

牛蛙爱德华氏菌病的研究

樊海平 徐娟儿 王 易 黄晓枫

(福建省淡水水产研究所, 福州 350002)

摘 要 1993年9月—1994年5月, 作者对牛蛙的肝、眼内水样液进行了病原菌分离、人工感染、病原菌生理、生化特性和药物的敏感性的测定, 观察了病理组织变化等。结论认为病原菌为革兰氏阴性、周身鞭毛能运动的短杆菌; 氧化酶、V-P反应阴性, 过氧化氢酶、 H_2S 产生、吲哚反应、甲基红反应为阳性; 最适生长所需温度、盐度和pH值分别为30–35℃、5–10‰和7.0。病菌为迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*), 它对吡嗪酸、复方新诺明、氯霉素等敏感。主要病理变化为肿大的肝脏、肾脏内形成局部坏死区、肠、胃发炎, 肠粘膜层坏死、脱落。

关键词 牛蛙, 爱德华氏菌病, 迟钝爱德华氏菌, 病理

前 言

在牛蛙养殖中, 近年发现一种疾病, 主要外部症状为蛙体发黑、体瘦, 四肢无力, 腹胀气, 下眼睑不能上翻覆盖眼球, 且下眼睑由透明转变为乳白色, 肝脏一般肿大呈黄色, 肠道发炎, 肾脏充血等。病蛙的死亡率为100%。本病从幼蛙至成蛙阶段均发生, 流行季节不明显, 周年均发病, 发病率占5%左右。一般出现外部症状15–20天后才发生死亡。本文主要研究本病的病原菌的生理、生化特性, 对药物的敏感性和主要病理变化等。

材 料 与 方 法

(一)病原菌的分离

1993年9月, 福建省漳浦县旧镇牛蛙研究所养殖的幼蛙及成蛙发病, 取典型症状的病蛙, 用70%的酒精反复擦洗病蛙体表三次, 以无菌法解剖, 取肝脏中层组织及眼内水样液, 划线接种于普通培养基平板上, 30℃培养24小时后选取形态、色泽一致, 占优势的菌落进行重复划线纯化。将纯培养物接种于普通斜面培养基上保存, 供人工感染与细菌学鉴定用。

(二)人工感染试验

取体重为40克左右的健康蛙, 于水族箱中饲养4天, 稳定后供人工感染用。将于30℃培养24小时的斜面培养物用无菌生理盐水洗下, 制成浓度达 10^8 个/ml的菌悬液,

用无菌注射器进行腿部肌肉注射感染。每 5 只蛙为一组, 每只蛙接种菌液 0.2ml。对照组注射 0.2ml 无菌生理盐水。饲养水温为 25–28℃, 不投饲料, 每天换水一次并观察记录结果。对 9302 菌株出现典型症状的病蛙, 从眼内水样液重复分离、纯化细菌后, 按上述方法进行重复人工感染试验。

(三)病原菌鉴定

病原菌的生物学性状, 按照中国科学院微生物研究所细菌分类组^[1]介绍的方法进行测试, 根据 John, J. Farmer III 和 Alma, C.M.^[7]的分类法鉴定至种。

(四)病原菌对温度、盐度和 pH 值的耐受性试验

试验用培养基为 1% 的蛋白胨水, 每管装无菌培养基 5.0ml, 加一滴新鲜培养的试验菌液, 30℃ 培养 24 小时, 用 721 分光光度计 ($\lambda=560\text{nm}$) 测定菌悬液的混浊度。所设温度梯度为 3.5、8、10、20、30、40、50℃; 盐度梯度为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、50、70; pH 值梯度为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12。

(五)病原菌对药物的敏感性试验

所用药敏纸片为上海生物制品公司制造, 每片含药物 10 μg 。用普通培养基平板, 涂布法接种细菌, 每个平板贴纸片 4 张, 每种药物设 2 个重复, 于 30℃ 培养 36 小时后测量抑菌圈直径, 对照使用说明书, 检测病原菌对药物的敏感程度。

(六)病理组织变化的观察

取典型症状病蛙的各组织器官, 用 10% 的中性福尔马林固定, 常规石蜡切片法, H.E. 染色, 中性树脂封片, 于 Olympus 显微镜下观察病理变化并进行显微照相。

