

棘胸蛙脑膜炎病原双重PCR快速诊断技术及疫苗免疫保护效果研究

黄晓峰¹, 颀志刚^{2*}, 苏欢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14日; 发布日期: 2023年3月22日

摘要

本研究从患脑膜炎的棘胸蛙体内分离到QSM01、QSM02和QSM03三株菌, 采用细菌形态学、生理生化特征及分子生物学技术对其进行鉴定, 并开展了药物筛选、快速诊断PCR诊断技术和免疫保护试验。结果显示: QSM01为朱斯特金黄杆菌(*Chryseobacterium joosteii*), QSM02为脑膜炎败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*), QSM03为比目鱼金黄杆菌(*Chryseobacterium scophthalmum*); 药敏实验表明QSM01对利福平等5种抗生素敏感, 对氯霉素5种抗生素中度敏感; QSM02菌株对新生霉素、红霉素、利福平敏感, 对氯霉素、链霉素、万古霉素中度敏感; QSM03菌株对万古霉素等抗生素6种敏感, 对四环素等5种抗生素中度敏感。建立了双重PCR快速诊断方法, 可特异性检测出致病性最高的QSM02菌株。采用注射、浸泡和喷雾方式给蛙接种QSM02甲醛灭活疫苗, 经攻毒后免疫保护率分别达到100%、87.5%和75%。因此, 采用浸泡和喷雾法接种疫苗方式在该蛙防治脑膜炎上是可行的。

关键词

棘胸蛙, 脑膜炎, 伊丽莎白菌属, 双重PCR, 疫苗

Meningitis Pathogenic Bacteria Identification, Doublex PCR Rapid Diagnosis and Immune Protective Effect of the Vaccine in the Frog (*Quasipaa spinosa*)

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

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

*通讯作者。

文章引用: 黄晓峰, 颀志刚, 苏欢, 郑荣泉. 棘胸蛙脑膜炎病原双重 PCR 快速诊断技术及疫苗免疫保护效果研究[J]. 生物过程, 2023, 13(1): 39-51. DOI: 10.12677/bp.2023.131006

Abstract

This experiment made the identification of the morphological characteristics, physical and chemical characteristics and the molecular biology to QSM01, QSM02, QSM03 which are isolated from a disease *Quasipaa spinosa* in meningitis and at the same time, made the drug screening, rapid PCR diagnostic techniques and immune prevention tests. The result showed QSM01 is *Chryseobacterium joostei*; QSM02 is *Elizabethkingia meningoseptica*; QSM03 is *Chryseobacterium scophthalmum*. Drug sensitivity test showed that QSM01 was sensitive to 5 antibiotics such as rifampicin and moderately sensitive to 5 chloramphenicol such as Chloramphenicol, QSM02 strain was sensitive to erythromycin, vancomycin and rifampicin, moderately sensitive to chloramphenicol, streptomycin and vancomycin, QSM03 strain was sensitive to 6 antibiotics such as vancomycin, moderately sensitive to 5 antibiotics such as tetracycline. The duplex PCR can detect the heaviest pathogenic bacterial strain QSM02 specifically. The immune protection rate for *Quasipaa spinosa* after injection, soak and spray of QSM02 inactivated vaccine can reach 100%, 87.5%, 75%. Therefore, it's feasible to control the disease by soaking and spraying the vaccine.

Keywords

Quasipaa spinosa, Meningitis, *Elizabethkingia sp.*, Duplex PCR, 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

脑膜炎是蛙类养殖中最常见且难以治疗的疾病之一，甚至被业内称为“不治之症”，给蛙类养殖业造成的经济损失难以估量。该病典型症状包括头部倾斜、水中原地打转（“旋游症”），同时可能伴随白内障等病症的发生。脑膜炎难以防治的原因主要是抗生素难以进入血脑屏障发挥作用[1]，且目前水产养殖允许使用的抗生素等药物对该病基本无效。根据现有的文献报道，导致蛙类脑膜炎的病原较多，包括脑膜炎败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) [2]、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) [3]、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) [4]，其中以脑膜炎败血伊丽莎白菌[5]-[11]为主。

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[12]。目前棘胸蛙养殖已经成为浙江、江西、贵州等地山区带动农民致富的优质项目，但随着养殖规模的不断扩大，病害问题日趋严重，尤其是脑膜炎病治疗难度极大，由于缺乏有效的治疗方法和快速的诊断技术可能导致治疗时间的延误和引起抗生素滥用问题。本研究从浙江丽水地区养殖棘胸蛙脑组织内分离出的菌株进行理化和分子鉴定和耐药性测试，建立了双重 PCR 快速鉴定技术，并对致病性最强的菌株进行了基于不同疫苗接种方式的免疫效果评估，以期棘胸蛙病害绿色防治提供实用的技术与方法，从而促进棘胸蛙养殖产业的持续、健康发展。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

患脑膜炎病的和健康的棘胸蛙(40 ± 5 g)均来自浙江丽水某养殖场。健康棘胸蛙暂养于水族箱(70 cm × 53 cm × 57 cm)内, 驯化 7 d 后用于后续实验。

