

鲟致病性类志贺邻单胞菌的鉴定及药物敏感性

王小亮, 徐立蒲*, 曹欢, 王静波, 王姝

北京市水产技术推广站, 北京 100021

摘要:【目的】2012年夏季北京地区多地养殖的鲟鱼发病, 主要临床症状为肛门红肿、伴有黄色分泌物, 腹腔内有大量腹水, 腹腔内壁有出血点, 肝脏点状出血, 脾脏肿大等, 累计死亡率达60%。本文目的为研究其病原。【方法】从具有临床症状的濒死鱼中分离病原菌, 分析病原菌的形态特征、理化特性、分类地位及药物敏感性等特性, 经过人工感染及引起的组织病理确认致病性。【结果】结果显示病原菌的16S rDNA序列构建的进化树, 与类志贺邻单胞菌同源性最高, 在99%以上; 结合其生理生化特征和API细菌鉴定系统的结果, 确认为类志贺邻单胞菌。该菌对鲟鱼的半致死量 LD_{50} 为 $1.0 \times 10^{5.8}$ CFU/mL, 引起肝、肾和脾组织病变。胞外产物不具有淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和明胶酶活性, 也无溶血性, 推测其毒性可能来源于内毒素。该菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟苯尼考和甲枫霉素敏感, 药物敏感浓度均小于 $2 \mu\text{g/mL}$; 而对试验的其它抗菌药物不敏感。【结论】确认类志贺邻单胞菌是引起北京地区鲟鱼发生上述临床症状疾病的主要致病菌, 可优选盐酸多西环素、氟苯尼考和恩诺沙星进行防治。

关键词: 鲟鱼, 类志贺邻单胞菌, 致病性, 药敏

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)07-0723-07

鲟鱼隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、软骨硬鳞总目(Chondrostei)、鲟形目(Acipenseriformes), 全世界共有2科6属26种, 我国分布有8种。鲟鱼作为一种经济价值较高的大型鱼类, 已在全国除西藏以外的地区广泛养殖, 养殖规模不断壮大, 养殖产量逐年增加^[1]。但近年来, 养殖的鲟鱼不断爆发各种疾病, 大量死亡的现象频发, 严重制约着鲟鱼养殖业的健康发展。已报道的引起鲟鱼发病的病毒有4种^[2], 确诊到病原的细菌性疾病很少^[3-5]。

2012年夏季北京地区多个养殖场的鲟鱼出现死亡, 累计死亡高达60%左右, 病鱼普遍症状为肝

脏和腹腔内壁肌肉有出血点、肛门红肿、腹水、脾脏肿大等。本文对发病严重的怀柔梭草渔场的发病鲟鱼进行了病原分离、鉴定, 并就病原菌的生物学特性、致病性、引起的组织病理特征及药物敏感性等进行了研究, 旨在探索诱发该病的主要病原及其生物学特性, 为该病的有效防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料: 病鱼为杂交鲟(*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂), 取自北京市怀柔区梭草渔场。

基金项目: 北京市农业科技项目(PXM2012_036237_000012); 北京市科委重大项目(D121100003712003)

* 通信作者。Tel: +86-10-89559484; E-mail: bjybk@163.com

作者简介: 王小亮(1981-), 男, 河南人, 硕士, 主要从事水产动物病害防治的研究。E-mail: wxldynasty@163.com

收稿日期: 2012-12-05; **修回日期:** 2013-02-25

人工感染试验所用杂交鲟购于北京市密云县北庄养殖场,试验用鲟鱼体色正常、体表无损伤、活力较好,平均体长(16.8 ± 1.0) cm、体重(28.50 ± 4.43) g,暂养 10 d 后用于试验。

1.1.2 主要试剂和仪器:培养基(干粉)、生理生化鉴定管购于北京陆桥生物技术有限公司,API 20 系统鉴定试剂条购于北京威泰科生物技术有限公司,细菌基因组抽提试剂盒购于上海生物工程有限公司,药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 病原菌分离

