~48 h 后挑取颜色、大小、形态特征基本一致的优势菌落进一步培养。纯化后再转接至斜面培养基上,4 ℃ 保存备用。

1.4 分离菌株形态学与生理生化鉴定

将纯化后的细菌接种至 BHI 琼脂平板,于生化培养箱中 28 ℃ 培养 24 h,观察菌落形态大小,同时对菌体进行革兰氏染色,光学显微镜观察菌体形态特征。挑取单个菌落接种于微量生化管中,28 ℃ 下培养 24~48 h,参考《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《伯杰细菌鉴定手册》^[8]进行生理生化特性鉴定。

1.5 16S rRNA 和 *gyrB* 基因扩增及序列测定

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株基因组 DNA 作为 PCR 模板。采用细菌通用引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,54 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

将分离菌株的 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因扩增序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析,调出与该序列相关性较高的核酸序列,用 MEGA 6.0 软件包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,重复抽样 1 000 次分析系统树各分枝的置信度。

1.6 人工感染试验

将复壮后的菌株接种到 BHI 肉汤培养基中,在 28 ℃,120 r/min 的摇床中培养 24 h 后,革兰氏染色检验纯度。采用生理盐水调整细菌浓度至 3.0×10^8 、 3.0×10^7 、 3.0×10^6 CFU/mL,将 1 L 菌液加入黑斑蛙养殖桶中浸泡,对照组加入等量的生理盐水,每组 20 只黑斑蛙。连续观察 14 d,记录黑斑蛙发病情况和死亡情况,并分离病原进行鉴定。

1.7 药物敏感试验

采用药敏纸片法对分离菌株进行药敏试验,采用氨苄西林、青霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素、阿齐霉素、克拉霉素、四环素、多西环素、制霉菌素、恩诺沙星、丁胺卡那、诺氟沙星、氧氟沙星、多粘菌素 B、氟苯尼考 17 种药物进行药敏试验。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离及生理生化特性

从患病黑斑蛙的肝脏分离得到 1 株高纯度的优势菌株(编号:QW),其菌落状态是灰白色、表面光滑、圆形凸起、边缘整齐、透明、涂片染色镜检可见革兰氏阴性短杆菌(图 1),生化反应结果见表 1。

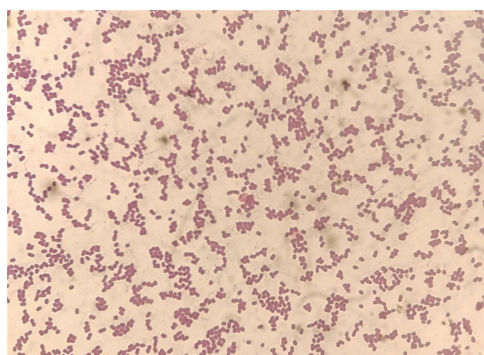


图1 菌株 QW 染色后呈革兰氏阴性短杆菌

表 1 菌株 QW 部分生理生化特性

测定项目	结果	测定项目	结果
鸟氨酸脱羧酶	+	蔗糖	-
过氧化氢酶	+	麦芽糖	+
氧化酶	-	木糖	-
山梨醇	-	吡啶试验	-
肌醇	-	H ₂ S	-
甘露醇	+	尿素	-
葡萄糖	+	硝酸盐还原	-

注: +、- 分别表示反应为阳性、阴性。

2.2 分离菌株的鉴定

以分离菌株 QW 的 DNA 为模板,采用细菌 16S

rRNA 和 *gyrB* 基因通用引物进行 PCR 扩增,经电泳检测和凝胶成像系统后,16S rRNA 基因于1 500 bp 左右得到目的条带(图 2 - a),*gyrB* 基因于 1 200 bp 左右得到目的条带(图 2 - b)。经测序得到 16S rRNA 序列 1 409 bp(genbank 登陆号:MN396229),*gyrB* 基因 1 113 bp(genbank 登陆号:MN504787)。

系统发育树结果显示,在 16S rRNA 序列、*gyrB* 基因序列上,菌株 QW 上都分别聚在洛菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)的分支上(图 3、图 4)。结合生理生化结果,将菌株 QW 判定为洛菲不动杆菌。

