

牛蛙温和气单胞菌病病原及防治

The pathogen and control of *Aeromonas sobria* disease of *Rana catesbiana*

叶雪平 顾金华¹ 杨广智 罗毅志

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

(¹湖州市中心医院, 313001)

Ye Xueping, Gu Jinhua¹, Yang Guangzi, Luo Yizhi

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

(¹ The Central Hospital of Huzhou, 313001)

关键词 牛蛙, 温和气单胞菌, 菌株

KEYWORDS *Rana catesbiana*, *Aeromonas sobria*, strain

中图分类号 S947.2

病害一直是困扰我国养蛙业发展的一个重要因素。国内已有学者相继报道了腹水病^[1]、脑膜炎^[2,3]、白内障病^[4]、肝肿大病^[5]及爱德华氏菌病^[6]等牛蛙疾病。1998年7月至9月,我省各主要养蛙地区暴发一种新的流行性蛙病,该病有发病面广、传染性强、死亡率高的特点。病蛙症状表现为厌食或停食,皮肤失去光泽,体表常出现点状溃疡斑,少数较大病蛙腹部膨胀。解剖可见有少量腹水,呈淡红色;肝充血呈紫色或失血呈白色;胃充血,内无食,多暗红色粘液,时有少量血凝块;肠充血呈紫红色或失血为白色,内有大量脓样物。多数病蛙的脂肪体上有明显的出血点。如是幼蛙发病,则脂肪体多为淡红色。我们对该病进行了病原的分离和防治技术的研究,确定该病由温和气单胞菌引起。现将研究结果作一报道。

1 材料和方法

1.1 病蛙及供试健康蛙来源

患病蛙来自湖州德清县下舍镇的一家个体养蛙场。试验用健康蛙由湖州练市锦森特种水产养殖场提供,蛙的体重为25~30g,该场近年来一直没有发生该病。

1.2 病原菌分离

按常规细菌分离方法,对病蛙的肝、肺和脂肪体等显症部位作细菌分离和纯化培养,纯化后的菌株作生化试验和致病性等试验。

1.3 动物回归攻毒试验

(1)组织滤液感染试验。取患病蛙的肝、脾、肺、肠等显症组织,匀浆后,以生理盐水1:10稀释,4000r/min离心30min,取上清液,梯级过滤,最后用灭菌的0.22 μ m滤纸过滤除菌,除菌液加入800

浙江省科委科技攻关课题“食用蛙主要疾病防治技术研究”的后续研究内容(编号:933038)。

第一作者简介:叶雪平,男,1964年11月生,高级工程师,主要从事水产经济动物病害研究。

收稿日期:1998-11-08

单位/mL的庆大霉素,4℃冰箱过夜,得无菌液(琼脂培养证实无菌生长)。以此液对30g左右的健康蛙进行腿部肌肉注射攻毒,每只0.2mL,5只蛙一组,另设一组注射无菌生理盐水作对照,于水簇缸中饲养,观察发病情况。水簇缸大小为100cm×60cm×50cm,内盛少量水,斜放,使缸底2/3有水,投放少量水草,水温为24~26℃,气温为22~30℃,每隔12h察看,收集死蛙(下同)。

(2)细菌感染试验。将纯化所得的菌株在平板上培养,经32℃24h生长,挑取菌落到无菌生理盐水中,制成细菌悬液,调整菌液浓度到MCF1号管。以该浓度菌液对健康蛙采用肌肉注射、腹腔注射、皮下注射、菌液浸泡和口灌菌液等方式进行攻毒,攻毒组用蛙5只,规格为25~30g,观察发病情况。同时设对照组。

(3)再感染试验。取人工感染后发病的濒死蛙,按1.2项所述进行细菌分离,挑取生长特征与所感菌株相一致的菌落,培养后再对健康蛙进行攻毒试验,方法同细菌感染试验,观察发病情况。

1.4 病原菌的生长特性与鉴定

采用API ATB系统进行菌种鉴定。

1.5 药敏试验

参照廖延雄^[7]所述方法,采用纸片法作药敏试验。

1.6 生产性防治试验

结合养殖生产需求,我们试制了专用药物——“蛙病宁5号”,选择发病较重,病症较为典型的养殖场进行药物防治试验,观察防治效果。

2 结果

2.1 病原菌分离

取患病蛙的肝、肺和脂肪体在普通营养琼脂平板上划线,经32℃培养24h后,各平板上均有菌落生长,菌落数量多且纯,挑取单一菌落作纯化培养后,获980903(肝)、980904(肺)和980905(脂肪体)3个菌株。

2.2 回归感染试验

(1)组织滤液感染试验。以除菌组织液对健康蛙作肌肉注射后,饲养观察12d,蛙活动均为正常,表明该病由病毒引起的可能性不大。

(2)菌液感染试验。将980903、980904、980905三个菌株用生理盐水制成菌液,浓度为 3×10^8 cfu,对健康蛙作肌注攻毒试验,对照组注射生理盐水,注射剂量为0.2mL。结果显示,试验组蛙在一周内100%发病死亡,其症状表现与自然发病基本相同。对照组全部存活。表明3个菌株均为致病菌。

