

Isolation and Identification of *Aeromonas hydrophila* from Dead Giant Salamander and Histopathological Observation of Infected Frog and Drug Sensitivity Analysis

Qiuhan Yu, Xianyan Li, Langhua Cai, Sha Sha

College of Animal Sciences, Southwest University, Chongqing
Email: 905418958@qq.com

Received: May 21st, 2019; accepted: Jun. 3rd, 2019; published: Jun. 10th, 2019

Abstract

In order to understand the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* from giant salamander in Chongqing to several animals and damage to organs of the American frog tissue and sensitivity to commonly used drugs, two strains of TG-2, TG-5 were isolated and identified from dead giant salamander. Biochemical characteristics were determined by 16srRNA sequencing and BIOFOSUN-GN-48. Squid, mouse and frog were inoculated, and drug susceptibility test was made. The results showed that all of the 2 strains were *Aeromonas hydrophila*. TG-5 killed 70% of crucian carp, 40% of frogs and 100% of white mice. TG-2 killed 80% of crucian carp, 70% of frogs and 100% of white mice. Histopathological observation showed that the frog's liver tissue was severely necrotic; hepatocyttoplasmic lysis and vacuolar degeneration occurred; cell nucleus fragmented; distribution of hepatic cord was disordered; hepatic sinus dilated; hyperemia was found in the kidney mesenchyme; renal capsule dilated; epithelial cells were enlarged; vacuolar degeneration was observed; and there was a protein exudation in the renal tubules. The results of 21 drug sensitivity tests showed that TG-2 was highly sensitive to cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, minocycline, ceftazidime, and polymyxin B. TG-5 was sensitive to polymyxin B, ceftazidime, and ceftazidime. Others showed strong resistance.

Keywords

Aeromonas hydrophila, Isolation and Identification, Pathological Section, Drug Sensitivity Test

病死大鲵嗜水气单胞菌分离鉴定和感染美蛙组织病理观察及药敏分析

余秋寒, 李娴妍, 蔡浪花, 沙莎

西南大学动物科学学院, 重庆
Email: 905418958@qq.com

收稿日期: 2019年5月21日; 录用日期: 2019年6月3日; 发布日期: 2019年6月10日

摘要

为了解重庆大鲵嗜水气单胞菌对几种动物的致病性和对美蛙组织脏器的损害以及对常用药物的敏感性, 从患病死亡大鲵体分离鉴定两株菌TG-2, TG-5, 用16srRNA测序, 并使用BIOFOSUN-GN-48鉴定板条测定生化特性; 接种鲫鱼、小鼠和美蛙及药敏试验, 结果显示2株菌均为嗜水气单胞菌。TG-5能使鲫鱼死亡70%, 蛙死亡40%, 小白鼠死亡100%。TG-2能使鲫鱼死亡80%, 蛙死亡70%, 小白鼠死亡100%; 组织病理观察显示, 蛙肝组织坏死严重, 肝细胞质溶解, 出现空泡变性, 细胞核碎裂, 肝索分布紊乱, 肝血窦扩张, 肾间质血管充血、出血, 肾小囊腔扩张, 上皮细胞肿大, 空泡变性, 肾小管腔内有蛋白物渗出; 21种药物药敏试验结果表明, TG-2对头孢哌酮、头孢曲松、头孢他啶、米诺环素、头孢他啶、多粘菌素B高度敏感, TG-5对多粘菌素B、头孢他啶、敏感。其他且呈现出较强耐药性。

关键词

嗜水气单胞菌, 分离鉴定, 病理切片, 药敏试验

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

中国大鲵(*Andrias davidianus*)属脊椎动物两栖纲, 有尾目, 隐鳃鲵科, 鲵属, 野生中国大鲵是我国特有的珍稀两栖动物, 列为国家二级保护动物, 还在科研、教学及物种进化研究等方面有着重要的科学意义。而人工养殖大鲵具有极高的营养及药用价值[1]。近年来, 随着人工养殖规模的不断扩大, 养殖大鲵疾病的爆发也越来越频繁, 生产中产生的抗生素和消毒剂的滥用现象[2]、耐药菌株增加的问题日趋严重, 对大鲵的健康养殖带来不利的影响, 病菌的流行与传播潜在威胁着其他水生及经济动物。

本次研究着重从重庆某大鲵养殖基地爆发大鲵腐皮病病原着手, 通过从病死大鲵患病部位分离细菌, 纯化, 对其进行表型、分子鉴定, 药敏试验, 鲫鱼、美蛙、小鼠致病试验和美蛙病理切片制作观察。了解病原体对几种动物的致病性和病原体对药物的敏感性, 并从病原体感染美蛙的病理组织观察研究大鲵源致病菌对美蛙组织的侵害与大鲵组织的病理变化是否相同, 探讨美蛙作为两栖类水生动物用于大鲵病原菌感染研究的可行性。研究结果以期对大鲵的科学养殖、合理用药提供科学依据, 对重庆地区大鲵养殖业的健康持续发展和大鲵细菌病实验室研究存在着重要意义。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

