

乌鳢伊丽莎白菌的分离鉴定及致病性研究

刘晓琳, 梅 寒, 卜令飞, 金 珊*, 赵青松, 陈寅儿

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为解明宁波某养殖场乌鳢死亡的原因, 从患典型症状病鱼体内分离到 1 株细菌 WLY01, 经形态学观察、生理生化表型鉴定和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌为伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia* sp.). 该菌最适生长温度为 37 °C, 其对绵羊血、小鼠血、乌鳢血和鲫鱼血等都有较强溶血活性, 呈 β 溶血. 人工感染试验表明: 该菌主要通过鱼体表受伤部位感染, 发病症状和死亡速度与创伤程度呈明显相关性, 其 8 d 的 LD_{50} 为 1.69×10^6 cfu·g⁻¹, 对乌鳢具有较强致病性. 药敏试验显示: 该菌对米诺环素、恩诺沙星、利福平、强力霉素、磺胺异噁唑、依诺沙星等 6 种药物较敏感, 因此, 可把米诺环素、利福平、强力霉素、磺胺异噁唑等作为治疗鱼类伊丽莎白菌病的候选药物.

关键词: 伊丽莎白菌; 乌鳢; 16S rDNA; 致病性; 药物敏感性

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 02-0001-07

乌鳢(*Channa argus*)作为中国特色的淡水经济鱼类, 广泛分布于我国各大水域, 其营养丰富, 含有多不饱和脂肪酸和各类氨基酸, 骨刺少、口感佳, 素有“鱼中珍品”之称^[1], 一直深受国内外消费者的青睐, 是菜市场销售的鲜活水产主要品种之一. 2015 年 5 月宁波某养殖池塘陆续出现养殖乌鳢死亡现象, 病鱼主要症状表现为精神萎靡、体表轻度溃烂, 偶有出血、肝脏略变黄, 偶有色斑、腹腔内组织松软糜烂、肾略有肿大、肠组织粘连. 为明确乌鳢的死亡原因, 作者对患病乌鳢进行了病原检查、分离鉴定及致病性试验, 认为引起本次乌鳢死亡的主要致病菌为伊丽莎白菌(*Elizabethkingia* sp.).

伊丽莎白菌在自然界中适应能力强, 在水、土壤、食物及医院环境中普遍存在, 是条件致病菌^[2]. 据资料显示, 目前伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*)中共包括脑膜败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*)、米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*)、按蚊伊丽莎白菌(*E. anophelis*)和内生伊丽莎白菌(*E. endophytica*)等 4 个种^[2]. 其中脑膜败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*)、米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*)和按蚊伊丽莎白菌(*E.*

anophelis)已被证实为人类重要病原菌种, 可引起人类脑膜炎、败血症和肺炎等多种严重疾病^[2]. 但关于伊丽莎白菌引起水产动物疾病的病例很少, 仅有脑膜败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*)作为病原被报道^[3], 而对该属细菌的流行病学及致病性知之更少. 因此, 对伊丽莎白菌的研究不仅可以丰富鱼类病原库的资料, 同时可为进一步探明伊丽莎白菌的致病机理及鱼类伊丽莎白菌病的防治提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼来源

病鱼取自宁波某乌鳢养殖场, 体重 250~400 g; 健康鱼购自宁波水产市场, 体重 250~300 g.

1.1.2 主要试剂和药品

胰蛋白胨琼脂(TSA)、血琼脂基础、药敏纸片等(杭州滨和微生物试剂有限公司); 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒等(北京全式金生物技术有限公司); 细菌通用引物 27F 和 1492R, 由上海华大基

收稿日期: 2017-06-21.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 海洋公益性行业专项项目(201105007); 宁波大学学科项目(XKZSC1503).

