

嗜水气单胞菌感染美洲鳗鲡的病理观察

陈锦民^{1,2}, 许晓芸^{1,2}, 郭松林^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 用嗜水气单胞菌人工感染美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*), 采集死亡或濒死鳗鲡的心脏、肝脏、肾脏和脾脏, 通过病理组织切片染色观察其病理变化, 从组织病理学角度研究嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对美洲鳗鲡的致病性. 结果表明, 美洲鳗鲡感染嗜水气单胞菌后注射部位出现溃疡, 其组织病理变化主要见于肾脏, 表现为肾小球毛细血管肿胀, 肾小囊囊腔狭窄; 肾间质出血, 有较多的炎性细胞浸润; 肾小管变性崩解, 上皮细胞肿胀, 颗粒或水泡变性, 大部分上皮细胞脱落进入管腔, 管腔内有蛋白管型和细胞碎片. 肝脏弥漫性出血, 肝细胞水肿变圆, 空泡变性, 部分肝细胞溶解、消失; 肝中央静脉扩张, 充盈红细胞; 肝血窦瘀血, 肝组织间含铁血黄素沉着. 脾淋巴细胞明显减少, 白髓几乎消失; 被膜结缔组织增厚、出血; 脾炎性水肿, 部分实质细胞坏死, 出现许多网孔; 脾间质小动脉管壁严重水肿增厚. 心肌纤维出现不同程度的颗粒变性, 变性纤维浑浊肿胀. 本研究结果为美洲鳗鲡感染嗜水气单胞菌后的病理诊断及其免疫防治提供了参考依据.

[关键词] 嗜水气单胞菌; 人工感染; 美洲鳗鲡; 病理变化

[中图分类号] S 942.5

[文献标志码] A

Pathological Changes of American Eel (*Anguilla rostrata*) Infected by *Aeromonas hydrophila*

CHEN Jin-min^{1,2}, XU Xiao-yun^{1,2}, GUO Song-lin^{1,2}

(1. Fishery College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Anguilla Modern Engineering Research Center of Industrial Technology of the Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To study the pathogenicity and pathological changes of farmed American eels (*Anguilla rostrata*) infected by *Aeromonas hydrophila*, heart, liver, kidney and spleen from dying eels were collected to prepare histopathological slice and staining. The ulcers was observed in the injection site of American eels, while pathological changes were mainly observed in kidney; the glomerular capillary was swollen and the renal capsule cysts were narrow; the renal interstitial was bleeding with large amounts of inflammatory cell infiltration; the kidney tubular showed degeneration or disintegration and the epithelial cells were swell with particles or blisters degeneration, and most of the epithelial cells, protein casts and cell debris were shed into the lumen. Diffuse bleeding and vacuolar degeneration of parenchyma were observed in the liver; some of parenchyma cells were dissolved and disappeared; the hepatic central vein were dilated and filled with erythrocytes; hepatic sinusoid was congestion and hemosiderosis appeared in the liver. The number of lymphocytes reduced significantly and pith was almost disappeared in the spleen; the capsule of the connective tissue was thicken-

ing and bleeding; the spleen was inflammatory edema and necrosis was observed in part of the parenchymal cells with many mesh holes; the stromal arterioles were thicken due to severe interstitial edema. Myocardial fibers showed varying degrees of granular degeneration, and degeneration fibers were cloudy swelling in the heart. The results lay the foundation for the diagnostic pathology and the immune control of the disease caused by *A. hydrophila* in *A. rostrata*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; artificial infection; *Anguilla rostrata*; pathological changes

0 引言

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 通常以腐生状态存在于动物皮肤、鳃、肠道和水体, 自然状态下不会导致鱼体患病, 当外部条件改变时常导致鱼类爆发性败血性传染病, 引起生物医学界的广泛关注^[1]. 在我国养鱼史上, 嗜水气单胞菌是危害种类最多、流行地区最广、流行季节最长、造成的损失最严重的一种鱼类传染病, 呈高发病率和死亡率. 该菌可引起鲤鱼 (*Crucian Carp*) 的竖鳞病^[2], 鲢鳙鱼 (*Aristichthy Snobilis*) 的打印病^[3], 鲟鱼 (*Acipenser Baerii*)^[4]、革胡子鲶 (*Clarias Lazera*)、^[5]斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)^[6]和异育银鲫 (*Allogynogenetic Silver Crucian Carp*)^[7]等鱼类的败血症. 嗜水气单胞菌感染鳊鲃 (*Anguilla*) 引起的疾病包括鳊鲃败血病^[8]、赤鳍病^[9]、烂鳃病和红头病等^[10]. 有关嗜水气单胞菌感染后引起鱼类各种病理变化的报道较多, 但该菌感染鳊鲃后所致的病理学相关研究较少, 仅见该菌攻击欧洲鳊鲃后的相关研究^[11-12]. 本试验拟对嗜水气单胞菌感染美洲鳊鲃 (*Anguilla rostrata*) 后在其体内主要脏器中引起的病理变化进行研究, 以期为该菌所致疾病的致病机理与病理诊断提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 鳊鲃和菌株

