

爱德华氏菌人工经口感染及病理观察*

韩先朴 李 伟 潘金培

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

用从病鱼体内分离到的福建爱德华氏菌 (*Edwardsiella fujianensis*) 人工经口感染鳊鲌获得成功, 证明该菌由消化道传染。人工感染后一系列组织病理观察表明: 该菌对肝脏的损害是致肝细胞融解形成灶性坏死, 对肾脏引起造血组织增生。当继发感染气单胞菌 (*Aeromonas*) 后, 灶性坏死区形成脓肿。继发感染是爱德华氏病致死的原因, 同时也是鳊鲌爱德华氏病症状表现为肝脏型或肾脏型两种类型的原因。

关键词 爱德华氏菌, 人工经口感染, 鳊鲌, 组织病理

爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*) 的细菌是鱼类的致病菌, 先后报道了4个种都能引起某些鱼类的病害^[1-4], 其中有的还是某些鱼类的主要致病菌。因此, 不少学者对该属的细菌及其引起的病害进行过很多研究, 但均未能人工经口感染成功, 对侵袭途径不甚了解。宫崎照雄氏等曾观察过鳊鲌爱德华氏病自然发病的病理变化, 但是, 该菌引起鳊鲌病害通常继发气单胞菌感染症, 这些过程不能阐明与气单胞菌感染症引起的病理变化的区别。作者用福建爱德华氏菌人工经口感染鳊鲌获得成功, 说明该病原体通过饲料经消化道感染鱼体, 且于感染后进行病理解剖和组织病理观察, 了解到该菌引起鳊鲌病害的发生及发展规律, 对探讨与气单胞菌感染症的关系多有裨益。

1 材料与方 法

1.1 人工经口感染 鳊鲌由福建省贵安养鳊场运回本所, 经三个月暂养, 观察, 无传染病发病史, 外观无肉眼可见异常, 体长20—24cm, 体重6—11g。试验鱼分别饲养在水箱中分为试验组和对照组, 饲养用水量能充足保证试验鳊鲌溶氧的需要, 每天更换部分饲养用水。经一段时间适应环境, 驯饵后开始试验。饲料来自日本国日清养鳊用黑仔粉。

1.2 感染方法 福建爱德华氏菌 E86—205 冷冻保存菌株接活后经鳊鲌体内复壮两次, 分离、转接普通斜面 27℃, 24h 培养, 用无菌水洗下菌苔, 配成每毫升约含 9×10^8 个活菌悬液, 加入适量饲料调和投喂, 每天一次, 连续三天, 从第四天以后不加菌, 用自来水调和饲料投喂, 第一次投喂含菌饲料时, 认定未摄食者淘汰。对照组投喂的饲料自始至终不加福建爱德华氏菌, 用自来水调和投喂, 其他处理与条件同试验组一致。

* 1. 国家自然科学基金资助项目。

2. 实验得到湖北医学院林宜先教授指导, 特此致谢。

1992年3月12日收到; 1995年3月20日修回。

1.3 病理解剖及组织病理观察 从第一次投喂含菌饲料算起, 分别于 6h、24h、48h、4d、7d、11d 从试验组取试验鳗鲡样品。先作细菌学检查再作病理解剖, 并取肝、肾、肠、胃四器官的组织作病理观察。无菌操作从人工感染后的鳗鲡各器官取样, 作细菌培养。选取菌落, 检查氧化酶特性。氧化酶试验为阴性, 菌落形态与 E86—205 相似者, 疑为人工感染菌株, 转接斜面, 保存备用, 然后与 E86—205 菌株平行鉴定, 生理生化特性完全一致, 认定为人工感染后检出的病原菌。

组织病理观察。所取的肝、肾、肠、胃四器官的组织材料, 一分为二, 一半用 Bouin 液固定, 石蜡包埋, 切片 6—8 μ m, Ehrlich 氏苏木精, 曙红 (H.E) 染色、银染色。另一半用 Helly 氏液固定, 石蜡包埋, 切片 6—8 μ m, Giemsa 染色。所有切片均取整个组织的横断面。同时取对照组鳗鲡相应组织与试验平行处理, 对比观察。

2 结果

2.1 人工经口感染 先后感染三次。三次感染均复制出与自然发病相似的症状, 并从感染的鳗鲡体内又重新分离到病原菌。

感染的鳗鲡大部分死亡, 从感染至发病死亡整个病程时间长短除与鳗鲡体重、个体大小, 继发感染等因素有关外, 还与感染时的水温有密切的关系, 10g 左右个体的鳗鲡病程约: 20—23℃ 为 16—17 左右, 27—29℃ 约 8—11d 左右。

2.2 细菌学检查 感染 6h 后, 胃和肠中存在有大量病原菌, 表明该菌同饲料到达胃和肠中后仍存活。24h 后检查, 肾脏中检出病原菌, 但肝脏中未检出, 48h 后肝、肾脏中均检出病原菌。

