

宽体金线蛭水肿病病原分离鉴定、致病性研究及药敏分析

赵良伟, 张丽, 霍文慧, 蒙晓雷, 魏俊利*

天津市动物疫病预防控制中心, 天津

收稿日期: 2025年2月11日; 录用日期: 2025年3月4日; 发布日期: 2025年3月14日

摘要

为明确宽体金线蛭水肿病病原、并筛选有效药物, 为水肿病的防治提供参考。从天津市宝坻区某养殖场发病水蛭中分离病原, 通过生理生化分析、16S rRNA基因测序、比对进行细菌鉴定, 采用微量稀释法测定8种抗菌药物的对分离菌株的最低抑菌浓度。结果显示: 维氏气单胞菌是宽体金线蛭水肿病的病原, 该菌株对恩诺沙星、氟苯尼考、盐酸多西环素、磺胺间甲氧嘧啶钠、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑敏感。

关键词

宽体金线蛭, 水肿病, 维氏气单胞菌, 人工感染, 药敏分析

Isolation, Identification, Pathogenicity and Drug Sensitivity Analysis of the Pathogen of *Whitmania pigra* Oedema Disease

Liangwei Zhao, Li Zhang, Wenhui Huo, Xiaolei Meng, Junli Wei*

Tianjin Animal Disease Prevention and Control Center, Tianjin

Received: Feb. 11th, 2025; accepted: Mar. 4th, 2025; published: Mar. 14th, 2025

Abstract

To identify the pathogen of *Whitmania pigra* oedema, disease and screen for effective drugs, providing a reference for the prevention and treatment of the disease. Pathogens were isolated from diseased leech in a farm in Baodi, Tianjin. The bacteria were identified by physiological and biochemical

*通讯作者。

文章引用: 赵良伟, 张丽, 霍文慧, 蒙晓雷, 魏俊利. 宽体金线蛭水肿病病原分离鉴定、致病性研究及药敏分析[J]. 水产研究, 2025, 12(1): 59-64. DOI: 10.12677/ojfr.2025.121007

analysis, 16S rRNA gene sequencing and comparison. The minimum inhibitory concentration (MIC) of eight antimicrobial agents against the isolated strain was determined using the microdilution method. The results showed that *Aeromonas veronii* was the pathogen of *Whitmania pigra* oedema, disease. This strain is sensitive to enrofloxacin, florfenicol, doxycycline hydrochloride, sulfamonomethoxine sodium, and trimethoprim/sulfamethoxazole.

Keywords

Whitmania pigra, Oedema, *Aeromonas veronii*, Artificial Infection, Drug Sensitivity Analysis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

宽体金线蛭(*Whitmania pigra*)是黄蛭科、金线蛭属环节动物,背部有5条黄色黑色斑点组成的纵线,体背面暗绿色,腹面淡黄色,在中国分布广泛,栖息于水田、河流、湖泊中[1],以螺、蚬等软体动物为食[2]。宽体金线蛭是中国中药典规定的传统药材[3],其干品和鲜品均含有抗凝血活性物质,包括蛋白质、微量元素和必需氨基酸,起着活血化瘀、通经活络、消积散结等功效,临床上主要用于防治心肌梗死、脑血栓等心脑血管疾病,以及高血压、高脂血症等[4]。随着近年来水蛭养殖规模、养殖密度的不断扩大,其病害也时有发生,一旦发病给养殖户造成严重的经济损失。水肿病是宽体金线蛭养殖过程中一种危害严重的疾病,主要临床症状表现为活力低下、腹部水肿、最后死亡[5]。

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)隶属弧菌科,气单胞菌属,是一种常见的革兰氏阴性杆菌,能够引起陆生动物、鱼和人的多种不同程度的感染[6]。维氏气单胞菌可以感染青虾[7]、黄颡[8]、罗非[9]、斑点叉尾鲷[10]、鲤[11]、鲫[12]等多种水产经济养殖动物,给水产养殖业造成巨大的经济损失。

