

鲍氏不动杆菌——鳊鱼暴发性死亡的新病原

顾天钊 陆承平 陈怀青

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要 1995 年广东某地人工养殖的鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)暴发传染病,大量病鱼急性死亡,引致严重经济损失。本试验从已接种嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和柱状噬纤维菌(*Cytophaga columnaris*)疫苗的病鱼脏器中分离到一种细菌,经腹腔注射和鳃部接种人工感染健康鳊鱼及罗非鱼(*Oreochromis spp.*),均复制出与自然发病相似的病例,主要特点为肝脏严重变性。从上述人工感染的病鱼体内再次分离到与自然发病相同的细菌。该菌为革兰氏阴性短杆菌,无鞭毛,不具运动性,氧化酶阴性,接触酶阳性,有自发荧光。结合生化试验表明,该菌是鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*),是一种未曾报道过的致鳊鱼死亡的新病原菌。

关键词 鳊鱼, 鲍氏不动杆菌, 暴发性传染病

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)是我国名贵的淡水鱼种,味道鲜美,具有很高的经济价值。由于需求量的增加,近几年南方各地纷纷大规模养殖,鳊鱼的各种疾病也随之而来。烂鳃病和出血性败血症首当其冲,其病原分别是柱状噬纤维菌^[1](*Cytophaga columnaris*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)在接种了相应的疫苗后,这两种疾病得到了较好的控制。但是 1994 年前后,广东又发生鳊鱼大规模死亡,某鳊鱼养殖场尤为严重,死亡率在 90% 以上,其中部分已接种柱状噬纤维菌和嗜水气单胞菌疫苗。病鱼起初浮升水面,游动缓慢,随后大量死亡。死鱼体表无出血症状,剖检的显著特点是肝脏变为土黄色,质地松脆,其它内脏器官未见明显病变。

从上述养殖场 3 次取得 4 批发病鳊鱼,作细菌分离培养、生理生化特性测定、药敏试验及动物回归试验,认为鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)为该病的病原菌。

1 材料和方法

1.1 细菌的分离和培养

1995 年 9 月、10 月在广东中山某地 3 次

取 4 批 35 尾症状明显的濒死鳊鱼,无菌操作取其肝脏,接种于营养琼脂平板和含 3% 氨苄青霉素(AMP)琼脂平板,置 28℃ 培养,24 h 后挑取单个菌落作纯培养。

1.2 分离菌的鉴定

1.2.1 形态观察: 用 24 h 的纯培养物分别作革兰氏染色镜检以及 2% 磷钨酸(pH 7.0)负染透射电镜观察。

1.2.2 生理生化特性测定: 以纸片法作氧化酶试验^[2]。氧化酶试剂为 1% 盐酸四甲基对苯二胺,(购自南京市卫生防疫站)。用接种针挑取少量纯培养细菌穿刺接种在含葡萄糖,甘露醇,蔗糖等的微量生化发酵管内(购自江苏省卫生防疫站)。此外,将分离菌接种 Vitek 快速诊断系统,进行测试。

1.3 药敏试验

采用药敏纸片琼脂平板扩散法^[2]。所用药敏纸片中新生霉素为美国 BBL Microbiology system 产品,其余为上海市卫生局劳动服务公司生化试剂所产品。

1.4 细菌的致病性试验

1996-07-22 收稿

分别取健康鳊鱼, 罗非鱼及小鼠作致病性试验。试验用鳊鱼来自广东本地的养殖场, 约 70 ~ 80 g/尾。奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 和尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 购自南京市罗非鱼良种厂, 约 100 g/尾。小鼠购自南京医科大学实验动物中心, 约 30 g/只。

1.4.1 鳊鱼: 取分离菌的肉汤纯培养物, 腹腔注射鳊鱼 4 尾, 接种量每尾 4.4×10^5 cfu/ml。置水温约 20 °C 的容器中连续观察 24 h, 同时设注射无菌生理盐水 (PBS) 作对照。

1.4.2 罗非鱼: 取无菌生理盐水将纯培养物 (同 1.4.1) 稀释。将奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼随机分为 3 组, 每组 3 尾, 腹腔注射, 每尾分别接种 6×10^5 , 6×10^6 , 6×10^7 cfu/ml。观察 3 d。对照组注射 PBS。

另取上述罗非鱼 6 尾; 鳃部接种分离菌, 2 尾作不接种对照。用无菌生理盐水将上述纯培养细菌稀释, 终浓度为 3×10^7 cfu/ml, 用脱脂棉球蘸取后, 轻轻抹在鱼鳃上。置水温 21 °C 的水族箱中观察 3 d。

