

二龄草鱼肠炎病发病机理

徐伯亥 葛蕊芳 熊木林*

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提要

本文通过对患肠炎病的二龄草鱼病鱼和正常草鱼的肠道及血液中的产气单胞菌(*Aeromonas*)的数量和毒力的比较, 病鱼肠道、血液和其他内脏中的产气单胞菌所出现比率的调查, 不同水温对该菌致病力的影响和用菌体提取液接种鱼体, 以及用鲎试剂(鲎变形细胞溶解物 *Tachypleus Amebocyte Lysate “TAL”*)对病鱼和正常鱼体内的内毒素进行测定等一系列的试验和观察, 从而推断出二龄草鱼细菌性肠炎病的发病机理。

关键词 产气单胞菌, 机理, 肠炎病, 内毒素

二龄草鱼肠炎病的病原菌是点状产气单胞菌(*Aeromonas punctata*)^{[1][2]}; 现已得到进一步证实^[3]。由产气单胞菌引起的鱼病, 世界上很多国家有报道。日本江草周三(1978)^[3]为简便起见, 对运动的产气单胞菌所引起的鱼病, 总称为产气单胞菌病。该菌无论对淡水鱼或海水鱼; 冷水鱼或温水鱼都能致病, 并且症状相似。在鲤科鱼类中肉眼可见的症状为: 体表和肛门发红, 内脏和肠道发炎, 肠内多粘液。我国的二龄草鱼肠炎病就是一个比较典型的例子。

由运动的产气单胞菌所引起的鱼病, 报道虽很多, 但涉及它的发病机理的文章并不多。高桥幸则(1984)^[4]为了阐明鲤产气单胞菌病的发病机理, 将这种病原菌的活菌和其破碎菌体提取液感染鲤, 比较研究了其组织病理的变化, 推断出鲤产气单胞菌的发病机理。而对于产气单胞菌在鱼体内的数量变化, 及其产生的内毒素等致病因素, 却未见报道。我们自1982年以来, 对二龄草鱼肠炎病的发病机理, 进行了一系列的试验和观察。

材料和方法

1. 材料来源

材料鱼系取自湖南省岳阳市和湖北省鄂州市各养殖场的二龄草鱼“殃胚”(半死不活的病鱼)和健康鱼(正常鱼)。

* 本所蔡桃珍和武大学生陈向东参加了部分工作。

1) 本文中所报道的是 *Pseudomonas punctata* 以后根据 Bergey 氏分类系统的改变, 才改为 *A. punctata* 微生物学报, 9(2), 150—154。1963。

1986年12月18日收到。

鲎试剂(鲎变形细胞溶解物 Tachypleus Amebocyte Lysate)购自福建省厦门市医学研究所鲎研究室。

标准内毒素为大肠杆菌(*E. Coli* O₁₁₁ B₄)内毒素(上海生物制品研究所)^④。

2. 试验方法

细菌分离及定性定量方法,见二龄草鱼肠炎病的研究^[4],Popoff等(1976)嗜水产气单胞菌——点状产气单胞菌群的分类研究^[10],及鲢鳙鱼打印病致病细菌的研究^[3]等。

毒力试验方法:将所分离到的细菌,于28℃培养18小时后,稀释成McF 5号管的浓度,腹腔注射0.3毫升,观察发病情况。

菌体提取液制备方法:刮下菌苔,洗涤3次后加铝钒土(AlO₃),以无菌手续置研钵中研磨,洗下并离心,取上清液0.5毫升,注射鱼体腹腔。

内毒素检测方法:试管法和倍比序列稀释法^[8,9,1111]。

(1) 器皿去热原处理:器皿用肥皂水洗净后,在清洗液中浸泡1小时(或用1%氢氧化钠溶液,煮沸半小时),再用蒸馏水冲洗,待干后,置180℃干烤2小时以上。

(2) 血液标本处理:从鱼的尾动脉抽血,加入上述去热原并含有50—100微克/毫升肝素管中摇匀,离心分离血浆。然后置另一试管,用去热原蒸馏水,将血浆作1:2或1:4稀释(作定量时,以1:1,1:2,1:4,1:8,……顺序稀释),加热100℃10分钟,以除去各种抑制物。

(3) 定性检测:用去热原处理的吸管,将溶解的鲎试剂及检样,加入试管内,加盖使混合均匀,然后放置37℃恒温水浴中静置1小时,取出并于室温放置约5分钟,观察结果。以倒置180度仍保持凝胶完整不变者为阳性;形成柔软凝胶、倒置试管变形、絮状、或混浊者为阴性。每次测定时,均另设加去热原水的阴性对照管和加入标准参比内毒素溶液(10毫微克/毫升)的阳性对照管。

