

养殖乌鳢内脏结节病的病原分离、 鉴定与药物敏感性分析

王二龙¹ 汪开毓^{1,2} 陈德芳³ 王均¹ 贺扬¹ 刘韬¹

1.四川农业大学动物医学院,雅安 625014; 2.四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室,雅安 625014;
3.四川农业大学动物科技学院,雅安 625014

摘要 从患内脏结节病的四川眉山地区养殖乌鳢腹水和肝、脾、肾组织中分离并纯化培养、筛选出1株致病菌,经形态结构、染色观察、生理生化实验、16S rRNA基因和特异性序列的PCR检测进行菌株的鉴定,并进行分离菌株的药物敏感性实验。结果发现,该分离株具有与诺卡氏菌 *Nocardia* 较一致的形态特征和相似的生化特性。16S rRNA基因的PCR扩增、测序和系统发育分析显示,该菌株与诺卡氏菌属的亲缘关系较近,同源性较高,与鳢诺卡氏菌 *Nocardia seriolae* 的16S rRNA基因序列相似性高达99%以上;鳢诺卡氏菌的特异性引物 N5F1/N5R1 的PCR检测结果表明该菌为鳢诺卡氏菌;药物敏感性结果显示,该菌对四环素、强力霉素、美满霉素、阿奇霉素、磺胺异噁唑和利福平等药物敏感。

关键词 乌鳢; 结节病; 诺卡氏菌; 16S rRNA; 特异性引物 PCR; 药敏实验
中图分类号 S 941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0090-09

乌鳢(*Channa argus*),又名北方蛇头鱼、黑鱼、生鱼、乌鱼、蛇头鱼、文鱼和才鱼,属鲈形目、鳢科、鳢属,是一种生性凶猛、胃口奇大的肉食性鱼类,在我国分布范围广泛,具有生长快,繁殖力强,疾病少,产量高,适应性强等特点。因其肉质细嫩,味道鲜美,营养丰富,蛋白质含量高,又是外科伤愈食疗补品,深受消费者喜爱,是中国人的“盘中佳肴”,具有较高的营养、药用价值。此外,在东南亚各国,乌鳢的市场需求量日益增加,作为我国外贸出口的重要淡水经济鱼类之一,其经济价值较高。

随着乌鳢高密度集约化养殖的发展,其病害也频见报端,危害程度日趋加剧^[1-5]。本次乌鳢内脏结节病发生在四川眉山仁寿乌鳢养殖区,患病乌鳢腹部膨大,眼球突出。剖检后腹腔充满腹水,以肝脏、脾脏、肾脏出现白色或淡黄色结节为主要症状,并伴有肿大、出血,发病率高达80%,平均死亡率为45%,初步判断为诺卡氏菌感染。通过对患病的乌鳢进行病原的分离培养、动物回归感染试验、生理生化特性鉴定、16S rRNA分析、特异性引物PCR扩增,鉴定该病原菌为鳢诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)。本研究旨在为乌鳢诺卡氏菌病的临床诊断

提供基础资料,为有效防治乌鳢诺卡氏菌病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病料样品、试验动物与主要试剂

患病乌鳢于2014年6月采自四川省眉山市仁寿县乌鳢养殖场,体长18~25 cm,体质量200~300 g。收集腹部膨大,内脏出现典型白点或结节症状的患病乌鳢作为研究材料。健康乌鳢购自四川省雅安市某养殖场,规格与自然发病乌鳢相近,经检查确认健康后做回归感染试验使用。

试验所用培养基为改良诺卡氏菌培养基,参考夏立群等^[6]的方法进行制备。药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,试验所用引物合成与基因测序于生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 病原菌的分离纯化

选取濒死的患病乌鳢,用75%乙醇棉球对体表进行擦拭消毒后,无菌操作剖检鱼体,用接种环从患病乌鳢的腹水、肝脏、脾脏和肾脏等组织中取样划线

收稿日期: 2015-03-12
基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003)
王二龙,博士研究生,研究方向: 水生动物疾病与免疫。E-mail: welsicau@126.com
通信作者: 汪开毓,博士,教授,研究方向: 水生动物疾病与免疫。E-mail: kywangsicau@126.com

接种至固体培养基,25℃恒温培养4~10 d分离纯化细菌,分离菌株编号为WEL-NS01。

1.3 病原菌形态观察

无菌操作剖检鱼体后,分别取腹水和少许具有明显白色结节的内脏组织在玻片上进行均匀涂片,自然晾干后进行抗酸染色和革兰氏染色,观察细菌形态和染色情况。

挑取平板上分离纯化后的单个菌落划线转接于固体培养基上,25℃恒温培养4~10 d,观察平板上的菌落形态,并进行革兰氏染色镜检观察。同时接种于液体培养基中,25℃水浴摇床振荡培养4~10 d,观察菌液浑浊情况以及是否有菌膜产生。