病鲵: 重庆某养殖场送检患腐皮病大鲵。健康鲫鱼: 重庆荣昌双河某鱼苗养殖中心 80 尾, 平均体长 15 cm/尾; 健康美蛙: 重庆某养殖场 40 尾, 平均体重 160 g/尾。小白鼠: 购自西南大学荣昌校区动物科

提供昆明系小鼠 20 只, 平均体重 18 g/只。

2.2. 试剂与器材

麦康凯琼脂、克氏双糖铁琼脂、胰蛋白胨、酵母提取物等购自北京奥博星生物技术有限公司; 裂解上清液、Premix Taq (Ex Taq Version 2.0)、Forward Primer (1×10^{-8} mmol/ μ L)、Reverse Primer (1×10^{-8} mmol/ μ L)、dH₂O, 购自上海生工生物技术服务有限公司; 药敏试纸购自杭州微生物试剂有限公司; BIOFOSUN 自动生化鉴定仪器(上海复星医学科技发展有限公司)(地点: 重庆市璧山区动物疾病预防控制中心)。

2.3. 方法

2.3.1. 大鲵病原菌的分离

从病死大鲵、肝、脾、胰、肾、肌肉病灶等分离接种至 LB 培养基平板上, 28℃培养 24 h~48 h。取优势菌纯化, 记录并编号 TG₁、TG₂...TG_n, 保存备用。纯化菌进行革兰氏染色、氧化酶试验、麦康凯培养、溶血试验、过氧化氢试验、克氏双糖等培养特性检测。

2.3.2. 鲫鱼致病性试验

将健康鲫鱼置于大塑料桶中暂养 4 天, 按分离菌数分组, 分为试验组、生理盐水对照组、空白对照组, 每组 10 尾。将分离菌分别接种于 LB 肉汤中, 28℃培养 24 h, 麦氏比浊, 将菌液稀释至 6×10^8 cfu/ml, 分别对试验组鲫鱼胸鳍肌肉注射接种 0.2 ml/尾[3]; 同时同部位注射等量生理盐水于对照组, 空白对照组不注射。观察鲫死亡状况。

2.3.3. 分离菌的鉴定

用 PCR 扩增 16SrRNA 和 BIOFOSUN 生化系统鉴定对分离的可致鲫死亡的致病菌 TG-2、TG-5 进行鉴定。采用 TAKARA 公司 50 μ l 反应体系, 将 TG-2、TG-5 菌培养好的单独菌落勾入 50 μ l 的裂解液, 提取基因模板, 加入引物, 在 PCR 仪中扩增, 琼脂糖明胶中电泳。确保基因组提出后将产物送往上海生工生物技术有限公司, 对 PCR 产物进行测序。在 NCBI 上将测序后的待测菌序列与数据库上的所有序列进行比对, 再使用 DNASTAR 中的 Megalign 进行进化树的构建, 从而鉴定出菌的种类。按操作要求将 TG-2、TG-5 菌液加入 BIOFOSUN-GN-48 生化系统鉴定板条, 28℃培养 24 h, BIOFOSUN 微生物鉴定药敏分析仪读取板条, 分析报告结果。

2.3.4. 药敏试验

用 K-B 纸片法[4], 将致病菌接种至营养肉汤中, 28℃培养 24 h, 用麦氏比浊管稀释至 1.5×10^8 cfu/ml, 再用灭菌棉签蘸取菌液均匀涂抹在 LB 培养基表面, 镊子夹取药敏试纸平铺在培养基表面, 置温箱 28℃培养 24 h~72 h, 用直尺量取抑菌圈的直径, 记录结果。

2.3.5. 小白鼠致病试验

将致病菌接种于 LB 肉汤中 28℃培养 24 h, 按麦氏比浊管将菌液稀释至 2.4×10^9 cfu/ml [3], 将小白鼠按分离菌数分组, 分为试验组、生理盐水对照组、空白对照组, 每组 5 只, 试验组小白鼠 0.2 ml/只, 腹腔注射; 同时同部位注射等量生理盐水于对照组, 空白对照组不注射。注射后观察记录小鼠的死亡率。

2.3.6. 美蛙致病性试验及脏器病理切片制作

将致病菌接种于 LB 肉汤中 28℃培养 24 h, 按照麦氏比浊管将菌液稀释至 1.5×10^9 cfu/ml [5]将健康美蛙按分离菌数分组, 分为试验组、生理盐水对照组、空白对照组, 每组 10 尾, 分别对试验组健康美蛙

接种注射，腹腔注射 0.2 ml/尾。同时同部位注射等量生理盐水于对照组，空白对照组不注射。注射后观察记录蛙的死亡情况。对死亡蛙进行病理剖检，取严重病变组织，浸入 10%福尔马林中固定，洗涤，采用梯度浓度的乙醇脱水，后浸入二甲苯中 30 min 进行透明，再浸入融化过滤后的石蜡中进行浸蜡包埋，包埋蜡凝固后，修整组织放入切片机中切片，把浸蜡较好的切片展平烘干，HE 染色，光学显微镜下观察其组织学变化。

