



## 美国牛蛙蝌蚪约氏不动杆菌的分离、鉴定及耐药性分析

丁戈野, 李纯, 徐杨, 陈晓颖, 张秋实, 胡亮,  
邓新兰, 刘小燕, 冯兴浪\*, 李军华\*

(湖南农业大学水产学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 为探明 2023 年 3 月初引起中国重庆市渝北区某牛蛙养殖场暴发疾病的原因, 本实验从患病美国牛蛙蝌蚪肝脏和肠道中分离优势菌, 采用形态学观察、生理生化实验、16S *rDNA* 和 *rpoB* 基因序列测定、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、生长特性研究及药物敏感性实验。结果显示, 在患病濒死美国牛蛙蝌蚪的肝脏和肠道中分离得到的其中一株优势菌命名为 LT202303, 经鉴定为约氏不动杆菌。该菌株携带 *OmpA*、*Omp34* 和 *OmpTsx* 等 3 种毒力基因, 具有较强的耐盐性和在广泛的 pH 范围内生存的能力, 对美国牛蛙蝌蚪的半数致死浓度为  $6.8 \times 10^6$  CFU/mL, 发病临床症状为肝脏红肿并伴有大量白色结节, 肠道透明发黄。组织病理学观察发现该菌株可引起美国牛蛙蝌蚪肝脏和肠道的明显炎症反应和病灶性坏死。药敏实验结果显示, 分离菌 LT202303 是一种产  $\beta$ -内酰胺酶的多重耐药细菌。本研究表明, 约氏不动杆菌对牛蛙蝌蚪具有高致病力, 可引起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。本研究首次报道约氏不动杆菌感染引起的美国牛蛙蝌蚪传染病的暴发, 为该疾病的诊断和防控提供理论参考。

**关键词:** 约氏不动杆菌; 美国牛蛙; 蝌蚪; 分离鉴定; 耐药性

中图分类号: S 947.2

文献标志码: A

约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*) 是奈瑟氏菌科 (Neisseriaceae) 的一种革兰氏阴性菌, 自 20 世纪发现以来一直被认为是食品和环境中的重要污染源, 与禽类、肉类、乳制品以及水体和土壤污染有关<sup>[1-3]</sup>。此外, 约氏不动杆菌还是引发人类社区和医院感染的重要致病菌, 可导致皮肤感染引起的菌血症、发热患者的血流感染以及小儿脑膜炎等<sup>[4-6]</sup>。在水生动物中, 已有报道约氏不动杆菌感染虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和鲤 (*Cyprinus carpio*), 引起肝脏病变、腹水、肠道出血和

水肿等症状<sup>[7-8]</sup>。然而, 两栖动物中尚未见到关于约氏不动杆菌感染的报道。

美国牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 隶属于两栖纲 (Amphibian) 无尾目 (Anura) 蛙科 (Ranidae)<sup>[9]</sup>, 原产于美国东部和加拿大东南部, 自 1950 年引入中国以来, 由于其肉质细嫩、生长速率快、易饲养等特点, 已成为重要的水生经济物种, 其养殖规模不断扩大。然而, 高密度的集约化养殖、气候变化以及致病微生物的传播导致美国牛蛙养殖过程中病害频发, 其中包括米尔伊丽莎白菌 (*Elizabeth-*

收稿日期: 2024-02-01 修回日期: 2024-04-02

资助项目: 国家自然科学基金 (32173021); 湖南省科技专项 (2022sfq30, 20231F18); 湖南省教育厅重点项目 (23A0196); 湖南省大学生创新创业训练计划项目 (S202310537085)

第一作者: 丁戈野 (照片), 从事水生生物免疫与病害研究, E-mail: 1839668491@qq.com;

李纯, 从事水生生物免疫与病害研究, E-mail: 1264599572@qq.com

通信作者: 冯兴浪, 从事水生生物免疫与病害研究, E-mail: FXL132231@126.com;

李军华, 从事水生生物免疫与病害研究, E-mail: lijunhua@hunau.edu.cn



*kingia miricola*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和摩氏摩根氏菌 (*Morganella morganii*) 等<sup>[10-14]</sup>。细菌性疾病已成为牛蛙养殖病害防控的重点。

2023年3月中旬, 中国重庆市渝北区的一家牛蛙养殖场暴发了一种严重的传染病, 主要危害约2月龄的美国牛蛙蝌蚪, 导致累计死亡美国牛蛙蝌蚪6 000余只, 约占感染池塘总数的24%。患病美国牛蛙蝌蚪表现出肝脏充血肿大, 白色结节大量增生和肠道透明发黄等症状。为查明病因, 选取症状明显的濒死美国牛蛙蝌蚪进行研究, 通过分子生物学技术分离、鉴定病原菌, 并进行病原菌生理生化特性研究和毒力基因检测。同时开展药敏实验和人工感染实验以及组织病理学分析, 以期对美国牛蛙的细菌性疾病防控提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

患病美国牛蛙蝌蚪取自中国重庆市渝北区某牛蛙养殖场(发病温度约为25℃), 体长(8.53±0.71) cm, 体重(3.18±0.35) g, 约2月龄。选择20只具有临床症状的患病美国牛蛙蝌蚪和170只健康美国牛蛙蝌蚪(其中20只用于病原鉴定, 150只用于人工感染), 在充氧条件下运送到本实验室进行病原鉴定。健康美国牛蛙蝌蚪购自重庆市渝北区的另一家牛蛙养殖场, 体长(4.52±0.23) cm, 体重(2.02±0.43) g, 经检查确认健康后用于人工感染实验。

本研究获得了湖南农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(审批号: 201903297), 实验过程中操作人员严格遵守湖南农业大学伦理委员会伦理规范, 并按照湖南农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 病原菌分离与纯化

