



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3498—2013

---

## 温泉鱼类志贺邻单胞菌病检疫技术规范

Quarantine protocol for *Plesiomonas shigelloides* from *Garra rufa*

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国四川出入境检验检疫局、四川农业大学、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：余华、杨光友、王昱、严玉宝、李应国、岳川、刘洋洋、陈世界、周岷江、胡娟、崔鹏博。

# 温泉鱼类志贺邻单胞菌病检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了温泉鱼类志贺邻单胞菌病的检疫技术规范。

本标准适用于温泉鱼类志贺邻单胞菌病的临床诊断和分离鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 临床诊断

### 3.1 临床症状

鱼群出现厌食或不吃食;病鱼静止不动或阵发性乱游、乱窜,或在池边摩擦,最后衰竭而死;鱼体出现体色异常,呈现黑色;死鱼有较明显的出血症状。

### 3.2 病理变化

病鱼鳍条基部及鱼体两侧轻度充血,体表侧线两侧出现白斑或溃疡斑,随着病情的加重,斑的颜色逐渐变深,严重病情时斑的颜色呈现黑色;鳃盖周围有出血点或出血斑;鳃、肝、肾的颜色均较淡,呈现灰白色;肝脏出现出血点,胆囊肿大;腹腔内积有腹水,腹水呈淡黄色透明或红色浑浊;肠道出血或肠壁变透明,可见肠内容物。

疫病的详细描述参见附录 A。

## 4 分离鉴定

### 4.1 设备和器械

- 4.1.1 生物安全柜。
- 4.1.2 普通光学显微镜。
- 4.1.3 高压灭菌锅。
- 4.1.4 恒温培养箱( $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。
- 4.1.5 解剖器械。
- 4.1.6 全自动生化鉴定系统。

### 4.2 培养基和试剂

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

- 4.2.1 普通营养琼脂平板,制备见附录 B 的 B.1。

- 4.2.2 革兰氏染色液,配制见 B.2~B.4。
- 4.2.3 SIM 培养基,配制见 B.5。
- 4.2.4 Kovacs 试剂,配制见 B.6。
- 4.2.5 市售触酶试剂。
- 4.2.6 市售氧化酶试剂。
- 4.2.7 糖发酵试验管,配制见 B.7。
- 4.2.8 O/129 诊断纸片,制作见 B.8。
- 4.2.9 市售生化鉴定管(具体名称见附录 C)。

### 4.3 类志贺邻单胞菌的分离和鉴定

#### 4.3.1 样品采集

挑选 5~10 尾濒死的或带有上述症状的温泉鱼,使用无菌水冲洗体表后,用 75% 的酒精棉球擦拭体表,无菌操作解剖发病温泉鱼,采用接种环从病鱼出血点或出血斑处、肝脏、脾脏和肾脏蘸取渗出物。

#### 4.3.2 分离和纯化

接种环划线接种到普通营养琼脂平板培养基,37℃ 恒温培养 24 h。挑取数个可疑单菌落,划线培养于普通营养琼脂平板上,37℃ 恒温纯化培养 24 h。类志贺邻单胞菌于普通营养琼脂平板的纯菌落生长良好,形成边缘整齐、表面湿润、中央隆起、光滑、半透明、灰白色至淡黄色的圆形菌落。

#### 4.3.3 鉴定

##### 4.3.3.1 染色镜检

挑取疑似菌落涂片到干净的玻璃载玻片,在酒精灯火焰上方固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗;滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗;滴加 95% 乙醇脱色,约 30 s(或将乙醇滴满整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴满整个涂片,脱色 10 s 水洗;滴加沙黄复染液,复染 1 min;水洗,风干,镜检。志贺邻单胞菌为革兰氏阴性直杆菌,两端圆润,染色呈红色。

##### 4.3.3.2 初步生化试验

###### 4.3.3.2.1 氧化酶试验

挑取少许单菌落涂抹于无菌的白色的滤纸片上,滴加 1% 盐酸四甲基对苯二胺(或商品化)氧化酶试剂于菌落之上,15 s~30 s 呈深紫色到暗绿色为阳性,否则为阴性。

