

# 嗜水气单胞菌研究进展

张翠娟<sup>1</sup>, 于宙亮<sup>1</sup>, 赵宝华<sup>1</sup>, 何宏轩<sup>2</sup>

(1. 河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016 2 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

[收稿日期] 2008-04-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)07-0046-05 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 嗜水气单胞菌属于弧菌科气单胞菌属, 在自然界分布广泛, 可以感染多种水生及陆生动物并引起不同的疾病, 是一种重要的人-兽-鱼共患病病原菌, 概述了嗜水气单胞菌的分类地位和生物学性状, 并对其鉴定方法、致病因子和由其引起的疾病进行了综述。

**[关键词]** 嗜水气单胞菌; 研究; 进展

## Research Progress on *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Cui-juan<sup>1</sup>, YU Zhou-liang<sup>1</sup>, ZHAO Bao-hua<sup>1</sup>, HE Hong-xuan<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016

2. Institute of Zoology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; China)

**Abstract** *Aeromonas hydrophila* belongs to *Vibrionaceae Aeromonas*, widely distributed, which can infect a variety of aquatic and terrestrial animals with different disease outcomes and is a pathogenetic strain spread among human beings, beats and fishes. This paper summarized its taxonomic status and biological character; the identifying method, pathogenetic factors and the diseases caused by *Aeromonas hydrophila*.

**Key words** *Aeromonas hydrophila*; research; progress

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 在自然界分布广泛, 普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中, 是一种条件致病菌, 对水产动物、畜禽和人类均有致病性, 是一种典型的人-兽-鱼共患病病原菌<sup>[1]</sup>, 可引起多种水产动物的败血症和人类腹泻, 给人类的健康带来了威胁, 同时也给养殖业造成较大的经济损失, 已引起了国内外水产界、兽医学界和医学界的高度重视。目前国内外学者对嗜水气单胞菌的研究已取得了很大进展, 本文就国内外学者对其部分研究现状做一综述。

### 1 分类地位

嗜水气单胞菌属于弧菌科 (*Vibrionaceae*) 气单胞菌属 (*Aeromonas*)。根据有无运动力可将气单胞菌属分为嗜冷性、无运动力的嗜冷气单胞菌 (*Psy-*

*chrophilic group*) 和嗜温性、有运动力的嗜温气单胞菌 (*Mesophilic aeromonad*) 两类气单胞菌群。嗜水气单胞菌属于第二类, 是气单胞菌中最重要的一种, 是气单胞菌属的模式种, 它又可分为三个亚种: 嗜水亚种 (*A. hydrophila*), 不产气亚种 (*A. hydrophila anaerogenes*), 解氨亚种 (*A. hydrophila proteolytica*), 前两种是赖氨酸脱羧酶阴性, 后一种是赖氨酸脱羧酶阳性。运用同工酶技术和 DNA-DNA 杂交技术, 并结合生物型将气单胞菌属分为 14 个 DNA 杂交群 (DNA hybridization group, DHG), 嗜水气单胞菌属于 DHG1-2。

### 2 生物学性状

2.1 细菌的形态和特性 嗜水气单胞菌是兼性厌氧的革兰氏阴性短杆菌, 两端钝圆, 直或略弯, 单个

作者简介: 张翠娟 (1984年-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事分子细菌学研究。

通讯作者: 赵宝华, 男, 教授。E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com; 何宏轩, 男, 教授。E-mail: hehx@ioz.ac.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

或成双排列,大小为  $0.3 \sim 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 3.5 \mu\text{m}$ ,无荚膜,不产生芽孢。电子显微镜下可见极端单鞭毛,部分侧鞭毛<sup>[2]</sup>,有运动力。生长的适宜 pH 值为 5.5~9.0 最适生长温度为 25~30℃,最低 0~5℃,最高 38~41℃,在 45℃ 存活不超过 48 h。

**2.2 菌落的形态和特性** 嗜水气单胞菌在普通营养琼脂培养基上生长良好,形成圆形、边缘整齐、中央隆起、表面湿润、光滑、半透明、颜色由灰白色至浅黄色的菌落,并有特殊芳香气味。菌落大小因培养时间及温度而异,菌落小的仅有针尖大小,大的直径可达 2~3 mm。大多数菌株有血溶性,在血琼脂平板上生长旺盛且形成清晰的  $\beta$ -溶血环。

