

中华鳖台湾群体耶尔森氏菌病的研究

蔡完其 孙佩芳 官兴文

(农业部水产增殖生态、生理重点实验室, 上海水产大学, 200090)

摘 要 从中华鳖台湾群体病鳖的肝脏分离到菌株 97-7-2C、97-9-2A', 用这两种菌株人工感染 10~ 15g 稚鳖, 发病率和死亡率均为 100%。经菌体形态特征、培养特性和生理生化反应测定, 鉴定 97-7-2C 为小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*), 97-9-2A' 为假结核耶尔森氏菌 (*Y. pseudotuberculosis*), 这两种菌都会引起鳖败血症。肝、肾及肠等脏器的病变明显, 肠的病变最为严重。20 种药物敏感性试验结果表明, 小肠结肠炎耶尔森氏菌对庆大霉素和甲氧苄氨嘧啶敏感, 假结核耶尔森氏菌对甲氧苄氨嘧啶和呋喃妥因敏感。

关键词 中华鳖, 台湾群体, 小肠结肠炎耶尔森氏菌, 假结核耶尔森氏菌, 败血症, 药敏试验

随着养鳖业的迅速发展, 苗种的缺乏已成为影响养鳖业发展的突出问题。近二、三年来, 福建、广东、江西、浙江、江苏及上海等省市, 从我国台湾省大量购入鳖苗。由于缺乏检疫, 病害乘虚而入, 来势凶猛, 使不少养鳖场遭受较大损失。笔者对上海两家养鳖场的台湾群体病鳖进行病原分离、鉴定、病理研究及药物筛选, 研制有效的防治方法, 使疾病得到了控制, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料来源

病鳖来自上海郊县两家养鳖场, 体重 10~ 15g。健康鳖来自上海松江百鸟养鳖场, 稚鳖体重 10~ 15g, 在水温为 28℃ 的水族箱内饲养一周备用。

1.2 方法

1.2.1 病原分离

在无菌操作下, 用 75% 酒精棉球擦拭病鳖体表, 打开腹腔, 取肝脏少许, 经无菌水漂洗后于营养琼脂平板划线分离, 28℃ 恒温培养 48h, 待平板上长出形态一致的优势菌落, 选挑单个菌落再次划线分离, 直至获得纯培养的 97-7-2C、97-9-2A' 两菌株, 转接到营养琼脂斜面。

1.2.2 人工感染试验

将 97-7-2C、97-9-2A' 两菌株分别接种于新鲜营养琼脂斜面, 28℃ 恒温培养 24h。用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液, 以 MCF3 号管测得各菌株菌液浓度为 9×10^8 CFU/mL。稚鳖感

染试验是取健康稚鳖 6 只, 腹腔注射上述两菌株的菌悬液各 3 只, 剂量各为 0. 1mL; 对照组 2 只, 各注射生理盐水 0. 1mL。

1. 2. 3 病原菌的分类鉴定

按中国科学院微生物研究所细菌分类组 [1978] 及 Bercovier 和 Mollaret [1984] 等方法进行。所有生化试验接种后均于 28℃ 恒温培养, 三天内检查。氨基酸脱羧酶和精氨酸双水解酶试验, 观察 7 天。

1. 2. 4 组织切片制备

在上海郊县两家养鳖场分别取发病鳖 5 只和 4 只。上海松江百鸟养鳖场取健康鳖 2 只。分别取肝、肾、肺、心、脾及肠等各脏器组织, 用葡翁氏液固定, 石蜡切片, 厚度 5~ 6 μm, 苏木精-伊红染色(H-E)。肝组织还用 10% 福尔马林固定, 冰冻切片, 苏丹 III 染色以显示脂肪。