选取濒死的美国牛蛙蝌蚪, 用75%乙醇擦拭体表后进行无菌操作解剖。检查体表和体内是否存在寄生虫感染, 并记录临床症状。随后, 取有明显病变的肝脏和肠道组织, 采用三区划线法接种于脑心液培养基琼脂平板(BHI, 青岛海博生物技术有限公司)上, 在25℃条件下培养18 h。筛选形态和颜色相同的优势菌落进行至少3次的纯化, 以获取纯培养。最后, 获得的纯培养菌株命

名为LT202303, 并存储在含有25%甘油的BHI液体培养基中-80℃保存备用。

### 1.3 分离株LT202303的鉴定和形态学观察

分离菌株活化后, 按照生产商的说明使用细菌微量生化反应鉴定管(青岛海博生物技术有限公司)进行鉴定。随后, 分别使用鞭毛染色(改良Ryu染色法)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)和革兰氏染色试剂盒(北京酷来搏科技有限公司)对分离菌株进行染色观察, 使用光镜(×400)检查其形态和染色特征。为了更清晰观察, 将单个菌落固定在戊二醛溶液中, 经脱水干燥处理, 然后使用扫描电子显微镜(日立)进行形态学鉴定。同时, 评估pH值和盐度对分离菌生长的影响。按照Lin等<sup>[13]</sup>所述方法, 调节BHI肉汤的pH值和盐度, 并接种分离菌株。25℃, 200 r/min培养18 h, 使用紫外分光光度计测量600 nm波长处吸光度, 以评估培养物的浓度并判断其生长状况。

将分离的菌株接种到BHI液体培养基中, 在25℃培养18 h。随后使用基因组DNA提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)从菌液中提取DNA。使用Bi等<sup>[6]</sup>的通用引物(表1)对16S *rDNA* 和 *rpoB* 序列进行PCR扩增。PCR产物(16S *rDNA* 和 *rpoB* 基因)由生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 并通过NCBI网站的BLAST数据库进行序列比对。最后利用MEGA 11.0软件, 采用邻接法(Neighbour Joining)基于序列构建系统进化树。

此外, 基于16S *rDNA* 和系统进化树结果, 采用不动杆菌3种外膜蛋白基因的引物<sup>[6]</sup>检测分离菌株是否携带相关毒力基因(表1), 灭菌水作为阴性对照。PCR产物在2%琼脂糖凝胶(含GelRed)和1%三乙酸乙酯-EDTA缓冲液中电泳。在紫外光下对凝胶进行观察和拍照。

### 1.4 人工感染实验

健康美国牛蛙蝌蚪在实验室循环水养殖系统中暂养, 隔天换水。暂养适应后, 随机将150只蝌蚪分成5组, 每组3个水箱, 进行回归感染实验。其中4组接受不同浓度梯度的感染剂量, 而第5组为阴性对照。将纯化后的菌株接种于BHI肉汤, 25℃培养24 h。4 000 r/min离心20 min去除上清液, 经3次无菌生理盐水漂洗后重悬。将暂养10 d的美国牛蛙蝌蚪采用浸泡法进行人工感染实验。每组蝌蚪浸泡在2 L细菌悬液中, 浓度分别

表 1 所使用的引物序列

Tab. 1 Primers used in the article

基因编号 gene symbols	引物名称 primers	序列 (5'-3') sequences (5'-3')
16S <i>rDNA</i>	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT
<i>rpoB</i>	Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG
	Ac1093R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA
<i>OmpA</i>	F	ATGCGTGCATTAGTTA
	R	TTATTGTTTAGCATAAATG
<i>Omp34</i>	F	ATGAAAAACTTGGTTTAGC
	R	TTAGAAACGGAATTTAGCAT
<i>OmpTsx</i>	F	TTAGAAGTGGTATTTAAACCA
	R	ATGCAATTAAGCAACTTGC

为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL, 对照组则浸泡在等量的生理盐水中。浸泡 20 min 后, 转移到提前曝气的水缸中饲养, 水温保持在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。每天观察和记录实验牛蛙蝌蚪的发病率、症状和累积死亡率, 对濒死牛蛙蝌蚪进行剖检和病原菌分离鉴定。最后, 使用 Graphpad prism 8.0 软件绘制累计死亡率曲线。

### 1.5 组织病理学分析

从患病牛蛙蝌蚪采集症状明显的肝脏和肠道组织, 简单清洗后, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上。随后, 用  $1 \times$  磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 进行冲洗并在分级乙醇中干燥。干燥后经二甲苯使其透明化, 并制成 3~5 mm 的石蜡切片。切片经过苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H.E) 染色后, 在光镜下观察。

### 1.6 细菌耐药性实验

参照《不常分离细菌或苛氧菌的抗菌药稀释和药盘药敏试验方法》选择了 15 种抗生素, 随后使用 Kirby-Bauer (KB) 法检测分离菌对 15 种抗生素的敏感性<sup>[15]</sup>。用于耐药性测试的抗生素包括羧苄青霉素、四环素、哌拉西林、氨苄西林、庆大霉素、阿米卡星、头孢曲松钠、头孢他啶、头孢哌酮、头孢噻肟、亚胺培南、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星及磺胺甲恶唑。平板再经  $25^\circ\text{C}$  培养 24 h, 根据中华人民共和国卫生部 WS/T 125—1999 抗生素药敏试验标准, 将结果分为“高度敏感”“中度敏感”和“耐药”。

## 2 结果

### 2.1 自然感染的临床症状

经临床检查, 健康美国牛蛙蝌蚪游动灵敏, 体内外检查未发现异常 (图 1-a)。而患病美国牛蛙蝌蚪主要表现为腹部肿胀、游动不平衡以及反应迟钝。解剖可见肝脏红肿并伴有大量白色结节, 肠道透明发黄, 同时腹腔内存在少量淡黄色腹水 (图 1-b)。经过镜检, 患病牛蛙蝌蚪的体表和体内均未发现寄生虫或真菌感染。

