

荧光假单胞菌感染大鲵的病理损伤

杜宗君^① 段亚佼^{①#} 黄小丽^{①*} 汪开毓^② 段靖^① 邓永强^③
耿毅^② 陈德芳^①

① 四川农业大学动物科技学院 成都 611130; ② 四川农业大学动物医学院 成都 611130;

③ 四川省动物疫病预防控制中心 成都 610041

摘要: 通过对感染荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 发病的大鲵 (*Andrias davidianus*) 主要器官进行病理剖解和病理组织学观察, 以明确大鲵感染荧光假单胞菌引起的病理学损伤特点。结果表明, 大鲵感染荧光假单胞菌后, 主要表现为腹部极度膨胀、腹水和严重胃肠道反应, 严重者可见将胃呕吐至口腔; 组织器官具有典型的病理变化, 其主要靶器官为肾、肝、肠道、皮肤和肌肉。分别引起坏死性肾小球肾炎、肝炎。此外, 还可引起轻微肠炎及皮炎。可在肾小管管腔内、肝细胞坏死灶内、肠道固有层内及皮肤肌肉中发现数量极多的杆状细菌。

关键词: 大鲵; 荧光假单胞菌; 病理损伤

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2017) 03-537-06

Pathological Lesions of Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) Infected by *Pseudomonas fluorescens*

DU Zong-Jun^① DUAN Ya-Jiao^{①#} HUANG Xiao-Li^{①*} WANG Kai-Yu^② DUAN Jing^①
DENG Yong-Qiang^③ GENG Yi^② CHEN De-Fang^①

① College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130; ② College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130; ③ Animal Disease Prevention and Control Center of Sichuan, Chengdu 610041, China

Abstract: The pathological anatomy and histopathology of diseased Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) infected by *Pseudomonas fluorescens* were examined. The results showed that the diseased fish had extremely swelling abdomen with severe vomiting (Fig. 1a). Some stomachs even reached mouth due to vomiting (Fig. 1b). The serious lesions occurred in the kidney, liver, intestine, skin and muscle, causing necrotic glomerular nephritis and hepatitis, and mild enteritis and dermatitis. Renal tubular epithelial cells showed severe edema and big vacuoles in the cytoplasm (Fig. 2c). Urinary cylinder in kidney tubules (Fig. 2a), renal interstitial capillary congestion (Fig. 2b) and eosinophils infiltration in renal interstitial (Fig. 2d)

基金项目 四川省十三五育种攻关项目 (2016NYZ0047);

* 通讯作者, E-mail: hxldyq@126.com;

第一作者介绍 杜宗君, 男, 博士; 研究方向: 水生动物疾病学; E-mail: duzongjun@sina.com;

并列第一作者介绍 段亚佼, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产病理学; E-mail: 649591391@qq.com。

收稿日期: 2016-08-13, 修回日期: 2016-11-30 DOI: 10.13859/j.cjz.201703021

could also be observed. A large number of bacteria appeared in the tubular lumen (Fig. 2e). Hepatic cells showed severe edema (Fig. 2f) and enlargement with a large number of bacilli (Fig. 2g - h). Lysis also appeared in the liver. Lamina propria showed severe edema (Fig. 2i) infiltrated with bacilli (Fig. 2j). Capillary congestion and inflammatory cell infiltration were observed in epidermis (Fig. 2k). Also, a large number of bacilli existed in the muscle tissue (Fig. 2l).

Key words: Chinese Giant Salamander, *Andrias davidianus*; *Pseudomonas putida*; Pathological lesions

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 为一种非发酵、革兰氏阴性、专性需氧菌, 隶属于假单胞菌科 (Pseudomonadaceae) 假单胞菌属, 是一种嗜冷微生物 (Trivedi et al. 2015)。该菌为一种机会致病菌, 一般存在于植物、土壤、水体表层等自然环境中。除引起人类疾病之外 (Madi 2010, 王梅芬等 2013), 研究发现, 荧光假单胞菌也可引起水生动物感染发病。可导致鳊 (*Siniperca chuatsi*) 体表充血、肝肿大 (安伟等 2014), 罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 体表大量黏液、鳍条充血 (邓显文等 2010), 引起大西洋鲑 (*Salmo salar*) 体表皮肤溃疡 (王玲 2010), 并可感染斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) (Bly 1997)。