20 尾美洲鳊鲃购自集美大学海水养殖场, 平均体重为 15 g. 鳊鲃置于 480 L 水簇箱内, 水温 23 ~ 26 °C, 保持充气, 每天投饵与换水各 2 次, 投饵后 3 h 换水 40%, 暂养 1 周后进行感染. 病原菌分离自发病美洲鳊鲃肝脏, Biolog 生化 and 16S rRNA 基因鉴定均为嗜水气单胞菌^[8].

1.2 主要试剂

① PBS 缓冲液: 甲液, 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.82g 稀释至 500 mL; 乙液, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.61g, 加蒸馏水溶解, 最后稀释至 500 mL. 配制磷酸盐溶液使其 pH 值为 7.2.

② 树脂 (VCD, vinylcyclohexane), 增塑剂 (DER 736, diglycidyl ether of polypropylene glycol), 硬化剂 (NSA, nonenyl succinic anhydride), 催化剂 (DMAE, dimethylaminoethanol).

③ 染色剂: Paul 蓝 (由体积分数分别为 1% 的亚甲基兰、天青 II、硼氢化钠混合配制而成); 0.5% 洋红 (0.5 g 洋红与 100 mL 双蒸水混匀).

④ 梯度 50%、70%、80% 和 90% (体积比) 的丙酮水溶液.

⑤ Spurr 包埋剂的配制, 为了使包埋块质地柔软, 容易修块, 按以下方案配制: VCD 树脂 10.0 g, DER 736 6.0 g, NSA 26.0 g, DMAE 1.0 g, 混匀.

1.3 人工感染和脏器材料的采集

20 尾鳊鲃 (15 g/尾) 均分为 PBS 组和细菌注射组. 用灭菌生理盐水将新培养的细菌稀释为 1.0×10^8 cfu/mL 后于鳊鲃背部肌肉注射 0.1 mL. 观察感染后死亡或濒死鳊鲃的体表症状和解剖病变. 采集鳊鲃的实质脏器 (心、肝、肾和脾) 并制备为 3 mm × 3 mm × 3 mm 的组织块.

1.4 包埋块的制作

将组织切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小后, 经 PBS 清洗后按以下步骤处理: 先用 50%、70% 和 80% 的丙酮系列脱水各 10 min, 再用 90% 的丙酮脱水 2 次, 每次 10 min; 最后用 100% 的丙酮脱水 2

次, 每次 15 min. 然后进行包埋, 当丙酮与 Spurr 包埋剂的体积比分别为 1:1、1:2 和 1:3 时各包埋 60 min; 纯 Spurr 包埋剂包埋 60 min, 连续 2 次; Spurr 包埋剂聚合 9 h.

1.5 玻璃刀的制作

将 2.5 cm × 40 cm 硬质条形玻璃的光滑边沿朝上, 放在制刀机操作台面上, 将其平均划割成 2.5 cm 正方形小块, 逆时针旋转 45°, 摆放于划割器下方, 并将金属托叉放在方块玻璃下方, 用制刀机左侧手轮卡住两个对角线, 拉动划割器, 右手顺时针转动断裂旋钮, 取出玻璃刀.

1.6 病理切片与染色观察

制作好包埋块后, 进行包埋块的修块, 然后用超薄切片机进行切片, 厚度在 0.5 ~ 4 μm 之间. 切好的片子用 Paul 蓝和 0.25% (体积分数) 硼氢化钠的混合液 (体积比 1:1) 染色 1 ~ 2 min, 然后用洋红染色 1 min 左右, 染色好的片子烘干后在显微镜底下进行观察和拍照.