###### 4.3.3.2.2 触酶试验

挑取少许单菌落涂抹于干净的载玻片上,滴加 2~3 滴 3% 过氧乙酸(或商品化)触酶试剂,10 s~20 s 出现大量气泡者为阳性,否则为阴性。

###### 4.3.3.2.3 运动性和吲哚试验

取氧化酶、触酶阳性菌落穿刺接种 SIM 培养基,37℃ 培养 24 h,观察。细菌沿穿刺线向两侧扩增者为具运动性,否则为不具运动性;往管中加入数滴三氯甲烷(此时不要与火接触),2 min 后再向管中加数滴 Kovacs 试剂,出现红色者为吲哚阳性,否则为阴性。

###### 4.3.3.2.4 糖发酵试验

挑取吲哚阳性,有运动活性的可疑菌落少许。分别接种葡萄糖、麦芽糖发酵管(见 B.7)。37℃ 培

养 24 h。凡试验管颜色从紫色变为黄色,表明细菌可发酵该种糖类,则判为阳性。

#### 4.3.3.2.5 O/129 敏感性试验

挑取发酵葡萄糖、麦芽糖的可疑菌落接种营养肉汤,37℃培养 24 h。用无菌玻棒将待检菌悬液均匀涂布于营养琼脂平板上,将 O/129 诊断纸片贴于平板上,置 37℃孵育 18 h~24 h,观察结果。出现抑菌圈者表示敏感,无抑菌圈者为耐药。

#### 4.3.3.3 确认试验

将上述试验结果均为阳性的菌株,接种到营养琼脂平板(或斜面)。37℃培养 24 h 后,取适量利用全自动生化鉴定仪(或同类设备)进行鉴定。操作方法参照仪器说明书。若无全自动生化鉴定仪,则对照附录 C 依次进行生化试验。

#### 4.3.3.4 结果判定

结果判定如下:

- a) 若确认试验采用全自动生化鉴定仪(或同类设备),结果以生化鉴定仪的检测报告为准;
- b) 若确认试验采用生化鉴定管进行附录 C 中的生化鉴定项目,至少符合星号(\*)标示的全部生化特征,则为类志贺邻单胞菌阳性,否则为类志贺邻单胞菌阴性;
- c) 若非星号(\*)标示的生化项目只是部分符合,则判定为可疑,进行重复试验仍为可疑,则进行基因测序或用全自动生化鉴定仪检测加以确认。

### 5 综合判定

如果出现典型临床症状和病理变化,且分离出类志贺邻单胞菌,则诊断为“温泉鱼类志贺邻单胞菌病”。若临床症状、病理变化不显著,但分离出类志贺邻单胞菌,则报告为“检出类志贺邻单胞菌”。否则为阴性。



附 录 A  
(资料性附录)  
疫病概述

温泉鱼学名淡红墨头鱼(*Garra rufa*),又名“小鱼医生”,为鲤科(Cyprinidae)、墨头鱼属(*Garra*)的鱼类。其身长2 cm~10 cm,适应水温为18℃~40℃,而30℃~35℃的热水比较理想。其最大的特点是喜欢以浮游生物或动物身体上的附着生物为食。该鱼种是从土耳其引进的热带鱼种,把该鱼放在温泉浴池里,让其啄食人的死皮和一些皮肤上的细菌,可以治疗皮肤病,因此被誉为治疗诸如牛皮癣等皮肤病的法宝。

温泉鱼类志贺邻单胞菌病,是由类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)引起的一种温泉鱼细菌性败血症。类志贺邻单胞菌为肠杆菌科邻单胞菌属唯一记录亚种,为革兰阴性直杆菌,短圆状,长3.0 μm,宽0.8 μm~1.0 μm,兼性厌氧,无芽孢,通常具运动性。菌落呈灰白色、不溶血,中等大小。可成双或短链状排列,有2根~5根极端鞭毛,运动活跃。氧化酶和触酶阳性,硝酸盐还原阳性,发酵葡萄糖和其他一些糖类产酸不产气。生长温度范围广,可在8℃~45℃生长,在0%~5%的NaCl中可生长,pH范围为4.0~8.0,绝大多数菌株对O/129敏感。

