

中华鳖白底板病原的分析

沈锦玉¹, 潘晓艺¹, 余旭平², 尹文林¹, 曹铮¹, 吴颖蕾¹

(1. 浙江省淡水水产研究所, 中国水产科学研究院 鱼类健康与免疫重点开放实验室, 浙江 湖州 313001; 2. 浙江大学 动物科技学院, 浙江 杭州 310029)

摘要:从患白底板病的中华鳖(*Trionyx sinensis*)肾、肝、脾分离出致病力较强的细菌 TS6-1 和 TS6-2。同时样品经超薄切片, 电子显微镜观察, 在脾、肝、肾组织细胞质中观察到直径为 30 nm 病毒样颗粒。经人工感染试验证实, 分离菌株及患病鳖内脏组织过滤液均可导致中华鳖发病死亡, TS6-1 和 TS6-2 的 LD₅₀ 分别为 3.2×10^7 CFU/mL 和 1.0×10^8 CFU/mL。以患病鳖肝、脾组织的过滤液注射健康鳖后, 3~5 天内所有鳖全部死亡。通过对细菌形态、生理生化特性的测定, 判定 TS6-2 属于嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。同时对 TS6-1 进行了 16S rRNA 分子鉴定, 将测定的序列递交 NCBI 进行 BLAST 同源序列比对, 与迟缓爱德华氏菌的 16S rRNA 基因具有较高的同源性 (99%), 该序列在 GenBank 上的登录号为 DQ884466。结合细菌的生理生化特性, 判定 TS6-1 属于迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)。由此认为中华鳖白底板病由病毒和嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌混合感染引起。药敏试验结果表明, TS6-1 对先锋 V、丁胺卡那敏感, TS6-2 对卡那霉素、庆大霉素、丁胺卡那敏感。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 815-822]

关键词:中华鳖; 白底板病; 病毒; 迟缓爱德华氏菌; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S947.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2007)05-0815-08

近年来, 中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 病害在全国众多省份暴发流行, 给养殖户造成重大的经济损失, 其中白底板病危害最严重, 发病的主要是体质量在 100 g 以上的幼鳖、成鳖及亲鳖, 发病率为 30%~100%, 病害成为严重威胁着中华鳖养殖业健康发展的主要因素之一。用抗菌素、中草药等治疗, 效果往往不显著, 死亡率很高。该病的病因较为复杂。陈晓岚等^[1]报道嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 是中华鳖白底板病的病原; 池信才等^[2]和张奇亚等^[3]认为该病主要是由病毒引起; 叶巧真等^[4]则认为白底板病是由嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和病毒混合感染引起的。而病毒的致病性问题以及病毒与细菌在致病过程中的关系问题, 至今仍未有很明确的实验予以阐明, 这样势必给防治带来一定的困难和盲目性。研究鳖病毒与细菌的致病性问题, 可以为疾病的防治提供有价值的理论依据。本研究对某次中华鳖白底板病规模暴发的原因作了调查与分析, 以期对养殖中华鳖白底板病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病中华鳖取自浙江嘉兴某中华鳖养殖场, 该养殖场于 2005 年 7 月因白底板病暴发而造成鳖大量死亡。2005 年 6 月初将中华鳖从温室移到室外池塘, 共 30 000 余只, 7 月初开始, 每天死亡 20~40 只, 其中 4 个池塘发病最为严重, 死亡率高达 80%。发病鳖浮游于水面, 无力, 体表完整无损, 腹甲灼白。解剖后, 无血液流出, 肌肉苍白无血色, 内脏器官大多呈失血状。肝呈土黄色或有花斑状出血点。肠充血或苍白, 内有血或淤血块, 便血。健康中华鳖购自浙江湖州某养鳖场, 平均体质量 150 g, 饲养于容积为 2 m³ 的水泥池中, 每池中饲养 6 只, 水温 25~28 ℃。

1.2 细菌分离

从 10 只患病鳖的肝、肾、脾、血、肌肉组织取样进行琼脂平板划线分离, 所用培养基为 TSA。30 ℃ 培养 24~48 h, 挑取优势菌落分别在 TSA 平板上划线分离数次, 获得 2 株纯培养物, 菌落较小的编号为

收稿日期: 2006-08-18; 修订日期: 2007-03-27.

