

中华鳖爱德华氏菌病病原和组织病理研究

蔡完其 孙佩芳 刘至治
(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 从中华鳖(*Trionyx sinensis*)病鳖的肝脏分离得到菌株 s-1。用菌株 s-1 进行人工感染,100%的鳖患病。从感染的病鳖的肝脏分离到菌株 s'-1,经生理生化反应测定,它与菌株 s-1 特性一致。经鉴定,菌株 s-1 是迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*),野生型。爱德华氏菌感染会引起鳖的脏器发生变质性病变。主要症状呈肝脏型,肝局部坏死,有结节状肉芽肿。

关键词 中华鳖,爱德华氏菌病,迟钝爱德华氏菌,病理

随着养鳖业的发展,集约化程度不断提高,鳖赤斑病[蔡完其等 1990, Cai 1991]、鳖穿孔病[蔡完其等 1995, 孙佩芳等 1996]、鳖鳃腺炎[蔡完其 1985, 叶普仁 1996]及鳖疔疮病[肖克宇等 1991]等鳖病广泛流行,给养鳖业带来很大损失。爱德华氏菌能引起多种水产动物如鳊鲃等患病[韩先朴 1989、1995, 陈奖励等 1993],有关爱德华氏菌引起鳖病的报道[林 禹等 1995]较少。笔者发现,爱德华氏菌引起的鳖病已在一些大型养鳖场发生,并造成较大危害。因此,对此病进行了细菌分离、毒力感染试验、细菌分类鉴定及组织病理观察等试验,以弄清中华鳖爱德华氏菌病的病原采取防治措施。

1 材料和方法

1.1 材料来源

病鳖来源于某养鳖场,体重为 15~20 g。健康鳖来源于上海嘉定三友鳖业公司,体重为 11~70 g。在水温为(28±1)℃的水族箱内饲养两周后备用。

1.2 方法

1.2.1 病原分离

在无菌操作下解剖病鳖,取肝组织少许,平板划线分离,28℃恒温培养箱中培养 24 h。从平板上形态一致的优势菌落选取单个菌落,再次进行平板划线,直至获得纯培养。

1.2.2 人工感染试验

将纯培养菌株接种于新鲜营养琼脂斜面上,28℃下培养 16~18 h。用无菌生理盐水洗下菌台,制成细菌悬液,以 MCF 3 号管测得菌株 s-1 菌液浓度为 9×10^8 CFU/mL。取健康鳖 4 只,体重为 11~24 g,腹腔注射 s-1 菌液,剂量分别为 0.1、0.2 mL,各 2 只;另取同样大小健康鳖 2 只,作为对照组,分别注射生理盐水 0.1、0.2 mL。

从人工感染病鳖的肝脏分离到菌株 s'-1, 用它进行再次感染试验, 取健康鳖 4 只 (体重为 34~70 g), 腹腔注射 s'-1 菌液, 0.3 mL 两只, 0.4 mL 两只; 另取同样大小健康鳖 2 只作为对照组, 分别注射生理盐水 0.3、0.4 mL。

试验鳖置于水族箱中饲养, 水温控制在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2.3 病原菌的分类鉴定

据中国科学院微生物研究所细菌分类组 [1978] 及 Farmer 和 Mcwhorter [1984] 等方法进行。菌株均在营养琼脂斜面 28°C 恒温培养 16~18 h 活化后再进行菌体、菌落形态观察和生理生化试验。

1.2.4 组织切片制备

取人工感染病鳖 4 只及健康鳖 2 只。取肝、肺、心、肾、脾及肠等各脏器组织, 用葡翁氏液固定, 石蜡切片, 厚度为 5~6 μm , 苏木精-伊红染色 (H.E) 和革兰氏染色。

2 结果

2.1 s-1 菌株的致病性

健康鳖在人工感染 s-1 菌株后, 7 天内先后发病, 发病率为 100%, 死亡率为 25%。第 9 天取垂死病鳖一只, 作为组织切片材料; 余下两只病鳖, 由于水质控制较好, 且投喂鲜鱼, 到第 13 天逐渐康复。