大鲵 (*Andrias davidianus*), 又称中国大鲵, 俗名“娃娃鱼”, 属于两栖纲有尾目隐鳃鲵科。20 世纪 60 年代起, 为保护和利用大鲵资源, 国内的许多单位开始人工养殖大鲵, 取得了一定的进展 (李莉等 2012)。至 2010 年为止, 全国大鲵繁殖与养殖总量已达 170 多万尾, 其总量的快速增长为今后进一步开发利用大鲵资源提供了有力保障 (罗庆华 2010)。但随着集约化养殖的日益发展, 病害已成为大鲵人工健康养殖的瓶颈。2015 年 4 月, 四川某大鲵养殖场养殖的大鲵出现了以体表褪色、两侧充血, 腹部异常膨大, 严重呕吐等主要症状的疾病, 患病严重的病例甚至可见将胃呕吐至口腔, 发病率达到 85% 以上, 死亡率达 70% 以上。经对该病的致病病原进行研究, 确诊为荧光假单胞菌感染发病。由于至今未见大鲵荧光假单胞菌感染病理损伤相关报道, 对主要病变器官及主要病原侵蚀部位等尚不明确, 故从临床表现、解

剖变化、组织病理表现等方面对该病进行系统分析, 以期明确其病理损伤特征, 为相关研究提供参考借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验动物

感染荧光假单胞菌的患病大鲵 15 尾, 取自四川大鲵养殖场, 体长 26 ~ 30 cm。利用无菌技术从患病大鲵体内分离到 1 株优势菌 (DN-S01), 根据分离菌的形态、生理生化特性, 结合 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定 (GenBank 登录号 KU899097 ~ KU899098) 与系统发育分析, 鉴定此 DN-S01 菌株为荧光假单胞菌, 人工感染试验进一步证实其为发病大鲵的致病菌。

1.2 剖检观察

将患病大鲵用 MS222 麻醉后仔细观察其体表病变特点, 之后解剖, 观察腹腔、围心腔、心、肝、肺、脾、胰腺、消化道等各部位的色泽、质地及形态变化, 记录典型病变特点。

1.8 组织病理学观察

取患病症状明显大鲵的皮肤、肌肉、脑及心、肺、肾、肝、脾、胃肠道等内脏器官组织, 用 10% 的中性福尔马林固定液固定, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 中性树脂胶封片后, 显微镜观察、拍照。

2 结果

2.1 病史及临床症状

患病大鲵为人工微流水养殖。发病初期主要表现为体色发黑, 食欲减退; 之后食欲废绝,

腹部极度肿胀, 体态变胖, 且出现严重呕吐, 轻则只可见呕吐现象, 重则可见胃被呕吐至口腔, 患病个体最后衰竭死亡。发病区域的水温 17~19℃, 发病率 85% 以上, 死亡率 70% 以上。

2.2 剖检观察

15 尾患病大鲵均表现为腹部异常膨大(图 1a)、体态变胖, 整个腹部犹如圆筒状, 失去腹部正常的侧扁体形; 体表两侧轻微充血; 4 尾可见胃呕吐至口腔(图 1b)。解剖后可见腹部大量腹水, 内脏颜色发白, 肝肾水肿, 可见肝边缘锐角变钝; 部分大鲵可见胃黏膜出血。

2.3 组织病理学观察

经对 15 尾送检大鲵进行组织病理学检查, 发现荧光假单胞菌感染大鲵造成的病理损伤主要集中在肾、肝、胃肠道及皮肤肌肉, 其中主要以肾、肝的病变最为明显, 胰腺、肺、脑组织未见明显病理变化。所有患病个体均不同程度出现肾小球肾炎, 坏死性肝炎和胃肠炎, 5 尾可见轻微皮炎。

肾: 肾小球毛细血管扩张充血, 肾小囊扩张, 内可见蛋白样物质; 肾小管水肿, 部分肾小管上皮细胞红染、浓缩、颗粒变性与空泡变

性, 甚至溶解, 坏死, 多数肾小管管腔出现“管型”(图 2a); 部分肾小管上皮细胞胞质、胞核浓缩, 胞浆红染, 胞核嗜碱性增强, 结构破坏, 肾间质血管充血(图 2b); 有的肾小管严重水肿, 体积增大, 胞浆内形成巨大空泡, 将胞质、胞核挤于一端(图 2c); 肾间质大量嗜酸性粒细胞浸润(图 2d)。在肾小管管腔内发现大量杆状细菌(图 2e)。

肝: 体积增大, 严重肿胀, 狄氏间隙明显增宽, 空泡变性(图 2f)。有的细胞肿胀、破裂, 与相邻破裂细胞一起形成溶解灶, 在溶解灶内明显可见杆状细菌团块(图 2g~h)。组织内淋巴细胞中明显可见大量嗜酸性粒细胞浸润。