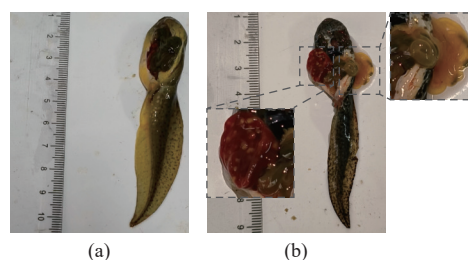


图 1 牛蛙蝌蚪的临床症状

(a) 健康美国牛蛙蝌蚪; (b) 患病美国牛蛙蝌蚪的肠道透明发黄, 肝脏内有大量白色结节。

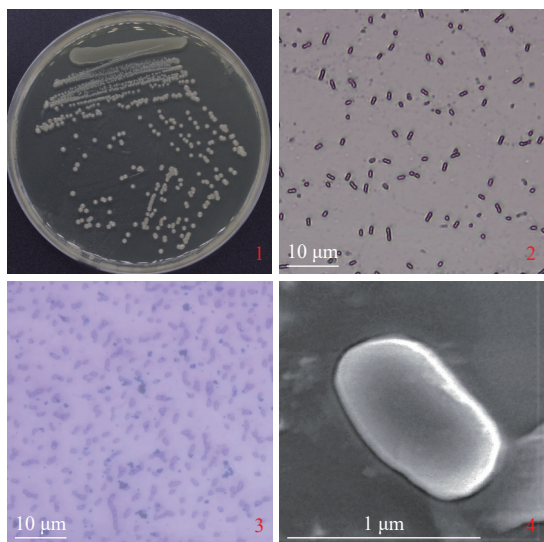
Fig. 1 Clinical signs in bullfrog tadpoles

(a) healthy bullfrog tadpoles; (b) diseased bullfrog tadpoles with yellowish transparent gut and large white nodules in the liver.

### 2.2 菌株 LT202303 的形态学观察和特性分析

**形态特征** 从患病美国牛蛙蝌蚪肝脏和肠道共分离出 4 株优势菌株, 并对所有菌株的 16S *rDNA* 基因序列进行扩增和测序, 测序结果显示, 其相似度为 99.3%~99.9%。选取肝脏和肠道的共有优势菌株, 命名为 LT202303。菌株 LT202303 在 BHI 平板上生长良好, 菌落呈现乳白色、圆形光滑、边缘略微凸起 (图版 I-1)。菌株 LT202303 革兰氏染色呈阴性 (图版 I-2), 镜检未观察到鞭毛结构 (图版 I-3)。扫描电子显微镜显示菌体呈短棒状, 末端呈圆形, 无鞭毛, 长 0.9~1.2 mm, 宽 0.4~0.6 mm (图版 I-4)。

**LT202303 的生长和生化特性** LT202303 经限制性条件培养后, 所测得的菌液吸光度反映其在 pH 值为 4~11 时生长良好, 在 pH 值为 7~9 时生长最佳, 吸光度在 1.10~1.14 (图 2-a)。同样, LT202303 在含 0.0%~3.5% NaCl 的 BHI 肉汤中生长良好。然而, 当盐度超过 4.0% 时极大限制了 LT202303 的正常生长, 且盐度浓度越高, 抑制作用越强 (图 2-b)。采用细菌微量生化反应鉴定管进行鉴定, 结果显示, 未观察到运动性, 无硝酸盐



图版 I 约氏不动杆菌 LT202303 的形态特征

1. BHI 平板上 LT202303 菌株的形态; 2. 革兰氏染色显示 LT202303 为革兰氏阴性菌; 3. 改良 Ryu 染色法染色显示 LT202303 无鞭; 4. 扫描电子显微镜下 LT202303 的形态。

#### Plate I The morphology of *A. johnsonii* LT202303

1. the morphology of LT202303 strain on BHI plate; 2. gram stain shows LT202303 as a gram-negative bacterium; 3. LT202303 without flagellum visible after modified Ryu method staining; 4. morphology of LT202303 under scanning electron microscopy.

还原, 氧化反应和  $H_2S$  产生, 也不能利用  $\beta$ -半乳糖苷、葡萄糖, 阿拉伯糖, 纤维二糖, 棉子糖、七叶苷、甘露醇、脲酶、麦芽糖、甘露糖、木糖、山梨糖、鼠李糖和乳糖, 不能产生吲哚和水解精氨酸, 不能使明胶液化。菌株 LT202303 与分离自患病虹鳟的约氏不动杆菌菌株 Ajo2017L-10<sup>[6]</sup> 生化特性基本一致 (表 2), 且符合《伯杰氏细菌手册》中描述的“三阴”表型。

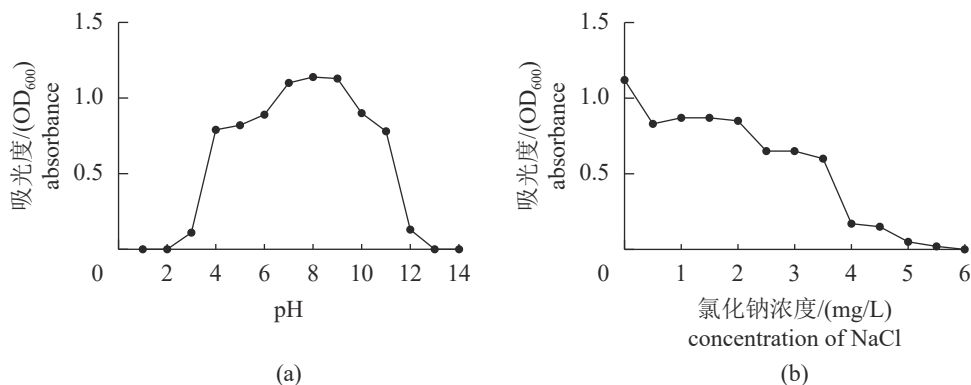


图 2 不同生长条件对约氏不动杆菌 LT202303 的影响

(a) pH 对约氏不动杆菌 LT202303 生长的影响; (b) 盐度对约氏不动杆菌 LT202303 生长的影响。

#### Fig. 2 Effect of different growth conditions on *A. johnsonii* LT202303 growth

(a) effect of pH on *A. johnsonii* LT202303 growth; (b) effect of salinity on *A. johnsonii* LT202303 growth.

