

棘胸蛙腐皮症病原菌的鉴定及疫苗免疫效果研究

苏欢¹, 颀志刚^{2*}, 黄晓峰¹, 郑荣泉¹

¹浙江师范大学生命科学学院, 浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 浙江 金华

²浙江省农业科学院水生生物研究所, 浙江 杭州

收稿日期: 2023年2月23日; 录用日期: 2023年3月22日; 发布日期: 2023年3月30日

摘要

为确定棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)腐皮病的病原, 并为生产中防治该病提供理论依据, 本研究从病蛙病灶处分离病原菌, 进行人工感染和病原菌的形态特征、理化特性及分子生物学分析, 同时开展药敏试验和疫苗免疫防治试验。结果表明, 从患病棘胸蛙病灶处分离得到的优势菌QS01, 通过人工回归感染试验证实该菌为棘胸蛙腐皮病的病原菌, 结合其表型特征及16S rRNA、gyrB基因序列分析判定为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。药敏试验结果显示, 该菌对恩诺沙星、氯霉素和头孢他啶等8种抗生素敏感, 而对其他抗生素敏感度低或具有一定的抗性。采用注射、浸泡和喷雾方式给蛙接种QS01甲醛灭活疫苗, 三组的平均效价均于第20 d时达到峰值, 血清抗体效价最高分别为1:64~128 (101.6)、1:16~32 (20.2)和1:16~32 (16), 明显高于对照组, 经攻毒后免疫保护率分别达到100%、85.71%和71.43%。试验发现弗氏柠檬酸杆菌可感染棘胸蛙导致其腐皮病, 使用疫苗对此病的防治是有效可行的。

关键词

棘胸蛙, 弗氏柠檬酸杆菌, 分离鉴定, 药敏试验, 疫苗

Identification of Pathogen of Skin Rot of *Rana spinosa* and Study on Immune Effect of Vaccine

Huan Su¹, Zhigang Xie^{2*}, Xiaofeng Huang¹, Rongquan Zheng¹

¹Key Laboratory of Wild Animal Resources Protection and Utilization in Zhejiang Province, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

²Institute of Hydrobiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou Zhejiang

*通讯作者。

文章引用: 苏欢, 颀志刚, 黄晓峰, 郑荣泉. 棘胸蛙腐皮症病原菌的鉴定及疫苗免疫效果研究[J]. 微生物前沿, 2023, 12(1): 33-44. DOI: 10.12677/amb.2023.121005

Abstract

In order to determine the pathogen of the skin rot disease of *Rana spinosa* and provide theoretical basis for the prevention and control of the disease in production, this study isolated the pathogenic bacteria from the diseased frog focus, carried out artificial infection and the morphological characteristics, physical and chemical characteristics and molecular biological analysis of the pathogenic bacteria, and carried out drug sensitivity test and vaccine immunity and control test. The results showed that the dominant bacteria QS01 isolated from the diseased lesions of *Rana spinosa* was confirmed to be the pathogen of skin rot disease of *Rana spinosa* by artificial regression infection test. Combined with its phenotypic characteristics and 16S rRNA, *gyrB* gene sequence analysis, it was determined to be *Citrobacter freundii*. The medicine sensitive test result showed that the bacteria is sensitive to eight kinds of antibiotics including Enrofloxacin, Chloramphenicol, Ceftazidime, but lowly sensitive or resistant to other tested antimicrobial agents. Adopting these ways included injection, immersion and atomizing to inoculate frog with vaccine named QS01 inactivated by formaldehyde, average titer of three immunity groups reached the peak in the 20 d. The highest serum antibody titers were 1:64~128 (101.6), 1:16~32 (20.2) and 1:16~32 (16), which were significantly higher than those of the control group. The immune protection rate for *Q. spinosa* after injection, immersion and spray of QS01 inactivated vaccine can reach 100%, 85.71% and 71.43%. Our research shows that *Citrobacter frederii* is the pathogen of skin rot disease of *Rana spinosa*, and it is effective and feasible to use vaccine to control ulcerative skin disease.

Keywords

Quasipaa spinosa, *Citrobacter freundii*, Isolation and Identification, Drug Sensitivity Test, Vaccine

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)俗称“石蛙”隶属于蛙科、棘蛙属,因雄蛙胸部具有棘刺而得名,主要分布于我国湖南、江西、浙江、福建和香港等地和越南北部[1],因其肉质鲜美,兼具滋补和药用价值,目前市场需求旺盛,价格不断攀升。由于棘胸蛙作为一种典型的溪源性大型无尾两栖类,其生物学特性决定了该物种对生境的要求非常苛刻,溪水仿生态养殖是棘胸蛙养殖的主要模式[2]。近年来,随着养殖规模的扩大,发生病害的频率不断升高,细菌耐药问题日趋明显,严重制约了棘胸蛙养殖产业的发展。

