

文章编号: 1004 - 7271(2001)01 - 0016 - 06

## 虎纹蛙白内障病原的分离鉴定及其免疫防治

周永灿<sup>1</sup>, 朱传华<sup>2</sup>, 陈国华<sup>1</sup>, 苏文强<sup>1</sup>, 唐泽锋<sup>1</sup>

(1. 海南大学水产系, 海南海口 570228; 2. 中国水产科学院南海水产研究所, 广东广州 510300)

**摘要:** 本文报道了海南养殖虎纹蛙白内障病的病原及其免疫学防治方法。对该典型患病个体进行病原分离并鉴定表明, 被分离出的病原为脑膜炎败血黄杆菌。在所实验的 20 种抗菌药物中, 该菌只对万古霉素敏感, 对头孢哌酮中度敏感, 而对其他 18 种药物均不敏感。通过筛选该病原强毒株制备甲醛灭活疫苗, 对健康虎纹蛙进行免疫接种后, 可明显提高其对该病的抵抗能力, 表明在生产上用免疫学方法防治该病是可行的。

**关键词:** 虎纹蛙; 脑膜炎败血黄杆菌; 白内障病; 免疫; 病原菌

**中图分类号:** S947.2      **文献标识码:** A

### Isolation and identification of pathogen of the cataract disease and its immunological control in *Rana tigrina rugulosa*

ZHOU Yong-can<sup>1</sup>, ZHU Chuan-hua<sup>2</sup>, CHEN Guo-hua<sup>1</sup>, SU Wen-qiang<sup>1</sup>, TANG Ze-feng<sup>1</sup>

(1. Fishery Department, Haikou 570228, China; 2. South China Sea Fisheries Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** This paper reports the pathogen and the immunological protective method of the cataract disease in cultured *Rana tigrina rugulosa* in Hainan. The pathogen isolated from the ill frog with typical characteristics was identified as *Flavobacterium meningitidis*. In all the 20 kinds of antimicrobial agents tested in this experiment, only vancomycin is susceptible and cefoperazone is intermediate susceptible to the pathogen, as to the other 18 kinds of antimicrobics are unsusceptible. After inoculation the health frogs with the vaccine prepared from the formalin killed *Flavobacterium meningitidis*, their sera agglutination titer and resistance to cataract disease improved obviously. It shows that the cataract disease in cultured *Rana tigrina rugulosa* can be successfully prevented by the vaccine.

**Key words:** *Rana tigrina rugulosa*; *Flavobacterium meningitidis*; cataract disease; immunology; pathogen

蛙类是一种高蛋白低脂肪低热量低胆固醇的营养保健品, 因其味道鲜美, 一直倍受人们青睐<sup>[1]</sup>。自 90 年代以来, 蛙的人工养殖在全国各地陆续开展, 养殖种类包括牛蛙 (*Rana catesbeiana*)、美国青蛙 (*R. grylio*)、黑斑蛙 (*R. goniath*)、棘胸蛙 (*R. spinosa*)、林蛙 (*R. sylvatica*) 和虎纹蛙 (*R. tigrina rugulosa*) 等。由于人工养蛙投资少、效益高、操作简便, 是家庭式养殖的良好对象, 现已成为我国特种水产养殖的重要组成部分。然而, 随着近年来人工养蛙规模的高速发展, 加上因家庭式养殖在技术、养殖管理和疾病防治措施等方面存在的严重不足, 导致各种蛙病在全国各地相继发生, 造成了巨大的经济损失。目前, 已报道的蛙病<sup>[1-7]</sup>有近 20 种(表 1)。

收稿日期: 2000-10-30

第一作者: 周永灿(1968-), 男, 江西吉安人, 水生生物病害学博士, 副研究员。Tel: 0898-6251609; E-mail: zychou@public.hk.hi.cn

表 1 我国养殖蛙类的常见疾病

Tab.1 The common diseases of frog in China

疾病种类	病原	主要症状	出处	疾病种类	病原	主要症状	出处
白内障病	醋酸钙不动杆菌	眼睛白内障	[2,4]	爱得华氏菌病	爱得华氏菌	腹胀、皮充血	[5]
红腿病	嗜水气单胞菌	后肢红肿	[3,4]	温和气单胞菌病	温和气单胞菌	腹部点状出血	[5]
肠胃炎	肠型点状气单胞菌	缩头弓背	[3]	水霉病	水霉菌	有白色菌丝	[3,6]
烂皮病	醋酸钙不动杆菌	体表腐烂	[3,5]	鳃霉病	鳃霉菌	鳃苍白或出血	[1,3]
腹水病	嗜水气单胞菌	腹部膨胀	[1,5]	车轮虫病	车轮虫	体表有灰色斑	[3,7]
脑炎病	脑膜炎败血黄杆菌	歪脖子、腹胀	[4]	斜管虫病	斜管虫	体表黄褐色	[3]
链球菌病	链球菌	粘液中带血丝	[1,4]	复口吸虫病	复口吸虫	眼睛发炎	[1]
烂鳃病	加尔梭杆菌	鳃丝白或烂	[1,3]	锚头蚤病	锚头蚤	体表有虫寄生	[3,7]
肝肾红肿病	产气单胞菌	肝肾充血肿大	[1,4]				