结 果

(一)病原菌的分离与鉴定

从病蛙的肝脏、眼内水样液中分离到菌落形态, 培养特征一致的数个菌落, 分纯后, 选取三个菌株 9301 (肝脏分离)、9302 和 9303 (眼内水样液分离), 用 9302 菌株感染后出现典型症状病蛙, 由眼内水样液分离、纯化细菌得菌株 9304, 将 9304 菌株进行再感染。病原菌在 TCBS 上不生长, 在 30℃ 普通培养基上培养 24 小时形成边缘整齐、白色透明、中央略凸、表面湿润、直径为 0.8mm 左右的圆形菌落。菌体大小平均为 1.0~1.5 $\times$ 2.0~3.0 μm , 革兰氏阴性, 周鞭毛, 对 O/129 弧菌抑制剂不敏感, 氧化酶, V-P 反应试验阴性; 过氧化氢酶、甲基红反应、硫化氢产生、吲哚反应试验阳性; 还原硝酸盐、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、丙二酸利用试验阳性, 苯丙氨酸脱氨酶、卵磷脂酶、纤维素水解试验阴性; 分解葡萄糖、麦芽糖、木糖、果糖产酸; 不分解七叶苷、蕈糖、山梨糖、甘露醇等; 在氯化钾培养基中不生长。试验结果列于表 1 和表 2。据此, 病原菌鉴定为迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)。病原菌的形态见图版-1。

(二)人工感染试验

细菌感染 2 天后, 发现部分蛙活动能力降低, 于水族箱内静伏不动, 对惊动反应不敏感, 第 4 天开始部分蛙上下眼睑翻动困难, 体色发黑, 腹胀气, 第 7 天开始出现个别蛙死亡。至 15 天后实验结束时, 虽然实验组蛙均显示下眼睑不能下翻, 成为乳白色, 但各组均有蛙存活, 对照组蛙均正常。(见表 3)

表 1 分离菌株的生理、生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated bacteria

项 目 Item	分离菌株(4株) Present isolate (4 isolates)	<i>E.tarda</i>	项 目 Item	分离菌株(4株) Present isolate (4 isolates)	<i>E.tarda</i>
在 TCBS 上生长 Growth on TCBS	-	-	KCN 中生长 Growth in KCN	-	-
周鞭毛 Peritrichous flagella	+	+	氧化酶 Oxidase	-	-
革兰氏染色 Gram stain	-	-	过氧化氢酶 Catalase	+	+
无 NaCl 生长 Growth in 0%NaCl	+	+	淀粉酶 Amylase	-	-
5%NaCl 生长 Growth in 5%NaCl	+	+	脲 酶 Urease	-	-
7%NaCl 生长 Growth in 7%NaCl	-	-	明胶酶 Gelatinase	-	-
4℃ 生长 Growth at 4℃	+	+	脂 酶 Lipase	-	-
42℃ 生长 Growth at 42℃	+	+	几丁质酶 Chitinase	-	-
50℃ 生长 Growth at 50℃	-	-	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	-
0/129 敏感性 Sensitive to 0/129	-	-	葡萄糖酸盐氧化 Gluconate oxidase	-	-
荚 膜 Capsule	-	-	葡萄糖发酵 Glucose ferment	+	+
芽 孢 Spore	-	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-	-
纤维素水解 Cellulolytic	-	-	精氨酸脱氨酶 Arginine deaminase	+	-
H ₂ S 产生 H ₂ S Production	+	+	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-
V-P 反应 Voges Proskauer reaction	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+
甲基红试验 Methyl red test	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+
吲哚试验 Indole test	+	+	石蕊中奶反应 Litmus milk reaction	还 原 reduction	-
丙二酸盐利用 Malonate utilization	-	-	卵磷脂酶 Lecithinase	-	-

表 2 分离菌株对糖类的发酵试验
Table 2 Carbohydrate fermentation tests of the isolated bacteria

糖 类 Carbohydrate	分离菌株(4 株) Present isolate (4 isolates)	<i>E. tarda</i>	糖 类 Carbohydrate	分离菌株(4 株) Present isolate (4 isolates)	<i>E. tarda</i>
七叶苷 Esculin	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	肌 醇 Inositol	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	血清菊糖 Inulin	-	-
蔗糖 Trehalose	-	-	卫矛醇 Dulcitol	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	果 糖 Levulose	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	-	水杨苷 Salicin	-	-
木 糖 Xylose	+	-	蔗 糖 Surcose	-	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	乳 糖 Lactose	-	-
松三糖 Melezitose	-	-	淀 粉 Starch	-	-

表 3 分离菌株的人工感染结果
Table 3 The results of the artificial infection experiments of the isolated bacteria

菌株号 No. of strains	试验蛙数 No. of frogs in experiment	菌液浓度 (cell / ml) Concentration of bacteria(cell / ml)	剂量(ml) Dosage(ml)	蛙体重(g) Weight of frogs(g)	症状出现率(%) Symptom present rate(%)	症状出现时间(天) Symptom Present time (day)
9301	5	1.2×10^5	0.2	40 ±	100	7
9302	5	1.0×10^5	0.2	40 ±	100	10
9303	5	9.6×10^5	0.2	40 ±	100	10
9304	5	1.2×10^5	0.2	40 ±	100	12
对照 Control	5	生理盐水 Physiological saline	0.2	40 ±	-	-

