

## 赤鰭病原菌鰻之病理生理研究

簡肇銜 賈愛華

國立陽明醫學院生理學研究所

本研究主要探討自然感染與人工感染 *Aeromonas hydrophila* 對鰻魚組織病理之變化。*Aeromonas hydrophila* 由人體或虹鱖分離所得，人工感染與自然感染主要不同在自然感染之鰻其消化道有發炎壞死之症狀而人工注射感染者無，但不論自然或人工感染者皆有肌肉壞死、敗血、出血、脾損壞、脂肪肝、腎造血組織萎縮、腎元壞死之症狀，這些症狀之病因可能是由於 *A. hydrophila* 所產生之毒素具蛋白質溶解性、溶血性及細胞毒性，進而破壞病鰻之肝臟及造血系統。

### 前 言

產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是一種條件性病原菌，當鰻在不同的緊迫狀態下就會有發病的可能。如不同環境因子：高密度養殖、管理不良、體外或鰓部寄生蟲、外傷、水黴感染、養殖水受污染、含氮廢物太高、缺氧、饑餓、高溫或水溫急劇變化、餌料等因子都有報導。其進入魚體的路徑是經由皮膚及消化道或兩者。香魚帶病原菌可能是經由眼睛 (Miyazaki and Jo, 1985)。產氣單胞菌會隨不同的菌株而有不同致病性，最近已將過去的產氣單胞菌細分為五種 (Balows *et al.*, 1991) 即 *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*，而從魚及池水所分離的大部分是 *A. hydrophila* 及 *A. Sobria* (Ysabel *et al.*, 1988)。臺灣的赤鰭病鰻出現於春、夏、秋三季，但以春、秋兩季較多。

產氣單胞菌與魚類的免疫力有很大的關連性，魚體的健康條件決定病原之感染與否，環境受重金屬鎘及有機物 Hexachlorocyclohexan 污染會減低魚之免疫力 (Saxena *et al.*, 1992) 此病原菌產生溶血毒 Hemolysin 及壞死毒 Necrotic toxin 具 proteolytic activity 造成組織壞死 (Allan and Stevenson, 1981)。Ysabel 等發現魚的病株具病原性的腸內毒素

enterotoxin。培養產氣單胞菌條件不同其溶血毒對宿主有種別性 (Nzeako *et al.*, 1991)，在鱈魚發現 *A. hydrophila* 產生的內毒素會縮短 prothrombin time，使得血液凝固作用發生改變 (Miller and Levin, 1984)。注射 *A. hydrophila* 到鯉魚觀察其組織生理及初級免疫變化的研究發現，抗原隨循環最初出現在脾臟的橢圓體 (ellipsoids)、頭腎及後腎，隨後擴散分布至全身，抗體在第 9 天開始顯著增加，並於 15 天後達到巔峰 (Lamers COR, 1986)，*Aeromonas* 在感染鱈幼魚可在 7 天內引起致死 (Kuge *et al.*, 1992)。

本研究係比較產氣單胞菌之自然感染及人工感染鱈之病理及組織免疫之結果。

## 材 料 及 方 法

### 自然感染

病鱈兩尾 150 公克採自鹿港輔導會養殖場 1992 年 8 月，觀察外部症狀並照像 (圖 1)，病鱈顯示虛弱，背鰭紅腫並有些許潰瘍出現。由患部血液及內臟分離，培養 TSA (tryptic soy agar, Difco Co.) 並鑑定病原菌 (ID test EB 20 kit, 日水製藥株式會社)，菌種保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  TBS broth 含 25% 甘油中，並採血作抹片，取出內臟及組織以 Bouin's 液固定、酒精脫水、石臘包埋，製備 3~5  $\mu\text{m}$  切片，並以 H-E、Giemsa 染色、PAS 反應試驗，以顯微鏡觀察照像。