2.2. 细菌的分离和纯化

取症状典型、濒死的棘胸蛙, 体表消毒后, 在无菌条件下, 取病蛙脑、眼等组织于 LB (Luria Bertani) 琼脂培养基平板上划线接种, 28℃下培养 24 h 后挑取形态大小一致优势菌落连续划线 3 次进一步纯化, 接种纯化单菌落于 LB 培养基中, 28℃摇床恒温培养 24 h, 加 20%无菌甘油, -70℃保存备用。

2.3. 人工感染试验

将获得的 3 株优势纯化菌株接种于 LB 平板, 28℃恒温培养 24 h, 用 0.65%无菌生理盐水洗下, 麦氏比浊法将细菌浓度调整为 1.0×10^9 CFU/mL。将驯化 7 d 后的健康蛙随机分 4 组(10 只/组), 感染组每只以 1.0×10^9 CFU/mL 浓度的菌悬液肌肉注射 0.2 mL, 对照组则注射相同剂量的 0.65%无菌生理盐水, 注射后每天观察记录发病症状和死亡情况, 连续观察 15 d, 并及时剖检濒临死亡的个体, 对病原菌再次分离纯化。

2.4. 病原菌的鉴定

2.4.1. 形态观察及理化特性鉴定

将 3 种菌株接种于 LB 培养基上, 28℃培养 24 h 后观察菌落形态特征, 按常规方法进行革兰氏染色和显微观察菌体形态特征; 菌液接种于细菌理化特性反应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参考《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》[13]。

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℃保存备用。16S rRNA 引物[14]为 F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', M = A/C, R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。gyrB 引物[15]为 F: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGN GGNAARTTYGA-3', R: 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。在 20 μL 反应体系中: 2 × Es Taq MasterMix (Es Taq DNA Polymerase, 2 × Es Taq PCR Buffer, 3 mM MgCl₂ 和 400 μM dNTP mix) 10 μL, 引物各 1 μL, Template DNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应程序为: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 1 min、56℃复性 45 s、72℃延伸 2 min、30 个循环, 然后 72℃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。通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行测序结果序列同源性分析, 从 GenBank 数据库中获得同源性较高的序列, 使用 MEGA5.1 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ) [16]构建 16S rRNA、gyrB 基因系统发育树, 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

药敏试验参照 CLSI 抗微生物药物敏感性实验执行标准, 采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法进行 20 种常用抗菌药物的敏感性测定[17], 抑菌圈直径小于 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。抗生素药敏试纸购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2.6. 双重 PCR 快速诊断

根据 QSM02 的 *gyrB* 和 *blaB* 序列, 设计扩增特异性片段的引物。blaB8F: 5'-GTGCAGGAGGT TTGGAATA-3', R: 5'-CCATACCACTACATTGTCAG-3', *gyrB*1F: 5'-AATAGGAGACAGCGACA-3', R: 5'-AGTTTTCTGGTAGTCC-3'。对双重 PCR 反应中 Mg^{2+} 浓度、退火温度进行优化并对引物特异性进行检验, 以确定适宜引物和最佳反应条件[18]。

2.7. 疫苗制备和免疫保护效果

选择致病性最强的 QSM02 菌株用于制备浓度为 1.0×10^9 CFU/mL 的甲醛灭活疫苗, 经平板涂布法和肌肉注射攻毒来检测其安全性。试验分注射组、浸泡组、喷雾组和对对照组(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。免疫后每 10 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[19], 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. 棘胸蛙脑膜炎病症

患病棘胸蛙体表皮发黑, 头部歪向一侧, 食欲不振, 行动迟缓, 胃肠无食并伴有部分白内障、肝病变的情况。

3.2. 人工回归感染实验

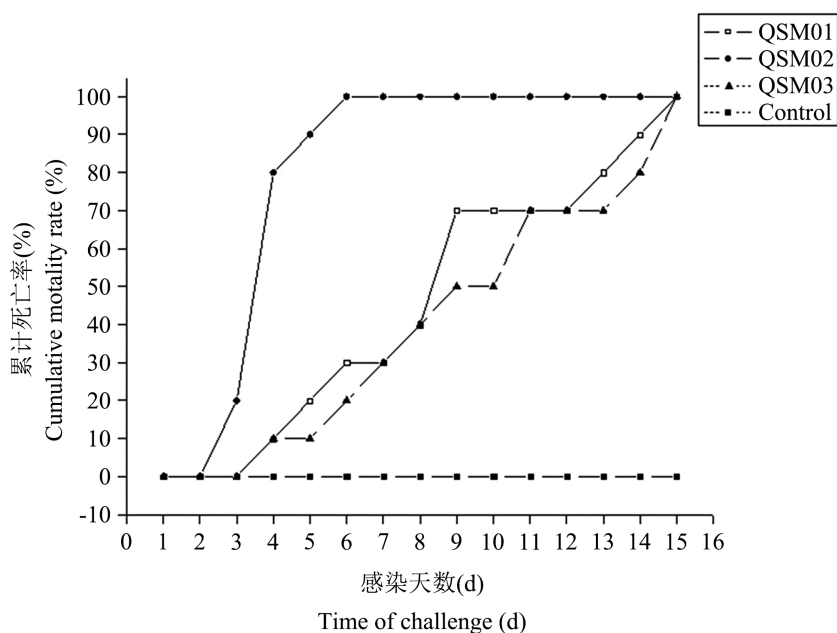


Figure 1. Artificial infection results of isolated bacteria to *Quasipaa spinosa*

