

宽体金线蛭嗜水气单胞菌感染的病原检验*

张晓君 房海** 陈翠珍 巩元芳

(河北科技师范学院动物科学系 昌黎 066600)

摘要:对河北某宽体金线蛭 (*Whitmania pigra* Whitman) 养殖场所养殖的宽体金线蛭发生的病害,进行了发病情况、临床表现、病理变化等方面的检验。同时,择代表菌株进行了16S rRNA基因的分子鉴定,测定了16S rRNA基因序列、分析了相关细菌相应序列的同源性、构建了系统发生树。结果表明所检病例为由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 所引起的感染。分离后做纯培养的10株嗜水气单胞菌均为同种血清型菌株;代表菌株对健康宽体金线蛭的人工感染试验表明了相应的原发病原学意义;药敏试验结果显示,对供试37种抗菌药物中的头孢噻肟等高度敏感、对链霉素等敏感、对苯唑青霉素等耐药。

关键词:宽体金线蛭, 病害, 嗜水气单胞菌

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0046-07

Examination of *A. hydrophila* Isolated from *Whitmania pigra* (L.)*

ZHANG Xiao-Jun FANG Hai** CHEN Cui-Zhen GONG Yuan-Fang

(Dept of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600)

Abstract: We examined diseases occurring farmed *Whitmania pigra* (L.) in Hebei province in the aspect of situation of disease, clinical symptoms and pathological changes. In addition, the molecular identification were conducted to representative strain, the 16S rRNA gene was sequenced and compared with that of related strains, molecular phylogenetic tree was constructed. The results showed that the disease was infected by *Aeromonas hydrophila*. Pure cultures of 10 strains have the same serotype. Selected representative strain was proved to be the corresponding primitive causal agent of the disease by artificial infection experiment to healthy *Whitmania pigra* (L.). Antibiotic sensitivity of the isolates to used thirty-seven antimicrobial agents showed that the tested strains were high sensitive to cefotaxime *et al.*, were sensitive to streptomycin *et al.*, were resistant to oxacillin *et al.*

Key words: *Whitmania pigra* (L.), Disease, *Aeromonas hydrophila*

宽体金线蛭 (*Whitmania pigra* Whitman) 分类于环节动物门 (Annelida)、蛭纲 (Hirudinea)。蛭纲动物主要为淡水产或陆栖,海水中也有少数种类。据有关记载,宽体金线蛭可用于中药,主要功效为破瘀通经、消积散结,还可用于治疗高血压、心肌梗塞和急性血栓性静脉炎等疾病。随着其药用价值的不断提高,养殖区域逐渐扩大,养殖量日益增加,其病害也时有发生。

2001年5月,我们对河北某宽体金线蛭养殖场发生的一起病害进行了检验,表明由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 所引起的感染。本文报告了对所检宽体金线蛭嗜水气单胞菌感染发病情况及相应病原主要生物学性状的检验结果,旨在为对该病的有效检验与防制及对相应病原嗜水气单胞菌的进一步研究等提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 病例检验

对发病宽体金线蛭进行发病情况、临床表现及主要病理变化检验,同时取其病变

* 河北省科技厅科技攻关项目 (No. 02220502D)

** 通讯作者 Tel: 0335-2039321, Fax: 0335-2024487, E-mail: fanghaihb@163.com

收稿日期: 2005-04-04, 修回日期: 2005-07-02

材料做抹片后以革兰氏染色镜检细菌,并在此基础上进行细菌的分离与鉴定。

1.2 细菌分离与纯培养

取经病理变化检验的病蚌(共5条)的生殖腺腔内容物及溃烂肌肉组织等为材料,分别划线接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂(含7%家兔脱纤血液的营养琼脂)培养基,28℃培养24~48h做细菌分离;待分离细菌后,分别选取其纯一或优势生长的细菌菌落移接于普通营养琼脂培养基斜面做纯培养(28℃培养24h)供鉴定用。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 形态特征检查:取上述纯培养菌,移接于普通营养琼脂斜面每株各2管,分置28℃、37℃条件下培养18h后制成涂片标本,经革兰氏染色镜检细菌形态。同时,取代表菌株,制备磷酸钼染色标本后置JEM-100CX透射电镜下观察形态特征、菌体表面结构与鞭毛形成情况等。

