

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)鮠爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染的动态病理学及病原分布研究*

杜宗君¹ 耿毅² 汪开毓² 廖雨婷¹ 周赵英¹
黄小丽² 陈德芳²

(1. 四川农业大学水产系 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物医学院 雅安 625014)

提要 采用病理形态学方法与免疫组化法进行了黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)鮠爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染的动态病理学与病原分布研究。结果表明,感染鱼主要临床特征为游动缓慢,旋游,体表出血,腹部膨大,腹腔内充有淡黄色或含血的腹水,肝、脾与肾肿大,出血;病理组织学上,感染后8—12h,肝细胞空泡变性和间质性肾炎;24h后肝出现局灶性坏死,肾小管上皮变性和更严重的间质性肾炎,脾出血和淋巴细胞坏死;48h后,肝、脾、肾坏死更严重,致感染鱼死亡。感染后8h,在肝脏检测到病原菌阳性信号,12h后,在肝、肾、脾中检出阳性信号,48h后,在肝、肾、脾、心、脑、鳃、肠道等都检出阳性信号,表明鮠爱德华氏菌腹腔注射感染黄颡鱼首先侵袭肝、肾、脾,然后是心脏、脑、鳃、胃肠等。

关键词 鮠爱德华氏菌;黄颡鱼;动态病理;侵染规律

中图分类号 S941.42

鮠爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)细菌。爱德华氏菌属包括鮠爱德华氏菌、迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)和保科爱德华氏菌(*E. hoshinae*)共3个种(Holt *et al.*, 1994),其中鮠爱德华氏菌和迟钝爱德华氏菌是严重危害水产养殖的病原菌。自Hawke(1979)在美国首次发现*E. ictaluri*感染斑点叉尾鮠以来,已在澳大利亚、泰国、越南、中国相继有*E. ictaluri*感染鱼类发病的报道(Austin *et al.*, 1999; Crumlish *et al.*, 2002; 邓显文等, 2008; Takamitsu *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2013),感染对象包括斑点叉尾鮠、云斑鮠、黄颡鱼、鳊、虹鳉和南方鲇等,其发病率和死亡率均较高,严重影响水产养殖业的发展。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),俗称“黄腊丁”,

属于鲶形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*)鱼类,是我国淡水中分布较广的底层经济鱼类,其肉质细嫩、少刺、味鲜美、营养丰富、经济价值极高,在我国已形成了较大的养殖规模(丁瑞华, 1994)。但随着养殖规模扩大和养殖密度提高,疾病危害日益严重,特别是鮠爱德华氏菌感染症(叶仕根, 2008; Geng *et al.*, 2010),又称“红头病”,具有传染性强、发病率高和死亡率高等特点,给广大养殖户造成严重的经济损失。深入研究鮠爱德华氏菌对黄颡鱼的感染机制,对该病的诊断、预防、治疗及疫苗的研制都具有重要意义。本研究旨在通过人工感染方式研究黄颡鱼鮠爱德华氏菌感染的病理损伤过程、损伤特点及其与病原分布的关系,为黄颡鱼鮠爱德华氏菌感染症的诊断与防治提供理论依据。

* 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目,IRTO848号;四川省“十二五”水产育种攻关项目,2012—2014;四川省教育厅重点项目资助,08ZA082号。杜宗君,副教授, E-mail: duzongjun@sina.com

通讯作者:耿毅, E-mail: gengyisicau@126.com

收稿日期:2012-02-26, 收修改稿日期:2012-05-27

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 黄颡鱼鮰爱德华氏菌 CNHYC01 (*E. ictaluri* CNHYC01)由四川农业大学动物医学院水生动物病害研究室分离、鉴定并保存。

1.1.2 试验鱼 无病史的黄颡鱼, 体重(45.0 ± 4.7)g, 于水族箱内暂养2周, 确认健康后用于试验。

1.1.3 主要试剂 脑心浸液培养基(BHI, 北京欣经科生物技术有限公司), 免疫组化试剂盒, DAB 显色剂以及赖氨酸处理载玻片(武汉博士德); 兔抗 *E. ictaluri* 高免血清(自制)。

