

水产动物疾病学实验指导书

邹文政 陈晓凤 宋振荣 鄢庆枇

集美大学水产学院

2005.9.1

目录

实验须知.....	1
实验一 培养基的制备	2
实验二 水产动物微生物病原的分离与纯化.....	5
实验三 人工感染试验	6
实验四 细菌的计数	9
实验五 微生物性病原体形态观察	11
实验六 水产动物常见病及病原体观察	13
实验七 水产动物疾病的常规诊断	16
实验八 微生物的药物敏感性测定	30
实验九 水产动物的药物毒性试验	35
实验十 水产动物疾病的病理组织观察	36

实验须知

1. 每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。
2. 认真及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需记下每次观察的现象和结果，以便分析。
3. 实验室内应保持整洁，勿高声谈话和随便走动，保持室内安静。
4. 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，若遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时、应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。
5. 实验过程中，切勿使酒精、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时用灭火器。
6. 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护。对消耗材料和药品等要力求节约，用毕后仍放回原处。
7. 每次实验完毕后、必须把所用仪器抹净放妥，将实验室收拾整齐，擦净桌面，如有菌液污染桌面或其他地方时，应用 3% 来苏尔液或 5% 石炭酸液覆盖其上半小时后擦去，如系芽孢杆菌，应适当延长消毒时间。凡带菌之工具(如吸管、玻璃棒等)在洗涤前须浸泡在 3% 来苏尔液中进行消毒。
8. 每次实验需进行培养的材料，应标明自己的组别及处理方法，放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等，未经教师许可，不得携出室外。
9. 每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，并连同思考题及时汇交教师批阅。
10. 离实验室前应将手洗净，注意关闭门窗、灯、火、煤气等。

实验一 培养基的制备

I 微生物学实验室常用的器皿

微生物学实验所用的器皿，大多要进行消毒、灭菌和用来培养微生物，因此对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。玻璃器皿一般要求硬质玻璃，才能承受高温和短暂烧灼而不致破裂；玻璃器皿的游离碱含量要少，否则会影响培养基的酸碱度；玻璃器皿的形状和包装方法要求能防止污染杂菌为准；洗涤玻璃器皿的方法不当也会影响实验的结果。

一、器皿的种类、要求与应用（详细内容见《微生物学实验》）

1. 试管(test tube)
2. 德汉氏小管(Durham tube)
3. 小塑料离心管，又称 Eppendor 管。
4. 吸管(pipette)
 - (1) 玻璃吸管(glass pipette)和吸气器(aspirator)
 - ① 玻璃吸管
 - ② 吸气器
 - (2) 微量吸管(micropipette)
5. 培养皿(Petri dish)
6. 三角烧瓶(Erlenmeyer flask)与烧杯(beaker)
7. 注射器(injector)
8. 载玻片(slide)与盖玻片(coverlip)
9. 双层瓶(double bottle)
10. 滴瓶(dropper bottle)
11. 接种工具

接种工具有接种环(inoculating loop)、接种针(inoculating needle)、接种钩(inoculating hook)、接种铲(inoculating shovel)、玻璃涂布器(glass spreader)等。

二、玻璃器皿的清洗方法（详细内容见《微生物学实验》）

一般包括如下内容：

1. 新玻璃器皿的洗涤方法
2. 使用过的玻璃器皿的洗涤方法包括
 - (1) 试管、培养皿、三角烧瓶、烧杯等洗涤。
 - (2) 玻璃吸管的洗涤
 - (3) 载玻片与盖玻片的洗涤

三、培养皿的包装

1. 培养皿的包装
2. 吸管的包装
3. 试管和三角烧瓶等的包装

II 培养基的制备（详细内容见《微生物学实验》）

牛肉膏蛋白胨培养基的制备

一、目的要求

1. 明确培养基的配制原理。
2. 通过对牛肉膏蛋白胨培养基的配制，掌握配制培养基的一般方法和步骤。

二、基本原理

牛肉膏蛋白胨培养基的配方如下：

牛肉膏	3.0g	蛋白胨	10.0 g
NaCl	5g	琼脂	15~20g
水	1000ml	pH	7.4~7.6

三、器材

1. 溶液或试剂 牛肉膏，蛋白胨，K₂CO₃，琼脂，1 mol/L NaOH，1mol/L HCl。

2. 仪器或其他用具 试管，三角烧瓶，烧杯，量筒，玻棒，培养基分装器，扭力牛角匙，高压蒸汽灭菌锅、pH 试纸 (pH6.8~8.0)，棉花，牛皮纸，记号笔，麻绳，纱布等。

四、操作步骤 (详细内容见《微生物学实验》)

1. 称量
2. 溶化
3. 调 pH
4. 过滤
5. 分装
 - (1) 液体分装
 - (2) 固体分装
 - (3) 半固体分装
6. 加塞
7. 包扎
8. 灭菌
9. 搁置斜面
10. 无菌检查

III 消毒与灭菌 (详细内容见《微生物学实验》)

消毒 (disinfection) 与灭菌 (sterilization) 两者的意义有所不同。消毒一般指消灭病原体和有害微生物的营养体而言，灭菌则是指杀灭一切微生物的营养体、芽孢和孢子。消毒与灭菌的方法很多，一般可分为加热、过滤、照射和使用化学药品等方法。

一、加热法

又分为干热灭菌和湿热灭菌两类。

1. 干热灭菌
2. 湿热灭菌
 - (1) 高压蒸汽灭菌法
 - (2) 常压蒸气灭菌法
 - (3) 煮沸消毒法
 - (4) 超高温杀菌

二、过滤除菌

三、辐射灭菌

四、化学药品灭菌

实验二 水产动物微生物病原的分离与纯化

一、目的要求

1. 掌握倒平板的方法和了解几种常用的分离纯化微生物的基本操作技术。
2. 掌握平板分离法。

二、基本原理（详细内容见《微生物学实验》）

从混杂的微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。常用的方法有：简单位细胞挑取法和平板分离法。

