

淡水鱼类细菌性败血症的组织 亚显微病理及防治研究

黄琪琰 郑德崇 金丽华 吴建农 陆宏达

(上海水产大学养殖系, 200090)

提 要 本文报道了淡水鱼类细菌性败血症的肝、脾、肾组织亚显微病理变化及防治方法, 并比较了鲫、团头鲂、鲢、鳙患此病后的症状和病理变化都基本相同, 呈败血症症状, 只是垂死的鲫较团头鲂、鲢、鳙为严重而已, 这与鲫的生命力较强有关。在光学显微镜还不能察觉细胞组织的病变时, 在电镜下已呈现出细胞病理变化, 肝、脾、肾等脏器最早出现的病变是细胞的膜性结构受损。在光学显微镜下看到肝细胞中有很多被苏木素深染的丝状物是高度密集成束的粗面内浆网, 这是机体的一种补偿性反应。根据病原、病理变化及发病机理, 研制出复合新药——鱼泰8号, 并提出三步曲治疗方法及16条治疗注意事项, 从而确保治愈率在95%以上, 治愈了2000多公顷内的病鱼。从改善环境、加强饲养管理, 提高鱼体抵抗力、及时杀灭病原出发, 提出10条综合预防措施, 在300公顷的鱼池中实施后均未发病。

关键词 细菌性败血症, “鱼泰8号”, 鱼病, 鱼药, 鱼类病理学

淡水鱼类细菌性败血症于1986年10月首先在上海市崇明县异育银鲫上发生, 引起大量死亡。因病鱼发生溶血及腹腔内有大量腹水, 故我们称它为“异育银鲫溶血性腹水病”[孙其焕等, 1991; 黄琪琰等, 1991、1992]。至今该病已在全国20多个省、市、自治区广泛流行, 危害鲫、团头鲂、鲢、鳙、鲮、鲤、黄鳝等多种淡水鱼, 造成的损失极其严重。1990年春农业部水产司在杭州召开鱼病专家会议, 讨论并组织攻关, 因当时该病的病原及病理均尚未完全查明, 故暂时统一命名为“主要淡水养殖鱼类暴发性流行病”[黄琪琰等, 1993]。至今各地对该病进行了大量研究, 发表了很多论文及报道, 病名主要有溶血性腹水病[孙其焕等, 1991; 黄琪琰等, 1991、1992]、暴发性传染病[中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 1991; 陈怀青等, 1991a; 左文功等, 1991; 贺路等, 1992; 徐伯亥等, 1991]、出血性败血症[翟子玉等, 1993]、出血病[何顺华等, 1993; 凌天慧等, 1991]、暴发性鱼病[周月秀, 1991; 杨成亮等, 1991]、暴发性出血病[泰贵泉等, 1992]等, 当这些病名译成外文时就更为混乱。现已查明该病是由嗜水气单胞菌[中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 1991; 朱民居等, 1992; 陈怀青等, 1991a、b; 何顺华等, 1993; 贺路等, 1992; 钱冬等, 1993; 陆承平, 1992; 孙其焕等, 1991]、点状气单胞菌[周月秀, 1991; 徐伯亥等, 1993]、温和气单胞菌[孙其焕等, 1991]、河弧菌生物变种Ⅲ[徐伯亥等, 1993]、鲁克氏耶尔森菌[徐伯亥等, 1991]、产碱假单胞菌[何顺华等, 1993]等感染多种淡水鱼引起全身广泛性出血、溶血、贫血, 各组织器官都发生病变, 尤以实质性脏器为严重, 常坏死解体成淡红色一片, 肝功能

及肾功能均发生障碍,呈败血症症状[黄琪琰等,1991、1992],所以建议将该病正式命名为“淡水鱼类细菌性败血症”,简称“细菌性败血症”。

1 材料和方法

1.1 材料鱼的来源

健康鱼和病鱼均取自上海及苏南地区的养殖场。

1.2 超薄切片制备及观察

用锋利的刀片迅速切下小于 2 mm^3 的组织块,放入预冷磷酸缓冲液配成的2.5%戊二醛液中作前固定,保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内;用1%锇酸重固定1小时,脱水后用环氧树脂618浸透、包埋;再用LKB-V超薄切片机切成 $600-700\text{ \AA}$ 厚度的超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色[利怀斯和克奈特,1981年汉译本;黄立,1982],用JEM100-CXII透射电镜观察、摄影。

