

文章编号:1004-7271(2004)02-0115-06

高体革鲮链球菌出血性败血症病原 与组织病理的初步研究

邱军强¹, 杨先乐¹, 李 怡¹, 薛 晖¹, 谭洪新², 罗国芝²

(1. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090;

2. 上海水产大学设施渔业研究所, 上海 200090)

摘 要: 从某养殖场患出血性败血症的高体革鲮(*Scortum bacoo*)中分离到一株细菌, 人工回染健康高体革鲮证明该菌株为其致病菌, 并具较强毒力, LD₅₀为 3.48×10^5 CFU。该菌株在形态、多项重要的生理生化指标与海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)相同, 因此可初步鉴定该菌株即为溶血性海豚链球菌。病理学观察表明该菌株主要引起高体革鲮的肝肾病变, 药敏试验表明该菌株对红霉素、复合磺胺、头孢哌酮等多种抗生素敏感。

关键词: 高体革鲮, 出血性败血症, 病原, 组织病理

中图分类号: S941.4 文献标识码: A

Preliminary study on the pathogen and histopathology of haemorrhagic blood poisoning in *Scortum bacoo*

QIU Jun-qiang¹, YANG Xian-le¹, LI Yi¹, XUE Hui¹, TAN Hong-xin², LUO Guo-zhi²

(1. Fishery Pathogen Collection of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Research Institute of Engineering-Aquaculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A bacterium strain was isolated from the haemorrhagic blood poisoning of *Scortum bacoo* in an aquaculture farm. The strain was confirmed to be the pathogen of the disease by artificial infection test. Its LD₅₀ is 3.48×10^5 CFU having high toxicity. According to the results of morphological features, physiological and biochemical characteristics were very similar to those of *Streptococcus iniae*, the strain was identified as haemolytic *Streptococcus iniae*. Meanwhile, the pathology and drug sensitivity tests were conducted. The bacteria harmed primarily the fish's liver and kidney and were sensitive to some antibiotics, for example, erythromycin, compound sulfonamide and cefoperazone.

Key words: *Scortum bacoo*; haemorrhagic blood poisoning; pathogen; histopathology

高体革鲮(*Scortum bacoo*), 又名宝石鲈、宝石鱼; 属鲈形目 Perciformes、鲷科 Theraponidae、革鲮属 *Scortum*。宝石鲈是遍布于澳洲的著名淡水鱼, 商品价值很高, 其肌间无刺、肉细嫩、内脏占的比例小、品质优良, 营养价值高。我国自 2002 年从澳洲引进该鱼, 养殖试验证明, 该鱼具有生长快、食性杂、耐低

收稿日期: 2004-02-25

基金项目: 上海市科委西部开发项目[(2001)013258034]

作者简介: 邱军强(1979-), 男, 江西临川人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物医学。

通讯作者: 杨先乐(1948-), 男, 湖南桃源人, 教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物疾病及药物。Tel: 021-65710870, E-mail: xlyang

@shfu.edu.cn

氧、适应性强等优点^[1]。

2003年在某养殖场宝石鲈苗种培育阶段发生一种严重病害,其主要症状为:眼球突出,腹部肿胀,肛门突出、红肿,剖解后可见血性腹水,肝脏肿大、土黄色、质脆,脾脏酱紫色、体积偏大,肠内无食物、弹性差、易断,胆囊肿大,鳃发白。尾鳍、背鳍、尾鳍基部发红。病鱼规格为20~45g,死亡率高达50%~90%。本文对该病的病原、病因及病理的初步研究结果进行报导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2003年3~5月,先后3次在某养殖厂采样。采集症状明显的宝石鲈共30余尾,24h内剖检。

1.2 细菌分离

无菌操作剪取症状典型的濒死鱼肝、胆、肾、肌肉、腹水等组织(取健康鱼相应组织作对照)接种普通营养琼脂培养基,28℃恒温培养18~24h,挑单菌落,经纯化培养后4℃保存于斜面备用。