三、器材

1. 培养基 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。
2. 溶液或试剂 无菌水，无菌生理盐水。
3. 水产动物 患细菌性疾病的水产动物（鱼、虾等）
4. 仪器或其他用具 无菌吸管，接种环，酒精灯，无菌培养皿，显微镜，解剖工具等。

四、操作步骤（详细内容见《微生物学实验》）

1. 倒平板 将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基加热溶化，待冷至 55~60℃时倒入无菌培养皿，即成平板。倒平板的方法：（详细内容见《微生物学实验》）

2. 划线（详细内容见《微生物学实验》）

水产动物病灶部位细菌的分离：

分离鱼体表面的病原菌：取病灶部分小片，接种于适当的培养基使它发育，或直接用接种环挑取病灶组织在固体平板培养基中进行划线分离。

分离其他器官和组织内的病原菌：用浸过 0.1%升汞或 75%酒精的纱布覆盖体表，进行鱼体表面消毒。若为内部器官，如肠、肝、肾等则用无菌手续剖开腹部后，取出病变器官，用灼热铁片或解剖刀片烫器官或组织表面后，再用接种环取出其里面材料进行划线分离。

3. 挑菌落 一般在 28~35℃下培养 18~24h 后，挑取形态一致的单个优势菌落再进行划线分离培养，直至获得纯化的菌株，最后转种到营养琼脂斜面保存，备用。

实验三 人工感染试验

一、目的要求

掌握对水产动物人工感染的操作方法。

二、基本原理

将从水产动物病灶部位分离的纯培养，分别接种于新鲜的琼脂斜面上，28℃恒温培养 16~20h 后，用无菌生理盐水洗下菌苔，制成菌悬液，以 McF3 管（或在显微镜下用血球计数板直接计数，也可用光比浊计数法计数）对菌悬液浓度进行估算，使得最后菌悬液的浓度为 $1\sim 9\times 10^8$ cfu /ml。后接种到健康水产动物中，进行感染试验。在试验期间（一般为 1~2 周）观察被感染的水产动物发病情况是否与自然发病症状一致，旨在进一步确定所分离的细菌是否为该种水产动物的致病菌。

人工感染试验的接种方法有浸泡、口服、注射、涂抹等。究竟选用哪一种方法最合适，需要根据不同疾病类型和可能的侵入途径而定。如体表的病，可采用浸泡法；是体内的病，可采用口服、注射等。本实验着重介绍注射法。

经过多次反复试验（包括再分离再感染）后，根据其出现的病症，便可知其所分离的细菌是否具有致病性，然后经一系列的形态和培养特征观察、生理生化反应测定等来确定其分类位置或属何种细菌，并通过药敏试验确定采用何种药物进行预防和治疗，为水产养殖者提供科学依据。

三、器材

1. 健康水产动物 鱼、虾等（注：与分离病原菌的水产动物一致）。
2. 仪器或其他用具 显微镜，解剖镜；灭菌生理盐水，注射器，针头，镊子，消毒煮沸器，碘酒棉花或酒精棉花，解剖盘，纱布及玻璃器皿，麦氏比浊管等。

四、操作步骤

1. 注射器的准备与消毒

（1）选择大小适当而针筒与筒心号码一致的注射器，并先吸入清水，试其是否漏水，漏水的注射器不能使用，因其注射量不准确，而且注射材料可能

为病原菌，会污染环境。

(2) 视选择的动物及注射途径之不同而选用不同长短大小的针头，并先试验是否通气或漏水（由于市售针头大小的编号比较混乱，本实验一般用老编号或直接用长短表示）。

(3) 消毒时将筒心从针筒中拔出，用一块纱布先包针筒，后包筒心，并使两者在纱布内的方向一致，包好后，置煮沸消毒器中。选好的针头包以纱布，置煮沸消毒器之另一端。同时放入镊子一把，加入自来水，以淹没注射器为度，煮沸消毒 10 分钟。

(4) 消毒完毕后，用镊子取出注射器，置筒心于针筒中，并将针头牢固地装于注射器的针嘴上，使针头的斜面与针筒上的刻度在一条直线上。

(5) 吸入注射材料，并将注射器内的空气排尽，若注射材料具有传染性，则排气时应以消毒棉花包扎住针头，以免传染材料外溢而污染环境。准备注射。

目前，一般用一次性注射器，上述操作可以不进行。

2. 菌悬液的准备

(1) 吸取灭菌的生理盐水约 5ml，注入预先培养的菌斜面培养物上，将菌苔洗下。

(2) 用无菌吸管吸取洗下菌液，注入无菌小试管或小烧杯中。

(3) 取一与比浊管同质量的小试管，加洗下的菌液约 1ml，再加生理盐水 4ml（或更多，视原菌液浓度而定），混均后与各比浊管比浊，使其与第 3 管的浊度相近，菌浓度约为 $1 \sim 9 \times 10^8$ cfu/ml，记下所用生理盐水的量。

(4) 稀释 用生理盐水将洗下的原菌液稀释至每毫升含菌为 $1 \sim 9 \times 10^8$ cfu/ml。

2. 注射

(1) 为了实验进行更顺利，在注射时，一般需要两个人进行，助手将预先暂养一周左右的实验动物（鱼）抓住放入解剖盘内的纱布上，一手抓住头部，一手抓住尾部，将鱼体背部向上。注意不能让鱼进行挣扎，以免在注射时将鱼体皮肤划伤。