海南自 1997 年开始发展虎纹蛙的人工养殖,到 1999 年底,已有养殖蛙池 5 万余口(每口蛙池面积约 13m<sup>2</sup>),年产量近万吨,产值 2 亿余元,在海南东北部的许多市县,已有许多村庄成为因养蛙而全面脱贫致富的养蛙村。但是,自 1999 年开始,海南养殖虎纹蛙的病害也越来越严重,其中,最为常见、造成经济损失最大的蛙病为白内障病。本文对引起该病的病原进行了分离鉴定,并初步探讨了应用免疫学防治该病的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

患病虎纹蛙:现场取材于海南琼山市大致坡镇龙玉青蛙养殖场,选取白内障病的典型患病个体。

健康虎纹蛙:由海南琼山市灵山镇大胜虎纹蛙养殖场提供,在无病区的养殖池内选取重量为 50~100g 的健康个体。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细菌分离

取典型白内障病虎纹蛙,用接种环分别从其眼、脑、血、肝和腹水取材,取材过程在无菌室中以无菌操作进行:患病眼球先用消毒酒精表面消毒后再用经灼烧的刀片切开,用接种环从切开部插入取材;用经灼烧消毒的解剖刀从颈椎处将病蛙头部断开,再用消毒酒精将断开的颈椎口消毒,用接种环从椎管插入脑腔从脑部取材;血液从心脏取材;肝脏用眼球取材相似的方法消毒并切开后从中央部取材。取材后分别于普通营养琼脂培养基上划线接种,28℃培养,选单菌落经纯培养后转接于斜面备用。

#### 1.2.2 病原菌确定

将各分离的细菌以  $1 \times 10^8$  个/mL 的浓度对健康蛙以每只 0.1mL 肌肉注射攻毒,用 pH 7.2 的无菌磷酸缓冲液(PBS)作对照。对 15d 内能产生典型白内障病症状的感染蛙再进行细菌分离,若所分离的细菌与从现场病蛙中分离的细菌一致,则确定该菌为虎纹蛙白内障病的致病菌。

#### 1.2.3 病原菌鉴定

用广东环凯微生物科技公司生产的细菌检测试剂盒检测,根据文献[8]确定病原菌的种类。

#### 1.2.4 药敏试验

以纸片法检测,药敏纸片为中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心的产品。经 28℃ 培养 24h 后测量抑菌圈大小并确定其对各种药物的敏感性。

#### 1.2.5 虎纹蛙白内障病疫苗的制备

经感染实验筛选出病原菌强毒株,按常规方法以 0.4% 甲醛制备成的灭活疫苗<sup>[9]</sup>,并用 PBS 配制成  $1 \times 10^{10}$  个/mL 的浓度,4℃ 保存。使用前再用 PBS 稀释 10 倍。

#### 1.2.6 疫苗的安全性检测

分别以平板涂布法和肌肉注射攻毒试验确定所制备疫苗中是否有活菌存在及其对接种虎纹蛙的安全性。

### 1.2.7 疫苗的免疫效果检测

实验分注射组、口服组、喷雾组和对照组,每组 100 只。注射组为每只肌肉注射  $1 \times 10^9$  个/mL 的白内障病疫苗 0.1 mL;口服组为连续 3d 每天投喂 1 次含有 1% 的  $1 \times 10^9$  个/mL 的疫苗和普通蛙料;喷雾组为连续 3d 每天向 100 只试验蛙体表喷射  $1 \times 10^9$  个/mL 的疫苗 10 mL,喷雾前将池水放干,喷雾后让蛙干置 30 min 再进水;对照组为每只肌肉注射 0.2 mL 的无菌 PBS。免疫后第 2 周、第 4 周、第 6 周、第 8 周,每组随机取 3 只蛙心脏取血并离心制备血清,用微量血凝板法检测平均凝集抗体效价<sup>[9]</sup>;免疫后第 5 周和第 8 周,每组分别随机取 20 只蛙以  $1 \times 10^8$  个/mL 的活病原菌攻毒,检测其 30d 内的成活率。