1.3.2 菌落特征检查:取上述纯培养菌,分别划线接种于普通营养琼脂、血液琼脂(分别为含7%家兔脱纤血及含7%绵羊脱纤血的营养琼脂)、沙门氏菌志贺氏菌琼脂(SS琼脂)、疖疮病琼脂(FA)、胰酪大豆胨琼脂(TSA)、木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD)、庆大霉素琼脂、硫代硫酸钠柠檬酸钠蔗糖琼脂(TCBS)、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、Rimler-Shotts培养基(RS)、2216E海水培养基(2216E)等12种不同培养基平板,置28℃培养24h和48h,分别检查生长情况及菌落特征。

1.3.3 理化性状测定:对上述供试纯培养菌分别进行氧化酶、H₂O₂酶、糖(醇和苷)类代谢、吡啶、MR试验、V-P反应、枸橼酸盐利用(Simmons)、H₂S产生、硝酸盐还原等较系统的理化特性的测定。

1.3.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析:(1)PCR模板DNA的制备:择代表菌株HTQ010505-1分别接种在LB琼脂平板上,28℃培养24h后取单菌落转接于LB肉汤中28℃培养16h左右,按少量细菌基因组DNA抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司产,批号204-L)所述方法提取DNA作为PCR模板DNA。(2)16S rRNA基因序列的PCR扩增与测序:16S rRNA基因PCR扩增的两个引物分别为27F(正向引物):5'-AGA GTT TGA TC (C/A) TGG CTC AG-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第8~27个碱基位置)、1492R(反向引物):5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(是对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第1492~1510个碱基位置)^[1]。在20μL反应体系中含有:无菌蒸馏水14.4μL,1×PCR缓冲液2μL,1.5mmol/L MgCl₂ 1.6μL,4×dNTP混合物0.4μL,引物各0.2μL,2.5U/μL的Taq DNA聚合酶0.2μL,模板DNA1μL。PCR反应条件为:95℃预变性3min、接94℃变性1min、55℃复性1min、72℃延伸2min,30个循环后72℃温育6min。PCR扩增产物经DNA纯化系统(Wizard PCR Preps, Promega)纯化后,由上海博亚生物工程技术公司使用3730测序仪进行基因序列测定。(3)序列分析与系统发育树构建:将上述代表菌株的16S rRNA基因序列分别通过NCBI的Blast检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析,并使用ClustalX1.8软件与从GenBank数据库中获得的气单胞菌菌株的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments),获得分支系统发育树。

1.3.5 菌种的归类判定:以经上述表型性状鉴定及系统发育学分析的结果,参照《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》^[2]、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[3]、《Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish》^[4]及《常见细菌系统鉴定手册》^[5]等有关资料,进行供试菌的种属判定。

1.4 血清型检定

取上述供试纯培养菌株分别接种于普通营养琼脂斜面 28℃ 培养 18h 作为玻板凝集原、分别移接于普通营养肉汤管 (10mL/管) 28℃ 振荡培养 18h 作为试管凝集原, 与原分离于草鱼肠炎病 (死) 鱼的嗜水气单胞菌 (记作: 肠炎 1 菌株) 制备的全菌 (OK) 免疫原经强化免疫家兔制备的抗血清做玻板、试管凝集试验, 测定相应的血清型^[6]; 同时, 设立肠炎 1 菌株及生理盐水对照。

1.5 人工感染试验

择上述纯培养菌株的 1 个代表菌株, 移接于普通营养肉汤中 28℃ 培养 18h 并调成 9×10^8 CFU/mL 作为供试菌液, 经背部肌肉注射健康宽体金线蛭 0.1mL/条、0.2mL/条的各 8 条共 16 条, 同时设立同剂量、同批无菌营养肉汤各 4 条共 8 条的对照, 均隔离养殖 (每天投喂田螺并换水 1 次)。每天观察发病与死亡情况, 对死亡蛭及时检查病变, 并以病变组织做感染菌的检查及分离培养与复核鉴定。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变特征