### 人工感染

鱈魚 (200 公克左右) 10 尾買回後先在實驗室馴養 3-5 天，以皮下注射的方式，分別注射菌液 (原液以滅菌過的生理食鹽水 0.85% NaCl 稀釋)  $10^6$ 、 $10^8$  CFU 各 4 尾及滅菌過的生理食鹽水當對照組注射 2 尾。經 3 天後，將實驗魚冰浴並由體軀幹穿刺採血，兩星期後，犧牲並採血 (由心臟)，內臟取出以 Bouin 液固定，石臘包埋 (Shandon Citadel 1000)，注射後第五天採血並做血液抹片，以 Giemsa 及 PAS 染色，兩星期後犧牲取出內臟組織及患部，用 Bouin 液固定，經石臘包埋後作成切片，以 Giemsa 及 H-E 染色 PAS 反應、觀察並照像。

## 結 果

### 病原菌的鑑定

患部及血液所分離之病原菌生化特性詳見 Table 1。

Table 1 : The biochemistry characteristic of the pathogenic bacteria.

character	response
production of	
H <sub>2</sub> S	-
Indole	+
lysine decarboxylase	-
arginine dihydrolase	+
ornithine decarboxylase	-
β-galactosidase	+
degradation of	
aesculin	+
urea	-
V-P reaction	+
utilization of sodium citrate	+
production of acid from	
maltose	+
adonitol	-
inositol	-
raffinose	-
rhamnose	-
sorbitol	-
sucrose	-
mannitol	-
arabinose	-

#### 自然感染病鰻之組織病理觀察

未受感染部位的表皮組織沒有顯著發炎反應，唯皮下真皮層沿疏結締組織出血，並有炎性細胞浸潤及血纖維滲出（圖 1）。嚴重的部位表皮發生潰瘍且其周邊表皮發生薄層化，其真皮層產生瀰漫且濾出性出血，不論是疏結締組織、密結締組織及脂肪層，皆有血斑及出血巢出現（圖 2）。在疏結締組織皆有組織球、淋巴球、單核球大量浸潤 infiltration，偶而有多核巨細胞出現（圖 3）。大病灶分布在脂肪組織層及紅肌層，形成巢狀

出血，並有很多滲出液貯積在其中（圖 4）。病原菌沿著血液擴展開來，在肌束膜之間蔓延，並建立起局部性的小病灶，炎性小圓淋巴球浸潤及局部肌纖維壞死（圖 5），此為菌血演發到敗血症之間的特徵。肝細胞萎縮，混濁腫脹並有脂肪變性，局部小圓淋巴球浸潤於肝細胞間（圖 6），脾莢組織 (sheath artery) 大量斑狀壞死（圖 7）。腸上皮小淋巴球浸潤，粘膜固有層微血管擴張、發炎，粘膜上皮剝離形成卡它性腸炎（圖 8）。腎臟細尿管上皮細胞混濁腫脹，變性壞死，絲球體崩壞及造血組織局部萎縮及壞死（圖 9）。

### 人工感染之結果

經注射菌液造成之病鰻其多形核球 (PMN) 有增加的趨勢（圖 13），比起對照組（圖 11）這些多形核球大多是單核球 (monocyte PAS negative) 而非中性球（中性球為 PAS positive，圖 10、12），在發病個體組織切片的血管中亦可發現多形核球之存在（圖 14）。

由皮下注射菌體產生菌血，細菌隨血行運行並在注射部位形成較大病灶，沿著細菌增生且發生炎性細胞浸潤，紅肌及脂肪組織間大量出血，並在肌束間擴展開來，引起肌纖維溶解性壞死（圖 15），此時鰻周邊防禦系統相當活躍，巨細胞吞噬作用非常明顯。受產氣單胞菌侵入後，鰻主要免疫反應來自脾臟及腎臟。脾的莢組織 (sheath artery) 顯著擴大，部分受侵襲的部位則呈現壞死（圖 16、17），脾之紅髓 (red pulp) 內充有相當量的紅血球，其鄰近之莢組織細胞出現增生之反應（圖 18）。