图 1. 分离菌对棘胸蛙的人工感染结果

肌注分离所得三株菌的病蛙均不同程度地表现出头颈歪斜、身体失衡或旋游等脑膜炎症状。在攻毒 24 h 后,实验组蛙出现行动迟缓。QSM02 组在 48 h 后出现死亡,感染 6 d 内全部死亡。QSM01 组和 QSM03 组在 36 h 后出现死亡,感染 15 d 内全部死亡,对照组全部存活。从人工感染发病死亡的棘胸蛙体内再次分离细菌,其形态、理化特性与 16S rDNA 序列与接种菌株一致,说明这三株菌株均为致病菌,且 QSM02 菌致病性最强(图 1)。

3.3. 病原菌鉴定

3.3.1. 形态与生理生化特征

从蛙眼和脑组织分离所得的三株菌,形态大小一致,革兰氏染色观察均为革兰氏阴性杆菌,在 28℃ 恒温培养 24 h 上形成直径为 1~2 mm、圆形、边缘整齐、凸起的菌落, QSM02 和 QSM03 菌落颜色为灰白色, QSM01 菌落为黄色,理化特性详见表 1。

Table 1. Isolates physiological and biochemical reactions
表 1. 分离株生理生化反应

特性 character	菌株 strain		
	QSM01	QSM02	QSM03
果糖 fructose	-	+	+
鼠李糖 rhamnose	-	-	-
乳糖 lactose	-	+	+
葡萄糖 glucose	-	+	+
甘露糖 mannose	-	+	+
麦芽糖 maltose	+	+	+
纤维二糖 cellobiose	-	-	-
阿拉伯糖 arabinose	-	+	+
蔗糖 sucromalt	-	+	+
淀粉 starch	+	+	+
明胶 gelatin	+	+	+
O-F 试验 O-F test	+	+	+
肌醇 inositol	-	-	-
硫化氢 H ₂ S	-	+	+
甘露醇 mannitol	-	+	+
精氨酸脱羧酶 arginine decarboxylase	+	+	+
葡萄糖磷酸盐胨水 glucose phosphate peptone water	-	-	-
鸟氨酸 ornithine	+	+	+
赖氨酸 lysine	+	+	+
硝酸盐气体 gas from nitrate	+	-	+

Note: -, negative; +, positive.
注: -, 阴性; +, 阳性。

3.3.2. 构建 16S rRNA、gyrB 基因系统发育树

以分离纯化 QSM01、QSM02 和 QSM03 菌株的 DNA 通过 16S rDNA 通用引物 PCR 分别得到 1428 bp、1417 bp、1427 bp 条带，测序后，将序列在 GenBank 进行 BLAST 分析，结果显示 QSM01 和 QSM03 与金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类，QSM01 菌株与在检索出的 *Chryseobacterium joostei* (登录号 HQ829938.1) 相似性最近，为 93%。QSM03 菌株与在检索出的比目鱼金黄杆菌(*Chryseobacterium scopthalmum*) (登录号 KC178594.1) 相似性最近，为 97%。对于 QSM02 菌株同时选取同源性较高的菌株以及金黄杆菌属(*Chryseobacterium*) 作为外类群构建系统发育树。结果显示，QSM02 菌株与脑膜炎败血伊丽莎白菌(登录号 HQ154560.1) 同源性最高，达 100%。QSM02 系统进化树如图 2。

