

西伯利亚鲟败血症病理学观察与病原学研究

赵凤岐 曹谨玲 刘 青

(山西农业大学动物科技学院, 山西省生态畜牧与环境兽医重点实验室, 太原 030801)

摘要: 针对西伯利亚鲟发生败血症的情况, 进行了流行病学调查、病理学观察和病原学研究。病鱼主要特征为严重出血性败血症, 发病率 20%、死亡率 15%。主要症状为: 鱼体消瘦, 嘴肿、四周充血, 肛门红肿, 鱼体两侧体表、腹部、口腔及下颌充血, 尤以背鳍、胸鳍、腹鳍及尾鳍基部充血显著, 体表溃疡, 有的伴有水霉着生。在对病鱼进行流行病学调查和病理学观察的基础上, 从患病鱼中分离得到一种优势细菌, 经感染性试验证明对健康西伯利亚鲟具有较强的致病性, 且症状与自然发病鲟的症状相同。通过形态学、溶血性、蛋白酶检测、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析, 证实引起西伯利亚鲟发生败血症的病原为嗜水气单胞菌。药物敏感性试验结果显示, 分离病原菌对头孢噻肟钠、硫酸卡那霉素、庆大霉素、强力霉素、氟苯尼考、黏杆菌素、乳酸诺氟沙星、盐酸环丙沙星和恩诺沙星等药物高度敏感, 对阿莫西林等药物具有抗性。本研究结果对西伯利亚鲟病害防治和健康养殖具有指导意义。

关键词: 西伯利亚鲟; 败血症; 病理学; 病原学; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S941.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)02-0316-08

西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 隶属于鲟形目 (*Acipenseriformes*)、鲟科 (*Acipenseridae*)、鲟属 (*Acipenser*), 为软骨硬鳞鱼, 分布于西伯利亚河流和湖泊。因其具有生长速度快、适应性强、成活率高、抗病力强、营养丰富、味道鲜美、鱼籽品质高等优点, 已成为极具开发潜力的淡水增养殖新品种。2008 年 3 月, 山西省临汾市某水产养殖场西伯利亚鲟发生了严重的疾病和死亡现象, 发病对象主要为体长 25 cm、体重 60 g 以上的西伯利亚鲟。此病传染性强, 波及面广, 使该场的养殖西伯利亚鲟死亡率达 15%。在对病鱼进行流行病学调查和病理学观察的基础上, 从发病西伯利亚鲟的肝、脾、肾等脏器与溃烂病灶部位肌肉中分离出优势细菌, 经形态学、溶血性、蛋白酶检测、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析以及病原菌感染性试验等方法对病原菌进行确定, 为有效控制和防治西伯利亚鲟败血症提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品和材料来源 患病西伯利亚鲟于 2008 年 3 月取自山西省临汾市某水产养殖场具有出血性败血症的个体, 共计 20 尾, 用于剖检观察、采集病料和

细菌分离培养。感染试验用西伯利亚鲟为该养殖场中的健康幼鲟。细菌分离用普通营养琼脂购自杭州天和生物试剂公司; 普通营养肉汤购自北京奥博星生物技术有限公司; 胰蛋白胨购自 OXOID LTD; 兔鲜血营养琼脂平板自行配制; 微量发酵管及其他试剂 (分析纯) 均购自天津科密欧化学试剂开发中心。细菌 16S rRNA 通用扩增引物由北京奥科生物公司合成, PCR 所用 Buffer dNTP Tag 酶等均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 流行病学调查 对患病渔场苗种来源、养殖密度、发病情况、管理状况等进行调查。

1.3 病理解剖与组织学观察 取病鱼和死鱼, 进行病理剖检, 观察各脏器组织的眼观病理变化。采集病死鱼的皮肤、肌肉、肾脏、肠道和胃等主要组织, 用 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋切片, 苏木素伊红 (HE) 染色、镜检观察组织病变。

1.4 病原菌分离 无菌条件下, 取 5 尾具典型症状病鱼的皮肤、肌肉、肾脏、肠道和胃, 以平板划线法接种于 S.S 琼脂和普通营养琼脂培养基, 置于 28℃ 生化培养箱倒置培养 24 h 挑取优势菌落并纯化培养 3 次。纯化后所得菌株以普通营养琼脂斜面 4℃ 保

收稿日期: 2008-08-04 修订日期: 2008-12-25

基金项目: 山西省高校科技研究开发项目 (200811009) 资助

通讯作者: 赵凤岐 (1953—), 男, 汉族, 山西原平人; 副教授, 硕士; 主要从事动物营养与水产养殖研究。Tel 0354-6288336; E-mail nongdazhaofengq@sohu.com

存,备用。

1.5 病原菌感染性试验 试验用健康西伯利亚鲟体重 30—50g 全长 20—25cm,共 40尾。将待试验的个体分组装在 100L 水族箱中暂养 5d后,选取个体大小均一、体质健康的西伯利亚鲟用于正式试验。