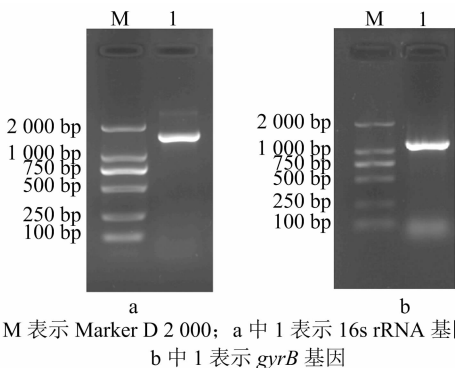


图2 菌株 QW 16S rRNA 与 *gyrB* 基因的 PCR 条带

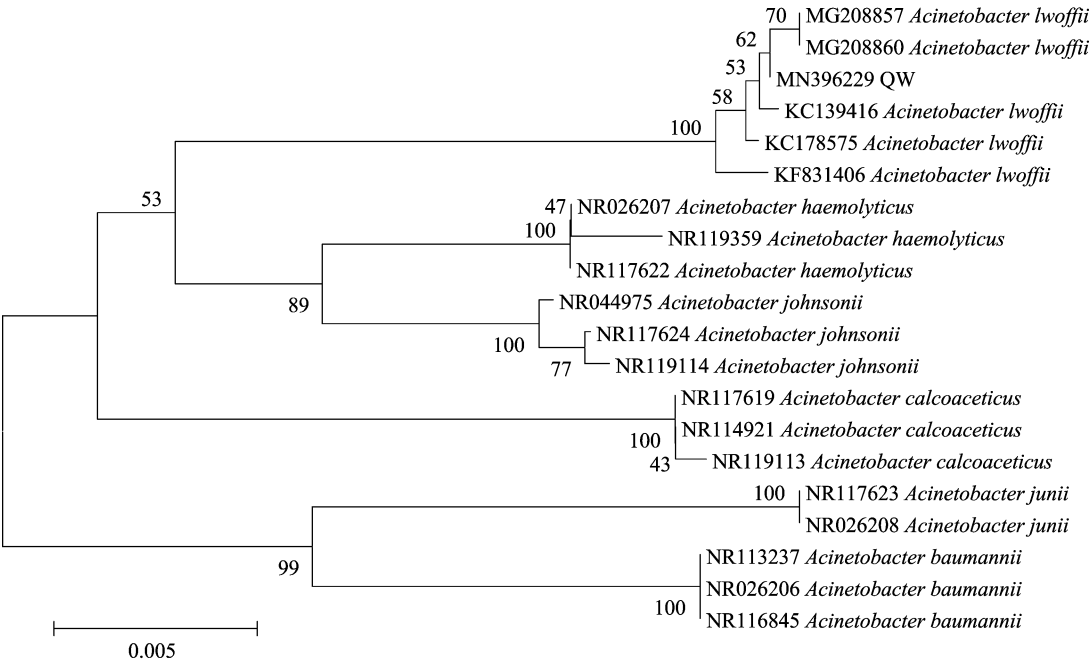


图3 菌株 QW 16S rRNA 的系统发育树

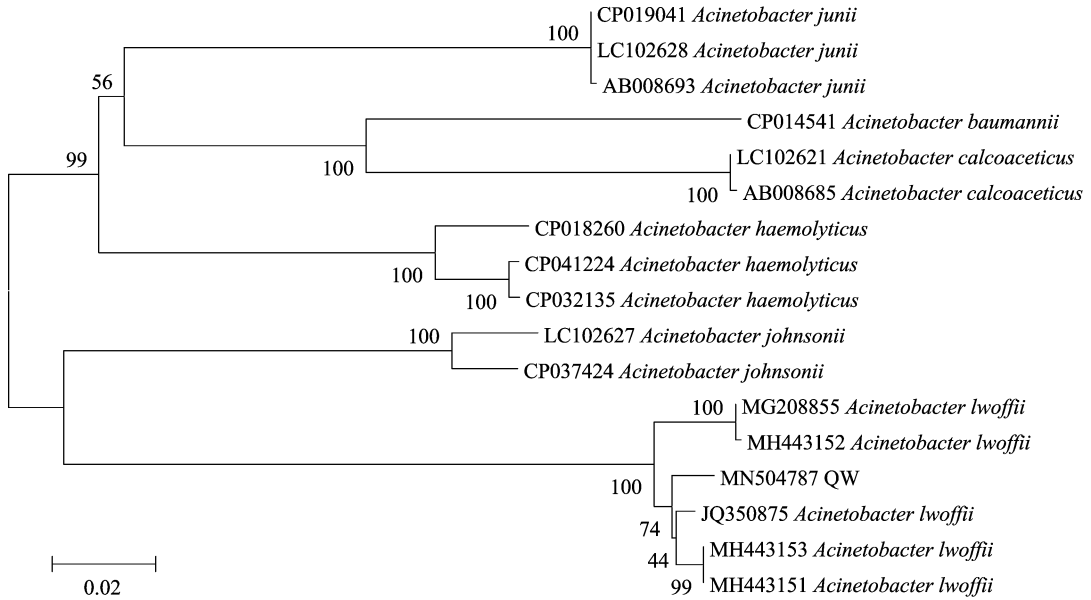


图4 菌株 QW *gyrB* 的系统发育树

2.3 人工感染试验

人工浸泡感染连续观察 14 d, 试验结果见表 2, 随着浸泡菌液浓度的增大, 黑斑蛙的死亡率随之升高, 同时病症周期加快, 表现出背部、腿部表皮溃烂 (图 5-a), 肝脏肿大, 肾脏、肺部出血 (图 5-b), 与自然发病症状相似, 推测洛菲不动杆菌是该病的主要病原, 且对黑斑蛙致病性较强。

表 2 菌株 QW 感染试验

试验组	菌液浓度 (CFU/mL)	死亡率 (%)
1	3.0×10^8	60 (12/20)
2	3.0×10^7	35 (7/20)
3	3.0×10^6	0
对照组	0.85% 生理盐水	0



a. 患病黑斑蛙皮肤腐烂



b. 肝脏、肾脏和肺出血

图5 患病黑斑蛙症状

2.4 药敏试验

采用纸片扩散法, 对菌株 QW 进行 17 种药物敏感性试验。由表 3 可知, QW 菌株仅对四环素、氧氟沙星、氟苯尼考 3 种抗生素敏感; 而对庆大霉素、链霉素、阿齐霉素、丁胺卡那 4 种抗生素介于敏感与耐药之间; 其余的 10 种均为耐药。

表 3 菌株 QW 药物敏感试验

抗生素	含药量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌环直径 (mm)	敏感性