(2) 注射者用以灭菌的注射器吸入稀释好的菌液，并赶走注射器内的气泡，准备注射。

(3) 注射前先用碘酒棉花或酒精棉花消毒鱼体背部皮肤，注射者以预先准备好的带针头（可用 4 号）的注射器（内装稀释后的菌液），刺入被消毒处的肌肉，注射 0.2ml/尾的菌悬液。注射时要缓缓推动筒心，不能太快。然后拔出注射器，再次用碘酒棉花或酒精棉花消毒鱼体被注射处。

(4) 为了使实验数据更有说服力，还应用生理盐水注射相同数量（用菌液注射的鱼体尾数）的鱼体，设为对照组，注射方法同上一步骤。

3. 观察

注射完后将鱼体放入水体，对其进行常规的管理（一般应进行 1~2 周，随时进行观察，看是否有病症出现，如有，记录病症，并与自然发病症状比较，如果症状一致，说明注射菌具有致病性（在条件允许的情况下，应对其进行细菌的重分离，以便进一步的研究）；否则，说明注射菌可能不具有致病性。

实验四 细菌的计数

基本原理：（详细内容见《微生物学实验》）

I 显微镜直接计数法 （详细内容见《微生物学实验》）

一、目的要求

二、基本原理

三、器材

1. 菌种 自分离病原菌或大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母。
2. 仪器或其他用具 血细胞计数板，显微镜，盖玻片，无菌毛细滴管。

四、操作步骤（详细内容见《微生物学实验》）

1. 菌悬液制备
2. 镜检计数室
3. 加样品
4. 显微镜计数
5. 清洗血细胞计数板

II 平板菌落计数法 （详细内容见《微生物学实验》）

一、目的要求

二、基本原理

三、器材

1. 菌种 自分离病原菌或大肠杆菌菌悬液。
2. 培养基
3. 仪器或其他用具

四、操作步骤 （详细内容见《微生物学实验》）

1. 编号
2. 稀释
3. 取样
4. 倒平板
5. 计数

III 光电比浊计数法 （详细内容见《微生物学实验》）

一、目的要求

1. 了解光电比浊计数法的原理。
2. 学习、掌握光电比浊计数法的操作方法。

二、基本原理（详细内容见《微生物学实验》）

三、器材

1. 菌种 酿酒酵母培养液。
2. 仪器或其他用具 721 型分光光度计，血细胞计数板，显微镜，试管，吸水纸，无菌吸管、无菌生理盐水等。

四、操作步骤（详细内容见《微生物学实验》）

1. 标准曲线制作
2. 样品测定
3. 根据所测得的光密度值，从标准曲线查得每毫升的含菌数。

一、目的要求

二、基本原理

三、器材

四、操作步骤

(一)改良的 Schaeffer-fulton 氏染色法

- | | | |
|----------|-------|---------|
| 1. 制备菌悬液 | 2. 染色 | 3. 涂片固定 |
| 4. 脱色 | 5. 复染 | 6. 镜检 |

(二)Schaeffer-Fulton 氏染色法

- | | | |
|-------|-------|-------|
| 1. 制片 | 2. 染色 | 3. 水洗 |
| 4. 复染 | 5. 水洗 | 6. 镜检 |

IV 细菌的鞭毛染色法 (详细内容见《微生物学实验》)

一、目的要求

二、基本原理

三、器材

四、操作步骤

V 霉菌的形态观察 (详细内容见《微生物学实验》)

一、目的要求

二、基本原理

三、器材

四、操作步骤 (详细内容见《微生物学实验》)

1. 直接制片观察法
2. 载玻片培养观察法

实验六 水产动物常见病及病原体观察

I 水产动物常见病病症的观察

一、目的

了解水产动物常见微生物引起的疾病。

二、内容

观察水产动物常见病的外部症状及剖检症状。

三、材料

患病水产动物的固定标本。

四、方法

直接用肉眼对标本瓶中的固定标本进行观察。

五、要求

- 1、比较各种常见病的基本症状。
- 2、描述所观察的症状。

水产动物常见微生物引起的疾病的描述

一、鱼类微生物寄生性疾病（详细内容见《水产动物病害学》）

- | | |
|---------------|-------------|
| 1. 草鱼出血病 | 2. 传染性胰腺坏死病 |
| 3. 传染性造血组织坏死病 | 4. 病毒性出血败血症 |
| 5. 鲤春病毒血症 | 6. 鱼痘疮病 |
| 7. 淋巴囊肿病 | 8. 鳃出血性开口病 |
| 9. 细菌性烂鳃病 | 10. 白皮病 |
| 11. 白头白嘴病 | 12. 赤皮病 |
| 13. 竖鳞病 | 14. 鲤白云病 |
| 15. 淡水鱼细菌性败血症 | 16. 细菌性肠炎 |
| 17. 打印病 | 18. 鱼类疔疮病 |
| 19. 烂尾病 | 20. 溃烂病 |
| 21. 鳃赤鳍病 | 22. 鳃红点病 |
| 23. 爱德华氏菌病 | 24. 鱼类弧菌病 |
| 25. 链球菌病 | 26. 结节病 |
| 27. 水霉病 | 28. 鳃霉病 |

29. 虹鳟内脏真菌病

二、虾蟹微生物寄生性疾病

- | | |
|----------------|--------------|
| 1. 肝胰腺细小病毒病 | 2. 中肠腺白浊病 |
| 3. 中国对虾病毒性暴发病 | 4. 斑节对虾杆状病毒病 |
| 5. 中国对虾立克次氏小体病 | 6. 对虾烂眼病 |
| 7. 对虾红腿病 | 8. 对虾幼体菌血症 |
| 9. 甲壳溃疡病 | 10. 对虾荧光病 |
| 11. 对虾气单孢菌败血症 | 12. 对虾肠道细菌病 |
| 13. 对虾嗜纤维菌病 | 14. 对虾细菌性烂鳃病 |
| 15. 锯缘青蟹河流弧菌病 | 16. 丝状细菌病 |
| 17. 镰刀菌病 | 18. 链壶菌病 |
| 19. 罗氏沼虾球拟酵母病 | |

