

文章编号: 1000-0615(2018)01-0120-11

DOI: 10.11964/jfc.20161110616

中华鲟脑膜败血伊丽莎白菌的分离鉴定及药敏特性

邸军^{1,2}, 张书环², 黄君², 杜浩², 周勇², 危起伟^{1,2*}

(1. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223)

摘要: 为了确定中华鲟养殖基地一尾死亡子二代中华鲟的病原, 利用传统病原菌分离方法, 从濒死的中华鲟肝脏、脾脏和腹水中均分离到一株优势菌EM, 采用16S rDNA基因序列分析、构建系统发育树并结合Biolog微生物自动分析系统进行鉴定, 确定菌株EM为脑膜败血伊丽莎白菌。进一步对健康子二代达氏鲟进行人工感染试验确定其致病性; 同时通过观察患病子二代中华鲟组织切片分析其病理特征; 并对菌株EM进行药敏特性研究以期指导临床用药。结果显示, 被感染子二代中华鲟肝脏、脾脏及肾脏组织中铁血黄素沉积、实质性细胞空泡变性, 溶血严重。菌株EM人工感染健康子二代达氏鲟, 发现其对达氏鲟具有致病性, 且从人工感染患病的达氏鲟肝脏中再次分离到相同的病原菌。药物敏感性试验表明, 中华鲟脑膜败血伊丽莎白菌对米诺环素、克林霉素、克拉霉素和麦迪霉素4种药物敏感, 对四环素、头孢噻肟和头孢西汀3种药物中度敏感, 对其余28种药物不敏感, 呈多重耐药性。本研究首次发现脑膜败血伊丽莎白菌可感染中华鲟, 并对达氏鲟也具有致病性, 并初步研究了病原菌的生物学特性、病理特征和药物敏感性, 以期为该病的诊断和防治提供理论依据。

关键词: 中华鲟; 脑膜败血伊丽莎白菌; 分离鉴定; 药敏试验; 病理特征

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

脑膜败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)是一种人畜共患病的致病菌, 1959年King^[1]首次从脑膜炎婴儿患者脊髓液中分离得到, 并命名为脑膜炎败血黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)。1994年Vandamme等^[2]将其归为金黄杆菌属并命名为脑膜浓毒性金黄杆菌(*Chrysobacterium meningosepticum*)。2005年Kwang等^[3]基于16S rDNA基因序列的系统发育分析方法和多相分类方法将其从原有属中分化出来并建立新属即伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*), 命名为脑膜败血伊丽莎白菌, 伊丽莎白菌属包括脑膜败血伊丽莎白菌和米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*) 2个种。脑膜败血伊丽莎白菌广泛存在于淡水、盐水、土壤等自然环境中, 主要引起鱼、蛙、鳖等冷血动物败血症或局部感染, 同时也是人

的一种条件性致病菌^[4]。在水产养殖中该菌主要侵害蛙类, 而关于鱼类感染发病的报道较少^[5]。目前已有报道, 南非养殖的淡水莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[6]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[7]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[8]、芦鲢(*Erpetoichthys calabaricus*)及锦鲤(*Cyprinus carpio*)^[9]可感染脑膜败血伊丽莎白菌致病, 染病黄颡鱼和锦鲤主要表现为身体损伤、腹部充血、内脏部分器官出血等症状。

2015年5月, 荆州太湖中华鲟(*Acipenser sinensis*)养殖基地(简称中华鲟基地)养殖的一尾子二代中华鲟发病, 无菌条件下分离病原菌, 获得一株优势菌, 进一步通过16S rDNA基因序列分析、构建系统发育树并结合Biolog微生物自动分析系统对该菌进行分类鉴定。随后对健康子二

收稿日期: 2016-11-23 修回日期: 2017-04-25

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究计划(2015CB150702)

通信作者: 危起伟, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

代达氏鲟(*A. dabryanus*)进行腹鳍基部注射感染试验, 确定其致病性, 并进行组织病理学观察和药物敏感研究, 以期为该病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病子二代中华鲟来源于中华鲟养殖基地, 体质量32 kg, 全长163 cm。用于人工感染试验的健康子二代达氏鲟亦来自该养殖基地。由于达氏鲟为国家一级保护动物^[10], 因此选择数量相对较多的子二代幼鱼作为人工感染试验用鱼。子二代达氏鲟幼鱼平均体质量(25.1±3.1) g, 平均全长(20.0±0.8) cm, 养殖在直径为100 cm的塑料圆桶内, 水深约为50 cm, 水温22~26 °C, 溶解氧7.58 mg/L。每日投喂2次鲟鱼饲料, 暂养1周后开始感染试验。

1.2 病原菌的分离、培养和鉴定

用75%酒精对濒死子二代中华鲟进行体表消毒, 在超净工作台上无菌操作取肝脏、脾脏和腹水进行病原菌分离。病原菌接种于BHI (BD, Becto™ Brain Heart Infusion)琼脂培养基上进行分离培养, 28 °C培养箱中培养24 h后, 挑取单菌落在相同条件下进行二次划线培养, 于-80 °C甘油中保存, 菌株编号为EM。

将纯化的菌株EM接种于BHI液体培养基中, 28 °C摇床培养12 h, 离心收集菌体, 采用高盐法提取细菌基因组DNA^[11]。利用细菌通用引物扩增16S rDNA序列, PCR反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP (10 mmol/L)1 μL, Primers (F/R, 10 μmol/L)各1 μL, rTaq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 2 μL菌液, ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火40 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后对目的条带进行回收纯化, 于上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