### 3 致病性及致病因子

**3.1 致病性** 嗜水气单胞菌的致病范围极其广泛,可引起淡水鱼类、蛙类、鳖类及包括人在内的多种哺乳动物的感染病症。如对虾的败血症,淡水鱼类的细菌性败血症(溶血性腹水病),蛙类的红腿病、鳖类的红底板病,哺乳动物的多种病症以及人类的腹泻、消化道及呼吸道感染<sup>[3]</sup>,甚至胰腺脓肿<sup>[4]</sup>。嗜水气单胞菌可以通过饮水、皮肤创伤等途径感染动物机体,并在体内经过不同途径对机体的不同器官进行破坏。其感染形式可以呈急性败血症,也可以由皮肤破损后引起局部感染,在抵抗力降低时,局部感染开始向全身扩散,严重时病原菌产生的外分泌物侵入血液,并在其中大量繁殖产生多种毒素,从而造成机体严重损伤,引起败血症。

**3.2 致病因子** 嗜水气单胞菌可产生多种致病因子,包括气溶素(aerolysin)、溶血素(hemolysin)、溶血毒素(hemolytic toxin)、细胞毒性肠毒素(cytolytic enterotoxin)、胞外蛋白酶(extracellular protease)、IV型菌毛、S层蛋白及载铁体等。

**3.2.1 外毒素(exotoxin)** 由于嗜水气单胞菌基因型的多样性,其外毒素的基因差异也很大,包括气溶素、溶血素、溶血毒素和细胞毒性肠毒素等。虽然外毒素名称各异,但这些毒素在结构和功能上都极为相似:它们都是单一多肽分子,并且其生物学活性相同,都具有溶血性、肠毒性和细胞毒性,因此外毒素属于同一基因家族。国际上将外毒素统一命名为气溶素(Aer)。在国内,涂小林、陆承平等从患暴发性传染病的家养鲫鱼中分离得到嗜水气单胞菌,并从其培养物中纯化获得一种分子量为 52.5 kDa 单一多肽的外毒素,根据毒素的生物学特

性将毒素命名为 HEC 毒素。但是, Rose 通过比较不同外毒素的氨基酸序列发现,虽然它们生物学活性很相近,但是氨基酸序列却有明显的差异。Wong 和 Albert 也分别从基因水平上证明了不同的外毒素的基因虽然具有一定的同源性,却仍然存在着差异。但为了利于研究进行以及文献检索引用方便,仍采用国际上的统一命名<sup>[5]</sup>。

**3.2.2 胞外酶** 胞外酶是嗜水气单胞菌重要的致病因子之一,研究得较多的是广泛存在于大多数嗜水气单胞菌的培养上清液中的金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。Gobius 等, Anguita 等分别克隆得到了嗜水气单胞菌的胞外淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶及磷脂酶。就其致病性而言,胞外蛋白酶有的具有直接致病性,有的则不具有直接致病性<sup>[6]</sup>,但可以活化其他致病因子,因为嗜水气单胞菌分泌的外毒素是以无活性的前体形式存在的,必须经过蛋白酶将其前体 C 末端的蛋白降解后才具有生物学活性。这些胞外酶的种类及性质随菌株、生长期、培养条件等差异而有所不同。孟喜龙、刘永杰、陆承平等对嗜水气单胞菌产弹性蛋白酶条件进行优化<sup>[7]</sup>,并用活化的右旋糖酐及单甲氧聚乙二醇(MPEG)分别对纯化的该酶进行化学修饰,两种修饰酶在耐热性、耐酸性等方面都优于天然酶,其稳定性具有较高的实用意义<sup>[8]</sup>。就其致病性而言,胞外蛋白酶有的具有直接致病性,有的则不具有直接致病性,但可以活化其他致病因子,因为嗜水气单胞菌分泌的外毒素是以无活性的前体形式存在的,必须经过蛋白酶将其前体 C 末端的蛋白降解后才具有生物学活性。

**3.2.3 粘附因子** 细菌感染的第一步就是粘附,病原菌通过粘附因子在合适宿主的特定组织或体表上定植而不被机体清除掉,从而有利于细菌在体内增殖并发挥毒性。嗜水气单胞菌的粘附因子包括菌毛、S层蛋白、外膜蛋白(out-membrane protein, OMP)和脂多糖。