将分离得到的优势菌经普通肉汤培养基培养 24h后,用无菌生理盐水作连续 10倍稀释,稀释度为 10^1 — 10^{11} ,用平板法进行细菌计数。将菌液用生理盐水稀释成浓度为 1×10^7 CFU/mL, 1×10^8 CFU/mL, 1×10^9 CFU/mL 分别腹腔和肌肉接种注射 5尾健康鲟,每尾 0.1 mL。对照组分别腹腔和肌肉注射等量的无菌生理盐水。注射后,每天观察发病、死亡情况,第 25天结束试验。在整个试验过程中,每天正常投喂专用饲料,水温 20—25℃,日换水量大约为 1/2。

1.6 病原菌鉴定 常规鉴定方法包括形态学观察、溶血性试验、蛋白酶检测和生理生化试验。同时结合分子生物学方法进行 16S rRNA 基因序列分析。

形态学观察 观察分离菌在普通营养琼脂上生长的菌落形态和营养肉汤中的生长情况;革兰氏染色和荚膜染色后,光学显微镜观察细菌的形态和染色特性。

溶血性试验 取纯化的分离菌培养物,接种于兔血琼脂培养基平板上,28℃培养 24h 观察溶血情况及血琼脂平板上的菌落形态。

蛋白酶的检测 取单菌落接种于含 1.5% 脱脂奶蔗糖胰蛋白胨琼脂平板上,28℃培养 24h判定,以在接种菌生长菌落周围出现清晰溶蛋白圈者判为阳性。

生理生化试验 按常规方法进行葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖、七叶苷、水杨苷、甘露醇、吡哌实验、VP、MR 等生理生化试验。

16S rRNA 基因序列分析 PCR 模板 DNA 的制备,参照储卫华等^[1]提取细菌染色体 DNA 的方法。16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序,登陆 Genbank 查找已发表的气单胞菌各种 16S rRNA 序列,参照 Dorsch *et al.*^[2]的方法,用 DNA tool 软件设计一对引物。P1: 5'-GAAAGGTTGATGCCTAAT-ACGTA-3', P2: 5'-CGTGCTGGCAACAAAGGACAG-3'。扩增反应在 PCR system 9700(ABI公司)上进行。反应体系 50μL,包括 10× buffer(with Mg^{2+}) 5.0μL, dNTP 4μL(2mmol/L), DNA 模板 4.0μL,上下游引物各 1μL(10μmol/L), Tag DNA polymerase

(2.5U/μL) 0.8μL,用超纯水补足至 50μL。PCR 反应条件为: 95℃预变性 5min 95℃变性 30s 61℃退火 45s 72℃延伸 45s 35个循环; 72℃保温 7min 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测,并挑选理想 PCR 产物 2份送北京诺赛基因组研究中心进行测序。将测序结果与 GenBank 上公布的嗜水气单胞菌 16S rRNA 序列用 DNAMAN 软件进行比对,分析其同源性,对病原菌进行分子水平鉴定。

1.7 药敏试验 将病原菌稀释成悬液后,均匀涂布于营养琼脂培养基平板上,然后用购自于杭州微生物试剂有限公司的阿莫西林、头孢噻肟钠、硫酸卡那霉素、庆大霉素、硫酸新霉素、强力霉素、氟苯尼考、黏杆菌素、乳酸诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星药敏纸片贴在平板上,在 28℃恒温箱中培养 24h 观察抑菌圈大小。

2 结 果

2.1 流行病学调查结果

苗种来源 2004年始,每年从北京某鲟鱼苗种公司购入西伯利亚鲟苗种 40万尾,规格全长 5cm,平均尾重 5g左右在苗种池培育,达 30cm 规格放入成鱼池分养。

养殖密度 100g左右规格达 80尾/m², 500g左右规格达 25—30尾/m²。

管理状况 调查发现,主要问题有四方面:即残留饵料和污物过多,清除不及时;随着鱼的生长,每个月按大小规格筛选分池不及时;养殖密度普遍较高;死鱼处理不及时,随处乱扔,病鱼无隔离措施。

发病情况 该水产养殖场常年均有败血症发生,其中 1—3月份为发病高峰期。部分病鱼呈急性型,突然死亡,以全长 30cm 左右幼鱼最为多见,且死亡率最高;成鱼多数病程稍长,摄食减少或不食,出血性败血症状明显,死亡率高;部分病鱼呈竖游转圈神经症状,病程长,逐渐消瘦,失去利用价值;发病率达 20%,死亡率达 15%。