将菌株EM 16S rDNA测得的序列通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析。检索出同源性较高的序列采用Clustal X进行多序列匹配排列(multiple alignments)。使用MEGA 5.05软件, 采用邻接法构建系统发育树, 并通过1000次的自举分析(Boostrapping)进行置信度检测。

1.3 形态学观察和Biolog微生物自动分析系统鉴定

取10 μL纯培养菌液滴于无菌的载玻片中央, 用接种环涂成均匀的薄层, 利用革兰氏染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司)进行染色, 在100倍油镜下观察细菌形态特征。

将BHI固体培养基纯培养的菌株EM接种于BUG鉴定平板上, 28 °C培养过夜, 待形成大小适宜的菌落时, 用无菌棉签蘸适量单菌落于IF-A接种液中, 充分摇匀, 使浊度仪读数为92%~98% T, 将混合液加入GEN III鉴定板中, 每孔100 μL, 将鉴定板放于Biolog系统中培养, 鉴定仪自动读取鉴定结果。

1.4 药物敏感试验

药敏试验采用纸片扩散法(K-B法), 药敏试纸购自杭州天和微生物试剂有限公司。取100 μL新鲜EM菌液(浓度约 7.7×10^8 cfu/mL)均匀涂布于BHI固体培养基上, 用灼烧后冷却的镊子将35种药敏纸片均匀置于培养基上, 每个平板7片。28 °C培养24 h后观察, 用游标卡尺测量抑菌圈直径, 根据美国临床实验室标准研究所出版的药敏试验指南^[13]的标准判定菌株对不同药物的敏感性。

1.5 人工感染试验

菌株EM单克隆接种于BHI液体培养液, 28 °C培养24 h, 3500 r/min离心20 min收集菌体, 所得菌体用无菌PBS离心洗涤3次, 使用分光光度法和菌落计数法测定并调节菌悬液浓度为 4.0×10^9 cfu/mL。由于中华鲟为极危物种, 因此选择亲缘关系最近的达氏鲟作为感染试验鱼^[12]。同时达氏鲟也属于濒危物种, 为了确定该菌株是否对鲟具有致病性, 仅选择15尾作为攻毒对象, 腹鳍基部注射15尾健康的子二代达氏鲟, 每尾注射200 μL菌悬液, 对照组注射相同剂量的无菌PBS。每天观察其发病症状并记录死亡情况, 连续观察1周。在达氏鲟出现濒死症状时取内脏组织进行病原菌的分离培养与鉴定, 以确定其致病性。

1.6 病理组织观察

取患病子二代中华鲟明显病变组织: 肝脏、脾脏、头肾及中肾组织用波恩氏液(Bouin's)固定, 样品经过石蜡包埋切片, H.E染色, 中性树脂封片处理, 用显微镜进行病理组织学观察并分析。由于中华鲟为极危物种, 无法解剖同

一年龄的健康中华鲟内脏组织作为对照, 本试验选择健康中华鲟幼鱼的病理切片作对照, 观察病理变化。

2 结果

2.1 患病子二代中华鲟病症和病原菌的分离

患病中华鲟临床症状主要表现为停止摄食、游动缓慢、腹部膨大, 伴有擦伤出血。显微镜镜检患病个体鳃、体表、鳍均未见寄生虫, 鳃外观淡红色。解剖发现肝脏肿胀、发黑, 脾脏萎缩、发黑呈弥散状, 肾脏发黑溃烂, 腹腔和鳔内积水严重, 肠道内无食物(图1)。

从病鱼肝脏、脾脏和腹水中均分离到一株细菌, 该菌在BHI固体培养基上生长良好, 经过28 °C培养24 h后形成大小为1~2 mm、光滑、圆形、隆起、有光泽的米黄色菌落。菌株经革兰氏染色后100倍油镜观察。结果显示, 该菌株为长短不一, 两端钝圆的革兰氏阴性杆菌(图2)。

2.2 16S rDNA序列分析及系统发育树的构建

测定菌株EM的16S rDNA序列, 获得1423 bp

的基因序列, 在GenBank中的登录序列号为KU613372。将该序列在NCBI数据库中进行序列同源性比对分析, 发现菌株EM与King^[1]从脑膜炎婴儿患者血液中分离的脑膜败血伊丽莎白菌(AJ704541、GQ360070、MH056770)同源性达到99%。从NCBI核酸数据库中选取黄杆菌属中的10个菌株和米尔伊丽莎白菌的16S rRNA基因序列进行系统发育树分析, 结果显示, 菌株EM与脑膜败血伊丽莎白菌(AJ704541、GQ360070、MH056770)聚为一支(图3), 表明菌株EM为脑膜败血伊丽莎白菌。

2.3 Biolog微生物分析仪对病原菌的鉴定

菌株EM经Biolog微生物分析仪鉴定, 结果显示为脑膜败血伊丽莎白菌的可能性为99.1%。各项参数为PROB=0.991, SIM=0.796, DIST=2.939(表1)。

2.4 药敏实验

药敏试验结果表明, 菌株EM对米诺环素、克林霉素、克拉霉素、麦迪霉素4种药物敏感;