河北某宽体金线蛭养殖场所养殖的 1,000 条左右宽体金线蛭, 于 2001 年 4 月中旬见有明显发病, 至 5 月 5 日送检时共发病 50 条 (发病率约 2.3%)、死亡 23 条 (病死率 46%), 病蛭表现为病初时皮肤处出现一块失去弹性 (较僵硬) 的病变, 随之出现肌肉腐烂、严重的从腐烂处断裂; 对送检的濒死宽体金线蛭 5 条进行检验, 除前述的肌肉腐烂外, 见均有生殖腺出血现象、肠道有不同程度的出血等败血症感染病变。

2.2 病变组织中的细菌

取病蛭生殖腺腔内容物及溃烂组织, 直接做抹片后经革兰氏染色镜检, 结果发现均有不同量的革兰氏染色阴性、杆状及短杆状, 两端钝圆, 散在 (个别的成双), 无芽孢, 大小多在 $0.5\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 2.5\mu\text{m}$ 的细菌。

2.3 细菌分离鉴定与确定分类位置

2.3.1 细菌分离: 取病蛭生殖腺腔内容物及溃烂组织做细菌分离, 结果均分离到菌落数量分布不等但均较多且为同一种细菌的菌落。在普通营养琼脂上, 为圆形光滑、边缘整齐、较隆起、不透明的灰白色菌落, 培养 24h 检查直径多在 1.5mm 左右、48h 多在 2.0mm 左右 (稍隆起), 生长丰盛; 在血液营养琼脂上, 为与普通营养琼脂培养基上的菌落特征基本一致、 β -溶血的菌落。

2.3.2 细菌纯培养: 分别随机取每条被检宽体金线蛭的生殖腺腔内容物、溃烂肌肉组织分离菌的各 1 个菌落 (每条各 2 个) 做纯培养共 10 株, 分别按分离地和分离日期 (年、月、日) 及株数进行编号为 HTQ010505-1 至 HTQ010505-10, 置 4℃ 冰箱保存供鉴定用。

2.3.3 纯培养菌的形态特征: 上述 10 株纯培养菌形态特征一致且与在病变组织中的相同, 在 28℃、37℃ 培养的均为革兰氏染色阴性, 杆状及短杆状, 散在 (个别的成双), 无芽孢, 两端钝圆 (有个别菌体的一端或两端稍尖些), 大小多在 $0.4\mu\text{m} \sim 0.7\mu\text{m} \times 0.9\mu\text{m} \sim 2.2\mu\text{m}$, 有个别的长丝状菌体。在电子显微镜下可见菌体呈杆状, 端生单鞭毛, 菌体表面较光滑。

2.3.4 纯培养菌的菌落特征: 上述 10 株纯培养菌在供试同种培养基上的生长与菌落特征一致 (表 1)。其在普通营养琼脂、血液营养琼脂上的与用此两种培养基从自然病