2.2 病理学观察结果

剖检变化 感染发病鱼可见鱼体消瘦,嘴肿、四周充血,肛门红肿(图版 I -1),鱼体两侧体表、口腔及下颌充血,尤以背鳍、胸鳍、腹鳍及尾鳍基部充血显著,有的伴有水霉着生。有些体表皮肤和肌肉坏死、糜烂,病变部位凹陷,严重时深及背腹骨板,形成溃疡和穿孔。鳃水肿、色淡、黏液多;腹腔有弥漫性溶血性红色浑浊腹水;肠中无食,有灰白色黏液,螺旋瓣呈暗红、深褐色;后肠出血严重,水肿、积水积

气,腔内混有红色水样液体;肠壁变厚,部分病例肠黏膜脱落或坏死;胃外观呈暗红色,剪开胃壁可见胃黏膜充血、出血;肝脏灰白或土黄色,呈胰样变性,质脆易碎;脾脏肿大,质地柔软,颜色暗红;肾脏肿大,呈暗褐色或土黄色,部分病例肾表面有出血点;心脏扩张,心肌松弛,颜色暗淡或苍白。

病理组织学变化 肠道:肠黏膜上皮细胞肿胀、变性、坏死、脱落;肠壁固有层有多量的淋巴细胞浸润,肠壁平滑肌变形、坏死、断裂(图版I-2、3和4)。

肌肉:肌纤维间隙增宽,肌纤维表皮严重变性、坏死、脱落、呈波浪状(图版I-5)。

皮肤:皮肤上皮细胞肿胀、空泡化,甚至坏死、脱落,皮下水肿(图版I-6、7)。

肾脏:肾小管上皮细胞肿胀,呈颗粒变性和水泡变性,肾小管管腔变小,腔内有蛋白样物质和破坏的肾小管上皮细胞碎片。肾小管间质有红细胞散在(图版I-8)。

胃:胃壁平滑肌变性、坏死,肌纤维断裂,浆膜水肿(图版I-9)。

2.3 病原菌的分离结果

在S.S琼脂和普通营养琼脂培养基上均分离得到一种菌落和形态相同的优势菌,其优势度占95%左右,将该菌作为感染性试验用菌。

2.4 病原菌感染性试验结果

用分离菌以不同剂量的菌液腹腔注射和肌肉注射均可复制出与自然病例症状相似的病例,而对照组正常。采用腹腔或肌肉注射攻毒时,菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL的出现典型出血性败血症死亡或

明显神经症状;菌液浓度低于 1×10^8 CFU/mL时没有出现死亡;菌液浓度高于 1×10^8 CFU/mL时病理变化明显,肠道出血性败血症强烈,实质器官损害严重。肌肉注射攻毒复制出“红嘴病”病例(图版I-1)。从攻毒死亡病例的肝、脾、肾、腹水均能分离出病原菌。

2.5 病原菌的鉴定分析

分离菌的形态观察 分离菌均在普通琼脂平板上生长良好,呈圆形、光滑、隆起湿润半透明、边缘整齐灰白色菌落,直径1—3mm。接种的普通肉汤菌体生长均匀,表面有一薄菌膜,轻摇即散开;呈均匀混浊。分离菌均为革兰氏染色阴性,两端较钝圆,中等大小短杆菌,多为单个或成双排列,无荚膜,无芽胞(图版I-10)。

溶血性试验结果 在血液琼脂平板上生长良好,呈现明显的 β 溶血,菌落呈圆形、光滑、边缘整齐、隆起、湿润灰白色,直径在2—3mm(图版I-11)。

蛋白酶检测结果 分离菌的蛋白酶检测均呈阳性,28℃培养24h,分离菌株的溶蛋白圈直径在15—18mm。

分离菌的生理生化试验结果 分离菌能够使葡萄糖、阿拉伯糖产酸产气,培养基由紫色变成黄色且微量发酵管内积有气泡;使蔗糖、麦芽糖、七叶苷、甘露醇及水杨苷产酸,培养基由紫色变成黄色。吲哚试验有玫瑰吲哚形成而呈阳性。穿刺线呈刷状生长,即运动力阳性;M R、V P氧化酶试验均为阳性,不发酵木糖、乳糖及山梨醇,说明分离菌符合嗜水气单胞菌的特性(表1)。

表1 菌株的形态特征及生理生化指标

Tab. 1 Morphological physiological and biochemical characteristics of the bacterial strains			
鉴定项目 Characteristics	结果 Result	鉴定项目 Characteristics	结果 Result
革兰氏染色 Gram staining	-	水杨苷 Salicin	+
运动性 Motility	+	吲哚 Indole	+
葡萄糖 Glucose	+	M R	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	V P	+
蔗糖 Sucrose	+	氧化酶 Oxidase	+
麦芽糖 Maltose	+	乳糖 Lactose	-
七叶苷 Esculose	+	山梨醇 Sorbitol	-
甘露醇 Mannitol	+	木糖 Xylose	-