1. 2. 5 药物敏感性试验

采用纸片扩散法[何长民 1981] 作药敏试验。含药纸片由中国腹泻病控制上海试验研究中心提供。取庆大霉素、复方新诺明、呋喃唑酮、氟哌酸、萘啶酸、氯霉素、洁霉素、氯洁霉素、氟嗟酸、氨苄青霉素、呋喃妥因、环丙沙星、红霉素、甲氧苄氨嘧啶、强力霉素、链霉素、四环素、卡那霉素、利福平及吡哌酸, 共 20 种药物纸片, 每种药两个重复。根据该中心的药敏试验判断标准书, 确定病原菌对不同药物的敏感程度。

2 结果

2. 1 分离菌株的致病性

健康稚鳖经 97-7-2C, 97-9-2A' 两菌株感染后, 都于第二天和第三天起发病, 发病率为 100%, 第六天起死亡, 死亡率为 100%。

发病鳖的症状与自然病鳖的症状基本一致。发病初期, 鳖精神不振, 行动迟缓, 食欲明显下降。随着病情发展, 背甲皮肤溃烂, 呈白色斑块, 腹甲由发红至发白, 剖检可见肝脏明显肿大并有出血点, 心脏发白, 肠呈紫红色, 有的肠腔内有紫色血块。整个腹腔充满恶臭味, 有的腹腔内积有腹水。又对从感染病鳖肝脏分离到的菌株作菌体形态特征、培养特性及生理生化反应测定, 结果与原分离菌株的相同。试验期间对照组鳖均健康活泼, 无任何症状。由此证明 97-7-2C 和 97-9-2A' 两菌株均为鳖耶尔森氏菌病的致病菌。

2. 2 病原的分类鉴定

2. 2. 1 培养特性

分离菌株经 28℃ 恒温培养 24h, 在营养琼脂平板上形成肉眼难以看清的小菌落, 培养 48h 后, 菌落直径增至 1. 0~ 2. 0mm, 圆形, 中心略隆起, 表面光滑, 半透明。在营养肉汤培养基中, 经 48h 培养所产生的混浊度与其他肠杆菌科的菌培养 18h 的混浊度相当。在 S. S. 培养基上, 经 48h 培养能长出少量针点状菌落。

2. 2. 2 菌体形态

革兰氏阴性球杆菌, 无芽孢, 无荚膜, 周生鞭毛, 30℃ 以下能运动, 37℃ 不运动。多以 4 个或 5 个细胞连成短链(特别在液体培养基中)或单个分散排列。

2.2.3 生理生化反应

两菌株均为化能异养型,行呼吸和发酵代谢。氧化酶阴性,接触酶阳性。发酵葡萄糖产酸不产气或极微量产气。能还原硝酸盐成亚硝酸盐。不利用柠檬酸盐(Simmon's),不产生H₂S(TSI),明胶酶和苯丙氨酸脱氨酶阴性。糖发酵和氨基酸脱羧酶等的反应结果详见表1。

表1 97-7-2C、97-9-2A' 两菌株的生理生化特性及其同小肠结肠炎耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌的比较

Tab.1 Physio-biochemical characteristics of 97-7-2C、97-9-2A' strains as well as comparison with the *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*

鉴定项目	菌名			
	97-7-2c	小肠结肠炎耶尔森氏菌	97-9-2A'	假结核耶尔森氏菌
接触酶	+	+	+	+
氧化酶	-	-	-	-
V.P	-	+(25℃)-(37℃)	-	-
靛基质	-	d	-	-
柠檬酸盐(simmon's)	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	+
脲酶	w	+	w	+
明胶液化	-	-	-	-
葡萄糖氧化发酵(O/F)	O/F	O/F	O/F	O/F
葡萄糖产气	-	v和w	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+
从下列碳水化合物产酸				
麦芽糖	+	+	+	+
蔗糖	+	+	-	-
乳糖	+	d	-	-
海藻糖	+	+	+	+
纤维二糖	w	+	+	-
阿拉伯糖	-	d	-	d
鼠李糖	-	-	-	+
甘露醇	+	+	w	+
山梨醇	-	+	-	-
水杨苷	-	v	+	d
七叶苷水解	-	d	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-
H ₂ S产生(TSI)	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	+	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	-
S.S.上生长	+	+	+	+