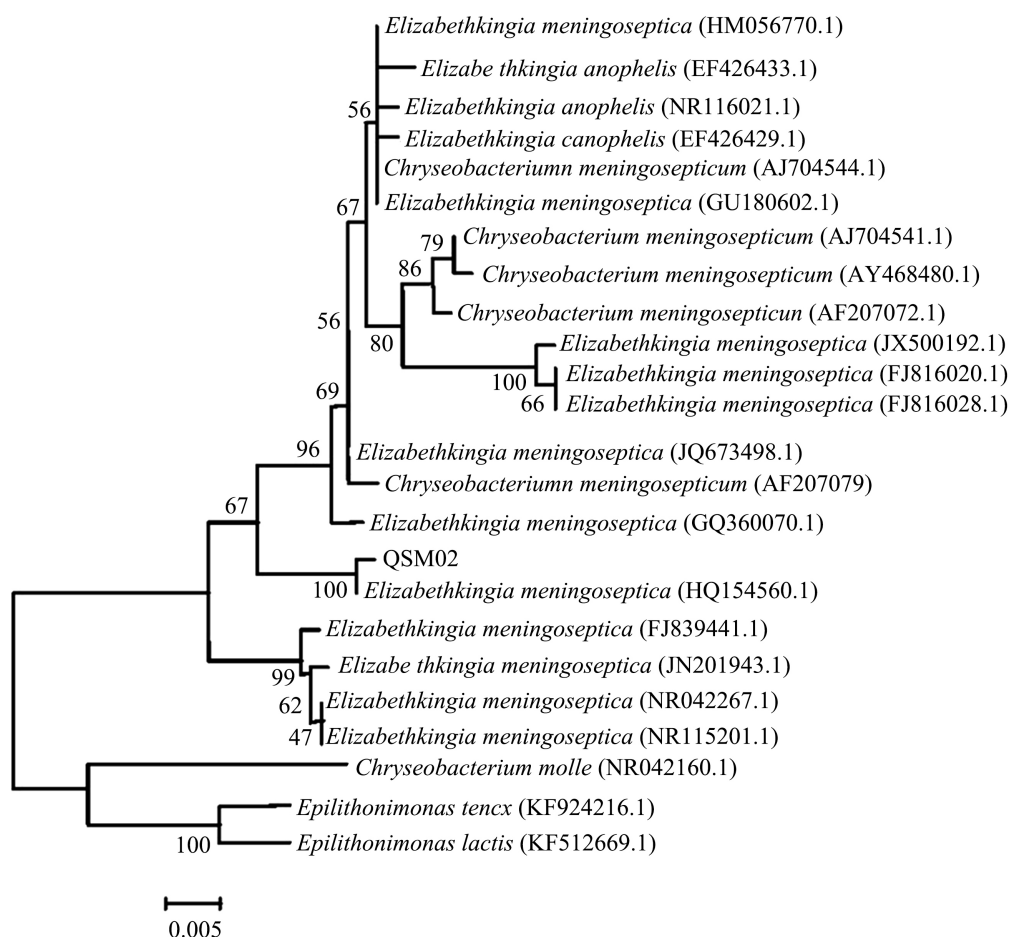


Figure 2. Phylogenetic tree of QSM02 and related strains based on 16S rDNA sequences
图 2. 基于 16SrDNA 基因序列构建的分离菌 QSM02 与相关菌株的系统发育树

分离株 QSM01、QSM02 和 QSM03 菌株所扩增的 *gyrB* 基因序列长度分别为 1231 bp、1212 bp、1219 bp，将菌株所扩增的 *gyrB* 基因序列进行同源性分析，分离株 QSM01 与 *Chryseobacterium joostei* (登录号 HQ829938.1) 相似度最近，为 93%。QSM03 与 *Chryseobacterium scopthalmum* (登录号 HQ829933.1) 相似度最近，为 90%。QSM02 与 *Elizabethkingia meningoseptica* (登录号 HQ829943.1) 相似度最近，为 92%。QSM02 *gyrB* 基因序列系统进化树如图 3。

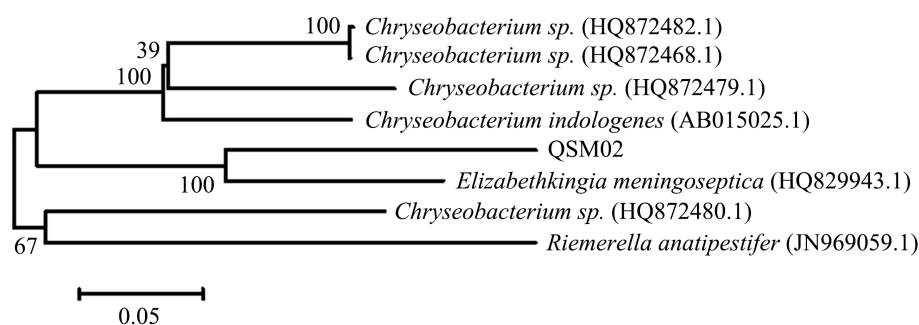


Figure 3. Phylogenetic tree of QSM02 and related strains based on *gyrB* gene sequences

图 3. *gyrB* 基因序列构建的分离菌 QSM02 与相关菌株的系统发育树

3.4. 药敏试验结果

选用了 20 种抗生素对致病菌的药敏试验(表 2), QSM01 菌株对新生霉素、恩诺沙星等 5 种抗生素敏感, 对氯霉素、新霉素等 5 种抗生素中度敏感; QSM02 菌株对新生霉素、红霉素、利福平敏感, 对氯霉素、链霉素和万古霉素中度敏感; QSM03 菌株对新霉素、万古霉素等 6 种抗生素敏感, 对头孢拉定、四环素等 5 种抗生素中度敏感。