1.4 人工感染试验

试验前随机选取5尾购自四川省雅安市某养殖场的健康乌鳢进行解剖,并取脑、肝脏、脾脏和肾脏等组织涂板以确定其有无细菌感染。试验乌鳢分为5组,每组10尾,分为试验组、PBS对照组和自然组。将分离菌株WEL-NS01接种液体培养基培养后,参照麦氏比浊法用无菌PBS调整菌悬液浓度为 3.0×10^8 、 3.0×10^7 、 3.0×10^6 cfu/mL,试验组每尾乌鳢腹腔注射0.2 mL,PBS对照组注射同等剂量的无菌PBS,自然组不做任何处理,水温(25±1)℃。感染后,每天观察并记录试验鱼的发病和死亡情况,连续观察7 d,并对濒临死亡的鱼进行剖检和病原菌分离鉴定。

1.5 病原菌分类鉴定

1)常规生理生化鉴定。按照《常用细菌系统鉴定手册》^[7]的方法,参照文献[8-9]提供的酶类产生、水解活性、单一碳源利用以及生长温度等生理生化指标,用生化鉴定管对分离的病原菌进行主要理化特性检测。

2)16S rRNA序列扩增和分析。无菌操作,分别挑取患病乌鳢不同组织器官分离纯化的菌株于液体培养基中,25℃振荡培养4~10 d。取菌液1~2 mL按照天根细菌基因组DNA提取试剂盒进行病原菌基因组DNA提取。采用细菌16S rRNA通用引物进行PCR扩增(上游引物27F:5'-AGAGTTT-GATC CTGGCTCAG-3',下游引物1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'),反应在25 μL体系中进行:PCR Premix 12.5 μL,上游引物1.0 μL,下游引物1.0 μL,模板DNA 2.0 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR循环参数:94℃预变性4 min;然后94℃1 min,55℃30 s,72℃1.5 min,循环扩增30次;最

后72℃延伸10 min,于4℃结束反应。预计扩增片段约1 500 bp。以1.0%的琼脂糖凝胶电泳PCR产物,将预期大小的PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

所测得的序列提交GenBank,并在NCBI网站中进行病原菌16S rRNA的Blast在线比对,选取与该序列相关性较高的核酸序列,采用Clustal X软件进行多序列匹配排列分析,并用MEGA 5.0软件包中的Neighbor-Joining法构建系统进化树,确定菌株进化位置。

3)诺卡氏菌特异性引物的PCR扩增和分析。以提取的病原菌基因组DNA为模板,并以海豚链球菌、鲷爱德华氏菌、鲁氏耶尔森氏菌的基因组DNA为对照,参照Labrie等^[10]设计的鳊诺卡氏菌特异性引物N5F1/N5R1(上游引物N5F1:5'-TGAGCCT GAACTGCATGGTTC-3';下游引物N5R1:5'-ACGGTATCGCAGCCCTCTGTA-3')进行特异性PCR检测。反应在25 μL体系中进行,其中:PCR Premix 12.5 μL,上游引物1.0 μL,下游引物1.0 μL,模板DNA 2.0 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR循环参数设置为:94℃预变性4 min;然后94℃1 min,58℃30 s,72℃1.5 min,循环扩增30次;最后72℃延伸10 min,于4℃结束反应。预计扩增片段为1 069 bp。PCR产物进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,观察是否与预期片段大小一致。

1.6 药物敏感实验

采用药敏纸片法,在无菌操作下,将病原菌接种于液体培养基中培养,麦氏比浊法调整菌液浓度至 1.0×10^7 cfu/mL,均匀涂布于固体培养基,贴上药敏纸片。25℃培养4~10 d后,测量抑菌圈直径并进行结果判定。

2 结果与分析

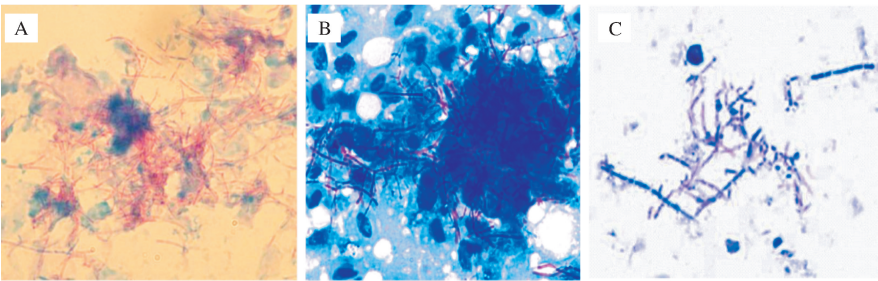
2.1 病原菌形态观察

取患病乌鳢的腹水和肝脏、脾脏、肾脏等组织在玻片上均匀涂片,抗酸染色观察,在腹水和肾脏的涂片上观察到抗酸染色呈阴性(粉红色)的分枝状杆菌(图1A,1B),革兰氏染色呈阳性(蓝紫色)的分枝状杆菌(图1C)。

分离得到的病原菌初代生长缓慢,在固体培养基上25℃培养4 d后才有少许菌落长出,患病乌鳢的腹水、肝脏、脾脏、肾脏等组织中均能分离到相似菌落。其中在固体培养基上菌落呈乳白色或淡黄色

沙粒状,粗糙易碎,边缘不整齐,偶尔在表面形成皱褶(图 2A,2B);在液体培养基中菌落呈颗粒状沉在试管底部,培养基呈透明状,且在液体培养基表面能够明显观察到一层菌膜(图 2C,2D),振荡试管,菌

