

细菌生化编码微量鉴定系统 在鱼病诊断中的应用

潘厚军 吴淑勤 黄志斌 石存斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要 应用细菌生化编码微量鉴定系统鉴定鱼类细菌具有较高的准确度。利用其中的 SWF-A 系统鉴定嗜水气单胞菌、苏伯利气单胞菌和迟缓爱德华氏菌等鱼类细菌 94 株, 符合率 97.87%; GYZ-9V 系统鉴定鱼类弧菌科细菌 55 株, 符合率 96.36%; GYZ-15e 系统鉴定鱼类肠杆菌科细菌 16 株, 完全符合。温度对这些系统鉴定结果无影响 (27℃ 与 36℃ 鉴定结果相同)。应用微量鉴定系统诊断细菌性鱼病, 具有简便、规范的特点, 其中 SWF-A 系统比 GYZ 系统更为方便适用。

关键词 生化编码微量鉴定系统、诊断、细菌性鱼病

在鱼病诊断中, 我们常要对分离的细菌进行鉴定。常规的生化鉴定方法, 在经验不足, 缺少配套的诊断试剂和资料的情况下, 经常难以实行, 即使用常规生化方法鉴定, 也费时较长, 包括准备工作, 往往需要 1~2 周时间才能得到鉴定结果。患病的鱼得不到及时治疗延误了时机, 生产常因此受到重大损失。所以, 迫切需要一套简便、准确、快速的细菌鉴定方法进行细菌性鱼病的诊断。

目前, 一些已商品化的医用细菌生化编码微量鉴定系统 (如 GYZ 系统、SWF-A) 已广泛应用于医学和兽医学, 推广到普通的医院、卫生防疫部门, 大大提高了这些部门的工作效率^[1,2,3]。在美国, API-20E 系统已应用于鱼病的日常诊断^{[4][9]}。而在国内, 还没有应用医用微量系统诊断鱼病的报导。本文报告了应用 GYZ 系统、SWF-A 系统鉴定鱼类细菌 7 个属 9 个种的结果。希望能为鱼类细菌性疾病诊断提供一套简便、适用的方法。

材 料 与 方 法

(一) 实验菌株

1. 标准菌株 5 株 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, 简称 Ah) D-II-1 株, 89-7-14 株, 苏伯利气单胞菌 (*Aeromonas sobria*, 简称 As) N-1-2 株由上海水产大学赠送。

苏伯利气单胞菌 CR-79-1-1 株由水生生物研究所提供。

爱德华氏菌 E895205 株由浙江水产学院提供。定名为浙江爱德华氏菌 (*Edwardsiella Zhejiangensis* sp. nov)

2. 致病菌株 79 株 由我室从病鱼中分离, 经人工感染有致病力的菌株。并经常规生理生化测定, 归类为亲水组气单胞菌 69 株 (包括嗜水气单胞菌 45 株, 苏伯利气单胞菌 23 株, 豚鼠气单胞菌 1 株), 类志贺邻单胞菌 2 株, 霍乱弧菌 1 株, 迟缓爱德华氏菌 7 株。
3. 无毒菌株 10 株 亦为我室从病鱼中分离, 经过人工感染实验而证明无毒的菌株。常规生理生化测定, 归为弗氏柠檬酸杆菌 8 株, 聚团肠杆菌 1 株, 大肠埃希氏菌 1 株。

(二) 培养基

1. 营养琼脂 用于上述所有菌株的扩大培养。
2. M-H 琼脂 用于弧菌科细菌对 0/129 敏感性的补充实验。

(三) 细菌生化编码微量鉴定系统

1. GYZ 系统 具有配套的试剂、微量菌鉴管、编码册和说明书等, 由浙江省军区后勤部卫生防疫检验所研制。其中两个亚系统, GYZ-9V 系统适用于弧菌科细菌的鉴定, GYZ-15e 系统适用于肠杆菌科细菌的鉴定。

使用 GYZ 系统, 需先做革兰氏染色、葡萄糖发酵和氧化酶试验。如果革兰氏染色阴性, 葡萄糖发酵试验阳性, 氧化酶试验阳性, 即用 GYZ-9V 系统。如果前两项同上, 而氧化酶试验阴性, 即用 GYZ-15e 系统。温度设为 27℃。