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 Content ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	QSM01		QSM02		QSM03	
		抑菌直径 Inhibition zone (mm)	敏感性 Sensitivity	抑菌直径 Inhibition zone (mm)	敏感性 Sensitivity	抑菌直径 Inhibition zone (mm)	敏感性 Sensitivity
氯霉素 Chloramphenicol	5	10.78 \pm 0.23	I	13.21 \pm 0.45	I	0.00	R
青霉素 Penicillin	10	0.00	R	0.00	R	0.00	R
头孢拉定 Cefradine	30	0.00	R	0.00	R	11.74 \pm 0.27	I
链霉素 Streptomycin	10	0.00	R	13.12 \pm 0.22	I	0.00	R
庆大霉素 Gentamycin	10	0.00	R	0.00	R	0.00	R
新霉素 Neomycin	30	10.59 \pm 0.31	I	8.65 \pm 0.11	R	22.46 \pm 0.42	S
新生霉素 Novobiocin	30	27.14 \pm 0.34	S	22.41 \pm 0.29	S	0.00	R
红霉素 Erythromycin	15	8.34 \pm 0.19	R	25.30 \pm 0.36	S	0.00	R
万古霉素 Vancomycin	30	13.75 \pm 0.17	I	13.09 \pm 0.20	I	20.92 \pm 0.57	S

Continued

四环素 Tetracycline	30	8.30 ± 0.55	R	11.17 ± 0.35	I	14.61 ± 0.24	I
卡那霉素 Kanamycin	30	0.00	R	0.00	R	9.23 ± 0.18	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10	7.76 ± 0.42	R	0.00	R	13.11 ± 0.26	I
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	30.95 ± 0.77	S	12.18 ± 0.23	I	41.61 ± 0.57	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	23.45 ± 0.31	S	0.00	R	33.12 ± 0.46	S
依诺沙星 Enoxacin	10	14.04 ± 0.20	I	0.00	R	0.00	R
氟罗沙星 Fleroxacin	5	23.43 ± 0.23	S	0.00	R	14.31 ± 0.21	I
呋喃妥因 Furadantin	300	0.00	R	0.00	R	20.29 ± 0.43	S
呋喃唑酮 Furazolidone	300	7.58 ± 0.36	R	0.00	R	14.13 ± 0.28	I
利福平 Rifampicin	5	31.84 ± 0.98	S	21.95 ± 0.33	S	24.22 ± 0.66	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	0.00	R	0.00	R	0.00	R

Notes: R. resistance; I. intermediate; S. sensitive.

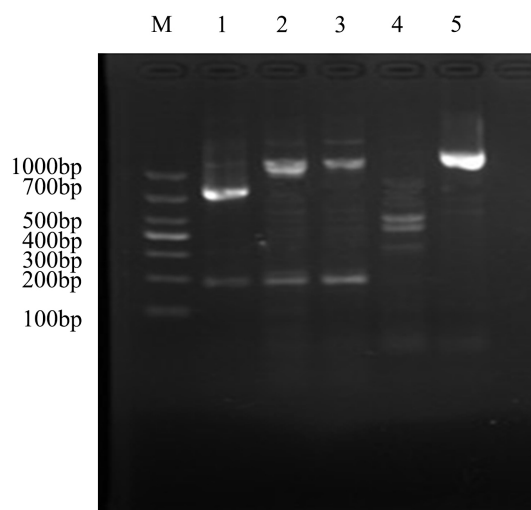
注: R 耐药; I 中度敏感; S 敏感。

3.5. 双重 PCR 快速诊断

最佳的反应体系为: Taq Master Mix 10 μ L, blaB8、gyrB1 的上下引物各 1 μ L, 8.07 ng/ μ L 的 DNA 模板 1 μ L, 5 μ L 无菌水。最佳反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 7 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, Mg²⁺浓度为 25 mg/L。QSM02 扩增出 789 bp 的 gyrB 基因和 200 bp 的 blaB8 基因 2 条清晰的目的条带, 阴性对照中的 QSM01、QSM03 只扩增出 200 bp 的 blaB8 基因条带, 温和气单胞菌和嗜水气单胞菌均未扩增出 blaB8 和 gyrB1 的特异性条带(图 4)。本次实验表明建立的 QS02 双重 PCR 检测方法具有较强的特异性。

3.6. 免疫保护效果

将疫苗涂布于 LB 平板培养 16~24 h 后, 观察到培养基上均无细菌生长, 表明疫苗没有细菌污染且已彻底灭活, 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。通过不同途径对棘胸蛙接种疫苗后, 其血清凝集抗体效价相对于对照组均逐渐上升。注射组中在第 20 d 时达到最高血清凝集抗体效价, 注射组效价最高(1:64~128), 一直延续到第 30 d。而浸泡组和喷雾组最高血清凝集抗体效价出现较晚(表 3), 使用浸泡免疫法和喷雾免疫法需要更长的时间来发挥较好的免疫保护作用。