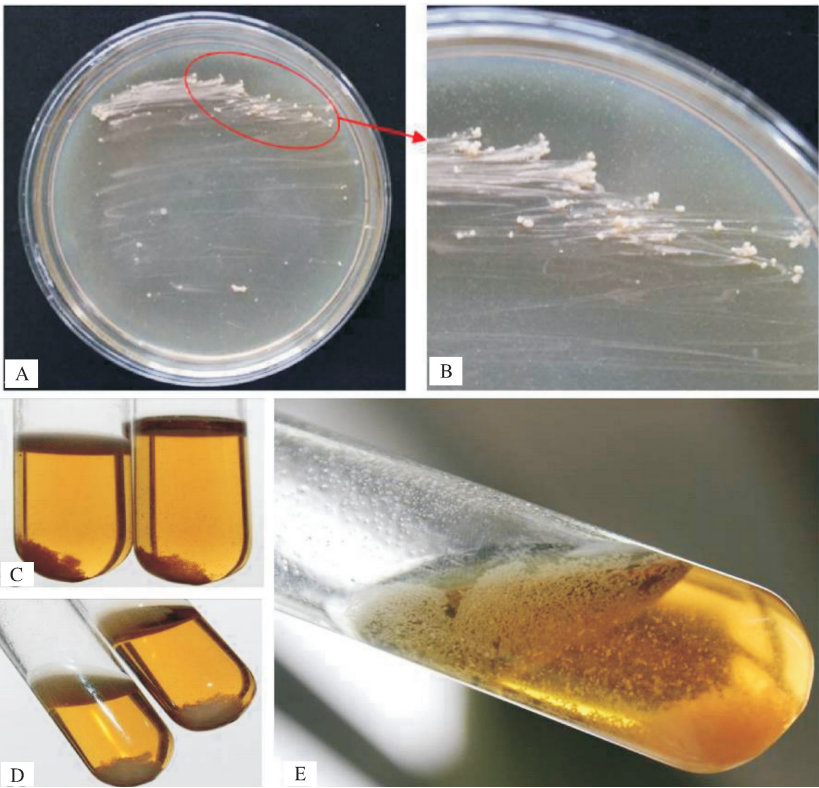
落和表面菌膜在培养基中分散,有的贴在试管内壁,不易洗下(图 2E)。通过进一步的染色镜检观察发现,病原菌为抗酸染色呈阴性、革兰氏染色呈阳性的分枝杆菌。



A:腹水涂片的抗酸染色呈阴性(红色)The acid-fast staining of ascites smear was negative (red); B:肾脏触片的抗酸染色呈阴性 The acid-fast staining of kidney smear was negative (red); C:腹水涂片的革兰氏染色呈阳性(蓝紫色) The gram staining of ascites smear was positive (bule).

图 1 患病乌鳢内脏组织触片的抗酸染色和革兰氏染色(1 000×)

Fig.1 The acid-fast staining and gram staining results of tissue smear of diseased snakehead (1 000×)



A~B:固体培养基上长出的乳白色或淡黄色沙粒状菌落 The bacterial colony was gritty with milk white or light yellow on the solid medium; C~E:液体培养基中长出的菌落和表面菌膜 The bacterial colony and superficial pellicle in the liquid medium.

图 2 病原菌在培养基上的生长情况

Fig.2 The growing states of the pathogen on the culture medium

2.2 病原菌人工感染试验

购自四川省雅安市某养殖场的乌鳢,经剖检取组织涂片接菌后,未分离出细菌,说明乌鳢健康无感染可用于本试验的病原菌回归感染试验。分离菌株 WEL-NS01 经人工感染对乌鳢有较强的致病力,结果见表 1。注射高浓度菌液(3.0×10^8 、 3.0×10^7 cfu/mL)的 2 个试验组乌鳢第 2 天开始死亡,表现

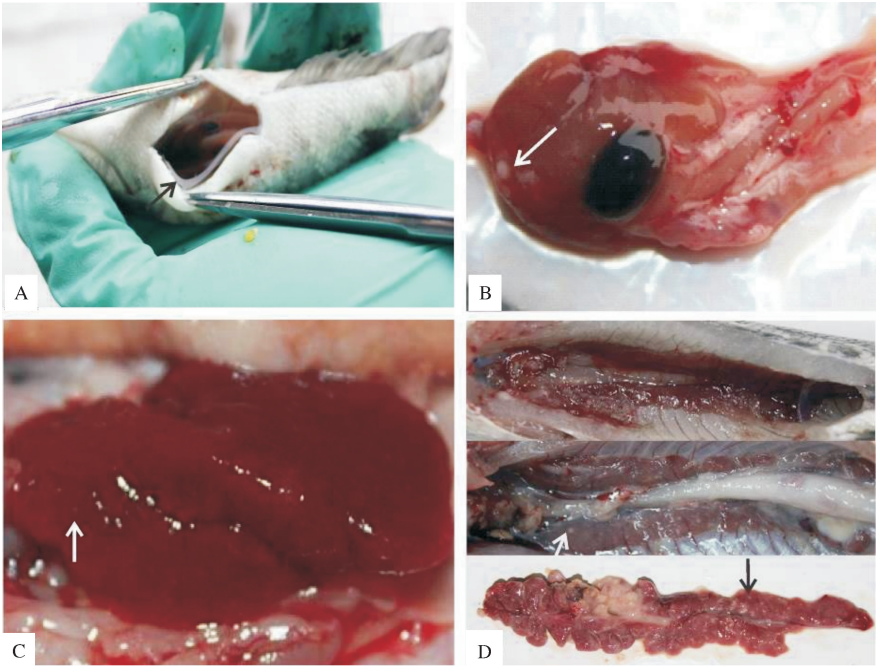
为眼球突出、体表出血、腹部膨大等症状。而 PBS 对照组和自然组无任何症状。剖检死亡的乌鳢,发现其肝脏、脾脏和肾脏出血、肿大,表面可见典型的白色或淡黄色小结节(图 3),从肝脏、脾脏、肾脏等组织中均能分离纯化得到一致的细菌,其菌落形态、菌体形态及染色情况与从自然发病乌鳢体内分离的菌株完全一致,说明分离菌株 WEL-NS01 即为引起

