



广西地区美国牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定、 耐药性及组织病理

肖双燕¹, 韦冬冬¹, 刘明珠^{1,2}, 黄静¹,
余庆^{1,2}, 蒙兰丽^{3*}, 李鹏飞^{1,2*}

(1. 广西科学院广西海洋科学院, 广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室, 广西壮族自治区渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心, 广西南宁 530007;
2. 广西海洋科学院, 北部湾海洋产业研究院, 中国-东盟现代渔业产业技术转移示范中心, 广西南宁 530007;
3. 田东县水产技术推广站, 广西百色 531500)

摘要: 为了探明 2022 年 5 月在广西南宁某养殖基地引起美国牛蛙暴发疾病的原因, 本实验从患病美国牛蛙的肝脏、脾脏、肾脏和肠道中分离出优势菌, 采用形态学观察、生理生化实验、16S *rRNA* 基因序列测定及系统发育学分析进行鉴定。为确定该菌株的致病机理, 对该菌株进行了人工感染实验、组织病理学观察、毒力基因检测、药物敏感性实验以及耐药基因检测。结果显示, 在患病濒死美国牛蛙的肝脏、脾脏、肾脏以及肠道均分离到单一的优势菌株, 从肠道分离得到的一株优势菌被命名为 NFCF-02, 并经鉴定为弗氏柠檬酸杆菌。该菌株携带 *viaB*、*ompX*、*ureE*、*ureD*、*ureG* 和 *ureF* 等 6 种毒力基因, 对美国牛蛙的半数致死浓度为 3.12×10^6 CFU/mL, 发病临床症状包括肝脏变黄、花肝、肝脏坏死; 肾脏充血发红、胃表面有血丝以及肠道呈红色和充血。组织病理学观察发现, 其肝细胞变性坏死, 肝索排列紊乱; 肾小管上皮细胞肿胀坏死、严重区域肾小管崩解、坏死; 脾脏中央静脉扩张淤血, 含铁血黄素、色素细胞增多; 肠黏膜脱落, 肠上皮细胞坏死脱落, 杯状细胞坏死。药敏实验结果显示, 分离菌株 NFCF-02 对新霉素、多黏菌素 B、头孢拉定、多西环素等 4 种抗菌药物敏感, 对林可霉素等 14 种抗菌药物已产生耐药性, 携带 *gyrA*、*Sul1* 等 7 种耐药基因。研究表明, 弗氏柠檬酸杆菌对美国牛蛙具有高致病性, 可引起美国牛蛙肝脏和肠道等多器官组织的病理损伤, 最终引发机体的损伤甚至死亡。本研究首次从组织病理学分析和毒力因子携带情况的角度确定了弗氏柠檬酸杆菌对美国牛蛙的致病力, 为养殖美国牛蛙中弗氏柠檬酸杆菌病的诊断和药物防控提供了参考依据。

关键词: 美国牛蛙; 弗氏柠檬酸杆菌; 分离鉴定; 组织病理分析; 毒力因子; 耐药性

中图分类号: S 947.2

文献标志码: A

美国牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 在分类学上属于 其不仅肉质细腻, 味道鲜美, 营养丰富, 还可避免皮肤生疮毒, 促进伤口愈合, 提高食欲, 是世

收稿日期: 2023-04-10 修回日期: 2023-05-16

资助项目: 国家自然科学基金 (U20A20102); 广西自然科学基金 (2022GXNSFBA035521, AD23026331); 广西农业科技项目 (Z2022167); 国家现代农业产业技术体系 (nycytxgxcxt-2021-08-02)

第一作者: 肖双燕 (照片), 从事水生动物医学与水产生态健康养殖技术研究, E-mail: 15737954163@163.com

通信作者: 蒙兰丽, 从事水产养殖与病害防控研究, E-mail: mll54183@163.com;

李鹏飞, 从事水生动物医学与水产高效养殖技术研究, E-mail: pfl2014@126.com



界最受欢迎的大型食用蛙类, 平均体重可达 1 kg 以上。美国牛蛙于 20 世纪 50 年代从北美引入中国, 近年来美国牛蛙养殖业不断发展, 已成为我国养殖数量最多的两栖动物^[1]。2021 年全国年产量已超 50 万 t, 其中, 粤东、闽南一带年产量可达 20 多万 t, 养殖面出现由南向北扩散的趋势。随着国内美国牛蛙养殖集约化的不断发展, 美国牛蛙养殖单位面积产量显著增加, 导致由细菌和真菌引起的美国牛蛙病害频发, 已经报道的有摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)^[2]、达卡气单胞菌 (*Aeromonas dhakensis*)^[3]、米尔伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia miricola*)^[4-5]、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)^[6]、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)^[7] 等。

弗氏柠檬酸杆菌隶属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*)^[8]。该菌周身鞭毛和菌毛, 无荚膜, 为革兰氏阴性杆菌, 需氧或兼性厌氧, 在普通培养基上形成光滑、低凸、温润、半透明或不透明, 表面光泽, 边缘整齐的菌落, 且生存能力强, 是一种典型的人-畜-鱼共患的条件致病菌。动物和人感染致病性弗氏柠檬酸杆菌会发生腹泻、脑膜炎、脑脓肿、败血症和继发感染^[9-10]。弗氏柠檬酸杆菌引起动物致病甚至急性死亡报道较多, 如导致中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 腹腔有血水、肝脏肿大出血^[11]; 大鲵 (*Andrias davidianus*) 胃肠道出血, 四肢充血溃烂^[9]; 团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 鳔和肝脏严重出血, 肾脏、脾脏肿大等^[12]。尽管近年有关弗氏柠檬酸杆菌对水产动物致病的报道陆续增多, 但国内关于美国牛蛙感染弗氏柠檬酸杆菌的报道较少, 目前仅有 2 篇病原菌的分离鉴定和药物敏感性检测的文献^[7, 13], 有关美国牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌的组织病理学分析和毒力因子检测尚未进行报道。

2022 年 5 月, 南宁市某养殖场美国牛蛙出现大量死亡的现象, 主要症状表现为病蛙精神不振, 四肢软弱无力、行动迟缓、反应迟钝; 四肢及腹部出现红色出血点, 肝脏变黄呈现花斑状, 脾脏肿大发紫, 有腹水, 肠道脓肿出血, 患病率较高。为了查明病因, 本研究以症状明显的濒死美国牛蛙为研究材料, 进行病原菌分离鉴定, 对其携带的毒力基因及耐药基因进行检测, 同时进行药敏实验, 并开展人工回归感染实验和组织病理分析, 以期科学有效地防控美国牛蛙细菌性疾病提供依据, 为美国牛蛙病原学的研究奠定科学基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

患病美国牛蛙 (100~150 g/只) 和健康美国牛蛙 (15~20 g/只) 均由广西南宁市某美国牛蛙养殖场提供。LB 琼脂培养基购自广东环凯生物科技有限公司; 甲硝唑、大观霉素等 18 种药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司; API 20E 鉴定试剂条购自法国梅里埃公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。扩增引物均由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成。PCR 产物经纯化后由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

1.2 病原菌分离纯化及形态学观察

对送检症状明显、濒死的美国牛蛙, 无菌条件下采集其肝脏、脾脏、肾脏、肠道等组织, 采用三区划线接种法分离病原菌, 28 °C 培养 18~24 h, 然后挑取单个优势菌落连续纯化培养 3 次, 获得 1 株纯培养的细菌菌株 NFCF-02。4 °C 保存备用。并挑取分离培养的单菌落, 进行革兰氏染色、镜检。涉及蛙类的程序按照《动物研究: 体内实验报告指南》进行, 并经广西科学院伦理委员会批准。

