

丰产鲫细菌性败血病的研究 I——病原分离与鉴定

李小波* 黄文芳**

(华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘要: 从患败血病的丰产鲫 (*Carassius auratus of penze* (♀) × *Cyprinus acutidorsalis* (♂)) 脾脏中分离到的一株细菌 CSS-4-2, 经人工感染证实为病原菌。其主要特征为短杆状, 革兰氏阴性, 有运动性, 极端生单鞭毛, 不产生芽孢, 无荚膜; 对 O/129 弧菌抑制剂不敏感, 能利用葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、肌醇等, 不利用丙二酸盐、乳糖、木糖、棉子糖、山梨糖、福寿草醇等; 氧化酶、精氨酸双水解酶阳性, 尿素、苯丙氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阴性。经细菌自动化鉴定系统 VITEK-AMS-60 鉴定, CSS-4-2 菌株为豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*)。药物敏感试验表明, CSS-4-2 对链霉素、妥布霉素、氯霉素、利福平、诺氟沙星、呋喃妥因等药物敏感, 对青霉素 G 等不敏感。

关键词: 丰产鲫, 豚鼠气单胞菌, 病原, 鉴定

中图分类号: Q941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0056-04

* 现工作单位: 广东药学院

** 联系人 Tel: (020) 85213469, E-mail: zhangshl@scau.edu.cn

收稿日期: 2002-09-27, 修回日期: 2002-12-12

STUDY ON THE BACTERIAL SEPTICEMIA OF *CARASSIUS AURATUS* OF PENZE (♀) × *CYPRINUS ACUTIDORSALIS* (♂) I—ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE PATHOGEN

LI Xiao-Bo HUANG Wen-Fang

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: The bacterial strain CSS-4-2 isolated from the spleen of *Carassius auratus* of penze (♀) × *Cyprinus acutidorsalis* (♂) with septicemia was proved to be a pathogen by artificial infection. This bacteria has short rod-shaped cells, Gram negative and motile, with single polar flagellum, and with not capsule. No spore was formed, and it was resistant to O/129. It could utilize glucose, maltose, mannite, sucrose and inositol, but could not utilize malonate, lactose, xylose, raffinose, sorbin and adonitol. Oxidase and arginine dihydrolase was positive. While urease, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase was negative. Bacteriological identification by VITEK-AMS-60 showed the strain CSS-4-2 was *Aeromonas caviae*. Drug sensitivity assay showed that this strain was sensitive to streptomycin, tobramycin, chloromycetin, rifampicin, norfloxacin and nitrofurantoin, but resistant to penicillin G.

Key words: *Carassius auratus* of penze (♀) × *Cyprinus acutidorsalis* (♂), *Aeromonas caviae*, Pathogen, Identification

丰产鲫 (*Carassius auratus* of penze (♀) × *Cyprinus acutidorsalis* (♂)) 是华南师大鱼类室利用异精雌核技术育出的淡水养殖鱼类新品种, 1998年7月在广东番禺某渔场所养殖的丰产鲫暴发以败血症为特征的病情, 症状表现为鱼体两侧及腹部均充血, 鳞片松动, 胸鳍、腹鳍、臀鳍基部充血, 肛门及尾鳍皆有脓血, 解剖内脏见腹腔充满脓血, 肝、脾、肾皆肿大。本研究对从患败血症的丰产鲫脾脏分离到的豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*) 的病原生物学特征进行了研究, 并进行了药物敏感试验, 其目的是阐明豚鼠气单胞菌的病原特征、危害并筛选出有效的抗菌治疗药物, 为鱼类豚鼠气单胞菌病的防治提供科学的依据和方法, 减少渔业经济损失。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用的病原分离材料为广东番禺某渔场有明显败血症的自然发病鱼 (体重约 150 g)。人工感染用的健康丰产鲫由华南师范大学鱼类研究室提供, 体重约 150 g。

1.2 病原菌的分离与鉴定

1.2.1 病原菌的分离: 取上述典型症状的濒死丰产鲫病鱼擦干体表, 用 70% 酒精消毒后按常规方法无菌操作取病鱼肝、脾、肾组织块接种于胰蛋白胨琼脂斜面改良培养基上 (蛋白胨 0.5g, 胰蛋白胨 0.5g, 牛肉膏 0.5g, 酵母膏 0.3g, K_2HPO_4 0.2g, NaCl 0.5g, 琼脂 2g, 水 100mL, pH7.2), 28℃ 培养 24h 后, 作平板稀释涂布分离, 挑取纯的优势菌落接种斜面培养基上保存。

