

水蛭常见病原菌的分离与鉴定

磨美兰^① 韦平^{①*} 周维官^② 廖品静^① 陶锦华^①

(^①广西大学动物科学技术学院 南宁 530005; ^②广西科学院生物研究所 南宁 530003)

摘要: 从表现软体、水肿、出血和硬结等特征的患病宽体金线蛭 (*Whitmania pigra*) 中分离到 13 株细菌分离物。通过培养特征、形态学观察及生化试验, 确定了所分离的细菌中有 6 株为大肠杆菌 (占 46.15%), 4 株为变形杆菌 (占 30.77%), 3 株为沙门氏菌 (占 23.08%)。动物回归试验表明, 接种后 10 d 内大肠杆菌、沙门氏菌和变形杆菌对水蛭的致死率分别为 100% (4/4)、100% (4/4) 和 25% (1/4); 药敏试验结果表明, 这三种细菌普遍对复合磺胺、氯霉素、丁胺卡那霉素、头孢哌酮、丙氟哌酸、氟哌酸敏感。研究结果表明, 本病是由多个病因导致的一种临床综合症。因此, 在进行药物治疗时, 应选用多种药物联合以达到最佳的治疗效果。

关键词: 水蛭; 药敏试验; 生化试验; 回归试验; 大肠杆菌; 变形杆菌; 沙门氏菌

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)03-02-06

Isolation and Characterization of Common Pathogens from Diseased Leeches

MO Mei-Lan^① WEI Ping^① ZHOU Wei-Guan^② LIAO Pin-Jing^① TAO Qin-Hua^①

(^① College of Animal Science and Veterinary Medicine, Guangxi University, Nanning 530005;

^② Institute of Biology, Guangxi Academy of Science, Nanning 530003, China)

Abstract: 13 bacteria were isolated from the diseased leeches (*Whitmania pigra*), characterized by a soft body, edema and bleeding or hard abscess on the skin. Morphological features and the results of a biochemical test with bacterial isolates revealed that 6, 4 and 3 bacteria were classified as *Escherichia coli* (constitutes 46.15% of the total isolates), *Proteus* (30.77%) and *Salmonella* (23.08%) respectively. A pathogenicity test on leeches found that mortality was 100% (4/4), 100% (4/4) and 25% (1/4) respectively within 10 days post-inoculation with isolates of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Proteus* respectively. The drug susceptibility test showed that 3 pathogens were all highly sensitive to co-trimoxazole, chloramphenical, amikacin, cefoperazone, ciprofloxacin and norfloxacin. Since the poor condition of the leeches was due to a multi-factorial rather than a simple mono-factor disease, a combination drug treatment is probably necessary to cure the disease.

Key words: Leech (*Whitmania pigra*); Drug susceptibility test; Biochemistry test; Pathogenicity test; *Escherichia coli*; *Proteus*; *Salmonella*

* 通讯作者, E-mail: pingwei8@hotmail.com;

第一作者简介 磨美兰, 女, 29岁, 博士研究生, 讲师; 研究方向: 动物疫病及其防治。

收稿日期: 2002-10-10, 修回日期: 2003-03-14

水蛭, 俗称蚂蟥, 是我国传统名贵中药材, 它具有活血化瘀、通经活络等功能, 临床上用于治疗跌打损伤、闭经、血瘀腹痛^[1]、角膜溃疡、角膜斑翳^[2]、中风、风湿痹痛、淋闭、肝脾肿大、瘫痪、脑血栓、高血压、高血脂、肿瘤等疾病, 而且还具有抗癌作用^[3]。从水蛭唾液中提取的能抑制血液凝固的水蛭素已知是世界上最强的天然抗凝剂, 其作用优于肝素, 对心脑血管疾病有显著疗效^[2,3]。以水蛭为主要原料生产的中成药已有近 10 种。水蛭养殖是近年来刚刚兴起的特种养殖业, 随着养殖规模的不断扩大, 水蛭的疾病也随之增加, 而国内对其研究较少, 关于水蛭疾病的诊断以及预防尚未见报道。作者发现水蛭在养殖过程中很容易发病, 临床上最常见到的主要病状是: 身体柔软、水肿、身体腹部出现大小不等的硬结、有出血斑点等, 其发病率及死亡率较高, 如不能控制会给养殖户造成严重的经济损失。