2024年8~9月,天津市宝坻区部分养殖场养殖宽体金线蛭出现大量死亡,患病水蛭停止摄食、腹部肿胀、触感软塌塌、反应迟缓、触摸不能蜷缩,最终死亡。本研究从患病水蛭病灶部位分离病原菌,进行人工感染实验,通过对病原菌的形态观察、生化鉴定、分子生物学鉴定及药敏分析,确定水肿病的病原,为宽体金线蛭水肿病的防治提供参考资料。

2. 材料与方法

2.1. 材料

患病水蛭采自天津市宝坻区朝阳街道某养殖场,健康水蛭来自宝坻区德盛源牧业有限公司。脑心浸液琼脂(BHI)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自英国Oxoid公司,营养琼脂、革兰氏染液试剂盒、氧化酶试纸以及生化鉴定管均购自北京陆桥技术有限责任公司,梅里埃生化鉴定试剂卡GN及配套试剂购自法国梅里埃公司,药敏预制板购自上海复星医药(集团)股份有限公司,DL2000 DNA marker、核酸染料、琼脂糖购自Takara,PCR引物27F:(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R:(5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3')苏州金唯智合成。

2.2. 细菌分离与纯化

用75%酒精对宽体金线蛭进行体表消毒,在无菌环境下从患病宽体金线蛭的水肿部位分离细菌,接

种于 BHI 培养基上 28℃静置培养 18~24 h，挑取优势菌落重复划线培养以获得纯化菌株，将纯化菌株加入含有 25%甘油的 TSB 培养基中于-80℃保存备用。

2.3. 分离菌株的鉴定

细菌生化鉴定采用梅里埃 VITEK Compact2 进行，并补充革兰氏染色、氧化发酵试验、氧化酶试验、硫化氢、葡萄糖产气、V-P 试验等。

细菌 16S rRNA 分子生物学鉴定按照曹青[13]等进行的方法进行。

2.4. 人工感染试验

挑取单个分离菌株接种于营养琼脂培养基中培养 18~24 h，用无菌生理盐水冲洗菌苔并重悬，采用荧光显微镜直接计数法[14]计数，用无菌生理盐水配制成浓度为 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 、 1.0×10^{10} CFU/mL 菌悬液备用。受试群体预先抽样检测，在 BHI 平板上未见菌落生长，且暂养期间未出现发病和死亡情况。选取体表无伤、无水肿症状、触摸能够迅速蜷缩的水蛭 100 尾，集中于一个容器中，然后随机分为 5 组，每组 20 尾，背部注射不同浓度菌液 50 μL，对照组注射无菌生理盐水 50 μL。试验水蛭养殖在 40 L 整理箱中，24 h 连续充气，水温保持在 20℃~25℃，每天更换 50% (体积)的水，不投喂。观察并记录水蛭的死亡情况，移除死亡水蛭。对出现发病症状的水蛭按照 1.2 的方法进行细菌分离。

2.5. 分离菌株的药敏分析

细菌最小抑菌浓度测定采用微量稀释法进行，操作方案按照药敏预制板说明书进行，质控菌株使用大肠杆菌(ATCC29522)，测定药物均为允许使用的国标渔药。结果判定参考美国临床实验室标准化协会 (CLSI)发布的药物敏感性耐药标准判定。

3. 结果

3.1. 细菌鉴定结果

分离菌株在营养琼脂上呈圆形、灰白色菌落，表面光滑、边缘整齐，革兰氏染色为阴性杆菌，生化鉴定为维氏气单胞菌，将其编号为 BYK61，部分生化反应结果见表 1。

Table 1. Biochemical characterization of isolated strain

表 1. 分离菌株的生化特性

生化项目	生化特性	生化项目	生化特性	生化项目	生化特性
D-葡萄糖	+	吡啉试验	+	葡萄糖产气	+
D-甘露醇	+	赖氨酸脱羧酶	+	D-山梨醇	+
D-甘露糖	+	鸟氨酸脱羧酶	-	D-麦芽糖	+
蔗糖	+	L-阿拉伯糖	-	柠檬酸钠	+
β-半乳糖苷酶	+	蔗糖	+	酯酶	+
氧化酶	+	硫化氢	-	七叶苷	+
V-P 试验	+	葡萄糖发酵	+	水杨苷	+