3. 结果

3.1. 大鲵病原菌的分离结果

从患病死亡大鲵病灶肌、肝、脾、胰、肾部分离出优势生长菌株，进一步对其进行革兰氏染色、氧化酶试验、麦康凯培养、溶血试验、过氧化氢试验、克氏双糖铁试验等生化及生理学特征检测，获得 6 株菌。将其编号为 TG-1、TG-2、TG-3、TG-4、TG-5、TG-6 (表 1)。

Table 1. Culture characteristics of pathogenic bacteria

表 1. 病原菌的培养特性

项目	菌株					
	TG-1	TG-2	TG-3	TG-4	TG-5	TG-6
革兰染色	-	-	-	-	-	-
氧化酶	+	+	+	+	+	-
麦康凯	+	+	+	+	+	+
溶血	-	β	-	-	α	-
过氧化氢	+	+	+	+	+	+
克氏双糖铁	K/A(-)	K/A(+)	K/A(-)	K/K(-)	K/A(-)	K/K(-)

注：K/A 为分解葡萄糖，不分解乳糖，K/K 为不分解葡萄糖与乳糖，(+)为产气，(-)为不产气。

3.2. 鲫鱼致病性试验结果

TG-5 菌株组死亡鲫鱼体表出血，眼球充血突出，剖检可见血性腹水，肝胰脏颜色变浅，肠道粘膜层充血发红。TG-2 菌株组死亡鱼体出血严重，眼球充血突出，鳞片部分掉落。剖检可见大量血性腹水，血水偏黑色，肝胰脏出血，肠道粘膜层充血发红，肌肉组织稍有溃烂。其他几株菌的试验组及对照组无死亡，结果显示 TG-2 与 TG-5 菌为致病菌(表 2)。

3.3. 16SrRNA 测序鉴定结果

将 TG-2、TG-5 菌株基因组进行 PCR 扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳后显示目的条带大小约为 1500 bp (见图 1)，经上海生工生物工程技术有限公司测序，得到大小为 1453 pb、1448 pb 的序列。将检获得的测序列在 NCBI 上比对和数据分析。TG-2 与 TG-5 的序列覆盖度最高为 99%，TG-2 与 TG-5 的 99% 的序列的相似度为 99%。将 NCBI 上 TG-2 与 TG-5 比对的基因序列在 DNASTAR 的 Megalign 进行同源性比对(见图 2)。若 16SrRNA 全长的同源性 $\geq 99\%$ ，为同种细菌。若在 97%~98.9%，一般为同属不同种。若 $< 95\%$ ，则为不同属[6]。

TG-2 与 TG-5 的最高同源性菌均为 KC202278.1 号菌，达 98.9%、98.5%。TG-2 和 TG-5 的同源性略有不同，其进化树不在一个分支上。综合数据分析为：TG2 与 TG5 均为变形菌门(*Proteobacteria*)，变形菌纲(*Proteobacteria*)，气单胞菌目(*Aeromonas*)，气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)，气单胞菌属(*Aeromonas*)

中的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

Table 2. Pathogenicity test of crucian carp
表 2. 鲫鱼致病性试验结果

组别	剂量(ml)	菌株	感染尾数	每天死亡情况(d)					死亡率
				1	2	3	4	5-10	
试验组	0.2	TG-1	10	0	0	0	0	0	0%
		TG-2	10	6	4	0	0	0	80%
		TG-3	10	0	0	0	0	0	0%
		TG-4	10	0	0	0	0	0	0%
		TG-5	10	5	3	0	0	0	70%
		TG-6	10	0	0	0	0	0	0%
对照组	0.2	生理盐水	10	0	0	0	0	0%	
空白组	0	无	10	0	0	0	0	0%	

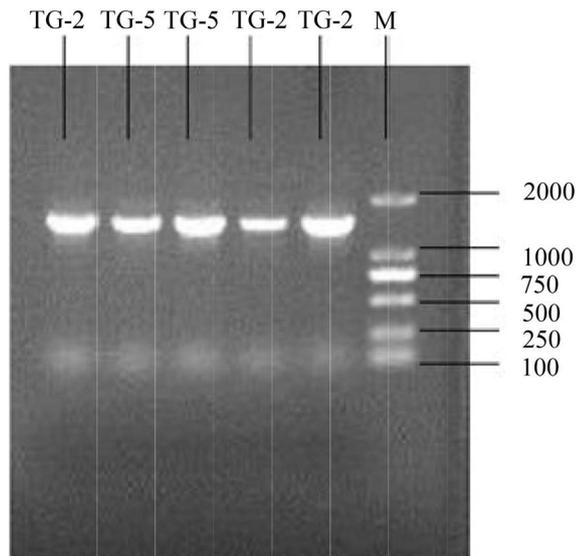


Figure 1. 16SrRNA PCR amplification results of TG-2 and TG-5 strains
图 1. TG-2、TG-5 菌株的 16SrRNA PCR 扩增结果