从感染病鳖的肝脏分离到菌株 s'-1, 经生理生化反应测定, 它与菌株 s-1 的特性一致。用 s'-1 再感染健康鳖, 4 天内先后出现症状, 发病率为 100%, 死亡率为 25%。到第 6 天取垂死鳖 3 只作为组织切片材料。

两次人工感染发病症状与自然发病症状一致。在发病初期, 鳖精神不振, 活力不强, 悬浮于水面, 停止摄食。随着病情的发展, 鳖出现浮肿, 有的背部表皮溃烂, 有的则无明显症状。剪开腹腔, 有大量腹水并有恶腥臭味。肝脏明显肿大, 可见淡黄色小结节病灶, 随着病情的进一步恶化, 小结节病灶可融合成灰色片状病灶。肾未见结节病灶。胆肿大呈墨绿色。脾脏肿大呈深紫色。肺紫褐色。肠呈白色, 很少见充血。对照组鳖均健康活泼, 无任何症状。由此可知, s-1 菌株为鳖爱德华氏菌病的致病菌。

2.2 病原菌的分类和鉴定

2.2.1 s-1 菌株菌落形态

圆形, 较小, 直径为 0.5~1.0 mm, 表面光滑湿润, 半透明, 灰白色, 中间略隆起。

2.2.2 s-1 菌株菌体形态

革兰氏阴性小杆菌, 菌体直, 多为单个排列, 周生鞭毛, 无芽孢, 无荚膜 (图 1)。

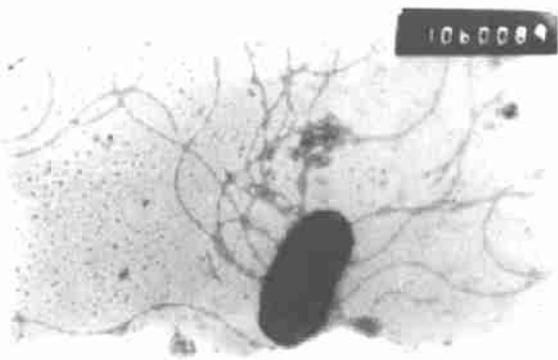


图 1 爱德华氏菌 s-1 菌株菌体电镜照片 ($\times 14\ 000$)

Fig.1 Electron micrograph of strain s-1 of *Edwardsiella ictaluri* ($\times 14\ 000$)

2.2.3 s-1菌株生理生化反应

氧化酶阴性,接触酶阳性,不利用柠檬酸盐为唯一碳源。发酵葡萄糖产酸产气,发酵麦芽糖。不发酵乳糖、甘露醇、蔗糖和阿拉伯糖。赖氨酸与鸟氨酸脱羧酶阳性,精氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶阴性。在三糖铁(TSI)培养基上产生 H_2S ,在含1%胨水中产生吲哚。M.R阳性,V.P阴性。不分解尿素,不液化明胶,不利用酒石酸盐等(表1)。这同Farmer和Mcwhorter[1984]对迟钝爱德华氏菌的描述一致。根据菌株的形态特征和生理生化反应,鉴定s-1菌株为迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda* Ewing et Mcwhorter),且为野生型。

表1 s-1菌株与迟钝爱德华氏菌*生理生化特性的比较

Table 1 Comparison of physio-biochemical characteristics between s-1 strain and *Edwardsiella tarda*

鉴定项目	菌名		鉴定项目	菌名	
	s-1菌株	迟钝爱德华氏菌		s-1菌株	迟钝爱德华氏菌
氧化酶	—	—	肌醇	—	—
接触酶	+	+	卫矛醇	—	—
葡萄糖氧化发酵(O/F)	F	F	赖氨酸脱羧酶	+	+
葡萄糖产气	+	+	鸟氨酸脱羧酶	+	+
蔗糖	—	—	精氨酸脱羧酶	—	—
麦芽糖	+	+	M. R.	+	+
甘露糖	—	—	V. P.	—	—
乳糖	—	—	在含1%胨水中产生吲哚	+	+
阿拉伯糖	—	—	柠檬酸盐利用(西蒙氏)	—	—
纤维二糖	—	—	d-酒石酸盐利用	—	—
水杨苷	—	—	尿素水解	—	—
七叶苷	—	—	在TSI上产生 H_2S	+	+
木糖	—	—	硝酸盐还原	+	+
棉子糖	—	—	明胶液化(22℃)	—	—
侧金盏花醇	—	—	ss培养基上生长	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	—	—			