氨苄西林	100	0	R
青霉素	10	0	R
庆大霉素	10	7	I
卡那霉素	30	8	R
链霉素	10	7	I
新霉素	30	0	R
阿齐霉素	15	15	I
克拉霉素	15	13	R
四环素	30	25	S
多西环素	30	0	R
制霉菌素	100	0	R
恩诺沙星	10	13	R
丁胺卡那	30	15	I
诺氟沙星	10	0	R
氧氟沙星	5	30	S
多黏菌素 B	300	0	R
氟苯尼考	30	21	S

注: 敏感(S); 中间(I); 耐药(R)。

3 讨论

洛菲不动杆菌是一种可利用环境中多种营养物质作为自身能量来源的需氧型革兰氏阴性菌, 因其适应性强, 普遍存在于土壤、水及干燥环境中, 且是一种对多种抗生素具有抗性的细菌, 一直以来是医院感染常见的一种条件性致病菌^[9]。洛菲不动杆菌感染包括菌血症、继发性脑膜炎、尿路感染、手术部位感染、胃炎和肺炎, 特别是在重症监护室中^[10]。在养殖业中, 洛菲不动杆菌能广泛引起养殖动物感染, 感染包括奶牛子宫内膜炎^[11]、仔猪肺部感染^[12]、禽类呼吸道感染^[13]等, 水生动物感染相对较少, 感染鲤鱼^[14]、虹鳟^[15]、草鱼^[16], 主要表现为败血症、胡子鲇“吊头病”^[17]等, 两栖动物感染的美

国青蛙“抽搐症”^[18]、牛蛙腹水病^[19]。本试验表明,洛菲不动杆菌感染黑斑蛙后,主要表现为腐皮和肝脏肿大出血、肾脏出血、肺出血,这与洛菲不动杆菌感染牛蛙症状相似^[19],感染后黑斑蛙表皮轻微腐烂、肝脏肿大充血,但未出现美国青蛙和牛蛙的腹水、肝脏白色结节、腿部充出血斑,证明不同环境、不同种属动物感染间存在一定差异。

