

# 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症

## THE SEPTICAEMIA OF *ANGUILLA ANGUILLA* INFECTED BY *AEROMONAS CAVIAE*

樊海平 曾占壮 余培建 李志青

(福建省淡水水产研究所, 福州 350002)

FAN Hai Ping, ZENG Zhan-Zhuang, YU Pei Jian, LI Zhi-Qing

(Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002)

关键词 欧洲鳗鲡, 豚鼠气单胞菌, 败血症

KEYWORDS *Anguilla anguilla*, *Aeromonas caviae*, Septicaemia

从 1994 年起, 欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*) 发生一种危害严重的疾病, 其流行时间及地域逐年不断扩展。主要症状为鳃丝水肿溃烂; 头部水肿、充血发红; 腹部膨大, 腹部皮肤出血; 腹腔积血水, 内脏失血, 肝脏呈苍白色, 胃积水, 肠道发炎呈卡他性肠炎。主要流行于水温达 26℃ 以上时节, 传染速度快, 于 24h 内感染全池鳗 50% 左右, 出现症状病鱼的死亡率一般在 60% 以上[樊海平 1998a、b、c]。豚鼠气单胞菌能引起多种水产养殖动物的疾病[Austin B 和 Austin D A 1987], 但引起欧洲鳗鲡败血症还是首次报道。本文报道省内对此症的研究结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原菌的分离

取典型症状濒死病鳗, 无菌生理盐水冲洗体表三遍, 无菌解剖剪解剖, 无菌接种环自腹腔血水、肝脏、肾脏取样, 普通培养基划线涂布, 30℃ 培养 24h 后, 挑取形态一致的优势菌落进一步划线纯化, 直至获得纯培养后, 移入斜面, 液体石蜡保存备用。从人工感染出现典型症状病鳗由肾脏分离纯化细菌。

### 1.2 人工感染试验

取体重为 10g 左右健康鳗, 于水族箱暂养 5d, 暂养期间不投饵, 连续充气, 水池保持 28℃, 稳定后随机挑取供人工感染。40L 水族箱放水 20L, 每组放鱼 6 尾, 每试验组设置重复, 不换水, 连续充气, 连续观察 7d。

注射感染: 将于斜面培养 24h 的细菌, 用无菌生理盐水洗下并稀释成不同浓度的菌悬液。将试验鳗用冰水麻醉后, 背鳍基部注射, 每尾注射 0.2mL。对照组注射等量的无菌生理水。试验共用二个菌株。

创伤感染: 将培养 24h 的细菌, 用肉汤培养基稀释加入水族箱中制成不同浓度菌悬液。试验鳗用无菌解剖剪剪掉一小片背鳍。对照组不加菌液。

浸浴感染: 试验方法除不剪背鳍外其余与创伤感染相同。所选菌株同创伤感染。

### 1.3 病原菌的分类鉴定

自然病鳗分离二株菌,人工感染分离二株菌,共计四株,按照中国科学院微生物研究所细菌分类组[1978]和厦门大学生物学系微生物学教研室[1989]介绍的方法进行形态、生理生化特性测试。将培养 16h 细菌用 2% 磷酸钨磷酸缓冲液负染,透射电子显微镜观察菌体形态,鉴别至种[Holt 等 1993, Palleroni 1984]。

### 1.4 药敏试验

试验所用 24 种药敏纸片由上海伊华临床科技公司制造,涂布法接种,每皿贴纸片 6 片,每种药品设置重复,25℃ 培养 24h 后测定抑菌圈直径,按 Necls 推荐标准评介[王淑娟 1995]。

### 1.5 治疗试验

于福建省长乐、福清、罗源等地发病池,首先洗刷池底及池壁,大换水后,用氟哌酸  $10\sim 15\times 10^{-6}$  和维生素  $c\ 3\sim 5\times 10^{-6}$  药浴,18~20h 换水  $1/2$  后,用氟哌酸  $8\sim 10\times 10^{-6}$  和维生素  $c\ 3\times 10^{-6}$  药浴 18~20h 后换水投饵。每 kg 饵料添加维生素 c 0.5g、肝泰乐 8~10 片、盐酸环丙沙星 0.8g 或庆大霉素 8 万 IU,日投饵二次,连续投喂 7~10d。

## 2 试验结果

### 2.1 人工感染试验

肌肉注射,创伤感染,人工感染三种方法结果(表 1、2、3、4)表明:分离菌株能导致健康鳗的死亡,注射感染高浓度导致急性死亡,死亡鳗肠道积血水,但腹腔未积血水,注射感染后期死亡鳗表现为肝脏肿大、色淡、胃部积水、肠内出血、腹腔积少量血水。创伤感染、浸浴感染鳗上下颌充血红肿、内脏表现贫血、肠道出血、腹腔积少量血水,症状基本与养殖病鳗相似。分离菌株为致病菌。