第一作者: 刘晓琳(1991—), 女, 安徽安庆人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品微生物学. E-mail: 1412649782@qq.com

*通信作者: 金珊(1964—), 女, 浙江天台人, 教授, 主要研究方向: 水产动物病害防控. E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

因科技有限公司合成。

1.2 病原菌的分离

取典型患病乌鳢 3 批数尾, 在无菌操作台上用灭菌剪刀解剖病鱼, 取其肝、血液、肾等组织分别划线接种于 TSA 平板培养基上, 28 °C 恒温培养 48 h 后, 经形态学观察选取形态特征一致的优势菌落进行纯培养, 将获得的纯菌株 WLY01 接种胰蛋白胨半固体保存。

1.3 病原菌的分类鉴定

1.3.1 形态学观察

分离菌接种于 TSA 平板, 分别在 24, 28, 32, 37, 42 °C 下培养, 定时对菌株的菌落形态和生长情况进行观察记录, 并将分离菌株在最适温度下培养 20 h 后作革兰氏染色及透射电镜观察。

1.3.2 生理生化鉴定试验

分离菌生理生化试验采用 API 20E 和 API 20NE 细菌快速鉴定试剂盒并参考文献[4-6]等资料中的项目进行。

1.3.3 16S rDNA 扩增及其序列分析

试验采用细菌通用引物 27F 和 1492R 对分离菌株的 DNA 进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增。扩增条件及 PCR 扩增产物回收、克隆参考王鑫毅等^[7]的方法进行, 结果由上海桑尼生物科技有限公司完成测序。

利用 Genbank 数据库中的 BLAST 方法, 将测得的菌株的 16S rDNA 序列在该数据库进行序列相似性比较, 选择与所测的目的序列同源性较高的菌株, 采用 ClustalX 软件进行多序列比对(Multiple Alignments), 利用 MEGA 6.06 软件, 采用邻位相连(Neighbor-Joining, N-J)法构建系统发育树。

1.4 溶血活性检测

采用绵羊、小鼠、乌鳢、鲫鱼等动物的血制成血琼脂平板, 点种法接入分离菌, 37 °C 培养 24 h, 通过观察溶血圈有无判断病原菌的溶血活性。

1.5 致病性试验

试验参照韩艳楠和余银春等^[8-9]的方法并稍作修改。健康乌鳢暂养 7 d 后进行感染试验, 水温 (28±1)°C, pH 7.0±0.2, 连续充气, 适量投饵。菌株接种在 TSA 培养基上 37 °C 培养 24 h 后, 用 0.75% 无菌生理盐水制成浓度分别约 5.37×10^8 , 5.37×10^7 , 5.37×10^6 , 5.37×10^5 , 5.37×10^4 和 5.37×10^3 cfu·mL⁻¹

的菌悬液。人工感染共设肌肉注射组和创伤浸泡组 2 大组。其中肌肉注射组又分 14 小组, 以上每个菌浓度各 2 组, 每组健康乌鳢 10 尾, 共 20 尾, 肌肉注射 0.3 mL 菌液, 对照组 2 组 20 尾注射同量无菌生理盐水, 用 SPSS 19.0 软件计算细菌半致死浓度^[10]。创伤浸泡组也分为 8 小组, 即创伤浸泡组、无创伤浸泡组、创伤对照组、空白对照组各 2 组, 每组乌鳢 10 尾。创伤浸泡组是剪去部分鳍条、刮去部分鳞片、用无菌小刀轻划伤皮肤, 然后把经创伤处理的鱼放入 5.37×10^4 cfu·mL⁻¹ 稀释菌液中浸泡 30 min, 自来水清洗后暂养; 无创伤浸泡组不制造创伤, 其他处理方法同创伤浸泡组; 创伤对照组和空白对照组均不浸泡菌液, 其他处理方法同试验组。实验过程中定时观察记录试验鱼的病症及死亡情况, 对濒死鱼进行细菌分离。