例初代分离的相一致, 在血液营养琼脂上使用绵羊血的不如使用家兔血的所呈现的 β -溶血效果优。

表 1 10 株供试菌在不同培养基上的菌落特征

培养基	菌落特征
TSA	圆形光滑、边缘整齐、较隆起、不透明、灰白色的菌落, 培养 24h 的菌落直径多在 1.5mm 左右、48h 多在 2.5mm 左右 (稍隆起), 生长丰盛
TCBS	培养 24h 检查仅于划线接种起始部的菌苔黄色、并有部分看不明显颜色的很小的菌落, 48h 检查菌落为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、黄色、直径多在 0.4mm 左右的小菌落, 刮下菌落 (苔) 呈较黏的块状不易涂开, 不易在连续划线处生长出单菌落, 生长不良
庆大霉素琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、较透明状的灰褐色菌落, 培养 24h 检查直径多在 0.3mm 左右、48h 多在 0.5mm 左右 (呈灰色), 不易在连续划线处生长出单菌落、仅于划线接种起始部出现菌苔及个别的菌落且菌落易融合 (不易划出单菌落), 生长不良
XLD	圆形较光滑、边缘整齐、较扁平的同心圆状、黄色的菌落, 培养 24h 检查直径多在 1.2mm 左右、48h 多在 1.5~2.0mm (同心圆的脐状且表面有皱褶), 刮下菌落呈发黏的块状不易涂开且留下黄色菌落痕迹, 生长较丰盛
SS	圆形光滑、边缘整齐、较隆起的菌落, 培养 24h 检查直径多在 1.2mm 左右 (无色)、48h 多在 2.2mm 左右 (红色), 生长丰盛
伊红美蓝琼脂	培养 24h 检查未见明显生长, 48h 检查见生长出直径多在 0.2mm 左右、同培养基本底颜色 (紫黑色)、圆形光滑、边缘整齐、稍隆起的小菌落, 生长贫瘠
FA	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、不透明、灰白色的菌落, 培养 24h 检查直径多在 1.8mm 左右、48h 多在 3.0mm 左右 (较扁平), 生长丰盛
麦康凯琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起的菌落, 培养 24h 检查直径多在 1.2mm 左右 (无色)、48h 多在 2.2mm 左右 (红色), 生长丰盛
RS	圆形光滑、边缘整齐、较扁平、黄色的菌落, 24h 检查直径多在 1.0mm 左右、48h 多在 1.2~1.5mm, 孤立菌落呈同心圆状并有浅黄绿色的中心, 刮下菌落呈发黏、成块不易涂开并留下黄色菌落痕迹, 生长中度
2216E	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、不透明、浅灰白色的菌落, 24h 检查直径多在 0.2mm 左右、48h 多在 1.2mm 左右, 刮下菌落较黏稠不易涂开, 生长接近中度

2.3.5 理化特性: 供试 10 株分离菌所测理化特性的结果一致 (表 2)。

表 2 理化特性测定结果表

项目	结果	项目	结果	项目	结果
37℃ 生长试验	+	甘露醇	+	脂酶 (吐温 80)	+
氧化酶	+	吡啶产生	+	糊精	+
接触酶	+	七叶苷利用	+	松二糖	-
克氏双糖铁琼脂: 斜面	+	苯丙氨酸脱氨酶	+	硝酸盐还原	+
柱层	+	尿素酶	-	水杨苷	-
H ₂ S	-	IPA (SIM)	-	卫茅醇	-
OF 试验 (葡萄糖)	F	麦芽糖	+	甘露糖	+
H ₂ S 产生: 纸条法	+	丙二酸盐利用	+	半乳糖	+
琼脂法	-	醋酸盐利用	-	甘油	+
动力 (半固体)	+	木糖	-	赤藓醇	-
明胶液化	+	木糖醇	-	海藻糖	+
枸橼酸盐利用 (Simmons)	+	苦杏仁苷	-	纤维二糖	+
葡萄糖: 产酸	+	侧金盏花醇	-	菊糖	-
产气	+	松三糖	-	棉子糖	-
山梨醇	-	酒石酸盐利用	-	乙酰胺酶	-
蜜二糖	-	黏液酸利用	-	阿拉伯醇	-

续表 2

蔗糖	+	ONPG	+	乳糖	+
鼠李糖	-	蛋白酶(7%牛奶营养琼脂)	+	α -甲基-D-葡萄糖苷	-
肌醇	-	淀粉酶(碘液显示法)	+	精氨酸双水解酶	+
MR 试验	+	NaCl 肉汤中生长: 0%	+	DNA 酶(盐酸覆盖法)	+
V-P 反应	-	1%	+	卵磷脂酶(蛋黄法)	-
阿拉伯糖	+	6%	-	O/129: 10 μ g	R
山梨糖	-	果糖	+	150 μ g	R

注: + 阳性, - 阴性, R 抗性

2.3.6 16S rRNA 基因序列与系统发育学: 代表菌株 (HTQ010505-1) 进行的 16S rRNA 基因序列测定, 不包括引物结合区, 所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1,422bp (GenBank 登录号: AY987394)。将 HTQ010505-1 的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果检索出的细菌均为气单胞菌属的细菌, HTQ010505-1 株的 16S rRNA 基因序列与它们的同源性分别在 97% ~ 99%。选取了其中部分菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, HTQ010505-1 株与嗜水气单胞菌在系统发生树中聚为一个分支, 其系统发育树如图 1 所示。