表 1 97-19 菌株肌肉注射感染结果

Tab. 1 Result of intramuscular injecting infection test by clone 97-19

菌液浓度(个/毫升)	试验尾数	死亡数							死亡尾数/试验尾数
		1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
$8.5\times 10^6$	6	0	2	2	1	0	1	-	6/6
$8.5\times 10^7$	6	3	2	1	-	-	-	-	6/6
$8.5\times 10^8$	6	3	-	-	-	-	-	-	6/6
$8.5\times 10^9$	6	6	-	-	-	-	-	-	6/6
对照	6	0	0	0	0	0	0	0	0/6

表 2 97-20 菌株肌肉注射试验结果

Tab. 2 Result of intramuscular injecting infection test by clone 97-20

菌液浓度(个/毫升)	试验尾数	死亡数							死亡尾数/试验尾数
		1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
$9.0\times 10^6$	6	0	0	1	2	0	1	0	4/6
$9.0\times 10^7$	6	1	1	3	0	1	-	-	6/6
$9.0\times 10^8$	6	0	1	3	2	-	-	-	6/6
$9.0\times 10^9$	6	6	-	-	-	-	-	-	6/6
对照	6	0	0	0	0	0	0	0	0/6

表 3 97-19 菌株浸浴感染结果  
Tab. 3 Result of dipping infection test by clone 97-19

菌液浓度(个/毫升)	组别	试验尾数	死亡数							死亡尾数/试验尾数
			1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
$2.25 \times 10^6$	1	6	0	0	0	0	2	0	1	3/6
	2	6	0	0	0	0	0	0	1	1/6
$2.25 \times 10^7$	1	6	0	0	0	2	1	1	0	4/6
	2	6	0	0	0	1	2	0	0	3/6
$2.25 \times 10^8$	1	6	0	0	1	2	1	2	-	6/6
	2	6	0	0	0	2	1	0	0	3/6
$2.25 \times 10^9$	1	6	0	1	1	3	-	1	-	6/6
	2	6	0	1	0	2	1	3	0	6/6
对照	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0/6

注: 组别 1: 创伤感染; 组别 2: 浸浴感染, 表 4 同此。

表 4 97-20 菌株浸浴感染试验结果  
Tab. 4 Result of dipping infection test by clone 97-20

菌液浓度(个/毫升)	组别	试验尾数	死亡数							死亡尾数/试验尾数
			1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
$5 \times 10^6$	1	5	0	1	0	1	0	1	0	3/6
	2	6	0	0	0	1	1	0	0	2/6
$5 \times 10^7$	1	6	0	0	0	1	2	1	1	5/6
	2	6	0	0	0	1	1	0	2	4/6
$5 \times 10^8$	1	5	0	1	1	3	0	1		6/6
	2	6	0	0	1	2	2	1		6/6
$5 \times 10^9$	1	5	0	0	4	0	1	1		6/6
	2	6	0	0	2	0	3	1		6/6
对照	1	5	0	0	0	0	0	0		0/6
	2	6	0	0	0	0	0	0		0/6

## 2.2 病原菌的分类鉴定

四株菌株形态及生理生化特性相同, 均为革兰氏染色阴性具动力的短杆菌。氧化酶、接触酶阳性, 发酵乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、蔗糖, 不发酵肌醇、卫矛醇, 硝酸盐还原、吲哚反应、甲基红反应、精氨酸双水解阳性, V-P 反应、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阴性, 于 6% 食盐水中不能生长。

## 2.3 药物敏感性试验结果

分离菌株对 24 种药物敏感试验结果(表 6) 显示: 对庆大霉素、氟哌酸敏感, 对呋喃妥因、头孢哌酮、头孢他定、头孢三嗪、头孢噻肟中度敏感, 对青霉素类、红霉素、万古霉素、氯霉素等大多药物不敏感。

表 5 分离菌株的特性

Tab. 5 Characteristics of the isolated bacteria

鉴定项目	97- 19	97- 20	97- 21	97- 22	豚鼠气单胞菌*
形状	短杆状	短杆状	短杆菌	短杆菌	短杆菌
动力	+	+	+	+	+
革兰氏染色	-	-	-	-	-
NaCl 生长					
0%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	NR
6%	-	-	-	-	NR
氧化酶	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+
克氏双糖铁	- / Ý	- / Ý	- / Ý	- / Ý	- / Ý
葡萄糖	F	F	F	F	F
葡萄糖产气	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S 产生	-	-	-	-	-
乳糖	+ <sup>L</sup>	+ <sup>L</sup>	+ <sup>L</sup>	+ <sup>L</sup>	d
麦芽糖	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	d
甘露糖	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+
L- 阿拉伯糖	+	+	+	+	+
木糖	+	+	+	+	+
密二糖	-	-	-	-	-
果糖	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	[+]
蕈糖	+	+	+	+	+
水杨素	+	+	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	+
肌醇	-	-	-	-	-
卫矛醇	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	+	
靛基质	+	+	+	+	+
V- P 反应	-	-	-	-	-
MR 反应	+	+	+	+	+
尿素酶	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-
精氨酸双水解	+	+	+	+	+
醋酸钠利用	+	+	+	+	d
丙二酸钠利用	-	-	-	-	-
明胶酶	+	+	+	+	+
α/129 10 <sup>11</sup> g/片	-	-	-	-	-
敏感性 150μg/片	-	-	-	-	-