1 材料与方 法

1.1 材料 患病水蛭为广西科学院生物研究所水蛭养殖基地饲养的不同时间提供的发病宽体金线蛭 (*Whitmania pigra*), 共 24 条。主要的共同病征为软体、水肿、出血和皮肤硬结等。培养基为按常规的方法配制 5% 的鸡全血平板、肉汤培养基、伊红美兰琼脂平板及血斜培养基。药敏试纸为上海伊华医学科技有限公司生产。细菌生化微量鉴定管为浙江省军区后勤部卫生防疫检验所生产。试验动物为广西科学院生物研究所提供的健康宽体金线蛭。

1.2 方 法

1.2.1 临床症状及病理学观察 按常规进行。

1.2.2 细菌分离培养 从 24 条患病水蛭的硬结、出血、水肿等部位的皮下, 无菌取样划线接种于全血琼脂平板, 置 37℃ 培养 24 ~ 48 h。挑取可疑菌落在全血琼脂平板或伊红美兰琼脂平板上进行纯培养并保存于血斜培养基上。

1.2.3 细菌形态学观察 取纯培养细菌抹片, 革兰氏染色, 镜检。

1.2.4 细菌分离物的药敏试验 取细菌的纯

培养物按常规方法进行药敏试验(纸片法)。结果判定标准如下: 抑菌圈直径(mm) 大于 20 以上为高敏, 15 ~ 20 为中敏, 15 以下为低敏, 无抑菌圈为耐药。

1.2.5 细菌分离物的生化试验 按韦平^[4]、韩文瑜等^[5]和李仲兴等^[6]的方法分别进行如下试验: ①对可疑大肠杆菌做 10 项定性的生化试验: 葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、尿素、明胶、硫化氢、枸橼酸盐、吡啶、M.R.、V-P 试验; ②对可疑变形杆菌做定性的生化试验: KCN 培养基、丙二酸盐、苯丙氨酸酶、吡啶、M.R.、V-P、尿素、葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、枸橼酸盐、尿素酶、卫茅醇、明胶、精氨酸、赖氨酸、硫化氢试验; ③对可疑沙门氏菌做定性的生化试验: 吡啶、M.R.、V-P、尿素、KCN 培养基、乳糖、葡萄糖、蔗糖、硫化氢、动力、明胶、枸橼酸盐、硝酸盐还原、苯丙氨酸酶、侧金盏花醇、水杨苷。

1.2.6 药物治疗试验 选用氟哌酸配成 200 mg/kg 药液。方法是将患病水蛭放入药液中浸泡 2 ~ 3 h/次, 1 次/d, 连续浸泡 3 ~ 5 d, 取出水蛭放入清水中饲养以观察治疗效果。同时, 用水溶性痢特灵喷洒水体, 水体终浓度为 0.4 mg/kg 并保持 5 d 不换水。

1.2.7 回归试验 将分离的菌株配制成约 7×10^{11} 个菌落形成单位(CFU)/kg 水的悬液, 按 0.1 ml/条注射接种到健康的水蛭腹部肌肉内, 每组 4 条, 并将其饲养于不同的容器内进行观察, 容器内的各种饲养条件保持一致, 同时设立对照组。水蛭发病死亡后进行病理学观察、细菌分离和生化试验。

2 结 果

2.1 临床症状及病理学观察 据养殖者诉说这批发病的水蛭是从外地引种回来的, 引种回来后第二天即陆续发病, 散发性, 发病率 10% ~ 30%, 致死率几乎为 100%。精神差, 活动少, 部分病水蛭沉在水底, 有的吸附在池壁或产卵平台的泥土上。所选送来的 24 条患病水蛭中有的身体呈柔软状, 像海绵一样(5/24); 有的表现为腹部出现明显的硬结, 或在头部, 或在尾

部,或头尾部兼有(7/24),有的整条水蛭明显水肿(3/24);有的有出血斑、出血点或伴有硬结(12/24)。剖检变化不明显,有的可见体内壁出血,死者大多数体表有一层无色透明粘液,部分水蛭腹部有出血斑点,有大量体液。