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD03B0502); 浙江省科技厅重大招标项目 (2004C12007)。

作者简介: 沈锦玉 (1963-), 女, 研究员, 从事水生动物病害防治研究. Tel: 0572-2041403; E-mail: sjinyu@126.com

TS6-1, 菌落较大的编号为 TS6-2。用含 15% 甘油的生理盐水保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱备用。

1.3 感染实验

1.3.1 细菌感染实验 将待检菌株斜面培养 24 h 后, 用无菌生理盐水 (0.85% NaCl) 洗下, 制成菌悬液。实验设 4 个实验组, 分别注射菌液浓度为 1.8×10^9 CFU/mL、 1.8×10^8 CFU/mL、 1.8×10^7 CFU/mL、 1.8×10^6 CFU/mL, 每只注射 0.2 mL, 对照组注射等量的无菌生理盐水。每组 6 只, 设 3 个平行组, 水温 $25 \sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。按 Reed - Muench 法^[5]计算 LD_{50} 。

1.3.2 组织过滤液感染实验 将患病中华鳖的肝、脾组织加 10 倍于其体积的无菌生理盐水匀浆, 反复冻融 2~3 次, 以 $6\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 再经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 滤液分别注射健康中华鳖的腹腔, 注射量 0.2 mL/只, 每组 6 只, 对照组注射等量的无菌生理盐水。共分 3 组。

1.4 细菌分类鉴定

1.4.1 常规生化鉴定 纯培养的细菌经 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、18~20 h 平皿培养, 培养物作革兰氏染色, 进行细菌形态观察, 生理生化特性测定采用肠杆菌科鉴定盒 (杭州天和微生物试剂有限公司) 及 API 20E [法国, 生物梅里埃公司 (BioMerieux)] 生化鉴定条进行。

1.4.2 16Sr RNA 方法的进一步验证 用于 TS6-1 菌株 16S rRNA PCR 反应的引物为: (5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 (5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGCA-3')。该对引物由 Wilmotte 等^[6]根据大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 16S RNA 基因序列设计, 预期扩增产物 1 534 bp, 由上海申友生物技术有限责任公司合成。细菌的培养和 DNA 的提取按常规方法进行, 即纯化的菌种用 TSB 液体培养基在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液, 于 $5\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 收集菌体, 用酚-氯仿法抽提细菌基因组 DNA, 用紫外分光光度法测定 DNA 浓度。PCR 反应体系 (50 μL) 为: 5 μL 的 $10\times$ 扩增缓冲液, 模板 DNA 1 μL (1 ng), 引物 10 $\mu\text{mol/L}$ 各 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 1 μL , 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 超纯水 40.5 μL , 混匀。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 44 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 PCR 产物 7 μL , 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物采用 DNA 快速纯化/回收试剂盒 (北京鼎国生物技术有

限责任公司) 进行回收。PCR 产物经纯化后, 克隆到 pMD 18-T 载体, 转化 *E. coli* TG1, 在 LB 培养基上培养, 挑取白色菌落, 碱法提取质粒, 用 *Pst* I 和 *EcoR* I 双酶切及 PCR 鉴定确认阳性重组质粒。应用 ABI PRISM™ 377 DNA 自动测序仪 (上海博亚生物公司) 对阳性重组质粒进行测序, 运用 NCBI 的 BALST 程序将所得序列与同源序列进行比对。

1.4.3 进化树构建及分析 将完成测序的 TS6-1 16S rRNA 基因序列与已发表的 9 株迟缓爱德华氏菌 (*E. tarda*) (GenBank 登录号分别为: AY775313、DQ233654、AB050830、AB050831、AB050832、AB050827、AB050828、AB050829、AF015259) 及 5 株鲶鱼爱德华氏菌 (*E. ictaluri*) (AB050826、EF015475、DQ985469、EF015476、AF310622) 16S rRNA 基因序列用 DNASTAR 软件构建进化树, 分析进化关系。