* Farmer 和 Mcwhorter[1984]

2.3 组织病理观察

各脏器发生变质性病变,肝脏病变尤其明显,故该病为肝脏型病变。

2.3.1 肝脏

由于爱德华氏菌的作用,肝淤血,形成典型的肉芽肿,成团的类上皮细胞积集成结节状病灶,其中央有坏死物及细菌块(革兰氏染色呈红色),周围有淋巴细胞(图版-1);同时可见肉芽肿融合灶(图版-2);肝脏局部坏死,肝细胞肿大,核碎裂,嗜中性白细胞浸润(图版-3)。

2.3.2 心脏

部分心肌弯曲,断裂,横纹消失。心肌间有渗出液,红细胞及嗜中性白细胞浸润(图版-4、5)。

2.3.3 肺

肺炎性水肿,肺泡肿大,肺泡壁血管充血,肺泡内充满红细胞、嗜中性白细胞及渗出液(图版-6)。

2.3.4 脾

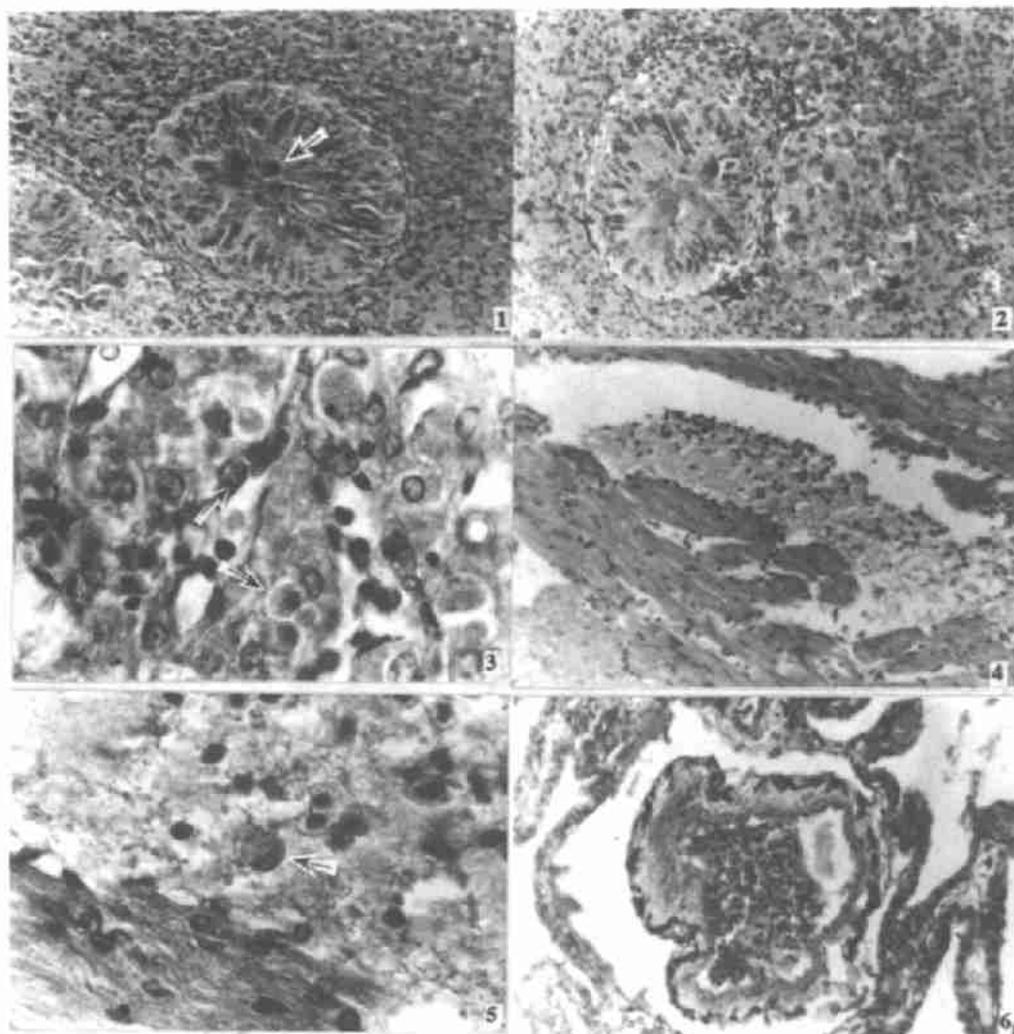
脾窦扩大,脾窦间充满炎症细胞,使红髓和白髓界限不清。

2.3.5 肠

肠组织无明显病理变化。肠腔中有渗出的嗜中性白细胞。肠粘膜下层的血管轻度充血。

2.3.6 肾

肾小管上皮细胞肿大,颗粒变性。



图版 Plate

1. 肝脏肉芽肿, 中央有坏死物及细菌块(↑)(横切, ×504); 2. 肝脏肉芽肿融合(横切, ×504); 3. 肝脏局部坏死; 肝细胞肿大, 核碎裂(↑); 嗜中性白细胞浸润(↑)(横切, ×2520); 4. 心脏心肌间有渗出液、红细胞及嗜中性白细胞(横切, ×504); 5. 图4的局部放大, ↑示嗜中性白细胞(横切, ×2520); 6. 肺泡肿大, 肺泡内充满渗出液、红细胞及嗜中性白细胞(横切, ×504)

3 讨论

3.1 s-1 菌株的致病性

s-1 菌株在人工感染试验中, 表现出的毒力较强, 使健康鳖患病或死亡。从感染的病鳖

