

欧洲鳗鲡红头病病原的研究

周 凯 郑国兴 孙其焕¹⁾

(东海水产研究所, 上海, 200090) ¹⁾(上海水产大学, 上海, 200090)

摘要 我国南方各省欧洲鳗鲡养殖过程中,在黑仔及幼鳗期易发生一种以头部充血发红为主要特征的严重疾病,被称为“红头病”。本文描述了欧鳗红头病的症状,从病鳗血液中分离到3株菌,肌注和口服人工感染试验出现与自然发病相似的症状,死亡率分别为83%和67%,从病鳗身上重新分离到性状相同的菌株。4株分离菌的特性完全一致。均为革兰氏阴性杆菌,以周鞭毛运动,兼性厌氧,发酵葡萄糖产酸,氧化酶阴性,过氧化氢酶阳性,还原硝酸盐,VP和柠檬酸盐阴性,赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶阳性,发酵麦芽糖和甘露糖等,该菌除葡萄糖产酸不产气外,其余生理生化特性完全与《伯捷细菌鉴定手册》第九版中迟钝爱德华氏菌吻合,因此鉴定为迟钝爱德华氏菌。

关键词 欧洲鳗鲡,红头病,迟钝爱德华氏菌,败血症

欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla* Linnaeus)的养殖近年来在我国南方各省发展迅速,以缓解日本鳗苗不足、苗价昂贵的矛盾。欧洲鳗苗的价格远低于日本鳗鲡,其经济效益十分显著。但欧洲鳗在养殖过程中的病害问题十分突出,其中“红头病”是危害严重的疾病之一^[1-3]。病鳗主要症状为活动力下降,食欲衰退,常浮游于水面,头顶、嘴唇周围、下颌部严重充血,使头部呈鲜红色,故称“红头病”。胸鳍、臀鳍和腹鳍亦充血发红。内部解剖可见肝脏肿大,肠壁充血,肠道无食物。此病多发生于4—6月份,主要危害黑仔及幼鳗,一旦发病,死亡率甚高,给养殖业带来很大损失。

目前,有关“红头病”的病因有多种推测,有的认为是病毒性的,还有的认为是寄生虫感染引起的。1996年4—6月期间,作者对福建省霞浦地区欧洲鳗的“红头病”进行了调查,并从病鳗血液中分离到一种细菌,经人工感染试验和细菌的分类鉴定,证实欧鳗“红头病”的病原是迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda* Ewing et Mcwhorter)。有关爱德华氏菌引起日本鳗鲡(*Anguilla japonica* Temminck et Schlegel)疾病的报告国内外已经有不少报道^[4-10],而有关爱德华氏菌引起欧洲鳗鲡患红头病的研究报告在国内尚未见有报道。现将作者有关欧洲鳗鲡“红头病”病原的研究结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

病欧鳗取自福建省霞浦县某养殖场。将症状典型之病鳗,用清水冲洗干净,再用80%

酒精棉球,将尾部反复擦洗消毒,然后用灭菌剪刀剪断尾巴,将血液滴加在营养琼脂或 SS 琼脂平板上作划线分离,在 30℃ 培养 48h 后,取形态一致的单个菌落,进一步划线纯化。获得纯培养后移入斜面保存备用。

1.2 人工感染试验

肌注感染是将斜面培养 48h 的试验菌用无菌生理盐水洗下,并稀释成浓度为 1.6×10^9 个/mL 的悬浊液。给体重为 20—25g 的健康幼鳗作尾部肌肉注射,每尾注射量为 0.04mL,对照组在相同部位注入等量的灭菌生理盐水。分别饲养在 26—28℃ 的水族箱中,连续冲气,不喂食,不换水,连续观察一周。口服感染是将上述悬浊液拌入饵料中,用导管灌入胃中,每尾灌入拌有细菌悬液的饵料 0.5mL。该试验欧鳗的体重和饲养条件同肌注感染组。

1.3 病原菌的鉴定

病原菌菌落形态分别在营养琼脂、SS 琼脂和麦康凯琼脂平板上 30℃ 培养 24h 后观察。细菌形态的观察是取固体斜面的新鲜培养物,经革兰氏染色后,用光学显微镜观察和测量。细菌的鞭毛观察用硝酸银染色法。其它各项生理生化试验按《一般细菌常用鉴定方法》一书进行^[11],接种后在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温箱中培养。根据细菌的形态特征、培养特点及生理生化反应,按《伯捷细菌鉴定手册》第九版^[12]鉴定至种。