### 2.3 16S rDNA、rpoB 基因序列和毒力分析

以 LT202303 的 DNA 为模板进行扩增, 扩增后的序列经过测序和 BLAST 检索分析发现, LT202303 的 16S rDNA 和 rpoB 序列与约氏不动杆菌的序列相似度最高, 分别为 99.51% (JQ815206.1) 和 98.49% (LC102683.1), 将获得的序列提交至 GenBank (登录号: OR342050、OR343191)。根据 LT202303 的测序结果构建系统进化树 (图 3)。在以 16S rDNA 基因序列为基础构建的系统进化树上, LT202303 与不动杆菌属 (*Acinetobacter* spp.) 聚为一支; 在根据 rpoB 基因序列构建的系统进化树上, LT202303 与约氏不动杆菌聚为一支。此外, 凝胶电泳结果显示, LT202303 携带 3 个外膜蛋白毒力基因: *OmpA*、*Omp34* 和 *OmpTsx* (图 4)。

### 2.4 人工回归感染实验与半数致死浓度 (LD<sub>50</sub>) 测定

对健康美国牛蛙蝌蚪进行浸泡感染病原菌 LT202303, 结果显示, 受感染的牛蛙蝌蚪表现出反应迟钝、游动歪斜, 而经最高浓度的细菌悬液处理后的牛蛙蝌蚪在感染后 6 d 内全部死亡。当浓度降低到  $1 \times 10^7$  CFU/mL 和  $1 \times 10^6$  CFU/mL 时, 牛蛙蝌蚪的异常症状直到处理 2~3 d 后才出现, 累积死亡率分别降低到 60% 和 40%。在浓度为  $1 \times 10^5$  CFU/mL 时, 只有 10% 的牛蛙蝌蚪死亡。根据改良寇氏法计算分离菌株对牛蛙蝌蚪的 LD<sub>50</sub> 为  $6.8 \times 10^6$  CFU/mL。相比之下, 对照组牛蛙蝌蚪没有出现死亡或异常表现 (图 5)。表观和体内检查显示, 受感染的牛蛙蝌蚪腹部肿大, 部分呈灰白色, 颞部点状出血, 肝脏充血肿大, 肾脏发黑

表 2 约氏不动杆菌 LT202303 的生理生化特性

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of *A. johnsonii* LT202303

生化检测 biochemical test	约氏不动杆菌 LT202303	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> <sup>[6]</sup>	生化检测 biochemical test	约氏不动杆菌 LT202303	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> <sup>[6]</sup>
硝酸盐还原 nitrate reduction	—	—	精氨酸水解 arginine dihydrolase	—	—
氧化-发酵 O/F	—	n.a	β-半乳糖苷 β-galactosidase	—	—
吲哚产生 indole production	—	—	动力试验 motility test	—	n.a
甘露醇 mannitol	—	—	明胶液化 gelatinase	—	—
脲酶 urease	—	—	葡萄糖 glucose	—	—
麦芽糖 maltose	—	—	氧化酶 oxidase	—	n.a
甘露糖 mannose	—	—	阿拉伯糖 arabinose	—	—
木糖 xylose	—	—	纤维二糖 cellobiose	—	—
山梨糖 sorbose	—	—	H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	—	—
鼠李糖 rhamnose	—	—	棉子糖 raffinose	—	—
乳糖 lactose	—	—	七叶苷 aesculin utilization	—	—

注：“—”表示阴性反应，“n.a.”表示非适用。  
Notes: “—” negative; “n.a.” not applicable.

(图 6)。重新分离自所有患病牛蛙蝌蚪的约氏不动杆菌与 LT202303 的同源性为 99.7%。

## 2.5 组织病理学变化和分析

将健康与患病美国牛蛙蝌蚪进行组织病理学分析, 结果显示, 健康牛蛙蝌蚪的组织无明显病理变化(图版 II -1, 3)。相反, 所有患病牛蛙蝌蚪的病理变化均表现出明显的炎症反应。在肝脏中, 肝细胞出现气球变性, 血窦中可见成团的嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和浆细胞(图版 II -2)。肠道黏膜上皮增生并出现复层, 部分上皮细胞透亮, 呈现颗粒性内含物, 黏膜下层可见大量淋巴细胞浸润(图版 II -4)。

## 2.6 药物敏感性分析

抗生素药物敏感性结果显示, LT202303 对羧苄青霉素、阿米卡星、头孢哌酮、亚胺培南、氧氟沙星、诺氟沙星、磺胺甲恶唑敏感; 对头孢曲松钠、头孢他啶、头孢噻肟、环丙沙星中度敏感; 对四环素、哌拉西林、氨苄西林、庆大霉素耐药(表 3)。

## 3 讨论

约氏不动杆菌广泛分布在人体皮肤、土壤和水源中<sup>[16]</sup>, 属于典型的条件致病菌。过去的研究主要关注与其同属的其他不动杆菌, 如鲍曼不动杆菌、乙酸钙不动杆菌、溶血不动杆菌和鲁氏不

动杆菌。尽管约氏不动杆菌在自然环境中普遍存在, 但关于其在特定水生生物, 如美国牛蛙幼体中的感染和鉴定尚无报道。

## 3.1 LT202303 的鉴定和生物学特性

16S *rDNA* 基因序列在同一属和种的生物体中高度保守<sup>[17]</sup>, 而 *rpoB* 参与 DNA 转录, 已被广泛应用于细菌系统发育分析和鉴定, 成为 16S *rDNA* 测序的补充<sup>[18]</sup>, 因此, 通过 2 种管家基因的测序分析可以确保鉴定的准确性。许多水生细菌在 4.0%~4.5% 的盐度下不能存活<sup>[19-20]</sup>, 而对 LT202303 的生长特性分析表明, 该菌株能够在较宽的盐度和酸碱度范围内生长。Hubloher 等<sup>[21]</sup>发现, 鲍曼不动杆菌通过 Mrp 反向转运蛋白适应不同盐度和 pH 范围, 这可能与 LT202303 的耐不同盐度和 pH 生长特性有关。