表 1 分离菌株人工感染试验结果¹⁾

Table 1 Artificial infection results of the isolated strains

注射菌株 Strain	菌液浓度/(cfu/mL) Bacteria concentration	注射剂量/mL Injection dose	样本数 Number	死亡数/尾 Death number							死亡率/% Mortality
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
WEL-NS01	3×10^8	0.2	10	0	1	2	2	2	3	0	100
	3×10^7	0.2	10	0	1	1	1	2	2	0	70
	3×10^6	0.2	10	0	0	1	1	1	1	1	50
	PBS 组 PBS group	0.2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	自然组 Natural group	—	10	0	0	0	0	0	0	0	0

1) “—”表示自然组未做处理。“—”not given any treatment in natural group.



A:腹腔积满腹水(→) Abdominal cavity filled with ascitic fluid(→); B:肝脏肿大、出血,表面有白色结节(→) Hepatomegaly, bleeding with white nodules on the surface(→); C:脾脏肿大,出血,表面有小结节(→) Splenomegaly, bleeding with white tubercule on the surface(→); D:肾脏出血,肿大,表面有小结节(→) Renal enlargement, bleeding with tubercule on the surface(→).

图 3 感染病原菌的试验组乌鳢内脏器官病变情况

Fig.3 The lesions of the internal organ of experimental group snakehead infected with the isolated bacteria

本次乌鳢内脏结节病的病原菌。

2.3 病原菌的分类鉴定

1)生理生化鉴定结果。分离菌株 WEL-NS01 的

主要生理生化特性见表 2,该病原菌具备了诺卡菌属的基本生理生化特征,且与参照菌株 *N. seriolae* 的特性完全相同,初步判定为鳊诺卡氏菌 *N. seriolae*。

表 2 病原菌 WEL-NS01 与参照菌株的生理生化特征¹⁾

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of isolated strain WEL-NS01 and reference strain

检测项目 Items	病原菌 Pathogen	参照菌株 Reference strains	
	WEL-NS01	<i>N. asteroides</i> ATCC19247	<i>N. seriolae</i> JCM 3360
革兰氏染色 Gram staining	+	+	+
抗酸染色 Acid-fast staining	—	—	—
酶类产生 Enzymes activity			
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+
氧化酶 Oxidase	—	—	—
脲酶 Urease	—	+	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+
水解活性 Decomposition of			
七叶苷 Aesculin	+	+	+
明胶 Aesculin	—	—	—
淀粉 Starch	—	—	—
酪蛋白 Casein	—	—	—
黄嘌呤 Xanthine	—	—	—
酪氨酸 Tyrosine	—	—	—
唯一碳源利用 Growth on sole carbon sources			
甘露醇 Mannitol	—	+	—
山梨醇 Sorbitol	—	—	—
柠檬酸盐 Citrate	+	+	+
45℃下生长 Growth	—	—	—

1)“+”阳性;“—”阴性;参照菌株星状诺卡氏菌 *Nocardia asteroides* ATCC19247、鱗鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolae* JCM 3360 引自参考文献[8]。“+” positive; “—” negative.Reference strains,i.e.*N. asteroides* ATCC19247 and *N. seriolae* JCM 3360 quote from reference [8].

2)16S rRNA 序列分析。采用通用引物 27F 和 1492R 扩增病原菌的 16S rRNA 基因,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测得到预期约为 1 500 bp 大小的单一条带,测序发现所得序列共有 1 429 bp,序列提交 NCBI 获得 GenBank 登录号为 KM387284,经 Blastn 比对与相关序列进行相似性分析,并通过 MEGA5.0 软件包中 Neighbor-Joining 法构建系统

发育进化树,结果表明,分离得到的病原菌与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系较近,同源性较高,相似性为 96.9%~99.9%,与诺卡氏菌属亚种 *Nocardia* sp. MH166(GQ495658.1)的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.9%,仅有 1 个碱基的差异(图 4);系统发育进化树分析显示,本次分离的病原菌与鱗诺卡氏菌 *Nocardia seriolae* W060622 聚为一簇(图 5)。