嗜水气单胞菌的菌毛作为一种主要的粘附因子,促使细菌粘附在红细胞表面、机体肠道和消化道内。菌毛从 S 层晶格网孔伸出菌体外,并根据其形态不同可分为 W 菌毛(wavy pili)和 R 菌毛(rigid pili)。前者长而易弯曲呈波浪状,菌毛数量虽少,但与嗜水气单胞菌的粘附及血凝作用有关;后者短而硬,菌毛数量较多且周身分布,却不参与粘附。

许多病原菌在菌体外表面具有一层晶格状排

列的结构,称为 S 层, S 蛋白是构成 S 层的蛋白亚单位,有规则地排列在菌体表面,完整地包裹着菌体,具有抗吞噬、抗补体等多种生物学功能。在嗜水气单胞菌的表面结构中,只有 S 层能行使非菌毛粘附因子的作用,它还是嗜水气单胞菌的主要表面抗原,在嗜水气单胞菌的感染与免疫中起重要作用。

外膜蛋白是革兰氏阴性菌外膜的主要结构,是嗜水气单胞菌重要的粘附因子和保护性抗原,与细菌的毒力也密切相关<sup>[9]</sup>,其数量、种类及毒力大小随着不同菌株及菌株的不同培养条件而有所变化。

脂多糖是嗜水气单胞菌的内毒素,其毒性主要为热原性,表现为白细胞数目减少或增多,弥漫性血管内凝血,神经症状及休克以至死亡等。

总之,嗜水气单胞菌的致病因子繁多复杂,它们对机体发挥毒性作用时也不是单个因子独立作用,而是相互协同作用于机体的<sup>[10]</sup>。

#### 4 鉴定及诊断检测方法

4.1 生化鉴定 鉴定嗜水气单胞菌的常规做法是分离培养细菌并进行生理生化实验鉴定。因为各地菌株存在着差异,因而选用的生化试验指标也不尽相同。

Camahan 等推出一种简易的鉴定方法,对 60 株临床分离菌进行初步鉴定,其准确率达到 97%。马子行等提出了鉴定嗜水气单胞菌的 9 项生化指标为关键性反应,精氨酸双水解酶(+),赖氨酸脱羧酶(+),鸟氨酸脱羧酶(-),VP 试验(+),葡萄糖产气(+),七叶苷或水杨苷水解(+),甘露醇或靛基质(+),蔗糖(+),纤维二糖(-)。董传甫等以革兰氏阴性,七叶苷(+),阿拉伯糖(+),氧化酶(+),葡萄糖产气(+),作为对嗜水气单胞菌鉴定的初选指标,效果不错。陆承平认为鉴定嗜水气单胞菌的生化指标有:氧化酶(+),发酵葡萄糖产酸产气,甘露醇(+),水杨苷(+),蔗糖(+),VP 试验(+),吲哚试验(+),等<sup>[5]</sup>。致病性嗜水气单胞菌鉴定方法的国家标准是:嗜水气单胞菌在普通琼脂平板上,28℃培养 24 h 后的菌落为光滑、微凸、圆整、无色或淡黄色,有特殊芳香气味;氧化酶试验(+);穿刺接种 AHM 鉴别培养,顶部仍为紫色,底部为淡黄色,细菌沿穿刺线呈刷状生长,即运动力阳性,部分菌株顶部呈黑色;吲哚试验(+);革兰氏染色(-);糖发酵试验,可发酵葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷及水杨苷。

4.2 免疫学检测 对嗜水气单胞菌免疫学检测技术主要有 Dot-ELISA、间接 ELISA、间接荧光抗体法等,这些方法的灵敏度一般可达到  $10^{-9}$  级,但需要制备特异的抗血清。