1.3 致病性试验

体重为20g左右的健康活泼宝石鲈暂养在水族箱中,自来水充分曝气,连续充气,温度保持在28℃左右,暂养5d,期间不投饵。将1.2分离到的菌株经 $2.32 \times 10^5 \sim 2.32 \times 10^7$ CFU/mL的梯度稀释后,肌肉注射每尾0.2 mL,对照组为注射等量无菌生理盐水,每组10尾。发现死鱼立即收集,并对濒死鱼进行病原分离,方法同1.2。

1.4 细菌鉴定

1.4.1 形态学观察

以24h纯培养的菌落革兰氏染色,油镜下观察菌体形态特征。

1.4.2 理化特性试验

按照《常用细菌系统鉴定手册》^[2]及《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)^[3]的方法进行,运动性试验采用半固体琼脂穿刺法。

1.5 病理切片观察

取具典型发病症状的濒死病鱼的肝、胆、肾、肠、肌肉等组织块(取健康鱼相应组织为对照),按龚志锦^[4]的方法 Bouin 氏液固定,石蜡包埋,切片厚度8~10 μ m,苏木精-伊红(H-E)染色。OLYMPUS显微镜观察和拍片。

1.6 药敏试验

普通培养基上细菌涂布后将药敏纸片(上海市卫生防疫站产品)贴于培养基表面,28℃恒温培养48h,测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 细菌的分离培养

从自然发病鱼体中分离到同一种菌株,编号为XC01。

2.2 致病性试验

最高浓度组在试验开始后的40h后即出现死亡,72h后全部死亡。对照组在168h内无死亡。人工感染发病鱼眼球突出,腹部肿胀,肛门突出、红肿,剖解后可见血性腹水,肝脏肿大、土黄色,尾鳍、背鳍、尾鳍基部发红等。与自然发病鱼具有极为相似的临床症状。人工感染后各组鱼死亡情况见表1。

表 1 XC01 株人工感染试验结果

Tab.1 The results of artificial infection of strain XC01

组别	试验尾数	注射剂量($\times 10^5$ CFU)	死亡尾数	死亡率(%)
对照	10	生理盐水	0	0
	10	0.464	2	20
试验	10	4.64	6	60
	10	46.4	10	100

根据以上结果,计算 XC01 的 LD_{50} 为 3.48×10^5 CFU。证明该菌株为其致病菌,并具较强毒力。

2.3 组织病理观察

发病鱼主要表现为肝肾受损较严重。肝细胞排列紊乱,部分肝细胞失去正常结构(图版-1),而且部分区域常有大量粒细胞浸润,部分肝细胞坏死、解体,形成多处坏死病灶(图版-2)。肠在发病早期发生轻度病变时,固有膜、肌层和浆膜结构较完整,仅少数粘膜上皮脱落到肠腔中(图版-3);发病后期,不仅粘膜上皮脱落,固有膜结构断裂,粘膜顶部细胞发生崩解、脱落,肠腔中可见大量脱落的肠上皮及嗜酸性物质(图版-4)。肌细胞病变不明显,仅发现少数肌纤维断裂折叠(图版-5)。肾脏结构受损也较严重,不仅肾小球肿与肾小囊界限不明显,部分肾小管解体,细胞内颗粒释入管腔中(图版-6)。

2.4 病原菌的鉴定

2.4.1 形态观察

菌株 XC01 在营养琼脂上菌落为半透明,边缘整齐,有光泽,菌落直径约 1mm。不产芽孢。细菌纯化后革兰氏染色阳性,在 100 倍油镜下呈单球、双球或短链状。

2.4.2 生理生化鉴定

经生理生化特征测定,好氧或兼性厌氧,不产芽孢,氧化酶阳性,接触酶阴性,pH9.6 的碱性条件下不见生长,DNA 的 G + C 含量 $> 30\text{mol}\%$ 且 $< 50 \text{mol}\%$ 。对照常见细菌系统鉴定手册,XC01 菌株与海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)的生化指标基本相符(表 2)。