1.4.3 小鼠: 腹腔注射 4.4×10^5 cfu/ml 细菌悬液, 细菌来源及培养方法同 1.4.1。观察 3 d。对照组注射等量 PBS。

2 结果

2.1 细菌的分离培养

病鱼的肝脏接种营养琼脂平板和 AMP 琼脂平板, 28 °C 培养 24 h 后, 均可见一种较小的圆形白色菌落。该菌落白色微凸, 表面润滑, 边缘整齐, 发出肉眼可见的淡蓝色荧光。3 次 4 批患病鳊鱼用上述方法均分离到相同的细菌, 且未发现菌株的差异。

2.2 细菌的鉴定

2.2.1 形态观察: 该分离菌革兰氏染色阴性, 球杆状, 菌体两端钝圆, 无鞭毛, 无运动性。

2.2.2 生理生化特性: 该分离菌氧化酶阴性, 接触酶阳性。能利用柠檬酸盐作碳源, 不能利用丙二酸盐和乙酰胺。发酵葡萄糖产酸产气, 能发酵乳糖和木糖, 不能发酵葡萄糖苷、

麦芽糖、甘露醇、棉子糖、山梨醇、蔗糖、肌醇、鼠李糖和阿拉伯糖。该细菌不能使苯丙氨酸脱氨, 也不能使鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸脱羧。对尿素酶, β -半乳糖苷酶的利用亦为阴性。此外, 该菌在 5% 的兔血平板上不溶血。

2.3 药敏试验 该分离菌对青霉素、氨苄青霉素、磺胺、利福平、红霉素、多粘菌素 B 不敏感, 对链霉素、四环素、新生霉素低度敏感, 对庆大霉素, 卡那霉素高度敏感。

2.4 致病性试验 纯培养的分离菌悬液腹腔接种鳊鱼后, 结果 3/4 尾 (75%) 鳊鱼在 22 h 内死亡, 症状和病理变化与自然病例相同, 主要特点为肝脏严重变性 (另文报道), 全身无明显出血症状。对照组无异常。腹腔接种不同浓度分离菌的罗非鱼均在 72 h 内发病死亡, 接种 6×10^5 cfu/ml 者死亡率为 2/3 (66%), 接种 6×10^6 和 6×10^7 cfu/ml 者均为 3/3 (100%)。对照组罗非鱼正常。鳃部接种分离菌的罗非鱼, 均在 36 h 内死亡, 死亡率为 6/6 (100%)。从上述人工感染发病的鳊鱼和罗非鱼肝脏中, 均再次分离到与自然发病分离菌相同的细菌。该分离菌接种小鼠腹腔, 可导致小鼠发病, 死亡率为 26/31 (83.9%)。

3 讨论

通过细菌分离培养、生理生化特性测定及动物致病性试验, 认为广东地区鳊鱼暴发性传染病的病原为鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。关于该菌对鳊鱼有致病性, 并致使大批死亡, 在国内外尚未见报道。

该分离菌氧化酶阴性, 接触酶阳性, 无鞭毛, 不具运动性, 发酵葡萄糖产酸产气, 不能使苯丙氨酸脱氨, 也不能使鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸脱羧。另外, 摇床振荡培养证实该菌为需氧菌。据此, Vitek 快速诊断系统认定该菌为乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)。该系统系根据第 8 版伯杰氏细菌鉴定手册^[3]鉴定细菌, 在第 8 版中不动杆菌属中只有这一个模式种, 其它种尚未定名。作者检索第 9 版伯杰氏细菌鉴定手册^[4], 发现所

获的鳊鱼分离菌的生理生化指标更接近于鲍氏不动杆菌。后经德国慕尼黑技术大学微生物所 Amann 博士以 16 srRNA 寡核苷酸探针原位杂交鉴定该菌为不动杆菌属,再经德国科隆大学医学微生物所 Seifert 博士以生化特性进一步鉴定该菌为鲍氏不动杆菌生物 9 型。鉴于对不动杆菌属成员特性知之甚少。随着今后研究的深入,对不动杆菌属的分类及致病性等还会有新的认识。