1.5 药物敏感试验

将菌悬液均匀涂布于普通营养培养基平板上, 贴上不同药物的药敏纸片 (购自杭州天和微生物试剂有限公司), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后检测抑菌圈大小。

1.6 电镜超薄切片观察

将患病鳖的肾、肝、肠、脾等组织经戊二醛、四氧化锇固定, 包埋, 超薄切片, 染色后在电子显微镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 细菌分离

对肾、肝、脾进行细菌分离, 在 TSA 上均有大量细菌生长, 从菌落形态、大小、色泽来分, 优势菌主要有 2 类, 各挑取单菌落进行纯培养, 编号为 TS6-1 和 TS6-2。

2.2 细菌感染试验

细菌以不同的浓度腹腔注射健康中华鳖后, 第 3~4 天出现发病死亡, 结果见表 1。

从表 1 可知, TS6-1 对中华鳖的半数致死量 (LD_{50}) 为 3.2×10^7 CFU/mL, TS6-2 的 LD_{50} 为 1.0×10^8 CFU/mL。细菌 TS6-1 的毒力比 TS6-2 强。死亡鳖内脏病变肉眼观察不明显。

2.3 组织滤液的感染实验

自然发病中华鳖的肝、脾组织的除菌上清液人工感染健康鳖后 (第 1 次感染实验), 3~5 d 内所有

鳖全部发病,行动迟缓,并死亡,解剖后发现肝呈花斑状。而对照组则没有发病或死亡。将人工发病鳖

的肝、脾组织的除菌上清液再次进行感染试验,3~5 d内所有鳖全部死亡,症状同第 1 次感染实验。

表 1 细菌对健康中华鳖的感染实验

Tab.1 Challenge test of bacterium isolated from diseased turtle

菌株 Strain	项目 Item	细菌感染浓度 / (CFU·mL ⁻¹) Bacteria concentration					
		1.8×10 ⁹	1.8×10 ⁸	1.8×10 ⁷	1.8×10 ⁶	对照 Control	LD ₅₀ / (CFU·mL)
TS6-1	死亡数 Death nos.	18	18	6	0	0	3.2×10 ⁷
	死亡率 / % Mortality	100	100	33.3	0	0	
TS6-2	死亡数 Death nos.	18	12	0	0	0	1.0×10 ⁸
	死亡率 / % Mortality	100	66.7	0	0	0	

2.4 细菌分类鉴定

2.4.1 细菌的生理生化特征 TS6-1 和 TS6-2 菌株的生理生化性状见表 2、表 3。根据表 2、表 3 菌株的生理生化特征,参照东秀珠等《常见细菌系统鉴

定手册》^[7]和布坎南等《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8], TS6-1 的鉴定结果为爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*), TS6-2 为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。

表 2 TS6-1 菌株的生理生化性状

Tab.2 Physiological and biochemical characterizations of TS6-1 isolate

生化性状 Characteristics	TS6-1	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	生化性状 Characteristics	TS6-1	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>
革兰氏染色 Gram stain	G ⁻	G ⁻	吲哚 Indole	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	蔗糖 Sucrose	+	-
O/F	F	F	葡萄糖 Glucose	+	+
葡萄糖产气 Gas production	+	+	丙二酸钠 Sodium malonate	-	-
运动性 Motility	+	+	山梨醇 Sorbitol	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	明胶水解 Gelatine hydrolysis	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	+	ONPG 水解 ONPG hydrolysis	-	-
脲 Urea	-	-	硫化氢 H ₂ S	+	+
甲基红试验 MR test	+	+	柠檬酸盐 Citrate	-	-
甘露醇 Mannitol	+	-	鼠李糖 Rhamnose	-	-
肌醇 Inositol	-	-	木糖 Xylose	-	-
V-P 试验 V-P test	-	-	棉子糖 Raffinose	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	甘露糖 Mannose	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	乳糖 Lactose	-	-