1.6 药敏试验

采用 K-B 纸片法对菌株进行药物敏感性测定, 根据 CLSI 文件^[11]并结合杭州滨和微生物试剂有限公司提供的药敏判读标准进行结果判定。

2 结果

2.1 菌株 WLY01 的菌体形态和菌落特征

本实验从患病乌鳢体内分离出 1 株疑似病原菌 WLY01, 将分离菌株 WLY01 接种于 TSA 平板, 分别在 24, 28, 32, 37, 42 °C 下培养, 结果显示, 该菌在 TSA 平板上 24 °C 生长相对较缓慢, 培养 24 h 菌落很小; 28 和 32 °C 下生长速度中等, 培养 24 h 菌落直径约 0.50~0.75 mm; 在 37 和 42 °C 下生长较好, 24 h 形成直径约为 1.0~1.5 mm 的圆形菌落, 菌落颜色为米色或淡黄色, 边缘整齐, 半透明, 表面湿润、光滑(图 1)。



图 1 菌株 WLY01 在 TSA 上的菌落形态
把菌接种于 TSA 斜面 37 °C 培养 20 h 后作革兰

氏染色及电镜观察, 结果显示, 该菌为杆状, 两端略微钝圆, 呈单个分散存在, 大小约 $(0.4\sim 0.7)\mu\text{m}\times(1.0\sim 3.5)\mu\text{m}$, 具有荚膜, 无芽孢和鞭毛(图 2), 革兰氏染色阴性。

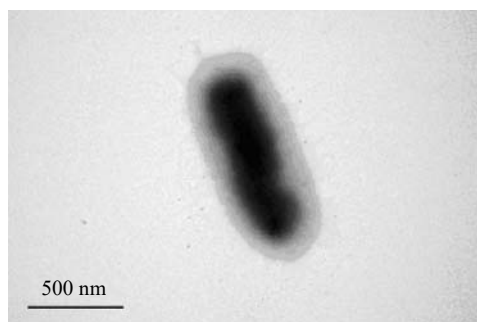


图 2 菌株 WLY01 的电镜照片

2.2 菌株 WLY01 的生理生化特性

采用 API 20E 和 API 20NE 细菌快速鉴定试剂盒并参考相关文献^[2,6]对菌株 WLY01 进行 40 项生理生化试验, 结果见表 1。

表 1 菌株 WLY01 的生理生化特征

测试项目	R26 ^T WLY01	测试项目	R26 ^T WLY01
5℃生长	-	37℃生长	+
42℃生长	-	麦康凯琼脂	-
硝酸盐还原	0	黑色素	-
色氨酸脱羧酶	+	鸟氨酸脱羧酶	-
精氨酸双水解酶	-	赖氨酸脱羧酶	-
脲酶	-	淀粉酶	-
β-半乳糖苷酶	+	V-P 试验	0
甘露醇	+	乳糖	w
肌醇	-	鼠李糖	+
山梨醇	-	蔗糖	+
柠檬酸盐	-	蜜二糖	-
葡萄糖	+	木糖	-
纤维二糖	w	苦杏仁苷	-
果糖	+	阿拉伯糖	-
七叶苷	0	麦芽糖	+
水杨苷	-	棉籽糖	-
酪蛋白	-	海藻糖	+
明胶	-	吡啶	+
H ₂ S 产生	-	丙二酸盐	-
氧化酶	+	接触酶	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性; “w”表示弱; “0”表示没有资料记载; R26^T为 *E. anophelis*。

从表 1 可见, 菌株 WLY01 不产黑色素, 接触

酶、氧化酶和 β-半乳糖苷酶阳性, 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶和淀粉酶阴性; 不产生 H₂S, 能水解七叶苷, 可利用果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、海藻糖等产酸, 但不利用阿拉伯糖、纤维二糖、棉子糖、蔗糖、水杨苷、木糖、丙二酸盐等, 以上这些结果跟 Kim 和 Kämpfer 等^[4-5]描述的伊丽沙白菌属细菌主要特征完全符合, 因此, 认为菌株 WLY01 为伊丽沙白菌属细菌 (*Elizabethkingia* sp.)。