腐皮病(或烂皮病)是棘胸蛙等经济蛙类最为常见的疾病之一,且病原种类较多[3]-[11],可以导致动物的大量死亡,即便治愈也会严重影响水产品的商品价值。按病因该病症可分为营养型和病原型腐皮病。前者因饲料单一、机体缺乏某些维生素或微量元素导致的皮肤溃烂[12],继而诱发细菌感染,可通过补充营养素来防治此症;后者由细菌或病毒感染直接引起,尤其在高密度养殖条件下传染性更强、致死率更高。在养殖实践中,仅凭症状很难确定病因,治疗中经常出现抗生素滥用现象,因此亟待开发专用疫苗等绿色防控技术。近期,浙江丽水地区棘胸蛙养殖蛙场内先后出现大规模腐皮病爆发,本实验室对致病菌株进行了分离鉴定,并发现该菌株在耐药性等方面与浙江金华地区分离的菌株[13]存在一定差异,并且

通过制备甲醛灭活疫苗研究了不同接种方式对疫苗免疫保护效果的影响,以期开发一种实用性的免疫防治技术,从而提高我国蛙类无公害养殖的技术水平,促进这一特色水产养殖业的可持续发展。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

患腐皮病棘胸蛙收集自浙江丽水地区养殖场,健康棘胸蛙(40 ± 5 g)亦来自该养殖场,饲养于水族箱(70 cm \times 53 cm \times 57 cm)内,提供充足的水陆环境和遮蔽物,以黄粉虫(*Tenebrio molitor*)活体作为饵料,每日投喂一次,驯化一周后用于后续研究。

2.2. 病原分离

在无菌条件下,取患病棘胸蛙体表病灶、肝脏等组织少许,使用无菌玻璃匀浆器研磨,经稀释后涂布于营养琼脂培养基,28°C培养24 h后肉眼观察菌落形态、大小、隆起度、颜色等,挑取优势单菌落接种于绵羊血琼脂培养基,28°C摇床恒温培养24 h后,观察菌落生长和溶血情况,将具有溶血性的单菌落转移至胰酪大豆胨琼脂培养基,继续进行28°C纯化培养。将分离纯化得到的1个菌株命名为QS01。

2.3. 回归感染试验

将筛选出的菌株接种于TSA平板上,28°C培养24 h,用0.65%的无菌生理盐水洗下菌苔制成菌悬液,稀释得到浓度为 1.0×10^9 CFU/mL的菌悬液。试验采用肌肉注射法,选取健康棘胸蛙随机分两组(10只/组),感染组每只注射菌悬液0.2 mL,对照组每只注射同剂量的0.65%无菌生理盐水。连续观察记录15 d内的发病症状和死亡情况,并对濒临死亡的个体病原进行再次细菌分离与鉴定。

2.4. 病原菌鉴定

2.4.1. 形态观察及理化特性鉴定

将供试菌接种于胰酪大豆胨琼脂培养基,28°C培养24 h观察菌落特征,按常规方法进行革兰氏染色和显微观察。将供试菌株接种于细菌微量生化鉴定管中进行理化特性鉴定。细菌微量生化鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。细菌各项生理生化指标的鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》[14]和《伯杰氏细菌鉴定手册》[15](第九版)中的方法进行。

2.4.2. 病原菌分子生物学鉴定

按细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)所述方法提取DNA作为PCR模板DNA,-20°C保存备用。细菌16S rRNA引物[16]为F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',M=A/C,R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。gyrB引物[17]为F:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGNAARTTYGA-3',R:5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。在20 μ L反应体系中:2 \times Es Taq MasterMix (Es Taq DNA Polymerase, 2 \times Es Taq PCR Buffer, 3 mM MgCl₂和400 μ M dNTP mix) 10 μ L,引物各1 μ L,Template DNA 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。PCR反应程序为:94°C预变性4 min,94°C变性1 min、56°C复性45 s、72°C延伸2 min、30个循环,然后72°C温育10 min。PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,由上海生物工程技术公司进行测序。获得的16S rRNA和gyrB基因序列通过NCBI的BLAST检索系统进行序列同源性分析,从GenBank数据库中获得相似性较高的序列,使用MEGA X软件,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ) [18]构建16S rRNA、gyrB基因系统进化树,并通过1000次的自举分析(Bootstrap)进行置信度检测。

2.5. 药物敏感试验

采用常规琼脂扩散(K-B)法进行常用抗菌药物的敏感性测定[19], 选用氯霉素、头孢拉定和恩诺沙星等 20 种药敏纸片进行试验, 测定其抑菌圈直径(平行重复 3 次), 直径小于 10 mm 为不敏感或低度敏感, 10~15 mm 为中度敏感, 大于 15 mm 为高度敏感。药敏试纸购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2.6. 免疫防治试验