2. SWF-A 系统 包括 SWF-A 微量生化鉴菌板及配套试剂、编码手册、色卡等, 由上海市卫生防疫站研制。

使用这个系统, 需先做革兰氏染色, 葡萄糖发酵试验。如果革兰氏染色阴性, 葡萄糖发酵试验阳性, 则可以应用此系统。温度设为 27℃。

(四) 温度对微量法鉴定结果的影响

取嗜水气单胞菌 GX₇ 株, SX₂ 株, 苏伯利气单胞菌 E8D 株, 爱德华氏菌 E895205 株、E27 株, 弗氏柠檬酸杆菌 E6 株, 用 GYZ 和 SWF-A 两种系统鉴定, 设 27±1℃ 和 36±1℃ 两种培养温度。比较在两种培养温度下的分类鉴定结果。

结 果

(一) SWF-A 系统与常规法鉴定鱼类细菌的比较

共鉴定鱼类细菌 94 株, 结果见表 1。与常规法鉴定结果比较, 符合菌株 92 株, 符合率 97.87%。5 株标准菌株, 其中 N-1-2、D-II-1、89-7-14 和 CR-79-11 在此系统中鉴定为亲水组气单胞菌 (*A. hydrophila* group, 简称 Ahg), 都很典型。E895205 株鉴定为迟缓爱德华氏杆菌 (*E. tarda*, 简称 Et), 亦很典型。

在 94 株菌中, 与常规法鉴定不一致的有 2 株, AHG1 株, 弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrofreundii*, 简称 Cf) 1 株, 这两株菌在 SWF-A 系统编码手册中均查不到码。

(二) GYZ 系统与常规法鉴定鱼类细菌的比较

用此系统鉴定鱼类细菌 71 株, 结果见表 2。其中用 GYZ-9V 系统鉴定 55 株, 符合 53 株, 符合率 96.36%。不符合的两株, 常规法的结果为弧菌和嗜水气单胞菌, 而此系统鉴定为类志贺邻单胞菌和苏伯利气单胞菌。而用 GYZ-15e 系统鉴定 16 株, 全符合。

5 株标准菌株中, D-II-1 株、89-7-14 株符合为嗜水气单胞菌、N-1-2 株、CR-79-1-1 株符合为苏伯利气单胞菌, E895205 株鉴定为迟缓爱德华氏杆菌。

表 1 SWF-A 系统与常规法鉴定结果的比较

Table 1 Comparison of the identification results between SWF-A system and the conventional method

菌 名 Species of bacteria	常规法鉴定株数 Strains indentificated by using conventional method	SWF-A 系统符合株数 Coincidental strains with SWF-A system	符合率 Coincidental rates(%)
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>			
亲水组气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> group	73	72	98.63
邻单胞菌属 <i>Plesiomonas</i>			
类志贺邻单胞菌 <i>P. shigelloides</i>	2	2	100
弧菌属 <i>Vibrio</i>			
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	1	1	100
爱德华氏菌属 <i>Edwardsiella</i>			
迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	8	8	100
柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>			
弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citro. freundii</i>	8	7	87.5
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>			
聚团肠杆菌 <i>E. agglomerans</i>	1	1	100
埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>			
大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	1	1	100
合 计 total	94	92	97.87