1.2.2 人工感染试验: 实验用蓝色塑料水族箱 (规格为 50.5cm × 38.5cm × 36.5cm, 水体约 50L), 在实验前均用 $KMnO_4$ 溶液消毒, 健康丰产鲫在水族箱饲养观察 4d, 水温 28℃, 实验期间不投喂, 连续充气。实验设实验组和对照组, 每组用鱼 5 尾, 将上述分离菌在斜面培养基上 28℃ 培养 24h 后, 用无菌生理盐水配成 10^7 cells/mL 的菌悬液, 用无菌注射器从腹鳍基部作腹腔注射感染, 试验组每尾注射 0.3mL, 对照组注射等量无菌

生理盐水。感染后,连续观察记录感染鱼的发病情况并对病鱼作病原重新分离。

1.2.3 病原菌 CSS-4-2 的鉴定:将病原菌稀释涂布于胰蛋白胨琼脂平板上 28℃ 培养 24h,观察菌落形态特征。将培养 16h 的 CSS-4-2 作革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色,记录其染色及形态特征。将 CSS-4-2 以胰蛋白胨液体培养基转接活化 3 次(培养时间分别为 10h, 13h, 16h),以第 3 次转接培养 16h 后的 CSS-4-2 作适当稀释后滴入铜网制片,1% 磷钨酸负染,于日立 H-600 透射电镜下观察并拍照,观察菌体形态大小。将分离得到的纯化病原菌 CSS-4-2 经美国进口的细菌自动化鉴定系统 VITEK-AMS-60 及其配套 GNI 卡(革兰氏阴性菌鉴定卡)进行各项生理生化测定。

1.3 病原菌 CSS-4-2 药物敏感试验

将病原菌菌悬液 (1×10^8 cells/mL) 涂布于胰蛋白胨琼脂平板上,加药敏片(由浙江省军区后勤部卫生防疫站生产),28℃ 培养 24h 后,测定其抑菌圈直径。按生产厂家推荐的抑制标准评价其药物敏感性。

1.4 病原菌 CSS-4-2 溶血试验

将 28℃ 培养 24h 的 CSS-4-2 菌种点接于 5% 马头羊血平板(中山医科大学第三附属医院动物实验室提供),在 28℃ 培养 24h 后观察是否产生溶血圈,在菌落周围出现清晰透明圈者判为 β -溶血,出现半透明不清晰透明圈者判为 α -溶血,不出现溶血圈者判为 γ -溶血。另采加州鲈鱼血,按 5% 加入 50℃ 胰蛋白胨琼脂培养基后倒血琼脂平板,点种培养 24h 的新鲜病原菌后 28℃ 培养 24h,若产生溶血毒素,则在菌落周围出现清晰的溶血圈^[1]。

1.5 病原菌 CSS-4-2 牛奶水解试验

取培养 24h 的病原菌点种于含 1% 脱脂牛奶的胰蛋白胨琼脂平板上,28℃ 培养 24h,若有蛋白酶产生,则在菌落周围出现清晰的水解蛋白圈^[2]。

2 结果

2.1 人工感染实验

从自然发病丰产鲫肝、脾、肾中分离到 8 个菌株,经人工感染试验证实从脾脏上分离到的菌株 CSS-4-2 能导致健康丰产鲫发病并死亡,毒性最强。人工感染的症状与自然发病的症状相似,均呈典型的败血症症状,对照组 5 尾鱼全部存活,实验组 5 尾鱼全部死亡。证实分离菌株 CSS-4-2 为病原菌。

2.2 病原菌 CSS-4-2 的分类鉴定

病原菌在胰蛋白胨琼脂平板上长出表面光滑、圆形、稍隆起、边缘整齐、灰白色半透明的菌落,28℃ 培养 48h 菌落大小为 2mm ~ 3mm。CSS-4-2 纯培养物涂片,经革兰氏染色,镜检结果为革兰氏阴性短杆菌;经芽孢和荚膜染色,结果为无芽孢、无荚膜;大小为 $1.0 \sim 2.2 \mu\text{m} \times 0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$,菌体两端钝圆直杆状。悬滴法镜检活菌发现具有运动力,电镜下观察该菌具极端生单鞭毛。经细菌自动化鉴定系统 VITEK-AMS-60 鉴定,CSS-4-2 菌株为豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*) (表 1)。