其他: 除了肾和肝存在较为典型的病变外, 肠道和皮肤肌肉也有一定程度的病理改变。肠固有层及黏膜下层水肿, 间隙增宽, 固有层变厚, 并可见大量嗜酸性粒细胞浸润(图 2i)及大量杆状细菌浸润(图 2j)。皮肤结构完整, 但表皮内小血管和毛细血管严重充血, 并在表皮层可见大量炎性细胞浸润(图 3k)。同时还可在肌肉组织间隙发现大量杆状细菌浸润(图 2l)。

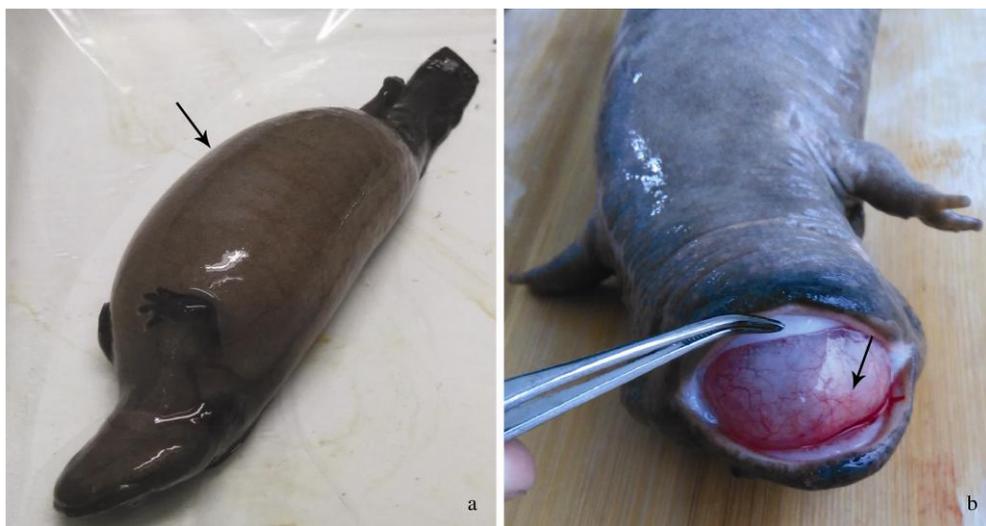


图 1 感染荧光假单胞菌大鲵的主要症状

Fig. 1 Main symptoms of *Andrias davidianus* infected with *Pseudomonas fluorescens*

a. 腹部极度膨大 (→); b. 胃经口腔吐出 (→)。

a. Severe abdominal enlargement (→); b. Stomach reached the mouth due to vomiting (→).