## 3.2 LT202303 的致病性

本研究通过浸泡感染方法对约氏不动杆菌 LT202303 的毒力进行评估。感染 LT202303 后美国牛蛙蝌蚪呈现出不同程度的器官损伤, 但是解剖后并未发现肝脏有明显的白色结节, 这可能与感染环境和水温相关, 也可能与感染样本自身的生理状况有关。此外, 外膜蛋白 (OMPs) 是不动杆菌的重要毒力因子之一<sup>[22]</sup>。LT202303 携带 3 种外膜蛋白基因片段, 尤其是 *OmpA* 基因, 被认为具有典型的毒力功能<sup>[23]</sup>, 这或许能解释病原菌表

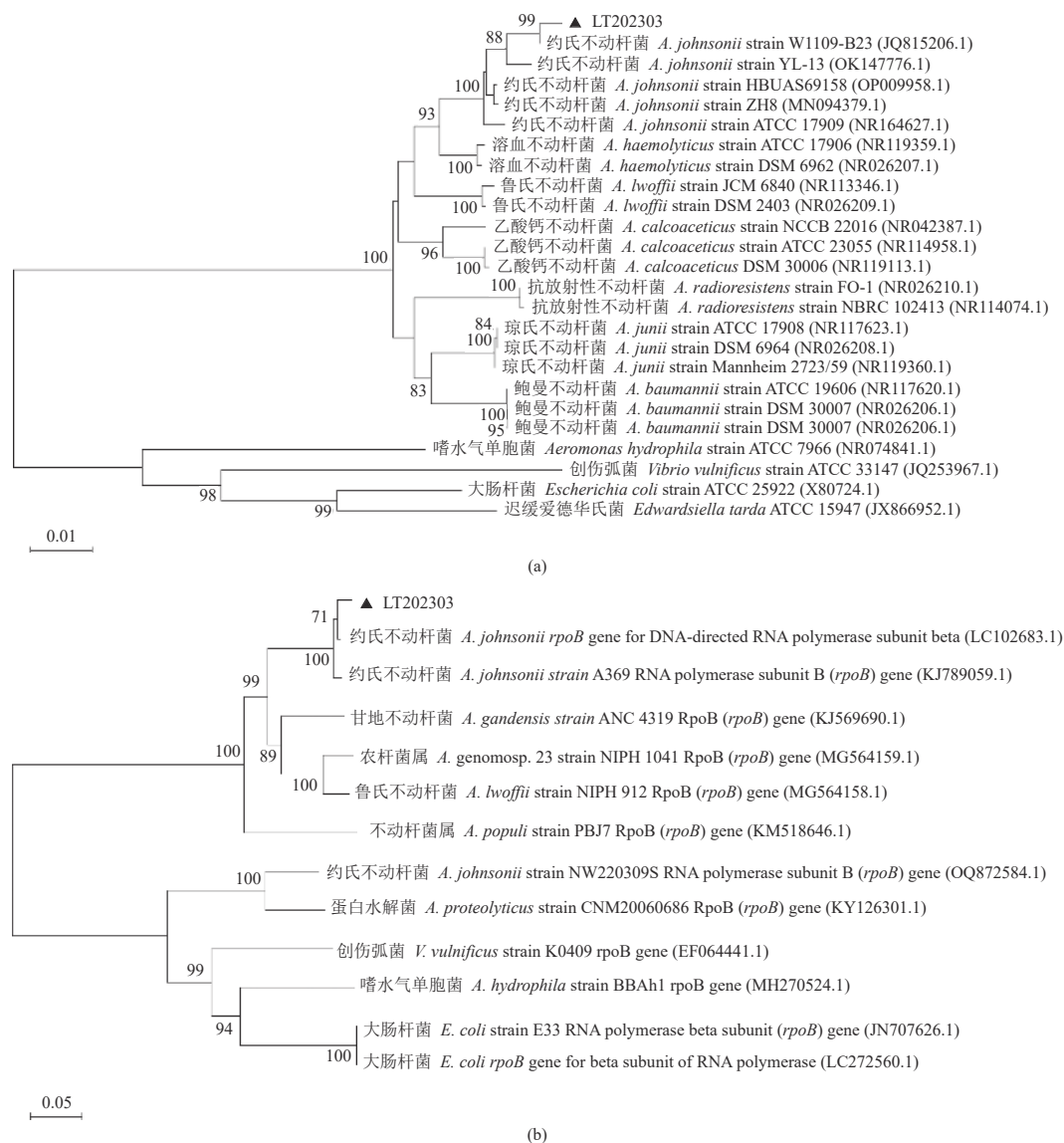


图3 基于16S *rDNA* 和 *rpoB* 基因序列构建的系统进化树

(a) 基于约氏不动杆菌 LT202303 的 16S *rDNA* 基因序列构建的系统进化树; (b) 基于约氏不动杆菌 LT202303 的 *rpoB* 基因序列构建的系统进化树。

Fig. 3 Phylogenetic trees constructed based on 16S *rDNA* and *rpoB* gene sequences

(a) phylogenetic tree constructed based on 16S *rDNA* gene sequences of *A. johnsonii* LT202303; (b) phylogenetic tree constructed based on *rpoB* gene sequences of *A. johnsonii* LT202303.