选取典型症状的患病鲟鱼鳃、体表粘液在显微镜下进行寄生虫和真菌排查。同时,无菌操作从患病鲟鱼肝脏、脾脏、肾脏和腹水划线分离于脑心浸液琼脂(BHIA)平板,于 28℃ 恒温培养箱培养 24 h,均出现大量形态一致的菌落。分别纯化,共获得菌株 4 株,编号 HRS12816L(肝脏)、HRS12816K(肾脏)、HRS12816S(脾脏)和 HRS12816A(腹水)。纯化菌株于营养肉汤 28℃ 培养 16 h 后,分装后加 20% 甘油在 -80℃ 保存备用。

1.3 病原菌形态观察和生理生化鉴定

取纯培养菌株接种于 BHIA 平板上,28℃ 培养 16-24 h,观察菌落大小和形态。然后进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察细菌形态特征。采用 API 20NE 细菌鉴定试剂条和传统方法测定病原菌的理化特性,参照伯杰氏细菌鉴定手册进行分类^[6]。

1.4 16S rDNA 基因序列测定与系统发育分析

病原菌的 DNA 模板制备采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒提取,置于 -20℃ 保存备用。应用 16S rDNA 基因引物^[7] 27F: 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAGG-3'; 1479R: 5'-ACGGCAAC CTTGTTACGAGTT-3'进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:采用 50 μL, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 25 mmol/L 氯化镁 5 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 模板 DNA 2 μL, 20 pmol/μL 上下游引物各 2 μL, ddH₂O 32.75 μL。PCR 反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物纯化后,由上海生工生物工程技术公司进行基因序列测定。

将分离菌的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析,从中选取与所获序列同源性较高的同种菌株的 16S rRNA 基因序

列,并从 GenBank 数据库中获得相关属的 16S rDNA 序列,利用 MEGA 4.0 采用邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树,通过自举分析进行置信度检测,自举数集 1000 次。

1.5 人工感染试验

从肝脏首次分离到的菌落数量最多,因此,选用肝脏分离的病原菌进行人工感染试验。将编号 HRS12816L 的菌株接种 BHIA 斜面,28℃ 培养 16h,用 PBS(0.02mol/L, pH 7.2)洗脱获得菌悬液,以 McFarland 比浊法设定细菌浓度,分别制成浓度 1.0 × 10⁸、1.0 × 10⁷、1.0 × 10⁶、1.0 × 10⁵、1.0 × 10⁴ CFU/mL 的菌悬液,备用。

取健康鲟鱼分为 6 组,每组设立 2 个试验箱,每箱盛 80L 消毒、暴气 3 天的地下水,放鱼 6 尾。其中 5 组采用腹腔注射相应浓度的菌悬液进行感染,1 组为试验对照,注射 PBS,注射剂量均为每尾 0.2mL。试验周期为两周,水温控制在 25℃,期间充氧、不投食、不换水,自注射后第 2 天记录各组的死亡数量。死亡鱼解剖,记录症状和每组随机选取 2 尾进行病原菌分离、鉴定。按照 Reed 阐述的方法计算半致死浓度^[8]。

1.6 病理组织切片制备

取人工感染濒死病鱼的肝脏、脾脏、肾脏、心脏和脑,立即浸泡于 10 倍体积的 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,采用 HE 染色,光镜下观察其组织学变化。

1.7 胞外产物酶活性及溶血活性检测

按文献[9]对菌株 HRS12816L 进行胞外产物的提取及胞外产物酶(淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和明胶酶)活性的检测,溶血性检测采用 5% 羊血琼脂平板。

1.8 病原菌药物敏感性分析

试验方法采用 CLSI 抗微生物药物敏感性试验执行标准中的浓度梯度稀释法,培养温度设置为 28℃。试验设立重复和空白对照。结果记录最小抑菌浓度(MIC),依据 CLSI 标准判断敏感和耐药,标准内没有的药物依同类药物判断。

2 结果

2.1 病鱼检查结果

患病鲟鱼池水温 23℃,病鲟主要表现为头部发

黑,腹部有出血点,腹侧有白斑,肛门红肿,伴有黄色分泌物。解剖发现腹腔内有大量腹水(图1),腹腔内壁有出血点(图2),肝脏上有出血点,脾脏肿大,肾脏溃烂、出血,肠道红肿。通过水浸片显微镜下观察,未发现寄生虫和真菌。



图1. 病鲟鱼腹腔内有大量腹水

Figure 1. The accumulation of ascites in the peritoneal cavity of diseased sturgeon.