## 2 结果

### 2.1 虎纹蛙白内障病的主要症状

白内障病是目前海南养殖虎纹蛙最常见的流行病,在海南各地均有发生,并可对包括蝌蚪期在内的各个时期的虎纹蛙造成危害。病蛙最明显的症状为一个或两个眼球变白(白内障),出现白内障的眼球视力丧失,但解剖眼球发现其晶状体仍然完整。此外,病蛙另一常见症状为身体间歇性弯曲(歪脖子),慢性患病个体在晚期还因产生大量腹水而出现腹部膨胀。

### 2.2 病原菌的分离与确定

对病蛙的眼、血、肝、脾、肌肉、大脑和脊髓等组织检查均未发现寄生虫。

从眼、脑、血、肝和腹水等部位取材培养 24h 后,在所有实验平皿的培养基上都长出了大量的细菌(500~1000 个以上);但用相同方法从健康虎纹蛙中取材培养后,在培养基上基本没有菌落出现。在从病蛙不同部位分离出来的菌落中,根据菌落形态可分为 2 种,其中,99-12-03 号菌占总菌数的 95% 以上(大脑和眼球中占 100%),99-12-04 号菌只占不到总菌数的 5%。攻毒实验表明,注射 99-12-03 号菌的所有实验蛙在 10d 内均出现白内障病症状,并从其眼和脑等部位分离出了同样菌落特征的细菌;而注射 99-12-04 号菌的所有实验蛙在 15d 内一切正常。说明 99-12-03 号菌是引起海南养殖虎纹蛙白内障病的致病菌,而 99-12-04 号菌株为非致病菌。

### 2.3 病原菌的种类鉴定

在普通营养琼脂培养基上,虎纹蛙白内障病致病菌(99-12-03 号菌)形成的菌落呈正圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,微凸,质地较软,不透明,乳白色;28℃ 培养 24h 后菌落直径为 2~3mm。表 2 对该菌的生理生化检测分析结果表明,该菌细胞色素氧化酶和氧化酶阳性,精氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶阴性;能利用七叶苷,不利用 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-半乳糖和蔗糖等几乎所有糖类。该菌与在福建等地养殖牛蛙中发现的“白内障病”病原——醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)相比,在运动性、细胞色素氧化酶、柠檬酸盐利用等方面均有显著不同<sup>[1]</sup>,经查阅文献[8]确定,本研究分离的虎纹蛙白内障病 99-12-03 号菌为脑膜炎败血黄杆菌(*Flavobacterium meningitidis*)。

### 2.4 虎纹蛙白内障病病原菌对不同化学药物的敏感性检测

表 3 的结果表明,虎纹蛙白内障病病原菌对绝大多数抗菌药物均表现出极强的抗性。在所检测的 20 种药物中,有 16 种的药敏纸片没有任何抑菌圈;有 2 种药敏纸片虽有抑菌圈,但其直径分别只有 9mm 和 10mm,根据“抑菌圈直径判断标准”也为不敏感;只有含头孢哌酮的药敏纸片对该病菌“中度敏感”、含万古霉素的药敏纸片对该病菌“敏感”。

### 2.5 虎纹蛙白内障病疫苗的制备及其安全性检测

将所制备的疫苗在普通营养琼脂培养基 48h 后,培养基上无细菌生长,表明其中已不含活菌。肌肉注射检测结果表明,所有注射疫苗和无菌 PBS 的健康虎纹蛙在实验的 15d 内都生长正常,进一步说明该疫

苗对虎纹蛙是安全无毒的。

表 2 99-12-03 菌的形态和生理生化特征及与醋酸钙不动杆菌的比较  
Tab.2 Morphological, physiological and biochemical characteristics comparisons between the pathogen 99-12-03 and *Acinetobacter calcoaceticus*