另外, 在所试验的 40 个项目中, 其中 35 个项目菌株 WLY01 与 *E. anophelis* R26^T^[2,5]表现出相同的表型特征, 符合率为 87.5%, 而其中 42℃生长与鼠李糖利用 2 个项目表现不同, 另有硝酸盐还原、V-P 试验、七叶苷利用 3 项 *E. anophelis* R26^T没有资料记载。再根据该菌株能利用纤维二糖, 不能利用蜜二糖、柠檬酸盐, 不产脲酶, 不能在麦康凯琼脂上生长等 5 个区分属内其他菌种的主要特点^[5], 作者初步推测菌株 WLY01 可能为按蚊伊丽沙白菌 (*E. anophelis*)。

2.3 菌株 WLY01 的 16S rDNA 序列及系统发育分析

利用引物 27F 和 1492R 扩增菌株 WLY01 的 16S rDNA 并测序, 将菌株 WLY01 的 16S rDNA 序列与 Genbank 中的参考序列进行比对, Blast 比对结果显示其与伊丽沙白菌属菌株的序列相似性较大, 结合 N-J 法构建的系统发育树(图 3)上可以看出菌株 WLY01 属于伊丽沙白菌(*Elizabethkingia* sp.)。但由于菌株 WLY01 与 *E. anophelis* R26^T(EF426425)和 *E. miricola*(KP844567)的序列相似性均为 99% (Genbank 中的注册号为 KY400644), 因此无法判定菌株 WLY01 为哪个种。

2.4 菌株 WLY01 的溶血活性及致病性

采用绵羊、小鼠、乌鳢、鲫鱼等动物的血制成血琼脂平板检测菌株 WLY01 的溶血活性, 结果显示菌株 WLY01 对绵羊血、小鼠血、乌鳢血、鲫鱼血等都具有较强溶血活性, 呈 β 溶血。

采用菌株 WLY01 对健康乌鳢进行肌肉注射和创伤浸泡感染, 结果见表 2 和表 3。肌肉注射感染初期乌鳢躁动不安、狂游、跳跃; 随着感染时间的延长, 鱼活力明显下降, 运动迟缓, 精神萎靡, 体表注射部位有点红肿发炎溃烂, 感染严重的病鱼体表有分散性出血症状。感染 2 d 开始最高浓度组