表 1 人工经口感染结果
Tab. 1 Infection test with *E. fujianensis* on eel

| 编组 Group | 水温 Water temp | 试验数 No. of test fish | 死亡数 No. of death |
|---------------------|------------------|-------------------------|---------------------|
| 试验组 Experimental | 20—30℃ | 4 | 4 |
| 对照组 Control | | 4 | 0 |
| 试验组 Experimental | 27—29℃ | 3 | 2 |
| 对照组 Control | | 3 | 0 |
| 试验组 Experimental | 27—29℃ | 6 | 3 |
| 对照组 Control | | 6 | 0 |

对照组各有一尾死亡, 检查认定死于烂尾病, 故未作发病死亡数统计。
这些检出的病原菌特性与 E86—205 菌株特性一致^[1], 即: 革兰氏阴性杆菌、菌体直、单个。周鞭毛、运动、无荚膜、无芽孢。
在普通培养基上 28℃ 培养 48h 菌落直径为 0.5mm 左右。正圆形灰白色透明隆起, 周缘光滑。接触酶、赖氨酸脱羧酶阳性, 产生硫化氢、产生吲哚、产氨、还原硝酸盐、甲基红

试验阳性。氧化酶、尿素酶、脂肪酶、精氨酸脱氢酶、鸟氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氢酶、VP 试验阴性。不液化明胶、不水解淀粉。不利用氰化钾、柠檬酸盐、 α -酒石酸钠、丙二酸钠。兼性厌氧。发酵葡萄糖产酸产气,迅速发酵纤维糖。利用果糖、海藻糖、蔗糖、甘油、甘露糖,不利用木糖、棉子糖、七叶灵、水杨甙、卫矛醇、鼠李糖、麦芽糖、甘露醇、淀粉、糖原、阿拉伯糖、肌醇、山梨醇、乳糖、菊糖,微弱利用半乳糖。其他特性详见参考文献^[4]。

2.3 病理解剖 感染 6h 后无肉眼可见症状。48h 后肝脏水肿、淡红色,表面有一层粘液样物质。感染 7d 后肝脏土黄色,有红色出血点,透过浆膜见到肝脏形成的脓肿,11d 后(刚死亡鳗鲡)肝脏瘀血,有多个脓肿,浆膜破溃,其中有大量乳白色脓液。肾脏肿胀,软化,肠和胃中无食物,严重贫血(剖检时无血液流出)。病鳗鲡的胸鳍和腹部稍充血。近肛门一段肠管发红。

2.4 组织病理观察 病原菌进入消化道胃、肠后并不引起消化道的病理改变,而是经由血液循环到达肝脏、肾脏等器官,引起肝脏和肾脏的病理变化,肝脏的病理变化是形成多个灶性坏死病灶,然后继发感染形成脓肿。肾脏病理变化主要是造血组织增生。

2.4.1 肝脏 鳗鲡肝脏没有肝小叶的结构,细胞呈索状排列,细胞索间有窦状隙(肝窦)。对照组鳗鲡肝脏始终正常,未见任何病理变化。肝板清晰,肝细胞多角形,排列致密,肝窦中枯否氏细胞少见(图版 I:1) 银染色可见支持肝细胞的网状胶原纤维均一。同对照组相比,人工感染 6h 后的肝脏肝细胞轻度混浊肿胀,有数个点状坏死病灶,病灶都靠近血管。肝窦中枯否氏细胞(网状内皮细胞)增多、活跃(图版 I:3) 细胞肿胀。人工感染 24h 后,点状坏死区域扩大成局限性灶性坏死,病灶大小不等(图版 I:4—5),病灶中有肝细胞的崩解物和残骸。肝窦扩张,肝窦中充满红血球,轻度瘀血。血管扩张,血管周围可观察到白细胞浸润。

人工感染 4d 后的肝脏未观察到病灶有进一步发展。感染 6h—4d 这段时间病理变化发展缓慢。人工感染 7—11d 的肝脏已见不到灶性坏死,只能看到形成多个大小不等的脓肿(图版 I:6)。脓肿中心支持肝细胞的网状纤维断裂,充满脓液和固缩、退变以及崩解的中性白血球(白细胞)。在脓肿的边缘形成明显的充血带,充血带的窦状隙极度扩张,充满血细胞,肝细胞梁彼此分离,有些细胞核质固缩,充血带近脓肿中心一侧的肝细胞不同程度的崩解(图版 I:7—9)。

整个肝脏窦状隙极度扩张,肝细胞索变窄,血管扩张,血管中白细胞显著增加。

2.4.2 肾脏 鳗鲡肾脏实质部为肾小球及肾小管结构,其间质为造血组织和拟淋巴组织,与对照组比较,人工感染初期,未见肾脏有显著的变化。感染 11d 后的病鳗鲡,肾脏明显肿大,造血组织增宽,在肾脏中所占的比例明显增加(图版 I:2)。H. E 染色可见到肾小管中有红染丝状的蛋白物。