菌株性状	醋酸钙不动杆菌	99-12-03 号菌	脑膜炎败血黄杆菌	菌株性状	醋酸钙不动杆菌	99-12-03 号菌	脑膜炎败血黄杆菌
革兰氏染色	-	-	-	产淀粉酶	-	-	-
运动性	-	+	+	产明胶酶	+	+	+
固体培养基上:游动	-	-	-	精氨酸脱羧酶	-	-	-
直杆		+	+	赖氨酸脱羧酶	-	-	-
色素:				鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
橘黄色		-	-	ONPG 水解		+	+
蓝黑色		-	-	TCBS 上生长		G	G
红色		-	-	D-木糖	-	-	-
精氨酸双水解酶		-	-	L-阿拉伯糖		-	-
氧化酶	-	+	+	D-甘露糖		-	-
接触酶	+	+	+	D-半乳糖		-	-
还原 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 为 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		-	-	蔗糖		-	-
发光		-	-	海藻糖		-	-
从 D-葡萄糖产气		-	-	纤维二糖		-	-
V.P. 反应	-	-	-	乳糖		-	-
甲基红(MR)	-	-	-	棉子糖		-	-
生长在:				水杨素		-	+ W
4°C	-	-	-	D-葡萄糖酸		-	-
30°C	+	+	+	D-甘露醇		-	-
40°C	-	-	-	D-III梨醇		-	-
吲哚产生		-	-	肌醇		-	-
硝酸盐产气	-	-	-	卫芽醇		-	-
葡萄糖胺		+	+	L-鼠李糖		-	-
尿素(脲酶产生)	+	+	+	D-葡萄糖(O/F)	+ W	- / -	- / -
丙二酸盐		+	+	D-糖果		-	-
亚硝酸盐产气		-	-	麦芽糖	+ W	-	-
H <sub>2</sub> S 产生	-	-	-	七叶苷		+	+
苯丙氨酸脱氨酶	+ W	+	+	侧金盏花醇		-	+ W
柠檬酸盐利用	+	-	-				

注:“+”示阳性;“-”示阴性;“+ w”示弱阳性,且迟缓;“G”示绿色;空项处示未做检查。其中,99-12-03 的结果为 28°C 培养 7d 后观察的结果,即为迟缓性发酵。

表 3 不同抗菌药物对虎纹蛙白内障病原的抗菌活性  
Tab.3 The antimicrobial sensitivity of the pathogen of cataract disease on different kinds of antimicrobial agents

抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性	抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性
青霉素	无	-	头孢唑新	无	-
链霉素	无	-	头孢他啶	无	-
红霉素	无	-	头孢哌酮	19	+
氯霉素	无	-	氟喹酸	无	-
四环素	无	-	氟哌酸	无	-
克林霉素	9	-	丙氟哌酸	10	-
卡那霉素	无	-	咪喃妥因	无	-
庆大霉素	无	-	咪喃唑酮	无	-
万古霉素	20	++	磺胺异恶唑	无	-
阿齐霉素	无	-	氨基南	无	-

注:“-”表示不敏感;“+”表示中度敏感;“++”表示敏感。

## 2.6 虎纹蛙白内障病疫苗的免疫保护效果

用不同方法对虎纹蛙接种白内障病疫苗后,其血清凝集抗体效价在第2至第8周都比对照组有显著升高。在三种免疫接种方法中,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(表4)。不过,与肌肉注射法相比,口服免疫法和喷雾免疫法的最高凝集抗体效价出现较晚,因此,用这些方法接种疫苗后,需要有较长的时间才能发挥免疫保护作用。

表4 不同方法接种白内障病疫苗的血清凝集抗体效价  
Tab.4 The sera agglutination titer after inoculated the vaccine against cataract disease

免疫方式	检测数量	平均体 重/g	免疫后各周的平均凝集抗体效价			
			第2周	第4周	第6周	第8周
肌肉注射免疫	3	68	53.3	426.7	256	170.7
口服免疫	3	61	8	10.7	16	10.7
喷雾免疫	3	64	32	170.7	256	128
对照组	3	65	<4	<4	<4	<4

表5的结果表明,在接种疫苗后第5周和第8周进行攻毒时,注射免疫法和喷雾免疫法都可对免疫虎纹蛙提供良好保护,其成活率均在95%以上;而口服免疫组的成活率则分别只有35%和20%,其免疫保护效果虽比对照组稍好,但明显比注射法和喷雾法差。

表5 虎纹蛙接种疫苗后对脑膜炎败血黄杆菌的防御效果  
Tab.5 The protective immunogenicity of *Rana tigrina rugulosa* after inoculated with the vaccine against cataract disease

攻毒时间	攻毒后30d内的成活率(%)			
	肌肉注射免疫组	口服免疫组	喷雾免疫组	对照组
第5周	95	35	95	10
第8周	100	20	95	0

## 3 讨论

蛙白内障病是以患病个体眼睛出现白内障的外观症状命名的疾病。在水生动物中,引起眼球出现白内障的原因有寄生虫性的,也有细菌性的。在养殖鱼类中常常有因复口吸虫的尾蚴和囊蚴等寄生引起的白内障病<sup>[10]</sup>;而在福建等地的养殖牛蛙中,也有因醋酸钙不动杆菌感染而引起的白内障病<sup>[11,14]</sup>。为了确定海南养殖虎纹蛙白内障病的病原,我们首先对患病虎纹蛙进行了寄生虫检查,在确定该病不是因为寄生虫感染而引起之后,再对病蛙进行细菌分离并将所分离的细菌对健康虎纹蛙攻毒感染,从而最终确定了海南养殖虎纹蛙白内障病的病原为细菌,并且,该细菌在形态及生理生化特征等方面与引起福建等地养殖牛蛙白内障病的醋酸钙不动杆菌有着显著不同,为脑膜炎败血黄杆菌。