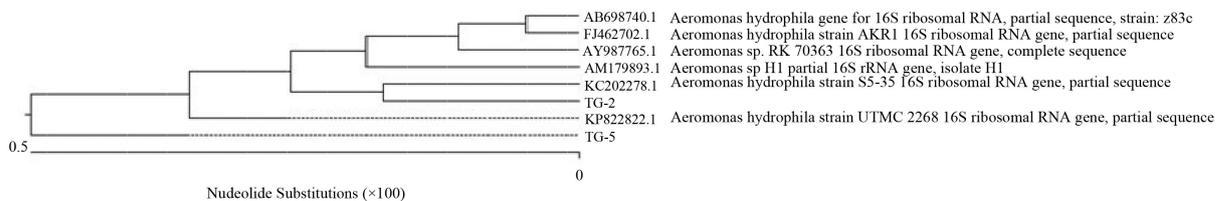


Figure 2. Phylogenetic tree of 16SrRNA gene sequence of TG-2 and TG-5
图 2. TG-2、TG-5 的 16SrRNA 基因序列系统发育树

3.4. 全自动生化鉴定结果

致病菌 TG-2、TG-5 均为革兰阴性需氧菌，所以采用 BIOFOSUN 革兰阴性需氧菌鉴定板，将其培养

了 24 h 后使用 BIOFOSUN 微生物鉴定药敏分析仪读取板条(见表 3、表 4、表 5)。根据 BIOFOSUN-GN48 鉴定板说明书[7]所知, 相似指数 $S \geq 0.5$, 可报告的种鉴定结果。相似指数 < 0.5 , 无鉴定结果。

Table 3. BIOFOSUN GN-48 identification result of TG-2

表 3. TG-2 BIOFOSUN GN-48 鉴定结果

底物	判定	底物	判定
水	-	蚁酸	+
土温 80	+	α -羟基丁酸	-
N-乙酰基-D-半乳糖胺	V+	β -羟基丁酸	-
树胶醛糖	V+	γ -羟基丁酸	-
D-阿糖醇	-	P-羟基苯乙酸	-
D-纤维二糖	-	D,L-乳酸	+
D-果糖	+	丙二酸	-
D-半乳糖	V+	砂糖酸	-
α -D-葡萄糖	+	酮戊二酸	+
甘油	+	L-丙氨酸	+
α -D-乳糖	-	L-丙氨酰-氨基乙酸	+
麦芽糖	+	L-天冬酰胺酸	+
D-甘露醇	+	L-谷氨酸	+
D-蜜二糖	-	L-组氨酸	+
β -甲基-D-葡萄糖苷	V+	羟基-L-脯氨酸	V-
D-阿洛酮糖	+	L-亮氨酸	-
D-棉子糖	-	L-焦谷氨酸	-
D-山梨醇-	I	D-丝氨酸	V+
蔗糖	+	γ -氨基丁酸	-
松二糖	-	肌苷	+
丙酮酸甲基脂	+	胸腺嘧啶脱氧核苷	+
琥珀酸单脂	I	腐胺	+
顺式乌头酸	-	D,L- α -甘油磷酸盐	+
柠檬酸	-	α -D-葡萄糖-1-磷酸盐	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“V+”为不相称阳性，“V-”为不相称阴性，“I”为中界。

Table 4. BIOFOSUN GN-48 identification result of TG-5

表 4. TG-5 BIOFOSUN GN-48 鉴定结果

底物	判定	底物	判定
水	-	蚁酸	-
土温 80	V-	α -羟基丁酸	-
N-乙酰基-D-半乳糖胺	+	β -羟基丁酸	-
树胶醛糖	+	γ -羟基丁酸	-

Continued

D-阿糖醇	-	P-羟基苯乙酸	-
D-纤维二糖	-	D,L-乳酸	+
D-果糖	+	丙二酸	-
D-半乳糖	+	砂糖酸	-
α -D-葡萄糖	+	酮戊二酸	-
甘油	+	L-丙氨酸	V-
α -D-乳糖	-	L-丙氨酰-氨基乙酸	-
麦芽糖	+	L-天冬酰胺酸	+
D-甘露醇	+	L-谷氨酸	+
D-蜜二糖	-	L-组氨酸	+
β -甲基-D-葡萄糖苷	+	羟基-L-脯氨酸	-
D-阿洛酮糖	+	L-亮氨酸	-
D-棉子糖	-	L-焦谷氨酸	-
D-山梨醇-	-	D-丝氨酸	+
蔗糖	+	γ -氨基丁酸	-
松二糖	-	肌苷	+
丙酮酸甲基脂	V-	胸腺嘧啶脱氧核苷	V-
琥珀酸单脂	V-	腐胺	-
顺式乌头酸	-	D,L- α -甘油磷酸盐	+
柠檬酸	-	α -D-葡萄糖-1-磷酸盐	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“V+”为不相称阳性，“V-”为不相称阴性，“I”为中界。