注+，≥90%的菌株为阳性；-，≥90%的菌株为阴性。

BYK61 经 16S rRNA 通用引物扩增、测序后得到长度为 1423 bp 的基因序列，将该序列与 NCBI 中

的基因序列 BLAST 比对，确定该菌株为维氏气单胞菌。

3.2. 人工感染试验结果

健康水蛭经人工感染后，初期表现为焦躁不安、游动频繁，随后游动变缓慢、活力减弱，各浓度在 1~3 d 内开始出现死亡(表 2)，感染严重的个体躯干部出现水肿(图 1)，解剖发现体腔内有大量积液。取刚刚死亡和濒死、症状明显的水蛭进行细菌分离，获得大量单一菌株，经鉴定与人工感染试验菌株相同。根据柯赫氏法则判定，人工感染试验菌株 BYK61，是宽体金线蛭水肿病致病菌。

3.3. 药敏试验结果

药敏试验采用恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、盐酸多西环素、氟甲喹、磺胺间甲氧嘧啶钠、胺甲噻唑/甲氧苄啶 8 种国标渔药，结果见表 3。根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)发布的

Table 2. Experimental results of artificial infection
表 2. 人工感染试验结果

感染浓度 CFU/mL	时间(d)和死亡数量(尾)						
	1	2	3	4	5	6	7
1.0 × 10 ⁷	0	0	5	8	1	1	0
1.0 × 10 ⁸	0	18	1	0	0	0	0
1.0 × 10 ⁹	5	11	3	0	0	0	0
1.0 × 10 ¹⁰	5	10	4	0	0	0	0
对照	0	0	0	0	0	0	0



Figure 1. Artificially infecting *W. pigra* with oedema symptoms
图 1. 人工感染出现水肿症状的水蛭

Table 3. Drug susceptibility assays for *Aeromonas veronii*
表 3. 维氏气单胞菌药敏试验结果

菌株	最低抑菌浓度 MIC (mg/L)							
	恩诺沙星	硫酸新霉素	甲砒霉素	氟苯尼考	盐酸多西环素	氟甲喹	磺胺间甲氧嘧啶钠	甲氧苄啶/磺胺甲噻唑
BYK161	0.015	1	1	0.25	0.5	0.125	32	0.125/2.4
ATCC25922	0.015	2	128	8	1	0.25	4	0.125/2.4
质控范围	0.008~0.03	1~4	—	2~8	0.5~2	—	—	≤0.5/9.5

药物敏感性及耐药标准判定 BYK161 对恩诺沙星、氟苯尼考、盐酸多西环素、磺胺间甲氧嘧啶钠、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑均敏感。硫酸新霉素、甲砒霉素、氟甲喹暂无判定标准,但其对 BYK161 的 MIC 相对较低。

4. 讨论

维氏气单胞菌是一种在水产养殖中常见的条件致病菌,广泛分布于各种环境中,能够感染各种水生动物,并能在人畜中进行传播。王楠楠[15]等从江苏省 310 个大宗淡水鱼发病样本中分离获得气单胞菌 775 株,其中维氏气单胞菌占了 418 株。郝成森[16]等从大鲵中分离 1 株维氏气单胞菌,该菌可致使大鲵脏器充血、出血和炎性细胞浸润并可致死。汤环宇[17]等从江苏省泗洪县多家克氏原螯虾养殖场发病样品中分离出维氏气单胞菌,能够引起克氏原螯虾肝胰腺与肠道组织出现严重的病理损伤。益准[18]等从病死牦牛鼻拭子、肛拭子及肝脏分离获得 6 株维氏气单胞菌,该菌可以引起牦牛腹泻和肝脏肿大。

水蛭水肿病的报道较少,其病原有多种。唐毅[19]等研究发现弗氏柠檬酸杆菌是引起宽体金线蛭水肿病的病原。磨美兰[20]通过研究认为宽体金线蛭水肿病是由大肠杆菌、沙门氏菌和变形杆菌混合感染引起的。董靖[5]等研究发现维氏气单胞菌是日本医蛭水肿病的病原。王海华[21]等、祝林[22]等研究发现维氏气单胞菌是引起宽体金线蛭水肿病的病原,与本研究的结果一致。