三、鳖微生物寄生性疾病

- | | |
|------------|-----------|
| 1. 鳖腮腺炎 | 2. 鳖出血病 |
| 3. 鳖细菌性败血症 | 4. 鳖疔疮病 |
| 5. 鳖黑斑病 | 6. 鳖白底板病 |
| 7. 鳖水霉病 | 8. 鳖毛霉病 |
| 9. 鳖固着类纤毛虫 | 10. 鳖雄性早熟 |

四、贝类微生物寄生性疾病

- | | |
|------------|--------------|
| 1. 三角帆蚌瘟病 | 2. 三角帆蚌细菌病 |
| 3. 皱纹盘的脓疱病 | 4. 贝类幼体面盘解体病 |

五、蛙类微生物寄生性疾病

- | | |
|------------|-----------------|
| 1. 牛蛙红腿病 | 2. 牛蛙脑膜炎脓毒性黄杆菌病 |
| 3. 牛蛙腐皮病 | 4. 牛蛙肠炎病 |
| 5. 美国青蛙膨气病 | 6. 牛蛙水霉病 |

II 寄生虫病原体的观察

一、目的

了解水产动物各类寄生虫病病原体的形态构造及寄生情况。

二、内容

观察水产动物各类寄生虫病病原体的形态构造。

三、材料

水产动物各类寄生虫病原体的玻片标本或临时制片标本。

四、方法

用显微镜观察，先用低倍镜后用高倍镜观察。

五、要求

- 1、比较各同类寄生虫病原体的构造。
- 2、描绘观察结果。

病原体简述（详细内容见《水产动物病害学》）

一、常见原生动植物病原体

- | | |
|--------|---------|
| 1. 碘泡虫 | 2. 单极虫 |
| 3. 两极虫 | 4. 尾孢虫 |
| 5. 小瓜虫 | 6. 肠袋虫 |
| 7. 车轮虫 | 8. 半眉虫 |
| 8. 累枝虫 | 10. 聚缩虫 |

二、常见单殖吸虫病原体

- | | |
|---------|----------|
| 1. 指环虫 | 2. 三代虫 |
| 3. 贝尼登虫 | 4. 异尾异斧虫 |
| 5. 双身虫 | |

三、常见复殖吸虫病原体

- | | |
|-------------|---------|
| 1. 血居吸虫 | 2. 侧殖吸虫 |
| 3. 扁弯口吸虫后囊蚴 | 4. 鲫吸虫 |
| 5. 独孤吸虫 | 6. 盾腹吸虫 |

四、鱼类绦虫、线虫和棘头虫病原体

- | | |
|-----------|-----------|
| 1. 中华许氏绦虫 | 2. 九江头槽绦虫 |
| 3. 毛细线虫 | 4. 嗜子宫线虫 |
| 5. 棘吻虫 | |

五、鱼类甲壳类病原体（详细内容见《水产动物病害学》）

- | | |
|--------|--------|
| 1. 中华鲺 | 2. 锚头鲺 |
| 3. 鱼虱 | 4. 鲺 |
| 5. 虾疣虫 | |

实验七 水产动物疾病的常规诊断

目的： 掌握水产动物疾病基本的诊断方法。

内容： 对患病水产动物进行外部症状的检查、剖检，进一步判别其病因。

材料： 患有微生物疾病的水产动物。

方法： 目检和镜检。

要求： 描述疾病症状以及检查结果。

I. 水产动物疾病的肉眼检查（目检）

1. 目检步骤 在野外调查和生产实践中，目检是检查鱼病的主要方法之一，目检可以从鱼体患病部位找出大型病原体，观察由病原体对机体刺激后引起的反应——表现出各种现象，即通常所称的症状，为诊断鱼病提供依据。

按病原体来说，鱼病可分为病毒性、细菌性和寄生虫性三大类。检查时，一些大型的寄生虫（蠕虫、甲壳动物、软体动物幼虫、体型较大的原生动物等），用肉眼可以识别出来。但有些病原体（病毒、细菌、体型较小的原生动物等），用肉眼是看不见的，就需要根据其症状进行大致的辨别。关于鱼类致病病毒的研究，我国最近几年才开始，还处于试验研究阶段，鉴定过程是比较复杂的。而鱼类致病菌的确定，在我国虽有方法可循，但需要一定的试验设备，训练有素的操作人员和较长的时间，所以当前在一般的鱼病检查及生产实践中，对病毒性病、细菌性病，多根据病鱼表现出的症状，用肉眼诊断，一般病毒性鱼病，常表现充血、发炎、脓肿、腐烂、鳍条基部充血、蛀鳍（鳍的表皮组织腐烂）、竖鳞等病状；而寄生虫性鱼病，常表现出粘液过多、出血、有点状或块状的胞囊、寄生处溃疡等病状。由于病原体种类的不同，其所引起的症状也各异，这些不同的病状，为诊断鱼病提供了依据。