1.3 病原菌的生理生化特性鉴定

将细菌接种于营养肉汤培养基中复壮, 取菌液, 使用 API 20E 生化试剂盒测定菌株 NFCF-02 的各项理化指标, 并记录结果。

1.4 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树分析

取分离菌, 使用细菌提取试剂盒 (广西南宁康维生物科技有限公司) 进行细菌 DNA 的提取。细菌 16S rRNA 基因通用引物由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1^[13]。反应体系为 25 μL, 反应条件参照柴静茹等^[14]的方法。以无菌水作为阴性对照。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司纯化并测序。将获得的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库, 进行 BLAST 序列比对分析, 然后利用 Megalign 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 通过 1 000 次 Bootstrap 检验其置信度。

1.5 人工回归感染实验与半数致死浓度 (LD₅₀) 测定

挑取分离菌株 NFCF-02 单菌落, 转接至 LB

液体培养基中, 180 r/min, 28 °C 条件下培养 24 h。离心后弃去上清液, 加无菌生理盐水振荡重悬后, 再次离心, 重复 3 次, 制成菌悬液, 将菌液分别以 10 倍比稀释至 3.75×10^8 、 3.75×10^7 、 3.75×10^6 、 3.75×10^5 、 3.75×10^4 CFU/mL 共 5 个浓度。实验前随机选取 5 尾实验室暂养 7 d 的健康美国牛蛙进行解剖, 并取内脏组织涂板, 进行病毒如蛙病毒 3 型 (FV3)、流行性造血器官坏死病毒 (EHNV) 的检测, 以确认其无细菌、病毒感染后选取健康、规格一致的美国牛蛙, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 进行人工感染实验, 实验组每只美国牛蛙腹腔注射 200 μ L 菌悬液, 对照组每只美国牛蛙腹腔注射 200 μ L 无菌生理盐水。攻毒后定时观察, 记录美国牛蛙的存活情况, 连续饲养观察 7 d, 每天观察病症, 记录美国牛蛙死亡率, 对濒死美国牛蛙进行解剖, 并对病灶区进行细菌分离。根据攻毒后不同浓度菌悬液下的死亡情况, 计算死亡率, LD₅₀ 值根据寇氏改良法^[15]进行计算。

1.6 毒力基因检测

为了进一步分析菌株 NCF-02 的致病性, 以“病原菌的生理生化特性鉴定”中提取的 DNA 为 PCR 模板, 参考文献^[16-17]选择外膜蛋白 (*ompX*)、定居因子 (*cfa*)、Vi 抗原 (*viaB*) 和尿素酶 (*ureG*、*ureF*、*ureE*、*ureD*) 共 7 个毒力相关基因, 合成特异性引物, 引物见表 1。

1.7 病理组织切片制备及观察

分别取人工回归感染实验组发病濒死的美国牛蛙和健康美国牛蛙的肝脏、肾脏、脾脏和肠道等组织, 用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定液进行固定, 然后进行石蜡包埋、切片、苏木精-伊红 (H.E) 染色, 在光学显微镜下观察其病理组织变化并拍照。

1.8 病原菌耐药性检测

病原菌药敏实验 采用 K-B 纸片扩散法, 将分离菌株用无菌生理盐水稀释至 1×10^8 CFU/mL, 将 100 μ L 菌液在 MHA 培养基涂布均匀后, 使用无菌镊子将药敏纸片均匀黏贴在琼脂表面, 28 °C 培养 24 h, 观察、测量并记录抑菌圈直径, 根据美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 的“抗菌药物敏感性试验执行标准”进行药物敏感性分析^[12]。

病原菌耐药基因检测 参照文献^[18-21]设计并合成细菌常见的 9 种耐药基因, 分别为 23S

表 1 目的基因扩增引物信息

Tab. 1 The primer sequences and size of PCR product			
基因 gene		PCR引物序列(5'-3') PCR primer sequence(5'-3')	片段大小/bp fragment length
16S <i>rRNA</i>	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
	R	TACGCTACCTTGTACGACTT	
<i>cfa</i>	F	GCGTTACTGGAAAGATG	345
	R	CGGCGATACTGAAATAGG	
<i>ureG</i>	F	AGGTTATCGCCACCGCTTTC	119
	R	GGTTGCCCGCATACTGCT	
<i>ureF</i>	F	ATGCCGAGAGTTGGCTGTC	300
	R	GGAGATTGGCTGGGTGAAAA	
<i>ureE</i>	F	TAACAGGCTTTGGCGAGTAGGA	215
	R	CGCCTTGACCACGCTCACT	
<i>ureD</i>	F	GCCAGATGTCACGCATAACG	243
	R	GGCTGCCACTGCTGATAGAA	
<i>viaB</i>	F	TGTCGAGCAGATGGATGAGCAT	516
	R	ACGGCTGAAGGTTACGGACCGA	
<i>ompX</i>	F	CTACGAATACGGCTCTGC	287
	R	ATCGGTTCTTCACTTACAC	

rRNA 甲基转移酶耐药基因 (*Cfr*)、氨基糖苷类耐药基因 [*Ant(3'')*]-I、磺胺类耐药基因 (*Sul1*、*Sul2*)、I 类整合子基因 (*int1*)、氟苯尼考类耐药基因 (*FexA*)、喹诺酮类耐药基因 (*gyrA*、*parC*、*qnrA*) 特异性引物 (表 2), 对分离菌基因组 DNA 进行 PCR 检测, PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 病原菌的形态学观察结果

在患病濒死美国牛蛙的肝脏、脾脏、肾脏、肠道均分离到单一的优势菌株, 从肠道分离得到的一株优势菌命名为 NCF-02, 分离菌株 NCF-02 在 LB 琼脂培养基上形成的菌落特征为正圆形、中央凸起、表面光滑且湿润。革兰氏染色镜检为紫红色短杆状, 两边钝圆的阴性菌 (图 1)。将优势菌株进行纯化, 命名为 NCF-02。

2.2 生理生化特性

采用 API 20E 细菌鉴定系统对 NCF-02 菌株进行生理生化鉴定, 结果见表 3, 与弗氏柠檬酸杆菌参考菌株的生理生化特性一致, 结合《伯杰氏细菌鉴定手册》^[22] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[23], 可判定分离菌株 NCF-02 为弗氏柠檬酸杆菌, 其鉴定值为 99.9%。

表 2 耐药基因引物信息

Tab. 2 Primers information of the resistance genes

基因 genes		引物序列 primersequences	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp ampliconsize
<i>Sul1</i>	F	5'-CGCACCGGAAACATCGCTGCAC-3'	56.3	163
	R	5'-TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG-3'		
<i>Sul2</i>	F	5'-TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG-3'	55	191
	R	5'-CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG-3'		
<i>int1</i>	F	5'-GGCTTCGTGATGCCTGCTT-3'	63	146
	R	5'-CATTCCTGGCCGTGGGTTTCT-3'		
<i>Cfr</i>	F	5'-TGTGCTACAGGCAACATTGGAT-3'	55	148
	R	5'-CAAATACTTGACGGTTGGCTAGAG-3'		
<i>Ant(3'')-I</i>	F	5'-TGATTTGCTGGTTACGGTGAC-3'	53	284
	R	5'-CGCTATGTTCTCTTGCTTTG-3'		
<i>FexA</i>	F	5'-ATTCTCCCGCAAATAACG-3'	52	156
	R	5'-TCGGCTCAGTAGCATCACG-3'		
<i>qnrA</i>	F	5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	56	516
	R	5'-GATCGGCAAAGGTYAGGTCA-3'		
<i>gyrA</i>	F	5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3'	56	648
	R	5'-TTAATGATTGCCGCCGTCGG-3'		
<i>parC</i>	F	5'-GTACGTGATCATGGACCGTG-3'	56	531
	R	5'-TCGGCTGGTCGATTAATGC-3'		