现出的强致病性。

### 3.3 LT202303 的耐药性

LT202303 表现出的多重耐药性的表型可能由多种因素导致。革兰氏阴性细菌细胞包膜可作为抗菌攻击的首道防御屏障<sup>[24]</sup>, 并且约氏不动杆菌在生物膜形成时, 受抗生素胁迫诱发代谢变化, 会导致对四环素类药物的耐药性<sup>[25]</sup>。此外, 不动杆菌属产生的  $\beta$ -内酰胺酶引起青霉素结合蛋白的变化, 并且还会改变成孔蛋白的结构和数量以及

外排泵的活性<sup>[26]</sup>, 从而导致对青霉素的耐药性。氨基糖苷类修饰酶是不动杆菌属逃逸氨基糖苷类抗生素的主要酶类<sup>[27]</sup>, 但本研究中 LT202303 对庆大霉素表现出耐药性, 而对阿米卡星敏感, 这可能是由于其只携带部分修饰酶的原因。

### 3.4 LT202303 的推荐治疗方案

尽管药敏结果显示 LT202303 对多种抗生素敏感, 但亚胺培南仍然是治疗多药耐药不动杆菌的首选药物<sup>[28]</sup>。此外, 阿米卡星也是有效的选

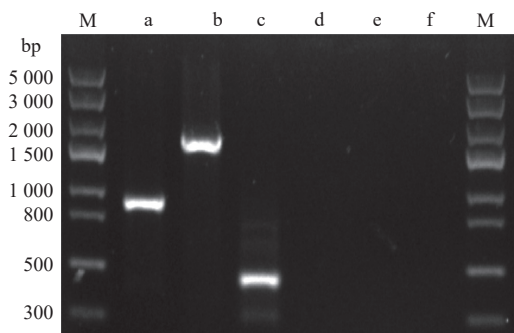


图 4 约氏不动杆菌 LT202303 的毒力因子检测

M. marker; a. *OmpA* (828 bp); b. *Omp34* (1 740 bp); c. *OmpTsx* (443 bp); d~f. 阴性对照。

Fig. 4 Virulence factors examination for *A. johnsonii* LT202303

M. marker; a. *OmpA* (828 bp); b. *Omp34* (1 740 bp); c. *OmpTsx* (443 bp); d-f. negative control.

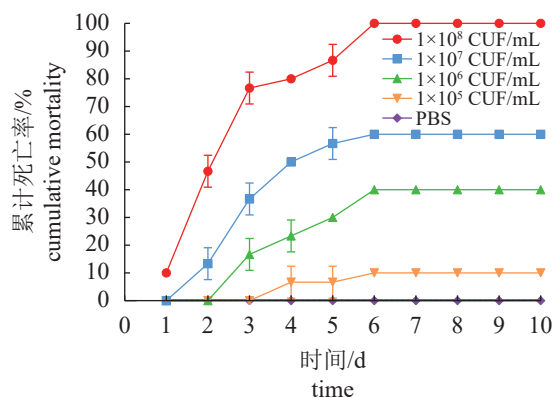


图 5 约氏不动杆菌 LT202303 感染美国牛蛙蝌蚪的累计死亡率

Fig. 5 Cumulative mortality of bullfrog tadpoles with *A. johnsonii* LT202303 immersion infection

择<sup>[29]</sup>。然而长期单一使用某种抗生素可能导致约氏不动杆菌产生耐药性, 因此联合用药可能是降低耐药性出现和改善疗效的潜在选择。多项体外研究发现, 黏菌素-碳青霉烯类的联合方案对于不动杆菌感染的治疗具有协同作用<sup>[30]</sup>。不仅如此, 抗生素敏感性还受到地理区域和用药习惯的影响<sup>[31]</sup>, 因此, 在生产中对于药物敏感性实验结果只能作为防治的参考, 具体的用法和用量还要以实际情况做修正。

#### 4 结论

本研究首次报道了在养殖美国牛蛙幼体中分离得到的传染性约氏不动杆菌菌株 LT202303, 其具有耐高盐和广 pH 范围内生长的特性, 其对牛

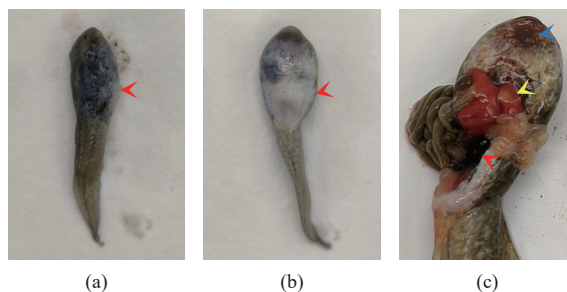
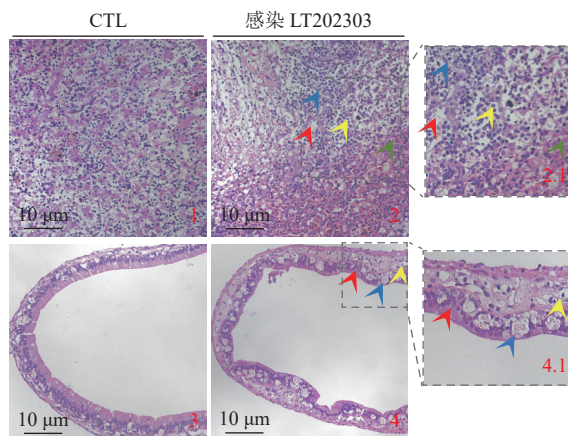


图 6 感染约氏不动杆菌 LT202303 后的美国牛蛙蝌蚪 (a)、(b) 腹部肿胀 (箭头), 部分体表呈灰白色 (箭头); (c) 顎部点状出血 (蓝色箭头), 肝脏充血 (黄色箭头), 肾脏发黑 (红色箭头)。

Fig. 6 Bullfrog tadpoles infected with *A. johnsonii* LT202303

(a) and (b) swollen abdomen (arrow), part of body surface greyish white (arrow); (c) punctate haemorrhage in the jaw (blue arrow), congested liver (yellow arrow), and blackened kidneys (red arrow).



