

东北三省 15 株致病性嗜水气单胞菌 分离株的药敏实验分析

司力娜^{1,2}, 李绍戊¹, 王 荻¹, 尹海富², 卢彤岩^{1*}

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学 动物科学技术学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 该研究对于合理使用抗菌药物并有效防治鲤鱼细菌性败血症提供一定的理论依据。采用细菌生化编码鉴定管与分子生物学方法(嗜水气单胞菌特异性 16S rDNA 及气溶素 *Aer* 基因的部分片段进行扩增)对从东北三省淡水鱼主养区患病鲤鱼体内分离并鉴定得到的 15 株致病性嗜水气单胞菌进行药敏分析试验。17 种常见药物的药敏实验结果表明,东北三省的 15 个致病性嗜水气单胞菌分离株表现出较均一的耐药性及敏感度:对左氟沙星、多粘菌素 B、氧氟沙星较敏感,而对苯唑青霉素、替考拉丁、氨苄青霉素和林可霉素耐药性极强,但仍有一部分菌株表现出不同程度的耐药性及敏感度的变化趋势,值得进一步深入研究。

关键词: 致病性嗜水气单胞菌; 东北三省; 分离鉴定; 药敏实验

中图分类号: S941 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0786-05

Drug Sensitivity Test on Fifteen Strains of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* from Northeast China

SI Li-na^{1,2}, LI Shao-wu¹, WANG Di¹, YIN Hai-fu², LU Tong-yan^{1*}

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery sciences, Harbin 150070, China; 2. Department of Animal Sciences, Northeast China Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: This study offers some theoretical basis for the rational use of antibiotic and the prevention and cure of bacterial septicemia in carps. 15 strains of pathogenic *Aeromonas hydrophila* were separated and identified from carps with typical bacterial symptom in Northeast China using bacterium biochemistry code appraisal tube and molecular biology methods, and the drug sensitivity of separated strains was studied. The results of sensitivity test with 17 common drugs suggested that 15 strains of pathogenic *Aeromonas hydrophila* showed an even trend of resistance and sensitivity to drugs. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* strains were highly sensitive to antibiotics such as Levofloxacin, Polymyxin B, Ofloxacin and resistant to antibiotics such as Bristopen, Linecomycin, Ampicillin and Teicoplanin. However, some strains showed different degrees of drug resistance and a changing trend of sensitivity. Therefore it is worth our attention and further study.

Key words: pathogenic *Aeromonas hydrophila*; Northeast China; isolation and identification; drug sensitivity test

收稿日期: 2010-10-14 修回日期: 2011-06-07

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-49-10)、农业公益性行业专项(200803013)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(201003)

作者简介: 司力娜(1985—),女,硕士生,主要从事鱼类病害研究, E-mail: si_lina@126.com; * 通讯作者: 卢彤岩, 研究员, E-mail: lutongyan@hotmail.com。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属弧菌科(Vibrionaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*),是一种重要的人、畜、鱼共患病的病原菌。嗜水气单胞菌为两端钝圆,直形,或略弯,革兰氏阴性、发酵的短杆菌,大小约(0.8~1.0) μm \times (1.0~3.5) μm ,电子显微镜下可见极生单鞭毛^[1],部分具有侧鞭毛^[2],有运动力^[3],无荚膜^[4]。该菌广泛存在于水环境中,可单独与其他致病菌一起协同感染多种水生、爬行、两栖、鸟类及哺乳类动物,并引发该动物全身性败血症或局部感染甚至死亡^[5],也可引发人类食物中毒、腹泻、败血症以及局部的伤口感染等病症^[6]。

20世纪90年代以来,大量报道表明,嗜水气单胞菌作为水产养殖动物的主要细菌病致病菌之一,常引起我国淡水养殖鱼类的爆发性败血症,并造成大量死亡,给淡水鱼养殖业造成重大的经济损失^[7-8]。同时,嗜水气单胞菌激发的淡水鱼爆发性疾病流行范围极广,遍及世界各地^[8-9],发病死亡率高达80%^[7]。国内也已有多例报道指出,嗜水气单胞菌为鲤鱼细菌性败血症的主要致病菌^[10-13]。因此,了解并掌握该致病菌的培养及生物学特性,并能对其进行早期、高效的分离鉴定,掌握病菌的药物敏感性对监测、控制该病菌引起的流行性疾病有着极其重要的意义。