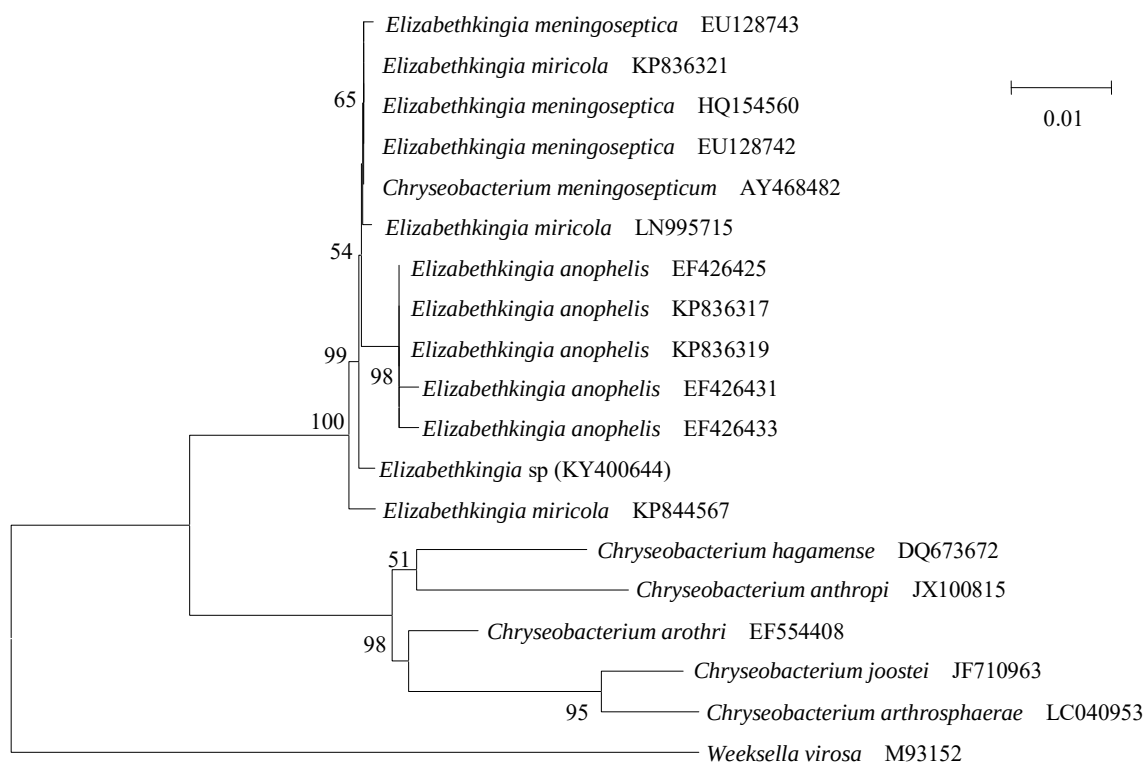


图3 菌株 WLY01 的 16S rDNA 邻位连接法系统发育树(自举数集 1 000)

表2 乌鳢肌肉注射感染试验结果

组别	试验数	菌液浓度/ (cfu·mL ⁻¹)	剂量/mL	不同时间的死亡数/尾								死亡率/%
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
肌肉注射	20	5.37×10 ⁸	0.3	0	3	4	2	3	3	3	2	100
	20	5.37×10 ⁷	0.3	0	0	2	2	3	3	3	2	75
	20	5.37×10 ⁶	0.3	0	0	0	2	1	4	3	2	60
	20	5.37×10 ⁵	0.3	0	0	0	2	1	2	2	0	35
	20	5.37×10 ⁴	0.3	0	0	0	0	1	1	0	1	15
	20	5.37×10 ³	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射对照	20	生理盐水	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 乌鳢创伤浸泡感染试验结果

组别	试验数	菌液浓度/ (cfu·mL ⁻¹)	浸泡时间/ min	不同时间的死亡数/尾										死亡率/%
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
创伤浸泡	20	5.37×10 ⁴	30	0	3	4	2	2	3	0	4	1	1	100
创伤对照	20	淡水	30	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	15
非创伤浸泡	20	5.37×10 ⁴	30	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	15
非创伤对照	20	淡水	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

鱼出现死亡, 感染 8 d 从高到低各感染浓度组的死亡率分别为 100%, 75%, 60%, 35%, 15%, 0%, 菌株 WLY01 对乌鳢的 LD₅₀ 为 1.69×10⁶ cfu·g⁻¹. 创伤浸泡组在感染 10 d 时死亡率为 100%, 发病症状和死

亡时间与创伤程度呈明显相关性, 创伤越严重, 发病和死亡也越快. 无创伤浸泡组感染 8 d 时的死亡率仅为 15%. 肌肉注射组和创伤浸泡组发病症状基本相同, 由于创伤浸泡组体表有多处创伤, 因此,

其体表出血、发炎、红肿等症状比肌肉注射组明显. 解剖濒死鱼发现 2 组鱼都有腹腔内组织松软糜烂、肝色变淡、肾略有肿大、肠组织粘连等症状. 从感染发病鱼体内的血液、肝、肾等组织中可以分离到与菌株 WLY01 表型特征完全一致的菌株, 根据 Koch 法则可以确定菌株 WLY01 为此次乌鳢发病的病原菌.

2.5 菌株 WLY01 的药敏试验结果

菌株 WLY01 对 40 种化学试剂的药敏结果见表 4. 从表中可见, 菌株 WLY01 对于米诺环素和恩诺沙星最为敏感, 其次为利福平、强力霉素、磺胺异噁唑、依诺沙星等, 常用于治疗革兰氏阳性菌的万古霉素(VA)对该菌也显示了很好的抗菌活性. 而菌株 WLY01 对卡那霉素等 16 种药物耐药, 特别是对青霉素等 β -内酰胺类药物具有较强的耐药性.