(4) 定量检测:样品和参比内毒素经倍比序列稀释后,同时检测鲎试剂的敏感度。分别确定试验中呈强阳性反应的样品及内毒素的最高稀释度。然后以样品的这一稀释倍数乘以鲎试剂的敏感度。

试 验 结 果

1. 病鱼和正常鱼肠道中细菌的定量定性测定

(1) 定量测定

自1982年至1984三年期间,我们从发病池中,取得二龄草鱼“殃胚”病鱼进行测定(表1)。从表1可以看出:在水温为25—33℃的发病期间,用网捕起的肠内有食,体表完整,肉眼观察无病变的正常鱼肠道中,每克湿重含菌量为 10×10^5 — 10×10^7 ;而离群独游,症状明显的“殃胚”病鱼肠道中,每克湿重所含的菌数却增加到 10×10^8 — 10×10^{10} 。显然,病鱼肠道中细菌的含量比正常鱼多几百以至几万倍。这就清楚地告诉我们:

^④ 吴伟洪,1983。鲎与鲎试验法论文汇编。厦门市医学研究所鲎研究室。

表 1 病鱼和正常鱼的肠道和血液中的细菌数量比较

Tab. 1 Comparison of bacterial counts in intestine and blood between diseased and healthy fish

鱼况 Condition of fish	来源 Source	肠道充实度 Intestinal fullness index	水温 Water temperature (°C)	鱼体大小 Size of fish (cm)	血液菌数 Bacteria in blood	肠道菌数 (个/克湿重) Bacterial counts: in gut (Cells/g Wet weight)
病鱼 Diseased	湖北鄂州市养殖场	0	29.5	28(23.8)×6.0	+++	1.9×10^8
		0	29.5	25(19)×5.5	++	4.0×10^9
		0	28.3	22(19)×4.5	+++	1.0×10^8
正常鱼 Healthy	湖南岳阳市养殖场	5	33.2	15(12.5)×3.3	-	9.8×10^6
		5	33.2	14.5(12)×3.2	-	8.6×10^6
		5	33.2	14(11.7)×3	-	1.0×10^7
病鱼 Diseased	湖南岳阳市养殖场	0	30	22.4(18.5)×4	+++	9.0×10^{10}
		0	32	23(19.5)×4.2	+++	7.5×10^{11}
		1	31	30.5(26.8)×6.3	+	1.53×10^9
正常鱼 Healthy	湖南岳阳市养殖场	1	31	16.5(13.7)×3.5	-	2.67×10^9
		2	25	13.5(11.2)×3	-	4.4×10^7

当二龄草鱼患细菌性肠炎病时,病鱼肠道中细菌的数量大量增加。

(2) 定性测定

考虑到代表性和工作量,我们从上述定量测定的9尾病鱼分离菌株中,随机地挑取一定数量的菌株进行鉴定(表2)。从表2可以看出:病鱼肠道中的产气单胞菌,在42个菌株中有31个,占总分离数的73.8%;而正常鱼肠道中的20个菌株中只有1个,仅占5%。即二龄草鱼患肠炎病时,肠道中所增加的细菌,绝大多数是产气单胞菌。

表 2 产气单胞菌在病鱼肠道中所占的百分率

Tab. 2 Percentage of *Aeromonas* in bacteria found in gut of diseased fish

鱼号 No. of fish	分离菌数 No. of isolated bacterial strains	菌数 No. of <i>Aeromonas</i> strains	百分比 (%)
病鱼 Diseased	1	4	2
	2	5	4
	3	5	5
	4	4	4
	5	5	5
	6	5	0
	7	5	5
	8	4	2
	9	5	4
正常鱼 Healthy	1	10	0
	2	10	1
			10

2. 病鱼和正常鱼肠道中细菌的毒力比较

从5尾病鱼肠道中所分离到的30个菌株和从2尾正常鱼中所分离到的40个菌株，通过鱼体进行人工毒力试验结果(表3)可以看出：病鱼肠道中的30个菌株，23株有毒力，占78%；而正常鱼的40个菌株中，却只有4株有毒力，仅占10%。病鱼肠道中细菌有毒力菌株，显然比正常鱼有毒力菌株多。

表3 病鱼和正常鱼肠道中产气单胞菌的毒力比较

Tab. 3 Comparison of the toxicity of *Aeromonas* isolated from intestine of diseased and healthy fish

鱼号 No. of fish	菌株数 No. of strain	无毒株数 Avirulent strain	有毒株数 Virulent strain	有毒株占百分比 Percentage of virulent strain	平均% Average (%)
病鱼 Diseased	1	10	3	7	70
	2	5	1	4	80
	3	5	1	4	80
	4	5	2	3	60
	5	5	0	5	100
正常鱼 Healthy	1	20	19	1	5
	2	20	17	3	15