本文对东北三省淡水鱼主养区的患病鲤鱼体内分离到的致病性嗜水气单胞菌进行了形态、生理生化特性、分子生物学快速检测、药物敏感性实验等研究,以期有效防治东北三省鲤鱼养殖业该类细菌性疾病的预警和防控提供科学数据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

自黑龙江省、吉林省和辽宁省几个大型淡水养殖场,取患病鲤鱼肝脏和肾脏样本保存于30%灭菌甘油中,待实验室分离细菌菌株并做进一步分析研究用。

实验用药敏试纸、弧菌科细菌生化编码鉴定管(A006)均购自杭州天和微生物试剂有限公司。实验用嗜水气单胞菌16S rDNA基因和*Aer*基因的特异性扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

目的菌株的分离培养及生化管检测:取甘油中保存的肝、肾组织,均匀涂板于普通营养琼脂培养基(MS培养基)上,28℃培养24h后观察菌落形态,并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,然后对菌株进行革兰氏染色、氧化酶实验,选取革兰氏阴性且氧化酶呈阳性的菌株进行弧菌科细菌生化编码鉴定管实验。

嗜水气单胞菌分子生物学及致病性检测:按照李绍戊等^[14]方法,对纯化所得的细菌分离株进行分子生物学鉴定(保守基因:16S rDNA基因的目的片段扩增)及致病性(特异性*Aer*基因的目的片段扩增)检测。

嗜水气单胞菌分离株的药敏试验:将分离纯化鉴定所得的致病性嗜水气单胞菌分离株挑入MS液体培养基中,28℃震荡培养过夜。取0.1 mL培养菌液均匀涂板于9 cm MS培养基平板上,然后等距贴上药敏纸片4片/平板,分别测定致病菌分离株对左氟沙星(Levofloxacin, LE)、红霉素(Erythromycin, ER)、多粘菌素B(Polymyxin B, PB)、四环素(Tetracycline, TC)、苯唑青霉素(Bristopen, BP)、替考拉丁(Teicoplanin, TP)、妥布青霉素(Tobramycin, TM)、头孢吡肟(Cefepime, CP)、头孢孟多(Cefamand, CM)、氨苄青霉素(Ampicillin, AP)、氟哌酸(Norfloxacin, NF)、氧氟沙星(Ofloxacin, OF)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CP)、卡那霉素(Kanamycin, KM)、林可霉素(Lincomycin, LC)、链霉素(Straptomycin, SM)和庆大霉素(Gentamicin, GM)共17种常见药物的敏感程度。将处理好的平板倒置于培养箱中,28℃培养24h,测定抑菌圈直径,并根据杭州天和微生物试剂有限公司细菌药敏试纸使用说明书判断检测结果。

2 结果

2.1 菌落形态特征

培养平板上优势菌落形态相似,为圆形,大小较均一,直径在1~3 mm。菌落表面光滑、湿润、边缘整齐、无水溶性色素、呈乳白色,有特殊气味。

2.2 革兰氏染色,氧化酶实验及生化鉴定管检测

分离菌株经革兰氏染色,经镜检为革兰氏阴性多形态杆菌,氧化酶实验呈阳性反应,由此判定,分离菌株属于弧菌科细菌。对分离到菌株按照采样渔场所属省份分别命名为:黑龙江省5株(Ah-H1、Ah-H2、Ah-H3、Ah-H4、Ah-H5);吉林省5株(Ah-J1、Ah-J2、Ah-J3、Ah-J4、Ah-J5);辽宁省5株(Ah-L1、Ah-L2、Ah-L3、Ah-L4、Ah-L5),采用弧菌科细菌生化编码鉴定管检测结果均呈现嗜水气单胞菌的典型反应,具体生理生化特性见表1。

表1 细菌生化编码鉴定管检测结果

Tab.1 The results of bacterium biochemistry code appraisal tube

	赖氨酸 Lysine	精氨酸 Arginine	鸟氨酸 Ornithine	葡萄糖产气 Glucose gas	蔗糖 Sucrose	甘露醇 Mannitol	水杨素 Salicin	6%氯化钠胨水 sodium chloride peptone water for 6%	枸橼酸盐 Citrate	检测值 Test value
Ah-H1	+	+	-	+	-	+	+	-	-	654
Ah-H2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	674
Ah-H3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	674
Ah-H4	+	+	-	+	-	+	+	-	-	654
Ah-H5	+	+	-	+	-	+	+	-	-	654
Ah-J1	+	+	-	+	+	+	+	-	+	675
Ah-J2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	470
Ah-J3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	674
Ah-J4	+	+	-	+	+	+	-	-	-	670
Ah-J5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	470
Ah-L1	+	-	-	+	+	+	-	-	-	470
Ah-L2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	470
Ah-L3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	674
Ah-L4	+	+	-	+	+	+	+	-	+	675
Ah-L5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	675

“+”为阳性,“-”为阴性。“+” is the pssitive,“-” is the negative.