16S rRNA 基因序列分析 分离菌的16S rRNA经PCR扩增后的电泳结果(图1)。由图可知,扩增条带明亮清晰,特异性良好,大小约680 bp与预期

结果相符。进一步经测序得知:扩增的16S rRNA基因序列大小为686 bp。将测序所得结果与GenBank上下载的嗜水气单胞菌的16S rRNA的序列进

行同源性比对,发现与河北师范大学 (gi 119633076) 和四川农业大学 (gi 188013261)所公布序列的同源性为 100%, 与日本 (gi 188496906) 和印度 (gi 188032688)所公布序列的同源性为 99%, 与中国科学院 (gi 189031545) 公布序列的同源性为 98%, 说明该病原菌为嗜水气单胞菌。

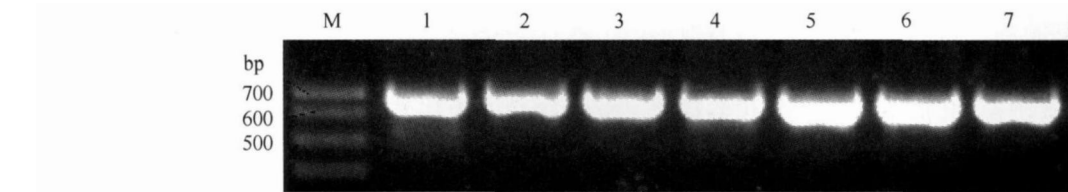


图 1 病原菌 16S rRNA PCR扩增后的电泳结果
Fig 1 Electrophoresis of 16S rRNA amplified by PCR
M: Marker 1—7 PCR扩增产物
M: Marker 1—7 amplification fragments by PCR

2.6 药敏试验

脏器中分离的病原菌对头孢噻肟钠、硫酸卡那霉素、庆大霉素、强力霉素、氟苯尼考、黏杆菌素、乳酸诺氟沙星、盐酸环丙沙星和恩诺沙星高度敏感,对硫酸新霉素中度敏感,对阿莫西林不敏感 (表 2)。

表 2 药敏试验判定标准与结果

Tab.2 The judgement criteria and the result of antibiotic sensitivity test

抗生素 Antibiotics	判定标准 [抑菌圈直径 (mm)] Criteria (diameter of inhibitory rings)			菌株 [抑菌圈直径 (mm)] Strains (diameter of inhibitory rings)
	耐药 (R)	中度敏感 (M)	敏感 (S)	脏器中的分离菌
阿莫西林 AMO	≤17	18—20	≥21	R(0)
头孢噻肟钠 CTX	≤14	15—22	≥23	S(43)
硫酸卡那霉素 KAN	≤10	11—15	≥16	S(24)
庆大霉素 GEN	≤10	11—15	≥16	S(27)
硫酸新霉素 NEU	≤17	18—21	≥22	M(21)
强力霉素 TET	≤10	11—15	≥16	S(18)
氟苯尼考 CMP	≤10	11—15	≥16	S(28)
黏杆菌素 POL	≤10	11—15	≥16	S(22)
乳酸诺氟沙星 NOR	≤12	13—16	≥17	S(22)
盐酸环丙沙星 CIP	≤15	16—20	≥21	S(28)
恩诺沙星 (ENR)	≤15	16—20	≥21	S(23)

注: 判定标准 [抑菌圈直径 (mm)] 参照 CLSI/NCCLS药敏标准 (美国临床实验室标准化委员会的缩写)
Note The judgement criteria [diameter of inhibitory rings(mm)] refer to the criteria of antibiotic sensitivity published by CLSI/NCCLS

3 讨论

嗜水气单胞菌广泛存在于水环境中^[3], 是引起水产生物病害的主要病原体^[4-7]。据报道, 鳖^[8]、黄鳝^[9]、斑点叉尾^[10]、草鱼^[11]、大黄鱼^[12]、罗非鱼^[13]、剑尾鱼^[14]、施氏鲟^[15]和淡水鲤科鱼类^[16]等都存在由嗜水气单胞菌感染引起的病例。本研究用自然发病鲟体分离培养的细菌, 肌肉注射感染体长 25—27cm 的健康幼鲟, 48h 出现口前吻周围及口

部周围充血肿胀, 口部括约肌僵硬, 不能进食, 腹缘两行骨板红肿的症状, 这与自然病鲟临床典型症状及姜祝飞^[17]报道的史氏鲟幼鱼发病症状相一致。前苏联学者尤金^[18]报道, 生活在西伯利亚勒拿河的鲟鱼, 几乎不生病, 不会被致病寄生物传染。这表明西伯利亚鲟在天然水体野生状态下抗病力很强, 但在人工养殖条件下, 由于管理不当、水环境污染等综合因素作用下, 其抵抗力降低, 易发病。患病养殖场调查时发现存在鱼体表面受伤、放养密度过大、粪便