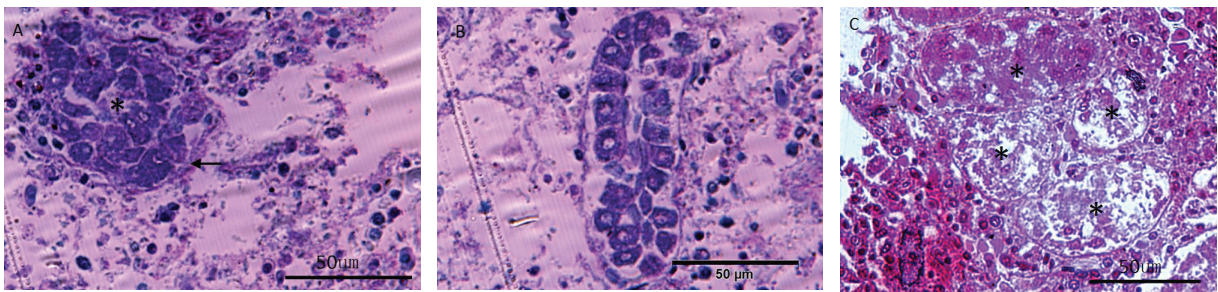
2 结果

2.1 鳗鲡的解剖病理变化

鳗鲡感染 6 h 后未见病变, 24 h 后有 1 尾鳗鲡死亡, 剖检时见肝肾肿大, 部分濒死鳗鲡注射部位溃烂、皮肤脱黏. 感染 72 h 后鳗鲡全部死亡, 死亡鳗鲡注射部位溃烂, 下颌充血, 腹部水肿, 实质器官不同程度出血, 部分死亡鳗鲡鳍条出血.

2.2 肾脏组织病理变化

图 1A 可见美洲鳗鲡肾小球毛细血管肿胀, 血管内皮细胞增生, 部分毛细血管坏死, 肾小囊囊腔狭窄; 肾间质出血, 组织间隙增宽, 有较多的炎性细胞浸润; 间质造血组织疏松、离散, 细胞坏死崩解. 由图 1B 可见鳗鲡肾脏肾小管变性崩解, 上皮细胞细胞肿胀, 颗粒或水泡变性, 大部分上皮细胞脱落进入管腔, 管腔内有蛋白管型和细胞碎片; 肾组织间隙增宽, 炎性细胞浸润, 造血组织疏松、离散, 细胞坏死崩解. 由图 1C 可见多数肾小管的上皮细胞坏死脱落进入管腔、肾小管管腔消失, 肾间质血窦内充满坏死的造血细胞, 周围有淋巴细胞浸润.



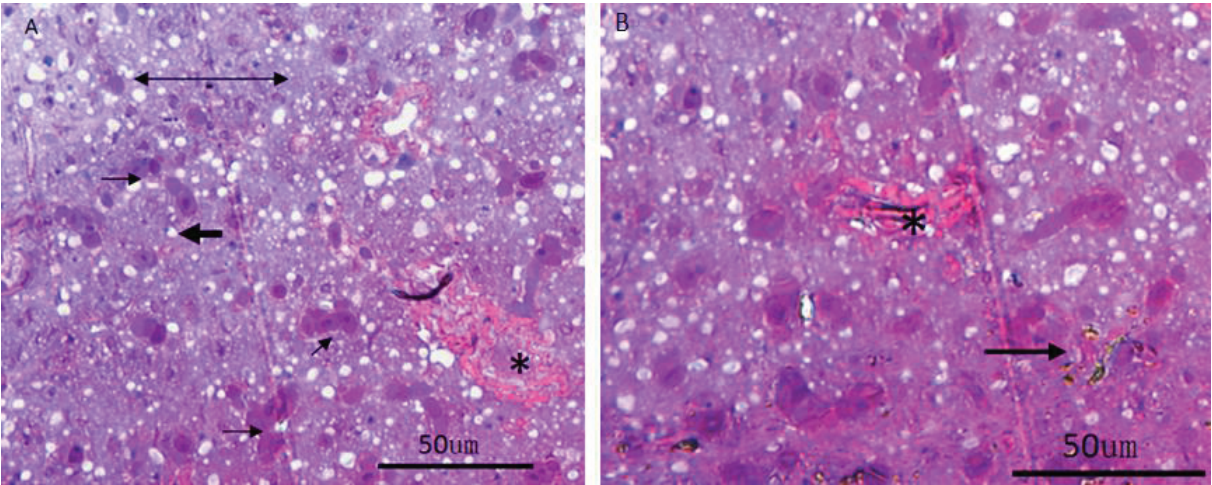
说明: A—肾小球毛细血管内皮细胞肿胀增生, 箭头示肾小囊囊腔狭窄; B—肾小管上皮细胞肿胀, 细胞脱落进入管腔; C—肾小管上皮细胞坏死, 脱落进入管腔.