抗生素是治疗细菌性疾病的主要方式,8 种药物对本研究分离出的维氏气单胞菌 BYK61 的 MIC 均比较低,因此在治疗水肿病时可以选择上述药物进行治疗。但宽体金线蛭主要以螺蛳[2]为食,在药物的使用过程中无法进行拌料投喂,仅能进行小范围药浴治疗。因此在防治过程中可以考虑使用中草药进行治疗。祝林[22]等研究发现,乌梅、五倍子、五味子和苏木对宽体金线蛭源维氏气单胞菌具有明显的抑制效果。

参考文献

- [1] 郑利,覃川杰. 宽体金线蛭研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(20): 1-5, 8.
- [2] 蔡银碧,张孟,梁月,等. 人工养殖宽体金线蛭食性偏好初探[J]. 水产科技情报, 2018, 45(6): 308-310.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 85.
- [4] 赵楠,徐子亮. 宽体金线蛭人工繁殖技术[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(1): 112, 116.
- [5] 董靖,刘永涛,胥宁,等. 日本医蛭水肿病病原分离鉴定及敏感性试验[J]. 淡水渔业, 2018, 48(6): 46-52.
- [6] 康元环,张冬星,杨滨僮,等. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 452-459, 465.
- [7] Gao, X.J., Tong, S.Q., Zhang, S.M., et al. (2020) *Aeromonas veronii* Associated with Red Gill Disease and Its Induced Immune Response in *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture Research*, **51**, 5163. <https://doi.org/10.1111/are.14854>
- [8] 徐洋,蔺凌云,姚嘉赞,等. 黄颡鱼“溃疡综合征”病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业, 2015, 45(5): 100-104.
- [9] 韦阳道,杨军,文衍红,等. 罗非鱼竖鳞病病原维氏气单胞菌的分离鉴定与致病性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(11): 3047-3052.
- [10] 田浪,温贵兰,张升波,等. 斑点叉尾源致病性维氏气单胞菌的分离与生物学特性鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11): 3203-3210.
- [11] 裴立硕,刘彬,韩卓然,等. 鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(7): 2184-2194.
- [12] 董思思,伍勇,蔚思琪,等. 银鲫致病维氏气单胞菌分离鉴定及生物学特性分析[J]. 水产学杂志, 2023, 36(5): 58-64.
- [13] 曹青,张向阳,庞茂达,等. 南京地区某渔场嗜水气单胞菌流行菌株的鉴定及分子分型[J]. 水产学报, 2017, 41(1): 134-141.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 12763. 6-200 海洋调查规范第 6 部分: 海洋生物调查[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 18-30.

- [15] 王楠楠, 吴亚锋, 沈广龙, 等. 江苏省水产动物源气单胞菌的分离鉴定和耐药性分析[J]. 金陵科技学院学报, 2023, 39(4): 85-92.
- [16] 郝成森, 刘佳, 王艳, 等. 1 株大鲵源多重耐药维氏气单胞菌全基因组解析及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(8): 1677-1683.
- [17] 汤环宇, 钱且奇, 陈圳, 等. 泗洪地区克氏原螯虾病原维氏气单胞菌鉴定及致病性分析[J]. 淡水渔业, 2023, 53(4): 61-71.
- [18] 益准, 求准, 泽木滚, 等. 牦牛源维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 草学, 2021(3): 59-65.
- [19] 唐毅, 杨清麟, 王伟, 等. 宽体金线蛭水肿病病原的分离鉴定与病理学研究[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(12): 2844-2853.
- [20] 磨美兰, 韦平, 周维官, 等. 水蛭常见病原菌的分离与鉴定[J]. 动物学杂志, 2003(3): 2-7.
- [21] 王海华, 付辉云, 王帅兵, 等. 蚂蟥水肿病病原的分离鉴定与药敏分析[J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32(6): 36-41.
- [22] 祝林, 覃晓曼, 刘峰, 等. 宽体金线蛭源维氏气单胞菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 南方农业学报, 2024, 55(11): 3474-3486.