2.2 细菌培养分离 共获得 13 株细菌分离物(分别用英文字母按顺序命名为 A~M)。其中, A、B、C、D、E、F 6 个菌株在普通培养基上均分别生长良好,形成直径 2~3 mm、圆形、凸起、润湿、光滑、灰白色、半透明、边缘整齐的菌落;在肉汤培养基中,呈均匀混浊,经 24 h 培养后,形成菌膜,管底有粘液状沉淀;在血琼脂平板上某些菌株产生 β 溶血环;在伊红美蓝琼脂平板上,形成的菌株是紫黑色,并带金属光泽,均符合大肠杆菌的培养特征。G、H、I、J 4 个菌株的培养特征为在普通琼脂、血琼脂平板上,大多数菌株呈迁徙扩散生长,迅速弥漫成波状薄膜,布

满整个培养基表面,某些菌株在血琼脂上溶血,有些产生腐败臭味。在肉汤中生长迅速、均匀混浊、液面有菌膜、管底部有沉淀,均符合变形杆菌的培养特征。K、L、M 3 个菌株的培养特征是在普通平板上菌落圆形,直径 2~3 mm,光滑、无色、半透明、边缘整齐,有时可出现侏儒型菌落,有的呈粘液状生长,菌落的大小往往不一,均符合沙门氏菌的培养特征。

2.3 细菌形态学观察 革兰氏染色,镜检,13 株细菌均为革兰氏阴性杆菌。

2.4 细菌分离物的药敏试验(表 1) 结果判定标准如下:抑菌圈直径(mm)大于 20 以上为高敏,15~20 为中敏,15 以下为低敏,无抑菌圈为耐药。从药敏试验结果可看出,虽然是同一种细菌,但其抑菌效果却不同。这三种细菌普遍对复合磺胺、氯霉素、丁胺卡那霉素、头孢哌酮、丙氟哌酸、氟哌酸敏感。

表 1 13 株水蛭病原菌对 23 种抗菌药的敏感性

抗菌药物	抑菌圈直径(mm)												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
利福平	7	6	10	6	12	10	0	0	0	0	28	0	0
呋喃妥因	33	24	26	18	21	24	12	11	13	12	13	14	20
卡那霉素	16	18	15	16	14	15	18	15	18	15	24	20	15
四环素	16	17	19	16	18	19	10	16	8	0	6	15	7
羧苄青霉素	0	0	0	17	0	0	16	0	7	19	34	0	11
氨苄青霉素	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	18
磺胺异噁唑	0	21	0	0	22	20	26	14	21	23	0	0	0
妥布霉素	17	12	20	15	14	19	16	15	14	15	22	0	16
大观霉素	20	16	18	15	16	18	13	10	15	20	0	0	26
克林霉素	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0
氯霉素	13	15	26	20	36	24	14	27	23	22	14	16	10
青霉素	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	22	0	0
庆大霉素	12	16	13	9	13	15	15	16	14	14	23	0	15
头孢唑啉	0	10	15	0	17	20	8	19	0	0	25	0	0
丁胺卡那霉素	14	0	24	14	16	20	18	16	18	16	26	16	15
红霉素	19	14	8	0	17	16	0	8	0	0	0	24	0
头孢哌酮	28	26	23	0	36	20	12	22	19	20	33	0	20
甲氧苄胺嘧啶	22	15	20	8	19	18	0	14	17	20	0	7	0
链霉素	14	15	15	18	12	10	7	17	17	14	16	0	0
丙氟哌酸	13	0	25	12	28	27	18	19	21	25	24	20	10
复合磺胺	19	16	18	14	27	24	22	21	24	28	0	0	15
氟哌酸	20	32	24	28	24	28	21	30	20	23	19	7	16
痢特灵	15	20	16	0	21	18	0	16	0	0	0	0	7

2.5 细菌分离物的生化试验 根据细菌分离物的生化试验结果并参照细菌的分类标

准^[4-6],可确定 A、B、C、D、E、F 6 个菌株为大肠杆菌, G、H、I、J 4 个菌株为变形杆菌, K、L、M 3 个菌株为沙门氏菌(表 2~4)。

表 2 可疑为大肠杆菌分离物的生化试验结果

菌株	试剂									
	吲哚	M.R.	V-P	尿素	甘露醇	葡萄糖	麦芽糖	明胶	硫化氢	枸橼酸盐
A	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
B	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
D	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
E	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-