1.2 方法

1.2.1 人工感染 *E. ictaluri* 接种 BHI 肉汤, 28 120r/min 培养 48h, 用生理盐水调整细菌浓度为 2.0×10^6 cfu/mL。160 只黄颡鱼随机分平均为 2 组。感染组每尾腹腔注射 0.2mL 菌液, 对照组注射 0.2mL 生理盐水。

1.2.2 临床症状与剖解病变观察 注射后详细观察感染鱼的临床表现, 并分别在 0、2、4、8、12、16、24、36、48、72、96h, …… , 直至感染鱼发生自然死亡, 试验组与对照组分别同时随机取 5 尾鱼, 剖解观察内脏器官眼观病变, 并取肝、肾、脾、胃、肠、鳃、心等器官分别用 4%多聚甲醛及 10%中性福尔马林固定备用。

1.2.3 病理组织学观察 取 10%中性福尔马林固定的肝、肾、脾、胃、肠、鳃、心脏等组织, 石蜡包埋切片, H.E 染色, 光学显微镜观察。

1.2.4 免疫组化法检测 *E. ictaluri* 在鱼体内分布 取 4%多聚甲醛固定的肝、肾、脾、胃、肠、鳃、心脏等组织, 石蜡包埋切片, 按试剂盒使用说明书进行 SABC 染色, 光学显微镜观察。免疫组化结果判定标准参考蔡文琴等(1994)方法判定: 无棕黄色颗粒的判为阴性, 棕黄色颗粒在组织中零星分布且少于 5%的判为弱阳性, 棕黄色颗粒在组织中零星分布比例为 5%—50%为阳性, 明亮的棕黄色颗粒在组织中分布比例大于 50%或片状染色为强阳性。

2 结果

2.1 黄颡鱼感染 *E. ictaluri* 的临床症状与剖解变化

感染 8—24h 后, 感染鱼体色加深, 采食明显减少, 游动缓慢, 部分鱼出现旋游症状。24—72h 鱼体表开始出现褪色的现象, 随病程发展感染鱼在下颌出现出血点(图 1a), 腹部轻微膨大, 腹腔内充有淡黄

色或含血的腹水, 肛门红肿, 挤压腹部有含血液体流出。剖解可见肝、肾、脾肿大, 出血。72h 后病变最为严重, 口腔、下颌、腹部、肛门及鳍条基部明显充血、出血; 部分感染鱼头部皮肤坏死, 溃烂, 形成溃疡(图 1b); 肝肿大, 出血呈花斑状(图 1c); 胃扩张积液, 胃壁点状出血(图 1d)。

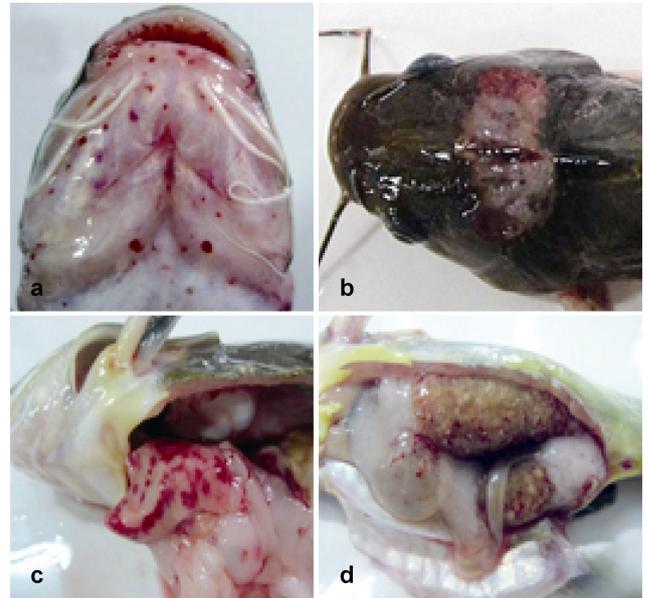


图 1 黄颡鱼感染鮰爱德华氏菌剖检病变

Fig.1 Necropsy lesions of yellow catfish infected with *E. ictaluri*
a. 口腔及下颌出血; b. 头部溃疡; c. 肝肿大、出血, 呈花斑状; d. 胃积液, 胃壁出血