图2. 病鲟鱼腹腔内壁有出血点、脾肿大

Figure 2. The petechial haemorrhages in the internal muscle wall and swollen spleen of diseased sturgeon.

2.2 病原菌形态特征与生理生化特征

菌落特征为:圆形,边缘齐整,中央微凸,表面光滑、湿润,呈淡黄色,不透明,直径1 mm - 2 mm。在血琼脂培养基上28℃培养24 h,菌落颜色为灰白色,其它特征同BHIA。革兰氏染色结果显示,被检细菌为革兰氏阴性、杆状、末端圆形,菌体大小为(0.8 - 1.0) $\mu\text{m} \times$ (2.1 - 3.7) μm ,长宽比平均为2.63。

采用API20NE系统鉴定编号HRS12816L、HRS12816K、HRS12816S和HRS12816A的分离株,菌株的生化特征数值编码均为7160744,鉴定率99.9%,T值为0.91,结果均为类志贺邻单胞菌

(*Plesiomonas shigelloides*)。采用传统方法测定编号HRS12816L菌株的常规生理生化特性,主要为氧化酶阳性,赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱氢酶、肌醇、吡啶阳性,发酵葡萄糖产酸不产气,甘露醇、蔗糖、明胶液化等指标为阴性,有些生化指标菌株间存在差异,具体见表1。

表1. 菌株HRS12816L的生化试验结果

Table 1. Results of biochemical characteristics of *Plesiomonas shigelloides* strain HRS12816L

Items	HRS12816L	<i>Plesiomonas shigelloides</i> *
Oxidase	+	+
0% NaCl	+	+
1% NaCl	+	+
3% NaCl	+	ND
6% NaCl	-	-
10% NaCl	-	ND
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Voges Proskauer	-	-
Indol production	+	+
ONPG	+	+
PNPG	+	D
Nitrate reduction	+	+
H ₂ S production	-	-
Urease	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Motility	+	+
Citrate	-	-
Inositol	+	+
Glucose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	-	-
Mannose	-	D
Mannitol	-	-
Esculin hydrolysis	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Melibiose	-	-
Salicin	-	-
Dulcitol	-	-
D-cellobiose	-	-
Amygdalin	-	-
Lactose	-	D
Arabinose	-	-
Phenylacetic acid	-	-
Adipic acid	-	-
Malic acid	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	D
Postassium gluconate	+	-
Capric acid	-	D
O/129 sensitivity	R	D

*Plesiomonas shigelloides**: Description in the Bergey's manual of systematic bacteriology (9th); ND: No Done; R: Resistance; D: Difference among strains.

2.3 16S rDNA 基因序列分析及系统发育树构建

测定了菌株 HRS12816L 的 16S rDNA 基因序列,经 Blast 同源性检索,发现其与类志贺邻单胞菌同源性最高,相似性均在 99% 以上。系统发育树也