Table 5. Biochemical identification results of TG-2 and TG-5

表 5. TG-2、TG-5 生化鉴定结果

菌株	种类	概率	相似指数	距离指数
TG-2	类嗜水气单胞菌 DNA 第二组	61%	0.520	2.131
	嗜水气单胞菌 DNA 第一组	39%	0.334	2.278
	豚鼠气单胞菌 DNA 第四组	0%	0.000	5.396
TG-5	嗜水气单胞菌 DNA 第一组	79%	0.606	3.518
	中间气单胞菌 DNA 第 5B 组	16%	0.117	4.061
	类嗜水气单胞菌 DNA 第二组	2%	0.013	4.796

TG-2 的相似指数为 0.520，TG-5 的相似指数为 0.606。两者的指数都大于 0.5；因此，TG-2 为嗜水气单胞菌 DNA 第二组，TG-5 为嗜水气单胞菌 DNA 第一组；将 48 种生化反应对照《伯杰氏系统细菌学手册》气单胞菌种属(*Aeromonas*)，其结果为 TG-2 嗜水气单胞菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*)，TG-5 为嗜水气单胞菌无气亚种(*Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*)。

3.5. 药敏试验结果

药敏试验结果表明头孢他啶, 多粘菌素 B 对两种菌敏感, 其中头孢他啶敏感性最高。TG-2 对头孢哌酮, 头孢曲松的敏感性也较强(见表 6)。

Table 6. Drug sensitivity test results
表 6. 药物敏感性试验结果

药物名称	TG-2		TG-5	
	平均抑菌圈直径/mm	抑菌强度	平均抑菌圈直径/mm	抑菌强度
多粘菌素 B	12.83	S	13.83	S
复方新诺明	0	R	0	R
万古霉素	0	R	0	R
头孢唑林	0	R	0	R
哌拉西林	23.3	S	10	R
诺氟沙星	0	R	0	R
米诺环素	19.67	S	17.67	I
羧苄西林	0	R	0	R
氨苄西林	0	R	0	R
多西环素	14.67	I	0	R
四环素	14.67	I	0	R
新霉素	20.67	S	20.5	R
卡那霉素	22.5	S	0	R
庆大霉素	21.83	S	15.17	R
丁胺卡那	25.5	S	16	R
苯唑西林	0	R	0	R
头孢氨苄	0	R	0	R
头孢哌酮	32.83	S	8	R
头孢他啶	32.83	S	25.67	S
头孢曲松	34.67	S	0	R
头孢呋辛	25.67	S	0	R

注: R 表示耐药, I 表示中介, S 表示敏感。

3.6. 小鼠致病试验结果

TG-2 组小鼠出现轻微腹胀, 肠道充气, 壁薄, 轻微充血, 肝脏肿大出血, 有的肝脏部分泛白, 肾脏肿大, 胃壁较硬。TG-5 组小鼠与 TG-2 组的病理变化相似(见表 7)。

3.7. 美蛙致病试验结果

试验组发病蛙皮肤出现不同程度的溃烂, 腹部与四肢呈大片红色, 肛门和四肢部位明显。TG-2 菌株组解剖后腹腔有大量淡黄色腹水, 暴露于空气中呈胶冻样, 肝脏肿大出血, 有的表面有灰白色点状病灶,

脾肿大，肾充血肿胀。TG-5 菌株组解剖后肝脏肿大表面红黄相间，胃充血，脾肿大，肾边缘泛白(见表 8)。

Table 7. Pathogenic test in mice

表 7. 小鼠致病试验结果

组别	剂量(ml)	菌株	感染只数	每天死亡情况(d)						死亡率
				1	2	3	4	5	6-14	
试验组	0.2	TG-2	5	2	3	0	0	0	0	100%
		TG-5	5	2	2	1	0	0	0	100%
对照组	0.2	生理盐水	5	0	0	0	0	0	0	0%
空白组	0	无	5	0	0	0	0	0	0	0%

Table 8. Pathogenic test of frog

表 8. 美蛙致病试验结果

组别	剂量(ml)	菌株	感染只数	每天死亡情况(d)						死亡率
				1	2	3	4	5	6-14	
试验组	0.2	TG-2	10	0	1	4	1	1	0	70%
		TG-5	10	1	0	3	0	0	0	40%
对照组	0.2	生理盐水	10	0	0	0	0	0	0	0%
空白组		无	10	0	0	0	0	0	0	0%

3.8. 病理切片观察结果

接种 TG-2 与 TG-5 菌发病致死蛙的各脏器组织病理变化明显，但两株菌致死蛙病理症状之间无明显差异。通过对美蛙肝正常与病理组织切片的比较观察，可见(见图 3)：镜检肝细胞绝大部分坏死消失，肝细胞肿大，胞质溶解，空泡变性，肝细胞核浓缩、碎裂，肝细胞索分布紊乱、断裂，肝血窦扩张、融合，间质被炎性细胞浸润，肝脏中有大量的淤血、出血和坏死灶。对美蛙肾脏正常与病理组织切片的比较观察，可见(见图 4)：肾小囊腔扩张中间含有血浆和蛋白渗出物，上皮细胞肿大，广泛性的颗粒、空泡变性，胞核浓缩、碎裂。肾间质血管淤血、出血，炎性细胞浸润。肾小管管腔中不同程度存在渗出物和红细胞等物质。