2.2 黄颡鱼感染 *E. ictaluri* 的病理组织学变化

肝脏: 8—12h, 肝小叶中央静脉周围肝血窦淤血明显, 其周围肝细胞空泡变性。12—24h, 肝血窦与中央静脉淤血更严重, 局灶性肝细胞空泡变性, 肝血窦内淋巴细胞增生。24—48h, 肝细胞广泛性严重气球样变, 肝血窦受压变狭窄, 局部肝细胞坏死。72h 后, 可见肝细胞坏死, 形成坏死灶(图 2a), 伴有大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润。

肾脏: 12h, 肾小球肿大, 肾小管上皮细胞颗粒变性, 肾间质出血, 少量巨噬细胞和中性粒细胞浸润炎症细胞浸润, 表现为轻微间质性肾炎。24h 后, 部分肾小囊内出现红染的渗出液, 肾小管上皮细胞空泡变性, 与间质性肾炎更为严重, 间质出血, 间质造血组织坏死, 淋巴细胞、巨噬细胞和中性白细胞浸润(图 2b)。72h 后, 肾间质细胞坏死, 甚至溶解、消失, 巨噬细胞或单核细胞浸润, 部分区域网状内皮细胞增生; 肾小管上皮细胞空泡变性而崩解, 细胞碎片脱落

于管腔内。

脾脏: 12—24h, 脾脏充血、出血, 被膜水肿增宽, 淋巴细胞数量减少, 少量含铁血黄素沉积。48h, 脾髓内血液充盈, 白髓数量减少、体积缩小, 淋巴细胞坏死, 数量进一步减少(图 2c)。72h 后, 脾脏严重出血, 淋巴细胞坏死, 在红髓和白髓均可见散在的坏死灶, 脾髓内淋巴细胞显著减少, 大量中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 并出现网状内皮细胞增生。

心: 24—48h, 心外膜下水肿, 淋巴细胞与中性粒细胞浸润; 心肌纤维颗粒变性, 横纹消失, 肌间隙少量淋巴细胞浸润。72h 后, 心肌出血, 心肌细胞变性、坏死, 甚至肌纤维溶解、断裂呈索状或团块状(图 2d), 淋巴细胞、巨噬细胞浸润。

胃、肠: 48h, 黏膜上皮局灶性变性、脱落, 固有

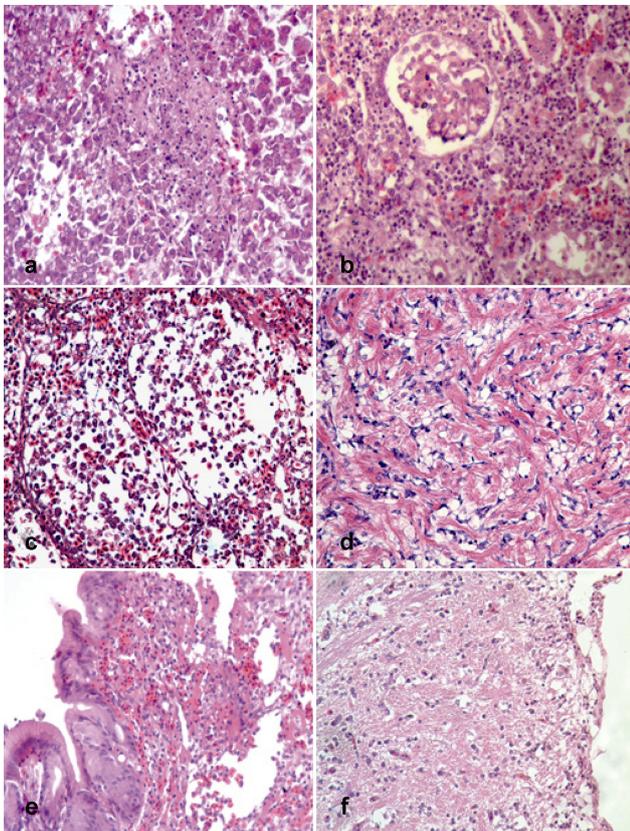


图2 黄颡鱼感染鲷爱德华氏菌的组织病理学变化 (×400, H.E)

Fig.2 Histopathological changes of yellow catfish infected with *E. ictaluri* (×400, H.E)

a. 感染后 48h, 肝细胞变性、死灶; b. 感染后 24h, 肾小管上皮变性、坏死和间质性肾炎; c. 感染后 48h, 脾脏出血, 淋巴细胞数量明显减少; d. 感染后 48h, 心肌纤维颗粒与空泡变性; e. 感染后 72h, 肠粘膜上皮细胞坏死脱落, 固有膜与粘膜下层出血, 炎症细胞浸润; f. 感染后 48h, 脑基质水肿, 脑膜游离, 炎症细胞浸润