甲醛灭活法制备浓度为 1.0×10^9 CFU/mL 的疫苗, 用平板涂布法和肌肉注射法攻毒试验来检测疫苗的安全性。试验分注射组、浸泡组、喷雾组和对照组(20 只/组)。注射组为每只肌肉注射 1.0×10^9 CFU/mL 的疫苗 0.2 mL; 浸泡组为连续 3 d 每天用 2.0% 的 1.0×10^9 CFU/mL 疫苗浸泡 30 min; 喷雾组为连续 3 d 每天喷 1.0×10^9 CFU/mL 的疫苗于蛙体 30 min; 对照组为每只肌肉注射 0.2 mL 的 0.65% 无菌生理盐水。免疫中第 0 d, 10 d, 20 d, 30 d, 每组随机取 3 只蛙制备血清, 用 96 孔 U 型板测定平均凝集抗体效价[20], 抗原为 1.0×10^9 CFU/mL 的活菌, 抗体为免疫血清。在 35°C 条件下孵育 1 h, 再置于 4°C 冰箱中过夜, 翌晨判定其结果。免疫第 30 d 后, 以 1.0×10^9 CFU/mL 的活病原菌进行攻毒, 连续观察 15 d 记录发病症状及死亡情况。相对免疫保护率(Relative percentage of survival, RPS): $RPS (\%) = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

3. 结果

3.1. 细菌的分离及回归感染实验

从病蛙病灶部位中分离出的一株致病菌(QS01), 回归感染实验表明菌株对棘胸蛙有较强的致病性, 感染组棘胸蛙死亡率高达 90%, 对照组无死亡(图 1)。部分感染组棘胸蛙的头部和背部皮肤出现白斑, 直至溃烂, 而且活动能力降低, 食欲减退, 解剖后发现其胃肠道无食, 充满粘液, 肝呈土灰色, 该症状与养殖场发病棘胸蛙相同。

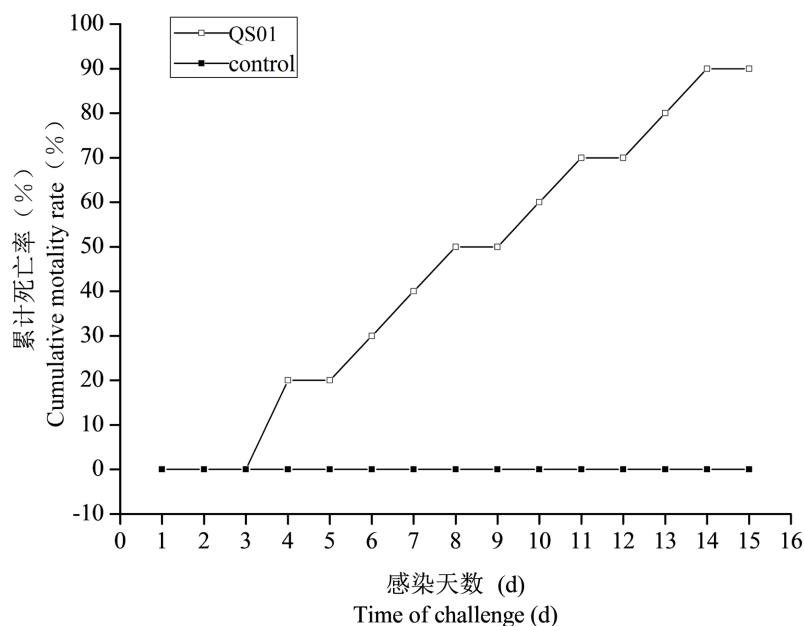


Figure 1. Challenge test of the isolated strain QS01 by muscle injection

图 1. 分离菌 QS01 人工感染试验

3.2. 形态与生理生化特征

从病蛙身上分离得到的病原菌 QS01 直径 1~2 mm、圆形、边缘整齐，为隆起和光滑湿润的灰白色半透明菌落，理化特性见表 1。挑取单菌落，经革兰氏染色后镜检，发现该菌株为革兰氏阴性菌，呈杆状。

Table 1. Morphological, physical and biochemical characteristics of isolated strain QS01

表 1. 分离株 QS01 的形态、生理生化指标

特性 Character	QS01	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i> [15] [21]	特性 Character	QS01	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i> [15] [21]
革兰氏染色 Gram stain	-	-	明胶 Gelatin	-	-
形态 Morphology	短杆状	短杆状	O-F 试验 O-F test	F	F
4℃生长 Growth at 4℃	-	-	淀粉 Pullulan	+	-
28℃生长 Growth at 28℃	+	•	肌醇 Inositol	-	-
37℃生长 Growth at 37℃	+	+	硫化氢 H ₂ S	+	+
42℃生长 Growth at 42℃	+	-	甘露醇 Mannitol	+	+
果糖 Fructose	+	•	七叶苷 Esculin	+	d
鼠李糖 Rhamnose	+	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+
乳糖 Lactose	-	+	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	D-山梨醇 D-sorbitol	+	d
甘露糖 Mannose	+	+	葡萄糖磷酸盐胨水 Glucose phosphate peptone water	-	•
麦芽糖 Maltose	+	+	鸟氨酸 Ornithine	-	•
纤维二糖 Cellobiose	+	d	赖氨酸 Lysine	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	硝酸盐产气 Gas from nitrate	-	•
木糖 Xylose	+	+	枸橼酸盐利用 Citrate	+	+