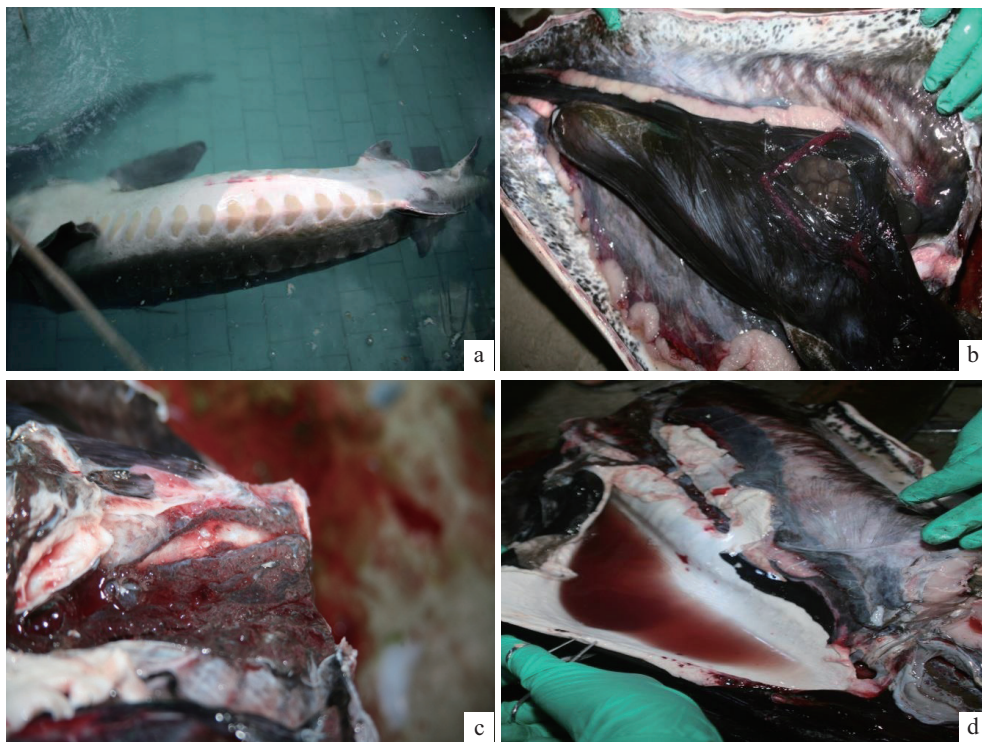


图1 患病子二代中华鲟

a. 腹部膨大; b. 脾脏发黑萎缩; c. 中肾发黑溃烂; d. 腹腔积液

Fig. 1 A sick F₂ *A. sinensis*

a. abdominal distention; b. dark and atrophy of spleen; c. posterior kidney dark and ulceration; d. accumulation of ascites in the abdomen

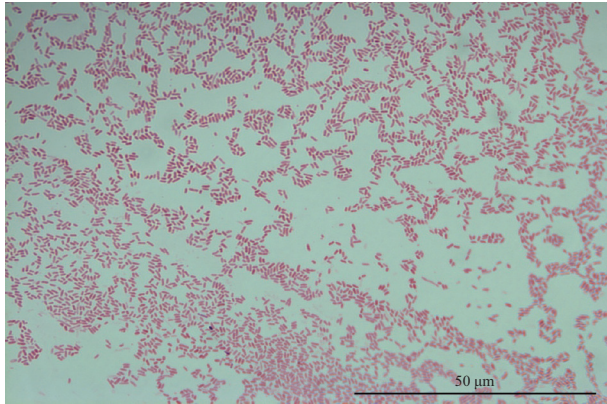


图 2 菌株EM革兰氏染色形态(×1000)

Fig. 2 The morphological characteristics of strain EM by Gram stain (×1000)

对四环素、头孢噻肟、头孢西汀3种药物中度敏感; 对庆大霉素、大观霉素、头孢曲松、多粘菌素B等28种药物不敏感(表2)。

2.5 人工感染试验

试验组达氏鲟在腹鳍基部接种感染初期, 表现为停止进食, 腹部贴于池底无力游泳, 18 h后出现死亡, 7 d内累计死亡率为20%, PBS对照组未出现死亡, 存活曲线结果见图4。说明该菌株对达氏鲟也具有一定的致病性。解剖死亡病鱼肝脏发黑、糜烂, 一触即破, 中肾发黑水肿, 肠道无食物(图5)。同时从感染死亡鱼体的肝脏内再次分离到脑膜败血伊丽莎白菌。

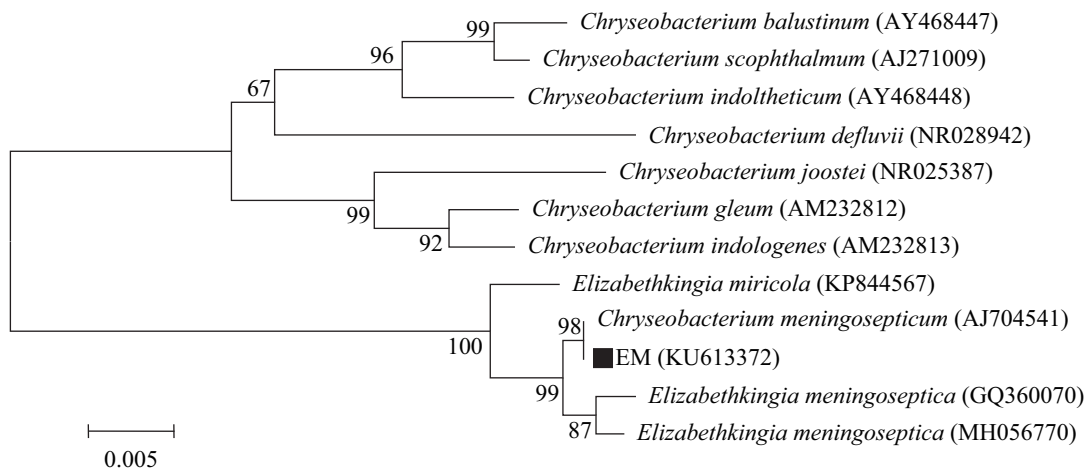


图 3 基于菌株EM 16S rRNA序列的系统发育树

黑色正方形表示分离株EM, 括号中为GenBank序列号

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of the strain EM

Black square refers to the isolated strain EM, numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank

表 1 Biolog鉴定结果

Tab. 1 Results of Biolog identification

反应项目 reaction item	结果 result	反应项目 reaction item	结果 result
阴性对照 negative control	N	α-D-葡萄糖 α-D-glucose	P
糊精 dextrin	P	D-甘露糖 D-mannose	P
D-麦芽糖 D-maltose	B	D-果糖 D-fructose	P
D-海藻糖 D-trehalose	P	D-半乳糖 D-galactose	N
D-纤维二糖 D-cellobiose	N	3-甲酰葡萄糖 3-methyl glucose	N
龙胆二糖 gentiobiose	P	D-岩藻糖 D-fucose	N
蔗糖 sucrose	N	L-岩藻糖 L-fucose	P
D-松二糖 D-turanose	N	L-鼠李糖 L-rhamnose	N
水苏糖 stachyose	N	肌苷 inosine	N

· 续表1 ·

反应项目 reaction item	结果 result	反应项目 reaction item	结果 result
阳性对照 positive control	P	1% 乳酸钠 1% sodium lactate	P
pH6	P	梭链孢酸 fusidic acid	N
pH5	P	D-丝氨酸 D-serine	P
蜜三糖 D-raffinose	N	D-山梨醇 D-sorbitol	N
α -D-乳糖 α -D-lactose	B	D-甘露醇 D-mannitol	P
D-蜜二糖 D-melibiose	N	D-阿拉伯醇 D-arabitol	N
β -甲基-D-葡糖苷 β -methyl-D-glucoside	N	肌醇 inositol	N
D-水杨苷 D-salicin	N	甘油 glycerol	B
N-乙酰-D-葡糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	P	D-葡糖-6-磷酸 D-glucose-6-phosphate	N
N-乙酰- β -D-甘露糖胺 N-acetyl- β -D-mannosamine	N	D-果糖-6-磷酸 D-fructose-6-phosphate	N
N-乙酰-D-半乳糖胺 N-acetyl-D-galactosamine	B	D-天冬氨酸 D-aspartic acid	N
N-乙酰神经氨酸 N-acetyl-neuraminic acid	N	D-丝氨酸 D-serine	N
1% NaCl	P	醋竹桃霉素 troleandomycin	N
4% NaCl	N	利福霉素SV rifamycin SV	P
8% NaCl	N	二甲胺四环素 minocycline	N
明胶 gelatin	P	β -羟基苯乙酸 β -hydroxy phenylacetic acid	N
氨基乙酰-L-脯氨酸 glycyl-L-prolin	P	丙酮酸甲酯 methyl pyruvate	N
L-丙氨酸 L-alanine	P	D-乳酸甲酯 D-lactic acid methyl ester	N
L-精氨酸 L-arginine	B	L-乳酸 L-lactic acid	N
L-天冬氨酸 L-aspartic acid	P	柠檬酸 citric acid	N
L-谷氨酸 L-glutamic acid	P	α -酮戊二酸 α -keto glutaric acid	N
L-组氨酸 L-histidine	N	D-苹果酸 D-malic-acid	N
L-焦谷氨酸 L-pyroglutamic acid	B	L-苹果酸 L-malic-acid	N
L-丝氨酸 D-serine	P	溴丁二酸 bromo succinic acid	N
林肯霉素, 洁霉素 lincomycin	P	萘啶酮酸 nalidixic acid	P
盐酸胍 guanidine hcl	P	氯化锂 lithium chloride	B
硫酸四癸钠 niaproof 4	N	亚碲酸钾 potassium tellurite	B
果胶 pectin	B	吐温40 tween 40	P
D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid	N	γ -氨基丁酸 γ -aminobutyric acid	B
L-半乳糖醛酸内酯 D-galactonic acid lactone	N	β -羟基丁酸 β -hydroxybutyric acid	B
D-葡糖酸 D-gluconic acid	N	β -羟基-D, L-丁酸 β -hydroxy-D, L-butyric acid	B
D-葡糖醛酸 D-glucuronic acid	P	α -酮丁酸 α -keto butyric acid	N
葡糖醛酰胺 glucuronamide	B	乙酰乙酸 acetoacetic acid	P
粘酸, 粘液酸 mucic acid	N	丙酸 propionic acid	N
奎宁酸 quinic acid	N	乙酸 acetic acid	P
糖质酸 D-saccharic acid	N	甲酸 formic acid	P
万古霉素 vancomycin	N	氨曲南 aztreonam	P
四唑紫 tetrazolium violet	P	丁酸钠 sodium butyrate	P
四唑蓝 tetrazolium blue	P	溴酸钠 sodium bromate	N