图版 II 患病牛蛙蝌蚪的组织病理学观察

1. 健康肝脏; 2. 肝脏中的肝细胞呈气球样变性 (红色箭头), 血窦中可见成团的嗜酸性粒细胞 (绿色箭头)、淋巴细胞 (蓝色箭头) 和浆细胞 (黄色箭头); 3. 健康的肠道; 4. 肠道黏膜上皮增生并出现复层 (红色箭头), 部分上皮细胞透亮, 出现颗粒性内含物 (蓝色箭头), 黏膜下层可见大量淋巴细胞 (黄色箭头) 浸润。

Plate II Histopathological observations on diseased bullfrog tadpoles

1. healthy liver; 2. hepatocytes in the liver showed ballooning degeneration (red arrow), and clusters of eosinophils (green arrow), lymphocytes (blue arrow), and plasma cells (yellow arrow) were seen in the blood sinusoids; 3. healthy intestine; 4. intestinal mucosal epithelial hyperplasia is accompanied by stratification (red arrow), some epithelial cells are translucent with granular inclusions (blue arrow), a large number of lymphocytes (yellow arrow) infiltrate can be seen in the submucosa.

蛙蝌蚪的半数致死浓度为  $6.8 \times 10^6$  CFU/mL, 可造成肝脏、肾脏和肠道不同程度的病变, 并携带 *OmpA*、*Omp34* 和 *OmpTsx* 等 3 种毒力基因片段。通过药物敏感性实验, 筛选出亚胺培南和阿米卡星作为推荐治疗方案。研究结果为理解约氏不动

表 3 约氏不动杆菌 LT202303 的药物敏感性

Tab. 3 Antimicrobial susceptibility patterns of *A. johnsonii* LT202303

抗生素种类 antibiotic categories	抑菌圈直径的判断标准/mm standard of inhibition zone			抑菌圈直径/mm diameter of inhibitory zone	药物含量/ (mg/片) content	敏感性 susceptibility
	耐药 resistant	中度敏感 moderately sensitive	高度敏感 highly sensitive			
四环素类 tetracyclines						
四环素 tetracycline	≤14	15~18	≥19	4.0	30.0	R
青霉素 penicillins						
哌拉西林 piperacillin	≤10	11~12	≥13	0.2	1.0	R
羧苄青霉素 carbenicillin	≤14	15~17	≥18	30.4	30.0	S
β-内酰胺类 β-lactams						
氨苄西林 ampicillin	≤14	15~17	≥18	0.0	30.0	R
氨基糖苷类 aminoglycosides						
庆大霉素 gentamicin	≤12	13~14	≥15	10.1	120.0	R
阿米卡星 amikacin	≤14	15~16	≥17	18.1	30.0	S
头孢菌素类 cephalosporins						
头孢曲松钠 ceftriaxonesodium	≤13	14~20	≥21	16.0	30.0	I
头孢他啶 ceftazidine	≤14	15~17	≥18	15.8	30.0	I
头孢哌酮 cefoperazone	≤15	16~20	≥21	28.3	75.0	S
头孢噻肟 cefotaxime	≤14	15~22	≥23	16.1	30.0	I
碳青霉烯类 carbapenems						
亚胺培南 imipenem	≤13	14~15	≥16	20.7	10.0	S
喹诺酮类 quinolones						
环丙沙星 ciprofloxacin	≤15	16~20	≥21	19.3	5.0	I
氧氟沙星 ofloxacin	≤12	13~16	≥17	19.5	5.0	S
诺氟沙星 norfloxacin	≤12	13~16	≥17	18.3	10.0	S
磺胺类药物 sulfonamides						
磺胺甲恶唑 sulfamethoxazole	≤10	11~15	≥16	16.8	1.25/23.75	S

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

杆菌在水生动物中的鉴定、致病性及耐药性提供了新见解，同时也为联合用药策略的开发提供了新思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[ 1 ] 黄萃, 伍思华, 李钰, 等. 圈养白额雁约翰逊不动杆菌分离鉴定与药敏分析 [J]. *野生动物学报*, 2020, 41(4): 1094-1098.  
Huang C, Wu S H, Li Y, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity analysis of *Acinetobacter johnsonii* from *Anser albifrons* in zoo[J]. *Chinese journal of wild-*

*life*, 2020, 41(4): 1094-1098(in Chinese).  
[ 2 ] Cui Q, Huang Y, Wang H, *et al.* Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 24-35.  
[ 3 ] Chang W N, Lu C H, Huang C R, *et al.* Community-acquired *Acinetobacter meningitis* in adults[J]. *Infection*, 2000, 28(6): 395-397.  
[ 4 ] Seifert H, Strate A, Schulze A, *et al.* Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. lwoffii): report of 13 cases[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 17(4): 632-636.  
[ 5 ] Gutiérrez-Gaitán M P, Montoya-Moncada A D, Suescún-