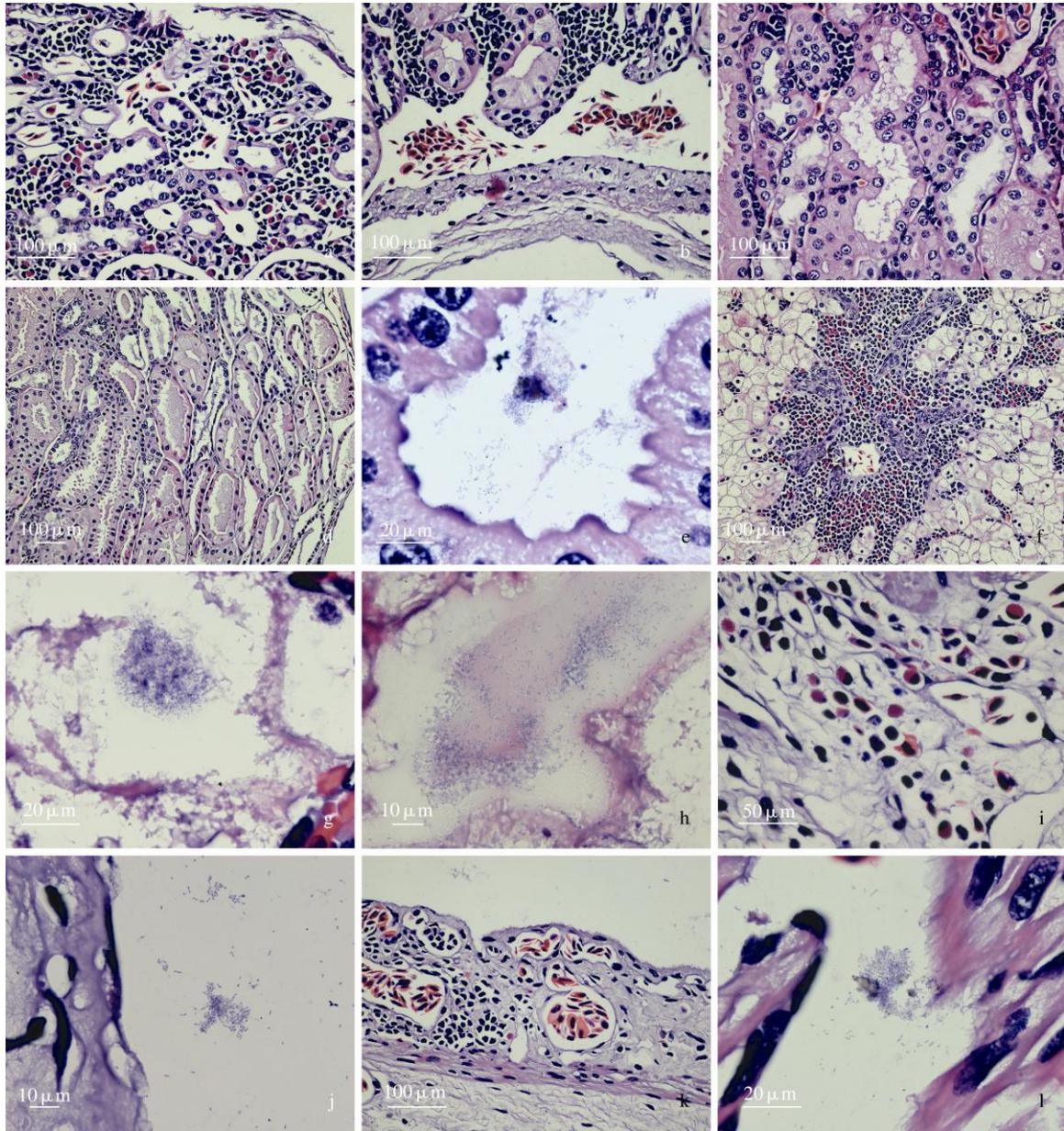


图 2 大鲵荧光假单胞菌感染的组织病理损伤

Fig. 2 Pathological lesions of Chinese giant salamander infected with *Pseudomonas fluorescens*

- a. 肾小管管型出现; b. 肾间质毛细血管充血; c. 肾小管上皮细胞严重水肿, 胞浆空泡形成; d. 肾间质嗜酸性粒细胞浸润; e. 肾小管管腔内大量杆状细菌; f. 肝细胞水肿, 体积增大; g, h. 肝组织内大量杆状细菌; i. 肠固有层水肿、间距增加; j. 肠固有层大量杆状细菌浸润; k. 表皮毛细血管充血, 炎性细胞浸润; l. 肌肉组织间隙内大量杆状细菌浸润。
- a. Urinary cylinder appeared in kidney tubules; b. Renal interstitial capillary congestion; c. severe edema in renal tubular epithelial cells and big vacuoles formation in the cytoplasm; d. Infiltration of eosinophils in renal interstitial; e. A large number of bacteria in tubular lumen; f. Severe swelling and enlargement of hepatic cells; g, h. A large number of bacilli in hepatic tissue; i. Severe edema and increasing space in the lamina propria; j. Infiltration of bacilli in the lamina propria; k. capillary congestion in epidermis and inflammatory cell infiltration; l. Infiltration of large number bacilli in the muscle tissue.

3 讨论

荧光假单胞菌是危害鱼类和水产软体动物的常见细菌,可感染鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、罗非鱼等在内的多种水产动物(Wang et al. 2009, Zhou et al. 2015),也可感染大鲵,使其发病死亡。之前报道表明,大鲵感染荧光假单胞菌后体表症状明显,可出现体表赤皮表现或皮肤黄白色小点等表现,而内脏器官变化差异较大(王高学等 1999, 杜宗君等 2011)。本研究中,发病大鲵体表症状不明显,主要以腹部极度膨胀、严重腹水、各脏器水肿、苍白为典型病理学表现,表明大鲵感染荧光假单胞菌后,其眼观病变特点并不一致,可有多种病理表现,需要在剖检后做进一步实验室分析。

本研究结果表明,病理损伤主要集中在肾、肝、胃肠道及皮肤肌肉。其中以肾、肝的病变最为明显,均以实质组织变化为主,而消化道组织病理变化表现较轻微,主要以固有层及黏膜下层水肿、嗜酸性粒细胞浸润为主要表现,并未见黏膜层严重坏死、脱落等坏死性胃肠炎表现。有报道表明,水质、放养密度、饵料质量、投喂方法、寄生虫、胃肠炎等均可导致大鲵呕吐(汪钺铭 2000),故本病例中大鲵的严重呕吐可能与机体患病有较大关系,但并没有胃肠炎导致呕吐的直接证据。

