

鲤鱼细菌性败血症病原菌的药敏试验

张玉芬, 张秀军*, 李明, 赵杰, 张文丽, 亢喜刚

(1. 华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000; 2. 河北省唐山市丰润区疾病预防控制中心, 河北唐山 064000)

摘要 [目的] 为研制有效防治鲤鱼细菌性败血症的疫苗提供依据。[方法] 从河北省某渔场具有典型细菌性败血症症状的鲤鱼中分离出2株优势菌, 对分离菌进行生化鉴定、16S rRNA 基因序列测定, 并研究分离菌的药物敏感性。[结果] 根据2株分离菌的菌落形态、生化特性和16S rRNA 基因序列的测定结果(同源率为99%), 发现2株分离菌均为气单胞菌属的嗜水气单胞菌, 认为嗜水气单胞菌是鲤鱼细菌性败血症的病原菌。分离到的2株嗜水气单胞菌对阿米卡星、氨基糖苷类、头孢噻肟、头孢他啶、加替沙星等15种抗生素均敏感, 对氨基糖苷类均耐药, 对复方磺胺表现出了菌株差异。[结论] 对嗜水气单胞菌敏感的15种抗生素可作为防治鲤鱼细菌性败血症的首选药物。

关键词 鲤鱼; 嗜水气单胞菌; 分离; 鉴定; 药敏试验

中图分类号 S941.42 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13200-02

Drug Sensitivity Test of Pathogen of Bacterial Septicemia of Carps

ZHANG Yufen et al (Department of Biological Science, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract [Objective] The study was to provide the basis for the development of vaccine that could effectively control bacterial septicemia of carps. [Method] 2 strains of dominant bacteria were separated from carps with typical bacterial septicemia symptoms in a fishing ground in Hebei Province, and the biochemical identification, gene sequencing of 16S rRNA of separated strains were conducted and the drug sensitivity of separated strains was studied. [Result] According to the colony morphology, biochemical characteristics and determination results of 16S rRNA gene sequence (homology was 99%) of 2 separated strains, it was found that both 2 separated strains were *Aeromonas hydrophila* of *aeromonas*, thinking that the *aeromonas hydrophila* was the pathogen of bacterial septicemia of carps. The 2 separated strains of *aeromonas hydrophila* were sensitized to 15 kinds of antibiotics such as amikacin, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime and gatifloxacin, and they all had drug resistance to ampicillin but showed strain difference to compound sulfamethoxazole. [Conclusion] 15 antibiotics sensitized to *aeromonas hydrophila* all could be the first selection drug to control bacterial septicemia of carps.

Key words Carps; *Aeromonas hydrophila*; Separation; Identification; Drug sensitivity test

细菌性败血症也称为细菌性出血病、出血病、出血性腹水病、腹水病等。该病为暴发性流行病, 具有危害重、流行广、周期长、殃及的鱼类品种多、死亡率高的特点。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 是一种重要的人、畜、鱼共患病的病原菌, 可以感染多种鱼类并造成大量死亡, 给淡水鱼养殖业造成重大的经济损失^[1-2]。2007年6月, 河北省唐山市丰南区某养殖场养殖的鲤鱼开始发生批量死亡, 病鱼主要症状为两眼突出, 腹部膨大, 体表有大小不等的红斑, 肛门红肿, 尾鳍溃烂。鱼鳃为暗红色, 肝肿大, 脾脏呈暗黑色, 腹腔有淡红色腹水, 黏膜变黑。笔者从具有典型症状的病鱼中分离到2株优势菌。对分离菌的生化特征及药物敏感性进行研究, 分析该病的致病原因, 为研制有效疫苗奠定基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 仪器。美国产Bdphoenix 100自动微生物鉴定仪。

1.1.2 培养基。营养肉汤、营养琼脂、氧化酶试纸条, 均由杭州天和微生物试剂有限公司提供; 细菌鉴定条20E, 由法国梅里埃公司提供; 细菌基因组DNA提取试剂盒, 由天根生化科技北京有限公司提供。