腎臟：病原菌侵入後，沿腎動脈血管周邊的造血組織發生萎縮並向皮質部擴展（圖 19）。造血細胞與細胞間呈現疏鬆狀，或脫離其內皮細胞壁，有些則產生壞死或出空的現象，與其相鄰的細尿管則有 cloudy swelling 之變性（圖 20）。離腎動脈較遠端之造血組織其細胞有絲分裂活躍，細胞仍處在緻密狀態（圖 21），在腎靜脈周邊形成嚴重的發炎反應，其造血組織亦有發炎病灶之產生（圖 22），甚至在鮑氏囊前端產生發炎反應（圖 23）。這些反應會引起鮑氏囊內的絲球體發生液化壞死（圖 24），甚至進而造成絲球體、造血組織溶解消炎（圖 25）。

肝臟：在肝臟方面則引起嚴重肝炎及脂肪變性之產生（圖 26）。

## 討 論

產氣單胞菌自然感染的病鰻並無全身鱗皮內出血的通紅病徵。*Aeromonas hydrophila* 病原菌來自人體或魚，其生化反應並無顯著的差異。人工感染與自然感染病原之病鰻在皮膚、肌肉、肝臟、腎臟、脾臟之病理切片顯示有相同的病變，但人工感染之病鰻沒發生腸之粘膜下層腫脹鬆開及粘膜層剝離的現象。推測是否因人工注射感染其病原侵入的部位不同，對鰻之侵害性有差異。產氣單胞菌對病鰻侵害後，病鰻之血液中之淋巴球、單核球增多，組織中之內皮細胞及巨細胞較多，但血液和組織中之中性球則並無明顯增加，鰻之單核球可能是由腎臟的造血組織分化而來。鰻對產氣單胞菌的免疫主要發生在侵入傷口之周邊、腎臟及脾臟的內皮系統。至於胸腺能否作用則有待進一步研究。

目前有關產氣單胞菌會產生毒素的報導很多其毒素具有蛋白溶解性 (proteolytic)，溶血性 (hemolytic) 或細胞毒性 (cytotoxic)。導致鰻組織呈現敗血症狀，肌纖維壞死溶解現象，及腎元、腎小管、造血組織溶解性壞死等症狀。故推測鰻魚致死除病原毒素可抑制宿主產生大量之中性球外也可因宿主之白血球產生過度的免疫反應引起造血組織受到嚴重破壞而導致腎元、細尿管壞死。至於肝臟之炎性細胞浸潤，脂肪肝之產生是否與中毒有關則有待進一步研究。

故本研究結論不論鰻魚是由自然或人工感染 *Aeromonas hydrophila* 皆有肌肉壞死、敗血、出血、脾損壞、脂肪肝、腎造血組織萎縮、腎元壞死之症狀，這些症狀之病因可能是由於 *Aeromonas hydrophila* 所產生之毒素具蛋白質溶解性，溶血性及細胞毒性，進而破壞病鰻之肝臟及造血系統。

## 謝 誌

本研究承農委會提供經費支持 (82 科技 2.11-漁-05 (4))，又承臺大郭光雄教授、陳秀男教授等的大力協助，鹿港水產試驗所及輔導會養殖處彰化分場李福銓先生提供病鰻，生理所王錫崗教授的鼓勵，學生陳建榮幫忙打字得以完成，謹此致謝。

## 參 考 文 獻

Allan, B.J. and R.M.W. Stevenson (1981) Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. Can J. Microb 27:1114-1122.

- Balows, A., W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H. J. Shadomy (ed.) (1991) *Aeromonas* and *Plesiomonas*, p36-401. Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Kuge, T., K. Takahashi, I. Barcs and F. Hayashi (1992) *Aeromonas hydrophila*, a causative agent of mass mortality in cultured Japanese catfish larvae (*Silurus asotus*) *Gyobyo kenkyu*, 27 (2) : 57-62.
- Lamers COR H. J. (1986) Histophysiology of primary immune response against *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.) *The J. of Experiment Zoology* 238 : 71-80.
- Miller, T. K. and J. Levin (1984) The effects of multiple injections of bacterial endotoxin on blood coagulation in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biol. Bull.* 166 : 189-205.
- Miyazaki T. and Y. Jo (1985) A histopathological study of motile aeromonad disease in ayu. *Fish Pathology* 20 (1) 55-59.
- Nzeako, B.C., T.S. Hastings and A.E. Ellis (1991) Cultural conditions for *Aeromonas hydrophila* affect the production of haemolysins with differing host specificities. *Antonie van Leeuwenhoek* 60 : 67-72.
- Saxena, M. P., K. Gopal, W. Jones and P. K. Ray (1992) Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 48: 194-201.
- Ysabel, S., A.E. Toranzo, J.L. Barja, T.P. Hieto, and T.G. Villa (1988) Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity*, Pec. 3285-3293.