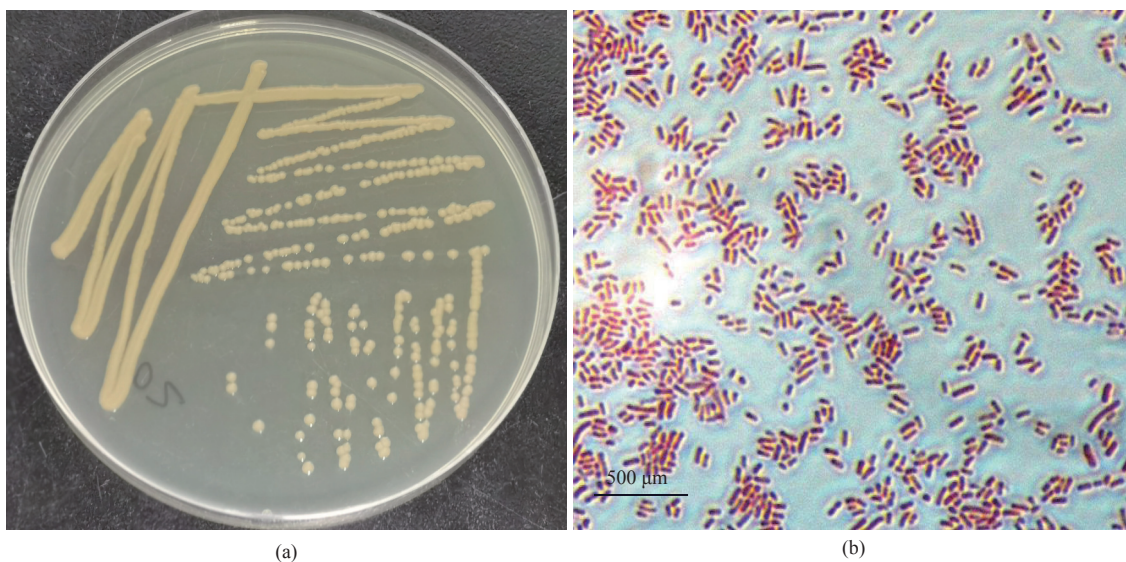


图 1 菌株 NCF-02 的形态特征

(a) 在 LB 培养基上的菌落形态, (b) 革兰氏染色镜检结果 (100×)。

Fig. 1 Morphological character of strain NCF-02

(a) colony morphology on the LB medium, (b) gram staining microscopy results (100×).

2.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果及系统发育分析

以分离菌株 NCF-02 的 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 序列基因 PCR 扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分别得到 1 500 bp 左右的清晰目的条带 (图 2)。测序结果显示, 基因序列长度约

1 434 bp。将扩增获得的 16S rRNA 序列在 NCBI 进行 BLAST 检索分析, 与已发表的弗氏柠檬酸杆菌相似性达 99% 以上。系统发育进化分析结果显示, 分离菌株 NCF-02 与弗氏柠檬酸杆菌聚为同一支, 亲缘关系最近 (图 3)。判定菌株 NCF-02 为弗氏柠檬酸杆菌。

表 3 病原菌 NFCF-02 生理生化特性鉴定结果

Tab. 3 Identification results of physiological and biochemical characteristics of pathogen NFCF-02					
测试项目 test item	菌株NFCF-02 strain NFCF-02	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	测试项目 test item	菌株NFCF-02 strain NFCF-02	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
邻硝基苯-半乳糖苷 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside	-	d	鼠李糖 <i>L</i> -rhamnose monohydrate	+	-
精氨酸 argininum	+	d	山梨醇 sorbitolum	+	-
赖氨酸 lysine	-	-	蔗糖 sucrose	+	+
鸟氨酸 ornithine	-	-	蜜二糖 melibiose	+	-
柠檬酸钠 sodium citrate	+	+	苦杏仁苷 amygdalin	-	+
硫代硫酸钠 sodium thiosulfate	+	+	阿拉伯糖 arabinose	+	-
脲素 urea	+	d	氧化酶 oxidase	-	+
色氨酸脱氨酶 tryptophan decarboxylase	-	-	二氧化氮 nitrogen dioxide	+	ND
色氨酸 tryptophan	-	-	氮气 nitrogen	-	ND
丙酮酸盐 pyruvate	-	-	MOB	+	ND
明胶 gelatin	-	-	McC	+	ND
葡萄糖 glucose	+	+	OF-O	+	ND
甘露醇 mannitol	+	+	OF-F	+	ND
肌醇 inositol	-	d	API20E鉴定	261457257	

注: +. 阳性; -. 阴性; d. 种间差异; ND. 没有相关数据。

Notes: +. positive reaction, -. negative reaction, d. interspecies differences, ND. means no determination.

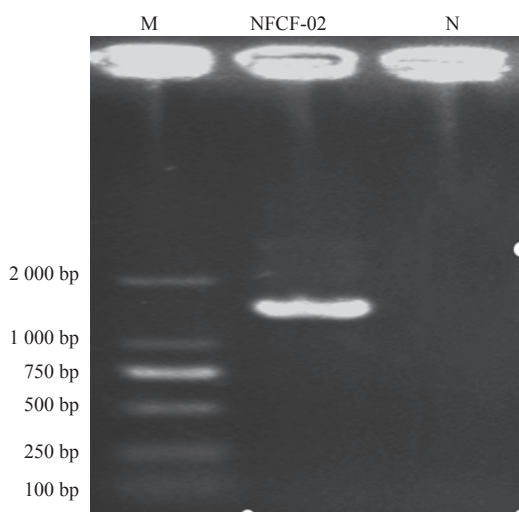


图 2 菌株 NFCF-02 16S *rRNA* 的 PCR 扩增产物电泳图

M. DL2000 标记, NFCF-02. 目标菌株, N. 阴性对照。

Fig. 2 16S *rRNA* of strain NFCF-02 by PCR amplification

M. DL2000 Marker, NFCF-02. target strain, N. negative control.

2.4 人工感染实验

对健康美国牛蛙进行腹腔注射病原菌 NFCF-02, 结果如图 4 所示, 对照组美国牛蛙在 7 d 内生长良好。攻毒浓度 3.75×10^8 CFU/mL 实验组美国牛蛙 3 d 内全部死亡, 攻毒浓度 3.75×10^8 、 3.75×10^7 、 3.75×10^6 、 3.75×10^5 和 3.75×10^4 CFU/mL 实验组美国牛蛙 7 d 内死亡率分别为 100%、70%、40%、20% 和 10%。根据寇氏改良法得到分离菌

株对美国牛蛙的 LD_{50} 为 3.12×10^6 CFU/mL。如图 5 所示, 人工感染的美国牛蛙腿部发红, 解剖发现胃充血发红、肠道出血, 肝脏颜色变浅, 肿大、坏死, 脾脏肿大、肾脏充血, 腹部及四肢有红色出血点 (图 5, 箭头 1), 其症状与自然发病症状基本一致, 且从被人工回归感染死亡的美牛蛙体内可分离到单一的原感染菌, 其形态、生理生化特性、16S *rRNA* 序列结果与此次患病美国牛蛙中的病原菌菌株一致。