对鱼体要进行检查的部位，包括体表、鳃、内脏等三部分。检查顺序和方法如下：

(1) 体表 将病鱼或刚死的鱼置于白糖瓷盘中，按顺序从头部、嘴、眼、

鳃盖、鳞片、鳍条等仔细观察。在体表上的一些大型病原体（水霉、线虫、锚头蚤、鲺、钩介幼虫等），很容易看到，但有些用肉眼看不出来的小型病原体，则根据所表现的症状，一般会引起鱼体分泌大量粘液，有时微带污泥，或者是头、嘴以及鳍条末端腐烂，但鳍条基部一般无充血现象；复口吸虫病后期，则表现出眼球混浊，呈白内障；细菌性赤皮病，则鳞片脱落，皮肤充血；疔疮病则在病变部位发炎，脓肿；白皮病是病变部位发白，粘液减少，用手摸时有粗糙的感觉；打印病的病变部位产生侵蚀性的腐烂等症状。但有些症状，包括体表、鳃、内脏等症状，在几种不同的病中基本上是一样的，如鳍基充血和蛀鳍，为赤皮病、烂鳃病、肠炎病及部分其它细菌性鱼病所共有的症状之一；又如在大量车轮虫、口丝虫、斜管虫、小瓜虫、三代虫等寄生时，都会在体表或鳃有较多的粘液，应把观察的症状，联系起来加以分析。

（2）鳃 鳃部的检查，重点是鳃丝，首先注意鳃盖是否张开，然后用剪刀把鳃盖除去，观察鳃片的颜色是否正常，粘液是否较多，鳃丝末端是否肿大和腐烂等现象，如是细菌性烂鳃病，则鳃丝末端腐烂，粘液较多；鳃霉病，则鳃片颜色比正常鱼的鳃片颜色较白，略带血红色小点；如果是口丝虫、隐鞭虫、车轮虫、斜管虫、指环虫等寄生虫性疾病，则鳃片上有较多粘液；如是中华鱼蚤、狭腹鱼蚤、双身虫、指环虫以及粘孢子虫等寄生虫，则常表现鳃丝肿大，鳃上有白色虫体或孢囊，鳃盖张开等症状。

（3）内脏 检查以肠为主，先把一边的腹壁剪掉（勿损坏内脏），先观察是否有腹水和肉眼可见的大型寄生虫（鱼怪、线虫、舌状绦虫等）；其次对内脏的外表仔细观察，看是否正常；最后用剪刀从靠咽喉部分的前肠和靠肛门部位的后肠剪掉，取出内脏，置于白搪瓷盘中，把肝、胆、鳔等器官逐个分开，再把肠道中的食物和粪便去掉，然后进行观察，在肠道中比较大的寄生虫如吸虫、绦虫、线虫等容易看到；如果是肠炎，会出现肠壁充血、发炎；球虫病和粘孢子虫病则肠壁上一般有成片或稀疏的小白点。其它内部器官，如果在表面上没有发现病状，可不用检查。

由于目检主要是以症状为依据，所以往往有这样的情况：一、一种病由几

种症状同时表现出来，例如肠炎病，具有鳍条基部充血、蛀鳍、肛门红肿、肠壁充血等症状；另一种是，一种症状在好几种病中都同样出现，如体色变黑、鳍条基部充血、蛀鳍等。这些症状是细菌性赤皮、疔疮、烂鳃、肠炎等病所共有。因此，在目检的时候，应做到认真检查，全面分析，并做好记录，为诊断鱼病提供正确的依据，也为今后的诊断工作积累资料。

2. 常见鱼病肉眼鉴别的症状 鱼有了病，一般都在病鱼体表或体内表现出各种各样的症状。虽然有些症状在许多病中都同样地有所表现，但一般说来，每一种病都有它本身所特有的症状，根据症状，并通过发病水体和周围环境条件的了解，以及病原体的检查等联系起来加以分析，就可对病作出确切的判断。因此，病鱼本身的症状，是诊断鱼病的重要依据之一。

II 水产动物疾病的光学显微镜检查（镜检）

仅凭目检，对病的正确诊断是不够的，因此，除一般较明显而情况又比较简单，凭目检可以有把握地诊断外，一般来说，都有必要进行镜检。例如白头白嘴病是由细菌引起，其病状是头、嘴发白，但又往往与车轮虫病并发，而患车轮虫病的病鱼中，有时也会有个别病鱼头部或嘴部出现轻微的灰白现象，容易被误认为是白头白嘴病。

镜检一般是根据目检时所确定下来的病变部位进行的。在这基础上，进一步全面检查。

一、检查时应注意的事项

(1) 活的或刚死的鱼检查 由于鱼的死亡，寄生虫也很快随着死去，寄生虫死后往往改变形状或崩解腐烂。在活的或刚死的鱼，症状明显，但死了过久的鱼，由于腐烂分解，原来所表现的症状已无法辨别。

(2) 检查的鱼要保持鱼体湿润 因鱼体干燥，寄生在鱼体表的寄生虫，会很快死去。症状也变得不明显或无法辨认。因此，病鱼标本不可让它在空气里干燥。应该放在水桶里（最好用原来的池水）。或用湿布或塑料布将鱼包着。

(3) 取出鱼的内部器官时，要保持器官的完整，检查内部器官时，要小

心地把各个器官逐一取出，并分开放在解剖盘或其他适当的干净的器皿内，避免寄生虫从一个器官跑到另一个器官上。对肠管、胆囊、膀胱等器官，更要注意勿使破损以防内含物和寄生物外流，污染其它器官无法查明寄生虫和寄生部位，从而影响对疾病诊断的正确性。

(4) 解剖的鱼体和取出的器官不能干燥 在检查整个过程中，需要经过相当长的时间，因此对于取出和分开的各个器官，以及解剖开的鱼体，不要让它干掉，最好用湿布或几块而洁净的白纸盖在上面，保持一定的湿润状态。

(5) 用过的工具要洗干净后再用 为了防止诊断时产生寄生虫部位的混乱，在每检查完一个器官时，都要把使用过的剪刀、镊子和吸管之类的工具洗干净后，再用它进行另一器官的检查。