4. 讨论

气单胞菌属(*Aeromonas*)包括：嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、豚鼠气单胞菌(*aeromonas caviae*)、维隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、中间气单胞菌(*Aeromonas media*)等共 14 个气单胞菌表型和 16 个基因种[8]。TG-2 与 TG-5 16srRNA 鉴定结果显示其两菌之间同源性 < 98.9%，进化树不在同一支，但均与嗜水气单胞菌 KC202278.1 号同源性为高，因此 TG-2 与 TG-5 为嗜水气单胞菌 DNA 不同组细菌。生理生化特性说明 TG-2 菌株为 β 溶血，葡萄糖产气；TG-5 菌株为 α 溶血，葡萄糖不产气以及如氧化酶试验呈阳性，能发酵葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖，L-丙氨酸、L-天冬酰胺酸、L-组氨酸、L-丝氨酸反应阳性等特征，并经查阅《伯杰氏系统细菌学手册》，TG-2 符合嗜水气单胞菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila subsp hydrophila*)，TG-5 符合嗜水气单胞菌无气亚种(*Aeromonas hydrophila subsp anaerogenes*)。

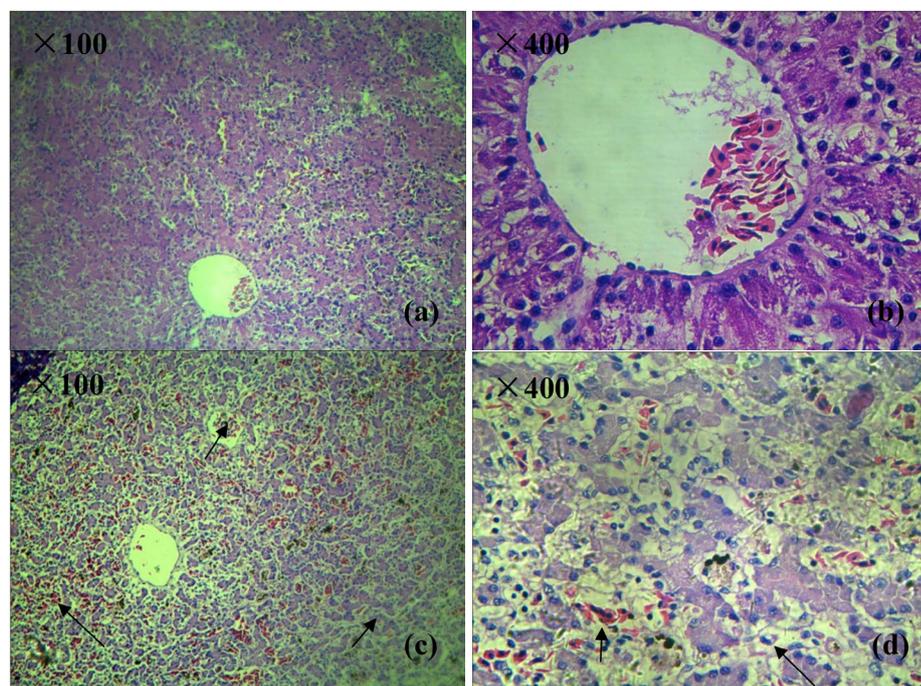


Figure 3. Histopathological characteristics of liver of diseased frog (HE staining). (a), (b) Healthy liver tissue; (c) Liver congestion, hemorrhage, disordered arrangement of hepatic cord; (d) Liver cell enlargement, vacuolar degeneration, cytolysis, nuclear concentration, fragmentation, hepatic sinusoidal dilatation

图 3. 患病美蛙肝脏病理组织学特征(HE 染色)。(a)、(b) 健康肝脏组织；(c) 肝脏淤血、出血，肝索排列紊乱；(d) 肝细胞肿大，空泡变性，胞质溶解，核浓缩、碎裂，肝血窦扩张