表 3 TS6-2 菌株的生理生化性状

Tab.3 Physiological and biochemical characterizations of TS6-2 isolate

生化性状 Characteristics	TS6-2	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	生化性状 Characteristics	TS6-2	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
革兰氏染色 Gram stain	G ⁻	G ⁻	吲哚 Indole	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	尿酶 Urease	-	-
O/F	F	F	水杨苷 Salicin	-	+
运动性 Motility	+	+	柠檬酸盐 Citrate	+	d
葡萄糖产气 Gas production	+	+	明胶水解 Gelatine hydrolysis	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	V-P 试验 V-P test	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	d	葡萄糖 Glucose	+	+
色氨酸脱氨酶 Tryptophane deaminase	-	-	山梨醇 Sorbitol	-	-
β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	+	+
硫化氢 H ₂ S	-	+	鼠李糖 Rhamnose	-	-
甘露醇 Mannitol	+	+	密二糖 Melibiose	-	-
肌醇 Inositol	-	-	苦杏仁 Amygdalin	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性; F: 发酵。

Notes: +: positive, -: negative, F: ferment.

2.4.2 细菌 16S rRNA 基因序列鉴定 菌株 TS6-1 的基因组经 PCR 扩增获得了预期的 1.5 kb 的特异条带, PCR 产物经回收, 并克隆到 pMD 18-T 载体。阳性重组质粒经 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切得到两条相应的条带, 小片段约 1.5 kb, 大片段约 2.6 kb (为

pMD 18-T 载体); 对阳性克隆进行 PCR 扩增, 仍能获得预期大小约 1.5 kb 的片段, 表明 1.5 kb PCR 扩增片段已克隆入 pMD 18-T 载体。挑选其中 1 个阳性克隆进行测序, 获得了细菌 16S rDNA 基因的部分序列, 部分序列如下:

tcggattact ggcgtaagcg ccgcaggcgg ttgttagtt gatgtgaatc ccgggctaac tgggaactgc atcaagactg gcaagctaga gtctcg-
taga gggaggtaga attccaggtg tagcgtgaa atcgtagag atctggagga ataccggtgg cgaagcgccg ctctggacg aagactgacg
ctcaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgtgtaa acgatgtcga ttggagggtt gtgcccttga ggcgtggcgt
cogaagctaa cgctttaat cgaccgctg gggagtagcg ccgaaggtt aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccga caagcggtgg agcatgtggt
ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tactcttgac atccagcgaa tctgttagag atacgggagt gccttcggga acgctgagac aggtgctgca
tggctgtcgt cagctcgtgt tgtgaaatgt tgggttaagt ccgcgaacga gcgcaaccct tatccttgtg tgccagcggt tcggccggga actcaaagga
gactgccagt gataaactgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcacat ggcccttacg agtagggcta cacacgtgct acaatggcgt atacaaagag
aagcgacctc gcgagagcaa gcggacctca taaagtacgt cgtagtcgg attggagtct gcaactcgac tccatgaagt cggaatcgct agtaacgtg
gatcagaatg ccacgggtgaa tacgttccc ggccctgtac acaccgccc tcacaccatg ggagtggtgt gcaaaagaag taggtagctt aaccttcggg
agggcgctta ccactttgtg attcatgact ggggtgaagt cgtaacaagg taaccgtagg ggaacctgcg gctggatcac ctccttaat

测定的序列 (登录号为 DQ884466) 递交 NCBI 进行 BLAST 同源序列比对, 与迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 的参考菌株的 16S rDNA 具有 99% 的同源性, 但与鲢爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的同源性也有 99%, 结合生理生化特性, 迟缓爱德华氏菌有动力, H₂S、MR 和吲哚均为阳性, 而鲢爱德华氏菌无动力, H₂S、MR 和吲哚均为阴