表 2 分离菌株生理生化特征

Tab.2 The physiological and biochemical characteristics

特性	XC01	海豚链球菌 (<i>S. iniae</i>)	特性	XC01	海豚链球菌 (<i>S. iniae</i>)
G 染色	+	+	D-甘露醇	+	+
pH4.5 生长	-	/	侧金盏花醇	-	/
pH9.6 生长	-	-	ONPG	+	/
10℃ 生长	-	d	柠檬酸盐	-	/
45℃ 生长	-	-	硝酸盐还原	-	/
运动	-	/	精氨酸利用	+	/
接触酶	-	/	精氨酸双水解酶	-	d
氧化酶	+	/	鸟氨酸脱羧酶	-	/
无糖对照	-	/	精氨酸脱羧酶	-	/
鼠李糖	+	/	氨基酸脱羧酶对照	+	/
甘露糖	+	+	赖氨酸脱羧酶	-	/
木糖	-	/	尿素	+	/
菊糖	-	-	需要有机生长因子	+	/
蕈糖	+	/	产 H_2S	-	/
麦芽糖	+	/	DNA 酶	+	/
乳糖	-	-	马尿酸	-	/
棉籽糖	-	-	七叶灵	+	+
D-半乳糖	+	/	乙酰氨	-	/
D-果糖	+	/	V-P 反应	-	d
蔗糖	+	/	β -溶血	+	+
山梨醇	-	/			

注:- 反应阴性;+ 反应阳性;d 反应不定;/ 文献中无记载。

2.4.3 药敏试验

结果表明该菌株对红霉素、庆大霉素、头孢唑啉、氟哌酸、复合磺胺、妥布霉素、头孢哌酮、头孢噻亏、羧苄青霉素、头孢三嗪、呋喃妥因、氧哌嗪青霉素、苯唑青霉素等 13 种药物高度敏感(S);对头孢呋新中度敏感(M);对氨苄青霉素及利福平等 2 种药物不敏感(R);对青霉素、丁胺卡那霉素、四环素、头孢他啶、卡那霉素、链霉素及氯霉素等 7 种药物低度敏感(I)(表 3)。

表 3 分离菌株药敏试验结果

Tab.3 Sensitivity of the isolated bacteria to the 23 chemotherapeutants

药物	结果	药物	结果	药物	结果
利福平(Lifuping)	R	头孢唑啉(Cefazolin)	S	氟哌酸(Norfloxacinum)	S
四环素(Tetracyclinum)	I	头孢呋新(Cefuroxime)	M	妥布霉素(Tobramycin)	S
氯霉素(Chloramphenicolum)	I	头孢他啶(Ceftazidime)	I	丁胺卡那霉素(Vancomycine)	I
青霉素 G(Benzyl penicillinum G)	I	头孢三嗪(Ceftriaxone)	S	庆大霉素(Gentamycinum)	S
氨苄青霉素(Ampicillin)	R	头孢哌酮(Cefoperazone)	S	卡那霉素(Kanamycinum)	I
苯唑青霉素(Oxacillin)	S	头孢噻肟(Cefotaxime)	S	链霉素(Streptomycinum)	I
羧苄青霉素(Carbenicillin)	S	红霉素(Erythromycinum)	S	复合磺胺(Compound sulfonamide)	S
氧哌嗪青霉素(Ciprofloxacin)	S	呋喃妥因(Nitrofurantoin)	S		

注 S 高度敏感, M 中度敏感, I 低度敏感, R 不敏感

2.5 药物防治

根据药敏试验结果,在发病期采用磺胺五甲氧嘧啶与甲氧苄氨嘧啶按 4:1 混合投喂,第一天按 200 mg/kg 鱼剂量投喂,第二天开始以 100 mg/kg 鱼剂量投喂,连续投喂 7d。同时添加中草药大黄、黄柏、黄芩(按 5:3:2 的量配比)、穿心莲与板兰根(前三种药物与后两种药按 3:1:1 的量配比),总中草药添加量为饲料量的 1%。这一防治方案对未发病及轻度发病鱼有明显的效果。

3 讨论

3.1 病原的确定

从发病宝石鲈中分离到的 XC01 菌株,经动物试验证明对宝石鲈具有很强的致病性,是引起该次宝石鲈发病的病原菌。本试验分离到的 XC01 菌株除 10℃ 生长、精氨酸双水解酶及 V-P 反应三项指标与文献中记载的(反应不定)略有不同以外,其菌株形态特征及多项生理生化指标的测定结果,与《常用细菌系统鉴定手册》及《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)中溶血性海豚链球菌的描述极为一致。因此,可以确认本试验分离的 XC01 菌株为溶血性海豚链球菌。