目前关于荧光假单胞菌感染引起动物病理损伤的研究报道较少,可引起半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)肝、肾、脾、肠及脑严重损伤(高桂生等 2016),并出现明显的炎症变化。虽然本病例中也造成了肝、肾的严重损伤,但消化道损伤较轻,且未观察到脑组织损伤,这可能与感染对象不同有关,说明荧光假单胞菌是否对神经系统造成损害存在一定的种属差异性。

正常动物的体表及体内,存在着一定数量不同种类的细菌,通常对动物起着有益的作用。当宿主免疫力底下、抗生素滥用或细菌寄生部

位改变时,易导致机会致病菌大量繁殖,引起发病(盛凤珍 2010)。故利用常规的细菌分离技术诊断鱼病常常会受到机会致病菌的干扰,从而导致误诊。病理组织学技术为解决这一难题提供了方向,其不仅能显示疾病的主要病变靶器官及组织病变特点,而且能在组织中找到光镜可见的疑似病原,如细菌、真菌、寄生虫等(黄小丽等 2016),且可对病原的数量进行初步评估,从而对疾病的病原类型进行初步分类,可在一定程度上防止误诊。当然这受到临床用药情况、病理学家的主观判断及诊断水平的影响。本研究通过组织病理学技术,不仅发现了机体病变靶器官,而且在肾小管管腔内、肝细胞坏死灶内、肠道固有层内及皮肤肌肉中均发现数量极多的杆状细菌,进一步确定了该病为细菌性疾病,印证了细菌学检测结果。

参 考 文 献

- Bly J E, Quiniou M A, Lawson L A, et al. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases*, 20(1): 35-40.
- Madi A, Lakhdari O, Blottiere H M, et al. 2010. The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiology*, 10(1): 215.
- Trivedi M K, Patil S, Shettigar H, et al. 2015. Antimicrobial sensitivity pattern of *Pseudomonas fluorescens* after biofield treatment. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, 3(3): 1-5.
- Wang H R, Hu Y H, Zhang W W, et al. 2009. Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine*, 27(30): 4047-4055.
- Zhou Z J, Zhang L, Sun L. 2015. *Pseudomonas fluorescens*: Fur is required for multiple biological properties associated with pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 175(1): 145-149.
- 安伟, 肖雨, 高晓华, 等. 2014. 鳊源致病性荧光假单胞菌的分离与鉴定. *动物学杂志*, 49(5): 760-765.
- 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 2010. 罗非鱼荧光假单胞菌的分离鉴定. *广西农业科学*, 41(6): 612-615.

- 杜宗君, 黄小丽, 邓永强, 等. 2011. 人工养殖大鲵病原荧光假单胞菌的分离鉴定. *四川农业大学学报*, 29(1): 103–107.
- 高桂生, 张艳英, 吉志新, 等. 2016. 半滑舌鳎致病性荧光假单胞菌的分离鉴定及其感染的病理损伤. *中国兽医学报*, 36(7): 1145–1150.
- 黄小丽, 汪开毓, 樊威, 等. 2016. 一例乌苏里拟鲢体表溃疡症的病理学诊断. *南方水产科学*, 12(3): 106–111.
- 李莉, 王锡昌, 刘源. 2012. 中国养殖大鲵的食用、药用价值及其开发利用研究进展. *食品工业科技*, 33(9): 454–458.
- 罗庆华. 2010. 中国大鲵营养成分研究进展及食品开发探讨. *食品科学*, 31(19): 390–393.
- 盛凤珍. 2010. 细菌致病因素及机会致病菌探讨. *临床合理用药*, 3(9): 98.
- 汪钺铭. 2000. 诱发大鲵吐食的原因及预防对策. *当代水产*, 29(6): 20–21.
- 王高学, 白占涛, 张向前, 等. 1999. 大鲵赤皮病病原分离鉴定及防治试验. *西北农业大学学报*, 27(4): 71–74.
- 王玲. 大西洋鲑荧光假单胞菌感染症的病原学及病理学研究. 雅安: 四川农业大学博士学位论文.
- 王梅芬, 明亮, 张傅山, 等. 2013. 重症监护病房患者下呼吸道感染非发酵菌菌群的分布及耐药性分析. *山东医药*, 53(10): 13–15.