陈怀青等应用 Dot-ELISA 法检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 HEC 毒素,可检出的最低水平为 95 ng/mL,该法无须做复杂的细菌鉴定,并能直接用于病料,是一种快速、敏感、特异、有效的方法。钱冬等用双抗体夹心 ELISA 检测暴发病病原——嗜水气单胞菌,该法可测出 10 ng 抗原,能有效地检测出人工感染白鲫中的病原体,整个过程可在 1.5 h 内完成,且对点状气单胞菌、温和气单胞菌等菌株不发生交叉反应。陈琼等从致病性嗜水气单胞菌培养上清液中提取到一种外毒素 HEC,并筛选得到了 8 株抗毒素的单克隆抗体能特异性地抑制 HEC 毒素的高溶血活性,并用其中的 1B4 和 5E3 两株细胞制备的腹水混合,建立了检测 HEC 毒素的 Dot-ELISA 法,应用此法对 95 株临床病鱼分离菌检测阳性率为 76%,敏感性高于多抗点酶法。李焕荣等建立了检测气单胞菌胞外蛋白酶的 Dot-ELISA 法,可用于快速、定性检测气单胞菌,对判定菌株是否致病有一定作用。刘颖等应用 Dot-ELISA 法检测嗜水气单胞菌全菌抗原,重点针对细菌性病原的复杂抗原成分,预处理特异性抗血清,通过降低非特异性反应带来的交叉反应干扰来提高检测灵敏度,使得对嗜水气单胞菌引起的疾病进行早期预报成为可能<sup>[15]</sup>。

李卫军<sup>[11]</sup>应用间接荧光抗体法(IFA)对人工感染鲟鱼体内的嗜水气单胞菌进行检测,结果显示 IFA 不但能有效地检出鲟鱼体内的嗜水气单胞菌,而且不与杀鲑气单胞菌、荧光假单胞菌、爱德华氏菌发生交叉反应,说明 IFA 具有较好的敏感性与特异性。

De lan are<sup>[12]</sup>等用嗜水气单胞菌 ATCC7966 菌株的生长细胞免疫小鼠,将其脾细胞与骨髓瘤细胞融合,制备特异的单克隆抗体,ELISA 分析表明 MA5F3 能快速地检测出患者粪便中的嗜水气单胞菌。陈红燕<sup>[13]</sup>等利用杂交瘤单克隆抗体技术制备了 AHYT-1 和 AH105012 株嗜水气单胞菌的菌体单克隆抗体,经筛选获得了 11 株稳定细胞株,并对其分泌的单抗进行了特性分析,建立了一种快速诊断鱼类嗜水气单胞菌病的方法和血清分型方法。

郭闯等<sup>[14]</sup>以嗜水气单胞菌纯化的气溶素免疫 8 周龄的 Balb/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 获得 1 株稳定分泌气溶素单克隆抗体的杂交瘤细胞, 抑制效价和中和效价分别为 1: 128 和 1: 128, 并用此单克隆抗体对临床分离的 50 株嗜水气单胞菌培养上清检测, 有 48 株呈阳性反应, 建立了检测嗜水气单胞菌气溶素的方法。陈瑞<sup>[15]</sup>等用甲醛灭活的嗜水气单胞菌免疫 Balb/c 小鼠, 得到 5 株能稳定分泌 MAbs 的杂交瘤细胞系, 又经交叉反应试验筛选得到一株可用于特异性地检测嗜水气单胞菌, 为该菌的免疫学检测及防治提供了有用试剂。

4.3 分子生物学检测 随着分子生物学等技术的发展, 逐渐产生了基于 PCR (聚合酶链式反应) 的检测方法, 其特异性强, 灵敏度高达  $10^{-12}$  级, 并且设计的引物可以长期保存使用, 又因其快速、敏感的优点, 适于早期和大量样品的检测。因此, 近年来不少学者以嗜水气单胞菌的毒力基因设计引物进行 PCR 检测嗜水气单胞菌。