注: \* 为豚鼠气单胞菌特性。d 为 11%~ 89% 菌株阳性, + 为 90% 以上菌性阴性, L 为反应弱[ Holt 等 1993], NR 为无记载。

表6 分离菌株药敏感试验结果

Tab.6 Sensitivity of the isolated bacteria to the 24 chemotherapentants

药品	敏感性	药品	敏感性	药品	敏感性
卡那霉素	R	丁胺卡那霉素	I	呋喃妥因	I
氨苄青霉素	R	氟哌酸	S	羧苄青霉素	R
苯唑青霉素	R	头孢哌酮	I	链霉素	R
头孢呋新	R	青霉素	R	头孢唑啉	R
氟哌嗪青霉素	R	氯霉素	R	利福平	R
头孢三嗪	I	复方新诺明	R	头孢他定	I
四环素	R	头孢噻肟	I	妥布霉素	R
红霉素	R	万古霉素	R	庆大霉素	S

注: R为耐药, I为中度敏感, S为敏感。

## 2.4 治疗试验结果

治疗前日死亡率为0.8%~1.2%左右,药浴2d后日死亡率迅速下降,但日死亡率仍达0.1%~0.2%左右,经投喂药物饵料后死亡逐渐递减,一疗程7d投喂后,每池日死亡鳊2~5尾左右,日死亡率仅为0.01%左右,详细结果列于表7。

表7 败血症的治疗结果

Tab.7 Treatment results of the septicemia

场名	治疗前日死亡鳊	药浴2天后日死亡鳊	投饵7天后日死亡鳊
	(尾/池)	(尾/池)	(尾/池)
长乐盛源鳊场	257	47	3
长乐明丰鳊场	163	45	2
福清大利来鳊场	375	86	5
罗源贵安鳊场	123	23	—
古田水口鳊场	214	35	3

## 3 讨论

人工感染试验病鳊出现上下颌充血、水肿,腹部具出血点,肠道出血,内脏贫血,这与养殖池中前期病鳊及药浴处理死亡高峰过后的病鳊症状相同,在死亡高峰期亦有部分病鳊与人工感染症状相同。但死亡高峰期,病鳊腹腔积水较人工感染更多,内脏败血症较人工感染更为明显。这可能是由于病原菌在鳊体内繁殖,内脏受损速度较慢,因而症状显示更充分。当体内病原体积至一定量及内脏功能严重损伤时暴发大量死亡。人工感染试验采用高浓度菌液感染,内脏迅速受损,导致鱼体于短时期内死亡,因而症状显示不充分。本研究还利用病原菌进行灌胃感染,导致鱼体死亡,死亡鱼肠道出血、积血水,说明了本症感染途径有口和接触感染两种。欧洲鳊败血症的发生呈漫延趋势,尤其在1997、1998两年夏季高温季节,其发生率高,引起死亡严重。在养殖生产中,采用敏感抗菌素如氟哌酸+维生素C药浴,同期内服敏感抗生素、维生素C及肝泰乐等辅助肝功能恢复的治疗措施疗效显著。在实践中发现同一场前期发病池病情极易控制,而后期发病池必须提高用药剂量,延长药浴时间才能控制病情,说明病原菌对药物于短时期产生了耐药性,因而应加强免疫制剂及无耐药性产生的中草药研制。

## 参考文献

王淑娟,周惠平,夏铁安. 1995. 现代诊断学手册. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学、联合出版社. 511~525

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:农业出版社. 111~193.

- 厦门大学生物学系微生物学教研室(译). 1989. 普通细菌学方法手册. 厦门: 厦门大学出版社. 527~ 553
- 樊海平. 1998a. 欧洲鳗主要病害的调查防治方法(一). 科学养鱼, 100: 37~ 38
- 樊海平. 1998b. 欧洲鳗主要病害的调查防治方法(二). 科学养鱼, 101: 28~ 29
- 樊海平. 1998c. 欧洲鳗主要病害的调查防治方法(三). 科学养鱼, 102: 22~ 23
- Austin B, Austin D A. 1987. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and wild Fish. Ellis Horwood Limited, 250~ 262
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. 1993. Determinative bacteriology. Williams and Wilkins, 155~ 190
- Palleroni N J. 1984. Genus *Pseudomonas*. In: Krieg N R, ed. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1: 141~ 199