2.3 嗜水气单胞菌的分子生物学及致病性检测

采用特异性引物,对弧菌科细菌生化编码鉴定管检测结果为嗜水气单胞菌分离株的保守基因16S rDNA部分序列进行PCR特异性扩增。琼脂糖凝胶电泳结果表明,15个分离株在686 bp处均有单一阳性目的片段扩增,因此,分子生物学快速检测结果与生化管鉴定结果一致,确定得到的15个分离株均为嗜水气单胞菌分离株。

而针对嗜水气单胞菌气溶素基因*Aer*部分序列设计的特异性引物,在以15个嗜水气单胞菌分离株为模板的扩增中,在301 bp处得到了阳性目的片段扩增,表明分离到的15株嗜水气单胞菌均具有一定的致病性,为致病性嗜水气单胞菌菌株。

2.4 药敏试验结果

药敏试纸抑菌实验结果表明,分离到的15株嗜水气单胞菌对检测的17种常见药物表现出程度不一的敏感性,具体结果见表2。

实验统计结果显示,15个分离株对17种药物有不同程度的敏感性,但是所有分离株均对BP、TP、AP、LC 4种药物100%耐药,而对LE、PB、OF完全不耐药。

按照省份耐药比率,将剩余的10种药物整理成图见图1,可以看出各省份致病性嗜水气单胞菌对10种药物耐药性的趋势:吉林省分离株相对于黑龙江省和辽宁省的分离株对大部分药物的耐药性较高,而黑龙江省分离株对其中的5种药物(TM、NF、KM、SM、GM)耐药性为0,吉林省和辽宁省分离株各对1种药物(吉林省:KM;辽宁省:TC)不耐药。

表 2 药敏实验结果

Tab.2 The results of drug sensitive test

药物 Drugs	菌株 Strains															耐药率/% The rate of resistance
	Ah - H1	Ah - H2	Ah - H3	Ah - H4	Ah - H5	Ah - J1	Ah - J2	Ah - J3	Ah - J4	Ah - J5	Ah - L1	Ah - L2	Ah - L3	Ah - L4	Ah - L5	
LE	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
ER	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	86.67
PB	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0
TC	S	I	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	26.67
BP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100
TP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100
TM	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	I	S	S	S	R	20
CP	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	26.67
CM	R	R	S	S	I	R	R	S	S	S	R	S	I	S	S	33.33
AP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100
NF	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	13.33
OF	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
CP	R	I	I	I	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	40
KM	S	S	I	I	S	I	I	I	I	S	I	I	S	R	I	6.67
LC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100
SM	S	S	I	I	S	S	S	R	R	I	S	R	S	R	R	33.33
GM	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	R	R	S	20

S 表示高度敏感; I 表示中度敏感; R 表示耐药。S: high sensitivity; I: sensitivity; R: resistance.

3 讨论与分析

实验分离到的来自黑龙江、吉林、辽宁三省淡水鱼养殖场患病鲤鱼体内的 15 株致病性嗜水气单胞菌, 其培养后的菌体形态特征、培养特性、生化特性与已有报道^[15-16]基本相同, 而用于分子生物学快速检测的 16S rDNA 基因和致病性检测的 *Aer* 基因特异性序列的扩增结果, 也得到了确定的阳性目的条带。综合检测结果表明, 分离到的东北三省 15 株致病性嗜水气单胞菌其培养、生化特性以及保守基因序列都未出现较大变异。

东北三省地域辽阔, 淡水鱼养殖面积较大, 但养殖模式等差别较大; 黑龙江多是大水面粗放型散养, 池塘深度较浅, 人工用药及自动化设施少, 自制饲料较多, 且部分鱼池处于盐碱地区, pH 值较高; 而辽宁省的养殖模式趋于机械化, 规模化, 养殖密度较大, 人为控制及用药都较多; 吉林省养殖条件介于黑龙江省和辽宁省之间, 水面相对较大, 养殖密度不高, 自动化程度高于黑龙江省而低于辽宁省。