Pollard<sup>[16]</sup>等率先根据嗜水气单胞菌的气溶素 *aerA* 基因设计一对特异性引物, 从嗜水气单胞菌扩增得到 209 bp 的核酸片段, 并应用于临床检验。以后陆续有研究者<sup>[17-18]</sup>针对嗜水气单胞菌的不同基因设计引物进行 PCR 检测嗜水气单胞菌。但是并不是所有菌株都携带所有的基因, 也不是所有基因都与致病性相关。朱大玲等<sup>[19]</sup>采用 PCR 扩增的方法对 9 株鱼源嗜水气单胞菌中的气溶素基因 (*aerA*)、溶血素基因 (*hlyA*) 和丝氨酸蛋白酶基因 (*ahpA*) 进行了扩增, 结果表明, *ahpA* 阳性的菌株皆为有毒株, 该基因的存在与毒株的毒力相关, 而且虽然在几乎所有菌株中都能检测到的 *hlyA* 基因, 但却没有发现该基因与毒株的毒力存在相关。郭松林<sup>[20]</sup>等以溶血素和外膜蛋白的基因序列为目的基因设计引物, 采用双重 PCR 方法检测了 32 株从发病欧鳗分离的细菌, 结果显示其中 4 株既有溶血素基因又有外膜蛋白基因, 其生化鉴定结果全部为阳性, 而仅具有外膜蛋白基因的 13 株菌株中只有 5 株生化鉴定结果为阳性, 证明双重 PCR 法可用于快速检测部分嗜水气单胞菌。饶静静<sup>[21]</sup>等针对致病性嗜水气单胞菌的 *hlyA* 基因、*aerA* 基因以及 16S rRNA 保守区设计引物, 通过进行多重 PCR 反应体系优化, 产物的测序鉴定与特异性和敏感性实验, 建立了一种检测致病性嗜水气单胞菌的多重

PCR 检测方法, 该方法的建立对水产动物嗜水气单胞菌病的快速诊断和分子流行病学的调查有重要意义。Shannon<sup>[22]</sup>等以嗜水气单胞菌的 *aha I* 为靶基因, 采用 TaqMan real-time quantitative PCR 检测废水中的嗜水气单胞菌, 结果显示检测所需的最低基因组 DNA 量为 100 fg 这种 PCR 方法可以有效检测废水中包括嗜水气单胞菌在内的多种病原菌。

## 5 展望

嗜水气单胞菌是一种引起淡水养殖鱼类败血症的主要致病菌, 还能引起人和多种动物的疾病。自从 20 世纪 80 年代末在我国南方出现并引起许多主要淡水养殖鱼大面积爆发性死亡以来, 嗜水气单胞菌一直频繁地给水产养殖业造成严重的经济损失。近年来又经常从鳖类、家禽以及人的粪便中分离到嗜水气单胞菌, 其危害性也日益引起人们的广泛关注。嗜水气单胞菌对多种抗生素及化学药物都比较敏感, 如链霉素、四环素、氯霉素、卡那霉素、庆大霉素、氟哌酸、呋喃类药物、环丙沙星、恩诺沙星等。但由于这些传统化学药物防治该病效果较差并会引起耐药性及环境污染等诸多问题, 而且难以有效地控制, 因而国内外研究人员在开发高效、安全的疫苗方面已做了大量的研究。我国在全菌灭活苗、减毒活疫苗和菌体成分亚单位苗的制备上已取得了一定的成果, 然而因嗜水气单胞菌血清型众多, 不同地区、不同鱼种之间分离的菌株差异明显, 灭活疫苗使用剂量大, 机体的免疫应答水平较低, 弱毒疫苗存在毒力反强等原因而导致免疫效果不佳。近些年针对嗜水气单胞菌的保护性抗原基因构建的基因工程疫苗以及更新一代的核酸疫苗, 都具有较好的免疫保护效果, 但仍处于试验探索阶段, 尚无商品化的疫苗投放市场, 因此开发新型疫苗以针对多种血清型菌株仍是今后防治嗜水气单胞菌引起疾病的重要方向。

## 参考文献:

- [1] 吴会民, 林文辉, 石存斌. 嗜水气单胞菌研究概述 [J]. 河北渔业, 2007, 3: 7-11.
- [2] Canals R, Altarriba M, Vilches S *et al*. Analysis of the Lateral Flagellar Gene System of *Aeromonas hydrophila* AH-3 [J]. J Bacteriol 2006, 188(3): 852-862
- [3] 张运强, 李庆乐. 嗜水气单胞菌的致病性及其防治方法 [J]. 广西农业科学, 2007, 38(5): 565-568.
- [4] De Gascun C F, Rajan L, O'Neill E, *et al*. Pancreatic Abscess

