

鳖“穿孔病”病原菌及其免疫防治

毛宁 杨岩花 赖琼华

(福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

廖才生

(福建永泰县福晚淡水养殖有限公司, 350700)

摘要 从鳖穿孔病灶分离得到 CH-108 菌株, 经理化鉴定为嗜水气单胞菌。药敏试验结果表明, 链霉素, 环丙沙星对其有一定抑菌作用。回接感染均产生穿孔和粗脖子疾病。用 CH-108 菌株制成菌苗进行免疫接种, 可产生有效的防治结果。

关键词 鳖, 嗜水气单胞菌, 穿孔病, 免疫接种

随着人工养鳖的迅速发展, 鳖病日趋增多。穿孔病是危害鳖较为严重的一种细菌性疾病。该病在大棚养殖中一年四季均可发生。其传染性强, 流行面广, 流行时间长, 发病率从 20%~90%, 并能引起鳖大批死亡。体重从 0.05~1.0 公斤的鳖都易患此病。其中 0.5 公斤以下鳖感染率最多, 是目前养鳖场普遍遇到的难题之一[于春然等 1996, 孙佩芳等 1996, 齐彩霞等 1995, 陆宏达和金丽华 1996, 程天印等 1996,]。在所见的文献和报导中, 穿孔病的防治常以呋喃唑酮拌饲料内服, 外加呋喃唑酮或 2.5% 食盐水浸洗消毒, 还未见采用免疫防治疗法[谭北平 1996, 杨先乐 1996a、b, 张胜宇和张晓刚 1996]。福晚淡水养殖有限公司 1995、1996 两年由于穿孔病而导致鳖最终死亡的占病死鳖总数的 60% 左右, 常规治疗难以见效。针对这一问题, 我们进行病原细菌的分离, 鉴定, 回接感染等, 同时进行穿孔病的免疫防治研究。

1 材料与方 法

1.1 材料鳖来源及病鳖症状

健康的鳖与病鳖均来自福晚淡水养殖有限公司。病鳖发病初期颈部, 背甲, 腹部, 裙边和四肢基部出现点状小突起数个或数十个。以后逐渐扩大成疔疮, 四周红肿, 向外突起, 此时鳖开始精神不振, 行动缓慢, 脖子也变粗, 对外界反应迟顿。当疔疮溃烂后, 内容物呈脓状, 有腥恶臭味, 随着病情的严重, 背甲, 腹底等出现穿孔, 溃烂成深的孔洞。内脏解剖发现, 肺充血呈酱紫黑色; 肝脏肿大, 充血; 肠道内无食物, 红肿充血, 鳖最终死亡。

1.2 病原菌分离和鉴定

取濒临死亡的, 具有典型穿孔病的病鳖, 用清水冲洗干净后, 再用 75% 酒精棉球将孔洞及体表反复擦拭消毒。用无菌刀片刮去孔洞浅层的污物, 再用接种针挖取孔洞较深的内容物, 在普通营养琼脂平板上进行增殖培养, 在 37℃ 24 小时后再进行划线分离单菌落, 经纯化后转接斜面培养基上保存。

1.3 细菌鉴定及药敏试验

纯化后的细菌先经革兰氏染色为阴性杆菌, 再进行生理生化试验及药敏试验。生理生化试验部分采用微量发酵管, 药敏试验采用药敏纸片。微量发酵管和药敏纸片为上海市医学化验所和浙江省军区后勤部卫生防疫检验所产品。

1.4 人工回接感染试验

从鳖穿孔处分离纯化得到 CH-108 菌株, 将它接种到改良营养琼脂茄瓶中, 37℃培养 24 小时, 用生理盐水洗下培养物, 采用比浊管法(由北京药物生物制品检定所提供)稀释成 1.8×10^9 CFU/mL, 给 4 只 50~80 克健康鳖进行腹腔注射和后腿肌肉划破皮后破口皮下注射, 每只腹腔注射 0.05mL, 划痕处注射 0.05mL, 用生理盐水给 2 只健康鳖作等同注射为对照, 饲养在玻璃箱中, 玻璃箱置 4.6m² 的稚鳖池中, 池中水温 28~30℃与其它鳖池等同条件下饲养观察。