M: DM 2000; 1: QSM02; 2: QSM01; 3: QSM03;
4: 温和气单胞菌; 5: 嗜水气单胞菌。

Figure 4. Specificity test result of duplex PCR
图 4. 双重 PCR 特异性实验结果

Table 3. Serum agglutinating antibody titers

表 3. 血清凝集抗体效价

组别 groups	凝集抗体效价 Agglutinating antibody titers time of assaying after immunization/d			
	0 d	10 d	20 d	30 d
注射组 injection	1:2~2 (2)	1:16~64 (32)	1:64~128 (101.6)	1:64~128 (101.6)
浸泡组 soak	1:2~2 (2)	1:8~16 (12.7)	1:16~32 (20.1)	1:16~64 (32)
喷雾组 spray	1:2~2 (2)	1:4~8 (2.6)	1:8~16 (12.7)	1:16~32 (20.1)
对照组 control	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)	1:2~2 (2)

Table 4. The relative percent survival of *Quasipaa spinosa* after challenged by *E. meningoseptica*

表 4. 棘胸蛙活菌攻毒后免疫保护力

组别 groups	攻毒蛙数 Number of frog challenged	存活蛙数 Number of frog survival	存活率/% Survival/%	免疫保护率/% relative percentage of survival/%
注射组 injection	8	8	100	100
浸泡组 soak	8	7	87.5	87.5
喷雾组 spray	8	6	75	75
对照组 control	8	0	0	-

在接种疫苗后的第 30 d 后进行攻毒, 观察 15 d 后, 对照组全部死亡, 浸泡组死亡 1 只, 喷雾组死亡 2 只, 注射组全部存活。表明免疫组蛙体都具有一定的抗病力, 注射免疫、浸泡免疫、喷雾免疫的免疫保护率分别达 100%、87.5%、75%, 其中注射组的免疫保护力最高(表 4)。

4. 讨论

4.1. 病原菌的鉴定

根据现有报道, 伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia sp.*)是导致蛙类患脑膜炎的主要病原。如从患脑膜炎虎纹蛙(*Rana tigrina*) [7]、黑斑蛙(*Rana nigromaculata*) [10]、牛蛙(*Rana catesbeiana*) [5]、美国青蛙(*Rana grylio*) [6]、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) [20]等体内分离出的致病菌均为脑膜炎败血伊丽莎白菌, 又如从患病黑斑蛙[21]、北美豹蛙(*Lithobates pipiens*) [22]、牛蛙[23]体内分离出的致病菌为米尔伊丽莎白菌(*Elizabethkingia miricola*)。此外, 发现肺炎克雷伯菌[2]、嗜水气单胞菌[3]也可能导致蛙类出现该疾病。本研究从浙江丽水地区养殖场棘胸蛙脑组织中共分离出三个菌株, 根据回归感染实验均三株菌均会导致不同程度的脑膜炎症状, 但三者对蛙的致死时间和致死率方面存在差异, 如 QSM01 组和 QSM03 组大约在 36 h 后出现死亡, 感染 15 d 内全部死亡, 而 QSM02 组在 48 h 后出现死亡, 感染 6 d 内全部死亡(图 1), 说明这三株菌株均为致病菌, 且 QS02 菌致病性最强。利用两种分子标记对三株菌进行了鉴定, 其中 16S rRNA 基因是细菌鉴定、分类及系统发育分析研究中最常用的标记, 由于 16S rRNA 自身的局限性, 很多情况下只能将细菌鉴定到属水平, 而 *gyrB* 基因具有进化速率快、碱基替换频率高等优点, 能够更好地对细菌在种水平上的鉴定[24]。通过这两种分子标记的共同鉴定, 最终确定 QSM01 菌为朱斯特金黄杆菌(*C. joostei*), QSM02 菌为脑膜炎败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*), QSM03 菌为比目鱼金黄杆菌(*C. scophthalmum*)。关于棘胸蛙歪头病、白内障等症状及病原鉴定已有相关报道。如雷雪平等[8]从四川雅安场殖养暴发白内障、体表溃疡的棘胸蛙体内鉴定出了脑膜炎败血伊丽莎白菌, 又如本实验室成员也从丽水地区其他养殖场患歪头病棘胸蛙体内分离出的三株细菌, 经鉴定也均为脑膜炎败血伊丽莎白菌[9]。由此可见, 虽然引起棘胸蛙脑膜炎的细菌菌种类是多样的, 但脑膜炎败血伊丽莎白菌是最为广泛的致病菌, 而且感染此菌后棘胸蛙出现的病症也存在一定差异, 这可能与病症或菌株差异有关。

4.2. 双重 PCR 快速诊断

双重 PCR 与常规单基因 PCR 相比, 是在一个反应体系中添加两对不同的引物, 扩增不同基因片段, 从而实现同时检测多种病原或进行病原的不同类型检测。当前, 双重 PCR 被广泛用于病原学分类鉴定、流行病学调查、早期诊断等方面, 具有灵敏度高、特异性强、省时省力等优点[25]。本研究利用 QSM02 菌株的 *gyrB* 和 *blaB* 基因设计了特异性引物, 通过多次对 PCR 体系反应条件进行优化, 建立了双重 PCR 检测技术。QSM02 扩增出了 789 bp 的 *gyrB* 基因和 200 bp 的 *blaB8* 基因 2 条清晰的目的条带, QSM01、QSM03 只扩增出 200 bp 的 *blaB8* 基因条带, 温和气单胞菌和温和气单胞菌均未扩增出 *blaB8* 和 *gyrB1* 的特异性条带, 表明本研究建立的双重 PCR 具有高度特异性, 显著提高了检测方法的真实可靠性。