不动杆菌在自然界广泛存在,土壤、水以及健康的动物和人体内均有发现。一般认为不动杆菌的毒力很低,很少致病^[5]。但是最近的研究表明不动杆菌引起人类医院内感染的病例有所增加,而且该菌对大多数抗生素不敏感^[6,7],治疗比较困难。近年来国内虽有从患病水生动物分离到不动杆菌的报道^[8],但其对动物确切的致病性如何,尚未见报道,至于致病机理则更不清楚。作者所进行的研究表明,动物回归实验可复制出与自然发病相同的病症,并分离到相同细菌,从而证实了该菌分离株的致病性。进一步的研究显示,致病机理可能与该菌对细胞的粘附及侵袭能力有关(另文发表)。

本试验所得不动杆菌分离株菌落发出淡蓝色荧光,肉眼清晰可见。检索有关不动杆菌的报道及文献包括第 9 版伯杰氏细菌鉴定手册都未提及,这一特性值得注意。本试验还发现,该菌株在普通琼脂平板连传 5 代以后,荧光减弱直至消失。但如果通过鼠体或鱼体复壮,则可重新发出荧光。尽管其机理尚不清楚,但这一现象提示,此种未见报道的荧光物质可能与该菌株致病性有关,至少是一种与毒力因子相关的指标。鉴定和分析此种荧光物质,值得一试。

本试验用奥利亚罗非鱼及尼罗罗非鱼代替鳊鱼作人工接种试验,获得同样好的效果。罗

非鱼与鳊鱼同属鲈形目^[9](Perciformes),分类地位相近。但罗非鱼价廉易得,且离疫区远,可取代鳊鱼作为理想的动物模型。作者用分离菌培养液接种罗非鱼鳃部感染成功,证明鳃是该菌的感染途径之一。这一感染途径比一般采用的腹腔注射、浸泡感染或同居感染均为优越。腹腔注射量不易掌握,而且与自然感染差异太大,未必能说明问题,至于浸泡或同居感染,往往不易获得可靠的发病结果。鳃部接种这一接种途径简便有效,是鱼类微生物学研究方法的睿智之举。

致谢 本课题得到广东省中山市农业科技开发中心的资助。中山市农委梁泽伟、何大庆、冯铨汉先生在采样中给予极大方便。上海商检局微生物室吴仲樑先生,德国慕尼黑技术大学微生物所 Amann 博士,德国科隆大学医学微生物所 Seifert 博士等在细菌鉴定方面提供了有益的帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- [1] 陈昌福,史维舟,纪国良等. 华中农业大学学报, 1994, 13(6): 621 ~ 625.
- [2] 廖延雄主编. 兽医微生物实验诊断手册, 北京: 中国农业出版社, 102 ~ 103, 126 ~ 127.
- [3] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯编. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1981, 604 ~ 607.
- [4] Holt JG, Krieg NR, Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.) Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994. 73.
- [5] Tilley P A G, Roberts F J, *J Clin Infect Dis*, 1994, 18(6): 896 ~ 900.
- [6] 何林, 张立军, 吴劲松等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 16(3): 196 ~ 199.
- [7] Crowe M, Towner KJ, Humphreys H. J. *MED. MICROBIOL.* 1995, 43(1): 56 ~ 62.
- [8] 肖克宇. 鱼类病害研究, 1992, 14(2): 26 ~ 31.
- [9] 成庆泰, 郑葆珊主编. 中国鱼类系统检索, 北京: 科学出版社, 1987, 274 ~ 393.

(下转第 83 页)

ACINE TO BACTER BAUMANNII A NOVEL PATHOGEN OF ACUTE EPIDEMIC IN MANDARIN FISH (*SINIPERCA CHUATSI*)

Gu Tianzhao Lu Chengping Chen Huaqing

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095)

Abstract In last few years, a new acute epidemic disease with high mortality occurred among cultured mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) which had been immunized with vaccines of *Aeromonas hydrophila* and *Cytophaga columnaris* in Guangdong Province, China. Bacteriological examination revealed that all isolates from moribund fish liver had the same characteristics, eg. Gram-negative, coccirrod, no motile, oxidase negative and catalase positive. In addition, the isolated colony might produce fluorescence. Inoculating the strains to mandarin fish, tilapia and mouse for lethality indicated the germ had pathogenicity, and the same bacterium could be recovered from these experimental animals. The results suggested the bacterium was the causative agent of this disease. Conclusively, morphological, cultural and biochemical tests demonstrated that the microorganism isolated from mandarin fish was *Acinetobacter baumannii*.

Key words *Siniperca chuatsi*, Acute epidemic disease, *Acinetobacter baumannii*