Notes: A—swelling of the endothelial cell in the glomerular capillary of hyperplasia; arrow: narrow sac in the renal cysts. B—Swelling of epithelial cell in the renal tubular, and epithelial cells shed into the lumen. C—necrosis of epithelial cell in the renal tubular; cells shed into the lumen.

图 1 肾组织病理变化
Fig.1 Pathological changes in the kidney

2.3 肝脏组织病理变化

感染后死亡鳗鲡肝脏弥散性出血, 肝组织间充满红细胞; 肝细胞脂肪变性, 胞浆内充满空泡, 将胞核挤于一侧 (见图 2A). 肝细胞变圆, 核被挤向一侧; 部分肝细胞坏死, 坏死区疏松、淡染, 肝细胞核固缩、碎裂、消失; 有的肝细胞溶解、消失, 形成模糊、无结构的溶解坏死灶, 肝中央静脉扩张, 充盈红细胞 (见图 2A). 肝血窦瘀血, 中央静脉有均质、红染的蛋白样物质残留, 管腔消失, 肝组织间有大量的含铁血黄素沉着 (见图 2B).



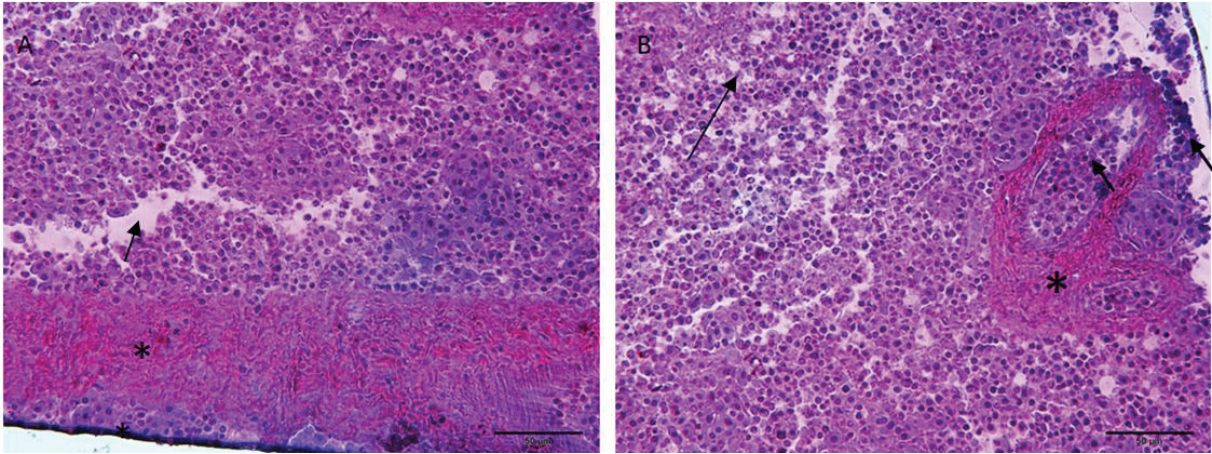
说明:A—肝小叶静脉扩张,充盈红细胞,细箭头示肝脏弥散性出血且肝组织间充满红细胞,粗箭头示肝细胞空泡变性,双箭头示疏松、淡染的肝细胞坏死区;B—肝小叶静脉瘀血,有均质、红染的蛋白样物质残留,箭头示肝组织间沉积的含铁血黄素.

Notes: A—many red blood cells in the dilated vein of liver lobules; thin arrow: diffuse hemorrhage (red blood cells) in the liver; thick arrow: vacuolar degeneration in the hepatocellular; double arrow: necrosis in the hepatocellular (pale staining area).B—vein congestion in the lobules of liver, red stained protein like substances appeared in the lobules; arrow: hemosiderin deposition in the liver.