(三) 温度对微量法鉴定结果的影响

按材料与方方法四实验, 结果见表 3。

GX₇ 菌在 GYZ-9V 系统中, 36℃ 时编码为 675, 27℃ 时编码为 674, 但结果均为嗜水气单胞菌。这是因“西蒙氏枸橼酸盐利用试验”(简称“枸试验”)在 GYZ-9V 系统中, 36℃ 呈阳性反应, 27℃ 呈阴性反应。我们把 GX₇ 菌“枸试验”在 27℃ 延长 1 天(共 48 小时)观察, 也为阳性结果。在 SWF-A 系统中, GX₇ 菌在两种温度下的编码也是因为“枸试验”分别为阳性和阴性而不同, 但两种编码都为嗜水气单胞菌。

其余 5 株菌, 27℃ 与 36℃ 时的编码均相同。

讨 论

(一) 医用细菌生化编码微量鉴定系统鉴定鱼类细菌的可行性

我们用细菌生化编码微量鉴定系统鉴定鱼类细菌, 与常规法比较, 两个系统的符合率都较高, 证明这类系统适用于鱼类细菌的鉴定。5 株标准菌株中, 亲水组气单胞菌 4 株完全符合, E895205 株在 SWF-A 和 GYZ-15e 两系统都鉴定为迟缓爱德华氏菌, 典型性都很高, 王国良把它定为浙江爱德华氏菌, 我们认为它应为迟缓爱德华氏菌的一个亚种。

鱼类致病菌与人类、其他哺乳类致病菌生态环境不同。鱼类为变温动物, 其致病菌寄生于机体, 因而常处于变温环境中。各种鱼类病原菌适宜温度各有不同, 但大都在 25℃ 与 30℃ 之间^[5]。而人类病原菌生长于常温 36℃ 的生态环境中。这些微量系统都要求细

表 2 GYZ 系统与常规法鉴定结果的比较

Table 2 Comparison of the identification results between GYZ system and the conventional method

系 统 Systems	菌 名 Species of bacteria	简 写 Abbreviated characters	常规法鉴定株数 Strains identified by using conventional method	GYZ 系统符合株数 Coincidental strains with GYZ stsyem	符合率 Coincidental rates(%)
GYZ-9v 系统	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>				
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	Ah	28	27	96.43
	苏伯利气单胞菌 <i>A. sobria</i>	As	23	23	100
GYZ-9v system	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	Ac	1	1	100
	弧菌属 <i>Vibrio</i>				
	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	Vc	1	0	/
	邻单胞菌属 <i>Plesiomonas</i>				
	类志贺邻单胞菌 <i>P. shigelloides</i>	Pc	2	2	100
	合 计 total		55	53	96.36
GYZ-15e 系统	爱德华氏菌属 <i>Edwardsiella</i>				
	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	Et	6	6	100
	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>				
	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrofreundii</i>	Cf	8	8	100
GYZ-15e system	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>				
	聚团肠杆菌 <i>E. agglomerans</i>	Ea	1	1	100
	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>				
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	Ec	1	1	100
	合 计 total		16	16	100

表 3 两种培养温度的鉴定结果比较

Table 3 Comparison of the identification results between two kinds of incubating temperature

结果(编码/菌名) Results(Code/ bacteria)		GYZ 系统 GYZ system		SWF-A 系统 SWF-A system	
		27±1℃	36±1℃	27±1℃	36±1℃
菌株 Strains					
	GX7	674 / Ah	675 / Ah	G30625 / Ahg *	G30665 / Ahg
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> (Ah)	X2	675 / Ah	675 / Ah	G34665 / Ahg	G34665 / Ahg
苏伯利气单胞菌 <i>A. sobria</i> (As)	E8D	671 / As	671 / As	G30675 / Ahg	G30675 / Ahg
迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i> (Et)	E895205	46360 / Et	46360 / Et	G17400 / Et	G17400 / Et
	E27	46360 / Et	46360 / Et	G17400 / Et	G17400 / Et
弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrofreundii</i> (Cf)	E6	43315 / Cf	43315 / Cf	G71034 / Cf	G71034 / Cf

* Ahg: 亲水组气单胞菌(*A. hydrophila* group, Ahg)包括嗜水气单胞菌(Ah), 苏伯利气单胞菌(As), 豚鼠气单胞菌(Ac)等, 在 SWF-A 系统中未细分。

* Ahg: Species in *Aeromonas hydrophila* group containing *A. hydrophila*, *A. sobria* and *A. caviae* don't classify with SWF-A system.

