

鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的建立

邵光富 鄢庆枇 徐晓津 李 芊 覃映雪*

(农业部东海海水健康养殖重点实验室 集美大学水产学院, 厦门 361021)

摘 要 为建立鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌的数量模型,研究了感染时间一定、感染复数变化的情况下鳗鲡外周血白细胞吞噬的细菌数量和白细胞的存活率,同时还研究了感染复数一定、感染时间变化的情况下鳗鲡外周血白细胞吞噬的细菌数量和白细胞的存活率。结果发现,鳗鲡外周血白细胞对嗜水气单胞菌有较强的吞噬作用,在感染复数为 100:1、感染时间为 30min 时细胞吞噬的细菌量达到饱和,而细胞本身仍可维持较高活性。表明 100:1 的感染复数及 30min 的感染时间,是研究鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的最佳参数。本研究还通过检测吞噬速率和杀菌速率评估建立起来的数量模型发现,鳗鲡外周血白细胞吞噬嗜水气单胞菌的速率较吞噬大肠杆菌的速率快,但杀灭该菌的速率却均显著低于杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的速率,进一步证明建立的数量模型具有良好的可行性。

关键词 外周血白细胞 吞噬 嗜水气单胞菌 鳗鲡

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0068-07

Establishment of quantitative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing *Aeromonas hydrophila* in vitro

TAI Guang-fu YAN Qing-pi XU Xiao-jin LI Qian QIN Ying-xue*

(Fisheries College, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Jimei University, Xiamen 361021)

ABSTRACT In order to establish the quantitative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing *Aeromonas hydrophila* in vitro, we first examined the variation of the number of bacteria phagocytosed by eel peripheral blood leukocytes and the survival ratio of the leukocytes when the infection time was unvaried and the infection multiplicity was changed, as well as when the infection multiplicity was stable and the infection time was changed. It was found that the phagocytosis of eel peripheral blood leukocytes against *A. hydrophila* was significant. When the infection multiplicity was 100:1 and the infection time was 30 min, the number of the bacteria that phagocytosed by eel peripheral blood leukocytes reached saturation while the leukocytes still maintained high activity, indicating that 100:1 and 30 min was the optimal infection

福建省自然科学基金(2013J0113)和福建省杰出青年基金(2011J06014)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-28; 接受日期: 2013-03-10

作者简介: 邵光富(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物病原学与免疫学研究。E-mail: love9328@sina.com

multiplicity and infection time. In addition, the quantitative model was validated by detecting predation velocity and sterilization velocity. It was found that the phagocytosis velocity for eel peripheral blood leukocytes against *A. hydrophila* was faster than that against *Escherichia coli*, while the velocity for killing *A. hydrophila* was significantly lower than that for killing *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, which shows that the established quantitative model can be used for further study on intracellular survival mechanism of *A. hydrophila*.

KEY WORDS Peripheral blood leukocyte Phagocytosis
Aeromonas hydrophila Eel

鳎不仅味道鲜美、少刺多肉,而且营养丰富,具有滋补强身的作用,是一种很受欢迎的名贵鱼类。然而,近年来高密度集约化养殖导致鳎病害频发,给养殖业造成巨大的经济损失,其中嗜水气单胞菌是引发鳎养殖病害的主要病原之一(饶静静等 2007;潘晓艺等 2010;Reyes-Becerril *et al.* 2011;Jiravanichpaisal *et al.* 2009)。

嗜水气单胞菌为革兰氏阴性短杆菌,极端单鞭毛,没有芽胞和荚膜,广泛分布于自然界的各种水体,是典型的人-兽-鱼共患的条件致病菌(毛秀秀等 2011)。由该菌导致的疾病一般病势较猛,多为恶性传染病,死亡率很高(Natrah *et al.* 2012)。目前,针对嗜水气单胞菌检测技术及致病机制的研究已较为深入(李晨等 2010;Sha *et al.* 2009;Delamare *et al.* 2002),现有研究发现,嗜水气单胞菌对机体细胞的侵袭起始于细菌对细胞的黏附,紧接着是细菌的内化和繁殖并释放若干的毒力因子如外毒素、胞外蛋白酶等,这些毒力因子与细菌的菌毛、外膜蛋白、脂多糖等相互协调共同作用于机体,进而引起细胞的溶解和组织的损伤(于学辉等 2007)。