2.5 毒力基因检测结果

致病菌株中广泛存在毒力因子, 为了进一步研究菌株 NFCF-02 的致病性与毒力因子分布的相关性, 对其进行了 7 种毒力基因的检测。结果显示, 病原菌 NFCF-02 携带外膜蛋白 (*ompX*)、尿素酶 (*ureG*、*ureF*、*ureE*、*ureD*)、Vi 抗原 (*viaB*) 这 6 种毒力基因, 扩增片段与目的片段大小相符合, 但不携带定居因子基因 (*cfa*) (图 6)。所检测 7 种毒力基因的基因型为 *ompX*⁺ *-ureE*⁺ *-viaB*⁺ *-ureD*⁺ *-ureG*⁺ *-cfa*⁻ *-ureF*⁺。

2.6 病理切片观察

感染弗氏柠檬酸杆菌的美国牛蛙主要受损器官为肝脏、脾脏、肾脏和肠道。患病美国牛蛙肝脏肝索变宽, 排列错乱, 肝细胞肿大, 胞浆出现细小颗粒, 胞浆疏松呈网状, 有炎性细胞浸润,

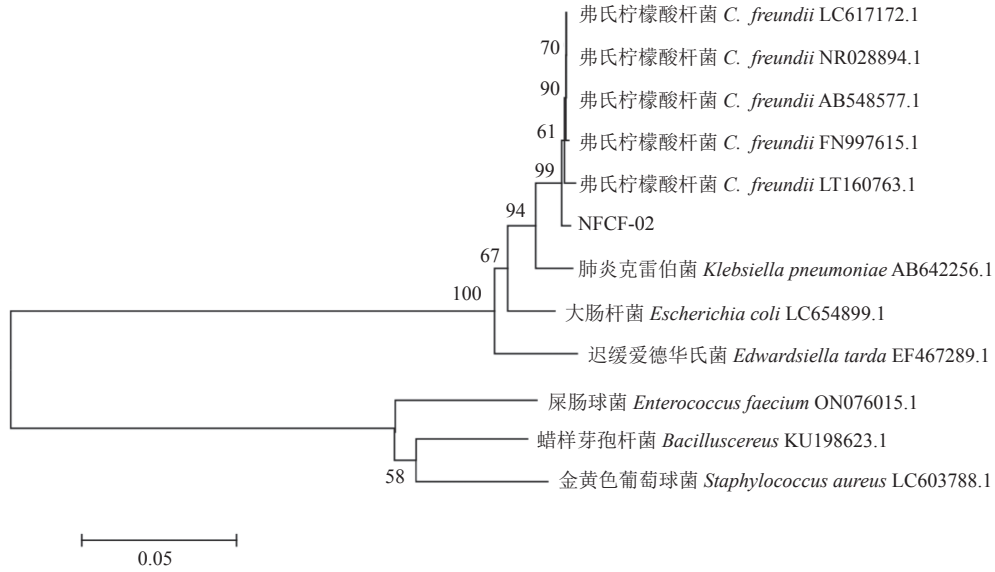


图3 基于 16S rRNA 序列相似性构建的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences similarity

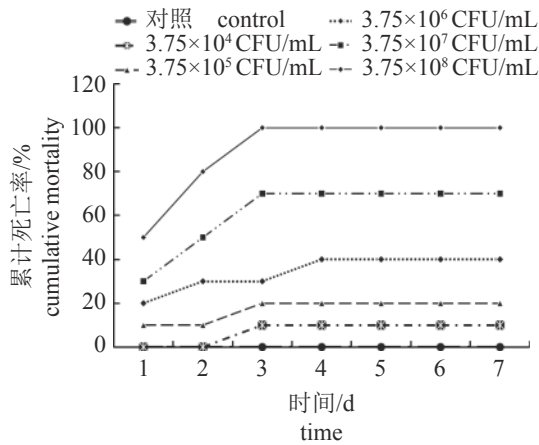


图4 菌株 NFCF-02 感染后的美国牛蛙累计死亡率

Fig. 4 Cumulative mortality rate of *R. catesbeiana* infected by strain NFCF-02



图5 人工回归感染发病美国牛蛙的剖检结果

(a) 正常美国牛蛙, (b) 患病美国牛蛙。黑色箭头 1~5 所指依次为人工感染发病美国牛蛙的大腿出现红色出血点、肝脏颜色变浅、胃充血、肠道有血栓、肾脏充血。

Fig. 5 Retrospective necropsy results of infected *R. catesbeiana*

(a) normal bullfrog, (b) diseased bullfrog. The black arrows 1-5 point to the red bleeding point in the thigh, the lighter liver color, stomach congestion, intestinal blood and pus, and kidney congestion in the artificially infected bullfrog.

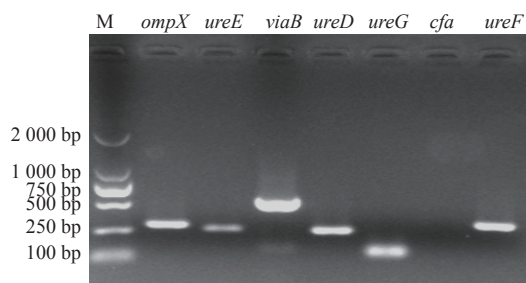


图 6 NFCF-02 菌株的毒力因子 PCR 扩增电泳结果

Fig. 6 Results of PCR amplification and electrophoresis of virulence factor of NFCF-02 strain

M. DL2000 Marker.

素类、头孢菌素类、糖肽类抗生素敏感, 对 β -内酰胺类、喹诺酮类、氯霉素类、大环内酯类、林可霉素类抗生素均有耐药性 (表 4)。此现象表明, 在美国牛蛙病害防治过程中, 由于抗生素的不合

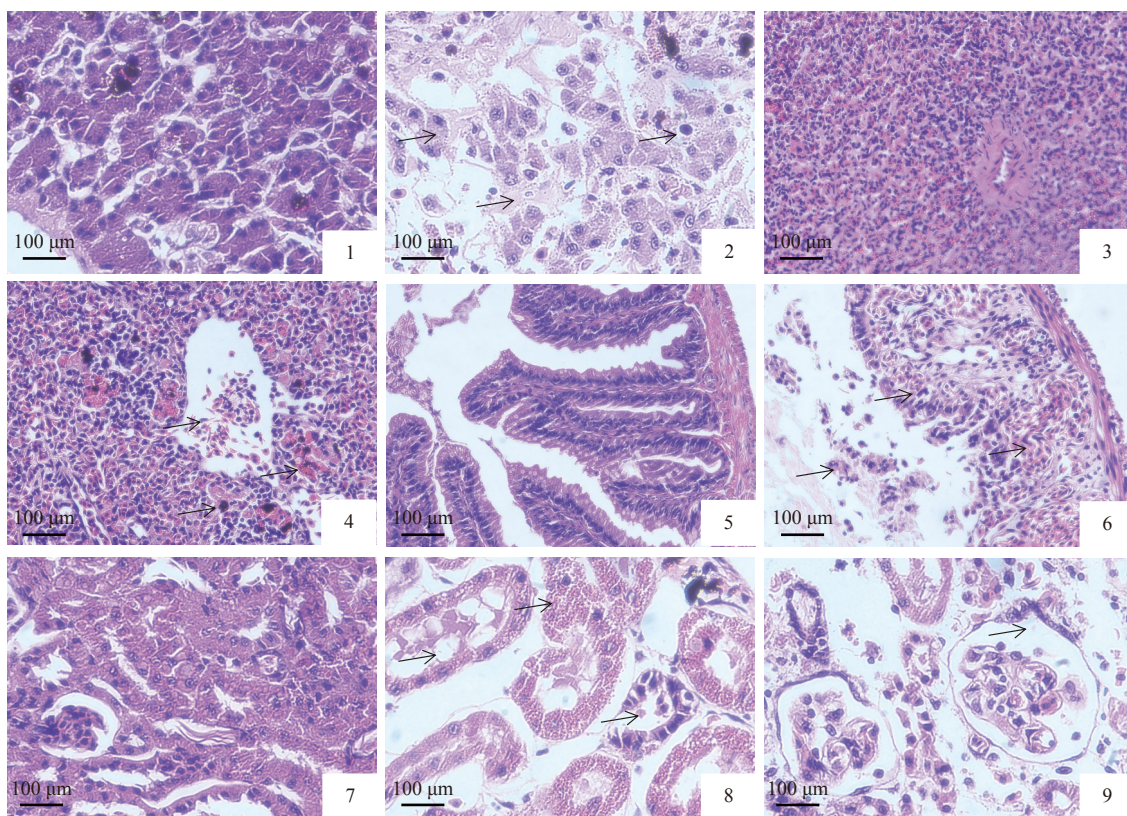
理利用, 导致包括弗氏柠檬酸杆菌在内的某些病原菌对多种抗生素产生耐药性, 并且情况不容乐观。针对本研究中所用菌株来说, 该菌已表现出多重耐药性。