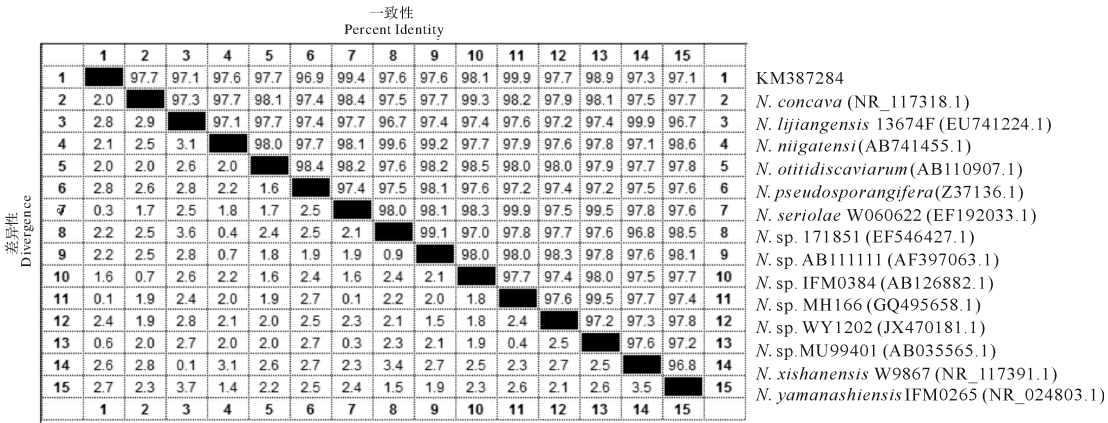


图 4 病原菌与 14 株诺卡氏菌的 16S rRNA 基因的同源性矩阵分析

Fig.4 Homology matrix analysis of 16S rRNA gene sequences of strain KM387284 and 14 *Nocardia* reference strains

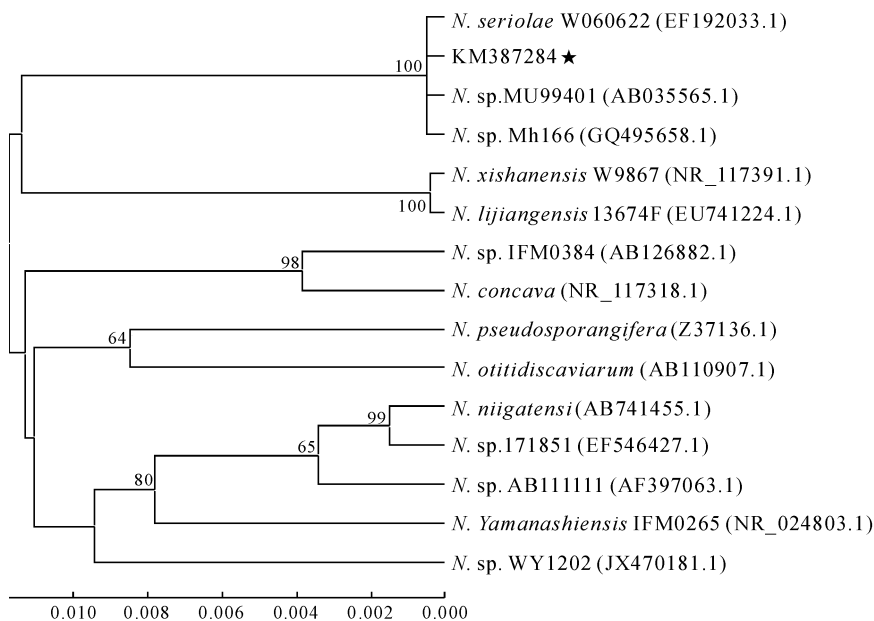
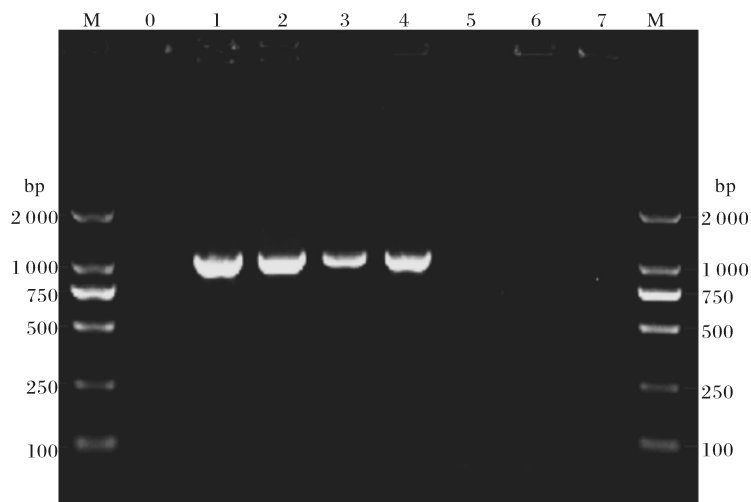


图 5 邻近法构建病原菌与 14 株诺卡氏菌 16S rRNA 基因的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic trees of the isolated strain KM387284 and 14 *Nocardia* strains based on 16S rRNA gene sequence by Neighbor-Joining method