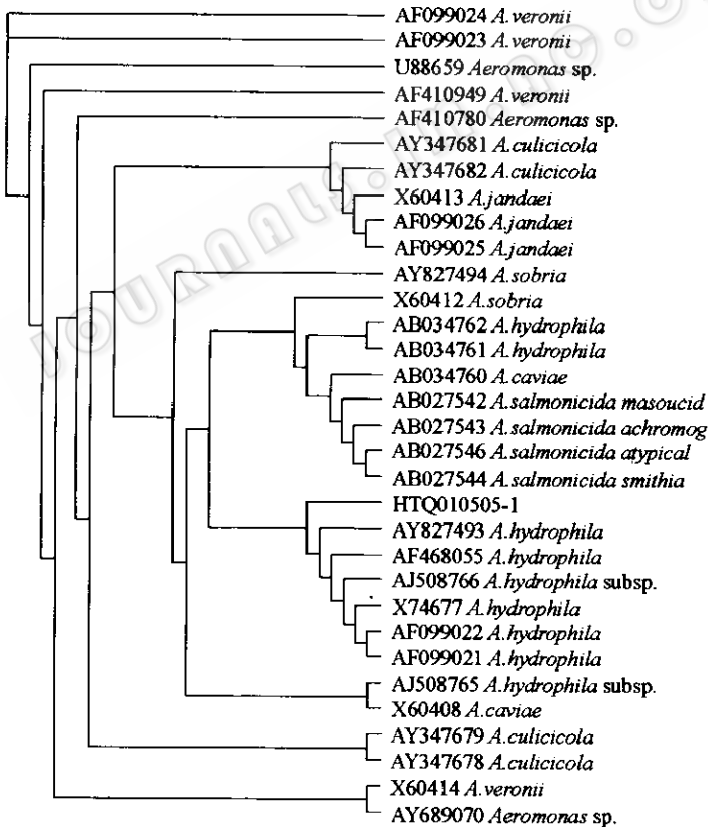


图 1 气单胞菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

图中 AF099024 至 AY689070 为菌株在 NCBI 的登录号, 数字为自举次数

2.3.7 菌种归类判定: 综合上述对 10 株菌在形态和理化特性、代表菌株 DNA 中 G + C mol% 和 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析的结果, 依据这些性状并结合上述的形态、菌落特征、生长表现等, 将其判定为气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的嗜水气单胞

菌 (*A. hydrophila*)。

2.4 血清型及血清同源性

在玻板凝集反应中, 所分离鉴定的 10 株嗜水气单胞菌、供对照用的已知嗜水气单胞菌 (肠炎 1 菌株) 菌株^[7], 均与用肠炎 1 菌株所制备的 OK 抗血清呈明显凝集 (+ +), 与对照用的生理盐水均不凝集 (-); 在试管凝集反应中, 肠炎 1 菌株与相应的 OK 抗血清的效价为 $14\log_2$ (1:16384 倍), 分离鉴定的 10 株嗜水气单胞菌中有 6 株 (占 60%) 为 $14\log_2$ (1:16384 倍)、4 株 (占 40%) 为 $13\log_2$ (1:8192 倍), 与对照用生理盐水均不凝集 (-)。

2.5 人工感染试验的致病作用

择 HTQ010505-1 株作为代表菌株进行的人工感染试验, 结果为接种 0.1 mL/条的 8 条于感染后 72h、96h 各死亡 1 条 (共 2 条), 接种 0.2 mL/条的 8 条于感染后 24h、72h 各死亡 1 条 (共 2 条), 剖检见死亡蛙表现表皮充血, 内脏溃烂; 感染未死亡的各 6 条共 12 条蛙中, 有的于感染后的 14d 后出现在接种感染部位皮肤与肌肉的腐烂 (分别为接种 0.1 mL/条的有 2 条、接种 0.2 mL/条的有 3 条) 且随之加重, 但此 12 条均于 20d 观察期内未再死亡。对照 8 条蛙, 于 20d 观察期内均健活。感染蛙分离菌经形态及理化特性鉴定, 结果与原感染菌完全一致。

