研究报告

斑马鱼几种病原菌监测

冯丽萍, 杨 迟, 林金杏, 胡建华

(上海实验动物研究中心,上海 201203)

【摘要】 目的 对斑马鱼进行几种病原菌的流行病学调查,为后续相关标准的制定提供依据。**方法** 基于细菌的形态学及生理生化特性为基础的传统方法,并与分子生物学方法相结合,最后分离株人工感染健康斑马鱼,观察实验组发病、死亡情况以判定其对斑马鱼的致病性强弱,从而了解影响斑马鱼健康的主要病原菌。**结果** 在所有采样单位共检出 3 种病原菌,包括嗜水气单胞菌、温和气单胞菌和铜绿假单胞菌。嗜水气单胞菌普遍存在于大多数被检单位,且有较强的致病力。个别单位检出温和气单胞菌和铜绿假单胞菌。温和气单胞菌致病力稍弱;铜绿假单胞菌致病力最弱,感染斑马鱼无典型临床症状,无死亡。**结论** 嗜水气单胞菌可能造成实验用鱼设施的污染,嗜水气单胞菌已证明可以感染人类,此类潜在的人-鱼感染途径应引起重视。由此建议,嗜水气单胞菌应成为重点监控的病原菌。

【关键词】 斑马鱼;病原体检测;PCR 鉴定;人工感染;
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2017) 02-0025-04
doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856. 2017.02.005

Monitoring of pathogenic bacteria in zebrafish

FENG Li-ping, YANG Chi, LIN Jin-xing, HU Jian-hua
(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To conduct an epidemiological investigation of several pathogens in zebrafish, and to provide the basis for subsequent development of relevant standards. **Methods** This study mainly used traditional methods based on morphological, physiological and biochemical characteristics of bacteria, combined with molecular biology methods, to isolate bacteria and artificially infect healthy zebrafish with the bacteria. Through investigating the incidence and mortality in the experimental group, we distinguished the virulent effect of the pathogens, and further understanding the pathogens affecting the health of zebrafish. **Results** There were three kinds of pathogens identified in all sampling institutions, including pathogenic *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Aeromonas hydrophila* was detected in most sampling institutions, and showed to possess strong virulence. *Aeromonas sobria* and *Pseudomonas aeruginosa* were detected in some sampling institutions, and the virulence of *Aeromonas sobria* was revealed to be weaker than that of *Aeromonas hydrophila*. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa* was the weakest among these three bacteria, did not induce typical clinical symptoms and death in the zebrafish. **Conclusions** *Aeromonas hydrophila* may cause contamination of fish experimental facilities, and it has been shown to be potentially able to infect humans. Thus regarding the fish infection routes, enough attention should be payed to *Aeromonas hydrophila*, and it should be the focus in the pathogens monitoring.

【Key words】 Zebrafish; Pathogen detection; PCR identification; Artificial infection;

[**基金项目**]国家科技支撑计划课题(No. 2013BAK11B02)和上海市科技发展基金(No. 15140901000)资助。
[**作者简介**]冯丽萍,女,硕士,助理研究员,研究方向:斑马鱼质量控制,Email:flp2013@ foxmail. com。
[**通讯作者**]胡建华,男,研究员,主要从事实验动物质量控制研究,Emial:jhhu@ live. cn。

斑马鱼属于辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属,其作为新型的模式生物,具有很多优势,比如体型小、饲养成本低、管理方便;体外受精、发育且早期胚胎透明等,同时在基因水平上与人类具有高度同源性,使其在生命科学研究领域中的应用日益广泛[1-3]。随着斑马鱼在生物医学科研和环境监测中的大量使用,国内对高质量斑马鱼供鱼的需求也不断增加。斑马鱼质量对于试验结果,和人员的健康安全都有重大的意义[4]。有报道表明斑马鱼质量不同引起实验差异,为了确保科学实验的可靠性,对斑马鱼质量的控制已成为一个不容忽视的重要环节,然而有关斑马鱼质量控制的情况却鲜有报道。其中细菌性病原作为目前影响实验用斑马鱼健康的关键因素,备受国内外学者的关注[4-6]。本文通过检测评估国内斑马鱼细菌感染情况,为相关国家或地方标准的制定,提供临床调研数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