3)诺卡氏菌特异性引物 PCR 扩增分析。分离自患病乌鳢腹水、肝脏、脾脏、肾脏的病原菌经鲈诺卡氏菌特异性引物 N5F1/N5R1 的 PCR 扩增后均在 1 000 bp 条带处得到预期大小(1 069 bp)的单一

条带,而对照菌株海豚链球菌、鲎爱德华氏菌、鲁氏耶尔森氏菌在 1 000 bp 处均无条带产生(图 6),表明本试验分离病原菌 WEL-NS01 为鲈诺卡氏菌,且引物的特异性较强。



M:DNA marker 2000; 0:阴性对照 Negative control; 1~4:分别为分离自患病乌鳢腹水、肝脏、脾脏、肾脏的病原菌 Bacteria isolated from ascites,liver,spleen and kidney,respectively; 5~7:分别为鲎爱德华氏菌、鲁氏耶尔森氏菌和海豚链球菌 *Edwardsiella ictaluri*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*, respectively.

图 6 分离自患病乌鳢的病原菌特异性引物 PCR 检测

Fig.6 Specific detection of the isolated bacteria from diseased snakehead by PCR

2.4 病原菌药物敏感性实验

药敏纸片法测定分离菌 WEL-NS01 对 22 种抗菌药物的药物敏感性结果见表 3。表 3 结果表明:分

离菌株对四环素、强力霉素、美满霉素、阿奇霉素、磺胺异噁唑、利福平等敏感,对红霉素、呋喃唑酮、复达欣、妥布霉素中度敏感,对其他抗菌药物耐受(表 3)。

表 3 致病菌的药物敏感试验结果¹⁾

Table 3 The sensitivity of the pathogen to antibiotics

抗菌药物名称 Antibiotic	每片药敏纸片含量/ μg Concentration	结果判定/mm Determine results	抗菌药物名称 Antibiotic	每片药敏纸片含量/ μg Concentration	结果判定/mm Determine results
青霉素 Penicillin	10	0(R)	克林霉素 Clindamycin	2	0(R)
氨苄西林 Ampicillin	10	0(R)	氟苯尼考 Florfenicol	30	12(R)
先锋霉素 V Cephalexin V	30	0(R)	诺氟沙星 Norfloxacin	10	11(R)
头孢噻肟 Cefotaxime	30	0(R)	恩诺沙星 Enrofloxacin	5	15(R)
链霉素 Streptomycin	10	0(R)	磺胺异噁唑 Sulfisoxazole	300	17(S)
卡那霉素 Kanamycin	30	12(R)	复方新诺明 Cotrimoxazole	3.75	0(R)
四环素 Tetracycline	30	21(S)	甲氧苄啶 Trimethoprim	5	0(R)
强力霉素 Doxycycline	30	26(S)	呋喃唑酮 Furazolidone	100	16(I)
美满霉素 Minocycline	30	28(S)	利福平 Rifampicin	30	20(S)
红霉素 Erythromycin	30	18(I)	复达欣 Ceftazidime	30	16(I)
阿奇霉素 Azithromycin	30	22(S)	妥布霉素 Tobramycin	10	14(I)

1)R 表示耐药;I 表示中度敏感;S 表示敏感 R;Resistance; I;Middle sensitive; S;Sensitivity.

3 讨 论

诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)为革兰氏阳性菌,属细菌界,放线菌门,放线菌纲(*Actino bacteria*),放线菌目(*Actinomycetales*),诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*),诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[11]。该菌以腐生为主,广泛分布在空气、土壤、活性污泥、水、腐烂的植被、动物的排泄物及人的组织中,可引发人、哺乳动物及鱼类疾病^[12-13]。鱼类感染诺卡氏菌的首次报道可追溯到 1963 年,从阿根廷的患病虹彩脂鱼分离出第一例鱼类诺卡氏菌,并命名为星状诺卡氏菌(*N. asteroides*)^[14]。1967 年,日本报道了黄尾鲷首次暴发感染放线菌,并于次年分离出该病原菌,通过形态学及生理生化特性观察发现与星状诺卡氏菌很相似,但某些生理生化特征又存在差异,于是认定它是新菌种,并命名为卡帕其诺卡氏菌(*N. kampachi*)^[15],直到 1988 年,Kudo 等^[16]结合分子分类的方法真正确定了其分类地位,并将卡帕其诺卡氏菌更正命名为鳟诺卡氏菌(*N. seriolae*)。随后,又从发病的大西洋牡蛎、红鲑鱼体内分离出诺卡氏菌,并分别鉴定命名为粗形诺卡氏菌(*N. crassostreae*)和杀鲑诺卡氏菌(*N. salmonicida*)。

鳟诺卡氏菌 *N. seriolae* 是从发病鱼中分离最多的一种诺卡氏菌。鉴于诺卡氏菌感染的鱼类病情严重时,鱼体外部和解剖症状都较明显,且该菌可用

选择性培养基分离培养,故可根据临床症状、组织病理及病原菌形态特征等进行诺卡氏菌的初步诊断^[17]。本研究中从四川省眉山仁寿患病乌鳢腹水和内脏组织分离出的病原菌经人工培养菌落特征、个体形态学及革兰氏染色和抗酸染色观察,生理生化特性检测,发现该病原菌符合诺卡氏菌的一般特征,结合 16S rRNA 基因序列分析以及特异性引物 PCR 扩增等分子生物学方法,鉴定为鳟诺卡氏菌引起的发病,是四川省首次关于养殖乌鳢感染诺卡氏菌的报道。