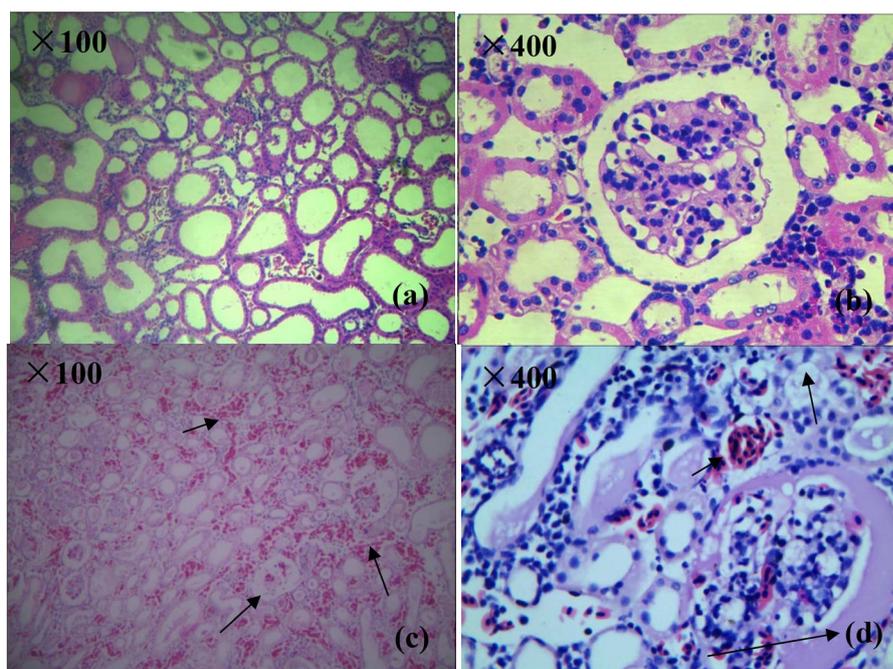


Figure 4. Histopathological characteristics of kidney of diseased frog (HE staining). (a), (b) Healthy kidney tissues; (c) congestion and hemorrhage of renal interstitial vessels, protein exudates in renal tubules; (d) enlargement of renal cysts, protein exudates, vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells, nuclear concentration and fragmentation

图 4. 患病美蛙肾脏病理组织学特征(HE 染色)。(a)、(b) 健康肾脏组织；(c) 肾间质血管淤血、出血，肾小管官腔内含蛋白渗出物；(d) 肾小囊肿腔扩大，内含蛋白渗出物，肾小管上皮细胞空泡变性，核浓缩、碎裂

由于不同菌株间的生理生化性状、血清型、基因型的差异,其致病性在表达毒力因子上也存在差异[9]。分离于大鲵体 TG-2 与 TG-5 的致病性不同。TG-2 与 TG-5 菌对鲫鱼、美蛙、小白鼠均可致死。TG-2 菌对鲫鱼致死率 80%、蛙 70%、小白鼠 100%; TG-5 菌对鲫鱼致死率达 70%、蛙 40%、小白鼠 100%。两菌株均能对鲫鱼、美蛙、小白鼠造成出血性病变,肝脏、肾脏与脾脏的病变较明显。张玉芬[10]对感染嗜水气单胞菌的鱼类病理变化的描述和孟彦[11]与钟蕾[12]对大鲵感染嗜水气单胞菌后的病例症状的描述与我们的结论相符。两菌株对美蛙的致死率较鱼和小白鼠低,可以说明美蛙对嗜水气单胞菌的抵抗力较鲫鱼、小白鼠强, TG-2 对动物的致病性更强,引起的败血症更为严重。美蛙和大鲵在自然环境下抵抗力较强,这一现象在实验室攻毒结果上亦可体现。

由于蛙与大鲵都为两栖动物,两者在生理结构生活特性等方面近似,大鲵为国家保护动物,资源非常珍贵,养殖大鲵因价格等因素限制了致病菌研究。本课题意图将美蛙作为大鲵的病原菌感染的实验动物模型进行探索,并通过感染死亡蛙的病理组织观察了解蛙和大鲵异同。感染后的美蛙临床病理症状显示皮肤溃疡,腹部与四肢出现大量红色出血点,腹水增多,泄殖孔出血,脾脏肿大,肝脏肿大黄色斑纹或白色坏死灶,肾肿大出血。宋婷婷[13]用嗜水气单胞菌感染棘胸蛙后,患病棘胸蛙体表泛白,肝脏发黑,无红腿症,其病理症状与嗜水气单胞菌感染美蛙不同,分析其原因可能与蛙品种不同有关。感染死亡的美蛙肝脏、肾脏病理切片显示肝细胞肿大,胞质溶解,空泡变性,细胞核浓缩、碎裂,肝索紊乱,出血,肝血窦扩张。肾间质出血,肾小囊扩张,充满蛋白渗出物,肾小管官腔出现渗出物,由此组织细胞病变导致肝脏肿大出血,肾脏充血肿胀。与资道荣[14]、于喆[15]报道牛蛙嗜水气单胞菌病理症状和病理切片相似。刘大志[16]在对感染嗜水气单胞菌的大鲵病理切片观察中发现大鲵肝细胞排列紊乱,肝细胞肿胀,肝血窦扩张,肝细胞空泡变性。肾间质出血,肾小管上皮细胞空泡变性,肾小管内有少量红细胞,肾小囊肿大,有少量红细胞和蛋白渗出物。与本试验中美蛙病理切片所观察到的结果相似。重庆大鲵嗜水气单胞菌致死大鲵的组织病理与接种大鲵源嗜水气单胞菌致死的美蛙组织病理学之间的关系有待进一步研究。