吞噬细胞在清除病原微生物的过程中发挥着重要的作用。研究发现,吞噬细胞和病原菌的相互作用分为两个相互依赖的阶段,第一个阶段是识别摄入阶段,第二个阶段是摄入的细菌在细胞内存活或繁殖而细胞则对此进行处理的阶段(Ryckaert *et al.* 2010)。前一个阶段是研究吞噬细胞和病原菌相互作用的基础,因此过去的研究主要针对的是识别摄入阶段(Geho *et al.* 2006);而现有研究则发现,在吞噬细胞内存活的能力也是决定细菌毒力的重要因子,因而研究病原菌在吞噬细胞内存活的机理也成为研究热点之一(McCarthy *et al.* 2008)。综上因素,建立吞噬细胞体外吞噬病原菌的数量模型,并进一步研究病原菌被吞噬后在细胞内存活的机理,对了解病原菌的致病机理具有极其重要的意义。但目前这方面的研究主要集中在人类致病菌中,水生动物病原菌的相关研究还相当薄弱。

鱼类血液白细胞在抗传染免疫中起着至关重要的作用,而白细胞中粒细胞和单核细胞都具有较强的吞噬作用,它们是机体抵抗病原入侵的重要防线(王军等 2001)。为了解嗜水气单胞菌与吞噬细胞的相互作用,本研究建立了鳎外周血白细胞吞噬嗜水气单胞菌的数量模型,为进一步探讨嗜水气单胞菌在吞噬细胞中的存活能力以及该菌的致病机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株的培养及菌悬液的制备

本研究用的嗜水气单胞菌分离于自然发病的鳎,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心的标准菌株。细菌均采用牛肉膏蛋白胨培养基培养,嗜水气单胞菌培养温度为 28℃,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌温度为 37℃,培养时间均为 12h,培养好的细菌用磷酸盐的缓冲液(PBS, pH 7.4)洗脱后制备不同浓度的菌悬液。

1.2 鳎外周血白细胞的分离

鳎用 75%乙醇体表消毒后,注射器尾部静脉取血。将抽取的血液置于等量冷却至 4℃的 L-15 细胞培养

液(0.1%胎牛血清, 100 IU 链霉素或青霉素/ml 和 10 IU 肝素/ml)中。将上述混合液用注射器缓慢沿着试管壁加入等体积的 60%的 Percoll 液中,置于 4℃下 350g 离心 15min,小心吸取交界面处的细胞带,放入 5ml 离心管中,加 10% L-15(10%胎牛血清, 100 IU 链霉素或青霉素/ml 和 10 IU 肝素/ml)洗涤,4℃下 350g 离心 10min 收集细胞,重复洗涤 1~2 次后用瑞氏和吉姆萨混合染色法检测分离的效果,同时采用台盼蓝染色法检测细胞活性,血细胞计数器计数后用含 10%胎牛血清的 L-15 调整细胞的浓度为 2×10^6 个/ml 备用(李金凤等 2008;陈刚等 2005、2006)。

1.3 外周血白细胞吞噬细菌的电镜观察

取上述制备的细胞悬液按 1ml/孔的量加入六孔板中,再分别加入 1 ml 浓度为 2×10^8 CFU/ml 的菌悬液(MOI=100),28℃混合培养 30 min,将培养后的混合液转移到无菌离心管中,28℃、400 g 离心 10 min,弃上清液后,加入 2.5%的戊二醛 2ml 重悬沉淀,于 4℃固定 30 min 后离心,弃上清液并用无菌的 PBS 洗涤沉淀 1~2 次,最后用无菌 PBS 重悬作为待观察样品。用聚醋酸甲基乙烯脂涂抹的铜网捞取样品,静置 5min,然后在 80 kV 的加速电压下用透射电子显微镜观察吞噬细胞对细菌的吞噬并拍照。