3. 水温对产气单胞菌致病力的影响

在不同的水温下进行的人工感染试验,见表4。从表4看出:当水温在25℃以上时,被感染的鱼6小时之内便可发病;25℃时,12小时死鱼最多;而29℃时6小时左右则死鱼最多。水温较低时,要24小时,甚至到第二或第三天死鱼才能达到高峰,并且症状不明显。

表 4 水温对产气单胞菌致病力的影响

Tab. 4 Effect of water temperature on pathogenicity of *Aeromonas*

可见水温对产气单胞菌的致病,有很重要的关系。但它不是唯一的因素,因为在同一温度下,有的鱼池发病,有的鱼池却不发病;甚至在同一鱼池,有的鱼发病,有的鱼安全无恙。

4. 病鱼血液和肝、脾、肾中细菌的测定

表 5 病鱼肠道、血液和内脏中产气单胞菌的比率

Tab. 5 Relative abundance of *Aeromonas* in intestine, blood and other organs of diseased fish

时 间 Date	鱼数 No. of fish	鱼体大小 (cm)	水温 Water temperature (°C)	部位 Position	总菌数 No. of total bacteria	菌数 No. of <i>Aeromonas</i>	百分率 Percentage (%)
1984 年 5—8 月	10	14—18	28—33	后肠 Hind-gut	42	25	59.5
				血液 Blood	45	42	93.3
				肝 Liver	30	28	93.3
				脾 Spleen	15	13	86.7
				肾 Kidney	24	21	87.5

表 6 鱼血液中内毒素的测定

Tab. 6 Endotoxin determination in blood of fish

		鱼 号 Number of specimen	结 果 Results	阳 性 对 照 Positive blank	阴 性 对 照 Negative blank
正常鱼血液 Blood of healthy fish		1	—	+	—
		2	+	+	—
		3	—	+	—
		4	—	+	—
		5	—	+	—
		6	—	+	—
		7	—	+	—
		8	—	+	—
		9	—	+	—
		10	—	+	—
病鱼血液 Blood of diseased fish		1	+	+	—
		2	+	+	—
		3	+	+	—
		4	+	+	—
		5	+	+	—
		6	+	+	—
		7	+	+	—
		8	+	+	—
		9	+	+	—

二龄草鱼在正常情况下,一般来说,除肠道外其他内脏是无菌的^[4]。但在患细菌性肠炎病时,内脏却有很多细菌存在。从10条肠炎病鱼的测定结果(表5)可以看出:产气单胞菌占血液中细菌的93.3%;肝脏中占93.3%;脾脏中占86.7%;肾脏中占87.5%。它是占绝对优势的种。其余10%左右是别的细菌,它们是随同产气单胞菌一道从肠道进入血液,肝、脾和肾脏的。

5. 菌体提取液注射鱼体的感染试验

用研磨破碎的方法制备的菌体毒素,以大剂量注射鱼体(腹腔注射0.5毫升),得到与注射活菌体相似的结果,病鱼症状也相似。

6. 病鱼血液中内毒素的定性定量测定

鲎试剂法是目前检测内毒素最敏感的方法,它比家兔热原试验敏感10—100倍以上,可以测出微量内毒素0.1—1毫微克/毫升。从病鱼和正常鱼血液中的内毒素测定结果(表6)可以看出:9尾病鱼的血液中都有内毒素存在(含量约为2.496毫微克/毫升);而10尾正常鱼除1尾有内毒素外,其余9尾均未测得有内毒素存在。

讨 论 和 小 结

我们认为二龄草鱼肠炎病的发病机理是:当水温上升到18℃以上时,肠道内的病原性产气单胞菌,开始大量繁殖,并进入肠壁微血管到血液,引起肠壁微血管机能紊乱。在血液中该菌又不断增殖,并通过血液循环到全身各内脏组织。经过大量繁殖以后的产气单胞菌,自溶释放出菌体内毒素,致使血管渗透性改变,导致败血症,最后引起死亡。

高桥幸则(1984)^[6]推断鲤产气单胞菌病的发病机理为:病原性产气单胞菌,在肠道内异常增殖后,侵入肠壁血管,通过血液循环遍布各组织,同时血管内的一部分细菌自溶,其内毒素使血管的渗透性恶化,致血管壁损伤厉害,部分红血球逸出,出现出血。这一推断与我们的结果不约而同。在他的试验中,未能进行肠道和内脏中细菌的分析以及内毒素的测定;而我们没有作组织病理观察。然而彼此的试验得到了互相补充,使结论更加完善,更能反映实际情况。