性^[9], 因此, TS6-1 菌株属于迟缓爱德华氏菌。

2.4.3 系统进化关系 TS6-1 16S rRNA 基因序列与其他已发表的爱德华氏菌 16S rRNA 基因序列的进化关系 (图 1)。发现迟缓爱德华氏菌 TS6-1 株与 AF015259、AB050829、AB050827、AB050828 株聚为一类, 成为独立的一枝; 而鲢爱德华氏菌的 AB050826、EF015475、DQ985469、EF015476、

AF310622 株聚为一类, 成为独立的一枝, 进化关系最近。而与其他迟缓爱德华氏菌 AY775313、DQ233654、AB050830、AB050831、AB050832 株的

16S rRNA 基因距离较远, 说明爱德华氏菌属中迟缓爱德华氏菌与鲑爱德华氏菌 16S rRNA 的基因变异不大。

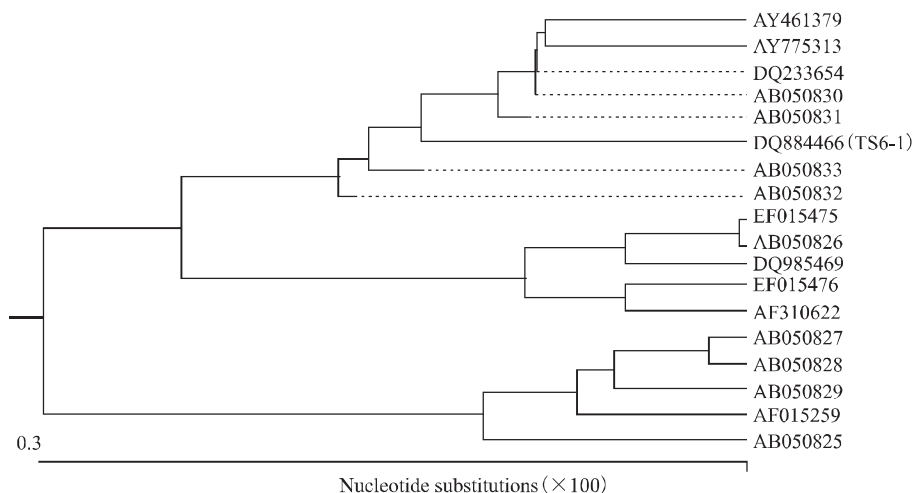


图 1 爱德华氏菌 16S rRNA 基因的进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Edwardsiella* based on 16S rRNA genes

2.5 药敏试验

从药敏实验结果显示, TS6-1 对先锋 V、丁胺卡那敏感, 对卡那霉素、庆大霉素中度敏感, 对强力霉素、复方新诺明、青霉素 G、氟哌酸、痢特灵、新霉素、四环素、红霉素、氯霉素、链霉素有抗药性。从表 5

得出, TS6-2 对卡那霉素、庆大霉素、丁胺卡那敏感, 对先锋 V、氟哌酸、痢特灵、新霉素、红霉素、氯霉素、链霉素、四环素中度敏感, 对强力霉素、复方新诺明、青霉素 G 有抗药性。

表 4 TS6-1 菌株的药物敏感试验结果

Tab.4 Sensitivity of strain TS6-1 to antibiotics

药 品 Antibiotics	纸片含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径 /mm Diameter of inhibitory zone	敏感性 Sensitivity	药 品 Antibiotics	纸片含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径 /mm Diameter of inhibitory zone	敏感性 Sensitivity
卡那霉素 Kanamycin	30	15	I	痢特灵 Furazolidone	300	12	R
强力霉素 Doxycycline	30	—	R	氟哌酸 Norfloxacin	10	13	R
复方新诺明 SMZ + TMP	23.75	—	R	新霉素 Neomycin	30	16	R
庆大霉素 Gentamicin	10	13	I	四环素 Tetracycline	30	10	R
先锋 V Cefazolin	30	24	S	红霉素 Erythromycin	15	—	R
青霉素 G Penicillin	10	—	R	氯霉素 Chloramphenicol	30	—	R
丁胺卡那 Amikacin	30	17	S	链霉素 Streptomycin	10	—	R

注: R—耐药, S—敏感, I—中敏。

Notes: R—resistance, S—sensitive, I—Intermediate.