圖 版 說 明

- Fig. 1. An eel appeared portion in red at dorsal fin and a protrude with hemorrhage in trunk after infection by *Aeromonas hydrophila*.
- Fig. 2. Dermis hemorrhage and fibrinoid degeneration were observed in ulcer peripheral area. (H-E stain, X175)
- Fig. 3. Severe hemorrhage in stratum spongiosum and stratum compactum in domain skin ulcer portion. (H-E stain, X175)
- Fig. 4. Eosinophilic exudate fluid, lymphocytes and WBC infiltration were surrounded red muscle layers and fatty tissue. (H-E stain, X175)
- Fig. 5. Septicemia lesion in the muscle layer: lymphocytes and fibrin exudation around skeletal muscles and focal muscle necrosis.
- Fig. 6. Liver cells atrophy with fatty degeneration and focal lymphocytes infiltration lesion were appeared in hepatic tissue. (H-E stain, X175)
- Fig. 7. Focal sheathed artery necrosis in spleen. (H-E stain, X350)
- Fig. 8. Submucosal inflammation and mucosal dissociation were appeared in intestine. (H-E stain, X175)
- Fig. 9. Renal tubules showed cloudy swelling degeneration, necrosis of Bowman's capsule, and hematopoietic tissue atrophy. (H-E stain, X350)
- Fig. 10. Normal neutrophilic cells stained with PAS. (H-E stain, X350)
- Fig. 11. Normal blood smear stained with Giemsa. (X875)
- Fig. 12. Blood smear after challenge with *Aeromonas hydrophila* stained by PAS. (X350)
- Fig. 13. Blood smear after challenge with *Aeromonas hydrophila* stained by Giemsa, PMN was increased dramatically. (X875)
- Fig. 14. PMN in blood vessels was showed dramatically increased in section. (Giemsa stain, X350)
- Fig. 15. Musculari tissue liquefacient necrosis in the skeletal muscles. (H-E stain, X350)
- Fig. 16. Spleen sheathed arteries showed swollen proliferation. (H-E stain, X175)
- Fig. 17. Spleen sheathed arteries showed focal necrosis (H-E stain, X350)

Fig. 18. Spleen red pulp engorged with red blood cells and sheathed endothelial cells proliferation. (H-E stain, X175)

Fig. 19. Hematopoietic tissue atrophy around renal artery and developed toward renal cortex. (H-E stain, X175)

Fig. 20. Intercellular space of renal hematopoietic cells increased by detached from the endothelial cells. (H-E stain, X175)

Fig. 21. Hematopoietic tissue around distal cortex showed active proliferation state and intact. (H-E stain, X350)

Fig. 22. Both renal hematopoietic tissue and renal vein showed inflammation. (H-E stain, X350)