注：-，阴性；+，阳性；d，10%~90%阳性；F，发酵型；•，原文中无记载。

3.3. 16S rRNA、gyrB 基因序列分析与系统进化树构建

对 QS01 菌株进行了 16S rRNA 和 gyrB 基因序列的测定，PCR 扩增产物电泳结果(图 2)。

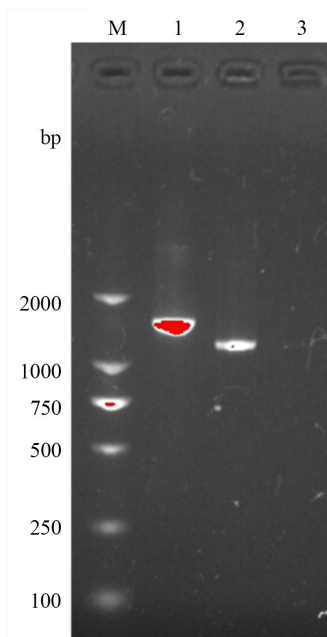


Figure 2. PCR amplified products of 16S rRNA, *gyrB* genes of strain QS01. M: DM 2000; 1: Amplified products of 16S rRNA; 2: Amplified products of *gyrB*; 3: Control

图 2. 菌株 QS01 的 16S rRNA、*gyrB* 基因 PCR 扩增产物。M: DM 2000; 1: 16S rRNA 基因扩增产物; 2: *gyrB* 基因扩增产物; 3: 空白对照

分离菌 QS01 所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1441 bp，将分离菌所扩增的 16S rRNA 基因序列进行同源性分析，结果均与枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类，QS01 菌株与在检索出的弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) (登录号 DQ010114.1)相似性最近，为 99% (图 3)。

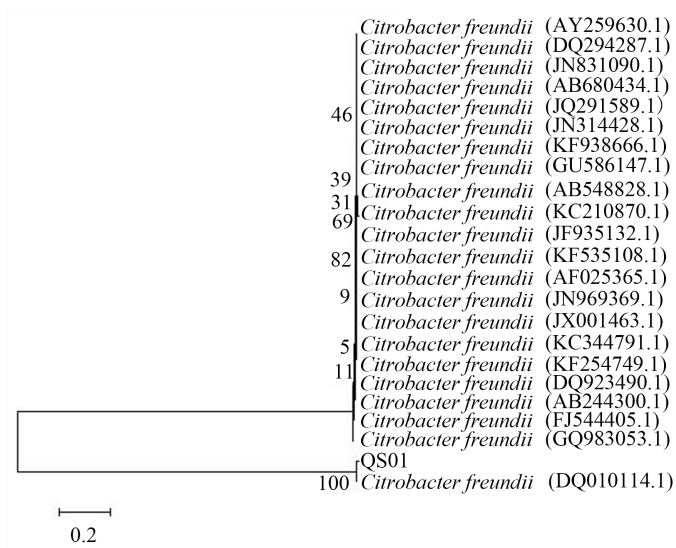


Figure 3. Phylogenetic tree based on QS01 16S rRNA gene sequences

图 3. 菌株 QS01 的 16S rRNA 基因序列系统进化树

分离菌 QS01 所扩增的 *gyrB* 基因序列长度为 1178 bp，将菌株所扩增的 *gyrB* 基因序列进行同源性分析，分离株与弗氏柠檬酸杆菌(登录号 AJ300528.1)聚为一支，同源性为 96% (图 4)。

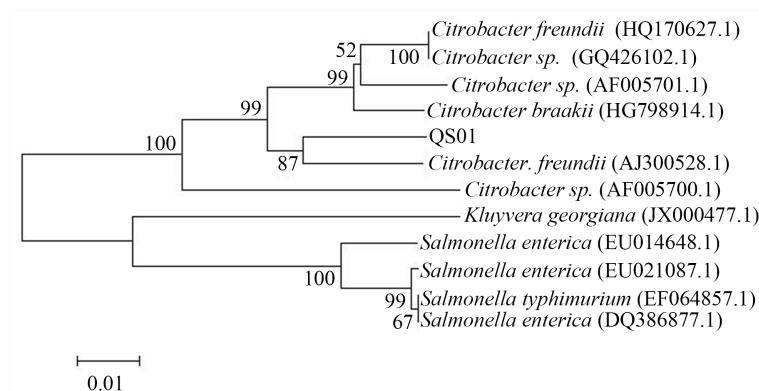


Figure 4. Phylogenetic tree based on QS01 gyrB gene sequences

图 4. 菌株 QS01 的 gyrB 基因序列系统进化树

综合菌株 QS01 的表型特征、理化特性及 16SrRNA 和 gyrB 基因序列的系统发育分析结果, 判定分离菌为枸橼酸杆菌属的弗氏柠檬酸杆菌。

3.4. 药物敏感试验

病原菌 QS01 的抗生素药敏结果如表 2 所示, 在检测的 20 种抗生素中, 菌株 QS01 对氯霉素、恩诺沙星和头孢他啶等 8 种抗生素敏感, 对链霉素、庆大霉素和呋喃妥因等 6 种抗生素中度敏感, 而对青霉素、头孢拉定和利福平等 6 种抗生素具有一定的抗性。