2 结果

2.1 症状

病鱼早期,鳃盖、上下颌、口腔、眼睛、鳍基及鱼体两侧轻度充血,肠内尚有少量食物。严重时,体表严重充血、出血、眼睛突出、肛门红肿、肠壁充血发炎、肠内没有食物;肝脏、肾脏、脾脏肿大,肝脏呈花斑状,脾脏呈紫黑色,胆囊肿大,腹膜、肠系膜及实质器官的被膜上有散在性的出血斑点,病鱼严重贫血,鲢、鳊的眼眶周围常严重出血;有些病鱼的腹部膨大,腹腔内有淡黄色透明腹水或红色混浊腹水(后者叫血性腹水);少数病鱼的骨骼肌也充血。病鱼在池边摩擦、厌食、静止不动或发生阵发性乱游、乱窜,最后衰竭而死。尸体极易腐败。病鱼的症状表现多样化,有些病鱼甚至在临死时,用肉眼仍看不出有明显症状。鲫、团头鲂、鲢、鳊患此病后的症状及病理变化基本相同,只是垂死的鲫较团头鲂、鲢、鳊为严重而已。

2.2 组织亚显微病理变化

从对病鱼的肝、胰、脾、肾、肠、心和鳃等脏器的组织显微病理研究,可以看到病鱼的内脏器官都发生病理变化,其中尤以肝、脾、肾的病变为严重[黄琪琰等,1991],因此,我们对病鱼的肝、脾、肾的组织亚显微病理变化进行了研究。

2.2.1 肝脏

病鱼的肝脏呈弥漫性病变,肝细胞发生不同程度的病理变化,从肿胀、变性及至坏死解体。一些尚未受损的肝细胞出现了显著多于健康鱼的双核及三核肝细胞,相邻肝细胞之间的胆小管清晰可见,细胞中的粗面内浆网极其丰富(图1)。当这种细胞受损害时,内浆网显著减少,一些线粒体结构以及细胞和核膜的局部膜结构肿胀至解体,而同一细胞大部分区域的膜结构线条仍然清晰(图2)。随着病变的发展,细胞膜、核膜、线粒体外膜和嵴膜等膜性结构肿胀、断裂至解体消失,仅能看出膜的痕迹。细胞质和核质的电子密度降低,呈现整个细胞的坏死解体现象,细胞边界模糊不清(图1右下角)。

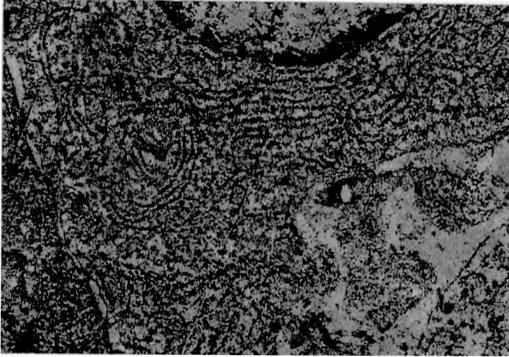


图1 肝脏的超薄切片。上方为一新生的肝细胞，
右下角是一个坏死的肝细胞×10000
Fig. 1 The ultra-thin section of liver, a
new-born cell on the top of picture, and
a necrosis liver cell in lower right of
picture ×10000



图2 肝脏的超薄切片。局部核膜肿胀、解体(↑)，
线粒体解体×10000
Fig. 2 The ultra-thin section of liver, the
nuclar membrine swollen and disintegrated
locally(↑), the mitochondria disintegrated
×10000

2. 2. 2 脾脏

病变脾脏组织中的网状细胞的细胞膜和核膜等膜性结构发生肿胀、解体。巨噬细胞的核膜和细胞膜的结构线条模糊不清及至解体消失，胞浆中有许多个残体，线粒体肿胀、解体；血窦内皮细胞消失，看不出血窦的边界(图3)。