3 结语与讨论

嗜水气单胞菌广泛分布于池、塘、溪、涧、江、河、湖泊和临海河口等淡水环境, 水中沉积物、污水及土壤中也均有存在, 也常从淡水鱼和虾、青蛙、爬虫类和其他水生动物体内检出。此菌宿主范围广泛, 已检出此菌的鱼类有鲫、鳊、鲢、鲤、鲮、鳙、草鱼、青鱼、香鱼、团头鲂、狼鲈、虹鳟、尼罗罗非鱼、斑点叉尾鲷、黄鳝、麦穗鱼、黄尾鲷、鲶等; 另外, 软体动物的蜗牛也有分离出本菌的记载, 三角帆蚌的所谓“蚌瘟”也有报道认为其病原是嗜水气单胞菌, 节肢动物中华绒螯蟹及对虾、两栖动物的蛙、爬行动物的鳄鱼及鳖、陆生动物如貂、兔、貉、猪、牛及鸟类也都可检出此菌, 在人体内也可分离到, 属于人的一种条件致病菌, 且目前已跃然成为引人注目的人及动物共患病的重要病原^[8,9]。本次从发病宽体金线蛙中检出该菌, 并经以分离菌株作对健康蛙的感染试验证明了其原发病原学意义, 进一步表明了该菌在水产养殖动物中的广泛致病作用。

通过本次所检病例, 发现宽体金线蛙的嗜水气单胞菌感染表现以皮肤、肌肉的腐烂为特征, 其病程较长, 随着病变加重可最后导致败血症感染; 经肌肉途径接种的人工感染试验能引起同自然感染的病变, 也进一步证明了这一点。从总体分析, 该感染症在起始可能属于一种在皮肤、肌肉的局部感染, 随之出现全身感染; 最有可能的侵入途径是外伤, 在水中存在的嗜水气单胞菌先在伤口局部生长繁殖并引起病变, 再逐渐向深部及全身扩散, 并最终可导致蛙的全身感染及死亡。另一方面, 基于这种情况, 在对该菌引起的蛙相应感染症的用药防治方面, 选择对嗜水气单胞菌的高敏药物定期对养殖用水进行处理是很必要和有效的。

经对分离鉴定的 10 株嗜水气单胞菌做全菌 (OK) 的血清型检定, 表明是有同种的 OK 抗原 (血清同源), 且与从草鱼肠炎病例分离的嗜水气单胞菌 (供试的肠炎 1 菌株) 是同型的。这一结果, 初步显示了在不同水产养殖动物的分离株间存在的血清同

源性,有利于对嗜水气单胞菌的血清流行病学调查、免疫血清学检验等。另一方面,已知嗜水气单胞菌存在不同血清型菌株,因此要明确分离菌株的血清同源性,尚需通过做试管凝集试验比较各菌株间的抗血清效价予以明确。

经以37种抗菌类药物对4株分离菌的药物敏感性测定,结果未发现在不同供试菌间存在敏感与耐药的明显差异,可供在对由该菌引起的水蛭感染症防治用药时的参考。考虑到细菌耐药变异的频繁性,提议有效用药还是对分离菌株在进行了药敏测定后选择敏感药物为宜。

参 考 文 献

- [1] Martin F, Collen M. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (10): 3724 ~ 3730.
- [2] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994. 190 ~ 191, 253.
- [3] Krieg N R, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1984. 545 ~ 548.
- [4] Austin B, Austin D A. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 1999. 20, 66 ~ 69.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 106 ~ 119, 353 ~ 398.
- [6] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 68 ~ 69.
- [7] 陈翠珍, 张晓君, 房海. 中国兽医科技, 1999, 29 (1): 5 ~ 7.
- [8] 聂青和. 感染性腹泻病. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 434 ~ 447.
- [9] 叶巧真, 何建国, 邱德全, 等. 微生物学通报, 2000, 27 (6): 407 ~ 413.