Table 2. The results of the antibiotics sensitivity test

表 2. 抗生素类药敏试验结果

药物 Drug	含量 Concent ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌直径 Inhibition zone/mm	敏感性 Sensitivity	药物 Drug	含量 Concent ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌直径 Inhibition zone/mm	敏感性 Sensitivity
氯霉素 Chloramphenicol	5	21.30 \pm 0.67	S	卡那霉素 Kanamycin	30	9.32 \pm 0.46	R
青霉素 Penicillin	10	0.00	R	诺氟沙星 Norfloxacin	10	31.64 \pm 0.79	S
头孢拉定 Cefradine	30	0.00	R	恩诺沙星 Enrofloxacin	5	34.52 \pm 0.40	S
链霉素 Streptomycin	10	13.74 \pm 0.39	I	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	34.12 \pm 0.38	S
庆大霉素 Gentamycin	10	14.02 \pm 0.51	I	依诺沙星 Enoxacin	10	32.68 \pm 0.72	S
新霉素 Neomycin	30	13.60 \pm 0.16	I	氟罗沙星 Fleroxacin	5	31.60 \pm 1.21	S
新生霉素 Novobiocin	30	0.00	R	呋喃妥因 Furadantin	300	14.10 \pm 0.67	I
红霉素 Erythromycin	15	10.70 \pm 0.33	I	呋喃唑酮 Furazolidone	300	12.06 \pm 1.03	I
万古霉素 Vancomycin	30	0.00	R	利福平 Rifampicin	5	0.00	R
四环素 Tetracycline	30	20.40 \pm 0.29	S	头孢他啶 Ceftazidime	30	21.70 \pm 0.82	S

注: R. 耐药; I. 中度敏感; S. 敏感。*Are allowed to be applied to nuisanceless aquaculture in China.

3.5. 药敏试验结果比较

棘胸蛙与其他水产生物来源的弗氏柠檬酸杆菌的药敏比较结果表明(表 3), 该菌对喹诺酮类、呋喃类、氨基糖苷类和酰胺醇类抗生素较为敏感, 青霉素和利福平耐药。

Table 3. Comparative analysis of antibiotic susceptibility test results

表 3. 药敏试验结果比较分析

抗生素 Antihiotics	来源 Source		棘胸蛙	棘胸蛙 [13]	大鲵 <i>Andrias davidianus</i> [22]	牛蛙 <i>Rana catesbiana</i> [23]	施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i> [24]	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i> [25]
	棘胸蛙							
氯霉素 Chloramphenicol	S	R	R	–	S	–		
青霉素 Penicillin	R	R	R	R	R	R	–	
头孢拉定 Cefradine	R	R	–	–	R	–		
链霉素 Streptomycin	I	S	R	–	S	–		
庆大霉素 Gentamycin	I	S	R	S	S	S	I	
新霉素 Neomycin	I	S	–	S	S	–		
红霉素 Erythromycin	I	R	R	R	I	–		
万古霉素 Vancomycin	R	R	R	–	R	–		
四环素 Tetracycline	S	–	R	–	–	–		
卡那霉素 Kanamycin	R	S	I	–	I	–	R	
诺氟沙星 Norfloxacin	S	–	I	–	S	–	R	
恩诺沙星 Enrofloxacin	S	S	–	S	–	–	R	
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	–	I	–	–	–	–	
呋喃妥因 Furadantin	I	–	S	–	–	–	I	
呋喃唑酮 Furazolidone	I	–	–	–	I	–	–	
利福平 Rifampicin	R	R	–	–	R	–	–	
头孢他啶 Ceftazidime	S	S	S	–	–	–	–	

注: R. 耐药; I. 中度敏感; S. 敏感; –. 其他研究中没有试验的抗生素。

3.6. 免疫保护效果

将疫苗涂布于 LB 平板培养 16~24 h 后, 培养基上均无细菌生长, 表明已彻底灭活, 同时肌肉注射结果表明, 所有注射疫苗和生理盐水的健康棘胸蛙在 15 d 内均活动正常, 进一步说明该疫苗对棘胸蛙是安全的。棘胸蛙在接种疫苗后, 血清的凝集抗体效价逐渐上升, 三个免疫组平均效价于第 20 d 时达到峰值, 注射免疫的血清抗体效价最高 1:64~128 (101.6), 浸泡免疫和喷雾免疫分别为 1:16~32 (20.2), 1:16~32 (16), 并一直持续到第 30 d, 而未免疫的对照组血清抗体效价只有 1:2~2 (2) (表 4)。