注:假结核耶尔森氏菌数据来源于 Bercovier 和 Mollaret [1984]。+ 阳性或产酸, - 阴性, d, v, 不定, w 阳性反应很弱。

综上所述,根据两菌株的形态特征、培养特性和生理生化反应鉴定结果,97-7-2C、97-9-2A' 两菌株分别同 Bercovier 和 Mollaret [1984] 对小肠结肠炎耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌的描述基本一致。故可确定97-7-2C 菌株为小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);97-9-2A' 菌株为假结核耶尔森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*)。

2.3 组织病理观察

两家养鳖场病鳖的组织病理变化基本一致。主要表现为各脏器出血,呈败血症,肝、肾及肠等脏器病变明显,肠病变最为严重。

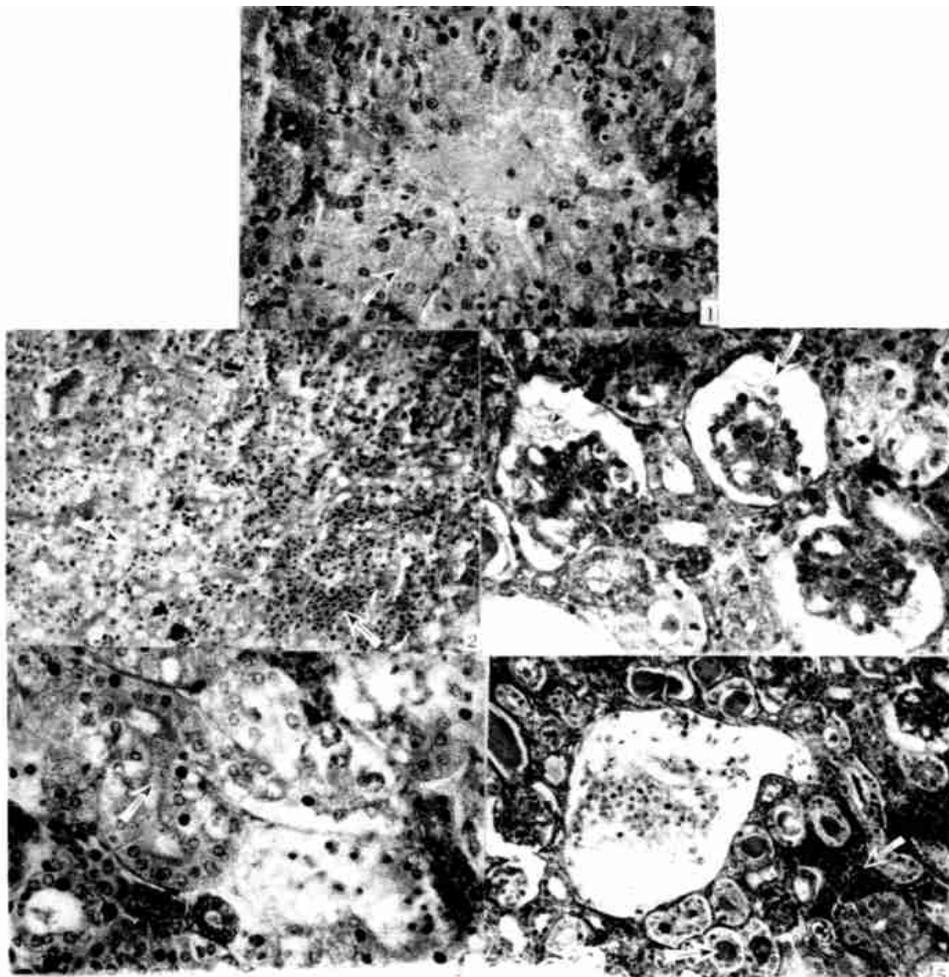
2.3.1 肝

肝细胞混浊肿胀,部分坏死及解体,肝组织呈局部坏死灶(图版iv-1)。更为严重的,肝出

血, 肝细胞脂肪变性, 苏丹 IV 染色显示阳性, 大量坏死和解体, 肝组织呈弥漫性坏死(图版 iv-2)。

2.3.2 肾

肾小球肿大, 内有嗜伊红的浆液渗出物和嗜中性白细胞(图版 iv-3)。肾小管上皮细胞混浊肿胀、坏死、解体(图版 iv-4)。同时, 坏死脱落的上皮细胞、蛋白及红细胞在肾小管管腔内凝集, 形成各种管型(图版 iv-4, 5)。肾出血, 肾小管之间有大量红细胞(图版 iv-5)。