1.5 菌苗的制备

将人工回接感染验证其致穿孔病的 CH-108 菌株以及其它致病菌株, 分别接种在改良营养琼脂茄形瓶中, 36℃培养 24 小时, 用磷酸盐缓冲生理盐水收集菌体, 加入适量甲醛溶液(1.0%), 低温处理 5 天以上, 经安全检查后, 冰箱贮存, 需要用时用无菌磷酸盐缓冲生理盐水稀释制成 1.8×10^9 CFU/mL, 并添加至终浓度为 0.3% 苯酚, 冰箱贮存备用[中华人民共和国卫生部 1995]。

1.6 免疫接种与免疫效果检测

利用选鳖换池时, 按鳖体重 2mL 菌苗/kg 鳖的剂量, 使用连续注射器给鳖进行免疫接种。饲养一定时间后, 随机捞取 3 只鳖断头采血, 血液收集于离心管内, 于 9000~10000r/min 高速离心机离心 5~10min, 取上清液测定抗体效价。将免疫血清按 2 倍稀释法进行稀释, 抗原浓度为 1.8×10^9 CFU/mL, 采用破片凝集反应, 肉眼观察到凝集(+)之血清最高稀释度为凝集反应之效价。

2 结果

2.1 病原菌的鉴定

经分离纯化的 CH-108 菌株, 在普通琼脂平板上 37℃24 小时培养, 出现菌落为圆形、灰白色、半透明、表面光滑、湿润、边缘整齐、菌苔很薄。菌体革兰氏染色呈阴性, 短杆菌, 两端钝圆, 无芽孢无荚膜。鞭毛染色为单端单极生鞭毛, 生理生化试验结果见表 1, 根据《伯杰氏细菌鉴定手册》1984 第八版, 该菌为嗜水气单胞菌[陈奖励等 1993, Popoff 1984]。

2.2 药敏试验

用 21 种药敏试纸片对 CH-108 菌株进行药敏试验, 药敏纸片药物含量为 10⁴g/mL。抑菌圈直径小于 10 毫米为不敏感, 16~20 毫米为中度敏感, 大于 20 毫米为高度敏感。结果见表 2。根据抑菌圈大小和透明度综合分析, 链霉素和环丙沙星抑菌效果相对较好, 属中度敏

感。而氟喹酸、氯霉素、卡拉霉素、新生霉素、痢特灵、二甲胺四环素、万古霉素、氟哌酸、妥布霉素对 CH-108 菌略有一些抑菌作用,而头孢唑啉、新霉素、庆大霉素、利福平、菌必治、磺胺、青霉素、氨苄青霉素等对该菌都不起作用。

表 1 CH-108 菌株理化特性

Tab. 1 Physi-biochemical character of the strain CH-108

测定项目	特性	测定项目	特性	测定项目	特性	测定项目	特性
葡萄糖产酸产气	+	37°C生长	+	7%NaCl 胨水	-	水扬苷	+
引哌	+	肌醇	-	H ₂ S	+	卫子醇	-
赖氨酸脱羧酶	+	侧金盏花醇	-	L-精氨酸双水解	+	柠檬酸盐	+
L-色氨酸	+	VP	+	L-酪氨酸	+	甲基红	+
蔗糖	+	运动力	+	乳糖	-	尿素	-
甘露醇	+	氧化酶	+	阿拉伯糖	+	明胶液化	+
山梨醇	+	无 NaCl 肉汤	+	七叶苷	+	水溶性色素	-
麦芽糖	+						

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

表 2 CH-108 菌株对抗生素的敏感性

Tab. 2 The sensitivity of the strain CH-108 against antibiotics

药品名称	抑菌圈		药品名称	抑菌圈		药品名称	抑菌圈	
	直径(mm)	透明度		直径(mm)	透明度		直径(mm)	透明度
链霉素	18	++	头孢唑啉	-	-	环丙沙星	18	++
新霉素	-	-	妥布霉素	16	++	庆大霉素	-	-
氟哌酸	16	+	磺胺	-	-	氯喹酸	15	++
菌必治	-	-	氯霉素	12	++	利福平	-	-
二甲胺四环素	10	+	青霉素	-	-	新生霉素	10	++
氨苄青霉素	-	-	万古霉素	10	++	羧苄青霉素	-	-
卡拉霉素	10	+	氧喹酸青霉素	-	-	痢特灵	10	++
苯唑青霉素	-	-	红霉素	8	++			

2.3 人工回接感染

健康的鳖在腹腔注射和划痕注射感染后第4天开始出现病症,随后病症逐渐加重,发展为穿孔、大脖子,最后濒临死亡,结果见表3。将濒临死亡的病鳖再进行细菌分离,从穿孔处得到与初次分离到的菌株特征一致的细菌。对照组鳖无症状。