4.3. 耐药性分析

本研究用 20 种常用抗菌药物对浙江丽水养殖场患脑膜炎棘胸蛙脑组织分离出的 QSM02 菌株进行药敏试验, 发现该菌株仅对新生霉素、红霉素、利福平三种药物敏感, 对氯霉素、万古霉素、恩诺杀星等 5 种药物中度敏感, 对新霉素、庆大霉素、诺氟沙星等药物有耐药性。本实验室成员[9]在 2016 年在同地区患病棘胸蛙上分离的菌株对头孢哌酮、红霉素、庆大霉素和万古霉素敏感, 本实验的菌株对万古霉素和庆大霉素的敏感性降低甚至产生耐药性, 这可能是在实际养殖中过量采用这类抗菌药物导致, 使丽水

地区养殖场中的病原菌对一些常用抗生素产生一定程度的耐药性。从其他地区如浙江温州患病棘胸蛙上分离得到的脑膜败血伊丽莎白菌株 PY-SW1506 [11]对万古霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、利福平等 7 种药物敏感,对青霉素、头孢氨苄、诺氟沙星、庆大霉素、呋喃妥因等 15 种药物表现出耐药性。利福平、万古霉素、恩诺沙星对同为浙江地区的 QSM02 菌株和 PY-SW1506 菌株有良好的抑菌作用,但四川雅安患病棘胸蛙上分离得到的脑膜败血伊丽莎白菌株 CM160701 仅对氟苯尼考敏感,对阿莫西林、头孢唑林、恩诺沙星、庆大霉素、红霉素等 15 种药物表现出耐药性,这可能是同一物种的不同地域的分离株耐药性可能不同。此外本实验分离所得同样能使棘胸蛙患脑膜炎的 QSM01 和 QSM03 菌株同为金黄杆菌属,对大多数药物有耐药性,仅环丙沙星、恩诺沙星、利福平、万古霉素、新霉素 5 种药物对其均有较好的抑菌作用。这与 Michel [26]从其他水产源获得的 67 株金黄杆菌中,多数菌株表现出多种抗生素耐药性结果相同。因此在实际养殖中要有针对性、交替式地使用不同类别的抗生素或者采用专用疫苗等绿色防治手段。

4.4. 疫苗免疫保护效果

疫苗防治已成为国内外水产动物病害防治的重要方向。周冬仁等[27]从患病牛蛙上分离鉴定出的无乳链球菌加弗氏佐剂制成甲醛灭活全菌疫苗,通过肌肉注射免疫对健康牛蛙的相对免疫保护率为 67%;宋婷婷[28]将分离鉴定的鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)制成甲醛灭活疫苗,通过注射免疫对棘胸蛙烂皮病相对免疫保护率达到了 75%。周末等[29]利用分离出的嗜水气单胞菌采用热灭活的方式制备疫苗,通过不同途径免疫对林蛙(*Rana temporaria*)红腿病的相对免疫保护率达到了 47%到 76%。胡成钰等[30]利用嗜水气单胞菌和乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)制备灭活疫苗,对牛蛙红腿病的相对免疫保护率在 75%以上。周永灿等[1]用分离鉴定的脑膜炎败血伊丽莎白菌制成甲醛灭活疫苗,对虎纹蛙白内障的相对免疫保护率达到了 95%。本研究针对棘胸蛙脑膜炎致病性最强的 QSM02 菌株制备甲醛灭活疫苗,相对免疫保护率均达到 75%以上。疫苗免疫方式的不同在很大程度上影响了动物机体的免疫保护效果以及疫苗的推广使用[31][32]。本实验注射组的免疫效果最佳,凝集效价为 1:64~128,且可一直延续到第 30 d,虽然见效快,但在规模化养殖中使用极为不便,并且不能对蝌蚪进行免疫保护。棘胸蛙的体表皮肤上有许多粘液腺,具有吸收疫苗和辅助呼吸的能力,因此采用浸泡免疫法和喷雾免疫法在实际生产中有更高的可行性。胡霁臻等[33]、周永灿等[1]研究表明喷雾免疫法较注射免疫法的最高凝集抗体效价出现较晚,但都有较好的免疫保护效果。本实验中浸泡组和喷雾组均在第 30 d 出现最高凝集抗体效价,且相对免疫保护率达到 87.5%和 75%,这种操作便捷,且对棘胸蛙无损伤的免疫更适合于实际应用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 夏理海, 罗凯, 李由申, 韩盼盼, 黎明, 郜卫华, 许巧情, 胡伟. 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. <https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.042>
- [3] 杨春浩, 肖克宇, 金红春, 雷宇杰, 李大安. 美国青蛙歪头病病原的研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(5): 53-57.
- [4] 程晓云, 翁旭东, 郑善坚. 棘胸蛙歪头病的病原分离鉴定与防治试验[J]. 科学养鱼, 2020(10): 55-56. <https://doi.org/10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2020.10.029>
- [5] 陈晓凤, 周常义, 陈梦麟. 牛蛙脑膜脓毒性黄杆菌病原的研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 1999(3): 32-37.
- [6] 张奇亚, 李正秋, 吴玉琛. 美国青蛙“旋游症”病原菌的分离鉴定及其组织病理学观察[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(2): 51-54.
- [7] Xie, Z.-Y., Zhou, Y.-C., Wang, S.-F., et al. (2009) First Isolation and Identification of *Elizabethkingia meningoseptica* From Cultured Tiger Frog, *Rana tigrina rugulosa*. *Veterinary Microbiology*, **138**, 140-144. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.02.011>