1.4 药物敏感试验

采用纸片法。药物纸片购自中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心和上海市卫生局服务公司生化试剂所。

2 结果

2.1 人工感染试验

肌注和口服人工感染试验的结果列于表 1。人工感染后的鳗鲡,胸、臀和腹鳍发红,下颌充血,头部有出血点,肝脏明显充血肿大,与自然发病症状相似,从感染的病鳗中再次分离到病原菌。肌注和口服试验组的鳗鲡大多在 4d 内死亡,死亡率分别为 83% 和 67%。对

表1 9605A菌株对欧洲鳗鲡的致病性*

Tab.1 Challenge experiments by intramuscular and oral inoculation with strain 9605A isolated from diseased European eel.*

组 别 Group	试验数 No. of tested	试验后死亡数(尾) No. of dead fish after inoculation						死亡总数 Total of death	存活尾数 No. of survival
		1	2	3	4	5	6**		
肌注组 injection	18		8	6	1			15	3
口服组 feeding	12	4	2	1	1			8	4
对 照 control	6							0	6

注: * 欧鳗体重约 20—25g,水温 26—28℃; ** 试验后天数。
Notes: * Body weight of eels: 20—25g. water temperature: 26—28℃;
** Days after inoculation.

照组无症状,无死亡(表 1)。

2.2 病原菌的鉴定

对从 3 条病鳗血液中分离到的 3 株菌 96041、96042 和 9605A 及从人工感染后重新分离到的 9605B 菌株,进行了分类鉴定,所有分离菌株的特征完全一致。属于革兰氏阴性短杆菌,菌体直,两端圆形,单个或两个串联在一起。以周鞭毛运动,无荚膜,无芽孢,菌体大小约为 0.5—0.8 × 1.1—2.0μm。在营养琼脂培养基上 30℃ 培养 24h 菌落直径约 0.5—1mm 左右,圆形、无色、透明、隆起,周缘光滑。在 SS 琼脂平板上,形成中间黑色、周边透明的圆型小菌落。能在麦康凯琼脂上生长。在三糖铁培养基(TSI)上的反应是碱性斜面,酸性底,产 H₂S。在 1% 蛋白胨液体培养基中,试验菌株均能在 NaCl 浓度为 0—4% 的范围内生长,4.5% 不生长。pH 的适应范围较广,5—9 之间都可生长。最适生长温度为 25—30℃,42℃ 能生长,5℃ 不能生长。有关分离菌株的生化特性见表 2,在表 2 中同时列出了《伯捷细菌鉴定手册》第九版中迟钝爱德华氏菌主要生化特性的资料^[12],予以比较。

表2 分离菌株的特性

Tab.2 Biochemical characteristics of the strains isolated from diseased European eels, in companson with *E. tarda*

鉴定项目	Characteristic	96041	96042	9605A	9605B	<i>E. tarda</i>
革兰氏	Gram	-	-	-	-	-
氧化酶	Oxidase	-	-	-	-	-
吲哚	Indole	+	+	+	+	+
甲基红	Methyl red	+	+	+	+	+
VP试验	VP	-	-	-	-	-
柠檬酸盐	Citrate	-	-	-	-	-
H ₂ S产生	H ₂ S production	+	+	+	+	+
尿酶	Urease	-	-	-	-	-
苯丙氨酸	Phenylalanine	-	-	-	-	-
赖氨酸	Lysine	+	+	+	+	+
精氨酸	Arginine	-	-	-	-	-
鸟氨酸	Ornithine	+	+	+	+	+
运动性	Mouility	+	+	+	+	+
明胶酶	Gelatinase	-	-	-	-	-
KCN生长	KCN grown	-	-	-	-	-
丙二酸盐	Malonate	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	Glucose, acid	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	Glucose, gas	-	-	-	-	+
产酸: Acid from:						
阿东醇	Adonitol	-	-	-	-	-
阿拉伯糖	Arabinose	-	-	-	-	-
纤维二糖	Cellobiose	-	-	-	-	-
卫矛醇	Dulcitol	-	-	-	-	-
甘油	Glycerol	+	+	+	+	d