- due to *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Infect* 2007, 54: 59–60.
- [5] 于学辉, 王元微, 汤承, 等. 嗜水气单胞菌的研究进展 [J]. 西南民族大学学报, 2007, 33(3): 507–514
- [6] Casón A, Yugueros J, Tempiano A, *et al*. A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3233–3241
- [7] 孟喜龙, 刘永杰, 陆承平. 嗜水气单胞菌产弹性蛋白酶条件的优化 [J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 98–101
- [8] 孟喜龙, 刘永杰, 陆承平. 化学修饰对嗜水气单胞菌弹性蛋白酶活性及稳定性的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(7): 1–3
- [9] Gryllos I, Shaw J G, Gavin R, *et al*. Role of fib locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(1): 65–74.
- [10] Yu H B, Zhang Y L, Lau Y L, *et al*. Identification and Characterization of Putative Virulence Genes and Gene Clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 [J]. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(8): 4469–4477.
- [11] 李卫军. 应用间接荧光抗体法检测鱼类嗜水气单胞菌的试验研究 [J]. 中国动物检疫, 1998, 15(4): 5–6.
- [12] Delamare A P, Echeverri-garay S, Duarte K R, *et al*. Production of a Monoclonal Antibody against *Aeromonas hydrophila* and Its Application to Bacterial Identification [J]. *J Appl Microbiol* 2002, 92(5): 936–940.
- [13] 陈红燕, 林天龙, 陈日升, 等. 嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 121–125
- [14] 郭闯, 方苹, 郭力新, 等. 嗜水气单胞菌气溶素单克隆抗体的制备及初步应用 [J]. 水产科学, 2007, 26(3): 167–170.
- [15] 陈瑞, 于辉, 唐旭, 等. 抗嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及初步鉴定 [J]. 免疫学杂志, 2007, 23(5): 583–585
- [16] Pollard D R, Johnson W M, Lior H, *et al*. Detection of the Aerolysin Gene in *Aeromonas hydrophila* by the Polymerase Chain Reaction [J]. *J Clin Microbiol* 1990, 28(11): 2477–2481.
- [17] Wang G, Clark C G, Liu C, *et al*. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas Sobria* by Multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol* 2003, 41(3): 1048–1054
- [18] Kong R Y, Lee S K, Law T W, *et al*. Rapid detection of Six Types of Bacterial Pathogens in Marine Waters by Multiplex PCR [J]. *Water Res* 2002, 36(11): 2802–2812
- [19] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2006, 45(1): 82–85
- [20] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟. 双重 PCR 法快速检测欧鳊嗜水气单胞菌 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2007, 12(4): 294–300
- [21] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749–755
- [22] Shannon K E, Lee D Y, Trevois J T, *et al*. Application of Real-time Quantitative PCR for the Detection of Selected Bacterial Pathogens during Municipal Wastewater Treatment [J]. *Sci Total Environ*, 2007, 382: 121–129.

(上接第 45 页)

- [10] Telfer S, Zervas G, Knott P. Water Soluble Glass Articles Their Manufacture, and Their Use in the Treatment of Ruminant Animals [J]. US Patent 4, 1984: 482–541.
- [11] Cardinal J R. Controlled Drug Delivery: Veterinary Applications [J]. *J Control Rel* 1985, 2: 393
- [12] Grimshaw W T R, Weatherley A J. Veterinary Devices [J]. US Patent 4, 994–275.
- [13] Laby R H. Controlled Release Compositions for Administration of Therapeutic Agents to Ruminants US Patent 4, 1981: 251–506
- [14] Conrad J M, Skinner D S. Controlled Sustained Delivery of Morensin in Cattle the Monensin R. D. D. [J]. *J Control Rel* 1988, 9: 133–147
- [15] 刘付启荣, 冯淇辉. 丙硫苯咪唑控释装置及其在山羊体内的释药过程和药效研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1993, 24(6): 560–565
- [16] Jones R M. Therapeutic and Prophylactic Efficacy of Morantel When Administered Directly into The Rumens of Cattle on a Continuous Basis [J]. *Vet Parasitol* 1983, 12: 223–232
- [17] Brewer M D, Griffin G J L. Sustained Released Compositions [J]. US Patent 4, 1980: 228–149
- [18] Pope D G, Wilkerson P K, Egerton J R, Conroy J. Oral Controlled Release Delivery of Ivermectin in Cattle via an Osmotic Pump [J]. *J Pharm Sci* 1985, 74: 1108–1110
- [19] 马驿, 彭金菊. 驱虫药的控释系统及其应用 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(6): 62–64.