(6) 一时无法决定的病原体或病象要保留标本 检查每一器官，首先用肉眼仔细观察它的外部，如发现寄生虫，可用镊子或解剖针拣出，放到器皿里，并标明是从哪个器官取下的。如发现可能因寄生虫或其它寄生物引起的病象（白点、溃烂等），而肉眼无法判定时，可利用显微镜检查，如仍无法决定则应把这部分组织剪下，保存起来，以便进一步作病理检查（如果器官不大，可把整个器官保存）。

二、 检查方法

在检查比较大的病原体，如蠕虫、蛭类、软体动物幼虫、寄生甲壳动物等，用双目解剖镜比用低倍显微镜便利的多，因为双目解剖镜视野大，较容易操作，但检查比较小的寄生虫时，非用显微镜不可，有时还需要放大到比较高的倍数，才能看清楚。

在检查寄生虫时，对一些较大的寄生虫，可直接放在小玻璃皿或玻片上观察外，目前一般采用两种方法进行检查。

1. 玻片压缩法 取两片厚度约 3~4mm，大小约 6×12cm 的玻片（用普通的玻璃板切成适当大小，边缘磨平即可），先将要检查的器官或组织的一部分（如果器官不大，可将整个器官进行压缩），或将从体表刮下的粘液、肠里取出的内含物等，放在玻片上，滴入适量的清水或生理盐水（体表器官或粘

液用普通水，体内器官或组织用 0.85% 的生理盐水，用另一玻片将它压成透明的薄层即可放在解剖镜或低倍显微镜下检查，检查时把玻片从左到右或从右到左慢慢地移动，仔细地观察，如发现有寄生虫的虫体或胞囊，以及某些可疑的病象，就停止移动，集中视力，将上面一玻片一点一点地平行移开，不要把器官组织或内含物的薄层翻乱，或发生过度的变化，影响原来看到的寄生虫或病象所在的位置，然后用镊子或解剖针、微吸管等，把要取出的寄生虫或出现可疑病象的组织从薄层中取出来，按照寄生虫的种类分别放在盛有清水或生理盐水的培养皿里，以后加以进一步处理。

但是有一点要加以注意的，压缩法对于鱼体外或体内所有的器官、组织或内含物等一般都可适用，但对鳃的检查，却不大适宜，因为鳃组织经过压缩，但发现寄生虫而把玻片移动后，反而不容易找到和取出里面的寄生虫。

2. 载玻片法 载玻片法适用于低倍或高倍显微镜检查，方法是用小剪刀或镊子取出一小块组织或一小滴内含物放在一干净的载玻片上，滴入一小滴清水或生理盐水（滴入的水，以盖上盖玻片后水份不溢出盖玻片的周围为度）。盖上干净的盖玻片轻轻地压平后，先在低倍显微镜下检查，如发现有寄生虫或可疑现象，再用高倍镜观察。

三、检查步骤

检查鱼病时，要有步骤地进行，才不致手忙脚乱，顾此失彼。

1. 编号 首先要将进行检查的鱼标本，在记录表（或记录本）上标定一个号码。编号的方法，通常用双号码，即一条鱼的编号用两种数字表示，例如 10—3 这个编号前一个数“10”表示在调查过程中，已解剖了各种鱼的总数，后一个数“3”表示已经解剖了某种鱼的条数，当一开始调查时，解剖第一条鱼是草鱼，标号为 1—1，第二次解剖的是第一条青鱼，编号为 2—1，第三条解剖的是第二条草鱼，则编号为 3—2，第四次解剖的是第一条鲢鱼，编号为 4—1，以次类推。如果调查的有几个不同地区，在编号前应加上一个地名的简号，例如调查的地区为浙江菱湖，可编号为“菱 10—3”。

2. 记录时间和地点 时间是指检查的月份和日期，地点是自检查的鱼是

从什么地方、什么水体（池塘、水库、湖泊等）中捕捞的，如果从市场购买的，查问不出捕捞地点，就应写明从什么市场购买。

3. 鉴定鱼的种名 检查的鱼，必须正确地鉴定鱼的种名，才能正确了解鱼生的哪一种病。这步工作，具体做起来，也许会碰到不少困难，因为鱼的种类很多，即使是很常见的一些鱼类，也有不少的品种，要仔细和认真对待这一工作。如果碰到有可疑的种类，一时无法判断，就应该把鱼标本保存起来，作进一步鉴定。如果同一种类的标本很容易取得，可保存 2—3 条；如果只有一条标本，这条鱼又要用它解剖检查，可以采取如下的方法：解剖时，可将内部器官全部取出检查，但鱼的身体要留一半（即身体的一边，体表上所有各器官，包括同一边的鳃在内）完整的，写好记录和编号，然后用白布条写上编定的号码（用墨汁写），绑在鳃盖或背鳍、尾鳍上，用 10% 的福尔马林溶液保存起来，已经鉴定的鱼，要记下种名（最好能附上学名），未能鉴定的鱼，除按上述方法保存标本外，要尽可能查明在当地通称的土名。

4. 称重量 称鱼的重量时，如果是鲜活的鱼，要注意避免因鱼跳动而落在地上，把鱼体弄脏，弄脏的鱼，要用清水轻轻洗干净，不要用手或器具刮擦鱼的皮肤，把体表上的粘液或寄生虫逗弄掉。称半斤左右以上的大鱼，可用弹簧秤或普通的秤钩住鳃盖，不要把鳃弄破，以致妨碍检查，半斤以下的小鱼，最好利用普通天平或有盘的秤。