注: P表示阳性, N表示阴性, B表示临界值

Notes: P-positive, N-negative, B-borderline

表 2 菌株EM对药物敏感性试验结果

Tab. 2 Antibiotic susceptibility test of the strain EM

药物 antibiotics	药量/($\mu\text{g}/\text{片}$) concentration	标准抑菌圈直径/mm standard diameter of inhibited zone			试验抑菌圈直径/mm test diameter of inhibited zone	敏感程度 susceptibility
		R	I	S		
米诺环素 minocycline	30	≤ 12	13~15	≥ 16	27	S
克林霉素 clindamycin	2	≤ 14	15~20	≥ 21	26	S
克拉霉素 clarithromycin	15	≤ 13	14~17	≥ 18	21	S
麦迪霉素 midecamycin	30	≤ 13	14~17	≥ 18	20	S
四环素 tetracycline	30	≤ 11	12~14	≥ 15	13	I
头孢噻肟 cefotaxime	30	≤ 14	15~22	≥ 23	20	I
头孢西汀 cefoxitin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	16	I
万古霉素 vancomycin	30	≤ 14	15~16	≥ 17	14	R
头孢哌酮 cefobid	75	≤ 15	16~20	≥ 21	14	R
左氧沙星 levofloxacin	5	≤ 13	14~16	≥ 17	12	R
氧氟沙星 ofloxacin	5	≤ 12	13~16	≥ 17	12	R
头孢吡肟 cefepime	30	≤ 14	15~17	≥ 18	12	R
红霉素 erythromycin	15	≤ 13	14~22	≥ 23	12	R
氯霉素 chloramphenicol	30	≤ 12	13~17	≥ 18	12	R
哌拉西林 piperacillin	100	≤ 17	18~20	≥ 21	11	R
环丙沙星 ciprofloxacin	5	≤ 15	16~20	≥ 21	11	R
庆大霉素 gentamycin	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≤ 6	R
大观霉素 spectinomycin	100	≤ 14	15~17	≥ 18	≤ 6	R
头孢曲松 ceftriaxone	30	≤ 13	14~20	≥ 21	≤ 6	R
多粘菌素B polymyxin B	30	≤ 11		≥ 12	≤ 6	R
卡那霉素 kanamycin	30	≤ 13	14~17	≥ 18	≤ 6	R
氨曲南 aztreonam	30	≤ 15	16~21	≥ 22	≤ 6	R
妥布霉素 tobramycin	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≤ 6	R
链霉素 streptomycin	10	≤ 11	12~14	≥ 15	≤ 6	R
头孢唑啉 zinacef	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≤ 6	R
苯唑西林 oxacillin	1	≤ 10	11~12	≥ 13	≤ 6	R
呋喃妥因 nitrofurantoin	300	≤ 14	15~16	≥ 17	≤ 6	R
阿米卡星 amikacin	30	≤ 14	15~16	≥ 17	≤ 6	R
头孢唑啉 novaporin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≤ 6	R
头孢噻吩 cefalotin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≤ 6	R
青霉素 penicillin	10	≤ 28		≥ 29	≤ 6	R
诺氟沙星 norfloxacin	10	≤ 12	13~16	≥ 17	≤ 6	R
头孢他啶 fortum	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≤ 6	R
氨苄西林 ampicillin	10	≤ 13	14~16	≥ 17	≤ 6	R
复方新诺(SMZ/TMP) sulfamethoxazole	23.75/1.25	≤ 10	11~15	≥ 16	≤ 6	R

注: S表示敏感; I表示中度敏感; R表示低度敏感或不敏感

Notes: S-denoted highly sensitive; I-denoted moderately sensitive; R-denoted low or no sensitivity

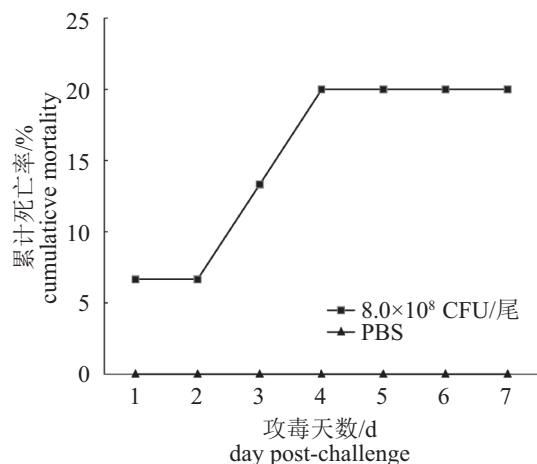


图4 菌株EM的人工感染试验结果

Fig. 4 Artificial infection results of the strain EM



图5 感染组对照组达氏鲢

a. 感染组达氏鲢; b. 对照组达氏鲢

Fig. 5 Infected and control group *A. dabryanus*

a. infected group *A. dabryanus*; b. control group *A. dabryanus*

2.6 病理组织观察

患病子二代中华鲟的组织病理学观察结果表明, 肝组织发生弥散性病变, 肝索、肝窦、肝小叶结构消失, 肝细胞排列紊乱, 呈明显的空泡变性, 组织中大范围铁血黄素沉积, 说明溶血严重(图6-a)。脾脏组织严重坏死, 红髓和白髓结构破坏, 部分脾细胞空泡变性, 组织中少量铁血黄素沉积(图6-b)。头肾细胞排列紊乱, 淋巴细胞广泛浸润, 组织中部分细胞空泡变性, 大量铁血黄素沉积(图6-c)。中肾组织广泛水肿, 肾小管、肾小球结构消失, 组织广泛淋巴细胞浸润, 部分细胞气球样变, 组织中大量铁血黄素沉积, 溶血严重(图6-d)。