病原菌耐药基因检测结果 为了进一步分析菌株 NFCF-02 对抗生素耐药性与其携带的耐药基因的关系, 采用 PCR 方法对 9 种耐药基因进行扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 分离菌携带有 *parC*、*qnrS*、*gyrA*、*Sul1*、*Sul1* 和 *intI1*、*Ant(3'')-I* 等 7 种耐药基因, 未携带 *FexA*、*cfr* 这 2 种耐药基因 (图 7)。

3 讨论

3.1 弗氏柠檬酸杆菌的致病力

弗氏柠檬酸杆菌是动物和人肠道内的正常菌



图版 美国牛蛙感染弗氏柠檬酸杆菌后的病理组织学观察结果

1. 正常美国牛蛙肝脏 (400 \times); 2. 肝索排列错乱, 肝细胞变性坏死 (400 \times); 3. 正常美国牛蛙脾脏 (400 \times); 4. 脾脏中央静脉扩张淤血 (400 \times); 5. 正常美国牛蛙肠道 (200 \times); 6. 肠上皮坏死, 脱落, 肠黏膜脱落, 肠绒毛坏死脱落 (200 \times); 7. 正常美国牛蛙肾脏 (400 \times); 8. 肾小管管腔变大, 上皮细胞崩解, 胞浆有红色颗粒 (400 \times); 9. 肾小球萎缩 (400 \times)。病变特征以黑色箭头标注。

Plate Pathohistological observation of *R. catesbeiana* infected with *C. freundii*

1. normal bullfrog liver (400 \times); 2. liver cord deranged, hepatocyte denatured and necrotized (400 \times); 3. normal bullfrog spleen (400 \times); 4. central splenic venous dilated and congested (400 \times); 5. normal bullfrog intestines (200 \times); 6. intestinal epithelium necrosis, shed, intestinal mucosa shed, intestinal villi necrotized and shed (200 \times); 7. normal bullfrog kidney (400 \times); 8. renal tubule lumen enlarged, epithelial cells disintegrated, cytoplasm has red granules (400 \times); 9. glomerular atrophy (400 \times). Lesion features marked with black arrows.

表 4 NFCF-02 菌株药物敏感性实验结果

Tab. 4 Antibiotic susceptibility of the strain NFCF-02

抗生素种类 antibiotics categories		药物名称 drug names	药物含量/片 contents	抑菌圈直径判断标准/mm standard of inhibition zone			抑菌圈直径/mm diameter of inhibitory zone	敏感性 sensitivity
药物种类 drug categories	耐药 resistant			中度敏感 medium sensitive	敏感 sensitive			
β-内酰胺类 β-lactamantibiotics	阿莫西林	10 μg	≤13	14~17	≥18	0	R	
	青霉素	10 IU	≤19	20~27	≥28	0	R	
氨基糖苷 aminoglycosides	庆大霉素	10 μg	≤12	13~14	≥15	0	R	
	新霉素	30 μg	≤12	13~16	≥17	26	S	
	大观霉素	10 μg	≤14	15~17	≥18	14	R	
	卡那霉素	30 μg	≤13	14~17	≥18	14	I	
	链霉素	10 μg	≤11	13~14	≥15	9	R	
喹诺酮类 quinolones	恩诺沙星	5 μg	≤16	17~22	≥23	10	R	
	氧氟沙星	5 μg	≤12	13~15	≥16	10	R	
	环丙沙星	5 μg	≤15	16~20	≥21	0	R	
	诺氟沙星	10 μg	≤12	13~16	≥17	14	I	
氯霉素类 chloramphenicols	氟苯尼考	30 μg	≤12	13~17	≥18	15	I	
	甲硝唑	5 μg	≤12	13~17	≥18	0	R	
四环素类 tetracyclines	多西环素	30 μg	≤12	13~15	≥16	17	S	
头孢菌素类 cephalosporins	头孢拉定	30 μg	≤14	15~17	≥18	18	S	
大环内酯类 macrolides	罗红霉素	15 μg	≤14	15~17	≥18	0	R	
糖肽类 glycopeptides	多黏菌素B	300 IU	≤11	12~13	≥14	21	S	
林可霉素类 lincomycin	林可霉素	10 μg	≤14	15~21	≥21	0	R	

注：“S”表示高度敏感；“M”表示中度敏感；“R”表示耐药。
Notes: S. highly susceptible; M. moderately susceptible; R. resistant.

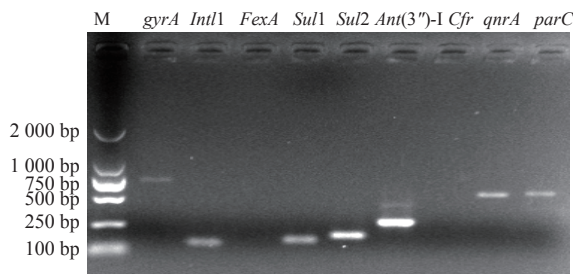


图 7 NFCF-02 菌株的耐药基因 PCR 扩增电泳结果

Fig. 7 Results of PCR amplification and electrophoresis of resistance genes of NFCF-02 strain

M. DL2000Marker.

群, 普遍分布在自然环境中, 如土壤、水、污水及食物等, 是一种典型的人-畜-鱼共患病条件性致病菌, 养殖环境恶化时, 弗氏柠檬酸杆菌侵入养殖动物体内, 会大量生长繁殖, 产生毒力因子, 导致疾病的暴发。

本实验对引起广西人工养殖美国牛蛙暴发性死亡的病原进行研究。在患病濒死美国牛蛙的肝

脏、脾脏、肾脏、肠道均分离到单一的优势菌株, 纯化培养后, 经鉴定表明分离菌为同种细菌。将从肠道分离得到的一株优势菌命名为 NFCF-02, 综合形态学观察、生理生化特性和基于 16S *rRNA* 基因的分子鉴定以及动物回归感染实验结果, 确定此次引起美国牛蛙暴发疾病的病原是弗氏柠檬酸杆菌。为确定分离菌对健康美国牛蛙的致病性, 对分离菌株进行了动物回归感染实验, 结果显示, 分离菌株 NFCF-02 对美国牛蛙的 LD_{50} 为 3.12×10^6 CFU/mL, 具有较高的致病力。苏英等^[11]从患病的大鲵上分离获得致病性弗氏柠檬酸杆菌 *int1705*, 其 LD_{50} 为 3.16×10^6 CFU/mL。李晓英等^[24]从患病的棘腹蛙 (*Quasipaa boulengeri*) 上分离获得致病性弗氏柠檬酸杆菌 CQWU201501, 其 LD_{50} 为 2.14×10^5 CFU/mL。可见不同的弗氏柠檬酸杆菌致病力强弱不同。