层少量炎症细胞浸润, 肌层肌纤维变性水肿肌间隙增宽。72h, 粘膜上皮细胞严重变性, 大量坏死脱落(图 2e); 固有层、黏膜下层毛细血管扩张淤血, 出血, 炎症细胞浸润, 肌层肌纤维变性。

脑: 表现为非化脓性脑炎: 48h, 脑膜水肿, 少量淋巴细胞浸润(图 2f); 脑基质毛细血管淤血, 周间隙增宽, 局部区域见胶质细胞增生, 形成胶质结节。72h 后, 脑基质严重水肿, 结构疏松, 呈海绵状, 胶质细胞增生; 神经元细胞固缩、坏死, 可见卫星现象与噬神经元现象。

鳃: 48h, 鳃小片毛细血管扩张、充血, 呼吸上皮细胞肿胀, 部分鳃小片远端上皮细胞增生。72h 后, 鳃小片上皮增生更为明显, 并发生坏死, 淋巴细胞和巨噬细胞等炎症细胞浸润, 鳃基部血管扩张充血, 出血。

2.3 黄颡鱼感染 *E. ictaluri* 后组织中病原菌细菌分布

感染后 8h, 在肝脏内出现弱细菌阳性信号(图 3a); 12h, 在肾脏肾小管上皮细胞、肾间质(图 3b)以及脾脏脾血窦检测到少量细菌阳性信号。48h, 在心脏肌纤维间隙检测到大量阳性信号存在(图 3c); 48h, 在胃肠粘膜上皮细胞出现弱阳性信号, 脑膜的毛细血管内和脑实质神经细胞内(图 3d), 以及鳃小片上皮细胞和基部毛细血管内检测到阳性信号, 而肝、肾、脾、心组织出现大量阳性信号。72h 后, 上述各组织逐渐可见较强阳性信号。阴性对照组均无阳性信号。

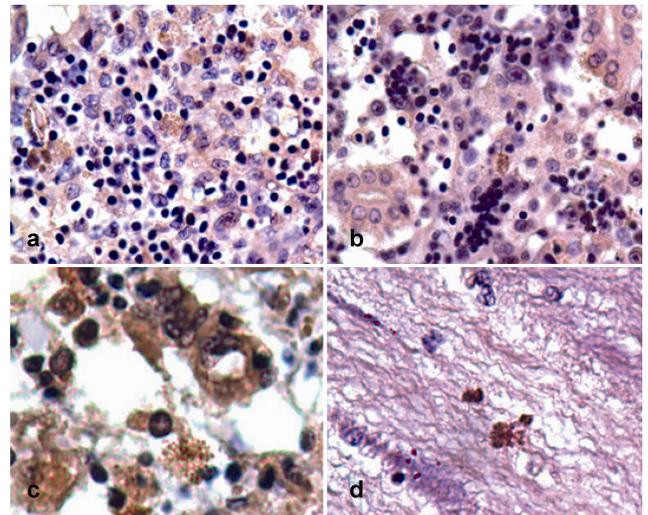


图3 黄颡鱼感染鲷爱德华氏菌器官组织中细菌的分布 (×400)

Fig.3 Distribution of bacteria in organs and tissues after yellow catfish infected with *E. ictaluri* (×400)