3 讨论

中华鲟为溯河洄游性鱼类, 是国家一级保

护动物^[14]。近年来由于过度捕捞、水利工程建设和环境污染等人类活动的干扰, 自然种群数量急剧下降^[14-15], 而人工养殖群体已经成为物种延续的最为重要的途径。20世纪90年代初仅进行了人工种群的零星蓄养, 直到1997年中华鲟苗种规模化培育技术取得突破以后, 人工种群蓄养形成一定的规模。2012年长江水产研究所实现了中华鲟全人工繁殖, 对中华鲟大规模增殖放流活动的开展和物种的延续具有重要意义^[16]。然而在中华鲟人工养殖的过程中, 存在养殖密度大、人工饵料营养不平衡、饵料中致病性细菌等影响因素, 人工养殖中华鲟极易患细菌性疾病^[17]。由于中华鲟人工养殖历史较短, 对其细菌性病害的研究报道较少^[18], 目前已报道的中华鲟细菌性疾病有细菌性烂鳃病^[19]、胃充气并发综合征^[20]、结核病^[21]等。感染的细菌种类包括气单胞菌^[19] (*Aeromonas* sp.)、非结核分枝杆菌^[20] (*Nontuberculous mycobacteria*, NTM)、产碱假单胞菌^[21] (*Pseudomonas alcaligenes*)等, 尚未有关于鲟感染脑膜败血伊丽莎白菌致病的报道。本实验从患病的子二代中华鲟的肝脏、脾脏和腹水中均分离到一株革兰氏阴性短杆菌。由于中华鲟为极危物种, 人工感染试验采用与其亲缘关系最近的达氏鲟作为试验对象, 用菌株EM人工感染健康子二代达氏鲟, 可复制出与中华鲟自然发病相似的症状, 死亡率为20%, 且从人工感染患病的达氏鲟肝脏中再次分离到相同的病原菌, 证实该菌对达氏鲟也具有致病性。进一步经过16S rDNA基因序列分析、构建系统发育树和Biolog微生物自动分析, 确定菌株EM为脑膜败血伊丽莎白菌。

本实验子二代中华鲟感染脑膜败血伊丽莎白菌与牛蛙^[22]感染该菌后发病的临床症状相似, 均表现为肝脏发黑、肿大, 脾脏萎缩, 身体局部有出血点和血斑。同样有研究表明, 脑膜败血伊丽莎白菌感染非洲冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)^[23]后会出现脂肪体发黑病变等症状, 并对非洲冈比亚按蚊具有较高的致病性, 能从卵到幼虫进行垂直传播。但是, 本实验分离的脑膜败血伊丽莎白菌对达氏鲟致病性较低, 7 d内累计死亡率为20%, 可能因宿主种类及环境条件不同, 细菌毒力也相应地发生变化^[24]。进一步对患病子二代中华鲟组织病理分析, 发现肝脏、脾脏和肾脏组织严重坏死、细胞空泡变性、组织中铁血黄素沉积, 溶血严重。以上病征表

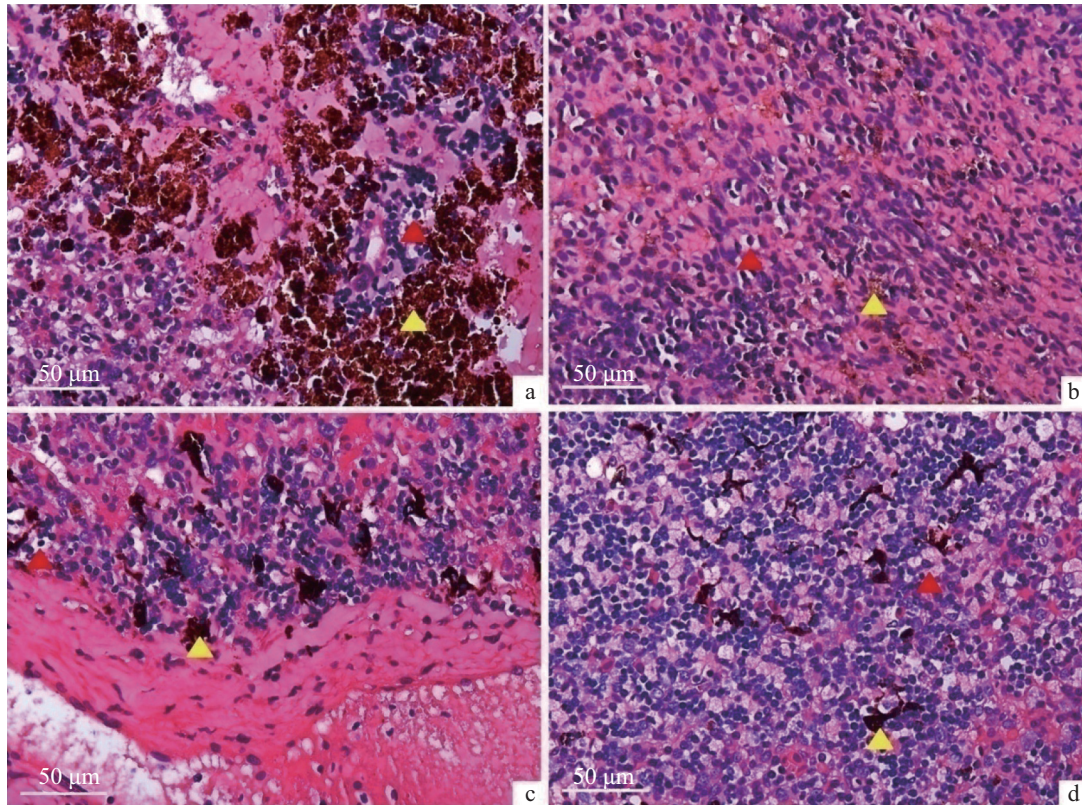


图 6 菌株EM感染中华鲟子二代的病理组织学观察(H.E×400)