5. 测量鱼的大小 测量鱼的大小，包括全长、标准长和体高三项。

全长：从鱼的吻端到尾鳍的末端。

标准长：从鱼的吻尖到尾部和尾鳍交接处的位置。

体高：身体的最宽处。

测量是最好用卷尺或米尺。

6. 记录年龄 鱼的年龄，可按如下的方法记录：

饲养鱼类：

当年鱼：（1）鱼苗（多少天的）；（2）初期夏花（又称火片或黄瓜子）；（3）后期夏花（又称冬片）。

第二年鱼：(1)春花(多少天的)；(2)二年鱼（春花以后阶段）。

第三年以后的鱼：按三年鱼、四年鱼…等记录。

非饲养鱼类：

可大致分为鱼苗、当年鱼、三年鱼、四年鱼等。

7. 记录性别 有些鱼的雌雄性，从外表容易辨别，而有些鱼的外表差别部明显。尤其在性未成熟时，更不易辨别它的雌雄性。如果从外表不易辨别性别时，可观察它的性腺，作出鉴定。

8. 肉眼检查鱼的体表 放在解剖盘上的鱼标本，首先要注意鱼的颜色和肥瘦等情况，并注意明显的可辨别的病象。例如皮肤上有否擦伤或腐烂，是否长水霉，肌肉是否浮肿，鳃盖是否充血和穿孔，鳍和尾巴是否蛀烂等；再注意表皮和鳞片有无粘附着肉眼可见的寄生虫，用镊子把鳍拉开，对着光仔细检查。在体表各部分，往往发现有白色的粘孢子虫、微孢子虫的胞囊和小瓜子虫的囊泡，有时还发现白色线状的肤孢子虫包在一个囊泡里，鳍上往往会有嗜子宫线虫，呈长短不一的红色粗线状。如果用肉眼不能决定时，就应利用显微镜检查，此外还可见到鱼蛭（鱼蚂蟥）、虱和锚头蚤等，可用镊子把他们取下来，但锚头蚤的头部是插入肌肉里的，应先用镊子将虫体周围鱼的肌肉撕开，再用镊子把它取下，要特别小心，不要把头部拉断。

9. 逐个器官检查 检查各个器官，通常按照下列的顺序进行：(1)粘液*、(2)鳍*、(3)鼻腔、(4)血液、(5)鳃*、(6)口腔、(7)脂肪组织、(8)胃肠*、(9)肝*、(10)脾、(11)胆囊*、(12)心脏、(13)鳔、(14)肾*、(15)膀胱、(16)性腺、(17)眼*、(18)脑、(19)脊髓、(20)肌肉。（注：标“*”是重点检查器官）。

鱼的每一种器官，往往有各类的寄生虫寄生，身体比较大的种类，例如吸虫、线虫、绦虫、棘头虫、鱼蛭、甲壳动物以及软体动物幼虫等等，一般可用压缩法，将器官、组织或内含物等压成薄层，在双目解剖镜下检查，或者把器官或组织的一部分浸在培养皿的清水或生理盐水里，或刮取比较多量的粘液、内含物等放在培养皿里用水或生理盐水充分稀释搅匀，在解剖镜下观察，但是

对于身体细小的原生动物，除了有些胞囊，可以用上述方法进行检查外，必须用载玻片法在显微镜下才能检查。同时，这类细小的寄生虫，一般比较容易死去，因此，在按照上述的顺序检查每一种器官时，必须首先用载玻片法，检查完原生动物之后，才可按检查比较大的各类寄生虫的方法进行检查。各部分的检查方法说明如下：

(1) **粘液** 在鱼的体表，除在上面肉眼检查一节中已说过的肉眼可见的寄生虫、寄生虫胞囊或病象外，往往还有许多肉眼看不见的寄生虫，例如口丝虫、颤动隐鞭虫、粘孢子虫、小瓜虫、车轮虫、以及吸虫囊蚴等。可用解剖刀刮取体表的粘液（附带检查一些鳞片），用显微镜或解剖镜检查。

(2) **鼻腔** 先用肉眼仔细观察，有无大型寄生虫或病状，然后用小镊子或微吸管从鼻孔里取少许内含物，用显微镜检查，可能发现粘孢子虫、车轮虫等原生动物。随后用吸管吸取少许清水注入鼻孔中，再将液体吸出，放在培养皿里（要多吸几次），用低倍显微镜或解剖镜检查，可发现指环虫、鲺等寄生虫。

(3) **血液** 检查血液时，可用如下方法取出：

①从鳃动脉取血——先用剪刀将一边鳃盖剪去，左手用镊子将鳃瓣掀起，右手用微吸管插入动脉或腹动脉吸取血液，如吸取的血液不多，可直接放在载玻片上，盖上盖玻片，在显微镜下检查。如果吸取比较大的鱼，血液较多，可先把血液吸出，放在玻皿里，然后吸取一小滴检查，血液比较多的大鱼，要尽量把血液吸出，否则残余的大量血液流出，沾染鳃瓣，影响检查鳃。当用吸管取血时，必须避免吸管与鳃接触，否则会使寄生在鳃上的寄生虫带到血液里，产生寄生虫寄生位置的混乱。

②从心脏直接取血——从鱼的外表可以确定心脏的位置，是在鱼体腹面两鳃盖之间的最狭处，将这部位的鳞片除去，用尖的微吸管插入心脏，吸取血液，用医用的注射器插入抽血亦可，但用的针头要粗，否则往往因血液凝固而抽不出来。