1.4 不同感染复数及不同感染时间下外周血白细胞吞噬的细菌数量及细胞的存活率

将制备的细胞悬液按 1ml/孔的量加入六孔板中(另设只加入细胞培养液 L-15 为空白组),接着将浓度分别为 2×10^7 、 2×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 CFU/ml 的菌悬液按 1 ml/孔的量加入六孔板中与细胞混合,使各实验组感染复数分别为 10 : 1、100 : 1、500 : 1、1 000 : 1,细胞悬液中加入 PBS 设为对照组,空白组中也加入 PBS。然后将六孔板放入 28℃的培养箱中培养 30 min,使细菌与细胞混合感染。将混合液转移至无菌离心管中,28℃下 150g 离心 5 min,去除上清液至剩下约 1ml 体积,然后加 20 μ l 浓度为 100 mg/ml 的庆大霉素杀胞外菌 20 min。之后加入 3 ml 的 L-15 细胞培养液稀释样品,平均分为两份,一份样品按 200 μ l/孔的量接种于 96 孔板,设 10 个平行复孔,然后各孔加入 5 mg/ml MTT 试剂 20 μ l,继续培养 4 h,弃除上清液后加入 DMSO 150 μ l,静置 30 min,最后用酶标仪(490 nm)测每孔光密度值并计算细胞存活率(Cell survival rate, CSR) = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。另一份样品在 28℃下 150g 离心 5 min,上清液涂板,检测胞外杀菌的效果,沉淀用 PBS 清洗两次,加无菌蒸馏水使细胞涨破并进行梯度稀释后涂板,每个梯度做 3 个平行,28℃培养过夜后统计平板菌落数量。根据计数结果选择适宜的感染复数,将细菌与细胞混合感染的时间分别设为 10、20、30、60、90、120、150 min 共 7 个时间,然后参照上述方法测定不同感染时间下细胞吞噬的细菌数量及细胞的存活率(Lowe *et al.* 1999)。

1.5 吞噬速率和杀菌速率

用含 10%血清的 PBS 配制浓度为 2×10^8 CFU/ml 的菌悬液,取 1 ml 置于 28℃下以 6 r/min 的速度持续上下颠倒转动管子 20 min 后与 1 ml 上述备用的细胞悬液在 28℃混合培养 30 min(对照组中则将细菌与等量 PBS 混合后进行梯度稀释涂布平板,最终计数结果计为 A_0),之后 150g、4℃离心 5 min,将上清液移至另一管,沉淀用 0℃的 PBS 洗涤后再离心,如此重复两次。将两次洗涤收集的上清液混合并采用平板菌落计数法涂布平板,结果计为 A(即胞外细菌数),另外将收集的细胞用 1ml 蒸馏水破碎,释放出的细菌进行平板菌落计数,结果计为 B(胞内细菌数)。每次实验做 3 个平行样并重复进行 3 次独立实验,结果根据公式 $A = A_0 e^{-K_1 t}$; $B = A_0 K_1 (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t})$; $T_{1/2} = \ln 2 / K$ 计算出吞噬速率(K_1)、杀菌速率(K_2)及吞噬半数感染细菌或杀死半数被吞噬细菌所需时间 $t_{1/2}$ (Hampton *et al.* 1994)。

1.6 数据处理

结果以平均数±标准偏差表示,用 EXCEL、SPSS 进行统计学分析。

2 结果

2.1 电镜观察鳗鲡外周血白细胞对嗜水气单胞菌的吞噬

图 1 中的照片显示,电镜下可清晰观察到鳗鲡外周血白细胞正形成伪足将细菌包裹吞噬。这一结果说明本研究所采用的方法是可行的。

2.2 不同感染复数下外周血白细胞吞噬的细菌数量及细胞的存活率

由图 2 可知,当感染复数为 10 : 1 时,细菌和细胞混合培养 30 min 后,细胞吞噬的细菌数量约为 1.6×10^6 CFU/ml,当感染复数达到 100 : 1 时,被吞噬的细菌数量显著增加至 2.5×10^6 CFU/ml ($P < 0.05$),但当感染复数进一步增加到 500 : 1 和 1 000 : 1 时,被吞噬的细菌数量与感染复数为 100 : 1 时的被吞噬细菌数间均不存在显著性差异 ($P > 0.05$),可以推测当感染复数达到 100 : 1 时被吞噬细菌数量达到饱和。