显示其与类志贺邻单胞菌聚为一支,并提示其与大肠杆菌的亲缘关系比与弧菌科细菌(弧菌、气单胞菌)的亲缘关系近(图 3)。

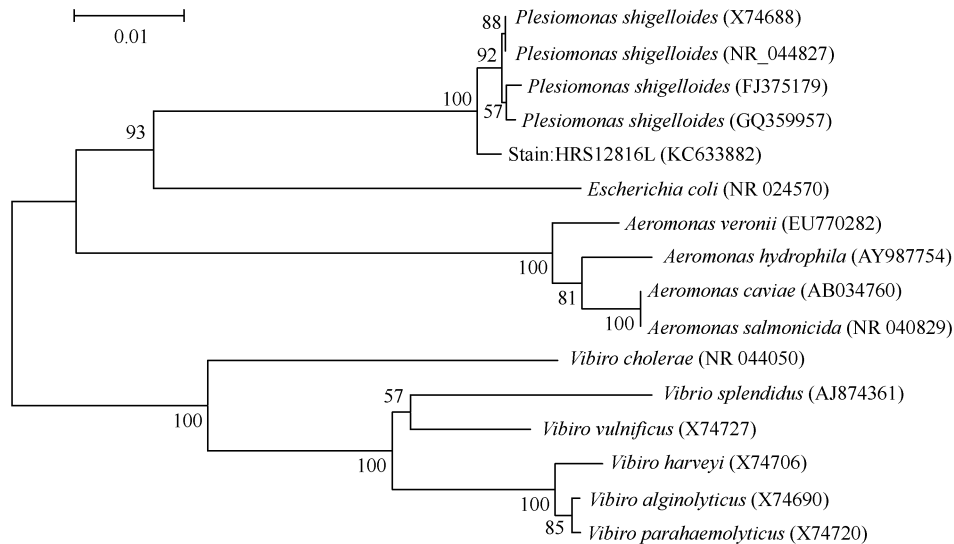


图 3. 菌株 HRS12816L 的 16s DNA 系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene partial sequence of strain HRS12816L. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The scale bar represents 0.01 nucleotide changes per position.

2.4 人工感染试验结果

人工感染试验表明鲟鱼在注射菌悬液 7d 后开始出现死亡,随后各试验组每天死亡 1-2 尾,后期不再死亡。人工感染的试验鱼出现活力减弱,肛门发红,腹部发黄症状,解剖后出现除腹腔内壁无出血点外的其它临床症状,而对照组未出现病理症状。

随机从人工感染的濒死鱼肝脏进行病原菌分离,得到大量形态高度一致的菌落,其菌落形态、大小与首次分离到的菌落相同,经 API 系统鉴定,同样为类志贺邻单胞菌。表明类志贺邻单胞菌是鲟鱼的致病细菌。依据人工感染试验结果(见表 2),计算出 HRS12816L 菌对鲟鱼的 LD_{50} 为 $1.0 \times 10^{5.8}$ CFU/mL。

表 2. 菌株 HRS12816L 的人工感染试验结果

Table 2. Results of experimental infection of sturgeons with strain HRS12816L

Group	c(bacteria)/(CFU/mL)	Injected volume/ mL	Number of trials	Number of deaths	Mortality/ %
HRS12816L	1.0×10^8	0.2	12	9	75.00
	1.0×10^7	0.2	12	8	66.67
	1.0×10^6	0.2	12	7	58.33
	1.0×10^5	0.2	12	2	16.67
	1.0×10^4	0.2	12	0	0
Control	PBS	0.2	12	0	0

2.5 病理组织特征

肝脏病变为肝细胞肿胀,体积增大,胞浆内充满大小不等的空泡,细胞完整结构解体,有的细胞核变性、崩解。脾脏病理变化为组织内充血、出血明显,脾实质细胞坏死、崩解,基膜下结缔组织出现明显空泡。肾脏的病理变化为部分肾小管上皮细胞坏死、

溶解或消失;肾小球细胞核浓缩,细胞质解体,出现空泡。见图 4。

2.6 胞外产物酶活性及溶血性结果

试验表明菌株 HRS12816L 的胞外产物不具有淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和明胶酶活性,在 5% 羊血琼脂平板上不产生溶血特性。