细菌致病力强弱的主要决定因素是毒力因子, 弗氏柠檬酸杆菌主要毒力因子有定居因子、尿素

酶、肠毒素、外膜蛋白等。当病原菌暴露于小肠时, 它通过定居因子定植于肠上皮细胞, 定植后的病原菌在肠上皮细胞上增殖, 产生并传递热不稳定 (LT) 和/或热稳定 (ST) 肠毒素, 以发挥毒性作用^[25-26]。脲酶蛋白包括结构蛋白 (UreA、UreB 和 UreC) 和辅助蛋白 (UreD/UreH、UreE、UreF 和 UreG), 它们在脲酶成熟过程中各有其独特的作用。尿素酶催化尿素水解成二氧化碳和氨, 导致局部 pH 升高, 对宿主细胞有氨毒性并造成直接的组织损伤^[27]。OmpX 是一种外膜蛋白, 能够与宿主细胞表面的表皮生长因子受体 (EGFR) 和细胞外基质蛋白纤维连接蛋白结合, 保护细菌抵抗机体的补体反应, 参与细菌对细胞的黏附侵袭, 影响细菌的生长、运动、附着等方面的功能^[28]。以往的研究表明, 弗氏柠檬酸杆菌可以从荚膜多糖毒力抗原中获得毒素, 如 *viaB* 基因, Vi 抗原是与细菌的毒力和致病力相关的荚膜多糖抗原, 其表达由 3 个染色体位点 *viaA*、*viaB* 和 *ompB* 控制, 该基因被调控产生可变的 Vi 抗原表达, Vi 抗原与细菌毒力相关, 具有 Vi 抗原的菌体有抗吞噬和保护菌体抵抗相应抗体在补体参与下的溶菌作用, 逃避宿主体内各种防御机制, 从而增强了菌株的侵袭性和致病力^[29]。因此, 本研究对分离株 NFCF-02 进行了包括 *viaB*、*cfa*、*ompX*、*ureE*、*ureD*、*ureG*、*ureF* 等 7 种弗氏柠檬酸杆菌在致病过程中起着重要作用的毒力基因进行检测, 结果显示, NFCF-02 菌株携带上述除 *cfa* 以外的其余 6 个毒力基因, 说明分离菌株的强致病性可能与这些毒力相关基因的表达有关。

3.2 弗氏柠檬酸杆菌感染两栖类的临床症状及组织病理学特征

感染弗氏柠檬酸杆菌的两栖类动物的临床症状主要表现为行动迟缓、精神不振, 摄食减少甚至停止摄食, 肝脏肿大、出血, 胃肠道红肿, 出血, 肾脏充血发红, 四肢及腹部皮肤发红等^[10, 30-32]。本研究中美国牛蛙感染弗氏柠檬酸杆菌症状表现为食欲减退, 腿部有红色斑点, 肝脏变为黄色、呈花斑状、肿大、坏死, 胃肠道红肿、充满血脉, 肾脏充血。宝小雪等^[13]研究发现, 美国牛蛙感染弗氏柠檬酸杆菌出现精神不振, 食欲减退, 肠道发红且血脉充血, 腹部肿大有腹水的症状, 这与本实验中人工回归感染的美国牛蛙的临床症状基本相似, 本实验中美国牛蛙未出现腹部肿大

有腹水的症状, 这可能是养殖条件不同的原因。组织学检查发现, 弗氏柠檬酸杆菌感染的美国牛蛙表现出明显的肝脏、脾脏、肾脏、和肠道病变。脾脏的病变情况与中华鳖^[32]感染弗氏柠檬酸杆菌的报道症状相似, 肝细胞破坏严重、肝索紊乱, 肝基本组织结构模糊。脾脏、肾脏、肠道病变情况与已报道的感染弗氏柠檬酸杆菌红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*)、中华鳖的症状存在差异^[30, 32], 本研究肝脏、肠道基本组织结构均破坏的更为严重, 肝细胞严重变性, 只余肝脏组织网状结构和细胞碎片, 有炎性细胞浸润。肾脏中肾小球和肾小管失去原有的组织结构, 崩解、破裂; 患病美国牛蛙肠壁被严重破坏, 肠黏膜溃烂、坏死, 肠上皮坏死, 崩解, 脱落至肠腔内, 肠绒毛大部分坏死脱落, 杯状细胞坏死, 黏膜固有层露出大量红细胞, 仅存的一些结构也不完整。肠道、肝脏和肾脏病变均较为严重。已有研究表明弗氏柠檬酸杆菌不仅感染动物肠道, 毒力较强的菌株可以穿过肠黏膜^[32], 在宿主体内传播, 随着血液循环进入全身各内脏组织, 导致内脏发生变性和坏死。这可能是造成肝脏、脾脏、肾脏、肠道等器官同时病变的原因之一。

3.3 弗氏柠檬酸杆菌的耐药性

抗菌药物目前仍是水产养殖生产中的常用的防治细菌感染的主要手段, 长期单一使用某种抗生素就会导致弗氏柠檬酸杆菌产生耐药性, 并且因不同地域用药习惯不同以及不同水产动物用药情况不同, 分离株的耐药性也存在差异^[33]。杨移斌等^[34]从浙江省衢州市施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 中分离的弗氏柠檬酸杆菌显示出对链霉素、庆大霉素、氟苯尼考高度敏感, 对头孢拉定不敏感。冯艺等^[35]从广东三水市罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中分离的弗氏柠檬酸杆菌的药敏性研究显示, 该菌对阿莫西林、恩诺沙星、氟苯尼考高度敏感, 对多黏菌素 B 不敏感。Deng 等^[36]从湖北荆州养殖中华鲟 (*A. sinensis*) 中分离的弗氏柠檬酸杆菌则对环丙沙星、诺氟沙星敏感。本研究药敏实验结果显示, 蛙源弗氏柠檬酸杆菌分离株 NFCF-02 对青霉素、庆大霉素、环丙沙星等众多药物表现出高度耐药性, 虽然对新霉素、头孢拉定、多西环素、多黏菌素 B 等药物敏感。但头孢拉定、多黏菌素 B 不属于农业农村部渔业渔政管理局下发的《水产养殖用药明白纸 2022 年 1 号》

和《水产养殖用明白纸 2022 年 2 号》文件中已批准的水产养殖用兽药, 不宜选用。

绝大多数细菌的耐药性与耐药基因产生、获得和表达有关。细菌耐药基因可从环境中获得, 也可通过自身发生耐药突变产生, 耐药基因可垂直传递给后代, 也可在种属间传播^[37]。本研究在分离菌株 NFCF-02 中检测出了喹诺酮类耐药基因 *parC*、*qnrS*、*gyrA*, 磺胺类耐药基因 *Sul1*、*Sul2*, I 类整合子基因 *int1* 和氨基糖苷类耐药基因 *Ant(3'')-I* 等 7 种耐药基因。而本实验未检测出 23S *rRNA* 甲基转移酶耐药基因 *Cfr* 和氟苯尼考类耐药基因 *FexA*, 耐药表型与耐药基因不是完全对应, 这可能是不同耐药基因在不同细菌中的相对拷贝数不同或者是存在其他因素介导的耐药。以上结果提示, 弗氏柠檬酸杆菌显示出严重的多重耐药现象, 且已产生相应的耐药基因, 因此在今后的养殖过程中应合理使用抗菌药物, 逐步减少抗菌药物的使用量, 降低抗菌药物进入环境中的量, 减少细菌耐药性的发生, 同时要着力研发新型的抗菌药, 达到有效预防和治疗细菌感染的目的, 使用中草药可能是一种潜在的有效方法^[38-39]。