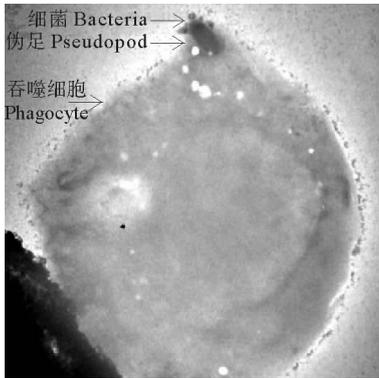
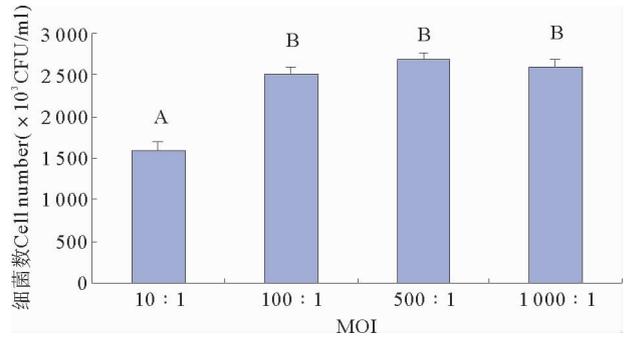


图 1 电镜下外周血白细胞吞噬的细菌($\times 8\ 200$)
Fig. 1 Electron micrograph of peripheral blood leukocyte phagocytosing bacterium($\times 8\ 200$)

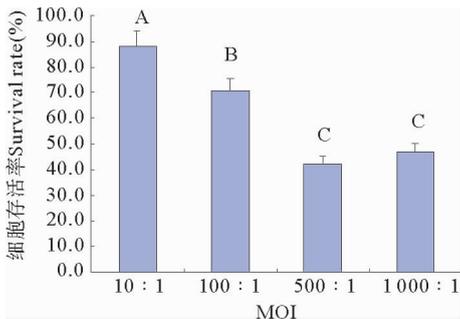


图中标有不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 2 不同感染复数下外周血白细胞吞噬的细菌数

Fig. 2 The number of bacteria phagocytosed by peripheral blood leukocyte under different MOI

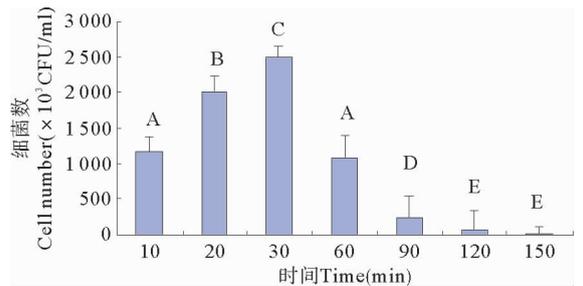
由图 3 可知,当感染复数为 10 : 1 时,细菌和细胞混合培养 30 min 后,细胞的存活率约为 88%,当感染复数达到 100 : 1 时,细胞存活率虽然显著降低 ($P < 0.05$),但仍维持 70% 的较高水平,但当感染复数进一步增加到 500 : 1 和 1 000 : 1 时,细胞存活率均显著降低至 40% 左右 ($P < 0.05$)。综合图 3、图 4 的结果,细菌和吞噬细胞比例为 100 : 1 时的感染复数为最佳感染复数。



图中标有不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 3 不同感染复数下外周血白细胞的存活率

Fig. 3 The survival rate of peripheral blood leukocyte at different MOI



图中标有不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 4 不同感染时间下外周血白细胞吞噬的细菌数量

Fig. 4 The number of bacteria phagocytosed by peripheral blood leukocyte at different infection time