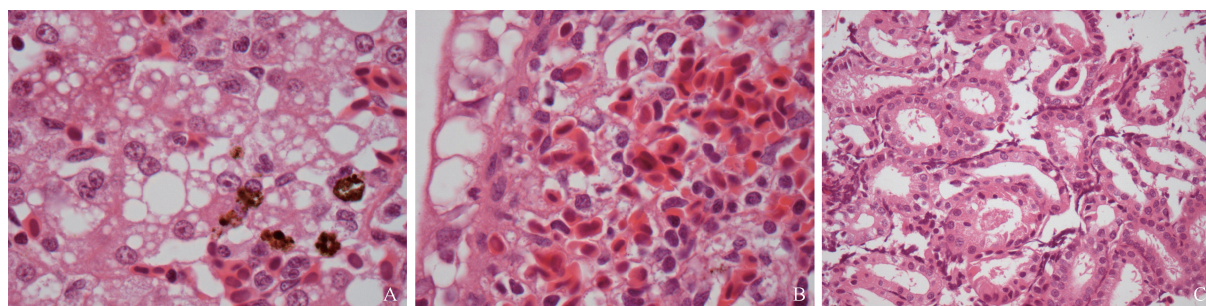


图 4. 类志贺邻单胞菌感染鲟鱼的病理组织学观察

Figure 4. The pathohistological observation of sturgeon infected *Plesiomonas shigelloide*. A: Liver (HE, 1000 ×); B: Spleen (HE, 1000 ×); C: Kindey (HE, 400 ×).

2.7 药敏试验

药敏试验结果显示:不同器官来源的 4 株分离株抗菌药物的敏感性一致,对恩诺沙星、盐酸多西环

素、氟苯尼考和甲枫霉素敏感,药物敏感浓度均小于 2 μg/mL;而对其它抗菌药物不敏感(表 3)。

表 3. 病鲟鱼不同器官来源分离株的最小抑菌浓度 (MIC) 结果

Table 3. The minimal inhibitory concentration (MIC) of *Ple. shigelloide* isolates from different organs of diseased sturgeons

Category	Drugs	HRS12816L	HRS12816K	HRS12816S	HRS12816A
Sulfonamides	Sulfamethoxazole (μg/mL)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)
	Sulfamonomethoxine (μg/mL)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)
	Sulfadiazine (μg/mL)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)	≥1024 (R)
Fluoroquinolones	Norfloxacin (μg/mL)	8 (I)	8 (I)	8 (I)	4 (S)
	Enrofloxacin (μg/mL)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
Aminoglycosides	Neomycin sulfate (μg/mL)	8 (R)	16 (R)	16 (R)	8 (R)
	Doxycycline hyclate (μg/mL)	1 (S)	1 (S)	1 (S)	2 (S)
Tetracyclines	oxytetracycline (μg/mL)	128 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)
	Tetracycline hydrochloride (μg/mL)	8 (I)	8 (I)	8 (I)	8 (I)
Chloramphenicol	Florfenicol (μg/mL)	2 (S)	1 (S)	1 (S)	0.5 (S)
	Thiamphenicol (μg/mL)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)

R. resistance; I. Intermediate; S. sensitive.

3 讨论

对具有典型临床症状的发病鲟鱼进行病原菌初次分离,获得大量菌落形态一致的菌落。纯化后经鉴定,判定为类志贺邻单胞菌。人工感染鲟鱼,出现除腹腔内壁无出血点外,与自然发病一致的症状,再次分离得到此菌,结合感染鲟鱼的肝脏、肾脏和脾脏的病理组织切片特征,揭示该菌为引起鲟鱼高温季节死亡的致病菌,可单独引起的鲟鱼发病。

类志贺邻单胞菌广泛存在于自然界,可引起人的急性腹泻和食物中毒等疾病。Van Damme 等指出淡水鱼是其天然贮存宿主^[10]。2000 年,国内学者朱越雄等^[11]从发病的中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中分离到此菌,推测其为非致病菌。近年来,该菌作为水生动物细菌混合感染的病原菌之一

在中华鳖 (*Trionyx sinensis*)^[12]、暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)^[13]、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[14]、鲟鱼^[5]、墨头鱼 (*Garra rufa*)^[15] 等上报道。同时,该菌可单独引起异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂)^[16]、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*)^[17] 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[18] 发病。本试验发现类志贺邻单胞菌引起的鲟鱼发病症状与引起的达氏鳇^[5] 和虹鳟^[18] 相似,与引起的异育银鲫^[16] 和斑点叉尾鮰^[17] 发病症状不同。鲟鱼和虹鳟都是冷水性鱼类,是否类志贺邻单胞菌引起的冷水性鱼类发病出现相同症状有待进一步证实。

本试验未从类志贺邻单胞菌的胞外产物检测到淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和明胶酶活性,也无溶血性,其 LD₅₀ 为 1.0 × 10^{5.8} CFU/mL,毒性较强。虽已证实