图 2 肝脏组织病理变化
Fig.2 Pathological changes in the liver

2.4 脾脏的组织病理变化

死亡鳗鲡脾淋巴细胞明显减少,白髓几乎消失,脾脏组织疏松,周围局部坏死,坏死组织细胞核浓缩、碎裂、消失,严重时局部组织坏死崩解;被膜结缔组织增厚、出血(见图 3A).脾炎性水肿,部分实质细胞坏死,出现许多网孔;脾髓几乎被红细胞全部占据,淋巴细胞减少,红白髓难以辨认,脾小体结构不清晰;脾间质小动脉管壁严重水肿增厚,管内充满红细胞、单核细胞和浆细胞,周围有淋巴细胞浸润(见图 3B).



说明:A—脾脏周围局部坏死、纤维化,箭头示脾实质细胞萎缩且间质增宽;B—脾小动脉管壁增厚,短箭头示血管内充满红细胞、单核细胞和浆细胞且周围有淋巴细胞浸润,长箭头示脾实质细胞坏死.

Notes: A—local necrosis and fibrosis in the spleen; arrow: atrophy in the hyperplasia cells and the broadening parenchymal. B—thickening arteriole wall in the spleen; short arrow: many red blood cells, mononuclear cells and plasma cells were filled in the arteriole and surrounded by infiltrating lymphocytes; long arrow: necrosis of hyperplasia cells.

图 3 脾脏组织病理变化
Fig.3 Pathological changes in the spleen

2.5 心脏的组织病理变化

死亡鳊心肌纤维浑浊肿胀, 颗粒变性, 横纹模糊不清; 严重时肌纤维扭曲断裂 (见箭头所示处), 心外膜增厚、疏松水肿、心肌间出血 (见图4)。

3 讨论

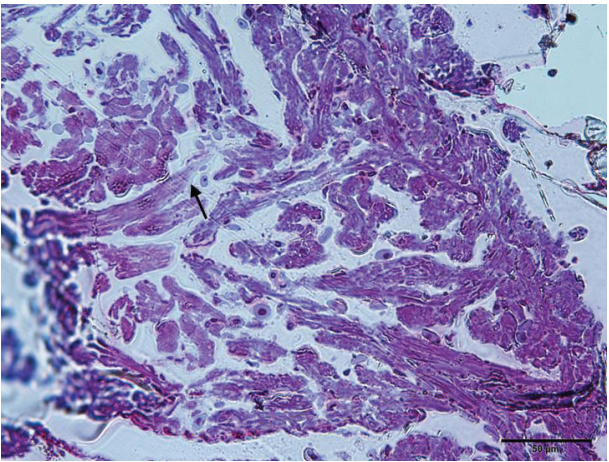
本研究结果表明, 嗜水气单胞菌感染美洲鳊后短时间内可引起多个实质器官的病理变化并导致鳊 72 h 内 100% 死亡。发病美洲鳊的肾脏出现肾小球坏死和肾小管上皮细胞的混浊肿胀, 肾小管上皮细胞的坏死和管腔消失以及肾间质的消失。另外, 病鳊感染部位出现明显的病变。本研究结果与该菌感染欧洲鳊后的病理变化^[12]相似。相关的研究表明, 感染嗜水气单胞菌后鲫鱼全身各组织器官都有病变, 尤其以肝、肾最为严重^[13-14]。在鳊研究方面, 文献 [11]

发现腹腔注射感染嗜水气单胞菌能引起欧洲鳊血管内细胞溶血和肝、肾的血细胞浸润。本研究结果表明, 除肝肾组织的重要损伤外, 感染嗜水气单胞菌的美洲鳊脾脏和心脏也存在一定的病理变化, 这与杂交鳊^[15]和南方鲇^[16]感染该菌后的部分病理研究结果相似。

嗜水气单胞菌是水环境中的常见细菌且仅在环境温度较高的条件下致病^[17], 本试验发现该菌人工感染后毒力很强, 鳊的肾脏病灶极其明显, 这与试验时所用的该菌株肌肉注射感染后成功侵染相关, 由于本研究的水温适于该菌的大量增殖, 故导致美洲鳊显著的病变。该菌一般不具侵染性, 但一旦进入鱼体后即可大量繁殖并导致死亡^[18]。Ventura 等^[19]对感染嗜水气单胞菌的斑点叉尾鲷进行组织病理观察, 结果发现炎症反应主要出现于消化道、皮肤和皮下肌肉内。由于本研究未进行这些部位的相关研究, 故无法将其与本研究进行比较, 但欧洲鳊感染该菌后也发现消化道的病理变化^[11], 故推测美洲鳊也可能有相关病变。