Table 4. Serum agglutinating antibody titers

表 4. 血清凝集抗体效价

组别 Groups	凝集抗体效价 Agglutinating antibody titers			
	0 d	10 d	20 d	30 d
注射组 Injection	1:2~2 (2)	1:16~32 (25.4)	1:64~128 (101.6)	1:64~128 (101.6)
浸泡组 Immersion	1:2~2 (2)	1:8~16 (10.1)	1:16~32 (20.2)	1:16~32 (20.2)
喷雾组 Spray	1:2~2 (2)	1:4~16 (6.3)	1:16~32 (16)	1:16~32 (16)
对照组 Control	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)

活菌攻毒试验表明, 免疫组蛙体都具有一定的抗病力, 注射组能够为免疫棘胸蛙提供良好的保护, 其免疫保护率高达 100%, 浸泡和喷雾免疫组免疫保护率分别为 85.71% 和 71.43%, 其中注射组的免疫保护力最高, 浸泡和喷雾组次之(表 5)。

Table 5. Effect of different inoculation methods on immune protection rate after live bacteria challenge

表 5. 不同接种方式对活菌攻毒后免疫保护率的影响

组别 Groups	攻毒蛙数 Num.of challenge	存活蛙数 Num. of survival	存活率/% Survival/%	免疫保护率/% RPS/%
注射组 Injection	8	8	100	100
浸泡组 Immersion	8	7	87.5	85.71
喷雾组 Spray	8	6	75	71.43
对照组 Control	8	1	12.5	-

4. 讨论

4.1. 病原菌的鉴定

腐皮症或烂皮病主要表现为皮肤溃烂和出现白斑, 甚至出现病灶部位肌肉暴露的现象, 可能导致大量死亡, 并严重影响水产动物的商品价值。根据相关研究报告, 多种致病菌均可引起蛙类的腐皮症。如可导致牛蛙腐皮症的细菌包括感染奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*) [3] [4]、克氏耶尔森氏菌(*Yersinia*

kristensenii) [3]、鲁克氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*) [4]和海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*) [5]、弗氏柠檬酸杆菌[22]均可导致皮肤溃烂的症状。在模式物种中,非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)腐皮病可由龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*) [6]和 *Mycobacterium liflandii* [7], 而热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)腐皮病可由溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*) [8]和斯氏分枝杆菌(*Mycobacterium szulgai*) [9]引起。又如嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和布兰汉氏球菌(*Branhamella* sp.) [10]是导致美国青蛙(*Rana grylio*)腐皮症的致病菌。关于引起棘胸蛙烂皮病的病原也有相关报道。如吕耀平等[26]在患烂皮病的棘胸蛙中筛选得到的病株名为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。本实验室曾在浙江金华地区棘胸蛙养殖场分离到三株烂皮病菌株,两株为弗氏柠檬酸杆菌(LJ10201 和 LJ10203),一株为布氏柠檬酸杆菌(LJ10202) [13]。在本研究获得的菌株 QS01 来自浙江丽水地区养殖场,首先对该菌株进行了回归感染实验,并对从形态、生理生化和基因层面进行了鉴定,本研究同时采用 16SrRNA 和 *gyrB* 基因对该菌株进行了分子鉴定。16SrRNA 基因是细菌鉴定、分类及系统发育分析研究中最常用、最有效的“分子钟” [27] [28] [29],但由于其自身的局限性,在有些情况下只能对细菌进行属水平的鉴定。与 16SrRNA 基因相比,蛋白编码基因 *gyrB* 基因是用于细菌鉴定和分类的又一理想的靶基因,具有进化速率较快、碱基替换频率高等优点,可以用于细菌种水平的鉴定[30]。因此,经过这两种基因检验进一步提高了细菌鉴定的准确性,最后判定该致病菌为弗氏柠檬酸杆菌。弗氏柠檬酸杆菌隶属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)。该菌革兰氏阴性,需氧或兼性厌氧,为条件致病菌,广泛存在于自然界中,可感染多种水产动物并导致大量死亡。在两栖类中已报道该菌可感染大鲵[22] [31],症状表现为头部和腹部肿大、表皮溃烂。感染弗氏柠檬酸杆菌的牛蛙[23]表现为皮下形成囊泡,厌食、皮肤充血和皮肤溃烂,这与研究棘胸蛙腐皮病的症状较为类似。