表 4 菌株 WLY01 的药敏试验结果

药物	药敏/($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/cm
头孢唑啉	30	0.8
头孢唑一肟	30	1.1
头孢菌素	30	0.8
头孢西丁	30	0.8
头孢他啶	100	1.2
阿莫西林	20	0.8
青霉素	10	0.8
复方新诺明 (SMZ、TMP)	23.75、1.25	0
万古霉素	30	1.9
米诺环素	30	3.4
麦迪霉素	30	1.9
红霉素	15	1.8
乙酰螺旋霉素	30	1.4
克林霉素	2	1.5
链霉素	10	1.8
羧苄青霉素	10	0
阿米卡星	30	0
诺氟沙星	10	0
盐酸环丙沙星	5	1.0
呋喃唑酮	300	0
头孢拉啶	30	0.8
头孢氨苄	30	0

续表

药物	药敏/($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/cm
头孢克洛	30	0
罗氏芬	30	0
苯唑西林	1	0
氨苄青霉素	10	0
氯霉素	30	0
四环素	30	1.8
强力霉素	30	2.4
阿奇霉素	15	1.2
罗红霉素	15	1.6
多粘菌素 B	300 IU	0.9
大观霉素	100	1.2
新霉素	30	0
利福平	5	2.5
卡那霉素	30	0
依诺沙星	10	2.0
恩诺沙星	10	3.1
呋喃妥因	300	0
磺胺异噁唑	300	2.2

3 讨论

伊丽莎白菌属是 Kim 等 2005 年提出的一个新属. 他们根据 16S rRNA 基因序列分析和 DNA 分子杂交分析认为脑膜败血金黄杆菌(*Chryseobacterium meningosepticum*)和米尔金黄杆菌(*C. mirium*)在种系上与其他金黄杆菌属菌有较大差异, 且在菌株表型及生理生化特性上也存在差别, 故提议将脑膜败血金黄杆菌和米尔金黄杆菌从金黄杆菌属中独立出来, 成立伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*), 并分别命名为脑膜败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*)和米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*)^[4], 该提议得到了广大学者的认同. 目前伊丽莎白菌(*Elizabethkingia* sp.)归属于黄杆菌纲(Flavobacteria), 黄杆菌目(Flavobacteriales), 黄杆菌科(Flavobacteriaceae), 伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*).

本实验从患病乌鳢中分离的菌株 WLY01 的溶血性试验显示其对乌鳢血、鲫鱼血、绵羊血、小鼠血等都具有 β 溶血作用, 人工回归感染试验证实其对乌鳢具有较强致病性, 其感染速度和程度与养

殖温度呈一定的相关性,感染率和死亡率都随着水温的升高而升高,水温 28℃该菌对乌鳢的 8 d LD₅₀ 为 1.69×10^6 cfu·g⁻¹. 人工感染试验还显示,该菌的主要感染途径是通过鱼体表创伤感染. 经对细菌形态学观察、生理生化试验及 16S rDNA 分析确定菌株 WLY01 为伊丽莎白菌(*Elizabethkingia* sp.). 虽然在 2.2 中菌株 WLY01 的生理生化特征与按蚊伊丽莎白菌(*E. anophelis*)较为符合,但根据 16S rDNA 基因组测序,菌株 WLY01 与按蚊伊丽莎白菌(*E. anophelis*)和米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*)都具有较高的序列同源性,因此,还有待于进一步的实验证实.