2.3 不同感染时间下外周血白细胞吞噬的细菌数量及细胞的存活率

由图4可知,随着感染时间的延长,吞噬细胞中的细菌数总体呈现先增加再减少的趋势。当感染时间为10min时,吞噬细胞吞噬的细菌数为 1.2×10^6 CFU/ml,之后随着细菌感染细胞的时间延长至20min,吞噬细胞中的细菌数量显著增加至 2×10^6 CFU/ml($P < 0.05$),当感染时间延长到30min,吞噬细胞中的细菌数较感染20min时吞噬的细菌数量进一步显著增加($P < 0.05$),并达到峰值 2.5×10^6 CFU/ml,当感染时间进一步延长至60min,吞噬细胞中的细菌数量急剧下降至 1.1×10^6 CFU/ml,在感染时间达到150min时,吞噬细胞中仍存在 2.5×10^4 CFU/ml的细菌。说明感染时间为30min时,吞噬细胞吞噬的细菌数量达到饱和。

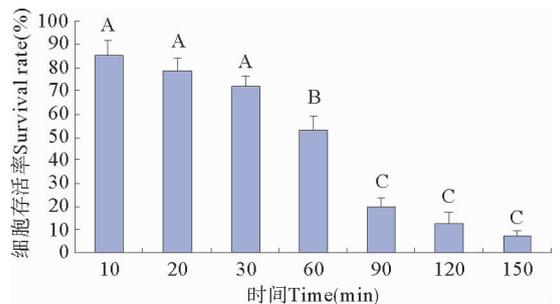
图5则表明,细胞的存活率随感染时间的延长总体呈逐步下降的趋势,但前3个时间点的细胞存活率间不存在显著性差异($P > 0.05$),而感染时间为60min时细胞的存活率则显著降低($P < 0.05$)。因此由图5和图6分析,30min是细菌与细胞的最佳感染时间。

2.4 鳗鲡外周血白细胞对细菌的吞噬速率和杀菌速率

由表1可知,鳗鲡外周血白细胞吞噬嗜水气单胞菌的速率为 0.095 CFU/cell·min,与大肠杆菌的吞噬速率 0.055 CFU/cell·min存在显著性差异($P < 0.05$),与金黄色葡萄球菌的吞噬速率 0.081 CFU/cell·min间无显著性差异($P > 0.05$),表明鳗鲡外周血白细胞吞噬嗜水气单胞菌的速率较吞噬大肠杆菌的速率快。而白细胞对嗜水气单胞菌的杀菌速率为 0.13 CFU/cell·min,显著低于杀灭大肠杆菌(0.38 CFU/cell·min)和金黄色葡萄球菌(0.24 CFU/cell·min)的速率($P < 0.05$),说明虽然白细胞吞噬嗜水气单胞菌的速率较快,但杀灭它却需要更长的时间。

3 讨论

从本研究结果可知,鳗鲡外周血白细胞对嗜水气单胞菌有较强的吞噬作用,在感染复数为 $100:1$ 、感染时间为30min时,细胞吞噬的细菌量达到饱和,而细胞本身仍可维持较高活性,说明 $100:1$ 的感染复数及30min的感染时间,是研究鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的最佳参数。



图中标有不同的字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)
Different letters indicate significant difference($P < 0.05$)

图5 不同感染时间下外周血白细胞的存活率

Fig. 5 The survival rate of peripheral blood leukocyte at different infection time

表1 鳗鲡外周血白细胞对细菌的吞噬速率和杀菌速率

Table 1 The predation velocity and sterilization velocity of eel peripheral blood leukocyte to different bacteria

细菌 Bacterium	吞噬作用 Phagocytosis		杀菌作用 Sterilization	
	$K_1 \pm sd$ (CFU/cell·min)	$t_{1/2}$ (min)	$K_2 \pm sd$ (CFU/cell·min)	$t_{1/2}$ (min)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	$0.095^A \pm 0.046$	7.3	$0.13^A \pm 0.040$	5.3
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	$0.055^B \pm 0.027$	12.6	$0.38^B \pm 0.030$	1.8
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	$0.081^A \pm 0.033$	8.5	$0.24^C \pm 0.040$	2.8