续表						
鉴定项目	Characteristic	96041	96042	9605A	9605B	<i>E. tarda</i>
肌醇	Inositol	-	-	-	-	-
乳糖	Lactose	-	-	-	-	-
麦芽糖	Maltose	+	+	+	+	+
甘露醇	Mannitol	-	-	-	-	-
甘露糖	Mannose	+	+	+	+	+
密二糖	Melibiose	-	-	-	-	-
葡萄糖苷	α -CH ₂ -D-glucoside	-	-	-	-	-
棉子糖	Raffinose	-	-	-	-	-
鼠李糖	Rhamnose	-	-	-	-	-
水杨苷	Salicin	-	-	-	-	-
山梨醇	Sorbitol	-	-	-	-	-
蔗糖	Sucrose	-	-	-	-	-
海藻糖	Trehalose	-	-	-	-	-
木糖	Xylose	-	-	-	-	-
果糖	Levulose	+	+	+	+	
松三糖	Melezitose	-	-	-	-	
菊糖	Inulin	-	-	-	-	
半乳糖	Galactose	+	+	+	+	
山梨糖	Sorbose	-	-	-	-	
粘多糖盐	Mucate					-
酒石酸盐 (Jordans)	Tartrate	+	+	+	+	[-]
七叶苷水解	Esculin hydrolysis	-	-	-	-	-
乙酸盐利用	Acetate	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	Nitrate reduction	+	+	+	+	+
DNA酶	DNase	-	-	-	-	-
脂酶	Lipase	-	-	-	-	-
ONPG	ONPG	-	-	-	-	-
色素	Pigment	-	-	-	-	-
周鞭毛	Peritricha	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	Catalase	+	+	+	+	+
O/F试验	O/F test	F	F	F	F	F
卵磷脂酶	Lecithinase	-	-	-	-	-
酪蛋白酶	Casease	-	-	-	-	-
淀粉酶	Amylase	-	-	-	-	-
几丁质酶	Chitinase	-	-	-	-	-
葡萄糖酸盐	Gluconate	-	-	-	-	-

注：[-]：11—25%阳性；d：26—75%阳性；F：发酵。
Notes：[-]：positive in 11—25% of strains；d：positive in 26—75% of strains；F：fermentation.

2.3 药敏试验

96041 和 96042 菌株对抗生素的敏感性见表 3。

表3 分离菌株对抗生素的敏感性
Tab.3 Sensitivity of the isolated strains to antimicrobial agents

抗菌药物名称	分离菌株	抗菌药物名称	分离菌株
Antibiotics	Strains	Antibiotics	Strains
四环素 Tetracycline	—	氧哌青霉素 Piperacillin	++
先锋霉素5 Cefazolin	++	氯霉素 Chloromycotin	++
洁霉素 Lincomycin	—	复方新诺明 SMZ+TMP	—
麦迪霉素 Medimycin	—	妥布霉素 Tobramycin	++
多粘菌素 B Polymyxin B	++	磺胺药 Sulfamethoxazole	—
先锋霉素1 Cephalothin	+	痢特灵 Furazolidone	+
氨苄青霉素 Ampicillin	++	新霉素 Neomycin	++
万古霉素 Vancomycin	—	庆大霉素 Gentamicin	++
丁胺卡那霉素 Amikacin	++	青霉素 G Penicilin G	—
红霉素 Erythromycin	+	链霉素 Streptomycin	++
卡那霉素 Kanamycin	++	羧苄青霉素 Carbenicillin	++
新生霉素 Novobiocin	—	苯唑青霉素 Oxacillin	—
林可霉素 Lincomycin	—	萘啶酸 Nalidixic Acid	—
吡嗪酸 Pipemidic Acid	+	氟喹酸 Ofloxacin	++
克林霉素 Clindamycin	—	环丙沙星 Ciprofloxacin	++

注：++：高度敏感； +：中度敏感； —：耐药。
Notes: ++: high sensivity; +: sensivity; -: resistance.