根据斑马鱼繁殖生长周期、实验动物等级及监测国家标准(GB14922.2-2010)以及 OIE 诊断手册要求,按以下所述取样:均选取成年斑马鱼,少于 100 尾,抽样 5 尾或更多;100 尾~500 尾,抽样不少于 10 尾,饲养群体 500 尾以上者,取样不少于 20 尾。

1.2 主要培养基及阳性对照菌株

胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、羊血琼脂平板、NAC 液体培养基、NAC 平皿。

阳性对照菌株仅有嗜水气单胞菌,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)的编号为 CGMCC 1.2017。

1.3 主要实验仪器和试剂

Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet 生物安全柜;奥林巴斯体视显微镜 SZX7 以及蔡氏光学显微镜 Axiostar Plus; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 分光光度计; PCR 仪 Biometra T-gradient Thermoblock;凝胶成像系统 Bio-Rad Universal Hood II, GelDoc-It Imaging System; API 生化鉴定系统为法国梅里埃公司产品。2 × Es Taq Master Mix 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; API ID32E 试剂条购自法国梅里埃公司。

1.4 方法

1.4.1 采样:选取上海 5 家不同的斑马鱼单位,各采斑马鱼 20 尾,共计采样 100 尾。所有斑马鱼均在采样地现场确认活体,按采样的饲养系统或水族箱分别标号,依次为 1-1#~20#,2-1#~20#,3-1#~20#,4-1#~20#,5-1#~20#。

1.4.2 检样方法:参照 OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals(OIE 水生动物疫病诊断手册,下文简称 OIE 手册)中鱼类病原体指标及鱼类常见病原体,即嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、海鱼分支杆菌、黄杆菌、链球菌和铜绿假单胞菌等共计 6 种病原体指标,对其进行分离培养鉴定及分子生物学检测。

1.4.3 病原菌的分离培养及鉴定:无菌操作条件下取斑马鱼体表病灶组织及腹腔器官团进行组织匀浆,利用接种环平板划线法接种于羊血平皿和 NAC 液体培养基,于 30℃条件下恒温培养 10~24 h,观察细菌的生长状况及菌落特征。采用 ID32E 微量多项试验鉴定系统对细菌纯培养物进行生理生化试验的检测。

NAC 液体培养基中均匀混浊生长、有菌膜或培养基中有绿色色素,部分菌株延长培养时间可产生色素,即可转接到 NAC 平皿中 42℃培养,纯培养物可进行生理生化鉴定。

1.4.4 PCR 鉴定:以鱼体组织和水样中分离纯化所得的菌株制作模板。选择黄杆菌属、分枝杆菌属、链球菌属以及气单胞菌属等斑马鱼常见病原菌所属的种属特异性引物,分别对纯培养的分离株进行 PCR 筛选。具体引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列及扩增产物大小

Tab. 1 Primer sequences and size of the amplification products

名称	引物	产物大小
黄杆菌属	F:AGTGTTTGATCATGGCTC R:GGACCCTTTAAACCCAA	561bp
分枝杆菌属	F:GCGAACGGGTGAGTAACAC R:TGCACACAGGCCACAAGGG	924bp
链球菌属	F:GTACAGTTGCTTCAGGACGTA R: ACGTTCGATTTCATCACGTTG	197bp
气单胞菌属	F:CTACTTTTGCCGGCGAGCG R:TGATTCCCGAAGGCACTCC	953bp

PCR 反应体系：DNA 模板 1 μL，上游引物 2 μL，下游引物 2 μL，2 × Es Taq Master Mix10 μL，灭菌 ddH_2O 5 μL。PCR 反应条件：94℃预变性 5 min，94℃变性 45 s，退火温度梯度范围为 45 ~ 60℃，退火时间 45 s，72℃延伸，时间梯度范围设定为 30 ~ 60 s，共设 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。