2. 2. 3 肾脏

受损的肾小管上皮细胞的线粒体肿胀、解体，核膜局部的双层膜结构清晰，而一些部位核膜的双层膜肿胀、解体。严重时整个细胞坏死解体(图4)。

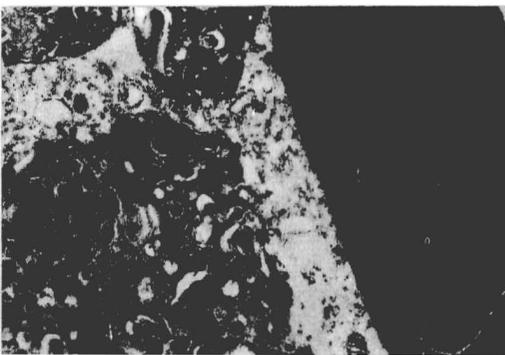


图3 脾脏内变性的巨噬细胞中有3个残体，
线粒体肿胀解体(↑)×7200
Fig. 3 There are three residual bodies
in degenerated macrophages of spleen ×7200



图4 坏死的肾小管上皮细胞×1900
Fig. 4 The nocrosis epithelial cells
of uriniferous tubule ×1900

3 治疗

3.1 治疗药物和治疗方法

经室内抑菌试验、鱼池治疗试验,并结合病理变化、发病机理,现已研制出复合配方新药——鱼泰8号及一套完整、有效的三步曲治疗方法。具体方法为

第一步杀灭鱼体外寄生虫。

第二步杀灭鱼体外及水体中的病原菌。

(1)连续投喂药饲5天(每公斤药饲中含鱼泰8号药5克),消灭鱼体内的病原菌。①鲫、团头鲂等吃食性鱼类患病,将药饲制成水中稳定性好、适口的颗粒药饲;每天投喂药饲的量,按池中吃食鱼的总体重计算,每100公斤吃食鱼每天投喂3公斤,分上午、下午两次投喂,均匀撒在食台上。②鲢、鳙等滤食性鱼类,过去从未内服过药,大的颗粒药饲吃不进;拌在粉状或糊状饲料中投喂,药在水中很快散失,鱼又吃不到足够量的药,怎么办?经我们反复试验,终于解决了这个难题,现已被各地广为采用和仿用。具体方法有二种:①将5克鱼泰8号药均匀拌和在1公斤碾碎的、干的新鲜青糠中,每天每100公斤滤食性鱼类投喂了3公斤青糠,分2—4次撒在水面投喂。②制备成水中稳性好的微颗粒药饲,每天每100公斤滤食性鱼类投喂3公斤(每公斤药饲中含鱼泰8号药5克),分2—4次撒在水面投喂。

(2)在投喂药饲期间,同时全池遍洒杀菌药(0.6ppm 漂白粉精,或0.5ppm 三氯异氰尿酸、0.6ppm 优氯净、1.2ppm 漂白粉)1—2次,杀灭水体中及鱼体表的病原菌。

第三步在投喂完药饲后3—4天,全池遍洒一次生石灰,将池水调成弱碱性。

3.2 治疗时的注意事项

由于该病的病原菌产生毒素,引起病鱼出血、溶血、贫血,组织损坏严重,再加上水温高时病原菌繁殖快,一小时可繁殖3—4代,一个细菌在10小时后就繁殖成一万亿个以上,因此必须严格按照上述治疗方法进行治疗。为了确保治愈率在95%以上,我们总结出16条治疗时的注意事项:

(1)必须做到无病先防,有病早治,不能等到鱼死得很严重时才进行治疗。因为重病鱼已完全失去食欲,投喂药饲就无效。

(2)在治疗时第一步必须先杀灭鱼体外的寄生虫。经多年来的诊断及治疗,我们发现鱼的体表及鳃上有寄生虫寄生时,虽然寄生虫的数量不很多,寄生虫本身尚不会直接引起鱼死亡,但这些鱼由于鳃及皮肤被寄生虫损伤后,就容易感染患细菌性败血症,且病情也常较严重,治疗效果也不理想,因此在治疗时必须先杀灭鱼体外的寄生虫。