表 5 TS6-2 菌株的药物敏感试验结果

Tab.5 Sensitivity of strain TS6-2 to antibiotics

药 品 Antibiotics	纸片含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory zone	敏感性 Sensitivity	药 品 Antibiotics	纸片含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory zone	敏感性 Sensitivity
卡那霉素 Kanamycin	30	21	S	痢特灵 Furazolidone	300	15	I
强力霉素 Doxycycline	30	22	R	氟哌酸 Norfloxacin	10	16	I
复方新诺明 SMZ + TMP	23.75	—	R	新霉素 Neomycin	30	23	I
庆大霉素 Gentamicin	10	21	S	四环素 Tetracycline	30	22	I
先锋 V Cefazolin	30	16	I	红霉素 Erythromycin	15	18	I
青霉素 G Penicillin	10	—	R	氯霉素 Chloramphenicol	30	14	I
丁胺卡那 Amikacin	30	22	S	链霉素 Streptomycin	10	14	I

注: R—耐药, S—敏感, I—中敏.

Note: R—resistance, S—sensitive, I—Intermediate.

2.6 病毒的电镜观察

在电子显微镜下看到肾、肝、脾组织细胞质内有同样的球状病毒样颗粒, 脾组织中最, 直径为 30 nm 左右 (图 2)。

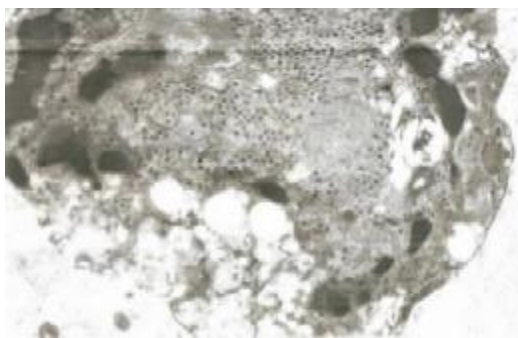


图 2 脾组织超薄切片 ($\times 10\,000$)

Fig.2 Viral particles in spleen tissue ($\times 10\,000$)

3 讨论

鳖白底板病症被认为是当前较难治疗的疑难病症之一, 主要原因是中华鳖白底板病病因复杂。不少学者对鳖白底板病进行了研究, 取得了较大的研究成果。对白底板病原的研究主要有 3 种看法: 池信才等^[2]、张奇亚等^[3]和朱家新等^[10]认为该病的主

要病原为病毒。陈晓岚等^[1]、江为民等^[11]认为病原为细菌, 陈晓岚等报道细菌病原有 3 种: 嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和普通变形杆菌, 而江为民等报道只有 1 种即迟缓爱德华氏菌。叶巧真等^[4]、周兵等^[12]和陈信忠等^[13]则认为有细菌和病毒二种病原, 先病毒感染后细菌继发感染。叶巧真等^[4]认为, 虽然有 2 种病原, 但病毒不致死, 仅嗜水气单胞菌有致死作用; 周兵等^[12]报道, 从电镜中看到的病毒颗粒, 但没有进行感染试验, 同时仅分离到毒力较强的嗜水气单胞菌; 陈信忠等证实病毒与嗜水气单胞菌均有致死作用。本实验从患白底板病的内脏器官中分离到嗜水气单胞菌、爱德华氏菌, 能使正常中华鳖致病, 同时组织滤液也能致病, 从患病鳖的电镜切片中观察到病毒颗粒, 由此认为白底板病由病毒和嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌混合感染引起, 这与叶巧真等、周兵等和陈信忠等的实验结果相似。纵观中华鳖疾病, 不难发现有两点是很突出的, 即一症多病和一病多症。前者如白底板病可由嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、普通变性菌和病毒引起^[1-4, 10-13]; 后者如嗜水气单胞菌, 此病原可引起腐皮病、疔疮病、红底板病和白底板病等多种不同症状的疾病^[14-16]。因此根据单一症状盲目下药是不可取的, 只有对病原进行广泛而深入的研究才能提