水产动物中细菌性疾病的治疗最常用且有效的方法为内服抗生素,而抗生素的准确使用需要以药敏试验结果作为依据^[20]。相关研究表明,在人医领域洛菲不动杆菌不同地域分离株的耐药性不同,但大部分菌株对青霉素、头孢类、复方新诺明表现出强耐药性,对阿米卡星、亚胺硫霉素、美罗培南敏感^[21],但除阿米卡星不能兽用且存在多重耐药、耐药率上升较快外,洛菲不动杆菌已成为“超级耐药菌的潜在菌群”^[22]。近几年,在水生动物上分离的洛菲不动杆菌对广谱 β -内酰胺类、碳青霉烯类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类等存在多重耐药性^[15]。本研究分析了洛菲不动杆菌对 17 种抗生素的敏感性,结果显示,菌株仅对四环素、氧氟沙星、氟苯尼考 3 种药物敏感,对庆大霉素、链霉素、阿齐霉素、丁胺卡那 4 种抗生素介于敏感与耐药之间,其余的 10 种均为耐药,说明洛菲不动杆菌具有较强的耐药性,因此建议临床治疗不能盲目使用抗生素。首先通过改善养殖环境,提高动物自身免疫力,调节水环境菌群结构等措施来预防该疾病,发病后需要科学诊断,在药物敏感试验指导下科学用药。

参考文献:

- [1] 杨尚昆,陈金辉,潘丽婷,等. 黑斑蛙高效生态养殖新技术[J]. 安徽农业科学,2015,43(29):52-53.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 舒新华,金燮理,肖克宇,等. 牛蛙腐皮-红腿病并发病致病菌研究[J]. 生命科学研究,1997,1(1):54-59.
- [6] 王瑞君,熊筱娟. 棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究[J]. 淡水渔业,2012(4):31-34.
- [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.
- [8] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 9 版. 北京:科学出版社,1994:729-759.
- [9] Rathinavelu S,Zavros Y,Merchant J L. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis[J]. Microbes Infect,2003,5(7):651-657.
- [10] Regalado N G, Martin G, Antony S J. *Acinetobacter lwoffii*: bacteremia associated with acute gastroenteritis [J]. Travel Medicine and Infectious Disease,2009,7(5):316-317.
- [11] 陈现伟. 规模化场奶牛子宫内膜炎病原菌的分离及鉴定[J]. 畜牧与兽医,2008,40(2):72-74.
- [12] 朱娟娟,冯世文,廖黎黎,等. 产房仔猪鲁氏不动杆菌感染的诊治[J]. 中国动物保健,2013,14(1):35-36.
- [13] Robino P,Bert E,Tramuta C. Isolation of *Acinetobacter lwoffii* from a lovebird (*Agapornis roseicollis*) with severe respiratory symptoms [J]. Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde,2005,147(6):267-269.
- [14] Kozińska A,Paździór E,Pękala A,et al. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens[J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy,2014,58(2):193-199.
- [15] Dadar M, Adel M, Zorriehzahra M J. Isolation and phylogenetic analysis of emerging new antibiotic resistant bacteria, *Acinetobacter lwoffii*, associated with mortality in farmed rainbow trout [J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences,2016,15(4):1279-1292.
- [16] Lü A J, Wei Z, Hu X C, et al. Isolation and characterization of *Acinetobacter lwoffii* from the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah,2017,69:1411-1417.
- [17] 李桂峰,李海燕,毕英佐. 胡子鲇“吊头病”病原的研究[J]. 中国水产科学,2001,8(2):72-75.
- [18] 叶雪平,罗毅志,施伟达,等. 美国青蛙“抽搐症”病原及防治研究[J]. 淡水渔业,2005,35(5):48-50.
- [19] 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.
- [20] 张石云,宋超,陈家长. 喹诺酮类抗生素在水产养殖中应用的研究进展[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):32-36.
- [21] Luciano T,Katia R,Ottaviani D,et al. Catheter-related bacteremia and multidrug-resistant *Acinetobacter lwoffii* [J]. Emerging Infectious Diseases,2007,13(2):355.
- [22] Alejandro B, Dominguez L, Ribera A, et al. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC beta-lactamase in a clinical strain of acinetobacter genomic species 3 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(4):1374-1378.