2.4 免疫应急试验

由于鳖的生性胆小,对生存环境中影响十分敏感,平时换池选鳖后,不仅会有1~2天鳖不愿吃食,并且会或多或少导致鳖生病或死亡。人工免疫要在换池选鳖过程中,再加腹腔注射,其刺激强度可能会导致较严重的应急反应。我们选用来自同一池的鳖进行试验,通过几批试验,得知鳖的应急反应与选鳖换池时的水温与棚温(或室温)温差关系极大。中午或下午捉鳖换池,无论是否免疫注射都会导致强烈的应急反应,使鳖大量死亡。20只鳖仅在中午换个池,没有注射任何物质,15天内死亡率达40%,而注射菌苗的20只鳖15天内的死亡率达50%。

而另一组晚上进行捉鳖, 注射菌苗或生理盐水, 15 天内均全部存活。在扩大试验中, 下午温差大时进行免疫注射的 1676 只鳖, 15 天内应急死亡率达 31.6%, 而晚上进行选鳖换池或免疫注射各 1000 只鳖, 半个月死亡死亡率均在 0.6% 以下。解决了免疫应急反应的问题。

表 3 CH-108 菌株人工回接感染结果

Tab. 3 The results of the injection of CH-108 into *Trionyx sinensis*

	人工回接感染天数			
	4 天	9 天	17 天	26 天
50 克鳖症状	划痕处出现疔疮	背甲上数个针尖大白斑, 划痕处疔疮扩大。	背甲两个大穿孔, 划痕溃烂, 脖子变粗。	背甲穿孔成深孔洞脖子粗大, 不吃食反应迟顿。
80 克鳖症状	划痕处出现疔疮	背甲数十个针尖状白斑, 划痕处疔疮扩大	背甲一个小穿孔, 划痕疔疮, 脖子略粗。	背甲穿孔向外突起, 中间呈深洞, 脖子变粗大, 行动缓慢。
对照组	正常	正常	正常	正常

2.5 抗体形成时间及效价测定

将 20 只 50~80 克左右健康的鳖, 按 2ml 菌苗/kg 体重的剂量进行人工免疫接种, 接种后饲养在稚鳖池中, 水温 28℃~30℃。免疫后 15、25、35、45、60 天分别随机取 3 只鳖进行断头采血测定 CH-108 抗体产生水平。参与凝集反应的抗原浓度固定为 1.8×10^9 CFU/mL CH-108 单一灭活菌, 凝集抗体水平测定结果显示: 当鳖免疫后 15 天就产生相当水平的抗体, 抗体效价为 1:160, 35~45 天鳖体内的抗体水平最高抗体效价为 1:1280, 二个月以后抗体水平下降很多, 抗体效价为 1:80 仍具有一定的抗病能力。

2.6 大池饲养免疫预防

分几批选择不同体重的鳖 12556 只进行扩大免疫接种。采用含有 CH-108 菌株的四联菌苗, 按 2mL/kg 体重剂量进行注射。其中 19[#]与 20[#]池 16[#]池与 7[#]池的鳖来自同一批鳖苗按体重大小分开投池。经过 53~69 天的饲养, 选鳖换池或清池销售进行统计。结果表明经过含 CH-108 菌苗免疫过的鳖极少出现穿孔病, 19[#]、20[#]池清池售鳖时, 二千多只鳖仅有 5 只鳖背甲有一小点, 占售鳖总数不到 2%, 其余的鳖外观无任何疤痕, 全部以一级品出售。售鳖同时, 随机取 3 只鳖断头采血, 测定血清中抗 CH-108 菌的抗体效价, 血清稀释为 1:80 肉眼可见凝集反应, 由此可见穿孔菌苗的免疫预防, 对鳖饲养过程中穿孔疾病不仅起到防治作用, 而且还可以提高鳖的商品等级。但是免疫预防是十分专一的, 与菌苗不同的致病菌侵袭鳖, 仍能导致鳖的致病死亡。B16[#]与 B7[#]池的鳖是从同一 A 池按体重大小而分开换池, 虽然鳖的来源一致, 免疫接种菌苗一致, 但由于水质管理不善, B16[#]池在换池后 32 天左右水质发黑几天, 造成连续一个星期鳖致病和死亡。但病、死鳖病因多为脖子粗、抽筋, 没发现有穿孔的病死鳖。B7[#]池水质管理正常, 鳖存活率达 97%。由此可见, 在鳖的饲养过程中免疫仅能起到预防作用, 而水质管理极为重要。