据资料显示,能引起水产动物疾病的伊丽莎白菌,至今只发现有脑膜败血伊丽莎白菌(*E. meningoseptica*),该菌在水产养殖动物中最早于 1986 年分离自患有出血性败血症的牛蛙(*Rana catesbeiana*)内脏^[12],后来发现该菌还可感染美国青蛙(*R. grylio*)、虎纹蛙(*R. tigerina rugulosa*)、豹蛙(*R. pipiens*)、南非爪蟾(*Xenopus laevis*)等多种蛙类,而蛙是该菌的主要宿主^[13]. 在国内,1994 年陈耀明等^[14]首先在患病牛蛙中分离到脑膜败血伊丽莎白菌,发现该菌对成蛙致死率可高达 92%. 其后叶雪平等^[15]、张奇亚等^[16]、周永灿等^[17]多位学者也报道了该菌引起牛蛙、美国青蛙、虎纹蛙等严重感染的病例,疾病调查显示该菌是蛙类养殖中最常见的致病菌^[13]. 此外,蔡完其等^[18]、周煜华等^[19]、黄志坚等^[20]在患病的中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)、黄鳝(*Monopterus albus* Zuiew)和鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)中也分离到了脑膜炎伊丽莎白菌. 按蚊伊丽莎白菌(*E. anophelis*)是 2011 年 Kämpfer 等^[5]从冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)的中肠中分离鉴定的一个新的菌种,目前已有研究显示按蚊伊丽莎白菌(*E. anophelis*)可引起人类肺炎、败血症和新生儿脑膜炎^[4-5,21],而米尔伊丽莎白菌(*E. miricola*)最早分离自米尔空间站冷凝水中^[22],也可以引起人类肺炎、胰腺炎等疾病^[23],但这 2 种菌至今还未有引起动物感染的病例报道.

由于伊丽莎白菌具有多个抗生素抗性基因,包括 2 个金属 β-内酰胺酶基因 *bla_{GOB}* 和 *bla_{blaB}*,它们对第 3 代头孢菌素、氨基糖苷和碳青霉烯类等多种抗生素都具有抗性^[24-26],引起的疾病不易治疗,

死亡率较高,因此,目前该属菌已引起医学界的高度关注^[4-5]. 本实验结果也显示,菌株 WLY01 耐药性广,在试验的 40 种药中,仅对米诺环素、恩诺沙星、利福平、强力霉素、磺胺异噁唑、依诺沙星、万古霉素等 7 种药物较敏感,但由于恩诺沙星、依诺沙星、万古霉素已被列入禁用渔药,因此可把米诺环素、利福平、强力霉素、磺胺异噁唑等作为治疗鱼类伊丽莎白菌病的参考药物.

参考文献:

- [1] 林永贺,邹记兴,林显道. 乌鳢营养研究进展[J]. 广东饲料,2009,18(3):42-44.
- [2] Lau S K, Chow W N, Foo C H, et al. *Elizabethkingia anophelis* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality[EB/OL]. [2016-10-18]. <http://www.nature.com/articles/srep26045>.
- [3] 房海,陈翠真,张晓君. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2010:499-517.
- [4] Kim K K, Kim M K, Lim J H, et al. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3):1287-1293.
- [5] Kämpfer P, Matthews H, Glaeser S P, et al. *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 2670-2675.
- [6] 赵乃昕,苑广盈. 医学细菌名称及分类鉴定[M]. 3 版. 济南:山东大学出版社,2013:115-120.
- [7] 王鑫毅,韩艳楠,金珊,等. 乌鳢产产嗜金杆菌的鉴定及其胞外产物特性分析[J]. 水生生物学报,2016, 40(3):641-646.
- [8] 韩艳楠,余银春,王鑫毅,等. 牛蛙致病变形菌的鉴定及其敏感药物筛选[J]. 微生物学通报,2016, 43(6): 1280-1287.
- [9] 余银春,韩艳楠,王鑫毅,等. 湘云鲫体表出血溃烂病原的鉴定及防治药物筛选[J]. 农业灾害研究,2015, 5(3):28-30.
- [10] 熊浩明,魏柏青,魏荣杰,等. 用 SPSS 软件计算鼠疫菌半数致死量(LD₅₀)[J]. 中国人兽共患病学报,2013, 29(11):1127-1130.
- [11] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement[S]. CLSI M100-S23, 2013.