3.2 病原菌的毒性及防治方法

链球菌的感染范围很广,不同的链球菌感染的宿主不同,从国外报道的感染鱼的链球菌可以看出,大多属于海豚链球菌和无乳链球菌(*Streptococcus agalaciate*)^[5,6]。本试验分离的 XC01 菌株——溶血性海豚链球菌即为其中之一。链球菌病现已成为世界水产养殖巨大经济损失的主要疾病,该病所引起的损失金额估计每年超过 1.5 亿美元。链球菌病最初主要在日本造成危害,而现在在世界各地广泛肆虐,并严重危害各种淡水养殖鱼类、半咸水养殖鱼类和海水养殖鱼类^[7,8]。本试验发现该菌株具有 β 溶血,与国外报道的特征相同。鱼链球菌病是由链球菌感染所引起的急性、致死率高的传染病,是我国近年来新发现的一种鱼病,链球菌容易产生抗药性^[9,10]。人工回染结果表明该菌株对宝石鲈具有很高的毒力,LD₅₀ 为 3.48 × 10⁵ CFU,应引起较大的注意。

国内外对宝石鲈疾病的研究较少,由链球菌引起的宝石鲈目前尚属首次报道。所以应对发病鱼进行细菌分离,通过药敏试验选用有效抗菌药物治疗,且应早期用药,剂量适当,对症状明显和已死亡的漂浮于水面的鱼应及时捞出并销毁,以减少对健康鱼的感染。

3.3 致病机理的初步结论

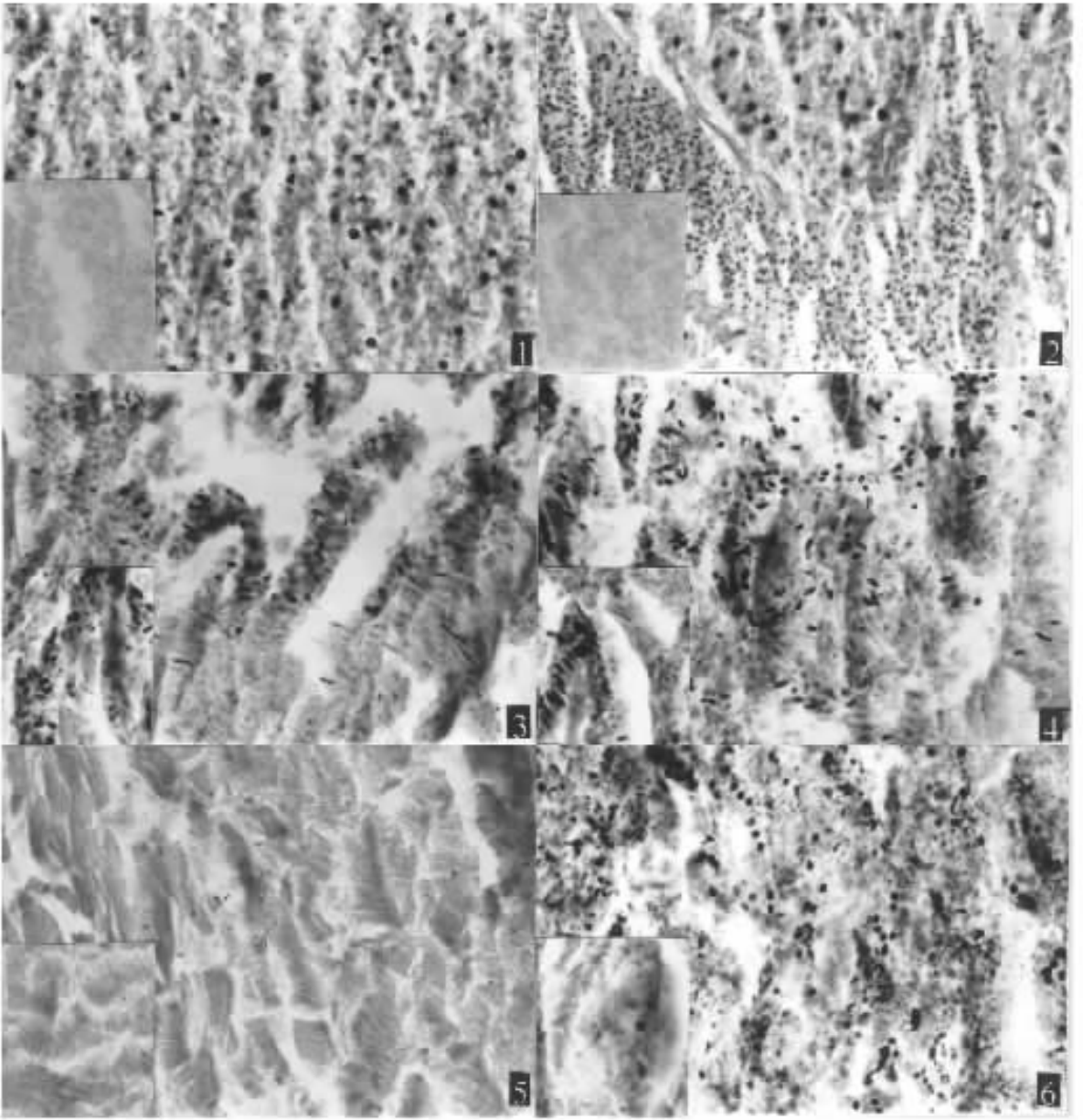
1966年,Robinsonand和Meyer首先报道了鱼类的链球菌病,由于每个人对链球菌病的报道不同,导致了对致病因素的争议。本试验自然及人工感染发病鱼均具有眼球突出,肝肿大、发灰,胆囊肿大及有大量腹水等症状,与国外链球菌感染鱼类发病的报道结果基本相同。本试验所分离菌株具有 β 溶血,与病理组织观察到主要产生肝肾损伤及药敏试验的结果一致。正如Olufemi和Robert提出,血溶性路线可能是链球菌感染和传播的主要途径^[10]。