3 讨论

从鳖穿孔的病灶中分离得到 CH-108 菌株, 经理化鉴定为嗜水气单胞菌。人工回接感染

健康的鳖,导致鳖穿孔病以及大脖子病,证明分离的CH-108菌株确是穿孔病原菌。

CH-108菌株经药敏试验结果表明,仅链霉素和环丙沙星对该致病菌有一定的抑菌作用,大多数抗生素对该菌抑制作用效果较差或不起作用。在实际治疗中,该抗生素疗法效果不明显,难以治愈。因此仅考虑用药物治疗不能根本解决问题,必须采用以防为主的免疫防治手段才能达到不患穿孔病的目的。

在鳖的免疫预防中,鳖的换池以及免疫接种时的水温与棚(室)温温差至关重要。在中、下午温差大时选鳖换池,即使不进行免疫接种,也会引起鳖的强烈应急反应,死亡率可高达40%。而采用晚上温差低($\pm 1^\circ\text{C}$)时换池选鳖以及免疫接种,应急死亡率可降至0.6%左右。这结果为免疫接种解决了最棘手的应急死亡问题,消除养殖人员对免疫接种的恐惧心理,以利养殖业推广现代免疫预防的科学方法。同时还提示:即使在常规养鳖中,(不采用免疫接种)选鳖换池也一定要关注水温与棚(室)温温差,否则同样导致鳖大量应急死亡,带来严重损失。

采用免疫预防法对鳖穿孔病的防治十分有效。经免疫接种穿孔病菌苗的鳖12556只,经过2~3个月饲养,患穿孔病的鳖不到0.2%,这是任何抗生素药物防治无法达到的效果。一次免疫接种后35~45天时,鳖的抗体效价最高,而60天以后抗体水平下降,仍能抵抗穿孔病。采用免疫接种穿孔病菌苗,不仅提高了鳖的存活率,而且大大提高了鳖的商品价值。对鳖穿孔病进行免疫预防,是鳖养殖中极为可取的方法,但水质管理极为重要。

参 考 文 献

- 于春然,张树浩,郑亘林等.1996.稚鳖腐皮病与疔疮病并发症的防治研究.水产科学,15(3):14~15.
- 中华人民共和国卫生部.1995.中国生物制品规程.北京:中国人口出版社,23~30.
- 孙佩芳,蔡完其,吴建农等.1996.鳖穿孔病的病原研究.水产学报,20(2):120~123.
- 张胜宇,张晓刚.1996.甲鱼常见病的诊断及防治技术.淡水渔业,26(3):39~41.
- 齐彩霞,罗运忠,吴佩链.1995.鳖穿孔病的病原菌及其防治的研究.淡水渔业,25(4):17~19.
- 陈奖励,何昭阳,赵一文.1993.水产微生物.北京:农业科学出版社,350~362,370~377.
- 陆宏达,金丽华.1996.鳖嗜水气单胞菌败血症的研究.水产学报,20(3):223~230.
- 杨先乐.1996a.鳖用药物.水产科技情报,23(3):134~137.
- 杨先乐.1996b.鳖用药物.水产科技情报,23(4):188~190.
- 程天印,鞠长征,赵万鹏等.1996.稚鳖“白点病”病原的研究.水产科学,1(4):19~22.
- 谭北平.1996.中华鳖腐皮病及防治方法研究.水利渔业,83(3):26~30.
- Popoff M. Genus III *Aeromonas*. 1984. In: Krig N R, Holt J G, eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Vol I. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 545~548.

PATHOGEN AND IMMUNITY OF HOLE DISEASE OF *TRIONYX SINENSIS*

MAO Ning, YANG Yan-Hua, LAI Qiong-Hua

(*Biological Engineering Institute of Fujian Teacher University, Fuzhou 350007*)

LIAO Cai-Sheng

(*Fujian Yongtai Fuwan freshwater Breeding Co. Ltd., 350700*)

ABSTRACT A pathogenic bacteria of CH—108 strain is isolated from the hole disease of the *Trionyx sinensis*. It is identified as *Aeromonas hydrophila* by the bacteriological method. The backinoculation test indicated that original symptom can be observed by injecting the pathogens into the healthy ones. The drug sensitivity test showed that the CH—108 strain is moderate sensitivity to streptomycin and ciprofloxacin. Immune inoculation using killed CH—108 strain can prevent hole disease effectively.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, *Aeromonas hydrophila*, Hole disease, Immune inoculation