4 结论

本实验从患病美国牛蛙体内分离得到一株致病菌弗氏柠檬酸杆菌, 其对美国牛蛙的半数致死浓度为 3.12×10^6 CFU/mL, 可造成美国牛蛙肝脏、脾脏、肾脏、肠道组织不同程度的病变。菌株 NFCF-02 携带 *viaB*、*ureG* 和 *ompX* 等 6 种毒力基因, 对新霉素、多西环素、多黏菌素 B、头孢拉定等 4 种药物敏感, 对林可霉素和卡那霉素等 14 种抗菌药物耐药, 且携带 *qnrS*、*gyrA*、*Sul1* 等 7 种耐药基因, 已具有多重耐药性。本实验首次报道了广西地区美国牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌毒力因子携带情况及组织病理学分析, 为养殖美国牛蛙过程中细菌疾病的防控提供了理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Yang Y B, Zhu X, Zhang H X, et al. *Vibrio cholerae* was found in cultured bullfrog[J]. *Epidemiology and Infection*, 2022, 150: e30.
- [2] Wei D D, Xiao S Y, Liao W Y, et al. The occurrence of *Morganella morganii* caused large death in cultured

American bullfrog (*Rana catesbeiana*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 568: 739343.

- [3] 潘纪汶, 王昕, 杨诺, 等. 美国牛蛙源达卡气单胞菌的分离鉴定及毒力特性分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53(3): 77-83.
- Pan J W, Wang X, Yang N, et al. Isolation, identification and virulence analysis of *Aeromonas dhakensis* from *Rana catesbeiana*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(3): 77-83 (in Chinese).
- [4] 向圣汉, 赵雨贺, 彭治鑫, 等. 美国牛蛙源米尔伊丽莎白菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. *水产学杂志*, 2023, 36(4): 83-88.
- Xiang S H, Zhao Y H, Peng Z X, et al. Isolation, identification drug susceptibility of pathogenic *Elizabethkingia miricola* from diseased bullfrog *Rana catesbeiana*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2023, 36(4): 83-88 (in Chinese).
- [5] 刘琦涛, 黄志艺, 孙延杰, 等. 美国牛蛙致病性阴沟肠杆菌的分离、鉴定和药敏分析 [J]. *韩山师范学院学报*, 2021, 42(3): 44-49.
- Liu Q T, Huang Z Y, Sun Y J, et al. Isolation, identification and drug susceptibility analysis of pathogenic *Enterobacter cloacae* in *Rana catesbeiana*[J]. *Journal of Hanshan Normal University*, 2021, 42(3): 44-49 (in Chinese).
- [6] Wei D D, Cheng Y, Xiao S Y, et al. Natural occurrences and characterization of *Elizabethkingia miricola* infection in cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*)[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1094050.
- [7] 黄志艺, 谢丽琴, 许嘉龙, 等. 美国牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定和药敏分析 [J]. *韩山师范学院学报*, 2022, 43(6): 45-51,73.
- Huang Z Y, Xie L Q, Xu J L, et al. Isolation, identification and antibiotics susceptibility analysis of *Citrobacter freundii* from *Rana catesbeiana*[J]. *Journal of Hanshan Normal University*, 2022, 43(6): 45-51,73 (in Chinese).
- [8] Wan K H, Park S, Hess B M, et al. Complete genome sequence of the *Citrobacter freundii* type strain[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9(19): e00240-20.
- [9] Choudhuri I, Khanra K, Maity P, et al. Structure and biological properties of exopolysaccharide isolated from *Citrobacter freundii*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 168: 537-549.
- [10] 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 等. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定 [J]. *中国水产科学*, 2010, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 17(4): 859-868.
- Hu G Z, Li D F, Su X R, *et al.* Isolation and identification of bacteria from soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) associated with fulminant septicaemia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 859-868 (in Chinese).
- [11] 苏英, 吴荣华, 申君宇, 等. 大鲵源致病性弗氏柠檬酸杆菌的分离、鉴定和药物敏感性 [J]. 淡水渔业, 2019, 49(4): 56-61.
- Su Y, Wu R H, Shen J Y, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity analysis of pathogenic *Citrobacter freundii* from *Andrias davidianus*[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(4): 56-61 (in Chinese).
- [12] 田佳鑫, 张冬星, 康元环, 等. 团头鲂致病嗜水气单胞菌的分离鉴定与毒力基因的检测及耐药分析 [J]. 中国兽医科学, 2017, 47(1): 100-108.
- Tian J X, Zhang D X, Kang Y H, *et al.* Isolation and identification, virulence factor detection and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Megalobrama amblycephala*[J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(1): 100-108 (in Chinese).
- [13] 宝小雪, 刘华, 余莹英, 等. 美国牛蛙源迟缓爱德华氏菌和弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(1): 122-125, 129.
- Bao X X, Liu H, Yu Y Y, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of bullfrog-derived *Edwardsiella tarda* and *Citrobacter freundii*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(1): 122-125, 129 (in Chinese).
- [14] 柴静茹, 王荻, 卢彤岩, 等. 虹鳟源嗜冷黄杆菌的分离鉴定及致病性 [J]. 水产学报, 2021, 45(6): 929-939.
- Chai J R, Wang D, Lu T Y, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* from *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 929-939 (in Chinese).
- [15] 尚琨, 曲凌云, 王玉芬, 等. 患腹水病牙鲆病原菌分离、鉴定及病原菌的特性 [J]. 水产学报, 2020, 44(2): 266-275.
- Shang K, Qu L Y, Wang Y F, *et al.* Isolation, identification and characteristics of pathogenic bacteria from *Paralichthys olivaceus* with ascites[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 266-275 (in Chinese).
- [16] 苗珍, 李席席, 高晓建, 等. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及其毒力基因检测 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(10): 85-90.
- Miao Z, Li X X, Gao X J, *et al.* Identification and virulence genes detection of pathogenic *Citrobacter freundii* isolated from *Eriocheir sinensis*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(10): 85-90 (in Chinese).
- [17] Guma S, Jiang Z Y, Zhang Y J, *et al.* The pathogenic characterization of *Citrobacter freundii* and its activation on immune related genes in *Macrobrachium nipponense*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 169: 105682.
- [18] 胡安东, 张明洋, 张飘, 等. 鲤源嗜水气单胞菌分离鉴定、耐药性及毒力基因检测 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 2167-2175.
- Hu A D, Zhang M Y, Zhang P, *et al.* Isolation, identification, drug resistance and virulence genes detection of *Aeromonas hydrophila* from carp[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(7): 2167-2175 (in Chinese).
- [19] 黄伟德, 肖双燕, 黎姗梅, 等. 广西凡纳滨对虾源副溶血弧菌耐药性和耐药基因的检测 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(9): 1979-1988.
- Huang W D, Xiao S Y, Li S M, *et al.* Detection of antibiotics resistance and resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* from *Litopenaeus vannamei* of Guangxi[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2018, 31(9): 1979-1988 (in Chinese).
- [20] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D F, *et al.* qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(8): 2872-2874.
- [21] Galani I, Souli M, Mitchell N, *et al.* Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates possessing *bla_{VIM-1}* in Greece[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36(3): 252-254.
- [22] 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.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual for the identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [23] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1995 (in Chinese).
- [24] 李晓英, 罗洁, 杜孝田, 等. 棘腹蛙“水肿病”病原的分离鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37(8): 116-119.
- Li X Y, Luo J, Du X T, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria caused “edema disease” in *Paa boulengeri*[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016,