3 讨论

肌注和口服感染试验的结果表明,被感染的健康欧鳗出现与自然感染欧鳗的红头病相似的症状,人工感染后大多在 4d 内死亡,肌注和口服试验组的死亡率分别为 83% 和 67%(表 1); 并从感染的病鳗中分离到相同性状的菌株,从而证实该菌是欧鳗的病原菌。经口感染试验获得成功,证明其传染途径是由消化道传播,结果与韩先朴等^[13]和 Miyazaki 等^[14]对日本鳗鲡爱德华氏菌经口感染的试验结果一致。作者曾对健康欧鳗作过菌浴感染试验,未造成鳗鱼发病死亡。迟钝爱德华氏菌广泛分布于养鳗场的环境中^[15],被认为是一种条件致病菌,当环境不良时,才会诱发疾病,造成死亡。

从病鳗分离到的菌株属革兰氏阴性杆菌,以周鞭毛运动,兼性厌氧,发酵葡萄糖产酸,氧化酶阴性,过氧化氢酶阳性,能还原硝酸盐,VP 和柠檬酸盐阴性,赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶阳性,发酵麦芽糖和甘露糖等特性与《伯捷细菌鉴定手册》第九版^[12]中的肠杆菌科(Enterobacteriaceae),爱德华氏菌属(Edwardsiella)的描述相符。在《伯捷细菌鉴定手册》第九版中爱德华氏菌属包括迟钝爱德华氏菌(E. tarda)、鲟爱德华氏菌(E. ictaluri)和保科爱德华氏菌(E. hoshinae)三个种。分离菌株除葡萄糖产酸不产气的特征外,其余生理生化特性完全与迟钝爱德华氏菌吻合(表 2),因此鉴定为迟钝爱德华氏菌。

迟钝爱德华氏菌的宿主范围很广,除能感染鳗鱼外,还能危害许多海、淡水鱼类,如:金鱼、虹鳟、大鳞大马哈鱼、黑鲈、紫鲈、真鲷、鲷鱼、川鲈等。此外从蛇、龟等其它冷血动物肠道和粪便,鸟类的肠道和病灶,猪和其它温血脊椎动物的肠内以及人的粪便、尿或血液中也常分离到该菌^[16]。最近我国福建省某养殖场从患败血症幼鳖的肝脏和腹水中也分离到该菌^[17]。

爱德华氏菌侵袭日本鳗鲡的主要器官是肝脏和肾脏,根据症状可分为以侵袭肾脏为主的肾脏型和以侵袭肝脏为主的肝脏型。肾脏型的病鱼肛门严重充血、发红,以肛门为中心的躯干部呈现丘状突起,附近区域有块状出血并软化。肝脏型病鱼的主要症状是鳗鲡前腹部肝区部位肿大,严重时肝区腹部皮肤软化、溃疡穿孔、肝脏外露。两型的共同特征是躯干腹侧呈现出血点,各鳍出血、显著发红,与赤鳍病相似^[15,7-9]。感染迟钝爱德华氏菌的欧洲鳗的主要症状是吻部、下颌、鳃区严重充血,使头部外观呈鲜红色,胸、臀、腹鳍也呈血红色,并伴随肝脏肿大,肠道发炎充血等,但内部器官的病变不像被爱德华氏菌感染的日本鳗鲡那样严重,两者的外观症状也有显著差异。笔者认为这是由于病菌侵袭鱼种的不同,所产生的症状不同的缘故。例如,爱德华氏菌感染牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼也有头部充血的状况;美国河鲈(*Ictalurus punctatus*)被迟钝爱德华氏菌感染后,于体侧及尾柄肌肉组织造成腐烂,病灶处因腐烂而充满气泡、肿大,故有气肿性腐烂病之称。

药物敏感试验结果表明,该菌对氨苄青霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、氟喹酸、环丙沙星等 14 种药物高度敏感;对磺胺类药、四环素、萘啶酸和苯唑青霉素等 12 种抗菌素耐药(见表 3)。1996 年 5 月是霞浦某养殖场欧鳗红头病的发病高峰期,从 10 日起,作者对其中 2[#]和 8[#]发病池进行了药物治疗试验,即用自己研制的添加剂 2 号按一定比例加入到配合饲料中,早晚各投喂一次。经一周的治疗,2[#]和 8[#]池的死亡率较其它池明显减少,日死亡数从原来的 40 多尾下降到几尾,其疗效是十分显著的。因此,虽然红头病号称欧洲鳗鲡疾病的“第二杀手”,只要在养殖过程中措施得当,合理用药,完全能预防和控制该病的发生。