由 TG-2 与 TG-5 对 21 种抗生素敏感性的测定结果表明,两菌株的耐药性较高,特别是 TG-5 对试验所使用的 21 种抗生素中 18 种耐药。TG-2 与 TG-5 两种菌对头孢他啶、多粘菌素 B 敏感, TG-2 对头孢哌酮、头孢曲松、头孢他啶、米诺环素、多粘菌素 B 高度敏感。四环素类中多西环素、四环素,磺胺类中复方新诺明和喹诺酮类中诺氟沙星广谱, β -内酰胺类中半合成青霉素哌拉西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林等对革兰阴性杆菌有较强抑菌作用,但 TG-2 与 TG-5 菌的实验结果均为耐药,说明该养殖场的病死大鲵体内病原菌对哌拉西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林等药物产生了耐药。氨基糖苷类中新霉素、卡那霉素、庆大霉素、丁胺卡那对需氧革兰阴性杆菌作用强,而一代头孢对阴性菌效果弱,二、三代头孢较一代对阴性菌作用强,所以 TG-2 对氨基糖苷类和 β -内酰胺类中二、三代头孢敏感。从肖丹[17]、王宏博[18]、蔡丽娟[19]、童照威[20]等的嗜水气单胞菌耐药性研究中,均得出了嗜水气单胞菌对大多数 β -内酰胺类,喹诺酮类(主要为沙星类),复方新诺明,四环素类等药物耐药性较高,对氨基糖苷类(除开链霉素), β -内酰胺类中二、三代头孢等药物敏感的结果。嗜水气单胞菌多重耐药的菌株,会对大鲵生产和疾病治疗造成极大困难。因此临床若能运用药敏试验结果科学选用药物,制定合理治疗方案,对养殖生产具有重要的意义。

基金项目

国家科技支撑计划项目:黑龙江等流域冷水鱼健康养殖关键技术继承与示范(2012BAD25B10:2012BAD25B10-1),开州农委采购项目:大鲵病害防控研究技术服务(2015ZFCG150)。

参考文献

- [1] 文立华. 中国大鲵自然资源现状及管理对策[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(4): 1716-1718.
- [2] 高智玲, 纪雪, 陈萍, 郭学军, 刘军, 祝令伟, 周伟, 冯书章, 孙洋. 致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(4): 400-405+411.
- [3] 王旭, 颜其贵, 雷燕, 左兰, 曾晖. 中国大鲵腐皮病原菌的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(10): 944-948.
- [4] 沙莎, 宋振辉. 动物微生物实验教程[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 2011: 65-66.
- [5] 钟蕾, 刘晓燕, 陈开健, 文祝友. 牛蛙腐皮病的血液与组织病理学研究[J]. 水利渔业, 2006, 26(4): 90-91.
- [6] 朱诗应, 戚中田. 16SrDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J]. 微生物与感染, 2013, 8(2): 104-109.
- [7] 上海星佰生物技术有限公司革兰阴性需氧菌鉴定板说明书[Z]. 2011-07.
- [8] 谭凤霞, 柴毅. 基于 16S rDNA 序列的 4 株气单胞菌属细菌的分子鉴定[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(9): 1837-1843.
- [9] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报, 2008, 27(1): 78-86.
- [10] 张玉芬, 亢喜刚, 张秀军. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(26): 12389-12390.
- [11] 孟彦, 曾令兵, 杨焱清, 肖汉兵. 大鲵腹水病原菌的分离与鉴定研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(3): 77-81.
- [12] 钟蕾, 刘大志, 肖调义, 刘晓燕, 陈开健. 大鲵细菌性败血症病原分离及生物学特性研究[J]. 生物学杂志, 2012, 27(4): 11-14.
- [13] 宋婷婷, 郑荣泉, 张俊美, 颜志刚, 董宝娟, 赵蒙蒙. 一种棘胸蛙新类型疾病病原分析[J]. 福建水产, 2014, 36(5): 344-350.
- [14] 资道荣, 萧克宇, 王晓清, 郭照良, 蒋武成. 牛蛙红腿病主要器官的病理变化[J]. 湖南农学院学报, 1992(S3): 713-716.
- [15] 于喆, 江辉, 钟蕾, 肖克宇, 谭情, 毛盼. 大鲵细菌性感染综合症的病原分离与药敏试验分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2012, 35(6): 74-79.
- [16] 刘大志. 中国大鲵细菌性败血症的病原特性及组织病理变化研究[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [17] 肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 杨先乐. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 分型与耐药性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1092-1099.
- [18] 王宏博, 邢海楠, 廖麇, 李艳茹, 李太元. 常用抗生素对林蛙嗜水气单胞菌抑制效果的检测[J]. 延边大学农学报, 2013, 35(1): 47-50.
- [19] 蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 42-45.
- [20] 童照威, 张龙琪, 王伟洪, 施柏年. 嗜水气单胞菌感染现状及耐药分析[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(1): 75-76.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org