(三)病原菌对温度、盐度和 pH 值的耐受性试验

适宜温度范围为 4-45℃, 最适生长温度范围为 30-35℃, 当温度低于 35℃ 或高于 50℃ 时不能发育; 对盐度适宜范围为 0-50‰, 最适盐度范围为 5-10‰, 当盐度超过 60‰ 时不发育; pH 值的适宜范围为 5-10, 最适 pH 值为 7, 当 pH 值低于 4 或超过 11 时不发育。

(四)病原菌对药物的敏感性试验

分离菌株对吡嗪酸、万可霉素、氯霉素、卡那霉素、庆大霉素、强力霉素和利福平敏

感；对呋喃唑酮、丁胺卡那霉素和头孢唑啉中度敏感；对苯唑青霉素、青霉素 G 及红霉素等具有抗性（见表 4）。

表 4 分离菌株对药物的敏感性

Table 4 The sensitivity of the isolated bacteria to drugs

药物名称 Name of drug	敏感性 Sensitivity	药物名称 Name of drug	敏感性 Sensitivity
吡哌酸 Piperacillin	++	头孢唑啉 Cefazolin	+
羧苄青霉素 Carbenicillin	-	先锋霉素 Cephalothin	++
苯唑青霉素 Oxacillin	-	万古霉素 Vancomycin	++
青霉素 G Penicillin G	-	复方新诺明 Cotrimexazole	++
链霉素 Streptomycin	-	氯霉素 Chloramphenicol	++
新霉素 Neomycin	++	妥布霉素 Tobramycin	+
庆大霉素 Gentamycin	++	红霉素 Erythromycin	-
卡那霉素 Kanamycin	++	呋喃唑酮 Furazolidone	+
丁胺卡那霉素 Amikacin	++	恶噻酸 Oxolinic acid	-
氨苄青霉素 Ampicillin	+	强力霉素 Doxycycline	++
利福平 Rifampicin	++	杆菌肽 Bacitracin	-

注: ++——敏感; +——中度敏感; ——抗性

Note: ++——Sensitive; +——Mid. sensitive; ——Resistant.

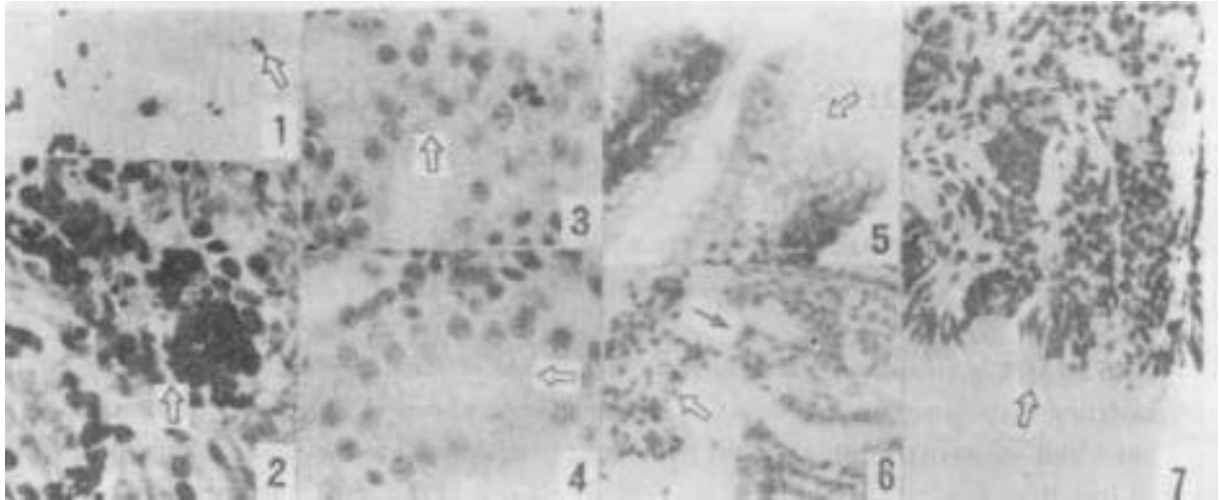
(五)病理组织变化的观察

病蛙肝脏呈黄色，切片显示肝脏呈结节状坏死。坏死区肝细胞死亡、分解、淋巴细胞聚积，分解的细胞碎屑、淋巴细胞及细菌形成坏死灶（图版-2）。肾脏充血、肾小管上皮细胞分解，严重时肾小管上皮细胞完全分解，分解物散入肾小管腔，肾小管功能丧失（图版-3、4）。胃上皮细胞粘液分泌增加，炎性细胞浸润（图版-5）。肠道发炎，淋巴细胞浸润，粘液分泌增加，部分肠绒毛坏死，坏死物脱落至肠管中（图版-6、7）。