a. 阳性信号位于肝细胞胞浆内; b. 阳性信号位于肾小管上皮细胞胞浆内; c. 阳性信号位于心肌间隙; d. 阳性信号位于脑神经细胞内

3 讨论

黄颡鱼鲶爱德华氏菌感染症是近年来暴发频繁, 严重危害黄颡鱼养殖的重要细菌性疾病, 自叶仕根(2008)率先报道以来, 该病在我国四川、广东、湖北、湖南、河南和重庆等省市皆有发生(徐进等, 2009; 耿毅等, 2010)。尽管 *E. ictaluri* 作为斑点叉尾鲶的重要病原菌在斑点叉尾鲶的感染机制方面已进行了较多的研究(Woo *et al.*, 1999), 但对于黄颡鱼的感染与损伤特点还未见报道。本试验在人工感染建立病理模型的基础上, 进行了 *E. ictaluri* 感染黄颡鱼的病理损伤过程与损伤特点的研究, 发现黄颡鱼 *E. ictaluri* 感染在临床上表现为败血症和红头病两种类型与黄颡鱼自然感染 *E. ictaluri* 的临床特征(Ye *et al.*, 2009; 耿毅等, 2010)相似, 前者主要为腹部膨大, 体表明显充血、出血, 腹腔内大量含血的或淡黄色的液体, 肾脾显著肿大, 呈暗红色, 肝肿大呈苍白色或由于充血与出血呈斑驳状; 后者以头顶部充血、出血、发红, 皮肤及颅骨溃烂, 形成开放性溃疡为特点。

在病理组织损伤上, 黄颡鱼 *E. ictaluri* 感染前期主要以肝、肾实质细胞变性以及脾脏淋巴细胞数量减少为主; 72h 后, 肝、肾、脾散在坏死灶, 非化脓性脑炎。96h 后, 实质器官坏死更加严重, 脾网状内皮细胞和鳃小片上皮细胞增生明显, 表明 *E. ictaluri* 可致黄颡鱼多组织器官损伤, 但以肝、脾、肾的损伤出现时间最早, 且病变最严重, 是其损伤主要的靶器官, 感染鱼最终因全身多组织、器官结构破坏, 引起多器官功能衰竭而死亡。其病理损伤特点与 *E. ictaluri* 感染斑点叉尾鲶等的病理损伤特点相似(Newton *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1993; Luke *et al.*, 2006)。作者的研究中除了发现脾脏淋巴细胞的坏死, 数量减少外, 也发现淋巴细胞凋亡率明显升高的现象(另文报道), 这与副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌感染对斑节对虾(张朝霞等, 2000)、溶藻弧菌对大黄鱼(金珊等, 2004)的损伤相似。由于淋巴细胞凋亡, 进一步引起鱼体淋巴细胞(T、B 淋巴细胞)数量减少、活性降低, 从而造成机体的体液免疫和细胞免疫功能受损, 这可能在病原菌在感染鱼体内的扩散, 导致多组织器官的损伤, 最终引起感染鱼死亡方面具有重要意义。

免疫组化法对黄颡鱼感染 *E. ictaluri* 后菌体在组织内分布情况检测发现, 病原菌在脾脏、肾脏、肝脏、心脏、肠道、脑和鳃中都能检测到阳性信号, 尤以脾脏、肾脏和肝脏的阳性信号最强, 表明 *E. ictaluri* 对

机体多组织、器官具有侵染性, 但脾脏、肾脏和肝脏是其侵染的重要靶器官。与此同时, 免疫组化检测阳性信号出现在这些组织、器官的细胞间隙、细胞内以及巨噬细胞内, 表明其为一种兼性胞内寄生菌, 这与 Booth 等(2006)的研究结论一致。病理组织学观察与免疫组化检测结果相比较, 不难发现, 病理损伤程度与免疫组化检测的中阳性信号的有无与强弱表现出较高一致性, 其病理损伤与病原菌分布数量呈明显的正相关。初期, 在肝脏、肾脏、脾脏器官首先表现出病理变化, 同时也在这些器官最先检测到了微弱的阳性信号, 而当病情发展到后期, 组织、器官的病理损伤较为严重时, 也都同时检测到了较强的阳性信号。当然, 也并非在所有的病变区域都检测出了病原菌的阳性信号, 究其原因可能与病原菌产生的诸如溶血素等外毒素的作用有关。