参 考 文 献

- [1] 方宋正. 欧洲鳗鲡“红头病”. 科学养鱼, 1994, (11): 27
- [2] 钱文华. 鳗种的红头病. 科学养鱼, 1995, (11): 26
- [3] 樊海平. 欧洲鳗鲡红头病的防治方法. 中国水产, 1995, (11): 21
- [4] 王国良、徐兴林、路 正. 鳗鲡爱德华氏菌病原菌及一新种. 水产学报, 1993, 17(3): 224—228
- [5] 卢全章、朱心玲. 鳗鲡肝肾病原菌的研究. 水生生物学报, 1994, 18(4): 360—367
- [6] 郭琼林、卢全章. 鳗鲡爱德华氏菌病的组织病理学研究. 水生生物学报, 1995, 19(1): 60
- [7] 韩先朴、李 伟、陈光辉. 鳗鲡爱德华氏菌病的研究. 水生生物学报, 1989, 13(3): 259—263
- [8] Miyazaki T, S Egusa. Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*), Suppurative interstitial nephritis form. *Fish pathology*, 1976, (11): 33—43
- [9] Miyazaki T, Egusa. S Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*), Suppurative hepatitis form. *Fish pathology*, 1976, (11): 67—75
- [10] Wakabayashi H, Egusa. S *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-culture eel disease. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1973, 39(9): 931—936
- [11] 中科院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978
- [12] Holt J G. et al.. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, 1994, 175—189. Williams

and Wilkins, Baltimore

- [13] 韩先朴、李伟和潘金培. 爱德华氏菌人工经口感染及病理观察. 水生生物学报, 1995, 19(3):245—249
- [14] Miyazaki T. et al.. Experimental infection of *Edwardsiella* in the Japanese eel. *Fish pathology*, 1992, 27(1):39—47
- [15] Minagawa T. *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. *Fish pathology*, 1983, 17(4):243—250

THE PATHOGEN OF RED-HEAD DISEASE IN EUROPEAN EEL (*ANGUILLA ANGUILLA*)

Zhou Kai, Zheng Guoxing and Sun Qihuan¹⁾

(East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai, 200090)

¹⁾(Shanghai Fisheries University, Shanghai, 200090)

Abstract During the cultivation of European eel (*Anguilla anguilla*), a serious epizootic occurred among cultured elvers in southern provinces of China. The disease was called red-head disease, because one of the typical symptoms was reddening on the head, which was caused by subcutaneous haemorrhaging. The present paper described characteristics of the red-head disease. Three strains of bacteria were isolated from the blood of the spontaneously diseased eels. After intramuscular or feeding inoculation with the bacterial suspension, the healthy eels appeared the symptoms similar to those in natural diseased eels. The mortality of injection and feeding challenge trials were 83% and 67%, respectively. Another strain of the same pathogen was isolated from the artificially infected eel. Characteristics of four strains were completely consistent. The organisms were gram-negative, short rod, motile by means of peritrichous flagella, facultatively anaerobic. Glucose was catabolized with the production of acid. Oxidase, Voges-Proskauer reaction, Simmon's citrate, β -galactosidase and phenylalanine deaminase were negative. Catalase, indole, hydrogen sulfide and methyl red test were positive. Nitrate was reduced. Lysine and ornithine decarboxylase were produced. The isolates produced acid from galactose, glycerol, levulose, maltose and mannose, but not from arabinose, cellobiose, inositol, lactose, mannitol, α -methyl-D-glucoside, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose and xylose. Physiological and biochemical characteristics of the present isolates were the same as those of *Edwardsiella tarda* described in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. (Holt et al., 1994), except that the isolates did not produce gas from glucose. Therefore, the pathogen isolated from the diseased European eels was identified as *Edwardsiella tarda*.

Key words European eel (*Anguilla anguilla*), Red-head disease, *Edwardsiella tarda*, Septicaemia