- 37(8): 116-119 (in Chinese).
- [25] Zhang Y C, Tan P, Zhao Y, *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2055943.
- [26] Madhavan T P V, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2015, 90: 155-197.
- [27] Grahl M V C, Uberti A F, Broll V, *et al.* *Proteus mirabilis* urease: unsuspected non-enzymatic properties relevant to pathogenicity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7205.
- [28] Zhou G, Wang Y S, Peng H, *et al.* *ompX* contribute to biofilm formation, osmotic response and swimming motility in *Citrobacter werkmanii*[J]. *Gene*, 2023, 851: 147019.
- [29] Mohammed M, Vignaud M L, Cadel-Six S. Whole-genome sequences of two *Salmonella enterica* serovar dublin strains that harbor the *viaA*, *viaB*, and *ompB* loci of the vi antigen[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(14): e00028-19.
- [30] 罗福丽, 牛宇宸, 胡秀彩, 等. 巴西龟弗氏柠檬酸杆菌病的临床症状及组织病理观察 [J]. *天津农学院学报*, 2020, 27(2): 44-47.
- Luo F L, Niu Y C, Hu X C, *et al.* Clinical signs and histochemical observation of *Citrobacter freundii* disease in turtle (*Trachemys scripta elegans*)[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2020, 27(2): 44-47 (in Chinese).
- [31] 薛巧, 赵战勤, 刘会胜, 等. 弗氏柠檬酸杆菌对动物和人致病性研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2015, 36(7): 81-85.
- Xue Q, Zhao Z Q, Liu H S, *et al.* Progress on *Citrobacter freundii* pathogenicity in animals and humans[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(7): 81-85 (in Chinese).
- [32] 黄莉萍, 安莉丽, 李芳, 等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及病理组织观察 [J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(7): 1176-1186.
- Huang L P, An L L, Li F, *et al.* Identification and pathological observation of *Citrobacter freundii* from *Pelodiscus sinensis*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(7): 1176-1186 (in Chinese).
- [33] 钟为铭, 彭芳, 陈康勇, 等. 黑斑蛙蝌蚪出血病原菌的分离鉴定及药物敏感性 [J]. *水产学报*, 2022, 46(1): 107-115.
- Zhong W M, Peng F, Chen K Y, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogen causing hemorrhagic disease of *Rana nigromaculata* tadpole[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(1): 107-115 (in Chinese).
- [34] 杨移斌, 夏永涛, 赵蕾, 等. 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, 37(4): 766-771.
- Yang Y B, Xia Y T, Zhao L, *et al.* Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt) and its antibiotic sensitivity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 766-771 (in Chinese).
- [35] 冯艺, 杨树浩, 杨映, 等. 罗氏沼虾费氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏分析 [J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(11): 1411-1417.
- Feng Y, Yang S H, Yang Y, *et al.* Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased *Giant freshwater prawn* (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(11): 1411-1417 (in Chinese).
- [36] Deng D, Mu Z Z, Lv X Y, *et al.* Pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Citrobacter freundii* isolated from the endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 173: 105818.
- [37] 赵秋云, 袁富威, 刘瑞琪, 等. 细菌耐药性产生的分子机制及对细菌毒力的影响研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(2): 71-74.
- Zhao Q Y, Yuan F W, Liu R Q, *et al.* Progress on molecular mechanism of bacterial drug resistance and its effect on bacterial virulence[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(2): 71-74 (in Chinese).
- [38] 李鹏飞, 刘明珠, 肖贺贺, 等. 药用植物在水产养殖动物病原防控中的应用进展 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(7): 2015-2024.
- Li P F, Liu M Z, Xiao H H, *et al.* Application of medicinal plants in prevention and control of aquatic animal pathogens[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(7): 2015-2024 (in Chinese).
- [39] 李鹏飞, 余庆, 罗永巨, 等. 广西水产疫病防控技术体系建设与水产养殖业高质化生态发展展望 [J]. *广西科学院学报*, 2019, 35(3): 161-165.
- Li P F, Yu Q, Luo Y J, *et al.* Aquatic diseases control technical system construction and prospects for high-quality ecological development of aquaculture in Guangxi, China[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(3): 161-165 (in Chinese).

Isolation, identification, drug resistance and histopathology of *Citrobacter freundii* from bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Guangxi

XIAO Shuangyan¹, WEI Dongdong¹, LIU Mingzhu^{1,2}, HUANG Jing¹,
YU Qing^{1,2}, MENG Lanli^{3*}, LI Pengfei^{1,2*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Biotechnology and Modern Ecological Aquaculture, Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and Efficient Healthy Breeding Industrial Technology (GERCFT), Guangxi Academy of Marine Sciences, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;

2. China-ASEAN Modern Fishery Industry Technology Transfer Demonstration Center, Beibu Gulf Marine Industrial Research Institute, Guangxi Academy of Marine Sciences, Nanning 530007, China;

3. Tiandong Fisheries Technology Extension Station, Baise 531500, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the cause of a disease outbreak in bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at a breeding base in Nanning, Guangxi in May 2022. The dominant bacterial colonies were isolated from the liver, spleen, kidney and intestine tissues of diseased *R. catesbeiana*, and identified using morphological observation, physiological and biochemical experiments, 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis. To determine the pathogenic mechanism of these dominant bacteria, artificial infection experiments, histopathological observations, drug sensitivity experiments, virulence gene and resistance gene testing were conducted. The results showed that a single dominant strain was isolated from the liver, spleen, kidneys, and intestines of the critically ill *R. catesbeiana*. The dominant strain isolated from the intestine was named NFCF-02 and identified as *Citrobacter freundii*. This strain carried six virulence genes, *viaB*, *ompX*, *ureE*, *ureD*, *ureG*, and *ureF*, with a half-lethal concentration of 3.12×10^6 CFU/mL. The *R. catesbeiana* infected with *C. freundii* presented the symptoms of liver changing to yellow and necrosis, kidney congestion and redness, blood streaks on the surface of the stomach, and blood pus in intestines. Histopathological observation revealed degeneration and necrosis of liver cells, with disordered arrangement of liver cords. Meanwhile, swelling and necrosis of renal tubular epithelial cells, severe tubular collapse and necrosis in severe areas, and splenic central vein dilation and congestion with an increase in hemosiderin and pigment cells were also observed. Besides, intestinal mucosal detachment, necrosis and detachment of intestinal epithelial cells, and necrosis of goblet cells were also the symptoms in *R. catesbeiana* infected with *C. freundii*. *C. freundii* was sensitive to neomycin, polymyxin B, cefradine, and doxycycline, while it has developed resistance to 14 antibiotics, including lincomycin, and carries 7 resistance genes such as *gyrA* and *Sul1*. In summary, *C. freundii* has high pathogenicity to bullfrogs, causing pathological damage to multiple organ tissues and even death of the *R. catesbeiana*. This study is the first to determine the pathogenicity of *C. freundii* to *R. catesbeiana* from the perspective of histopathological analysis and virulence factor carrying, which can provide reference for the diagnosis and drug control of *C. freundii* disease in farmed *R. catesbeiana*.

Key words: *Rana catesbeiana*; *Citrobacter freundii*; isolation and identification; histopathological analysis; virulence factors; drug resistance

Corresponding authors: MENG Lanli. E-mail: mll54183@163.com;

LI Pengfei. E-mail: pfli2014@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U20A20102); Guangxi Natural Science Foundation (2022GXNSFBA035521, AD23026331); Guangxi Agricultural Science and Technology Project (Z2022167); National Modern Agricultural Industry Technology System Guangxi Innovation Team Project (nycytxgxcxtd-2021-08-02)