本研究在病变组织的电镜照片中见嗜水气单胞菌侵袭肾脏和肝脏后大量增殖 (电镜图片本文未提供), 造成广泛性出血, 这种出血性病变与该菌引起的败血症密切相关, 是由人工感染导致的侵袭性损伤引起。文献 [20] 指出鳊感染该菌后的肾脏损伤将导致其排泄系统功能紊乱, 鳊体内的代谢产物仅能通过鳃等器官排泄。鳊肝脏组织破坏后将导致其消化系统紊乱, 影响鱼体对营养物质的消化和吸收, 肝元储存、解毒和造血, 而脾脏的损伤则直接影响鳊的细胞和体液免疫功能, 进而降低了鳊的代谢能力和免疫水平。此外, 嗜水气单胞菌产生的各种毒素可致鱼体组织与细胞的损伤, 使鱼体抵御病原菌的能力大大下降, 最终引起鳊的衰竭与死亡。

综上所述, 本研究发现美洲鳊被嗜水气单胞菌感染后其主要病变在肾脏, 并以肾间质坏死疏松和肾小管上皮细胞坏死脱落、肾小管管腔消失为其主要特征。肝脏和脾脏的实质细胞均出现空泡变性, 部分实质细胞坏死, 心脏的肌纤维浑浊肿胀。



说明: 箭头示心肌纤维浑浊肿胀, 颗粒变性, 横纹模糊不清。
Note: Arrow-cloudy swelling, granular degeneration and transverse blurred in the myocardial fiber.

图4 心脏组织病理变化
Fig.4 Pathological changes in the heart

[参 考 文 献]

[1] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟. 双重 PCR 法快速检测欧鳊嗜水气单胞菌 [J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2007, 12(4): 294-300.
[2] 汪开毓. 鲤鱼细菌性败血症的病理学研究 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 257-262.

- [3] 彭书练. 高温季节鲢、鳙鱼暴发性出血病的防治 [J]. 内陆水产, 2001, 26(7): 37.
- [4] 李圆圆, 曹海鹏, 邓璐, 等. 西伯利亚鲟源嗜水气单胞菌致病菌的分离及其全菌苗的免疫效果 [J]. 动物学杂志, 2005, 43(6): 1-9.
- [5] 韦友传, 覃志彪, 韦祖炜. 胡子鲶败血症病原菌的研究 [J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 111-112.
- [6] 李成, 江为民. 斑点叉尾鲟出血病的防治研究 [J]. 内陆水产, 2002(4): 35-36
- [7] 王春燕. 异育银鲫败血病病原体的诊断及毒力和药敏实验 [J]. 生物学杂志, 2009, 19(6): 30-31.
- [8] 杨求华. 养殖鳊鲈致病性气单胞菌的分离与鉴定 [D]. 厦门: 集美大学, 2012: 1-15.
- [9] 杨求华, 郭松林, 关瑞章, 等. 鳊鲈病原性维氏气单胞菌的分离与鉴定 [J]. 生物技术通报, 2012, 28(7): 134-139.
- [10] 郭松林. 鳊鲈细菌性疾病的研究概况 [J]. 科学养鱼, 2011(7): 48-49.
- [11] 郭松林, 冯建军, 熊静, 等. 嗜水气单胞菌在欧洲鳊鲈体内的免疫组织化学定位与病理观察 [J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 494-499.
- [12] 宋铁英, 龚晖, KHOMYAKOVA T I, 等. 嗜水气单胞菌 ZN1 攻击鳊鲈后的组织病理观察 [J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 25-30.
- [13] 王月娜. 南方人工养殖史氏鲟大量死亡的病理学研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- [14] 陈冬香. 斑点叉尾鲟细菌性败血症病原的分离、鉴定与病理学观察 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [15] 徐祥, 李华, 叶仕根, 等. 杂交鲟嗜水气单胞菌病的组织病理学研究 [J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(3): 227-231.
- [16] 朱成科, 周晓扬, 张其中. 南方鲢幼鱼细菌性败血症病原与组织病理 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 360-370.
- [18] 杜雄伟, 于博, 李叶, 等. 剑尾鱼感染嗜水气单胞菌的动态病理变化观察 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34(10): 22-25.
- [19] VENTURA M T, GRIZZLE J M. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Fish Diseases, 1988(11): 397-407.
- [20] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 中山大学出版社, 2011.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 张子平)