肝脏分离到的菌株 s'-1 的各种特性均与 s-1 菌株相同,证明菌株 s-1 为鳖爱德华氏菌病的致病菌。不过,从试验过程的观察结果看,此病为非暴发性,病情发展相对缓慢。如果鳖的体质较强或侵袭整体的病原菌数量较少,饲养条件较好,则可能通过鳖自身的免疫与防御系统逐渐康复。

3.2 鳖患爱德华氏菌病的可能性

迟钝爱德华氏菌是鱼类爱德华病的病原菌。1962年爱德华氏菌病首次在日本鳗鲡中发现,后来在多种人工养殖的淡水鱼和海水鱼中相继发现。此外,从蛇、龟等冷血动物肠道和粪便中,从鸟类、猪等温血动物的肠内以及人的粪便、尿或血液中也常分离到该菌,可见其宿主范围十分广泛,是水陆常见菌。陈奖励等[1993]报道养鳗池水中一般含有爱德华氏菌 10^{2-9} CFU/mL。可见中华鳖接触该病原和患病的机会是广泛的。

爱德华氏菌在 14°C 以下不繁殖,繁殖温度为 $15\sim 40^{\circ}\text{C}$, 30°C 最适[郭雄光等 1988],恰好是目前温室养鳖的温度,这又给爱德华氏菌的繁殖创造了良好的环境条件,因此,在整个温室养鳖过程中,鳖都有可能感染爱德华氏菌而患病,这是同养殖环境分不开的。

韩先朴等[1995]用人工经口感染的方法使鳗鲡患爱德华氏菌病获得成功,说明该病原菌可通过饲料经消化道感染鱼体,鳖也有可能通过摄食而感染爱德华氏菌,所以,把好饲料关是预防该病发生的重要措施。

3.3 组织病理变化的探讨

鳖受爱德华氏菌侵袭,使肝脏局部坏死,遭受损伤。由于鳖的自身免疫力较强,能以增生方式进行抗损伤,在坏死灶周围,成团的类上皮细胞集积成结节状的肉芽肿,这是鳖的一种抗损伤反应。但肉芽肿过多或过大会压迫周围的血管,特别是壁薄而且没有结缔组织支持的肝静脉分支,从而加重肝脏的血循环障碍。此外,肝脏受损后,白蛋白的合成能力降低,导致血浆胶体渗透压降低,形成腹水。此为鳖即将死亡的征兆,已无法治疗。