(1)“+”表示为阳性反应;“-”表示为阴性反应;(2)表中的培养基均置于 37℃ 温箱中培养 24~120 h,下表同

表 3 可疑为变形杆菌分离物的生化试验结果

菌株	试剂															
	KCN 培养基	丙二酸盐	苯丙氨酸酶	吲哚	M.R.	V-P	葡萄糖	阿拉伯糖	乳糖	尿素酶	卫芽醇	枸橼酸盐	精氨酸	赖氨酸	明胶	硫化氢
G	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
H	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
I	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
J	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

表 4 可疑为沙门氏菌分离物的生化试验结果

菌株	试剂															
	吲哚	M.R.	V-P	尿素	KCN 培养基	乳糖	葡萄糖	蔗糖	硫化氢	动力	明胶	枸橼酸盐	硝酸盐还原	苯丙氨酸酶	侧金盏花醇	水杨苷
K	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
L	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
M	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-

2.6 药物治疗 浸泡法能控制水蛭的死亡,但不能完全控制疾病的发生。发现有大约 30% 的水蛭仍发病,发病的水蛭身体柔软、水肿,身体腹部出现大小不等的硬结、出血斑点等。

2.7 回归试验

2.7.1 临床症状 接种 24 h 后,试验水蛭均不同程度出现发病症状。48 h 后接种大肠杆菌的水蛭发生死亡,7 d 内接种的 4 条水蛭全部死亡;接种变形杆菌的 4 条水蛭在 48 h 内未见死亡,接种后 10 d 死亡 1 条,存活 3 条;接种沙门氏菌的 4 条水蛭在 48 h 内死亡 1 条,接种后 10 d 另外 3 条全部死亡;对照组接种注射用水,10 d 后 4 条水蛭均存活。死亡水蛭共同的主要表现为身体蜷缩、游动无力、精神沉郁、潜伏懒动;死者有的身体肿大,体表有一层透明粘液,部分见身体硬结;身体肿胀处、腹下都有不同程度的充血出血现象。与自然病例的情况类似。

2.7.2 剖检变化 体内充满大量带有恶臭味的体液,呈浅黄色,皮下组织充血、出血,体内也充血、出血,有些病死水蛭内脏腐烂。

2.7.3 细菌形态学观察 从发病死亡的水蛭中分离到细菌的菌落形态、镜检情况与从送检患病水蛭分离得到的细菌相同。

2.7.4 生化试验 从发病死亡水蛭中分离的细菌生化试验结果与送检患病水蛭分离得到的细菌完全相同。

3 讨论与分析

3.1 水蛭的疾病 至今为止,国内对水蛭疾病的研究还是一个空白。目前临床上所见到的水蛭疾病均没有一个准确的命名。作者在实际工作中常见到发病水蛭共同的主要表现为身体呈现硬结、出血、水肿、软体。从上述病状的水蛭体内分别分离出大肠杆菌(占 46.15%)、变形

杆菌(占 30.77%)和沙门氏菌(占 23.08%),因此可认定它们是由多个病因导致的一种临床综合症。

3.2 病原菌 根据细菌的培养特征、形态学观察、生化试验及动物回归试验,可知大肠杆菌、沙门氏菌和变形杆菌是水蛭的常见病原菌。而这三种细菌均为环境常在菌,条件不适时,变为致病菌,又称条件致病菌。由于水蛭生活于水体中,对于各种应激因素,如气温的突然改变、水体受到污染等环境因素的影响都会引起水蛭的抗病力降低,可诱发条件性传染病的发生,导致死亡。本研究发现水蛭疾病不是由单一病因而是由多个致病因素所致,也证实了这一点。

3.3 药敏试验结果 从分离到的病原菌药敏试验结果表明,不同菌株对不同的药物具有不同程度的敏感性,这主要是因为同一菌属具有不同的菌种或菌株所致,有些是溶血的,而有些却是不溶血的,这就导致了药敏结果的差异。因此,在用药时最好是多种抗菌药物联合应用。

3.4 生化试验结果 6株可疑大肠杆菌中,A株的10项定性生化试验有9项符合,硫化氢为阳性,与其他学者的结果不尽相同,但与韦平^[4]在鸡大肠杆菌的发现相同,加上在选择培养基上的生长特点也符合大肠杆菌,故将其归为大肠杆菌。这也说明同一菌属中包含有不同的生化特性的菌种或菌株。