1.1.3 病鱼。取自河北省某养殖场患病或濒死鲤鱼。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离培养。无菌采取发病或濒死鲤鱼的肝、脾、肾, 划线接种于普通营养琼脂培养基上, 28℃培养24h, 挑取单个菌落获纯培养物后, 转接于普通营养琼脂斜面培养基上保存, 供鉴定用。

1.2.2 病原菌的生化鉴定。将分离菌株接种于普通营养琼

脂平板上, 28℃培养18~24h, 用法国梅里埃产细菌鉴定条20E进行生化鉴定。

1.2.3 16S rRNA 基因序列测定。择代表菌株接种于普通营养肉汤培养基中, 28℃培养16h。按细菌基因组DNA提取试剂盒所述方法提取DNA, 再进行16S rRNA基因序列的PCR扩增与测序, 将菌株的16S rRNA基因序列通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析。

1.2.4 病原菌的药敏试验。将病原菌分别接种于普通营养琼脂平板上, 28℃培养18~24h, 用美国产Bdphoenix-100自动微生物鉴定仪作药敏鉴定。

2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定

2.1.1 菌落形态特性。2株菌落形态特征基本一致, 分别命名为TSFN20070609-1、TSFN20070609-2。普通营养琼脂平板上典型菌落为圆形, 无色或浅黄色, 半透明, 表面光滑, 湿润, 边缘整齐, 无水溶性色素。

2.1.2 病原菌生化鉴定。经API细菌鉴定条鉴定, 2株菌均为嗜水气单胞菌, 两株菌对所检项目的生化实验结果见表1。

2.1.3 16S rRNA 基因序列测定。经上海生工生物公司测序, 通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析, 同源性为99%。

2.1.4 菌种分类位置确定。综合上述菌株在菌落形态、生化特性和16S rRNA基因序列的测定结果, 将其判定为气单胞菌属的嗜水气单胞菌。

2.2 病原菌的药敏结果

2.2.1 药敏结果。分离出的2株病原菌, 对供试的阿米卡星(丁胺卡那霉素)等15种抗生素均敏感, 而对氨基糖苷类均耐药, 对复方磺胺表现出了菌株的差异(表2)。

2.2.2 结果判读。判定结果时每种药物均有“耐药”和“敏感”2个数值作为参照, 称为分界点数值($\mu\text{g/ml}$)。测得的

基金项目 唐山市科技局科技攻关项目(07120203A4-2)。

作者简介 张玉芬(1974-), 女, 河北唐山人, 在读硕士, 主管检验师, 从事水产病原微生物及免疫的研究。* 通讯作者, 硕士生导师。

收稿日期 2008-09-01

MC 值大于或等于耐药分界点时判定为耐药,而测得的 MC 值小于或等于敏感分界点时则判定为敏感。

表1 两株菌生化试验结果

Table 1 Result of biochemical test of two bacterial strains

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
ONPG(邻硝基苯-半乳糖苷)	+	TDA(色氨酸脱氨酶)	-	SOR(山梨醇)	-
ADH(精氨酸双水解酶)	+	IND(吲哚试验)	+	RHA(鼠李糖)	-
LDC(赖氨酸脱羧酶)	+	VP(vp 试验)	+	SAC(蔗糖)	+
ODC(鸟氨酸脱羧酶)	-	GEL(明胶液化)	+	MEL(密二糖)	+
CT(柠檬酸盐)	+ / -	GLU(葡萄糖)	+	AMY(苦杏仁苷)	- / +
H ₂ S(硫化氢试验)	-	MAN(甘露醇)	+	ARA(阿拉伯糖)	-
URE(脲素)	-	INQ(肌醇)	-	OX(氧化酶)	+

注: + / - 为 TSFN20070609-1 菌株阳性, TSFN20070609-2 阴性; - / + 为 TSFN20070609-1 菌株阴性, TSFN20070609-2 阳性。

Nte: + / - stand for TSFN20070609-1 strain positive, TSFN20070609-2 negative; - / + stand for TSFN20070609-1 strain negative, TSFN20070609-2 positive.