类志贺邻单胞菌是感染性腹泻及食物中毒的病原体。主要存在于自然界的水体和土壤中,也见于鱼和其他水生动物以及各种哺乳动物和人类的肠道,可以引发人类的腹泻、食物中毒和哺乳动物等疾病。其感染主要与食入生的海产品有关,流行季节以夏季为主,症状表现为短期的水样腹泻或病程较长的痢疾样腹泻,感染人群无年龄差别。也多见于机体抵抗力下降的人群,主要引起败血症和脑膜炎,感染几率低,但死亡率很高。

温泉鱼类志贺邻单胞菌病的典型临床症状是,温泉鱼鱼群出现厌食或不吃食;病鱼静止不动或阵发性乱游、乱窜,或在池边摩擦,最后衰竭而死;鱼体出现体色异常,呈现黑色;死鱼有较明显的出血症状等。

温泉鱼类志贺邻单胞菌病的典型病理变化是,温泉鱼病鱼鳍条基部及鱼体两侧轻度充血,体表侧线两侧出现白斑或溃疡斑,随着病情的加重,斑的颜色逐渐变深,严重病情时斑的颜色呈现黑色;鳃盖周围有出血点或出血斑;鳃、肝、肾的颜色均较淡,呈现灰白色;肝脏出现出血点,胆囊肿大;腹腔内积有腹水,腹水呈淡黄色透明或红色浑浊;肠道出血或肠壁变透明,可见肠内容物等。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
**培养基和试剂的制备**

**B.1 营养琼脂平板**

分别称取蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 7.4~pH 7.6,121 °C 灭菌 15 min 备用。

**B.2 草酸铁结晶紫染液****B.2.1 甲液**

结晶紫  
溶于 95%乙醇 20 mL。

2.0 g

**B.2.2 乙液**

草酸氨  
溶于蒸馏水 80 mL。  
使用前将甲液和乙液混合。

0.8 g

**B.3 革兰氏碘液**

碘(I<sub>2</sub>)            1.0 g  
碘化钾            2.0 g  
蒸馏水 100 mL。

**B.4 复红酒精染液**

碱性复红            0.4 g  
95%乙醇            100 mL

**B.5 SIM 培养基**

胰胨 20 g,多价胨 6 g,硫酸铁铵 0.2 g,硫代硫酸钠 0.2 g,琼脂 3.5 g,pH 值 7.2±0.2。制法:称取本品 30.0 g,加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,分装试管,121 °C 高压灭菌 15 min 备用。

**B.6 Kovacs 试剂**

对二甲基氨基苯甲醛            5.0 g

SN/T 3498—2013

戊醇	75 g
浓盐酸	25 mL

#### B.7 糖发酵试验管

先配蛋白胨水(蛋白胨 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 至 7.4,分装,每瓶 100 mL)。每 100 mL 蛋白胨水中分别加入葡萄糖 1.0 g、麦芽糖 1.0 g,充分溶解,分装试管,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

#### B.8 O/129 试纸片

取 2,4-二氨基-6,7-二异丙醇喋啶 150 mg,溶于 10 mL 乙醇-二乙基醚(体积比为 1 : 1)中。把 6 mm 大小的滤纸片浸入该溶液后取出,在空气中晾干,备用。



附 录 C  
(规范性附录)

温泉鱼类志贺邻单胞菌主要生理生化反应特征

表 C.1 温泉鱼类志贺邻单胞菌主要生理生化反应特征

项 目	反应类型	项 目	反应类型
葡萄糖*	+	色氨酸脱氨酶	—
麦芽糖*	+	2-丁醇-3-酮(甲基乙酰甲醇)	—
触酶*	+	明胶	—
氧化酶*	+	甘露醇*	—
吲哚*	+	肌醇	+
O/129*	+	山梨糖醇	—
β-半乳糖苷酶*	+	鼠李糖	—
精氨酸双水解酶*	+	蔗糖*	—
赖氨酸脱羧酶*	+	蜜二糖	—
鸟氨酸脱羧酶*	+	苦杏仁甙	—
西蒙斯柠檬酸	—	L(+)阿拉伯糖*	—
H <sub>2</sub> S 硫化氢	—	β-溶血素(牛红细胞)	+
尿素酶*	—		
注：+为阳性；—为阴性。			
* 标记的生理生化反应项目应同时符合。			