3.4 关于该病的命名

目前还没有完全权威的关于水产动物病害命名的标准,依据目前国内水产上关于病害命名的通用规律,我们一般根据宿主、病原和临床症状等来命名。本研究发现该病的病原为链球菌,在腹水中也分离到该病原菌(败血症的标志性病征之一),而且发病鱼的临床症状表现为出血严重,因此该病暂定为高体革鰈链球菌出血性败血症。

参考文献：

- [1] 韩茂森. 养殖鱼类的新秀——澳洲宝石鲷[J]. 科学养鱼, 2002(4): 50.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 《常见细菌系统鉴定手册》[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 242-244, 259-266.
- [3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition[M]. USA: Williams & Wilkins, 1944. 552.
- [4] 龚志锦, 詹榕洲. 病理组织切片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 140.
- [5] Chang P A, Plumb J A. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. Infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. Fish Dis, 1996, 19(3): 235-241.
- [6] Petra R P, Johnson S K, Lenis D H. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas [J]. Aquac, 1997, 15(1/4): 25-33.
- [7] 杜佳垠. 大菱鲆链球菌病[J]. 河北渔业, 2001(4): 36-37.
- [8] 杜佳垠. 海水养殖鱼类链球菌病[J]. 渔业现代化, 2001(5): 28-29.
- [9] 林为民, 李新苹, 张孝恩, 等. 鱼链球菌病的诊断和防治[J]. 中国兽医杂志, 2000, 25(3): 51.
- [10] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20.



图版 Plate

1. 肝细胞排列紊乱,部分肝细胞失去正常结构;2. 部分区域常有大量粒细胞浸润,部分肝细胞坏死、解体,形成多处坏死病灶;3. 轻度病变的肠,固有膜、肌层和浆膜结构较完整,仅少数粘膜上皮脱落到肠腔中;4. 重度病变的肠,不仅粘膜上皮脱落,固有膜结构断裂,粘膜顶部细胞发生崩解、脱落,肠腔中可见大量脱落的肠上皮及嗜酸性物质;5. 少数肌纤维断裂折叠,病变不明显;6. 肾小球肿与肾小囊界限不明显,部分肾小管解体,细胞内颗粒释入管腔中。

图1~图6中各大图片为发病鱼各组织的照片,各大图片左下角的小图片为相应健康鱼的对应组织照片。发病及对照各组织均采用H-E染色法,放大倍率均为 20×6.7 。