鱼类诺卡氏菌病(Nocardiosis)是由诺卡氏菌属的细菌引起的慢性全身性疾病,症状包括皮肤的溃疡灶和内脏器官肉芽肿病变^[18]。诺卡氏菌曾是日本水产养殖中最主要的病原菌之一^[17],随着养殖规模的增加,该菌对我国水产养殖的健康发展产生了较大影响,造成了巨大的经济损失,近年来相关学者也加强了对诺卡氏菌对养殖鱼类致病的关注和研究。王国良等先后于 2006 年^[19]和 2009 年^[2]分别报道了我国在养殖大黄鱼和养殖乌鳢发现以患病鱼内脏表面出现大小不一的白色结节和肉芽肿病变为主要特征的诺卡氏菌病。此后,蒋依依等^[8]、王瑞旋等^[20]、徐晓丽等^[21]分别从加州鲈、卵形鲳鲷、丝足鲈体内分离鉴定出鳟诺卡氏菌的感染。本研究中通过对患病乌鳢剖检取样观察及分离菌株的回归感染试验发现,发病乌鳢腹部膨大,腹腔积有腹水,肝脏、

脾脏和肾脏等组织出现不同程度的肿大、出血,其表面均可见白色或淡黄色的小结节,发病情况和内脏器官病变特征与鱼类诺卡氏菌病的症状一致。

研究发现,诺卡氏菌由于菌体被包围在结节的中心,常规的内脏穿刺接种较难分离出该菌^[22],且该菌生长缓慢,给临床诺卡氏菌病的诊断及病原菌的分离鉴定带来了极大困难。本研究通过采用改良诺卡氏菌培养基进行病原菌的分离纯化培养,结果发现病原菌初代培养生长缓慢,在固体培养基培养5~7 d时长出白色或淡黄色呈沙粒状的菌落,粗糙易碎,在表面形成皱褶,这与王国良等^[2]报道的固体培养基生长的诺卡氏菌菌落形态特征一致。而在液体培养基中培养,表面可形成一层薄薄的菌膜,菌体沉积在试管底部,培养基澄清透明,这一特征在满其蒙^[17]的研究中也有同样的报道。随着现代生物技术的发展,越来越多的分子生物学技术应用在鱼类诺卡氏菌病的诊断和检测中。夏洪丽等^[5]成功建立了鱼类致病性杀鲑诺卡氏菌(*Nocardia salmonicida*)特异性PCR检测方法,Miyoshi等^[22]利用16S rRNA序列设计特异性引物检测鳊诺卡氏菌,蒋依依等^[23]选用具有较高保守性的16S~23S rRNA间隔序列(ITS)检测了分离自大口黑鲈的鳊诺卡氏菌,建立了诺卡氏菌特异性PCR快速检测方法。王国良等^[24-25]先后建立了环介导恒温扩增技术(LAMP)和荧光定量PCR等方法来检测大黄鱼、乌鳢中的鳊诺卡氏菌。本研究设计16S rRNA通用引物扩增病原菌的目的基因序列,通过测序比对和同源性分析发现该菌属于诺卡氏菌属,进化树分析表明该分离菌株与鳊诺卡氏菌聚为一簇。此外,利用鳊诺卡氏菌特异性引物N5F1/N5R1进行病原菌的特异性PCR检测,获得了预期大小的特异性条带,且参考菌株均为阴性。据此确定本次乌鳢结节病为诺卡氏菌病,病原菌为鳊诺卡氏菌。

为指导养殖中该病的防控,并合理进行临床上该病的治疗,本研究采用纸片扩散法对分离菌株的药物敏感性进行了初步研究。结果显示,22种受试药物中,仅对四环素、强力霉素、美满霉素、阿奇霉素、磺胺异噁唑、利福平等6种药物敏感,对红霉素、呋喃唑酮、复达欣、妥布霉素中度敏感,与已有报道的诺卡氏菌药物敏感性基本一致^[21],可为临床上同类药物的使用提供参考。值得注意的是,虽然病原菌对一些抗生素敏感(如强力霉素等),但当疾病发生后这些抗生素也很难达到治疗效果。因此,在疾

病高发季节不仅要适当使用药物进行预防,更要增强养殖鱼类的体质,提高其抗病能力,同时改善养殖环境。综上,本研究将为临床上乌鳢诺卡氏菌病的诊断、病原菌分离鉴定、疾病治疗和防控奠定基础。