多种水生动物病原菌的胞外产物在鱼类的感染致病中发挥着重要作用^[9], 但该菌可能不具有胞外产物毒性。Ciznar 等通过检测不同来源的类志贺邻单胞菌, 确定该菌只产生低水平的蛋白酶, 并指出此菌的毒力因子涉及菌的表面结构、鞭毛、弹性蛋白降解酶、三酰基脂肪酶和溶血性^[19], 陈林等也在该菌中检测到具有细胞毒性的外膜蛋白 (COMP) 基因^[17], 推测本分离株的致病机理可能是由于弱毒性的内毒素。此外, 在进行类志贺邻单胞菌的药物敏感性试验时, 学者多选用人工用的抗菌药物, 并采用纸片扩散法试验。这是定性的判断病原菌对抗菌药物是否有效的方法, 可能没有浓度梯度稀释法定量检测的最小抑菌浓度更有实际指导意义。类志贺邻单胞菌引起的水产动物发病更加频繁, 有必要进一步开展其致病机理方面的研究。

参考文献

- [1] Sun D, Qu Q, Zhang Y, Ma G, Wang W. Sturgeon aquaculture in China. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(4):67-70. (in Chinese)
孙大江, 曲秋芝, 张颖, 马国军, 王念民. 中国的鲟鱼养殖. *水产学杂志*, 2011, 24(4):67-70.
- [2] Wang D, Liu H, Lu T, Sun D. Advance on the study of sturgeon vironsis. *Chinese Journal of Fisheries*, 2008, 21(2):84-89. (in Chinese)
王荻, 刘红柏, 卢彤岩, 孙大江. 鲟鱼病毒性疾病研究进展. *水产学杂志*, 2008, 21(2):84-89.
- [3] Meng Y, Xiao H, Zhang L, Li L, Zeng L. Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen of amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(6):822-826. (in Chinese)
孟彦, 肖汉兵, 张林, 李罗新, 曾令兵. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定. *华中农业大学学报*, 2007, 26(6):822-826.
- [4] Zhao F, Cao J, Liu Q. Study on pathology and etiology of hemorrhagic septicaemia in *Acipenser baerii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2):316-323. (in Chinese)
赵凤岐, 曹谨玲, 刘青. 西伯利亚鲟败血症病理学观察与病原学研究. *水生生物学报*, 2009, 33(2):316-323.
- [5] Cao H, Yang X, Gao P, Li Y, Zhang S, Deng L. Preliminary study of the pathogens isolated from bacterial septicemia syndrome of sturgeon. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(2):53-56. (in Chinese)
曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 李怡, 张书俊, 邓璐. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究. *淡水渔业*, 2007, 37(2):53-56.
- [6] Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th eds. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994:253, 258-259.
- [7] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2008:104.
- [8] Reed LJ, Muech H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27:493-497.
- [9] Chen Z, Yao Z, Lin M, Chang J. Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5):764-771. (in Chinese)
陈政强, 姚志贤, 林茂, 常建波. 半滑舌鲷皮肤溃疡病原研究. *水产学报*, 2012, 36(5):764-771.
- [10] Van Damme LR, Vandepitte JJ. Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Pleisiomonas shigelloides* from healthy zairese freshwater fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropics. *Applied Environmental Microbiology*, 1980, 39(3):475-479.
- [11] Zhu Y, Gong C, Xue R, Cao G, Wei Y. Isolation and characteristics of *Pleisiomonas shigelloides* from tissue of *Eriocheir Sinensis*. *Chinese Journal of Microecology*, 2001, 13(5):263-264. (in Chinese)
朱越雄, 贡成良, 薛仁宇, 曹广力, 魏育红. 中华绒螯蟹组织中一株类志贺邻单胞菌的分离与特性分析. *中国微生态学杂志*, 2001, 13(5):263-264.
- [12] Wu H, Xue J. Pathogens of haemorrhagic intestinal necrosis in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) and their drug sensitivity. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2004, 24(4):343-345. (in Chinese)
吴惠仙, 薛俊增. 中华鳖出血性肠道坏死症病原及其药敏性. *中国兽医学报*, 2004, 24(4):343-345.
- [13] Yang Y, Chen H, Fang P, Duan J. Separation and identification of pathogenic bacteria of takifagu obscurus cultured in factory. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2005, 25(4):18-21. (in Chinese)
杨鸾劫, 陈辉, 方苹, 段金荣. 工厂化养殖暗纹东方鲀致病菌的分离和鉴定. *湛江海洋大学学报*, 2005, 25(4):18-21.
- [14] Pan F, Fang P, Chen H. Researches on the effective drugs for the pathogenic bacterium in diseased *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Aquaculture*, 2007, 28(6):39-41. (in Chinese)
潘璠, 方苹, 陈辉. 罗氏沼虾几种病原菌防治药物的筛选. *水产养殖*, 2007, 28(6):39-41.