(3)杀虫要有针对性。凡有条件的地方,应该用显微镜检查病鱼的体表及鳃,如仅有车轮虫、隐鞭虫寄生,只须全池遍洒硫酸铜或硫酸铜、硫酸亚铁合剂(5:2)0.7ppm;如仅有三代虫、指环虫、鲺寄生,须全池遍洒晶体敌百虫0.6ppm;如有中华鲩寄生,则须全池遍洒晶体敌百虫和硫酸亚铁合剂(5:2),或硫酸铜和硫酸亚铁合剂(5:2)0.7ppm;如有锚头鲩寄生,则须连续全池泼2—3次晶体敌百虫,每次间隔一周左右(间隔时间的长短随水温而定,水温高时间隔时间短,反之则长);鱼体外没有寄生虫寄生,就不须要杀虫。这样既能达到杀死鱼体外寄生虫的目的,又可节省药费。如没有条件进行镜检的单位,那就只好同时全池遍洒硫酸铜0.5ppm,硫酸亚铁0.2ppm和晶体敌百虫0.5ppm。

(4)发病鱼池的水体及鱼体中都有大量病原菌存在,治疗时必须外泼杀菌药(消毒药)和口服药相结合,将水体和鱼体中的病原菌同时消灭,才能取得理想的治疗效果,忽视任何一方面都是不行的。有的渔民认为一周前已全池遍洒过漂白粉精,现在只须投喂药饵就可以了,这是不对的,因一周前遍洒的漂白粉精早已消失,病鱼会不断向水中排出病原菌,随水、工具、动物等也会将病原菌带入池中。

(5)外用药的质量要好,尤其是硫酸亚铁和漂白粉最容易失效。好的硫酸亚铁呈淡绿色,变为黄色后就无效。漂白粉应呈粉状,很刺鼻,如受潮、结块、不刺鼻就不能用。渔民一般没有测定有效氯含量的仪器,故一般采用漂白粉精、三氯异氰尿酸等为好。药物必须密封,存放在阴凉、干燥、避光处。

(6)外泼杀虫药、杀菌药的浓度,要根据当时、当地的水温、水质及用药情况灵活掌握。

(7)外用药要分别溶解,漂白粉溶解后有残渣,要经过过滤,否则鱼误吞食残渣后会引起死亡。

(8)溶解药及泼药都不能用金属容器,而应该用木器、塑料容器或陶器等。

(9)外泼药要均匀,因药液的垂直扩散较水平扩散快,所以如池底不平整,则深水处要多泼些;同时池边(尤其是下风处)及食物周围,病原菌的密度一般较高,也应适当多泼些。

(10)生石灰不能和三氯异氰尿酸、漂白粉精、优氯净、漂白粉、硫酸亚铁、硫酸铜等同时使用,否则将严重影响药效。

(11)要使病鱼能吃到足够的药量。①药饵在水中的稳定性要好,如稳定性不好,药饵投入水中后很快就散失,鱼就吃不到足够的药量。鱼泰8号药饵在水中稳定性可达2小时左右,在水中半小时的散失率不到4%。②投喂药饵的量要计算正确,一般要求在投喂后30至45分钟内吃完。如不到20分钟就吃光,说明投喂量太少,病鱼就吃不到足够的药量;反之,如一小时后还未吃完,则说明投喂量过多,将影响下一次的吃食。③要注意投喂方法,确保病鱼能吃到足够的药饵,才能收到理想的治疗效果。药饵要撒得开、撒得匀,最好在投喂半小时后撒网检查一下病鱼是否吃到药饵(已停止吃食的重病鱼除外);反之,如药饵撒不开、不匀,病鱼的抢食能力较差,往往就不能吃到足够的量,甚至吃不到药饵,就达不到治疗目的。投喂滤食性鱼类的药饵应在上风处均匀撒在水面,并应尽量避开大风,否则须适当增加投喂药饵的量及增加每天投喂的次数。

(12)治疗期间及刚治好后不要大量换水、大量加水及捕鱼,以免给鱼带来刺激,引起应激反应,加重病情或引起复发。

(13)病死鱼要及时捞除深埋,不能到处乱扔。

(14)病治好后,仍应继续做好防病工作,否则还会再次感染发病。

(15)发病池用过的工具不能用于其他鱼池,必须经过消毒。

(16)做好池塘日记,以便总结提高。

4 综合预防措施

从改善环境、加强饲养管理、提高鱼体抵抗力、及时杀灭病原四方面提出了十条有效的综合预防措施,从而保证鲫、团头鲂、鲢、鳙、草鱼等成鱼饲养成活率均在80%以上,每公顷鱼池的净利润在15000元以上。具体措施为:

- (1)在冬季除去过多淤泥,或进行晒、冻及翻动底泥,并用生石灰或漂白粉精进行消毒。
- (2)严禁近亲繁殖,提倡就地培育健壮鱼种。
- (3)鱼种下池前用15—20ppm高锰酸钾水溶液药浴10—30分钟。
- (4)放养密度及搭配比例应根据当地条件,技术水平及防病能力进行适当调整。
- (5)加强饲养管理,定期泼洒生石灰及加注清水,改善水质,正确掌握投饲量,尽量多投喂天然饲料及优质颗粒饲料,不投喂变质、有毒饲料,提高鱼体抗病力。
- (6)食场周围定期泼洒漂白粉精或优氯净、三氯异氰尿酸进行消毒。
- (7)加强巡塘工作,每月对鱼进行抽样检查1—2次,发现病情及时进行防治。
- (8)在该病流行季节前,用显微镜检查一次鱼体,杀灭鱼体表及鳃上的寄生虫。
- (9)在该病流行季节,投喂鱼泰3号(低温季节)或鱼泰7号药饲(高温季节),每次连喂3天,每月预防1—2次。如周围鱼池已发病,则应该全池遍洒一次漂白粉精。
- (10)发病鱼池用过的工具要进行消毒,病死鱼应及时捞出深埋,而不能乱扔。

5 讨论

(1)细菌性败血症的症状表现多样化,是由于侵入鱼体的病原菌数量、毒力、鱼体的抵抗力、环境条件及发病阶段不同所引起。在自然发病及人工感染的病鱼中均发现有些鱼在临死时,用肉眼尚看不出明显症状,这是由于侵入的病原菌数量大、毒力强、鱼体抵抗力又差而引起的一种超急性感染。

(2)各种鲫、团头鲂、鲢、鳙患细菌性败血症后产生的症状和病理变化基本相同,只是垂死鱼的病变程度以鲫为最重,这与鲫的生命力比团头鲂、鲢、鳙强有关。

(3)当光学显微镜还不能察觉细胞组织的病变时,在电镜下已呈显出细胞病理变化,虽然各部结构分明可辨,似乎完好无损,但极微小的某个局部的核膜、细胞膜已肿胀,甚至解体,极少数的线粒体膜也已肿胀、解体。肝、脾、肾等脏器最早出现的病变是细胞的膜性结构受损,由此可见膜结构的易损性。

(4)在病鱼中部分尚未受损的肝细胞内出现了显著多于健康鱼的双核及三核肝细胞,新生的肝细胞中含有较健康鱼为丰富的粗面内浆网,高度密集成束(在光学显微镜下观察,呈被苏木素深染的丝状物),这些都是机体的补偿性反应,但由于病原菌的毒力强,疾病发展快,因此新生肝细胞不久就遭损害,肝小叶的正常结构难于重建,功能无法得到补偿。

(5)由于病原菌的毒力强、水质和底质条件差,鱼的抵抗力弱,再加上高温季节病原菌的繁殖速度快,所以在治疗时一定要严格按照三步曲治疗方法及治疗时的注意事项进行,才能取得理想的治疗效果。预防也必须采取综合预防才有效。

参加工作的还有周孝康、赵立勤、周平凡、魏海丽、陈逢安、刘光军、范丽萍、刘招生、高以太、倪国范、倪健、张敏同志协助摄影,一并谨致谢意。本文获上海市水产学会1994年度优秀论文奖。

参 考 文 献

- [1] 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,1991.淡水养殖鱼类暴发性传染病防治初步研究.水产科技情报,18(1):20—21.
- [2] 左文功等,1991.沙市地区鲢鱼等鱼暴发性传染病流行病学的初步调查.淡水渔业,(4):10—12.