产气单胞菌是二龄草鱼肠炎病的致病菌。一般来说,它进入机体并造成疾病,必须具备若干条件。首先要能穿过机体的解剖学屏障,又要能在鱼体内生长和繁殖,同时还必须产生一些物质,来对抗宿主的防御能力。这些物质包括辅助性致病物质和毒素。前者虽不一定具有毒力,但可抑制宿主的防御能力,使产气单胞菌能在组织中生长。这一工作,有待今后进一步研究;而后者主要引起宿主机体发生病变、症状、甚至死亡,其中包括内毒素。据目前所知大多数革兰氏阴性细菌,特别是肠道细菌含有内毒素。它能引起微血管舒缩机能紊乱,血管通透性改变^[2]。而细菌产生内毒素的多少,显然与细菌的数量是密切相关的。因此可以认为,产气单胞菌——这一非专一的条件致病菌,能在二龄草鱼中大量繁殖,这是致病的基本条件。搞清楚除温度之外的,促使肠道中病原性产气单胞菌大量繁殖的条件,可能对二龄草鱼肠炎病的预防是很重要的。

关于一龄(当年)草鱼的肠炎病, 倪达书(1980)¹⁾曾在全国鱼病工作会议上, 论述“草鱼细菌性肠炎病与草鱼出血病的关系”时指出: 用磺胺胍治疗草鱼肠炎病, 当年鱼种池的疗效为34.9%, 而一龄以上的疗效为80%, 推测出当年草鱼也还有30—40% 是由细菌引起的可能性。这一推测有待今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王德铭、葛蕊芳、吴兰影、王银妙, 1959。鲩、青鱼传染性肠炎病的研究。1, 肠炎病致病细菌的研究。水生生物学集刊, (3): 241—254。
- [2] 余渭、龙振洲, 1984。医学微生物学。人民卫生出版社。
- [3] 徐伯亥、葛蕊芳、熊木林, 1980。鲢鳙鱼打印病致病细菌的研究。海洋与湖沼, 11(1): 85—93。
- [4] 徐伯亥、熊木林、韩先朴、芦全章、葛蕊芳, 1987。二龄草鱼肠炎病的研究。水生生物学报, 11(1): 73—82。
- [5] 江草周三, 1978。魚の感染症。恒星社厚生閣, 东京。
- [6] 高桥幸则, 1984。コイのエロモナス病における発病機構。水产大学校研究报告, 32(1,2): 41—48。
- [7] Klontz, G. W., Yasutake, W. T. and Ross, A. J., 1966. Bacterial diseases of the Salmonidae in the Western United States: Pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. *Am. J. Vet. Res.*, 27(20): 1455—1460.
- [8] Levin, J., Lomasulo, P. A., Oser, R. S., 1970. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 903—911.
- [9] Nachum, R., Lipsky, A., and Sicgel, S. E., 1973. Rapid detection of gram-negative bacterial meningitis by the *Limulus* lysate test. *New Eng. J. Med.*, (289): 931—934.
- [10] Popoff, M. and Veron, M., 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas Punctata* Group. *Journal of General Microbiology*, 94(1): 11—22.
- [11] Shuji Okuguchi, 1978. Improvement of the micromethod for the *Limulus Lysate test*. *Microbiology and Immunology*, 22(3): 113—121.

1) 倪达书, 1980。论草鱼细菌性肠炎与草鱼出血病的关系。鱼病简讯, 9: 1—4。

PATHOGENETIC INVESTIGATION OF THE ENTERITIS OF THE GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

Xu Bohai Ge Ruifang and Xiong Mulin

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The enteritis of two-year-old grass carp is caused by the motile *Aeromonas*. This paper describes a series of tests and observations in relation to the pathogenesis of enteritis, including the comparison of densities and toxicities of *Aeromonas* in intestine and blood between diseased and healthy fish, the effect of water temperature on the pathogenicity of the bacterium, the relative abundance of *Aeromonas* in different organs of the diseased fish and the artificial infection of this disease by inoculating the bacterium and its cell extract respectively. Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL) has been used to determine the endotoxin in blood of the diseased and the healthy fish. The pathogeny of bacterial enteritis may be summarized as follows:

When water temperature rises over 18°C, the pathogenic *Aeromonas* in the digestive tract begins to proliferate rapidly and causes functional disorder of the capillaries of the intestinal wall. After entering the blood stream, this bacterium undergoes further proliferation and spreads all over the visceral tissues. Owing to the self-dissolution of the bacteria, bacterial endotoxins are released, which alter the permeability of the blood vessels and eventually result in septicaemia of the grass carp.

Key words Mechanisms, Enteritis, *Aeromonas*, Endotoxin.