3.5 药物的治疗效果 选用敏感的药物氟哌酸对患病水蛭进行浸泡治疗时,发现虽能控制水蛭的死亡但不能完全控制其疾病的发生,这可能是因为药物治疗用量和时间不足。另一个原因可能是乌龟、蛇、水蛭等变温动物对药物的吸收以及药物在体内的循环和分布比恒温动物差,这在作者对乌龟、蛇等的研究中已得到证实^[7-9]。此外,饲养水体中可能也存在多种细菌,也影响了药效的发挥。在治疗时,应根据实际情况,适当选用多种敏感药物联合应用和加大药液浓度以及注意水质的清洁等。

3.6 水蛭常见病的预防与治疗 本研究发现水蛭常见疾病不是由单个致病因素引起的,因此防治要根据实际情况制定出一套科学合理的

防控措施。如在饲养管理方面,每天要坚持巡视养殖池,观察水蛭的食欲、运动、体态、精神状况等,若发现病水蛭要及时进行隔离观察治疗,对死水蛭要立即捞出水池并严格消毒处理,防止病原菌的扩散。另外,还须对发病的养殖池更换新水,加入的水用 0.4 mg/kg 强氯精进行消毒;在养殖管理过程中,还应注意水质的变化,防止池水受到污染。水蛭生活的最适水质以中性或微酸性为宜,过多偏酸偏碱均会影响水蛭的生长发育。室外养殖池在投放水蛭之前,应用茶饼、巴豆、漂白粉、五氯酚钠等药物进行清塘处理,以杀灭水中的虾、蟹和水生昆虫的幼虫及一些病原微生物;在投喂饲料时,应注意防止食物在水中腐烂变质,污染水体,如条件允许,饵料在投放之前可用消毒液浸泡消毒以杀灭食物上的病原体。此外,水蛭的饲养密度应根据气温和个体大小而定,气温低和个体小的,密度可以大些,如密度过大会起水蛭缺氧而大量死亡。水蛭容易得细菌性传染病,特别是在秋天情况更严重。经研究发现在水温 20℃ 时用 0.4 mg/kg 的呋喃唑酮全池泼洒,保持 5 d 左右不换水,可以有效地预防水蛭细菌性传染病的发生。

4 结 论

本次实验所分离的水蛭常见病原菌主要是大肠杆菌(6/13, 46.15%),变形杆菌(4/13, 30.77%)和沙门氏菌(3/13, 23.08%)。

有些水蛭病原菌对某些抗菌药物的抵抗力较强。大肠杆菌对利福平、克林霉素、氨苄青霉素、青霉素等不敏感;变形杆菌对利福平、氨苄青霉素、克林霉素、红霉素不敏感;沙门氏菌对磺胺异噁唑、甲氧苄胺嘧啶、痢特灵不敏感。但这三种细菌均对复合磺胺、氯霉素、丁胺卡那霉素、头孢哌酮、丙氟哌酸、氟哌酸敏感。

从药敏试验及生化试验结果可知,同一种细菌不同分离株有些差异,这可能是同一属的不同种或亚种所致。

参 考 文 献

[1] 赵从民. 水蛭的药用与养殖技术. 经济动物学报, 2000, 2:

- 4.
- [2] 高本刚. 常见药用动物养殖采集与加工. 北京: 中国林业出版社, 1984. 4 ~ 5.
- [3] 欧阳淦. 特种动物养殖技术. 北京: 中国盲文出版社, 1999. 7 ~ 16.
- [4] 韦平. 广西大肠杆菌的分离与鉴定. 广西农学院学报, 1989, 8(2): 31 ~ 38.
- [5] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术. 吉林: 吉林农业出版社, 1992.
- [6] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏等. 临床细菌学. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [7] 曾维铭, 韦平, 周维官等. 广西驯养蛇类腐皮病病因的研究. 蛇志, 2001, 13(1): 9 ~ 11.
- [8] 韦平, 磨美兰, 李康然等. 蛇腐皮病的病原特性及其防治方法的研究. 蛇志, 2001, 13(3): 10 ~ 14.
- [9] 陶锦华, 李康然, 韦平. 石龟的肺炎克雷伯氏菌的诊断与防治. 广西畜牧兽医, 2002, 18(6): 20 ~ 21.