- [12] Bernardet J F, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, et al. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(7):640-660.
- [13] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 蛙脑膜炎败血金黄色杆菌病[J]. 中国水产, 2012(5):51-52.
- [14] 陈耀明, 胡永强, 周以凤, 等. 牛蛙脑膜炎脓毒性黄杆菌病[J]. 水产科技情报, 1994, 21(1):11-12.
- [15] 叶雪平, 杨广智, 罗毅志. 牛蛙脑膜炎(歪脖子病)病原分离及防治技术研究[J]. 浙江水产学院学报, 1996, 15(4):301-304.
- [16] 张奇亚, 李正秋, 吴玉琛. 美国青蛙“旋游症”的病原菌分离鉴定及组织病理学观察[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(2):152-155.
- [17] 周永灿, 朱传华, 陈国华, 等. 虎纹蛙白内障病原的分离鉴定及其免疫防治[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(1):16-21.
- [18] 蔡完其, 孙佩芳, 朱泽闻, 等. 中华鳖脑膜炎败血性黄杆菌病的研究[J]. 水产科技情报, 1997, 24(4):156-161.
- [19] 周煜华, 何成伟. 黄鳝鱼脑膜炎脓毒性黄杆菌的分离与鉴定[J]. 广西畜牧兽医, 1998, 14(3):5-7.
- [20] 黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4):241-246.
- [21] Frank T, Gody J C, Nguyen L B L, et al. First case of *Elizabethkingia anophelis* meningitis in the Central African Republic[J]. The Lancet, 2013, 381(9880):1876.
- [22] Li Y, Kawamura Y N, Naka T, et al. *Chryseobacterium miricola* sp. nov. a novel species isolated from condensation water of space station Mir[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2003, 26(4):523-528.
- [23] Rossati A, Kroumova V, Bargiacchi O, et al. *Elizabethkingia miricola* bacteremia in a young woman with acute alcoholic pancreatitis[J]. Presse Medicale, 2015, 44(10): 1071-1072.
- [24] Breurec S, Criscuolo A, Diancourt L, et al. Genomic epidemiology and global diversity of the emerging bacterial pathogen *Elizabethkingia anophelis*[EB/OL]. [2016-11-05]. <http://www.nature.com/articles/srep30379>.
- [25] Sáez-Llorens X, McCracken G H. Bacterial meningitis in children[J]. The Lancet, 2003, 361(9375):2139-2148.
- [26] Gonzalez L J, Vila A J. Carbapenem resistance in *Elizabethkingia meningoseptica* is mediated by metallo- β -lactamase BlaB[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(4):1686-1692.

Isolation and pathogenicity study of *Elizabethkingia* sp. from *Channa argus*

LIU Xiao-lin, MEI Han, BU Ling-fei, JIN Shan*, ZHAO Qing-song, CHEN Yin-er
(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to identify the pathogens of the *Channa argus* batch death from a farm in Ningbo, the dominant bacteria (WLY01) was isolated from the diseased fish. It was identified as *Elizabethkingia* sp., based on morphological, biochemical and physiological characteristics and sequencing of 16S rDNA. The strain has strong hemolytic activity with β hemolysis against sheep blood, mouse blood, snakehead blood and crucian carp blood. Artificial infection experiment demonstrated that the isolates were mainly infected by the wound surface of the fish. The symptoms and death rate were significantly correlated with the degree of trauma. The LD_{50} of the strain was 1.69×10^6 cfu $\cdot$ g $^{-1}$, which was highly pathogenic to the *Channa argus*. The result of drug sensitivity test showed that the isolates were sensitive to the Minocycline, Enrofloxacin, Rifampin, Doxycycline, Sulfafurazole, and Enoxacin. It is suggested that Minocycline, Rifampin, Doxycycline and Sulfafurazole can be used as candidate drugs for treatment of fish *Elizabethkingia*.

Key words: *Elizabethkingia* sp.; *Channa argus*; 16S rDNA; pathogenicity; drug sensitivity test

(责任编辑 韩超)