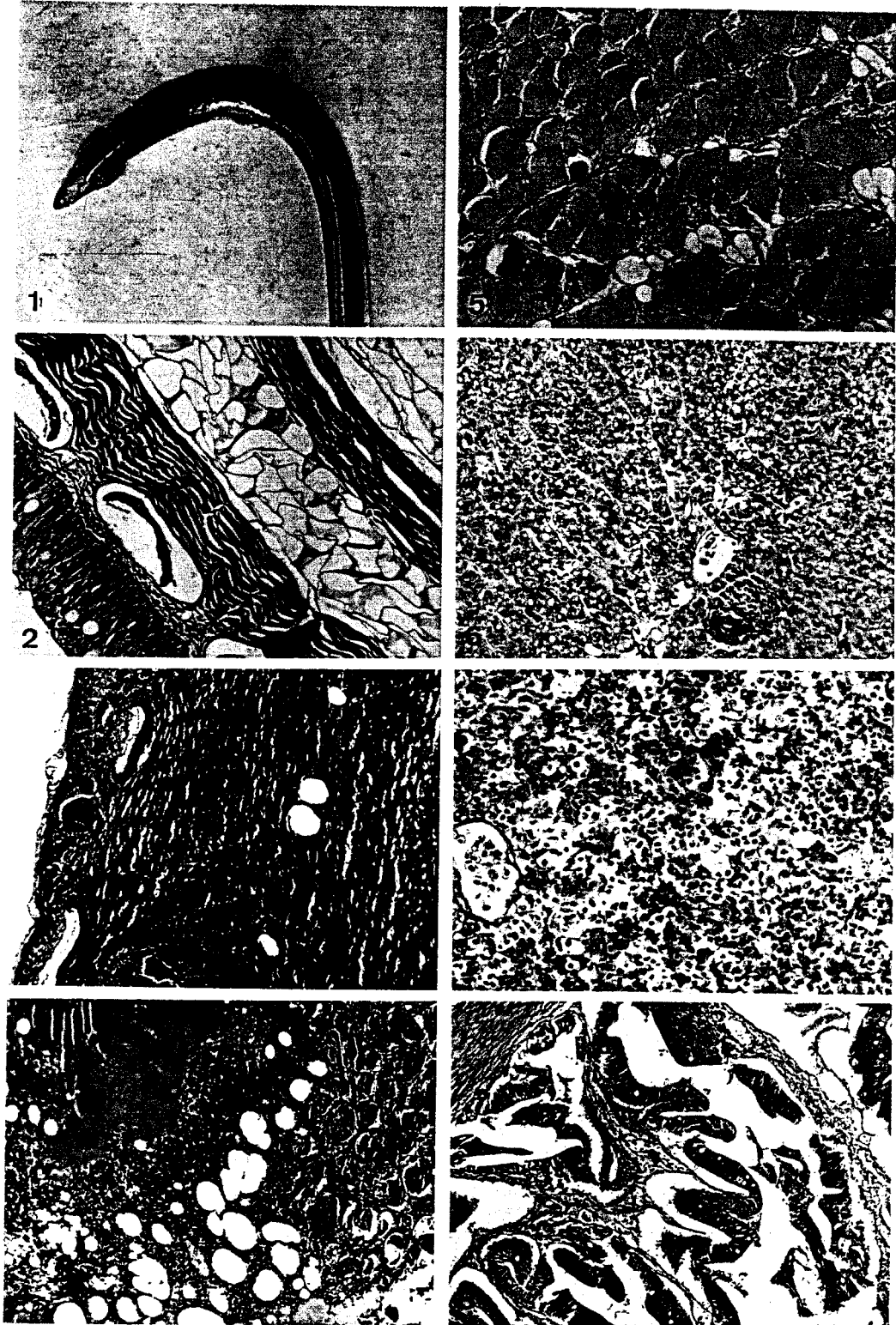
Fig. 23. Renal hematopoietic tissue around Bowmen's capsule showed inflammation. (H-E stain, X350)