东北三省分离到的 15 株致病性嗜水气单胞菌普遍对左氟沙星、多粘菌素 B、氧氟沙星较敏感, 而对苯唑青霉素、替考拉丁、氨苄青霉素和林可霉素耐药性极强。分离得到的东北三省菌株均表现出较均一的耐药性或敏感度, 但是值得注意的是, 实验得到的 14 个分离株对左氟沙星表现为高度敏感, 而编号为 Ah - H1 的黑龙省分离株对其的敏感度降为中度敏感, 表明黑龙省有部分致病性嗜水气单胞菌对左氟沙星有耐药性增强的趋势; 编号为 Ah - J2 的吉林省分离株对多粘菌素 B 以及编号为 Ah - H2 的黑龙省分离株对氧氟沙星也表现出相同的趋势。而编号为 Ah - J3 的吉林省分离株和编号为 Ah - L5

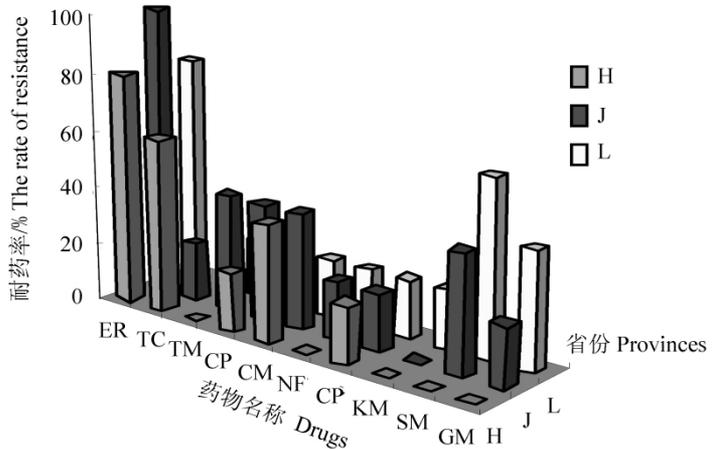


图 1 东北三省致病性嗜水气单胞菌 10 种药物的耐药比率
Fig. 1 The percentage of ten drugs resistant of pathogenic *Aeromonas hydrophila* in Northeast China

的辽宁省分离株对氟哌酸表现为强耐药性,其他13个分离株则对其高度敏感。编号为Ah-H5的黑龙江省分离株和编号为Ah-L3的辽宁省分离株对红霉素表现为中度敏感,其他13个分离株则表现为强耐药性。

实验结果表明,东北三省分离到的致病性嗜水气单胞菌的耐药性较一致,但仍有部分分离株表现出了不同的耐药或敏感趋势,值得我们注意和进一步深入研究,将对控制该菌引起的疾病起到一定的导向作用。但据报道,嗜水气单胞菌能生成生物被膜(Biofilm, BF),形成耐药屏障^[17-18]。所以抗生素的使用要格外慎重,如何有效、合理的使用抗菌药仍是防治鱼类细菌性疾病未来研究方向之一。

参考文献:

- [1]张玉芬,张秀军,张文丽,等. 鲤鱼嗜水气单胞菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31):13689-13709.
- [2]Canals R, Altarriba M, Vukches S, et al. Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 88(3): 852-862.
- [3]潘厚军,吴淑勤,董传甫,等. 鳊致病性嗜水气单胞菌 GYK1 株的鉴定、毒力及溶血性[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1): 23-29.
- [4]黄文疗,李海燕,张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病原的研究[J]. 微生物通报, 1999(4): 246-250.
- [5]张运强,李庆乐. 嗜水气单胞菌的致病性及其防治方法[J]. 广西农业科学, 2007, 38(5): 565-568.
- [6]杨守明,王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511-514.
- [7]吕爱军,李任年,余为一. 嗜温气单胞菌研究进展[J]. 中国动物检疫, 2000, 10(11): 42-43.
- [8]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.
- [9]杨守明,王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511-514.
- [10]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, 21(1): 8-10.
- [11]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.
- [12]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.
- [13]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.
- [14]李绍戊,王荻,刘红柏,等. 东北三省致病性嗜水气单胞菌快速检测[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(3): 585-589.
- [15]刘加波,谢芝勋,邓显文,等. 罗飞鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定[J]. 中国渔业, 2006, 26(4): 100-103.
- [16]朱芝秀,曾志明,何后军,等. 江西地区嗜水气单胞菌流行株的生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 623-627.
- [17]Bakken J S, Sanders C C, Clark R B, et al. β -lactamase resistance in *Aeromonas* spp. caused by inducible β -lactamases active against penicillins, cephalosporins and carbapenems[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1988, 32(9): 1314-1319.
- [18]Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P, et al. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 34(284): 1318-1322.