参考文献

- [1] 益鸣.乌鳢烂皮病的防治[J].渔业致富指南,2001(10):52.
- [2] 王国良,徐益军,金珊,等.养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J].水生生物学报,2009,33(2):277-283.
- [3] 赵宇江.浅析乌鳢两种常见代谢障碍综合症的发生与治疗[J].水产养殖,2012(1):56.
- [4] 杨成胜.一例乌鳢诺卡氏菌病的诊治[J].科学养鱼,2013(11):65-66.
- [5] 夏洪丽,鲁义善,汤菊芬,等.鱼类致病杀鲑诺卡氏菌(*Nocardia salmonicida*)特异性PCR检测方法的建立[J].广东海洋大学学报,2014,34(4):56-61.
- [6] 夏立群,王蓓,夏洪丽,等.鱼诺卡氏菌培养条件及培养基的优化[J].南方水产科学,2013,9(3):51-56.
- [7] 东秀珠,蔡妙英.常用细菌系统鉴定手册[M].北京:北京科学出版社,2001:409-412.
- [8] 蒋依依,李言伟,周素明,等.加州鲈诺卡氏菌病原的分离与鉴定[J].中山大学学报:自然科学版,2012,51(1):76-81.
- [9] 刘志恒,姜成林.放线菌现代生物学与生物技术[M].北京:科学出版社,2004:77-80.
- [10] LABRIE L,NG J,TAN Z,et al.Diseases in Asian aquaculture VI [M].Manila:Fish Health Section,Asian Fisheries Society,2008:297-312.
- [11] 张建丽,刘志恒.诺卡氏菌型放线菌的分类[J].微生物学报,2001,41(4):513-517.
- [12] 袁思平,王国良,金珊.养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J].微生物学通报,2006,33(2):137-141.
- [13] 张媛,张媛媛,李振军,等.诺卡氏菌研究进展[J].中国人兽共患病学报,2012,28(6):628-634.
- [14] VALDEZ I E,CONROY D A.The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*).ii.Characteristics of the bacterium isolated[J].Microbiologia Espanola,1963,16:249.
- [15] KARIYA T,KUBOTA S,NAKAMURA Y,et al.Nocardial infection in cultured yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *S. purpurascens*) I.Bacteriological study[J].Fish Pathol,1968,3:16-23.
- [16] KUDO T,HATAI K,SEINO A.*Nocardia seriolae* sp.nov.causing nocardiosis of cultured fish [J].International Journal of Systematic Bacteriology,1988,38(2):173-178.
- [17] 满其蒙.鳊鱼诺卡氏菌致病机制的研究[D].上海:上海海洋大学图书馆,2013.
- [18] BRANSDEN M P,CARSON J,MUNDAY B L,et al.Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J].J Fish Dis,2000,23(1):83-85.
- [19] 王国良,袁思平,金珊.网箱养殖大黄鱼诺卡氏菌病的初步研究

[J].水产学报,2006,30(1):103-107.

[20] 王瑞旋,刘广锋,王江勇,等.养殖卵形鲳鲹诺卡氏菌病的研究[J].海洋湖沼通报,2010(1):52-58.

[21] 徐晓丽,李贺密,邵蓬,等.丝足鲈致病性诺卡氏菌的鉴定及系统发育分析[J].水产科学,2013,32(11):657-661.

[22] MIYOSHI Y,SUZUKI S.A PCR method to detect *Nocardia seriolae* in fish samples[J].Fish Pathology (Japan),2003,38(3):93-97.

[23] 蒋依依,李安兴.诺卡菌特异性 PCR 快速检测方法的建立[J].南方水产科学,2011,7(6):47-51.

[24] 王国良,刘璐,徐益军.鱼类致病鲷鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 的 LAMP 检测技术建立与应用[J].海洋与湖沼,2011,42(1):27-31.

[25] 王国良,刘璐,李思源.鱼诺卡氏菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J].水产学报,2012,36(4):509-513.

Isolation,identification and drug sensitivity test of causative pathogen
offarmed snakehead (*Channa argus*) with visceral sarcoidosis

WANG Er-long¹ WANG Kai-yu^{1,2} CHEN De-fang³
WANG Jun¹ HE Yang¹ LIU Tao¹

1.College of Veterinary Medicine,Sichuan Agricultural University,Ya'an 625014,China ;
2.Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province ,
Sichuan Agricultural University,Ya'an 625014,China ;
3.College of Animal Science and Technology , Sichuan Agricultural University , Ya'an 625014,China

Abstract A pathogenic bacterium was isolated from the ascites,liver,spleen and kidney of the diseased snakehead (*Channa argus*) with visceral sarcoidosis from Meishan,Sichuan Province.Morphologic structure,dyeing observation,physiological and biochemical tests,PCR amplification of 16S rRNA gene and special sequence of the isolate were applied to determine the pathogen,and then drug sensitivity test was also carried out.The results showed that the isolate was similar to *Nocardia* in morphological and biochemical properties.The results of PCR amplification,sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene showed that the pathogen had close genetic relationship and maximum homologies with *Nocardia*,having a distant sequence similarity more than 99% with *N. seriolea*. Moreover,the bacterium was identified as *N. seriolea* by PCR amplification with special primers N5F1/N5R1.Besides,the results of drug sensitive test indicated that the organism was sensitive to Tetracycline,Doxycycline,Minocycline,Azithromycin,Sulfisoxazole and Rifampicin.

Key words *Channa argus*; Sarcoidosis; *Nocardia seriolea*; 16S rRNA; PCR amplification; drug sensitive test

(责任编辑:边书京)