注:同一列上方参数字母不相同则有显著差异($P < 0.05$)

Note: Values with different letters in the same column are significantly different($P < 0.05$)

本研究发现,提高感染复数并不能促进外周血白细胞的吞噬作用。这一现象可能与吞噬细胞的容量(成熟度)和被吞噬颗粒的大小有关。如一个基于磁阻实时监控的吞噬实验结果表明,生理条件下人类成纤维细胞对平均直径 $1.2 \mu\text{m}$ 颗粒的吞噬速率为45个/h,并在约28h后达到饱和(Shoshi *et al.* 2012)。还有研究发现

每一个人类的嗜中性粒细胞和单核细胞对未经血清调理的葡萄球菌的最大吞噬量分别是 232 和 53 个,而经过血清调理后的最大吞噬量大约是前者的两倍(Verbrugh *et al.* 1978)。此外利用流式细胞仪检测土壤中的卡氏棘阿米巴对荧光标记的乳胶磁珠的吞噬作用的研究证明,成熟细胞的吞噬能力几乎是那些刚完成分裂细胞的 3 倍(Avery *et al.* 1995)。

已有研究表明,细胞完成对异物的吞噬后,主要通过两条途径对其进行处理,一是吞噬体与溶酶体融合,其内容物被溶酶体中的水解酶类消化降解;另一条途径通过伴随吞噬作用的呼吸暴发(Respiratory burst)产生大量活性氧自由基,杀伤吞入的微生物(马洪明等 2003)。而被吞噬后的病原菌为了抵抗吞噬细胞的杀伤主要有相应的三种防御机制,其一是抑制溶酶体与吞噬小体的融合,如沙门氏菌和耶尔森氏菌(Ryckaert *et al.* 2010),该机制主要是细菌通过借助细胞内本身存在的空泡将自身包裹起来,从而避免了接触溶酶酶,以此逃过吞噬细胞的杀伤;其二是被吞噬的细菌产生过氧化氢酶,以消除吞噬细胞产生的活性氧自由基(Shatalin *et al.* 2008),该机制的原理是过氧化氢酶可催化活性氧自由基生成非活性氧和水的过程,这大大降低了活性氧对细菌的伤害;其三是病原菌在被吞噬细胞杀死之前,通过分泌外毒素或蛋白酶来破坏吞噬细胞的细胞膜,或诱导细胞凋亡或直接杀死吞噬细胞,并利用被杀死的吞噬细胞来逃避其他吞噬细胞的识别与杀伤,如 A 群链球菌产生的杀白细胞素(Garcia-del *et al.* 1995;石洁等 2012)。有研究认为,嗜水气单胞菌可能是第 3 种机制的代表,它可通过分泌细胞毒素——肠毒素来诱导吞噬细胞的凋亡(DeLeo *et al.* 2004;Galindo *et al.* 2003)。本研究发现,感染时间的延长导致外周血白细胞中细菌数量降低及细胞本身活性的下降,感染时间达到 150min 后,外周血白细胞的存活率还有 7%左右,而细胞中仍有 2.5×10^4 CFU/ml 的细菌存在,这些足以说明嗜水气单胞菌具有一定的逃避外周血白细胞杀灭的能力,这可能也是该菌感染宿主并能引发疾病的策略之一。但嗜水气单胞菌逃避吞噬细胞杀伤的策略和机制还需要进一步的研究和探索。

通过吞噬速率和杀菌速率检测建立起来的数量模型研究发现,鳗鲡外周血白细胞吞噬嗜水气单胞菌的速率较吞噬大肠杆菌的速率快,但杀灭该菌的速率却均显著低于杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的速率,这说明鳗鲡的病原性嗜水气单胞菌比非病原性的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌标准菌株对鳗鲡外周血白细胞的杀菌作用具有更强的抵抗力,反过来也很好地说明嗜水气单胞菌对鳗鲡具有更强的毒性,从而也证明建立的数量模型具有良好的可行性,为将来进一步研究嗜水气单胞菌在细胞内的存活机制奠定坚实的基础。