1.4.5 人工感染实验：将平均体长约为 4 cm，平均体重 0.7 ~ 0.9 g 斑马鱼随机进行分组，每组 6 条，移至感染实验室饲养以适应环境。按 1∶100 比例转接，30℃恒温培养 4 ~ 10 h 至菌液浑浊后，利用分光光度计测量菌液 A_{600} 值并控制在 0.8 ~ 1.0 的范围内，12 000 r/min 离心 1 min，弃上清液，收集菌体，用 PBS 洗 1 次，细菌悬液浓度调节为 1×10^{10} CFU/mL，注射剂量为 10 μL/条，采用腹腔注射的方法感染斑马鱼，并设置 1 组 PBS 对照组。实验周期内，注意随时观察斑马鱼的活力、摄食、发病症状和死亡情况，并及时做好相关记录。

2 结果

2.1 菌落形态特征

不同样品在羊血平皿上长出同一种菌落，编为同一个细菌标号 Z1 ~ Z5。其中 Z1 分离于 1 - 3#，3 - 5#，5 - 15#；Z2 分离于 1 - 11#、20#，3 - 3#，4 - 13#，5 - 1#；Z3 分离于 1 - 5#；Z4 分离于 2 - 7#；Z5 分离于 4 - 10#。

在羊血平皿上挑取可疑菌落纯化培养，涂片镜检均为革兰氏阴性杆菌。可疑菌落 Z1 菌落边缘整齐，中央凸起，湿润有光泽、灰白色、溶血。Z2 菌落表面光滑、中央微微凸起、圆整、无色，并有特殊芳香气味，β 溶血。Z3 在 NAC 平皿上菌落扁平，边缘不齐锯齿状，并产生绿色色素，42 ℃可以生长。Z4 菌落表面光滑，边缘整齐，圆形，湿润，呈不透明淡黄色，菌落偏小。Z5 菌落边缘光滑整齐，中央凸起，生长良好，溶血。

2.2 生化鉴定

采用 ID32E 微量多项试验鉴定系统分别分离株纯培养物进行生理生化特征的检测，其自动鉴定结果显示 Z1 ~ Z5 依次对应为：温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、铜绿假单胞菌，类志贺邻单胞菌和泛菌属 2 其主要生理生化特征如表 2 所示。

表 2 可疑菌株的生理生化鉴定结果

Tab. 2 Identification of biochemical characteristics of the suspected bacterial strains

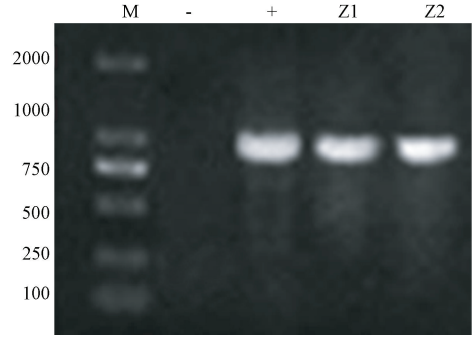
检测项目 \ 细菌编号	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
鸟氨酸脱羧酶 ODC	—	—	—	+	—
精氨酸双水解酶 ADH	+	+	+	+	—
赖氨酸脱羧酶 LDC	—	—	—	+	—
脲酶 URE	—	—	+	—	—
L - 阿拉伯糖醇 LARL	—	—	—	—	—
半乳糖酸盐 GAT	—	—	—	—	—
5-酮基-葡萄糖酸 5KG	—	—	—	—	—
脂肪酶 LIP	—	+	+	—	—
酚红 RP	—	+	—	+	+
β-葡萄糖苷酶 βGLU	—	+	—	—	—
甘露醇 MAN	+	+	—	—	+
麦芽糖 MAL	+	+	—	+	+
吲哚试验 IND	—	—	—	—	—
N-乙酰-β 葡萄糖苷酶 βNAG	—	+	—	—	—
β-半乳糖苷酶 βGAL	+	+	—	+	+
葡萄糖 GLU	+	+	+	+	+
蔗糖 SAC	+	+	—	—	+
L-阿拉伯糖 LARA	—	+	—	—	+
D-阿拉伯糖醇 DARL	—	—	—	—	+
α-葡萄糖 αGLU	—	—	—	+	—
α-半乳糖苷酶 αGAL	—	—	—	+	—
海藻糖 TRE	+	+	—	+	+
鼠李糖 RHA	—	—	—	—	—
肌醇 INO	—	—	—	+	—
侧金盏花醇 ADO	—	—	—	—	—
帕拉金糖 PLE	+	—	—	—	—
β-葡萄糖酸酶 βGUR	—	—	—	—	—
纤维二糖 CEL	—	—	—	—	—
山梨醇 SOR	—	—	—	—	—
α-麦芽糖苷酶 αMAL	+	+	—	—	—
丙二酸 MNT	—	—	+	—	—
L-天门冬素芳胺酶 AspA	—	—	—	—	—