和残饵等污染物清理不及时等问题,这些都为嗜水气单胞菌提供了增殖和感染的条件。

经病原菌感染性试验证实,从病西伯利亚鲟病灶分离得到的优势细菌对健康西伯利亚鲟有较强致病和致死作用,而且感染病鲟的症状与自然发病鲟的症状相同。另外,从感染发病的鲟体内分离得到大量形态单一的优势细菌,其形态特征和生化特征与从病鱼分离得到的细菌完全相同。这证明分离的病原菌是导致该养殖场西伯利亚鲟发病的致病菌。

陆承平认为革兰氏为阴性,氧化酶阳性的细菌,只要葡萄糖产气,并发酵甘露醇、阿拉伯糖、七叶苷或水杨苷、蔗糖,鸟氨酸脱羧酶阴性等6个指标符合就可以判定为嗜水气单胞菌^[4]。本研究分离菌的生化试验结果符合嗜水气单胞菌的基本特性。对分离出的嗜水气单胞菌16S rRNA基因进行特异性PCR扩增和序列测定,经过基因序列分析,可以看出,分离菌株与嗜水气单胞菌聚类分析同源性高达90%以上,进一步确认了病原菌为嗜水气单胞菌。

关于嗜水气单胞菌的致病因子,目前已发现并得到认可的主要包括外毒素(Exotoxin)、胞外酶(Exoenzyme)和膜上黏附因子(Adherent factor)等。其中外毒素包括溶血素(Hemolytic toxin)、肠毒素(Enterotoxigenicity)及细胞毒素(Cytotoxicity)。本研究兔血平板试验呈明显溶血阳性反应,证明病原菌产生的溶血毒素是引起西伯利亚鲟发病的主要致病因子之一。任燕等^[19]通过对分离15年间(自1990—2004年)不同分离地区和宿主来源的21株嗜水气单胞菌菌株进行检测,发现蛋白酶基因普遍存在于致病性嗜水气单胞菌菌株中,而在非致病性嗜水气单胞菌菌株中则未能检测到该蛋白,推测该蛋白与嗜水气单胞菌的致病性存在一定的相关性。本研究的脱脂奶平板试验检查胞外蛋白酶为阳性,说明分离的病原菌能够产生胞外蛋白酶毒素,从另一个侧面证实了其致病性。

陆承平^[4]研究证明,致病性嗜水气单胞菌的各种毒素的毒性作用能够使肠道分泌物增加,肠道积液,红细胞裂解,组织细胞溶解,组织的渗透性增加,杀伤白细胞,损伤毛细血管,引起败血症,出血,细胞毒素侵入肝、脾、肾、胆等组织器官,破坏组织细胞,引起细胞变性,组织崩溃,形成炎症。Ventura *et al.*^[10]对感染嗜水气单胞菌的斑点叉尾的组织病理学观察,炎症反应仅在消化道、皮肤和皮下肌肉中发现;Huizinga *et al.*^[20]对感染嗜水气单胞菌的黑鲈病变肝脏、肾脏观察,病灶处无炎症细胞浸润。本

研究在病变组织中未见炎症细胞浸润,出现这种现象可能是嗜水气单胞菌能产生导致白细胞死亡的杀白细胞毒素所致。对西伯利亚鲟的皮肤、肌肉、肾脏和肠道的组织病理学观察结果与姚金水等^[21]对中华鳖、曾纪锋等^[22]对鳖和杜雄伟等^[14]对剑尾鱼等的观察结果一致。但在对胃进行病理学观察时,姚金水等^[21]对中华鳖嗜水气单胞菌的病理学观察发现,胃黏膜上皮细胞脱落、破碎,黏膜层有多量红细胞,黏膜下层血管扩张,充满红细胞。但在本研究中观察到西伯利亚鲟胃壁平滑肌变性、坏死,肌纤维断裂,浆膜水肿,但未观察到胃黏膜上皮细胞的病变。

从发病西伯利亚鲟中分离的嗜水气单胞菌对头孢噻肟钠、硫酸卡那霉素、庆大霉素、强力霉素、氟苯尼考、黏杆菌素、乳酸诺氟沙星等药物高度敏感,对阿莫西林等药物具有耐药性。此结果可为指导西伯利亚鲟养殖生产中该病早期预防与治疗提供一定的依据。但由于不同地区不同嗜水气单胞菌菌株对药物的敏感性可能有差异,对药物的选择还应进行一定范围的临床试验,以保证安全用药。

致谢:

试验过程中得到山西农业大学动物科技学院山西省环境兽医重点实验室、动物遗传育种与繁殖博士学位点实验室郑明学博士、马海利博士、曹果清博士、闫芳博士、范瑞文博士、宁官保副教授以及山西省临汾市某水产养殖场许云平的大力支持和悉心帮助,特致谢忱。