(3)致病菌毒力试验。选取980903菌株,对健康蛙作肌肉注射、腹腔注射、皮下注射、口灌和创伤浸浴等多途径感染攻毒试验,同时进行肌注梯度攻毒,以测定病原菌的毒力。结果显示,除口服方式外,其他各种感染途径均能使牛蛙发病并导致死亡,且对蛙有较强的致病性。该菌液对健康蛙肌注的半致死剂量为 7.6×10^7 cells/ind。对病蛙作细菌分离,均可获得与980903相同特征的菌落(纯化后得980903-A菌株)。

(4)再感染试验。以980903-A菌株对健康蛙再进行肌注攻毒,仍可复制出相同病症,并引起蛙发病死亡。

2.3 病原菌特性

980903、980904和980905三个菌株具有相同的生长特性。菌株在普通琼脂培养平板上生长良好,经32℃恒温培养24h后,菌落大小约为1.5~2.0mm,圆形、隆起、湿润、边缘略显不规则、不透明、肉汤培养基中悬浮生长,繁殖速度较快,半固体中生长良好,穿刺线呈绒毛状,运动活泼,在液体和半固体表面可形成一层白色的菌膜;氧化酶阳性、OF发酵、产气、0/129耐药、溶血;革兰氏染色阴性,菌体呈短杆状。

参照 GYZ-9V 鉴定系统,对 3 个菌株进行生化反应试验,其结果完全一致,表明为同一种细菌^[8]。

选择 980903 菌株,采用 API ATB 鉴定系统中的 API-20E 鉴定试条对其进行进一步的鉴定(见表 1)。表中,生化谱为 7247124;鉴定结果为温和气单胞菌;鉴定 %(%id) = 99.7。根据上述试验结果,可以确定,引发蛙病的病原菌为温和气单胞菌。

表 1 980903 菌株在 API-20E 试条中的生化反应结果
Tab.1 The biochemical result of 980903 strain with API-20E system

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO
+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX							
-	-	+	-	-	-	+							

2.4 药敏试验

按照廖延雄^[7]所述方法,用纸片法对 980903 菌株进行药敏试验。结果表明,该菌株对氟哌酸、环丙沙星、氯霉素、四环素、链霉素、先锋必等高度敏感;对新霉素、痢特灵、红霉素、强力霉素及氨基糖甙类药物呈中度敏感;对林可霉素、青霉素、乙酰螺旋霉素、苯唑青霉素等则表现出耐药。

2.5 生产性防治初步试验

1998 年 9 月中旬,浙江省某地两个蛙场幼蛙暴发温和气单胞菌病,出现大批死亡。

两个场的基本情况是:1# 场共有 9 个蛙池,放养 10~20g 的幼蛙 9900 只,用药治疗前日病死 60~80 只;2# 场有 4 个蛙池,放养幼蛙约 5000 只,用药前日死蛙数 30 只左右。对此,试验中采用了不同的防治方法,取得以下结果。

1# 场蛙池用 10×10^{-6} 蛙鳖康和 2×10^{-6} 的蛙消安联合消毒,每天 1 次,连用 3d;同时结合投喂药物,将“蛙病宁 5 号”拌入黄粉虫投喂,投食量控制在原水平的 80%,每天 1 次。4d 为一个疗程。4d 后,1# 场不再有死蛙,蛙的吃食量也恢复到发病前的水平,病情得到控制。后再投药一个疗程,以防止病情复发。一月后回访,没再发病。

2# 场蛙池的水体消毒方法与 1# 场完全相同,投喂也一样,但将药物改为环丙沙星原粉,给药量为每公斤蛙每天 30mg,连用 4d。4d 后,蛙仍有大批死亡,与用药前相比无明显减少,蛙的日摄食量仅为发病前的 2/5。

参 考 文 献

- 1 贺路,曾令兵,艾晓辉等. 牛蛙腹水病原研究. 淡水渔业,1995,25(3):16~18
- 2 陈耀明. 牛蛙脑膜炎浓毒性黄杆菌病. 水产科技情报,1994,21(1):11~12
- 3 叶雪平,杨广智,罗毅志. 牛蛙脑膜炎(歪脖子病)病原及防治技术研究. 浙江水产学院学报,1996,15(4):301~304
- 4 陈晓凤,陈析辉,夏梅珠. 牛蛙“白内障”病原及防治的研究. 福建水产,1995,2:13~18
- 5 陈晓凤. 牛蛙“肝肿大”病原的研究. 厦门水产学院学报,1995,17(2):32~37
- 6 肖克宇,黄志坚,金斐理等. 牛蛙爱德华氏菌病原菌的鉴定和致病因素的研究. 水产学报,1997,21(3):316~321
- 7 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册. 北京:中国农业出版社,1995. 70~76
- 8 朱建国. 临床常见细菌鉴定手册. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1993. 167~170