供有效的防治措施。

从病鳖分离到的2种致病菌属于嗜水气单胞菌和爱德华氏菌属(*Edwardsiella*),但由于爱德华氏菌属的各种之间差异较小,且不时有新种出现^[17-19],因此为了进一步确认此种爱德华氏菌的分类地位,利用16S rRNA对其作进一步分子鉴定,将测定的16S rRNA基因的部分序列递交NCBI进行BLAST同源序列比对,与迟缓爱德华氏菌参考菌株的16S rRNA基因具有99%的同源性,但与鲇爱德华氏菌的同源性也有99%,结合生理生化特性判定TS6-1菌株属于迟缓爱德华氏菌。因此,在细菌分类鉴定时,将生理生化特性测定与分子鉴定相结合,是一种科学的鉴定方法,会使鉴定结果更可靠、更准确。

从鳖流行病学调查情况来看,白底板病在5~8月份流行,发病高峰期水温22~32℃,特别是温室移往外塘的鳖易患此病,气温突变(如寒潮、连续阴雨天气等)也容易诱发该病,鳖在转移时因干池捕捉、药浴、消毒、转运、下池放养等过程造成强烈的应激反应更是引发白底板病的一大诱因。此外,外塘温室之间的光照、水温、水质等方面的环境变化,转池过程中的应激反应使鳖在刚放入外塘的1周内很少摄食,并在池底打窝导致池水浑浊、水质下降,这些不利因素会导致鳖免疫功能下降,为病原提供了可乘之机,一旦条件适宜就全面暴发白底板病^[13,20]。

对药物的敏感与否是细菌的特征之一,虽然试验中有国家禁用的药物如氯霉素、红霉素、痢特灵等,但这并不是说明在生产上使用它们,而只是说明细菌对这些药的敏感度。但另一方面可根据药敏实验结果有针对性的选择药物,结合国家允许的渔用药物^[21],指导养殖者对症下药。从本次药敏结果看,TS6-1和TS6-2均对丁胺卡那敏感,可将丁胺卡那拌饵投喂,外泼含氯消毒剂如三氯异氰尿酸消毒,对细菌性疾病起到良好的治疗效果。但该病例由病毒与细菌混合感染,治疗有一定的难度。

参考文献:

[1] 陈晓岚,周常义,青新.鳖“白底板”致病细菌的研究[J].水产

学报,1997,21(3):309-315.

[2] 池信才,吴定虎,黄槐,等.养殖中华鳖出血病病毒的电镜观察[J].鱼类病害研究,1998,20(3):1-5.

[3] 张奇亚,李正秋,江育林,等.中华鳖病毒病原的发现.科学通报,1996,41(21):1987-1990.

[4] 叶巧真,何建国,翁少萍,等.中华鳖白底板病和红底板病病毒及细菌的致病性[J].淡水渔业,1999,26(8):3-7.

[5] 黄祯祥,洪涛,刘崇柏.医学病毒学基础及实验技术[M].科学出版社,1987:143-144.

[6] Wilmotte A, Van der Auwera G, De Wachter R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis HTF* ('*Mastigocladus laminosus HTF*') strain PCC7518, and phylogenetic analysis [J]. FEBS Letters, 1993, 317: 96-100.

[7] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:9-42.

[8] Holt J G, Krieg N R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th ed [M]. Baltimore London: Williams & Wilkins Co, 1994:353-376.

[9] 陈翠珍.爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病[J].河北科技师范学院学报,2004,18(3):70-76.

[10] 朱家新,方兰勇,吴新民,等.鳖白底板病的临床诊断与防治研究初报[J].畜牧与兽医,2000,32(1):27-28.