菌培养于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中, 这显然与人类致病菌的生态环境相适应。我们的实验证明 27°C 与 36°C 时鉴定结果相同。因而在应用这些医用微量系统鉴定鱼类细菌时, 把培养温度设为 27°C , 以满足鱼类细菌的最适生长温度是可行的。

本研究仅鉴定了发酵型革兰氏染色阴性菌的 7 个属 9 个种, 而且除气单胞菌属外, 其它菌种的株数都较少。还有待进一步补充。

(二) 细菌生化编码微量鉴定系统应用在鱼病诊断中的意义

如前言所述在鱼病诊断中, 用常规法鉴定细菌, 需要一个配备较多试剂和用品的实验室, 需要专业人员才能进行试验, 非科研单位很难办到, 而且时间也较长。微量系统鉴定法, 把多项生化试验集中于一个简易的测试系统中, 简化了很多准备工作。因而具有简便、规范的特点, 时间也较快, 适合鱼病防治部门、技术推广站等基层单位使用。

微量系统鉴定法在鱼病诊断中很有实用价值, 不需要常规法即可得到满意的结果。但当对一个新种进行鉴定分类时, 还需要结合常规法。

(三) 对 SWF-A 系统和 GYZ 系统的评价

SWF-A 系统和 GYZ 系统各有优缺点。SWF-A 系统能同时鉴定肠杆菌科、弧菌科细菌; 而 GYZ 系统又分为几个亚系统, 其中 GYZ-9V 系统鉴定弧菌科细菌, GYZ-15e 系统鉴定肠杆菌科细菌。在操作上, SWF-A 系统采用微板, 滴加菌悬液于微板上各孔即可完成接种工作; 而 GYZ 系统由多支菌鉴微管组成, 需要把管口打开, 穿刺接种, 比较麻烦。因而, SWF-A 系统比 GYZ 系统更为简便实用。

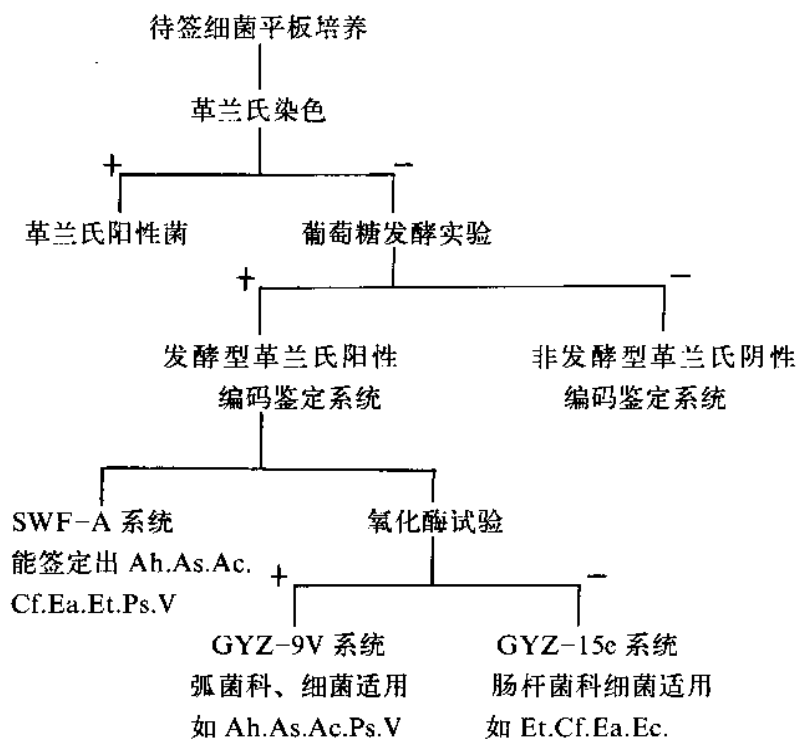
SWF-A 系统缺点是只能鉴定到亲水组气单胞菌 (Ahg), 而 GYZ-9V 系统对 Ahg 组分为嗜水气单胞菌 (Ah)、苏伯利气单胞菌 (As)、豚鼠气单胞菌 (Ac) 等。因此当需要对 Ahg 鉴定别种时, 最好应用 GYZ-9V 系统。如果单独应用 SWF-A 系统, 则需要配合常规法。下面列出区分三种气单胞菌的方法^[2]。