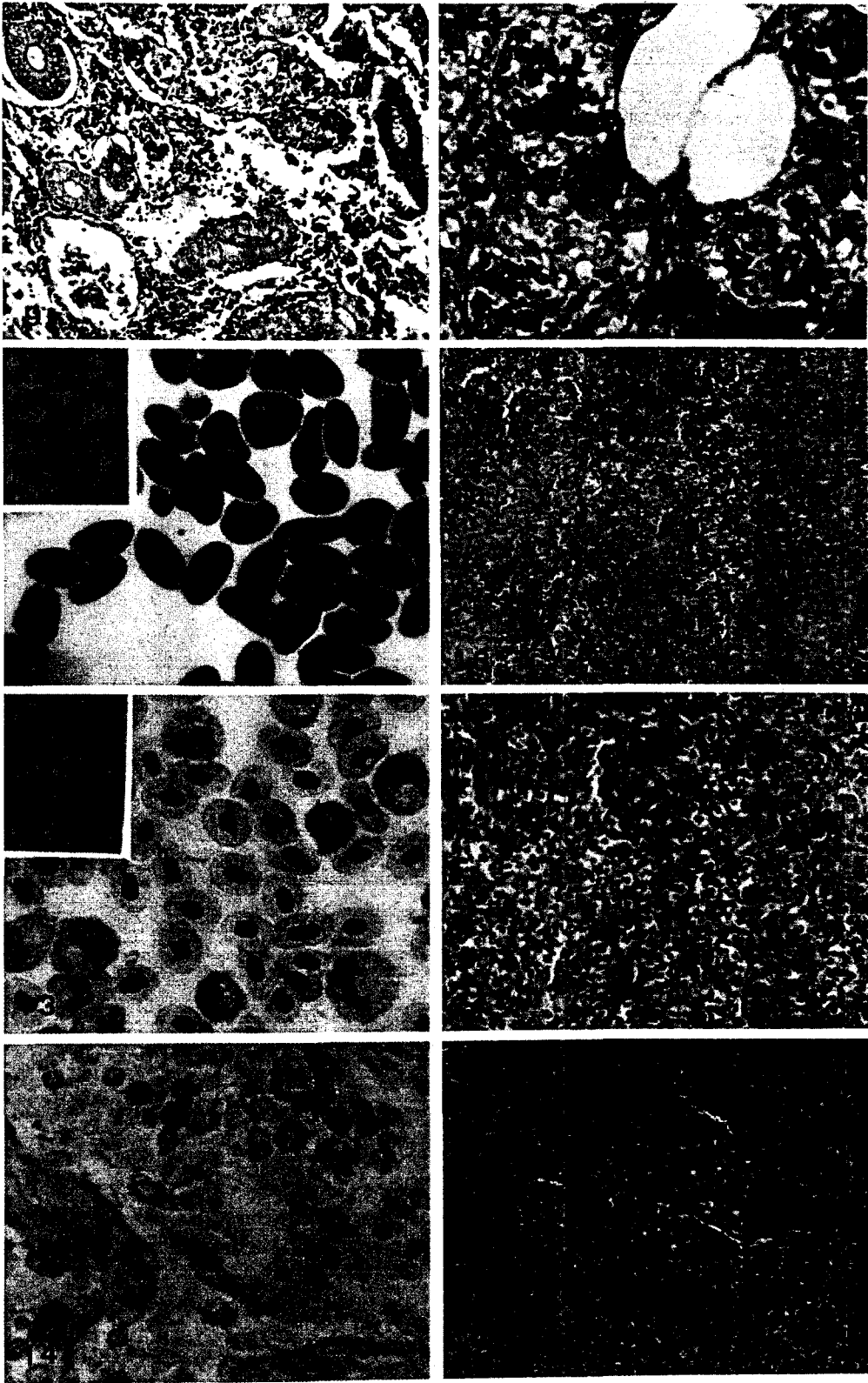
Fig. 24. Glomerulus showed focal liquefacient necrosis. (H-E stain, X175)

Fig. 25. Necrosis lesion in renal glomeruli and hematopoietic tissue. (H-E stain, X350)