注：“ + ”表示阳性；“ - ”表示阴性

Note. “ + ”means positive reaction; “ - ” means negative reaction

2.3 PCR 鉴定

将纯培养后的 Z1 ~ Z5 菌作为模版,利用黄杆菌属、分枝杆菌属、链球菌属以及气单胞菌属 4 类细菌种属的特异性引物进行 PCR 扩增,仅 Z1、Z2 扩增出了目的条带,与气单胞菌属的目标产物大小相一致,具体如图 1 所示。PCR 产物经测序,确定鉴定可靠。



注:M:DL2000 DNA 分子量标准; -:阴性对照; +:阳性对照;Z1、Z2: 分离株 Z1 和 Z2。

图 1 Z1 ~ Z2 PCR 扩增产物的电泳结果

Note. M: DL2000 DNA marker; -: negative control; +: positive control; Z1, Z2: the Z1 and Z2 isolates.

Fig. 1 Electrophoretic results of PCR amplification products from the Z1 and Z2 isolates

确定可疑菌株中仅有 Z1 ~ Z3 为所需检测病原体,其中 Z1 温和气单胞菌,Z2 为嗜水气单胞菌,Z3 为铜绿假单胞菌。

2.4 人工感染斑马鱼

以检测分离菌株 Z1 ~ Z3 感染斑马鱼,以确定分离株的致病力强弱。感染实验周期内观察并记录斑马鱼的活力、摄食、发病症状和死亡情况,可初步判断出 Z1 ~ Z3 菌株对斑马鱼的致病性强弱,临床表现为:Z1 实验组存在斑马鱼个体出现食欲减退,活动缓慢,尾部发红,尾鳍受损且无法正常活动的病症,10 d 内全部存活,提示该菌致病力较弱;Z2 实验组感染的斑马鱼,出现食欲不振,游动缓慢,腹部红肿等病症,24 h 内死亡率为 75%,提示该菌株为一种较强的致病菌;Z3 实验组感染的斑马鱼,体表正常,活动缓慢,食欲减退,未见明显异常症状,10 d 内全部存活,初步判定为一种非致病菌或者条件致病菌。由此可见嗜水气单胞菌为致病性嗜水气单胞菌,具有较强的致病力,可能是引发实验室斑马鱼患病的主要病原菌。温和气单胞菌能够引起斑马鱼临床病症,但致病力较弱。铜绿假单胞菌能够引起斑马鱼食欲不振等轻微症状,提示其为条件致病菌,并无需监控。

3 讨论

斑马鱼作为近年来新兴的一种非常有价值的模式生物,其健康状态常受到水体中病原体的影响,其中最重要的是病原菌[7, 8]。目前所发现的斑马鱼常见致病菌主要包括分支杆菌、黄杆菌、嗜水气单胞菌及温和气单胞菌等。为了确保用于科学实验的斑马鱼质量,定期对斑马鱼进行细菌学监测,并建立起疾病快速准确的诊断方法显得非常重要。

已知病原体的经典检测方法是分离培养鉴定确诊耗时耗力,不便于多个指标同时开展检测[9]。本实验考虑到大多数实验室无法收集完备的病原体或相应的诊断抗体作为对照,并且某些病原体对于培养所需的细胞株还有特定要求,故选用核酸诊断中的 PCR 方法处理可疑样品。本方法无需特殊的病原体或抗体对照,同时结合 PCR 产物测序方法以作为 PCR 方法的验证。

本文监测工作中鱼体主要检出嗜水气单胞菌和温和气单胞菌。嗜水气单胞菌同样可能造成对养鱼设备和水体的污染。由于铜绿假单胞菌为条件性致病菌,对斑马鱼危害较小,可以不作为监控的病原菌。致病性嗜水气单胞菌可感染人类,须引起重视做好操作人员的防护和培训[10, 11]。