图版 iv Plate iv

1. 肝细胞混浊肿胀, 肝组织呈局部坏死灶(横切, $\times 1\ 008$); 2. 肝出血, 肝细胞脂肪变性, 肝组织呈弥漫性坏死(H-E 染色, 横切, $\times 504$); 3. 肾小球内有嗜伊红的浆液渗出物和嗜中性白细胞(横切, $\times 504$); 4. 肾小管上皮细胞坏死, 管腔中有坏死脱落的上皮细胞(横切, $\times 2\ 250$); 5. 肾小管之间有大量红细胞; 管腔中有蛋白、红细胞凝集, 形成各种管型(横切, $\times 504$)

2.3.3 肠

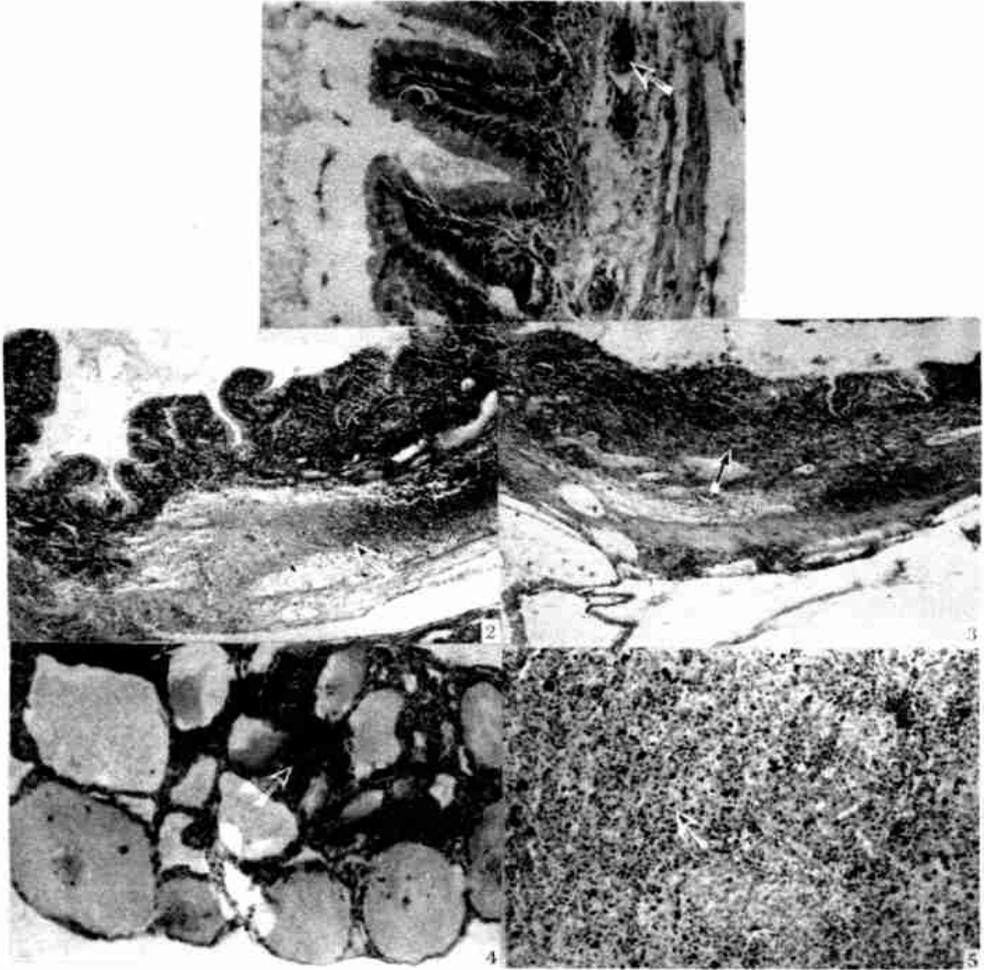
发病初期肠上皮细胞肿胀, 细胞各结构清晰可辨。粘膜下层血管充血。肠腔内有红细胞和纤维素样物质(图版 III 1)。随着病情的发展, 肠上皮由部分脱落到几乎完全脱落, 肠出血, 粘膜下层积有大量红细胞, 肌层也有红细胞。肠腔内有许多红细胞和脱落的肠上皮(图版 III 2、3)。