表2 病原菌的药敏试验结果

Table 2 Result of antibiotic sensitivity test

抗生素 Antibiotic	MC μg/cm ³	敏感度 Sensitivity	抗生素 Antibiotic	MC μg/cm ³	敏感度 Sensitivity
阿米卡星 Amikacin	8	敏感 Sensitive	氨苄西林 Ampicillin	> 16	耐药 Drug fast
氨曲南 Aztreonam	4	敏感 Sensitive	头孢吡肟 Cefepime	1	敏感 Sensitive
头孢噻肟 Cefotaxime	4	敏感 Sensitive	头孢西丁 Cefoxitin	4	敏感 Sensitive
头孢他啶 Ceftazidime	0.5	敏感 Sensitive	头孢曲松 Ceftriaxone	2	敏感 Sensitive
头孢呋辛 Cefuroxime	4	敏感 Sensitive	头孢拉定 Cefradine	4	敏感 Sensitive
加替沙星 Gatifloxacin	1	敏感 Sensitive	庆大霉素 Gentamicin	2	敏感 Sensitive
西胺培南(泰能) Tienam	1	敏感 Sensitive	左旋氧氟沙星 Levofloxacin	1	敏感 Sensitive
呋喃妥因 Nitrofurantoin	16	敏感 Sensitive	哌拉西林 Piperacillin	4	敏感 Sensitive
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/ Tazobactam	2/4	敏感 Sensitive	四环素 Tetracycline	2	敏感 Sensitive
妥布霉素 Tobramycin	2	敏感 Sensitive	复方磺胺 Compound sulfamethazole	> 2/ 38	耐药* Drug tolerance
				0.5/9.5	敏感* Sensitive

注: * TSFN20070609-1 菌株复方磺胺的药敏结果; * * TSFN20070609-2 菌株复方磺胺的药敏结果。

Nte: * antibiotic sensitivity result of TSFN20070609-1 strain against compound sulfamethazole; * * antibiotic sensitivity result of TSFN20070609-2 strain against compound sulfamethazole.

3 结论与讨论

(1) 根据病原菌菌落形态、生化特性和 16S rRNA 基因序列测定的结果表明, 所分离的病原菌为嗜水气单胞菌, 故认为嗜水气单胞菌是鲤鱼细菌性败血症的病原菌, 国内已有多例相关报道^[3-6]。

(2) 药敏试验结果显示, 从患病鲤鱼分离到 2 株嗜水气单胞菌对阿米卡星、氨曲南、头孢噻肟、头孢他啶、加替沙星等 15 种抗生素均敏感, 而对氨苄西林均耐药, 此结果有益于养殖场选择用药防治由该菌引起的感染症。

(3) 分离出的 2 株病原菌, 对供试的阿米卡星(丁胺卡那霉素)等 15 种抗生素均敏感, 说明上述药物可作为该养殖场的首选治疗药物; 对氨苄西林均耐药, 可能与其长期使用此药物有关; 对复方磺胺表现出了菌株的差异, 这是否与菌株各自的血清型有关, 有待进一步研究。

在淡水鱼生产养殖的实践中, 为提高防治效果, 应先从

患病鱼的肝、脾、肾等内脏分离出病原菌, 进行药敏试验; 然后结合病原菌分离、药敏试验的结果, 选用敏感药物, 确定其最低杀菌浓度; 再根据不同的药物, 确定药物的用量, 为防止细菌的耐药性产生, 应经常交替变换使用药物, 使药物防治鲤鱼细菌性败血症更加合理。

参考文献

- [1] 王春燕. 异育银鲫细菌性败血症病原体的微生物学诊断及毒力、药敏实验[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(5): 730-731.
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [3] 葛慕湘, 杨培培, 张文香, 等. 嗜水气单胞菌对鲤鱼血液指标的影响[J]. 河北渔业, 2006(1): 8-10.
- [4] 汪开毓. 鲤鱼细菌性败血症的病理学研究[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 257-262.
- [5] 钟妮娜, 汪开毓. 鲤鱼细菌性败血症及穿孔病病原菌与嗜水气单胞菌标准株特性的比较研究[J]. 四川农业大学学报, 2001, 19(1): 94-96.
- [6] 汪开毓, 冯泽光, 冯炳芳, 等. 鲤鱼嗜水气单胞菌病研究[J]. 鱼类病害研究, 1992, 14(1): 13-20.