- Vargas J M, *et al.* Emerging species in pediatrics: a case of *Acinetobacter johnsonii* meningitis[J]. Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico, 2022, 79(1): 51-55.
- [ 6 ] Bi B, Yuan Y, Jia D, *et al.* Identification and pathogenicity of emerging fish pathogen *Acinetobacter johnsonii* from a disease outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture Research, 2023, 1: 1-13.
- [ 7 ] Kozińska A, Paździor E, Pękala A, *et al.* *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens [J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2014, 58(2): 193-199.
- [ 8 ] Hof C, Araújo M B, Jetz W, *et al.* Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity[J]. Nature, 2011, 480(7378): 516-519.
- [ 9 ] 肖双燕, 韦冬冬, 刘明珠, 等. 广西牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定、耐药性及组织病理 [J]. 水产学报, 2024, 1-15.  
Xiao S Y, Wei D D, Liu M Z, *et al.* Isolation, identification, drug resistance and histopathology of *Citrobacter freundii* from bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Guangxi [J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 1-15(in Chinese).
- [10] Wei D, Cheng Y, Xiao S, *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.
- [11] Yang P, Zheng Y, Aweya J J, *et al.* iTRAQ-based comparative proteomic analysis of the *Lithobates catesbeianus* bullfrog spleen following challenge with *Citrobacter freundii*[J]. Aquaculture Reports, 2022, 23(5): 101037.
- [12] Cy I, L R, B S, *et al.* Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* infection in a captive-bred American bullfrog (*Lithobates catesbeiana*)[J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14(1): 289.
- [13] Lin H, Ma J, Sun J, *et al.* Identification and characterization of *Klebsiella pneumoniae* from farmed American bullfrogs (*Rana catesbeiana*)[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(1): e03579-22.
- [14] Wei D, Xiao S, Liao W, *et al.* The occurrence of *Morganella morgani* caused large death in cultured American bullfrog (*Rana catesbeiana*)[J]. Aquaculture, 2023, 568(1): 739343.
- [15] Bauer A W, Kirby W M, Sherris J C, *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1966, 45(4): 493-496.
- [16] Akrami F, Namvar A E. *Acinetobacter baumannii* as nosocomial pathogenic bacteria[J]. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2019, 34(2): 84-96.
- [17] Johnson J S, Spakowicz D J, Hong B Y, *et al.* Evaluation of 16S *rRNA* gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5029.
- [18] Ogier J C, Pagès S, Galan M, *et al.* *rpoB*, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 171.
- [19] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, *et al.* Isolation of myxobacteria from the marine environment[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 169(2): 317-322.
- [20] Liu C, Chang O Q, Zhang D F, *et al.* *Aeromonas shuberti* as a cause of multi-organ necrosis in internal organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Journal Of Fish Diseases, 2018, 41(10): 1529-1538.
- [21] Hubloher J J, van-der-Sande L, Müller V, *et al.* Na<sup>+</sup> homeostasis in *Acinetobacter baumannii* is facilitated via the activity of the Mrp antiporter[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(9): 4411-4424.
- [22] Golestani F, Malekan M, Rasooli I, *et al.* Immunogenicity of loop 3 of *Omp34* from *A. Baumannii* in loopless C-lobe of TbpB of *N. meningitidis*[J]. International Immunopharmacology, 2022, 110: 109013.
- [23] Tiku V, Kofoed E M, Yan D, *et al.* Outer membrane vesicles containing *OmpA* induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 618.
- [24] Zang M, Ascari A, Adams F G, *et al.* Characterizing the role of phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in *Acinetobacter baumannii* cell envelope biogenesis and antibiotic resistance[J]. The Cell Surface, 2022, 9: 100092.
- [25] Jia J, Xue X, Guan Y, *et al.* Biofilm characteristics and transcriptomic profiling of *Acinetobacter johnsonii* defines signatures for planktonic and biofilm cells[J]. Environmental Research, 2022, 213: 113714.
- [26] Mora-Ochomogo M, Lohans C T.  $\beta$ -lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates[J]. RSC Medicinal Chemistry, 2021, 12(10): 1623-1639.
- [27] Jia J, Liu M, Feng L, *et al.* Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation of *Acinetobacter johnsonii*[J]. Gene, 2022, 808: 145985.
- [28] Jain R, Danziger L H. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians[J]. Annals of Pharmacotherapy, 2004, 38(9): 1449-1459.
- [29] Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, *et al.* Reservoirs of

- Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013, 17(10): e802-e805.
- [30] Zusman O, Avni T, Leibovici L, *et al.* Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 57(10): 5104-5111.
- [31] 钟为铭, 彭芳, 陈康勇, 等. 黑斑蛙蝌蚪出血病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).

## Isolation, identification and drug resistance analysis of *Acinetobacter johnsonii* from American bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpole

DING Geye, LI Chun, XU Yang, CHEN Xiaoying, ZHANG Qiushi, HU Liang, DENG Xinlan, LIU Xiaoyan, FENG Xinglang\*, LI Junhua\*  
(College of Fisheries, Hunan Agricultural University, Changsha 41028, China)

**Abstract:** American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) are a globally distributed invasive anuran species. They are extensively farmed in aquaculture facilities, particularly in countries like China, where they are highly valued as a protein-rich delicacy. In early March 2023, an outbreak of a serious infectious disease occurred in a bullfrog breeding farm in Yubei District, Chongqing, China. To elucidate the cause of the disease and find treatment options, this study isolated predominant bacteria from the liver and intestine tissues of diseased bullfrog tadpole. Morphological observation, physiological and biochemical experiments, 16S *rDNA* and *rpoB* sequencing, and phylogenetic analysis were employed to identify the bacteria. To ascertain the pathogenic mechanism of these dominant bacteria, artificial infection experiments, histopathological observations, virulence gene detection, growth characteristic studies, and drug sensitivity testing were conducted. The results showed that a predominant strain isolated from the liver and intestine of the diseased bullfrog tadpoles, LT202303, was identified as *A. johnsonii*. It harbored a trio of virulence genes, *OmpA*, *Omp34*, and *OmpTsx*, exhibited strong salt tolerance and the ability to survive within a wide pH range, and had a half-lethal concentration of  $6.8 \times 10^6$  CFU/mL. Clinical symptoms included liver redness and swelling with large white nodules, and a transparent yellowing of the intestine. Histopathological observations indicated significant inflammation and focal necrosis in bullfrog tadpole liver and intestine. Drug sensitivity testing revealed that the isolated strain LT202303 is a  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant bacterium. In summary, *A. johnsonii* has high pathogenicity to *R. catesbeiana* tadpoles, causing pathological damage to multiple organ tissues including the liver and intestine, ultimately resulting in diseases or even death of bullfrog tadpoles. This study reports, for the first time, an outbreak of *R. catesbeiana* tadpole infectious disease caused by *A. johnsonii* infection and provides theoretical references for the diagnosis and prevention of this disease.

**Key words:** *Acinetobacter johnsonii*; *Rana catesbeiana*; tadpole; isolation and identification; drug resistance

**Corresponding authors:** FENG Xinglang. E-mail: [FXL132231@126.com](mailto:FXL132231@126.com);

LI Junhua. E-mail: [lijunhua@hunau.edu.cn](mailto:lijunhua@hunau.edu.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32173021); Hunan Provincial Science & Technology Major Project (2022sfq30, 20231F18); Educational Commission of Hunan Province of China (23A0196); Innovation and Entrepreneurship Training Programme for College Students in Hunan Province (S202310537085)