2.3 CSS-4-2 的药物敏感性

CSS-4-2 对链霉素、妥布霉素、氯霉素、利福平、诺氟沙星、呋喃妥因等药物敏感;对红霉素、卡那霉素、新霉素等药物中度敏感;对青霉素 G、羧苄青霉素、苯唑青霉素、氧哌嗪青霉素、氨苄青霉素、头孢唑啉、麦迪霉素、万古霉素、庆大霉素、丁胺卡

那霉素、四环素、强力霉素、环丙沙星、复方新诺明、呋喃唑酮等药物不敏感(表2)。

2.4 CSS-4-2的溶血和牛奶水解试验

在5%马头羊血琼脂平板上呈 β -溶血,在5%加洲鲑鱼血平板及脱脂牛奶琼脂平板上CSS-4-2均为阳性反应,分别出现了溶血圈和水解蛋白圈,说明该病原菌能产生溶血毒素和蛋白酶。

3 讨论

从患败血症的丰产鲫的肝、脾、肾组织中共分离到8个菌株,经过对菌株的致病力的测试,证明从脾脏中分离到的CSS-4-2菌株有很强的致病性,人工感染鱼在短时间内发病死亡,显示出与自然发病相似的症状,证实为此病病原菌。经细菌自动化鉴定系统VITEK-AMS-60鉴定为豚鼠气

表1 CSS-4-2的生理生化特性

项目	结果	项目	结果
DP300	+	棉子糖 RAF	-
葡萄糖氧化 OF	+	山梨糖 SOR	-
阳性生长控制 GC	+	蔗糖 SUC	+
醋酸胺 ACE	-	肌醇 INO	+
七叶树素 ESC	+	福寿草醇 ADO	-
植物尿酵母 PLT	+	香豆酸 COU	+
尿素 URE	-	H ₂ S	-
枸橼酸 CIT	-	β -半乳糖苷酶活性试验 ONPG 试验	-
丙二酸盐 MAL	-	鼠李糖 RHA	-
苯丙氨酸 TDA	-	阿拉伯糖 ARA	+
多粘菌素 B PXB	-	葡萄糖发酵 GLU	+
乳糖 LAC	-	精氨酸双水解酶 ARG	+
麦芽糖 MLT	+	赖氨酸脱羧酶 LYS	-
甘露醇 MAN	+	鸟氨酸脱羧酶 ORN	-
木质糖 XLY	-	氧化酶 OXI	+

注: + 为阳性, - 为阴性

表2 CSS-4-2对药物的敏感性

药物名称	纸片药量		抑菌环直径 (d/mm)			CSS-4-2
	片 (μ g)	耐药 (R)	中介 (I)	敏感 (S)		
青霉素 G Penicillin G	10	19	20-27	28	0 (R)	
羧苄青霉素 Carbenicillin	100	19	20-22	23	0 (R)	
苯唑青霉素 Oxacillin	1	10	11-12	13	0 (R)	
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	100	17	18-20	21	0 (R)	
氨苄青霉素 Ampicillin	10	13	14-16	17	0 (R)	
头孢唑啉 Cefazolin	30	14	15-17	18	0 (R)	
头孢拉定 Cefradine	-	-	-	-	24	
红霉素 Erythromycin	15	13	14-22	23	18 (I)	
麦迪霉素 Medecamycin	-	-	-	-	0 (R)	
万古霉素 Vancomycin	30	9	10-11	12	0 (R)	
链霉素 Streptomycin	10	11	12-14	15	25 (S)	
庆大霉素 Gentamicin	10	12	13-14	15	12 (R)	
卡那霉素 Kanamycin	30	13	14-17	18	17 (I)	
丁胺卡那霉素 Amikacin	30	14	15-17	15	0 (R)	
妥布霉素 Tobramycin	10	12	13-14	15	15 (S)	
新霉素 Neomycin	30	14	15-17	18	13 (R)	
四环素 Tetracycline	30	14	15-18	19	12 (R)	
强力霉素 Doxycycline	30	12	13-15	16	11 (R)	
氯霉素 Chloramphenicol	30	12	13-17	18	24 (S)	
利福平 Rifampicin	5	16	17-19	20	20 (S)	
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	15	16-19	20	15 (R)	
诺氟沙星 Norfloxacin	10	12	13-16	17	25 (S)	
复方新诺明 Co-trimoxazole	25	10	11-15	16	10 (R)	
呋喃唑酮 Furazolidone	100	14	15-16	17	0 (R)	
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	14	15-16	17	20 (S)	
0/129	10	-	-	-	0 (R)	