a. 肝脏; b. 脾脏; c. 头肾; d. 中肾, 红色三角形表示实质性细胞空泡变性, 黄色三角形表示组织中含铁血黄素沉积

Fig. 6 The pathohistological observation of F₂ generation *A. sinensis* infected strain EM (H.E×400)

a. liver; b. spleen; c. head kidney; d. posterior kidney, red triangle indicates ballooning degeneration of cells, yellow triangle indicates hemosiderin deposition of tissue

明, 脑膜败血伊丽莎白菌感染后对鱼体肝脏、脾脏和肾脏组织细胞损害严重, 致使器官功能发生障碍, 这可能是引起病鱼死亡的主要原因。

药敏试验结果表明, 35种药物中脑膜败血伊丽莎白菌对米诺环素、克林霉素、克拉霉素、麦迪霉素4种药物敏感, 但对大多数头孢类、氨基糖苷类、喹诺酮类等抗生素均不敏感, 表现出多重耐药性。此结果与从黄颡鱼中分离的脑膜败血伊丽莎白菌药敏特性存在较大差异^[8]; 与虎纹蛙(*Rana tigerina rugulosa*)中分离的脑膜败血伊丽莎白菌的药敏特性不同, 20种药物中只对万古霉素敏感, 对头孢哌酮中度敏感, 对其余18种药物不敏感^[25]; 与临床样品中分离的脑膜败血伊丽莎白菌药敏性也不相同, 其对利福平、克林霉素、万古霉素、复方新诺明、头孢西叮、磺胺甲基异恶唑6种药物敏感^[26]。中华鲟脑膜败血伊丽莎白菌与不同动物来源的脑膜败血伊丽莎白菌药敏特性不相同, 这些差

异可能与生物体所处的环境, 以及药物滥用导致菌株发生耐药性相关。实验发现米诺环素、克林霉素对脑膜败血伊丽莎白菌具有明显的抑制作用, 可作为防治鲟发生该病的选择用药。同时, 在实际生产中要科学地使用敏感性抗菌药物进行治疗, 预防耐药性菌株的产生, 同时积极改善养殖水体环境, 增强鱼体抵抗力。

脑膜败血伊丽莎白菌也是人类重要的病原菌, 可引起人类患心内膜炎、浓毒性关节炎及败血症等疾病。尤为重要的是该菌对多种抗菌药物耐药, 并且可能通过鱼体和水体传播给免疫力低下的渔业工作者和消费者^[27]。这提示中华鲟脑膜败血伊丽莎白菌对人类健康也存在威胁。目前关于脑膜败血伊丽莎白菌多重耐药机制的研究在临床上报道较多, 主要与生物被膜、外排泵和β-内酰胺酶的产生相关^[28], 而有关水生生物来源的报道相对较少, 水生生物来源的脑膜败血伊丽莎白菌多重耐药性菌株的产生

和传播机制有待进一步研究。因此,深入研究中华鲟脑膜败血伊丽莎白菌对中华鲟物种保护、鲟养殖业和人类自身健康有着重要的意义。

参考文献:

- [1] King E O. Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1959, 31(3): 241-247.
- [2] Vandamme P, Bernardet J F, Segers P, *et al.* New perspectives in the classification of the Flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(4): 827-831.
- [3] Kwang K K, Myung K K, Ju H L, *et al.* Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1287-1293.
- [4] Loch T P, Fujimoto M, Woodiga S A, *et al.* Diversity of fish-associated Flavobacteria of Michigan[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2013, 25(3): 149-164.
- [5] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- Fang H, Chen C Z, Zhang X J. Aquacultural Animal Pathogenic Bacteriology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009 (in Chinese).
- [6] Jacobs A, Chenia H Y. Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromis mossambicus*[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2011, 10: 16.
- [7] 黄志坚, 何建国. 鳊鱼细菌病原的生长和生理特性的研究[J]. 淡水渔业, 2000, 30(2): 35-36.
- Huang Z J, He J G. Growth and physiological characteristics of pathogenic bacterium in *Siniperca chuatsi*[J]. Freshwater Fisheries, 2000, 30(2): 35-36(in Chinese).
- [8] 周煜华, 何成伟. 黄颡鱼脑膜炎脓毒性黄杆菌的分离和鉴定[J]. 广西畜牧兽医, 1998, 14(3): 5-7.
- Zhou Y H, He C W. Isolation and identification of pathogenic bacterium *Flavobacterium meningosepticum* from Yellow eel[J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1998, 14(3): 5-7(in Chinese).
- [9] Bernardet J F, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, *et al.* Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(7): 640-660.
- [10] Zhang H, Wei Q W, Du H, *et al.* Present status and risk for extinction of the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in the Yangtze River watershed: a concern for intensified rehabilitation needs[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2): 181-185.
- [11] Aljanabi S, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [12] Krieger J, Hett A K, Fuerst P A, *et al.* The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2008, 24(S1): 36-45.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 26th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [14] Wang J H, Wei Q W, Zou Y C. Conservation strategies for the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2): 176-180.
- [15] Wei Q, He J, Yang D, *et al.* Status of sturgeon aquaculture and sturgeon trade in China: a review based on two recent nationwide surveys[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2004, 20(5): 321-332.
- [16] 危起伟, 李罗新, 杜浩, 等. 中华鲟全人工繁殖技术研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 1-11.
- Wei Q W, Li L X, Du H, *et al.* Research on technology for controlled propagation of cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 1-11(in Chinese).
- [17] 张艳珍, 张晓雁, 王彦鹏. 养殖中华鲟四种天然饵料的细菌分布及灭菌效果[J]. 淡水渔业, 2014, 44(3): 90-94.
- Zhang Y Z, Zhang X Y, Wang Y P. The bacteria distribution and sterilization effect of four kinds of natural baits for cultured *Acipenser sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2014, 44(3): 90-94(in Chinese).
- [18] 朱永久, 危起伟, 杨德国, 等. 中华鲟常见病害及其防治[J]. 淡水渔业, 2005, 35(6): 47-50.
- Zhu Y J, Wei Q W, Yang D G, *et al.* The main diseases