2.3.4 卵巢

卵巢出血, 卵细胞间有大量红细胞(图版 ④4)。

2.3.5 脾

脾红髓内积有大量红细胞, 白髓明显缩小。(图版 ④5)。



图版 ④ Plate ④

1. 肠粘膜下层血管充血, 肠腔内有红细胞和纤维素样物质(横切, × 504); 2. 肠出血、溶血, 部分上皮细胞坏死、脱落(横切, × 504); 3. 肠严重出血, 上皮细胞几乎完全坏死、脱落(横切 × 504); 4. 卵细胞间有大量红细胞(横切, × 1 008); 5. 脾红髓内积有大量红细胞, 白髓明显缩小(横切, × 504)

2.4 药物敏感性试验

纸片扩散法对 97-7-2C 菌株作药敏试验结果: 庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶敏感; 氟喹酸、环丙沙星中敏; 氯霉素、强力霉素、卡那霉素耐药, 其余 13 种药无作用。对 97-9-2A' 菌株药敏试验结果: 甲氧苄氨嘧啶、呋喃妥因敏感; 红霉素、强力霉素中敏; 庆大霉素、氨苄青霉素、四环素、卡那霉素耐药; 其余 12 种药物无作用。

3 讨论

3.1 97-7-2C、97-9-2A' 菌株的致病性

在人工感染试验中, 97-7-2C 和 97-9-2A' 两菌株表现出的毒力极强, 使健康稚鳖患病、死亡。从其肝脏分离到的菌株的各种特性均与原分离菌株相同, 证明 97-7-2C 和 97-9-2A' 两菌株为鳖耶尔森氏菌病的致病菌。该病对中华鳖台湾群体的稚鳖的危害要比对幼鳖的危害大得多。在本试验过程中, 作者还用上述菌株对 80~100g 左右的中华鳖台湾群体作人工感染试验, 菌液浓度为 9×10^8 CFU/mL, 注射剂量为 0.3mL 和 0.4mL, 也同样致病, 但发病比稚鳖缓慢, 第 7 天开始出现症状, 第 10 天才开始出现死亡。这表明, 随着鳖个体的长大, 对该病的致病性减弱。但是, 如果在稚鳖阶段对该病不能彻底治愈, 则在鳖的整个生长过程中, 该病不断反复出现, 影响中华鳖台湾群体的成活率。

3.2 鳖患耶尔森氏菌病的可能性

小肠结肠炎耶尔森氏菌在世界上遍及五大洲, 已有 70 多个国家报道过由此菌引起的疾病。该菌广泛存在于自然界, 以人和动物的粪便、食品和水为多见。我国 1980 年从猪分离到该菌, 1981 年又从腹泻病人粪便中分离到, 以后又从鼠类和污水中分离到该菌[李振林等 1993]。1996 年, 陈信忠等从中华鳖台湾群体幼鳖分离到小肠结肠炎耶尔森氏菌[陈信忠等 1996], 其幼鳖发病症状和本文描述相似。