- [3] 朱民居等,1992.淡水鱼暴发性流行病的病原分离与鉴定.动植物检疫,(2):12—14.
- [4] 陈怀育等,1991a.家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究.南京农业大学学报,16(4):87—91.
- [5] ——,1991b.嗜水气单胞菌,黄鲢出血性败血症的病原.中国人兽共患病杂志,7(4):21—23.
- [6] 何顺华等,1993.白鲢出血病病原菌的鉴定.水产科技情报,20(2):75—77.
- [7] 利怀斯,P.R.和D.P.克奈特(严其华译),1981.切片材料的染色方法——电镜技术.人民卫生出版社.
- [8] 周月秀,1991.鲢鳙鱼暴发性鱼病的初步探讨.北京水产,(23):62—65.
- [9] 杨成亮等,1991.浙江省淡水养殖鱼类暴发性鱼病的流行病学调查.淡水渔业(6):3—5.
- [10] 凌天慧等,1991.黄鲢出血病的病理研究.水产科技情报,18(3):81—83.
- [11] 贺路等,1992.沙市地区暴发性传染病病原研究.淡水渔业,(3):13—16.
- [12] 钱冬等,1993.应用酶联免疫吸附法检测暴发病病原——嗜水气单胞菌的研究.水产养殖,(4):14—17.
- [13] 陆承平,1992.致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述.水产学报,16(3):282—288.
- [14] 孙其焕等,1991.异育银鲫溶血性腹水病病原的研究.水产学报,15(2):130—139.
- [15] 徐伯亥等,1991.鲢、鳙鱼流行性传染病的流行病学和细菌病因的初步研究.水产科技情报,18(5):134—136.
- [16] ——,1993.淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究.水生生物学报,17(3):259—266.
- [17] 泰贵泉等,1992.用石灰乳防治池养鱼类暴发性出血病的试验.水产科技情报,19(6):181—182.
- [18] 黄立,1982.电子显微镜生物样品制备技术.江苏科学技术出版社.
- [19] 黄琪琰等,1991.异育银鲫溶血性腹水病的组织显微病理研究.水产学报,15(3):212—218.
- [20] ——,1992.异育银鲫溶血性腹水病的病理生理研究.水产学报,16(4):316—321.
- [21] ——,1993.水产动物疾病学,103—112.上海科学技术出版社.
- [22] 翟子玉等,1993.团头鲂、鲫鱼出血性败血症的研究.水产科技情报,20(3):105—108.

STUDIES ON THE BACTERIAL SEPTICEMIA OF FRESHWATER FISHES: THE SUPER-MICROHISTO- PATHOLOGY, PREVENTION AND CURE

Huang Qi-yan, Zheng De-chong, Jin Li-hua,
Wu Jian-nong and Lu Hong-da

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT The bacterial septicemia is initially found in crucian carp at Chongming County, Shanghai, October 1986. And it spread rapidly to 20 provinces. This disease makes very high epidemic and mortality on cultured fish. Its glaring symptoms are the hemolysis and a great quantity of ascites in abdominal cavity. Many species of freshwater fishes such as crucian carp, blunt snout bream, silver carp, big head carp, common carp and rice field eel were murdered seriously and caused enormous losses to fishermen. At that time nobody made a clear idea to the pathogeny and pathology of this disease, and now it has been known. Their important pathogens are bacteria of *Aeromonas hydrophila*. The research course of this disease listed briefly in literature of the present paper. In this paper, the super-microhistopathology of the bacterial septicemia and that of crucian carp, etc, will be discussed comparatively. Their general pathological characters of diseased fish are extensive hemolysis and hemorrhage in whole body, all organs were disintegrate, particularly the

substantive organs. Initial diseased change is the membraneous structures to be damaged in liver, spleen and kidney. These symptom may be perceived under electromicroscope but can not perceived under the lightmicroscope. Under lightmicroscope, much filiform matter dyed by hematoxylin are seen. Under electromicroscope, the filiform matter is rough endoplasmic reticulum and concentrated into sheaves. This is a compensated action. The pathological change degree of crucian carp was slighter than other fishes at same time that owing to its more vitality. According to the pathogen and pathological changes, a new compound medicine "YUTAI 8" was developed for this disease, and 3 steps of therapeutic method and 16 points for attention were raised. 2000 ha of cultured ponds were treated and the cure rate was over 95%. And using "YUTAI 8" for prevention in 300 ha of cultured ponds, the effect was good too. In meantime, 10 multiple preventive measures were raised for building up resistance to disease and restraining the pathogens on basis practices.

KEYWORDS bacterial septicemia, "YUTAI 8", fish disease, fish medicine, fish pathology