- [8] 雷雪平, 耿毅, 余泽辉, 郑李平, 曹师琪, 黄小丽, 陈德芳, 欧阳萍, 刘恺睿. 棘胸蛙脑膜炎败血伊丽莎白菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(3): 371-377.
- [9] 李明, 宋婷婷, 郑荣泉, 郑善坚, 胡文芳, 骆艺元, 严红. 棘胸蛙歪头病原分离·鉴定与药敏试验[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(3): 64-66+98.
- [10] 吴明皇, 林玲, 孙承文, 王英英, 石存斌. 棘胸蛙白内障病原的分离、鉴定及药物敏感性分析[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(6): 1042-1044+1047.
- [11] 阮陈松杰. 黑斑蛙“歪头病”病原菌的分离鉴定及其致病机制研究[D]: [硕士学位论文]. 荆州: 长江大学, 2021.
- [12] 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. 370.
- [13] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and William, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [14] 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>
- [15] 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>
- [16] 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>
- [17] Watts, J.L. and Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- [18] 方兵, 李樞年, 祖国掌, 余为一. 应用多重 PCR 检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 473-477.
- [19] 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>
- [20] Green, S.L., Bouley, D.M., Tolwani, R.J., Waggle, K.S., Lifland, B.D., Otto, G.M. and Ferrell, J.J. (1999) Identification and Management of an Outbreak of *Flavobacterium meningosepticum* Infection in a Colony of South African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214**, 1833-1838.
- [21] 刘益莎, 王荣华, 梁丹, 符艳纯, 张润春, 陈中元, 罗玉双, 杨星. 黑斑蛙歪头病的病原菌分离鉴定及其感染病理分析[J]. 水产学杂志, 2023, 36(1): 36-43.
- [22] Trimpert, J., Eichhorn, I., Vladimirova, D., et al. (2021) *Elizabethkingia miricola* Infection in Multiple Anuran Species. *Transboundary and Emerging Diseases*, **68**, 931-940. <https://doi.org/10.1111/tbed.13761>
- [23] 向圣汉, 赵雨贺, 彭治鑫, 李俊慧, 李伟. 牛蛙源米尔伊丽莎白菌的分离鉴定与药敏试验[J/OL]. 水产学杂志: 1-7. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1363.S.20221102.1533.002.html>, 2023-02-22.
- [24] 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>
- [25] 刘香, 梁佳平, 张灿, 邹玲, 任慧英, 刘文华. 马流产沙门菌双重 PCR 检测方法的建立[J/OL]. 中国兽医科学: 1-7. <https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2023.0042>, 2023-02-22.
- [26] Michel, C., Matte-Tailliez, O., Kerouault, B. and Bernardet, J.-F. (2005) Resistance Pattern and Assessment of Phenicol Agents' Minimum Inhibitory Concentration in Multiple Drug Resistant *Chryseobacterium* Isolates from Fish and Aquatic Habitats. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 323-332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02592.x>
- [27] 周冬仁, 陈莎莎, 杭小英, 施伟达, 罗毅志, 叶雪平. 牛蛙源无乳链球菌全菌疫苗免疫效果研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(14): 135-137.
- [28] 周末, 李艳茹, 曹世诺, 等. 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): 151-153.
- [29] 宋婷婷. 棘胸蛙规模化养殖常见疾病病原的鉴定及疫苗研究[D]: [硕士学位论文]. 金华: 浙江师范大学, 2015.
- [30] 胡成钰, 洪一江. 牛蛙红腿病菌苗免疫试验[J]. 水利渔业, 2001, 21(1): 38-39.
- [31] 诸亚平, 卢运站, 杨金兵, 程帮照, 刘鹏义. 不同免疫途径对鸡新城疫弱毒活疫苗免疫效果的影响[J]. 现代农业科技, 2018(11): 225+227.

-
- [32] Varga, J.F.A., Bui-Marinos, M.P. and Katzenback, B.A. (2019) Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in Immunology*, **9**, Article 3128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>
- [33] 胡霁臻, 郑善坚, 林威丞, 金米雪, 谢梦佳, 包伊鹏, 李柯. 棘胸蛙虹彩病毒疫苗制备及免疫技术[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(5): 833-836.