[11] 江为民,王宇,康惠,等.中华鳖爱德华氏菌病的病原与防治研究[J].内陆水产,2000,11:11-13.

[12] 周兵,黄小辉,郑毅艺.中华鳖白底板病病原体及组织病理研究[J].内陆水产,2000,10:7-9.

[13] 陈信忠,黄印尧,颜江华.一起病毒和细菌混合感染引起鳖病的诊治报告[J].福建畜牧兽医,1998,3:3-4.

[14] 孙佩芳,蔡完其,吴建农,等.鳖穿孔病的病原研究[J].水产学报,1996,20(2):120-124.

[15] 黄少涛,林祥日.鳖产气单胞菌病及其防治[J].福建水产,1996,3:62-64.

[16] 陆宏达,金丽华.鳖嗜水气单胞菌败血症的研究[J].水产学报,1996,20(3):223-234.

[17] 王国良,徐兴林,路政.鳊鲡爱德华氏病病原菌及一新种[J].水产学报,1993,17(3):224-229.

[18] 韩先朴,李伟,陈光辉.鳊鲡爱德华氏病的研究[J].水生生物学报,1989,13(3):259-264.

[19] Grimont P A E. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov, the causative agent of enteric septicemia of Catfish [J]. Internat J Syst Bacteriol, 1980, 31(4):347-351.

[20] 季龙辉.中华鳖白底板病的发病原因及防治方法初析[J].内陆水产,2002,12:30-31.

[21] NY5071-2002,无公害食品、渔用药物使用准则[S].

Pathogen in white abdominal shell disease of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*)

SHEN Jin-yu¹, PAN Xiao-yi¹, YU Xu-ping², YIN Wen-lin¹, CAO Zheng¹, WU Ying-lei¹

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Key Laboratory of Fish Health and Immunology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Huzhou 313001, China; 2. Zhejiang University, Science and Technology of Animal, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Serious epidemic in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) cultured in ponds broke out in 2005 in China. The main symptoms were white abdominal shell and bleeding spots in liver. By electron microscopy, virus-like particles with diameter at 30 nm were observed in spleen, kidney and liver of infected *T. sinensis*. The virus and bacteria isolated from diseased turtles with white abdominal shell disease were confirmed to be the pathogens of the epidemic based on the challenge test. The tissue suspension of liver and spleen from the diseased turtle caused the normal turtle to die within 3–5 days. Two strains of the bacteria with strong infecting ability were isolated, which were TS6-1 and TS6-2. The LD₅₀ of TS6-1 and TS6-2 were 3.2×10^7 CFU·mL⁻¹ and 1.0×10^8 CFU·mL⁻¹, respectively. The colony morphological, physiological and biochemical characters of the two isolates were determined. The results indicated that TS6-2 isolate belonged to *Aeromonas hydrophila*. In order to further classify TS6-1, 16S rRNA sequences were determined. About 1.5 kb fragments of the isolate was amplified by PCR using general primers of nuclear ribosomal DNA. The PCR product was extracted and cloned into pMD 18-T vector, and then was transformed into *E. coli* TG1. The recombination plasmid was identified by restriction enzymes digestion and by PCR. One selected clone was then sequenced. The BLAST result of the sequence showed that TS6-1 had high homology (99%) with respect sequence of *Edwardsiella tarda*. The accession number of 16S rRNA gene sequence was DQ884466 on GenBank. Phylogenetic tree of *Edwardsiella* based on 16S rRNA gene sequence analyzed with DNASTAR software showed that strain TS6-1 clustered together with *Edwardsiella tarda* (AF015259, AB050829, AB050827, AB050828). The test of sensitivities of the two isolates to 14 kinds of antibiotics revealed that TS6-1 was sensitive to amikacin and cefazolin, and TS6-2 was sensitive to kanamycin, gentamicin and amikacin. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 815–822]

Key words: *Trionyx sinensis*; white abdominal shell disease; virus; *Edwardsiella tarda*; *Aeromonas hydrophila*