参考文献:

- [1] Chu W H, Lu C P. PCR detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* by specific 16S rDNA and aerolysin gene [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29**(1): 79—82 [储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16S rRNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌. 水产学报, 2005, **29**(1): 79—82]
- [2] Dorsch M, Ashbolt N J, Cox P T, *et al*. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rRNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based screening of environmental isolates [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1994, **77**(6): 722—726
- [3] He M X, Ye Q Z, Chen C, *et al*. Construction and high expression of an actOmpT^S Fusion vector of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(2): 169—173 [何鸣筱, 叶巧真, 陈诚, 等. 嗜水气单胞菌外毒素和外膜蛋白双基因融合表达载体的构建和高效表达. 水生生物学报, 2004, **28**(2): 169—173]
- [4] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, **16**(3): 282—288 [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综

- 述. 水产学报, 1992, **16**(3): 282—288]
- [5] Elw itgala J P, H iggsd S, N annyak S, *et al*. Septic arthritis due to *Aeromonas hydrophila*: case report and review of the literature [J]. *International Journal of Clinical Practice*, 2005, **59**(Suppl 147): 121—124
- [6] V ivas J, Carracedo B, R iño J, *et al*. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* oral live vaccine in water microcosms [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, **70**(5): 2702—2708
- [7] Li A H, Yang W M, Hu J, *et al*. Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Cara A Sius auratus* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**(8): 813—820
- [8] Zhou X X, Huang R, Guo Q L. Construction of a subtractive cDNA library from the internal organs of *Trionyx sinensis* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **31**(4): 509—515 [周秀霞, 黄容, 郭琼林. 嗜水气单胞菌感染的中华鳖主要器官差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 2001, **31**(4): 509—515]
- [9] Chen H Q, Lu C P. Study on pathogen of bacterial hemorrhagic septicemia of Rice Eel (*Monopterus albus*) [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1991, **7**: 21—23 [陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌: 黄鳝出血性败血症的病原. 中国人兽共患病杂志, 1991, **7**: 21—23]
- [10] Ventura M T, Grizzle J M. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1988, **11**: 397—407
- [11] Zhang X J, Chen C Z, Fang H. Biological characterization and phylogenetic analysis of *Aeromonas hydrophila* from grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2006, **22**(4): 334—337 [张晓君, 陈翠珍, 房海. 草鱼肠炎嗜水气单胞菌分离株的主要特性及系统发育学分析. 中国人兽共患病学报, 2006, **22**(4): 334—337]
- [12] Cao J, Feng X Z, Feng Z B, *et al*. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from large yellow croaker [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007, **46**(5): 808—810 [曹军, 冯学芝, 冯展波, 等. 大黄鱼致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定. 湖北农业科学, 2007, **46**(5): 808—810]
- [13] Liu J B, Xie Z X, Deng X W, *et al*. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from tilapia [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, **26**(4): 100—103 [刘加波, 谢芝勋, 邓显文, 等. 罗非鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定. 水利渔业, 2006, **26**(4): 100—103]
- [14] Du X W, Chang O Q, Wang X H, *et al*. Study on pathogenicity and histopathology of *Aeromonas hydrophila* from *Xiphophorus helleri* [J]. *Journal of Yangtze University* (Nat Sci Edit), 2005, **2**(2): 53—56 [杜雄伟, 常藕琴, 王晓辉, 等. 嗜水气单胞菌对剑尾鱼的致病性及组织病理学研究. 长江大学学报(自然科学版), 2005, **2**(2): 53—56]
- [15] Meng Y, Xiao H B, Zhang L, *et al*. Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen of anur sturgeon *Acipenser schrenckii brandt* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(6): 822—826 [孟彦, 肖汉兵, 张林, 等. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定. 华中农业大学学报, 2007, **26**(6): 822—826]
- [16] Huang Q Y (Eds), Disease of aquatic animals [M]. Shanghai Shanghai Science and Technology Press, 1998, 103—139 [黄琪琰(主编). 水产动物疾病学. 上海: 上海科学技术出版社, 1998, 103—139]
- [17] Jiang Z F. Disease treatment of Artificial breeding *Acipenser* [J]. *Inland Fisheries*, 2002, **27**(6): 30—31 [姜祝飞. 人工养殖鲟鱼的疾病防治. 内陆水产, 2002, **27**(6): 30—31]
- [18] D. T. *Acipenser baerii* from Konakli [J]. *Science of Russia*, 1991, **2**: 89—93 [尤金. 来自科那科夫的西伯利亚鲟鱼. 苏联科学, 1991, **2**: 89—93]
- [19] Ren Y, Lu C P, Yao H C. Cloning, sequence analysis and detection of an extracellular temperature-labile protease encoding gene (*prfJ*) from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, **13**(6): 924—928 [任燕, 陆承平, 姚火春. 嗜水气单胞菌温敏胞外蛋白酶基因 *prfJ* 的克隆与检测. 中国水产科学, 2006, **13**(6): 924—928]
- [20] Huizinga H W, Esch G W, Hazen T C, *et al*. Histopathology of red sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1979, **2**: 263—277
- [21] Yao J S, Chen J X, Lu H M, *et al*. Studies on pathology of infection of *Aeromonas hydrophila* in *Trionyx sinensis* [J]. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1997, **26**(1): 94—97 [姚金水, 陈家祥, 卢惠明, 等. 中华鳖嗜水气单胞菌感染的病理学观察. 福建农业大学学报, 1997, **26**(1): 94—97]
- [22] Zeng J F, Wang J. Pathological observation the *Aeromonas hydrophila* septicemia of *Trionyx sinensis* [J]. *Journal of Hainan University* (Natural science Edition), 2000, **18**(3): 270—272 [曾纪锋, 王君. 鳖嗜水气单胞菌败血症的病理学观察. 海南大学学报自然科学版, 2000, **18**(3): 270—272]