2.4.3 肠、胃 同对照组对比,感染 6h 后肠血管内壁的内皮细胞增加,除此以外未见异常变化,肠、胃粘膜层清晰,上皮细胞和粘液细胞排列整齐,无溃损。

3 讨论

3.1 用福建爱德华氏菌人工经口感染的鳗鲡病理变化首先表现在肝脏出现灶性坏死病灶,感染 4d 后,病灶变化不大,基本停留在灶性坏死阶段,这一病理现象表明:该菌对肝细胞的损害是由毒素引起的。

多次反复从养殖鳊鲂群中分离爱德华氏菌时发现,当肝脏一旦形成脓肿,从体内一定能同时分离到爱德华氏菌和气单胞菌,只有在肝脏没有形成脓肿时才有可能只能分离到爱德华氏菌单一的病原菌;本次实验中未死亡的一尾试验鱼肝脏的组织切片中仍观察到有灶性坏死灶,根据这些事实作者认为:爱德华氏菌感染鳊鲂后只引起肝脏灶性坏死,而脓肿是继发感染的结果。死亡的原因也是由于继发感染。因为气单胞菌广泛存在于水体、污泥中,又是鱼类的致病菌或条件致病菌,故通常继发感染者为气单胞菌。鳊鲂爱德华氏病可能是以爱德华氏菌为先导,灶性坏死成为气单胞菌条件致病菌的致病条件之一。

3.2 鳊鲂爱德华氏病分为肝脏型与肾脏型^[1],是根据病鱼的外观症状区别的,在测定两型致病菌的生理生化特性时并没有发现两者有任何的差别^[2]。在同一养殖池流行爱德华氏病的病鱼,有的为肝脏型,有的是肾脏型,有的病鱼同时有肝脏型、肾脏型的症状,作者认为这也是继发感染的原因。爱德华氏菌进入鳊鲂血流后,产生的毒素不断侵害肝脏和肾脏。在长时间未继发感染时肝脏并不形成脓肿,则肾脏受毒素毒害造血组织增生,肾脏肿大,表现为肾脏型。如继发感染发生得较早,肝脏形成脓肿表现为肝脏型。如继发感染发生较迟,肝、肾脏同时表现出症状。这一病理过程仍在进一步研究中。

3.3 宫崎照雄氏等曾报道过自然发病病理过程^[3]。与此相比两者有些差异。宫崎氏认为脓肿是吞噬爱德华氏菌的细胞引起栓塞而形成的,没有提到灶性坏死。作者认为:爱德华氏病早期只是肝脏形成灶性坏死,外现无明显肉眼可见症状,摄食正常,这种病鱼是难以在养殖池收集到的。而自然发病者又极易继发感染,因而未能观察到前期症状,所观察脓肿形成过程的一系列病理现象可能是继发感染后发生的。其中一些病理现象作者在人工经口感染的病鱼中也观察到。

3.4 人工经口感染成功肯定了消化道是传染途径,这与保科,宫崎氏等曾经推测的是一致的,注意清除食台及饲料中的病原菌对预防该病的流行是重要环节,当然预防气单胞菌的继发感染对防治爱德华氏病亦有积极作用。

参 考 文 献

- [1] 韩先朴等。鳊鲂爱德华氏病的研究。水生生物学报,1989,13(3)。
- [2] 宫崎照雄等。ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究。鱼病研究,1976, 11(1): 33—44, (2) 67—76, (3) 127—132。
- [3] 江草周三等。鱼の病理組織学。日本: 东京大学出版会。1979。
- [4] Sakazaki R, Tamura k. 1975. Priority of the specific epithet *anquillimortiferum* over the specific epithet *tarda* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*. *Int. Jour. Syst. Bacteriol.* 25(2): 219—220.
- [5] Hawke John P, McWhorter. Alma C, Stegerwalt, Arnold G, Brenner Don J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov. the causative agent of enteric septicemia of Catfish. *Int. Jour. Syst. Bacteriol.*, 1981. 31(4): 396—400.
- [6] Md Arshad Ulah Toshihiko Arai, Exotoxins produced by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathology* 1983, 18(2).
- [7] Waltman W D Shotts E B Hsu T. C. Biochemical and enzymatic characterization of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Fish Pathology* 1986, 21(1).

ORAL INFECTION TO *ANGUILLA JAPONICA* WITH *EDWARDSIELLA* AND OBSERVATION ON HISTOPATHOLOGY

Han Xianpu, Li Wei and Pan Jinpei

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract

The success of artificial oral infection to *Anguilla japonica* Temminck et Schlegel by *Edwardsiella fujianensis* Han et al confirmed that the infection was induced through digestive tract by the bacteria. Several histopathological observations indicated that the germs dissolved the liver cells into focal necrosis and caused hyperplasia of hematopoietic tissue of kidney. The focal necrosis changed into abscess when secondary infection happened with *Aeromonas*, which is the reason for eel death and different symptoms of Edwardsielliasis for liver type of kidney type.

Key words *Edwardsiella*, Artificial oral infection, *Anguilla japonica*, Histopathology