假结核耶尔森氏菌最初报道是引起啮齿动物的疾病, 也传染给人, 引起人的疾病[李振林 1993]。本文发现该菌也是鳖的致病菌, 在水生动物为首次发现。

上述两菌均能引起人、鳖共患的疾病, 这是继作者首次发现中华鳖脑膜炎败血性黄杆菌病是人、鳖共患病后发现的又一人、鳖共患病原。养殖者和食鳖者必须予以高度重视。

3.3 组织病理变化的探讨

作者经组织病理切片观察, 由上述两菌引起耶尔森氏菌病的病理变化基本一致, 各脏器出血, 终以败血症而死亡。作者曾对鳖赤斑病[Cai 1991]、中华鳖爱德华氏菌病[蔡完其等 1997a]、中华鳖脑膜炎败血性黄杆菌病[蔡完其等 1997b]、中华鳖穿孔病[蔡完其和赵金良 1998]等病的病理作过观察, 也均以败血症而死亡。出血症状主要表现在各实质器官, 而耶尔森氏菌病除了肝、肾、脾等实质器官表现损伤、出血症状外, 突出地表现为典型的肠出血、坏死。肠腔内积有紫色血块。这可能与小肠结肠炎耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌对动物感染通常通过口腔途径感染有关[Berocovier 和 Mollaret 1984], 有待进一步探讨。

3.4 中华鳖台湾群体耶尔森氏菌病的防治

通过对 20 种药物的药敏试验, 发现庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶及呋喃妥因对中华鳖耶尔森氏菌病有一定疗效。当然, 防治该病的根本办法还在于杜绝病原, 这就要加强养殖管理, 净化水质, 保持良好的生长环境, 经常泼洒生石灰; 同时, 要加强检疫, 勿使病原带进养鳖场。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社. 88~ 89, 135~ 191
- 何长民(主编). 1981. 药用微生物试验技术. 兰州: 甘肃人民出版社. 288~ 292
- 李振林(主编). 1993. 微生物学及检验技术. 广州: 广东科技出版社. 185~ 188
- 陈信忠, 黄印尧, 林炳玲. 1996. 幼鳖小肠结肠炎耶尔森氏菌病诊治报告. 科学养鱼, 1: 25~ 26
- 蔡完其, 孙佩芳, 刘治至. 1997a. 中华鳖爱德华氏菌病病原和组织病理研究. 水产学报, 21(4): 428~ 433
- 蔡完其, 孙佩芳, 朱泽闻等. 1997b. 中华鳖脑膜炎败血性黄杆菌病的研究. 水产科技情报, 24(4): 156~ 163
- 蔡完其, 赵金良. 1998. 中华鳖穿孔病病理研究. 中国水产科学, 5(4): 19~ 22
- Berocovier H, Mollaret H H. 1984. Genus *Yersinia*. In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology (Ed. by J. G. Holt). Williams & Wilkine, Baltimore. 1: 498~ 506
- Cai Wanqi. 1991. Pathology of red-spot disease of soft-shelled turtles. Asian Fisheries Science. 4: 156~ 163

STUDIES ON THE DISEASE OF *YERSINIA* IN THE TAIWAN POPULATION OF *TRIONYX SINENSE*

CAI Wan-Qi, SUN Pei-Fang, GONG Xing-Wen

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture, Ministry of Agriculture, Shanghai, 200090)

ABSTRACT Two strains of 97-7-2C and 97-9-2A' were isolated from the liver of the diseased *Trionyx sinense* of Taiwan population. After artificial infection by these two strains, the diseased rate and mortality rate were all 100%, in the young turtles of 10~ 15g body weight. Through the cultivation and physical-biochemical reactive determination, 97-7-2C was identified as *Yersinia enterocolitica*, 97-9-2A' was identified as *Y. pseudotuberculosis*. They can cause septicemia in turtles. The alterative pathological changes were happened significantly in liver, kidney and intestine significantly, but most seriously in intestine. The results from 20 drug selection testings indicated that, the *Y. enterocolitica* is sensitive to gentamycin, and trimethoprim, *Y. pseudotuberculosis* is sentive to trimethoprim and furantoin.

KEYWORDS *Trionyx sinense*, Taiwan population, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, Septicemia, Drug selection testing