对白内障病虎纹蛙的病原分离结果显示,在病蛙的眼睛、大脑、血液、肝脏和腹水等部位都分离到了大量的致病脑膜炎败血黄杆菌,说明该病菌对虎纹蛙的感染不是局部的,而是全身性的,造成的危害也是十分巨大的。就病蛙所表现的外观症状来看,除产生白内障外,歪脖子和腹水也是该病常见的典型症状。当然,不同患病个体表现出来的具体症状也有所不同,急性患病个体常常来不及表现白内障和腹水等症状就已死亡,因而只有歪脖子症状;而在慢性患病个体中,三种症状均可表现出来。尽管如此,对不同症状的病蛙进行细菌分离的结果表明:不管是急性患病个体还是从慢性患病个体,从体内中分离到的病菌种类都是相同的,只是病菌的主要感染部位不同。只表现歪脖子症状的急性病蛙只能从脑部分离到大量病菌,而三种症状均已表现出来的慢性病蛙则可同时从眼、脑、肝和腹水等部位分离到大量病菌。

药敏实验表明,引起海南养殖虎纹蛙白内障病的脑膜炎败血黄杆菌具有很强的抗药性,在所实验的 20 种抗菌药物中,该菌只对万古霉素敏感、对头孢哌酮中度敏感,面对其他 18 种药物均不敏感;另外,由于该病原菌位于大脑和眼球等关键部位,因大脑屏障的保护作用,一般的药物难以深入其中。因此,正如海南各地虎纹蛙养殖户反映,在生产上使用各种抗菌药物防治白内障病都没有明显效果。

目前,通过研制并接种疫苗来防治疾病已成为国内外鱼类病害防治研究的重要方向,对有效预防养殖鱼类疾病的发生发挥了积极作用<sup>[9,11]</sup>。蛙类属于两栖动物,在系统发生要高于鱼类,在免疫系统的发育上也要比鱼类进化,因此,在虎纹蛙等养殖蛙类中利用免疫学方法预防细菌性疾病比在鱼类中利用免疫学方法预防相关疾病具有更好的前景。本文的研究结果也表明,接种由白内障病蛙中分离的病菌制备的灭活疫苗,对有效预防该病的发生确实具有十分良好的效果。目前,鱼病疫苗在使用中面临的另一主要困难是缺乏合适的免疫接种方法,但蛙类却不同,由于其体表吸收能力以及耐干能力都明显强于鱼类,使得在鱼类疫苗免疫接种上效果不佳的喷雾法在蛙病疫苗的免疫接种上却效果甚佳,为蛙病疫苗的研究与使用提供了良好前景。

### 参考文献:

- [1] 陈国英,凌跃进.经济蛙类的高效养殖[M].合肥:安徽科技出版社,1999.108-116.
- [2] 陈晓凤,陈祈辉,夏梅珠.牛蛙“白内障”病病原及防治的研究[J].福建水产,1995,(2):13-18.
- [3] 陈晋佑,杨勇清,曾逸生,等.蛙类养殖[M].广州:广东科技出版社,1998.217-236.
- [4] 叶雪平.病蛙的诊断与防治技术(一)[J].水产科技情报,1999,26(1):38-39.
- [5] 叶雪平.病蛙的诊断与防治技术(二)[J].水产科技情报,1999,26(2):82-83.
- [6] 叶雪平.病蛙的诊断与防治技术(三)[J].水产科技情报,1999,26(3):136-137.
- [7] 叶雪平.病蛙的诊断与防治技术(四)[J].水产科技情报,1999,26(4):183-184.
- [8] 中国科学院微生物研究所.伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)[M].北京:科学出版社,1994.354-386.
- [9] 秦启伟.石斑鱼弧菌病免疫防治研究[D].中国科学院水生生物研究所博士学位论文,1994.20-25.
- [10] 黄琪琰,唐士良,张剑英,等.鱼病学[M].上海:上海科学技术出版社,1985.122-125.
- [11] 杨先乐,陈远新.鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J].水产学报,1996,20(2):159-167.