斑马鱼易受水质的影响,因此对水的监测也应该引起重视并建立监测方法。控制斑马鱼质量应该从以下几个方面着手,首先应规范实验室引鱼流程,只引入被认可的斑马鱼,引入时尽量以鱼卵的形式方便消毒,切断病原体来源;如若引入幼鱼或成鱼应在隔离检疫后,才能于本鱼房的鱼合群。其次,养鱼饲料必须能排除病原体,并采用过滤消毒的水体养鱼。最后要注意的是成鱼应定期做常规病原体检测,试验前后应根据具体试验抽样进行必要的病原体检测。

参考文献:

[1] 耿波, 曹顶臣, 孙效文, 等. 斑马鱼 - 新型的实验动物 [J]. 水产学杂志, 2006, 19(2):106 - 108.

[2] 孙智慧, 贾顺姬, 孟安明. 斑马鱼:在生命科学中畅游 [J]. 生命科学, 2006,18(5): 431 - 436.

[3] Tavares B, Santos Lopes S. The importance of zebrafish in biomedical research [J]. Acta Med Port, 2013, 26(5): 583 - 592.

(下转第 80 页)

visual function in retinitis pigmentosa[J]. Curr Opin Neurobiol, 2011, 21(6): 942 - 946.
[46] Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, et al. Memory engram cells have come of age[J]. Neuron, 2015, 87(5): 918 - 931.
[47] Perkel J P D. Lighting our memories[J]. Biotechniques, 2016, 60(6): 268 - 272.
[48] Diester I, Kaufman M T, Mogri M, et al. An optogenetic toolbox designed for primates[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(3): 387 - 397.
[49] Han X, Qian X, Bernstein J G, et al. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain [J]. Neuron, 2009, 62(2): 191 - 198.
[50] Berdyyeva T K, Reynolds J H. The dawning of primate optogenetics[J]. Neuron, 2009, 62(2): 159 - 160.

〔修回日期〕2016 - 10 - 31

(上接第 28 页)

[4] 吴思昺, 王箐, 高昌, 等. 实验用斑马鱼主要疾病及其实验动物标准化研究过程面临的主要问题 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 51 - 55.
[5] Lü A, Hu X, Wang Y, et al. Comparative analysis of the acute response of zebrafish Danio rerio skin to two different bacterial infections [J]. J Aquat Anim Health, 2013, 25(4): 243 - 51.
[6] 钟女奇, 赵勇, 洪迅, 等. 实验动物细菌检测中的生物安全控制与预防 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(3): 51 - 54.
[7] Crim MJ, Riley LK. Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 135 - 143.
[8] Kent ML, Spitsbergen JM, Matthews JM, et al. Diseases of zebrafish in research facilities [M]. ZIRC, 2012, 4.
[9] 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, 106 - 121.
[10] 杨守明, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性 [J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511 - 514.
[11] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282 - 288.

〔修回日期〕2016 - 06 - 16

(上接第 58 页)

[8] 杨玉芳,曾健,劳山. 黄芪对顺铂肾损害大鼠肾功能及组织病理学的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(5): 669 - 671.
[9] 李传刚, 舒晓宏, 姜妙娜, 等. 大剂量顺铂所致大鼠急性肾损害过程中血浆内皮素 - 1 与肾功能变化的关系 [J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(6): 524 - 526.
[10] 蒋智, 黄晓玲, 杨红, 等. 超声造影观察兔急性肾衰竭前后肾皮、髓质血流灌注变化 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(1): 54 - 57.
[11] 董怡, 王文平, 丁红, 等. 超声造影定量技术评价兔急性肾功能衰竭早期灌注改变 [J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(1): 45 - 48.
[12] 李伟超, 刘俊平, 王宇, 等. 超声造影技术评价犬急性肾衰竭模型的研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2015, 36(2): 9 - 13.
[13] 申俊, 刘妍, 张金晓, 等. 尿中肾损伤分子 1 水平升高对大鼠早期肾损伤的预测作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 212 - 218.
[14] 王海燕. 肾脏病学(第 3 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2009: 440.

〔修回日期〕2016 - 07 - 13