4.2. 耐药性分析

本研究对浙江丽水地区养殖场患腐皮病棘胸蛙体内分离出的弗氏柠檬酸杆菌 QS01 菌株进行药敏实验,发现该菌株对氯霉素、四环素、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、头孢他啶敏感,而对青霉素、头孢拉定、万古霉素、卡那霉素和利福平 6 种抗生素表现出耐药性。然而,在浙江金华地区分离出的菌株对链霉素、庆大霉素、新霉素、卡那霉素、头孢他啶敏感,而对氯霉素、青霉素、头孢拉定、万古霉素、利福平具有耐药性[13] (如表 3)。这两株菌均对青霉素、头孢拉定、万古霉素、利福平表现出耐药性,仅对恩诺沙星和头孢他啶共同表现出敏感性,说明这两株菌在耐药性方面存在较大差异。在其他两栖类种,患病大鲵[22]体内分离出的弗氏柠檬酸杆菌对呋喃妥因和头孢他啶敏感,而引起牛蛙[22]腐皮病的弗氏柠檬酸杆菌对庆大霉素、新霉素、恩诺沙星敏感。因此,由同一种细菌病原引起的腐皮病难以采用同种抗生素进行治疗,这无疑增加了诊治难度,同时也是导致细菌耐药和抗生素滥用问题的主要原因。

4.3. 疫苗免疫保护效果

目前,养殖蛙类细菌多重耐药性和药物残留问题已经引起了人们对食品安全的担忧,利用免疫学方法预防细菌性疾病可以有效减少抗生素使用和缓解细菌耐药性问题。然而,疫苗接种方式是否具有操作性是亟待解决的问题。如采用注射方式费时费力,会给从业人员带来巨大的经济和劳动负担,因此这种疫苗接种方式难以推广。周永灿等[32]报道了虎纹蛙(*Rana rugulosa*)白内障脑膜炎败血黄杆菌(*Flavobacterium meningitidis*)灭活疫苗不同接种方式的免疫效果,结果表明肌肉注射法免疫效果最好,其最高凝集抗体效价达 426.7,喷雾法次之,而口服法的凝集抗体效价相对最低,在接种疫苗第 5 周进行攻毒后,注射和喷雾免疫的虎纹蛙成活率均在 95%以上,而口服免疫组的成活率则只有 35%。本研究采用了肌肉注射法、浸泡法、喷雾法对棘胸蛙进行免疫,发现三种接种方式血清凝集抗体效价逐渐上升,均于第 20 d 时达到峰值,注射免疫的血清抗体效价最高 1:64~128 (101.6),浸泡免疫和喷雾免疫分别为 1:16~32 (20.2),

1:16~32 (16), 并一直持续到第 30 d, 而未对照组血清抗体效价只有 1:2~2 (2), 其中肌肉注射法免疫效果最佳, 免疫保护率高达 100%, 浸泡法略优于喷雾法, 免疫保护率分别为 85.71% 和 71.43%, 这与上述对牛蛙的研究结果较为一致。然而, 周末等[33]研究了嗜水气单胞菌疫苗不同接种方式对中国林蛙(*Rana chensinensis*)免疫效果, 结果表明浸泡组、腹腔注射组和口服组均在免疫 40 d 后血清凝集抗体效价达到最高, 分别为 26、25、27, 而肌肉注射组在免疫 30~40 d 达到最高为 23, 口服和浸泡免疫组分别 71% 和 76%, 腹腔注射组和肌肉注射组的免疫保护力仅为 59% 和 47%。导致这种差异的原因尚不清楚, 有待深入研究。从经济性和可操作性角度来看, 利用浸泡法免疫棘胸蛙是相对实用的接种方式。

5. 结论

本试验确定了弗氏柠檬酸杆菌是导致本次试验中棘胸蛙烂皮病的病原菌, 该菌感染后会造棘胸蛙烂皮部分肌肉糜烂, 组织渗出坏死, 出现严重的炎症反应最终导致死亡。该病原对 8 种抗生素敏感, 对 6 种抗生素呈现出耐药性, 本研究研制的疫苗对减少抗生素的使用具有积极意义, 通过浸泡的方法具有较高的免疫保护率, 为蛙类疾病疫苗的研究和使用提供科学依据。