据韩先朴[1995]报道,爱德华氏菌引起鳗鲡患病的病症表现为肝脏型或肾脏型两种类型。作者所见的鳖爱德华氏菌病均为肝脏型,是否有肾脏型有待进一步研究。韩先朴[1995]又报道说,鳗鲡仅仅感染爱德华氏菌时,只引起肝脏灶性坏死,而爱德华氏菌和气单胞菌同时感染时,则引起脓肿,此乃气单胞菌继发感染的结果。作者在患爱德华氏菌病的中华鳖看到,肝脏中不但有灶性坏死,而且形成结节状肉芽肿;各脏器均有嗜中性白细胞浸润,但尚未见到脓肿。本次试验所取组织切片材料,是仅由爱德华氏菌人工感染的,这可能是未见脓肿的原因。由于气单胞菌在水体中广泛存在,所以,在自然环境中,不排除鳖同时感染爱德华氏菌和气单胞菌,从而出现更复杂的病理变化的可能性。

3.4 中华鳖爱德华氏菌病的防治

保持良好的生长环境,尤其是净化水质及投喂优质饲料,是预防该病的主要方法。发病初期可用药物治疗。采用二倍稀释法,以 11 种药物为对象,测定它们对爱德华氏菌的最低抑菌浓度(MIC),经筛选,确定“鳖必康”1 和 4 号为最佳药物,其最低抑菌浓度(MIC)值均为 $0.39\ \mu\text{g/mL}$,生产应用试验已取得了良好效果。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社. 82 ~ 89, 135 ~ 187.
- 叶普仁. 1996. 鳖鳃腺炎病及治疗. 淡水渔业, 26(1): 42 ~ 43.
- 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农等. 1996. 鳖穿孔病的病原研究. 水产学报, 20(2): 120 ~ 124.
- 何长民(主编). 1981. 医用微生物实验技术. 兰州: 甘肃人民出版社. 289.
- 肖克宇, 王晓清, 资道荣等. 1991. 鳖“疖疮病”的研究. 鱼类病害研究, 13(1): 11 ~ 15.
- 林禹, 胡毅军, 蔡开珍. 1995. 幼鳖爱德华氏菌败血症的诊断和防治. 水产养殖, 5: 5.
- 陈奖励, 何昭阳, 赵文. 1993. 水产微生物学. 北京: 农业出版社. 377 ~ 380.
- 郭雄光, 刘正义, 刘朝鑫. 1988. 鱼病专辑 — 鳊鱼. 台湾养猪科学出版社. 8 ~ 9.
- 韩先朴, 李伟, 潘金培. 1989. 鳊鳊爱德华氏菌病的研究. 水生生物学报, 13(3): 259 ~ 263.
- 韩先朴, 李伟, 陈光辉. 1995. 鳊鳊爱德华氏菌人工经口感染及病理观察. 水生生物学报, 19(3): 245 ~ 248.
- 蔡完其, 彭康民, 陆海燕. 1995. 鳖穿孔病的防治. 水产科技情报, 22(4): 162.
- 蔡完其. 1985. 鳖病防治. 淡水渔业, 3: 30 ~ 31.
- 蔡完其, 陈建林. 1990. 鳖赤斑病的诊疗. 淡水渔业, 3: 24 ~ 26.
- Cai Wanqi. 1991. Pathology of red-spot disease of soft-shelled turtles. *Asian Fisheries Science*, 4: 155 ~ 163.
- Farmer J J, Mcwhorter A C. 1984. Genus *Edwardsiella*. In: Holt J C, ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1: 486 ~ 490.

STUDIES ON THE PATHOGENY AND TISSUE PATHOLOGY OF *EDWARDSIELLIASIS* IN *TRIONYX SINENSIS*

CAI Wang-Qi, SUN Pei-Fang, LIU Zhi-Zi

(*Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090*)

ABSTRACT This paper presents the pathogenic identification, tissue pathology of the *Edwardsielliasis* in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*). Strain - 1 was isolated from the liver of diseased turtles. After artificial infection by the strain s - 1, 100% of turtles diseased. Strain s' - 1 was isolated from the artificial infected turtles. It was proved that the strain s' - 1 was the same as the strain s - 1 through physical and biochemical reactive determination. It was identified that the strain s - 1 belongs to *Edwardsiella tarda*, wild type. This bacteria could cause an alterative pathological changes, characterized by liver type with partial necrosis and spotted granulomatous, in internal organs of soft-shelled turtles.

KEYWORDS Soft-shelled turtle, *Edwardsielliasis*, *Edwardsiella tarda*, Pathology