单胞菌 (*Aeromonas caviae*)。根据文献记载,豚鼠气单胞菌能引起多种动物疾病,甲壳动物有虾感染的报道^[2],爬行动物有甲鱼感染的报道^[3,4],鱼类感染主要表现为败血症,而安利国等发现该菌能引起鲤竖鳞病^[5];陈翠珍等发现该菌能引起草鱼肠炎^[6]。感染该菌的鱼类有海水鱼类也有淡水鱼类,欧洲鳗鲡、鲤鱼、灰鳍鲷、河鲶等皆有感染的报道,通常造成大量死亡。豚鼠气单胞菌也可感染鸟类、哺乳动物甚至人类。肉禽类加工产品内常可检出对人致病的豚鼠气单胞菌。人感染豚鼠气单胞菌可表现为急性肠胃炎所致腹泻等症状。

CSS-4-2 菌株在 ONPG 和肌醇等生化特征方面与模式豚鼠气单胞菌不完全符合^[7];王振英等 [1993] 将从患出血性败血症的鲤鱼分离到的病原菌鉴定为豚鼠气单胞菌,但在精氨酸双水解酶及 V-P 试验等方面与模式豚鼠气单胞菌不完全符合^[8];樊海平等 [1995, 1999] 在患败血症的中国对虾和欧洲鳗鲡的病原分离鉴定中皆鉴定出豚鼠气单胞菌,但两者在乳糖、密二糖、蕈糖、木糖等方面结果不同^[9]。出现这些差异,可能是由于不同地区和寄主体上分离到的豚鼠气单胞菌由于地区、气候、水质条件及实验室培养条件等方面的不同而出现的差异。

用 CSS-4-2 菌株对丰产鲫进行人工感染时,当注射菌悬液浓度为 1×10^8 cells/mL,注射剂量 0.2mL/尾腹腔注射感染 150g 体重丰产鲫时,24h 之内就可导致试验鱼发病死亡,死亡率为 100%,症状与自然发病相似,说明 CSS-4-2 菌株有较强的致病性和毒力。气单胞菌的致病性与其毒力有关,已报道的气单胞菌的毒力因子有毒素、蛋白酶、S 蛋白及载铁体等,这些致病因子相互间具有协同作用^[10]。本实验检测出 CSS-4-2 产生 β -溶血和蛋白酶,但要全面分析 CSS-4-2 的致病因子及其对致病力的影响还需要作其他毒力因子的检测和研究。

药敏试验表明,CSS-4-2 菌株对链霉素、妥布霉素、氯霉素、利福平、呋喃妥因等药物敏感,与樊海平等从患败血症的欧洲鳗鲡体上分离到的豚鼠气单胞菌菌株对氯霉素、利福平等药物耐药的结果不同^[9],其他研究者对不同豚鼠气单胞菌菌株的药敏试验结果也不尽相同^[2,8,9]。这可能是由于不同地方、不同养殖环境中病原菌因接触不同的药物环境影响而产生的耐药性变异,这也说明在生产中渔药的使用要慎重,尽量防止病原菌对药物产生耐药性。生产中渔药的使用除了考虑有效性外还需考虑安全性,包括药物对养殖对象的毒性损害,对水域环境的污染,对人体健康的影响。药敏试验结果仅表示病原菌与药物的相互关系,能否应用于生产,有待于进一步的试验研究。

参 考 文 献

- [1] 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌.病原菌检验技术.长春:吉林科学技术出版社,1992.48.
- [2] 樊海平,孟庆显,俞开康.海洋与湖沼,1995,26(3):302~307.
- [3] 史秋梅,汤生玲,高桂生,等.中国兽医学报,1998,18(4):346~348.
- [4] 余旭平,马有智.中国兽医学报,1997,17(5):460~462.
- [5] 安利国,傅荣恕,刑维贤,等.水产学报,1998,22(2):136~142.
- [6] 陈翠珍,张晓君,房海.中国兽医科技,1999,29(1):5~7.
- [7] 闻玉梅.现代医学微生物学.上海:上海医科大学出版社,1999.563~564.
- [8] 王振英,李学勤,马家好,等.兽医大学学报,1993,13(1):55~57.
- [9] 樊海平,曾占壮,余培建,等.水产学报,1999,23(3):313~318.
- [10] 陈怀青,陆承平.鱼类病害研究,1997,19(3~4):18~33.