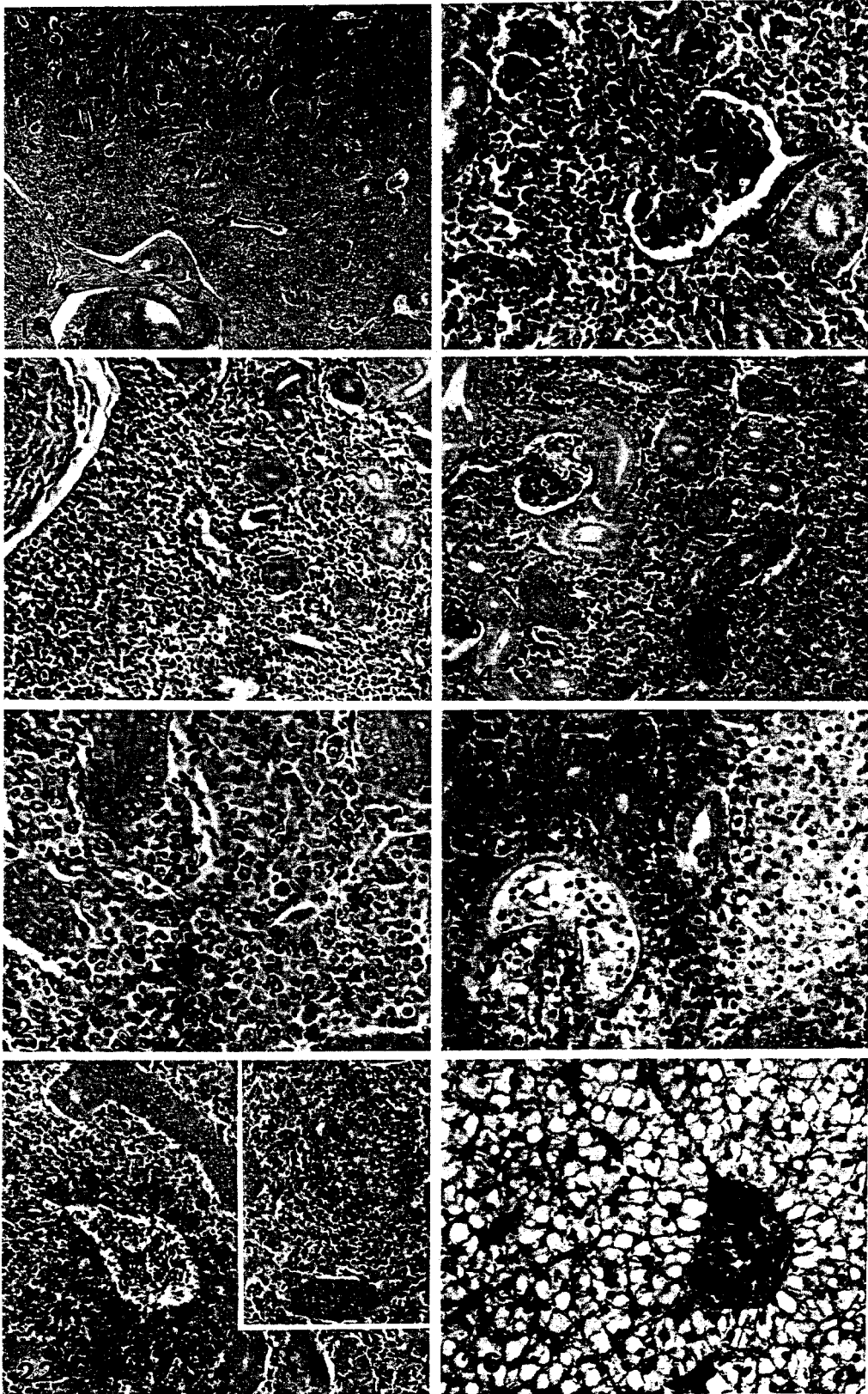
Fig. 26. Severe fatty liver degeneration and blood vessels inflammation in victim eels. (H-E stain, X350)

赤錆病原菌對鰻之病理生理研究





赤鱗病原菌對鰓之病理生理研究



## Histopathological study of *Aeromonas hydrophila* in Eel (*Anguilla japonica*)

Chau Heng Chien and Eileen J. Chieh

*Department of Physiology, National Yang-Ming Medical College, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

This histopathological study characterized the natural and artificial infections of *Aeromonas hydrophila* in eels. *Aeromonas hydrophila* was isolated independently from human and rainbow trout. The inflammation of digestive tract was observed mainly in victims of natural infection but absent in the artificial victims. Muscle bundle liqueficient necrosis, septic hemorrhage, spleen damage, fatty liver, renal hematopoietic tissue atrophy and necrosis in nephron were common symptoms in each victim infected by *Aeromonas hydrophila*. These results suggest that the pathological characteristics in (*Anguilla japonica*) eels may be due to the proteolytic, hemolytic, and cytotoxic attacks of liver and hematopoietic systems by the toxin from *Aeromonas hydrophila*.