参 考 文 献

- 于学辉,王远微,汤承,岳华. 2007. 嗜水气单胞菌的研究进展. 西南民族大学学报(自然科学版),33(3):507-514
- 马洪明,麦康森. 2003. 贝类血细胞的吞噬作用和非我识别. 海洋科学,27(2):16-18
- 王军,鄢庆枇,苏永全,周永灿,邵勋. 2001. 免疫添加剂对大黄鱼血液白细胞数量及其吞噬功能的影响. 海洋科学,25(9):44-46
- 毛秀秀,覃映雪,邹文政,郭松林,苏永全,鄢庆枇,纪荣兴. 2011. 致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性. 中国水产科学,18(2):371-378
- 石洁,王长军. 2012. 病原菌逃避宿主细胞防御的策略. 微生物学通报,39(1):90-98
- 李金凤,刘文礼,史小娟,刘伟,汉建忠,万静,罗自强. 2008. 四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较. 国际病理科学与临床杂志,28(4):277-281
- 李晨,王秀华,黄健. 2010. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展,31(3):100-106
- 陈刚,周晖,张健东,吴灶和. 2005. 军曹鱼血液指标及血细胞发生的观察. 水生生物学报,29(5):564-570
- 陈刚,周晖,叶富良,吴灶和. 2006. 美国红鱼血细胞观察. 热带海洋学报,25(2):59-65
- 饶静静,李寿崧,黄克和,江树勋,潘群兴. 2007. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立. 中国水产科学,5:749-755
- 潘晓艺,郝贵杰,姚嘉赞,徐洋,尹文林,沈锦玉. 2010. 嗜水气单胞菌 TPS-30 株丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因在大肠杆菌中的融合表达. 水生生物学报,34(3):591-597
- Avery SV, Harwood JL, Lloyd D. 1995. Quantification and characterization of phagocytosis in the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 61(3): 1124-1132
- Delamare APL, Echeverrigaray S, Duarte KR and 2 others. 2002. Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identification. *J Appl Microbiol* 92(5): 936-940
- DeLeo FR. 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 9(4): 399-413
- Galindo CL, Sha J, Ribardo DA and 3 others. 2003. Identification of *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced genes in macrophages

- using microarrays. *J Biol Chem* 278(41): 40198-40212
- Garcia-del Portillo F, Finlay BB. 1995. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol* 3(10): 373-380
- Geho D, Cheng MMC, Killian K and 11 others. 2006. Fractionation of serum components using nanoporous substrates. *Bioconjugate Chem* 17(3): 654-661
- Hampton MB, Vissers MC, Winterbourn CC. 1994. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J Leukocyte Biol* 55(2): 147-152
- Jiravanichpaisal P, Roos S, Edsman L and 2 others. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Invertebrate Pathol* 101(1): 56-66
- Lowe DC, Savidge TC, Pickard D and 4 others. 1999. Characterization of candidate live oral *Salmonella typhi* vaccine strains harboring defined mutations in *aroA*, *aroC*, and *htrA*. *Infect Immunity* 67(2): 700-707
- McCarthy UM, Bron JE, Brown L and 5 others. 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 25(5): 477-484
- Natrah FMI, Alam MI, Pawar S and 6 others. 2012. The impact of quorum sensing on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota* L.) larvae. *Vet Microbiol* 159(1-2): 77-82
- Reyes-Becerril M, Lopez-Medina T, Ascencio-Valle F and 1 other. 2011. Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 31(4): 564-570
- Ryckaert J, Bossier P, D'Herde K and 4 others. 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 29(4): 648-655
- Sha J, Erova TE, Alyea RA and 4 others. 2009. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* 191(9): 3095-3197
- Shatalin K, Gusarov I, Avetisova E and 4 others. 2008. Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Natl Acad Sci USA* 105(3): 1009-1013
- Shoshi A, Schotter J, Schroeder P and 8 others. 2012. Magnetoresistive-based real-time cell phagocytosis monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 36(1): 116-122
- Verbrugh HA, Peters R, Peterson PK and 1 other. 1978. Phagocytosis and killing of *Staphylococci* by human polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *J Clin Pathol* 31: 539-545