- and their control of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2005, 35(6): 47-50(in Chinese).
- [19] 潘连德, 刘健, 陈锦辉, 等. 中华鲟细菌性烂鳃病和胃充气并发症的临床诊断和控制[J]. *水产科技情报*, 2008, 35(5): 258-260.
- Pan L D, Liu J, Chen J H, *et al.* Clinical symptoms and control of complication of gill-rot disease and cramfull air in stomach[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2008, 35(5): 258-260(in Chinese).
- [20] Zhang D F, Cheng J, Zhang X J, *et al.* Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(8): 1941-1923.
- [21] Xu J, Zeng X H, Jiang N, *et al.* *Pseudomonas alcaligenes* infection and mortality in cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 37-41.
- [22] 陈耀明, 胡永强, 周以凤, 等. 牛蛙脑膜炎脓毒性黄杆菌病[J]. *水产科技情报*, 1994, 21(1): 11-12.
- Zhang Y M, Hu Y Q, Zhou Y F, *et al.* *Flavobacterium meningosepticum* diseases of RANA catesbiana[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1994, 21(1): 11-12(in Chinese).
- [23] Akhouayri I G, Habtewold T, Christophides G K. Melanotic pathology and vertical transmission of the gut commensal *Elizabethkingia meningoseptica* in the major malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77619.
- [24] 刘利, 胡勇. 细菌毒力基因的筛选技术研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(12): 1786-1788.
- Liu L, Hu Y. Research progress on filtration technologies of bacterial virulence gene[J]. *Medical Recapitulate*, 2011, 17(12): 1786-1788(in Chinese).
- [25] Xie Z Y, Zhou Y C, Wang S F, *et al.* First isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from cultured tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 138(1-2): 140-144.
- [26] Aber R C, Wennersten C, Moellering R C J. Antimicrobial susceptibility of flavobacteria[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1978, 14(3): 483-487.
- [27] Michel C, Matte-Tailliez O, Kerouault B, *et al.* Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 323-332.
- [28] Khan I D, Lall M, Sen S, *et al.* Multiresistant *Elizabethkingia meningoseptica* infections in tertiary care[J]. *Medical Journal Armed Forces India*, 2015, 71(3): 282-286.

Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Elizabethkingia meningoseptica* from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)

DI Jun^{1,2}, ZHANG Shuhuan², HUANG Jun², DU Hao², ZHOU Yong², WEI Qiwei^{1,2*}

(1. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China;

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract: To define the potential pathogens from a dead F₂ Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), which was reared in Taihu hatchery, a Chinese sturgeon breeding site located in Jingzhou City of Hubei Province, China, a bacterial strain EM was isolated from the liver, spleen and ascites of moribund F₂ Chinese sturgeon by traditional method of pathogen isolation. The strain EM was identified as *Elizabethkingia meningoseptica* by means of the 16S rDNA sequence, constructing phylogenetic tree and Biolog Microbial Identification System. The pathogenicity of the strain EM was confirmed by the infection experiment in healthy F₂ Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). Meanwhile, histopathological analysis was performed in the sick F₂ Chinese sturgeon, and the antibiotic susceptibility test of the strain EM was carried out to guide the clinical medication. The results found the hemosiderin deposition, ballooning degeneration and hemolysis severely in liver, spleen and kidney of the sick F₂ Chinese sturgeon. The strain EM was confirmed to be pathogenic to healthy Dabry's sturgeon by infection experiment, and the same bacterium could be recovered from these infected Dabry's sturgeon. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the strain EM from sick Chinese sturgeon was susceptible to minocycline, clindamycin, clarithromycin and midecamycin; medium susceptible to tetracycline, cefotaxime and cefoxitin, but resistant to other 28 kinds of antibiotics, which implied EM strain was resistant to multiple antibiotics. In short, the study reported for the first time that Chinese sturgeon could be infected by *Elizabethkingia meningoseptica*, which was also pathogenic to Dabry's sturgeon. Preliminary study on biological characteristics, antibiotic susceptibility of *Elizabethkingia meningoseptica*, histopathological features of diseased F₂ Chinese sturgeon, may provide a theory basis for the diagnosis, prevention and treatment of this disease.

Key words: *Acipenser sinensis*; *Elizabethkingia meningoseptica*; isolation and identification; antibiotic susceptibility test; histopathological features

Corresponding author: WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

Funding projects: National Basic Research Project of China (973 Program) (2015CB150702)