参 考 文 献

- 丁瑞华, 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 449—454
- 邓显文, 谢芝勋, 刘加波等, 2008. 广西斑点叉尾鲶爱德华氏菌的分离鉴定. 广西农业科学, 39(2): 231—235
- 叶仕根, 2008. 黄颡鱼“红头病”一种新的细菌性传染病. 科学养鱼, 23(1): 56—57
- 张朝霞, 王 军, 2000. 斑节对虾病原菌胞外产物的致病性研究. 海洋学报, 22(5): 94—99
- 金 珊, 郑天伦, 王国良等, 2004. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性. 中国兽医学报, 24(5): 439—441
- 耿 毅, 汪开毓, 范方玲等, 2010. 养殖黄颡鱼爱德华氏菌的分离鉴定. 海洋与湖沼, 41(1): 61—67
- 徐 进, 罗晓松, 曾令兵, 2009. 黄颡鱼鲶爱德华氏菌的分离鉴定及其致病性研究. 淡水渔业, 39(6): 47—53
- 蔡文琴, 王伯澆, 朱新立等, 1994. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 36—59
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer Verlag, Germany: 320—338
- Baldwin T J, Newton J C, 1993. Pathogenesis of enteric septicemia of channel catfish, caused by *Edwardsiella ictaluri*: bacteriologic and light and electron microscopic findings. Journal of Aquatic Animal Health, 5: 189—198
- Booth N J, Elkamel A, Thune R L, 2006. Intracellular replication of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish macrophages. Journal of Aquatic Animal Health, 18: 101—108
- Crumlish M, Dung T, Turnbull J *et al.*, 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Fish Diseases, 25: 733—736
- Geng Y, Li C W, Wang K Y *et al.*, 2013. Isolation and characterization of *Edwardsiella ictaluri* from southern catfish, *Silu-*

- rus soldatovi meridionalis*, (Chen) cultured in China. Journal of the World Aquaculture Society, 44: 273—281
- Geng Y, Wang K Y, Chen D F *et al*, 2010. Isolation and characterization of *Edwardsiella ictaluri* from cultured yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). The Israeli Journal of Aquaculture (Bamidgeh), 62: 105—115
- Hawke J P, 1979. A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 36: 1508—1512
- Holt J, Krieg N, Sneath P *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edn. Baltimore: Ed Williamse Wilkins, 544—551
- Luke R I, Alison R G, Deborah D C *et al*, 2006. Mortality and pathology in brown bullheads *Ameiurus nebulosus* associated with a spontaneous *Edwardsiella ictaluri* outbreak under tank culture conditions. Diseases of Aquatic Organisms, 70: 219—225
- Newton J C, Wolf L G, Grizzle J M *et al*, 1989. Pathology of experimental enteric septicaemia in channel catfish following immersion exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Fish Diseases, 12: 335—347
- Takamitsu S, Takashi K, Motohiko S *et al*, 2008. Outbreaks of *Edwardsiella ictaluri* infection in ayu *Plecoglossus altivelis* in Japanese rivers. Fish Pathology, 43: 152—157
- Woo P T K, Bruno D W, 1999. Fish Diseases and Disorders (Volume 3), Viral, Bacterial and Fungal Infections, Vol.3. CABI Publishing, 493—498
- Ye S, Li H, Qiao G *et al*, 2009. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Aquaculture, 292: 6—10

DYNAMIC PATHOLOGY AND PATHOGEN DISTRIBUTION STUDY ON YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* INFECTED WITH *EDWARDSIELLA ICTALURI*

DU Zong-Jun¹, GENG Yi², WANG Kai-Yu², LIAO Yu-Ting¹,
ZHOU Zhao-Ying¹, HUANG Xiao-Li², CHEN De-Fang²

(1. Department of Aquaculture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014;
2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014)

Abstract Using pathologic and immunohistochemical method, we studied the dynamic pathology and pathogen distribution of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) that infected with *Edwardsiella ictaluri* by intraperitoneal injection. Syndromes of infected fish included slowed / twisted swimming, external / internal bleeding / swollen, yellowish / bloody ascites in the abdominal cavity, etc. Histopathologically, after 8—12h of infection, vacuolar degeneration and interstitial nephritis were observed in liver and the kidney; after 24h, focal necrosis appeared in liver, renal tubular epithelial cells degeneration and more severe interstitial nephritis were founded in kidney, followed by hemorrhages on spleen and lymphocyte necrosis; after 48h, liver, spleen, and kidney showed more serious necrosis, causing death of infected fish. *E. ictaluri* could be detected positive in the liver in 8h of infection, and in the liver, kidney and spleen in 12h, and extended into heart, brain, gills and gut in 48h. It revealed that the pathogen invaded the liver, kidney, spleen first, and then the heart, brain, gills and gastrointestinal tract.

Key words *Edwardsiella ictaluri*; yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*; dynamic pathology; invasion procedure