讨 论

1. 在《伯杰分类系统细菌学手册》第一卷中，爱德华氏菌属分为三个种，本文分离菌株的生理、生化特性与迟钝爱德华氏菌相似，因此作者定名为迟钝爱德华氏菌。但本文分离

菌株对药物的敏感性与卢全章等^[2]分离到的迟钝爱德华氏菌存在一定差异。本文分离菌株对青霉素类不敏感, 而卢全章等分离菌株对青霉素类敏感, 这可能因为不同菌株感染不同养殖品种及分布地理环境不同而存在一些生理差异所致。



1. 鞭毛染色后迟钝爱德华氏菌的形态 ($\times 1000$); 2. 肝脏坏死结节 ($\times 400$); 3. 肾小管开始坏死 ($\times 400$); 4. 肾小管全部坏死 ($\times 400$); 5. 胃粘膜粘液分泌增加 ($\times 100$); 6. 肠绒毛坏死、脱落 ($\times 100$); 7. 肠绒毛粘连、粘液分泌增加 ($\times 200$)。

1. Morphology of *E. tarda* by flagellum stain ($\times 1000$); 2. Necrotic nodule in the liver ($\times 400$); 3. Renal tubule epithelium is necrotized in initial stage ($\times 400$); 4. Renal tubule epithelium is all necrotized ($\times 400$); 5. There is increased production of mucus from stomach mucous membrane ($\times 100$); 6. The intestinal villus degenerate with detritus within the luminal ($\times 100$); 7. The intestinal villus conjoin with increased production of mucus ($\times 200$)

2. 牛蛙的细菌性疾病主要有红腿病^[4], 脑膜炎脓毒性黄杆菌病^[5]、脱皮病^[3]等, 但牛蛙的爱德华氏菌病至今在国内外未见有报道。爱德华氏菌为引起水产养殖动物疾病的重要病原菌之一, 它能引起鳊鲈的肝肾病^[2]、沟鲈、鲤鱼、鲢鳙类、罗非鱼等的疾病^[6], 病鱼的主要症状为肝脏、肾脏肿大、消化道发炎。本文研究结果显示牛蛙爱德华氏菌病主要引起肝脏、肾脏肿大, 局部坏死及消化道发炎。这与鱼类的爱德华氏菌病病理变化相似, 但引起牛蛙眼睑不能翻动而呈乳白色的症状在鱼类爱德华氏菌病的研究中还未发现, 这种眼部病变可能可作为诊断依据。和鱼类爱德华氏菌病相似, 牛蛙爱德华氏菌病为慢性病, 且周年发生, 引起的总死亡率并不太高, 但死亡持续时间长, 累积死亡率较高。

参 考 文 献

- [1] 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, 111-193。科学出版社。
- [2] 卢全章, 朱心玲, 1994。鳊鲈肝肾病病原菌的研究。水生生物学报, 18(4): 360-367。
- [3] 肖启东, 1993。牛蛙脱皮病治疗一法。中国水产, (7): 27。
- [4] 严爱莲等, 1989。嗜水气单胞菌引起的牛蛙红腿病的诊断。动植物检疫, (1): 21-22。
- [5] 陈辉明等, 1994。牛蛙脑膜炎脓毒性黄杆菌病。水产科技情报, 21(1): 11-12。
- [6] Austin, B. and D. A. Austin, 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish, 196-205. Chichester.

er: Ellis Horwood Limited.

- [7] John, J. Famer III, Alma C. M, 1984. Genus X. *Edwardsiella ewing* and mcwhorter 1965, 486-491, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's Mannual of systematic bacteriology, Vol. I. Baltimore: The Williams & Wikins Co.

STUDIES ON EDWARDSIELLOSIS OF *RANA CATASBELANA*

Fan Haiping Xu Juaner Wang Yi Huang Xiaofeng

(The Freshwater Fishery Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002)

ABSTRACT An epizootic hepatic and renal disease of *Rana catasbeiana* was studied by isolating pathogen, artificial infection, testing the biochemical, physiological characteristics and sensitivity to drugs of the pathogen, observing the pathological changes of the ill frog from september, 1993 to May, 1994. The *Edwardsiella tarda* was proved to be the pathogenic bacteria, it was gram negative short rod with peritrichous flagella, oxidase and voges proskauer reaction negative, catalase, sulfide production, indole test and methyl red test positive. The optimum temperature, salinity and pH for its growth were 30-35℃, 5-10‰ and 7, respectively. It was sensitive to piperacillin, cotrimexazole, chloramphenicol *et al.*. Focal necrosis was found in the swollen liver and kidney, the intestinal mucous membrane was usually necrotic and sloughed into the luman.

KEYWORDS *Rana catasbeiana*, Edwardsiellosis, *Edwardsiella tarda*, Pathology