参考文献

- [1] 费梁, 叶昌媛, 江建平. 中国两栖动物及其分布彩色图鉴[M]. 成都: 四川科技出版社, 2012.
- [2] 肖波. 棘胸蛙腐皮病原分离鉴定与流行病学调查[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- [3] 舒新华, 肖克宇, 金燮理, 陈可毅, 黄志坚. 牛蛙腐皮病致病细菌的初步研究[J]. 水产学报, 1997(S1): 71-76.
- [4] 农业部《渔药手册》编撰委员会. 渔药手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 41.
- [5] Ferreira, R., de Souza Fonseca, L., Afonso, A.M., da Silva, M.G., Saad, M.H. and Lilienbaum, W. (2006) A Report of Mycobacteriosis Caused by *Mycobacterium marinum* Bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *The Veterinary Journal*, **171**, 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.08.018>
- [6] Green, S.L., Lifland, B.D., Bouley, D.M., Brown, B.A., Wallace, R.J. and Ferrell, J.E. (2000) Disease Attributed to *Mycobacterium chelonae* in South African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). *Comparative Medicine*, **50**, 675-679.
- [7] Fremont-Rahl, J.J., Ek, C., Williamson, H.R., Small, P.L.C., Fox, J.G. and Muthupalani, S. (2011) *Mycobacterium liflandii* Outbreak in a Research Colony of *Xenopus (Silurana) tropicalis* Frogs. *Veterinary Pathology*, **48**, 856-867. <https://doi.org/10.1177/0300985810388520>
- [8] Trott, K.A., Stacy, B.A., Lifland, B.D., Diggs, H.E., Hariand, R.M., Khokha, M.K., Grammer, T.C. and Parker, J.M. (2004) Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like Infection in a Colony of African Tropical Clawed Frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine*, **54**, 309-317.
- [9] Chai, N., Deforges, L., Sougakoff, W., Truffot-Pernot, C., Luze, A.D. and Demeneix, B. (2006) *Mycobacterium szulgai* Infection in a Captive Population of African Clawed Frogs (*Xenopus tropicalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **37**, 55-58. <https://doi.org/10.1638/04-064.1>
- [10] 乔志刚, 李用芳, 张会永. 美国青蛙腐皮病原菌的分离鉴定和致病因素研究[J]. 水产科技情报, 2000(2): 70-72.
- [11] 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, 42(4): 31-34.
- [12] 梁淡如, 潘淦. 蛙鳖养殖技术[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1998: 59.
- [13] 胡霁臻, 俞艳, 周超, 王小航, 郑善坚. 棘胸蛙柠檬酸杆菌的分子鉴定及防治技术[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(11): 2101-2105.
- [14] 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.
- [15] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- [16] Ward, D.M., Weller, R. and Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA Sequences Reveal Numerous Uncultured Microorganisms in a Natural Community. *Nature*, **345**, 63-65. <https://doi.org/10.1038/345063a0>
- [17] Yamamoto, S. and Harayama, S. (1995) PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1104-1109. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1104-1109.1995>

- [18] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- [19] Watts, J.L. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [20] Bandin, I., Rivas, C., Santos, Y., Secombes, C.J., Barja, J.L. and Ellis, A.E. (1995) Effect of Serum Factors on the Survival of *Renibacterium salmoninarum* within Rainbow Trout Macrophages. *Diseases of Aquatic Organisms*, **23**, 221-227. <https://doi.org/10.3354/dao023221>
- [21] Austin, B. and Austin, D.A. (1999) Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- [22] 高正勇, 曾令兵, 孟彦, 刘小玲, 张波. 患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 169-176.
- [23] Muel, M.J., Miller, D.L., Frazier, K.S. and Hines, M.E. (2002) Bacterial Pathogens Isolated from Cultured Bullfrogs (*Rana castesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **14**, 431-433. <https://doi.org/10.1177/104063870201400515>
- [24] 杨移斌, 夏永涛, 赵蕾, 郑卫东, 邱军强, 曹海鹏, 胡鲲, 杨先乐. 鲟源弗氏柠檬酸杆菌分离鉴定及药敏特性研究[J]. 水生生物学报, 2013(4): 766-771.
- [25] 张冬星, 康元环, 田佳鑫, 陈亨利, 安鼎杰, 许瑞, 孙武文, 单晓枫, 钱爱东. 团头鲂致病性弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(12): 1589-1595.
- [26] 吕耀平, 金晶, 施倩, 陈洁, 刘子明, 陆君, 黄富友, 傅旭豪. 棘胸蛙致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及病理组织观察[J]. 水生生物学报, 2018, 42(1): 26-32.
- [27] Church, D.L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A. and Emler, S. (2020) Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, **33**, e00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- [28] Sanschagrin, S. and Yergeau, E. (2014) Next-Generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. *Journal of Visualized Experiments*, **90**, e51709. <https://doi.org/10.3791/51709-v>
- [29] 白志鹏, 曹美娜, 张娜, 陈开廷, 马静, 刘玉婷, 马婧, 高金亮. 16S rRNA 基因序列用于临床非典型细菌的补充鉴定[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(6): 914-917.
- [30] Soler, L., Yáñez, M.A., Chacon, M.R., Aguilera-Arreola, M.G., Catalán, V., Figueras, M.J. and Martínez-Murcia, A.J. (2004) Phylogenetic Analysis of the Genus *Aeromonas* Based on Two Housekeeping Genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1511-1519. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03048-0>
- [31] 曹朕娇, 丁诗华, 凌空, 金娟, 吴兴镇. 大鲵源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及胞外酶活性研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(5): 13-18.
- [32] 周永灿, 朱传华, 陈国华, 苏文强, 唐泽锋. 虎纹蛙白内障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.
- [33] 周末, 李艳茹, 曹世诺, 王开艳, 李太元. 嗜水气单胞菌灭活苗对林蛙免疫效果的初步研究[J]. 水产科学, 2009, 28(3): 150-152.