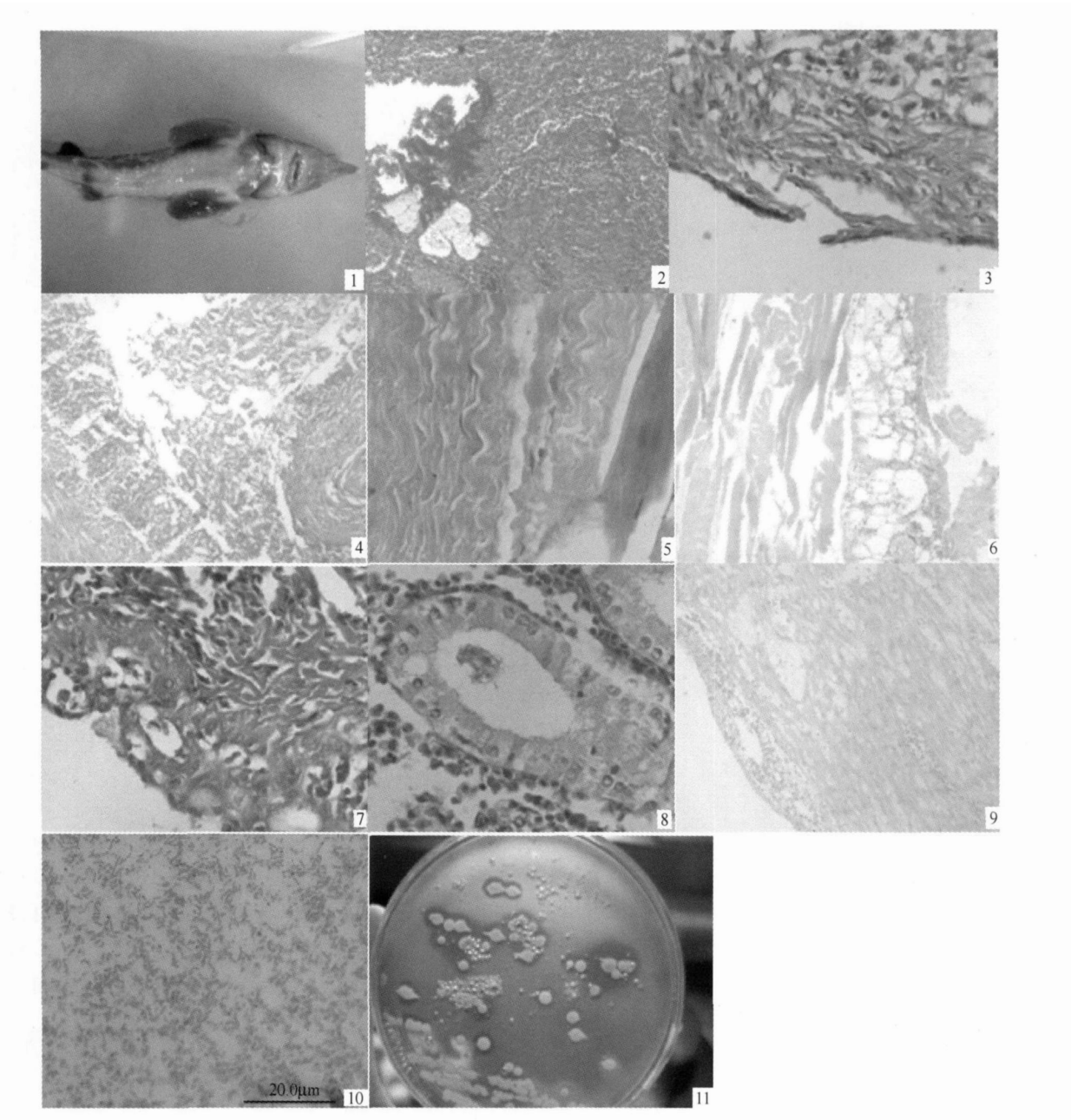
STUDY ON PATHOLOGY AND ETIOLOGY OF HEMORRHAGIC SEPTICEMIA IN *ACIPENSER BAERII*

ZHAO Feng-Qi CAO Jin-Ling and LU Qing

(Key Lab of Ecological Animal Husbandry and Environmental Veterinary Medicine of Shanxi Province, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstracts Epidemiological description, pathology and etiology of hemorrhagic septicemia in infected Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) were studied in this paper. The outbreak of this infectious and lethal disease happened in a fish farm which was located in Linfen, Shanxi Province, China. 20% of cultured *Acipenser baerii* was infected and the mortality rate was 15%. Fish suffering from hemorrhagic septicemia had many symptoms and these ranged from emaciation and red sore mouth to skin ulcerations at any site of the fish. Postmortem examination revealed swelling and haemorrhagic in liver and kidney, serious haemorrhagic and edema in alimentary canal, haemorrhagic and necrosis in gill-like tissue. The major histological lesions were epithelium degeneration, necrosis and desquamation in intestine mucous membrane, degeneration, necrosis in gastric wall smooth muscle, granular and vesicular degeneration and necrosis in renal tubular epithelial cells. On the basis of epidemiological investigation and pathological observation, the bacterium was isolated from the focal area of the infected *Acipenser baerii*, and it was dominant among the isolates. The symptom of the artificial infected fish and the natural infected fish was similar. Morphological observation revealed that the strain of bacterium was a middle-sized Brevibacterium without capsule and brood cell arrayed by single or two strains, two ends of which were obtuse circle. Hemolysis analysis showed that the strain of bacterium grew well and presented obvious β hemolysis on the blood agar plate. Measurement of protein enzyme revealed positive. Physiological and biochemical tests indicated that the isolated bacterium decomposed glucose, arabinose, sucrose, maltose, escubised, mannitol and salicin; it did not ferment xylose, lactose and sorbitol; tests of MR, VP and oxidase were all positive. 