三种气单胞菌属内的鉴别

试验	亲水气单胞菌	豚鼠气单胞菌	温和气单胞菌
产气	±	-	+
水杨苷	+	+	-

但在鱼病诊断中, 只要鉴定到 Ahg 已足够, 这是因为 As、Ac 同 Ah 一样, 均为有致病力的细菌^[2], 同为鱼类致病菌^[6]。我们的人工感染实验也证明 As、Ac 均有毒力。

在细菌性鱼病诊断中, 同时应用两个系统, 结果比较可靠。可以按以下步骤进行。



注: Ah: 嗜水气单胞菌 Ea: 聚团肠杆菌 Cf: 弗氏柠檬酸杆菌
 As: 温和气单胞菌 Ec: 大肠埃希氏菌 Ps: 类志贺邻单胞菌
 Ac: 豚鼠气单胞菌 Et: 爱德华氏菌 V: 弧菌

参 考 文 献

- [1] 陈长怡等著, 1990. SWF-A码发酵性革兰氏阴性杆菌分离鉴定编码手册. 上海市卫生防疫站.
- [2] 中国人民解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所编, 1993. 弧菌科细菌生化鉴定编码册(第二代GYZ-9V系统).
- [3] 中国人民解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所编, 1992. 肠杆菌科细菌生化鉴定编码册(GYZ-15c系统).
- [4] 徐德海, 吴淑勤, 1992年. 国外鱼类细菌病快速诊断方法. 国外水产, 3: 34~37.
- [5] 朱心玲等著, 1991年. 养殖鱼类疾病及其防治. 湖北科学技术出版社.
- [6] 陆承平, 1992. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 16(3): 282-288.
- [7] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯等编. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版).
- [8] Arai, T et al., 1990. J. Hyg, 84: 203.
- [9] Austin B et al., 1985. Bacteria pathogens of fish. J. Appl. Bacterial, 38: 483-506.
- [10] Krieg, N. K & J. G. Holt(Eds), 1984. Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Vol. 1, The williams & wilkins Co, Baltimore.

APPLICATION OF BIOCHEMICAL CODE MICRO-IDENTIFICATION SYSTEMS OF BACTERIA ON THE DIAGNOSIS OF FISH DISEASES

Pan Houjun Wu Shuqin Huang Zhibin Shi Cunbin

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510580)

ABSTRACT Biochemical code micro-identification systems of bacteria can be used in the identification of fish pathogenetic organisms, such as *A. hydrophila*, *A. sobria* and *E. tarda*. The coincidental rate of 94 strains was 97.87% using SWF-A system and it of 55 strains was 96.36% using GYZ-9v system, comparing to conventional method. 16 strains of Enterobacteriaceae was whole coincidence using GYZ-15e system comparing to conventional method. Temperature didn't affect the identification results in both of systmes. The method of applying these medical micro-identification systems in the diagnosis of fish diseases was accurate, easy and convenient. It was considered that SWF-A system was more convenient than GYZ system and was suitable to the department of fish disease control for popularization and application on the diagnosis of fish diseases.

KEYWORDS Biochemical code micro-identification system, Diagnosis, Fish bacteria disease