- [15] Yu H, He Z, Yan Y, Yang G, Hu J, Zhou M. Identification of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas schuberti* from doctor fish (*Garra rufa*) and antibiotics sensitivity. *China Journal of Animal Quarantine*, 2009, 26(7):37-39. (in Chinese)
余华,何智,严玉宝,杨光友,胡娟,周岷江. 温水鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验. *中国动物检疫*, 2009, 26(7):37-39.
- [16] Lu W, Yang J, Chen H. Identification of *Plesiomonas shigelloides* from hybridized prussian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂). *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(2):48-53. (in Chinese)
陆文浩,杨家新,陈辉. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定. *淡水渔业*, 2009, 39(2):48-53.
- [17] Chen L, Tan A, Zou W. Identification and characteristics of a pathogenic bacterial strain from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(3):200-205. (in Chinese)
陈林,谭爱萍,邹为民. 斑点叉尾鲟致病菌的鉴定及特性. *大连水产学院学报*, 2009, 24(3):200-205.
- [18] Cruz JM, Saraiva A, Eiras JC, Branco R, Sousa JC. An Outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1986, 6(1):20-22.
- [19] Ciznar I, Hostacka A, Gonzalez-Rey C, Krovacek K. Potential virulence-associated properties of *Plesiomonas shigelloides* strains. *Folia Microbiologica*, 2004, 49(5):543-548.

Identification and drug sensitivity of a *Plesiomonas shigelloides* isolated from diseased sturgeons

Xiaoliang Wang, Lipu Xu^{*}, Huan Cao, Jingbo Wang, Shu Wang

Beijing Aquatic Product Technology Promotion Department, Beijing 100021, China

Abstract: [Objective] In 2012, the cumulative mortality of farmed sturgeons in Beijing was almost 60% with various symptoms, including the reddening of the anus with yellow exudation, ascities in the peritoneal cavity, petechial haemorrhages in liver and internal muscle wall, and the swollen spleen. [Methods] We isolated the pathogen from the dying sturgeons with significant pathological signs, and then analyzed its morphological, physiological and biochemical characteristics, taxonomic status, and drug sensitivity. Moreover, the pathogenic characteristic of presumptive pathogens was identified by artificial infection. [Results] The 16S rDNA sequence of the pathogen was more than 99% homology with that of *Plesiomonas shigelloides*, suggesting that the pathogen was *P. shigelloides*, which was also demonstrated by the results of biochemical tests. The LD₅₀ of the pathogen to sturgeon was $1.0 \times 10^{5.8}$ CFU/mL, and it also can cause liver, kidney and spleen lesions. There were no activities of amylase, caseinase, lipase, gelatinase and haemolysis of extracellular products of *P. shigelloides*, and its toxicity might be from endotoxin. In addition, the bacterium was specific sensitive to enrofloxacin, doxycycline hyclate, florfenicol and thiamphenicol with MIC less than 2 μg/mL. [Conclusion] *P. shigelloides* was the main pathogen to cultured sturgeons in Beijing area, and enrofloxacin, doxycycline hyclate and florfenicol can be used against the disease.

Keywords: sturgeons, *Plesiomonas shigelloides*, pathogenicity, drug sensitivity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Program of Beijing Municipal Science and Technology Commission (D121100003712003)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-10-89559484; E-mail: bjbk@163.com

Received: 5 December 2012/Revised: 25 February 2013