16S rRNA sequence analysis showed the sequence length was 686 bp. The nucleotide sequence of isolated bacterium was 100%, 99% and 98% identical to that of *Aeromonas hydrophila* published by Hebei Teacher-training University (gi 119633076) and Sichuan Agricultural University (gi 188013261), Japan (gi 188496906) and India (gi 188032688), CAS (gi 189031545), respectively. Thus, the strain of bacterium was identified as *Aeromonas hydrophila* according to these methods. The drug sensitivity test showed that it was highly sensitive to CTX, KAN, GEN, TET, CMP, POL, NOR, CIP, ENR and resistant to AMO. This paper will be helpful to the disease control and health management during *Acipenser baerii* cultivation.

Key words *Acipenser baerii*, Hemorrhagic septicemia, Pathology, Etiology, *Aeromonas hydrophila*



图版I **Platd**

1. 西伯利亚鲟败血症病鱼; 2. 肠壁固有层有多量的淋巴细胞浸润 (HE × 100); 3. 肠壁平滑肌肿胀、变形、坏死、断裂 (HE × 400); 4. 肠黏膜上皮细胞坏死、脱落 (HE × 100); 5. 肌纤维坏死、呈波浪状 (HE × 100); 6. 皮肤表皮坏死、脱落、皮下水肿 (HE × 400); 7. 皮肤上皮细胞肿胀、空泡化 (HE × 400); 8. 肾小管上皮细胞肿胀, 呈颗粒变性和水泡变性 (HE × 400); 9. 胃壁平滑肌变性、坏死, 肌纤维断裂, 浆膜水肿 (HE × 100); 10. 革兰氏染色及显微观察; 11. 兔血平板菌落周围溶血环

1. *Acipenser baerii* suffering from hemorrhagic septicemia; 2. Large lymphocyte infiltration in intestinal lamina propria (HE × 100); 3. Smooth muscle tumidity, distortion, necrosis and rupture of intestinalis (HE × 400); 4. Epithelium necrosis and desquamation in intestinal mucous membrane (HE × 100); 5. Muscle fiber necrosis appearing waviness (HE × 100); 6. Necrosis desquamation and edema in skin epidermis (HE × 400); 7. Tumidity and vacuolar degeneration in skin epithelial cells (HE × 400); 8. Tumidity, granular and vesicular degeneration in renal tubular epithelial cells (HE × 400); 9. Smooth muscle degeneration, necrosis in gastric wall. Muscle fiber rupture. Chorion edema (HE × 100); 10. Gram's stain and microscopic observation of *Aeromonas hydrophila*; 11. Hemolytic observation of *Aeromonas*