在显微镜下检查血液，可发现锥体虫、拟锥体虫等原生动物。这些原生动物，身体都很小，一般要用高倍显微镜才容易辨别。原生动物检查完毕，将全

部血液（如果血液很多，可分几次检查）放在培养皿里，用生理盐水稀释，在解剖镜下检查，可发现线虫或血居吸虫等比较大的寄生虫。

(4) 鳃 检查鳃时，要用剪刀将左右两边的鳃完整地取出，分开放在培养皿里，并附上“左”“右”。首先仔细观察鳃上有没有肉眼可见的寄生虫，鳃的颜色和其它病象，并尽量详细地把情况记录下来（左右鳃要分别说明）。肉眼检查完毕，用小剪刀剪取一小块鳃组织，放在载玻片上，滴入适量的清水，盖上盖玻片，在显微镜下检查。鳃瓣是特别容易被寄生物侵害的器官，细菌性或寄生性烂鳃、水霉、鳃霉、隐鞭虫、口丝虫、车轮虫、粘孢子虫、微孢子虫、肤孢子虫、斜管虫、小瓜虫、半眉虫、舌杯虫、毛管虫，以及其它原生动物；指环虫、双身虫等单殖吸虫；复殖吸虫囊蚴、鱼蛭、软体动物幼虫、蚤、鲺等寄生甲壳动物等，在鳃上都往往可以看到，用显微镜检查时，为了得到比较准确的程度，每边鳃至少要检查两片，鳊鱼和鲢鱼还要检查鳃耙，取鳃组织检查时，最好从每一边鳃的第一鳃片接近两端的位置剪取一小块，根据经验，寄生虫大多在鳃小片这两个位置。检查完原生动物后，可把整个鳃放在一块大玻片上，加入清水，在解剖镜（没有解剖镜，则用最低倍的显微镜）下观察，观察时用两根解剖针，把鳃丝逐条拉开，仔细检查，或用镊子把每片鳃片上的含物完全刮下，放在培养皿里，用清水稀释搅匀后，在解剖镜或低倍显微镜下检查。

(5) 口腔 口腔检查，先用肉眼仔细观察上下腭，可能发现吸虫的大孢囊、鱼蛭、锚头蚤、鲺等。肉眼检查后，再用镊子刮取上下腭一些粘液，用显微镜检查，有时可发现车轮虫。

(6) 体腔 体腔检查，首先要将鱼剖开，解剖方法，是用左手将鱼握住（如果是比较小的鱼，可在解剖盘上用粗硬镊子把鱼夹住进行解剖），使腹面向上，右手用剪刀的一枝向肛门插入。先从腹面中线偏向准备剪开的一边腹壁，像横侧剪开少许，尔后，沿腹部中线一直剪至口的后缘。剪的时候，要将插入里的一枝剪尖稍微向上翘起，避免将腹腔里面的肠或其它器官剪破，沿腹线剪开之后，再将剪刀移至肛门，朝向侧线，沿体腔的后边剪断，再与侧线平行地向前一直剪到鳃盖的后角，剪断其下垂的肩带骨，然后再向下剪开鳃腔膜，直到腹

面的切口，将整块体壁剪下，体腔里的器官即可显露出来。这时候不要急于把内脏取出或弄乱，首先要仔细观察显露出来的器官，有无可疑得病象，同时注意肠壁上、脂肪组织、肝脏、胆囊、脾、鳔等有无寄生虫。如果发现有白点，可能是粘孢子虫或微孢子虫，还可发现线虫、绦虫等成虫和囊蚴。肉眼检查完后，接着把腹腔液（如果是患重病的鱼，体腔内还往往有许多半透明状的液体，叫腹水）用吸管吸出，置于培养皿里，用显微镜或解剖镜检查。

检查完腹壁，用剪刀小心地从肛门和咽喉两处，将整条肠的两端剪断，轻轻地把整个消化器官（包括胃肠、肝脏、胆囊、脾脏、脂肪组织）取出来，放到解剖盘上，逐个地把器官分开，依次进行检查。

(7) 脂肪组织 在胃肠的外壁有许多脂肪组织，先用肉眼观察，可发现线虫（往往盘曲成红色的瘤）、绦虫、棘头虫等，如果发现白点，肉眼无法决定时，可用镊子取出，放在载玻片上，盖上盖玻片，轻轻地把它压破，用显微镜检查，可能是粘孢子虫或微孢子虫。同时还可用于压缩法把脂肪组织压成薄层，在解剖镜下检查。

(8) 胃肠 检查胃肠时，首先要把肠的外壁上所有的脂肪组织，尽量除干净，否则，许多脂肪油滴混进肠的内含物里，会妨碍观察。除净脂肪组织后，把肠前后伸直，摆在解剖盘上，有些鱼例如鳙鱼和鲢鱼，肠子特别长，可把肠子作盘绕状摆好，先用肉眼检查，肠外壁上往往有许多小白点，通常是粘孢子虫或微孢子虫的胞囊。肉眼检查完后，通常分前、中、后三部分检查，即在前肠（胃）、中肠和后肠三段上，各取一点，用尖的剪刀从与肠平行的方向剪开一个小小的切口，用镊子从切口取一小滴内含物放在载玻片上，滴上一小滴生理盐水，盖上盖玻片，在显微镜下检查，每一部分同时检查两片，如果有盲囊的鱼，也同检查肠一样进行检查，但不要忘记，当检查完每一部分肠时，要把镊子洗干净后，才可再用来取另一部分的肠内含物。在检查的过程中，不要把肠全部剪开，而要先在前、中、后各段剪开一小口来取内含物，目的是检查原生动动物，如果发现其中某一部分的肠里有些原生动动物，需要把该部分的肠固定保存一小段的标本，为以后作组织切片，观察它的病理或寄生虫的生活史，保

持肠的横切面切片的完整。

胃肠也是最容易被细菌和寄生虫侵袭的器官，其中除了引起肠炎的细菌或病毒外，鞭毛虫、变形虫、粘孢子虫、微孢子虫、球虫、纤毛虫等原生动物和复殖吸虫、线虫、绦虫、棘头虫等都可经常发现，并且往往大量寄生，其中有些寄生虫，寄生的部位比较固定，例如六鞭毛虫、变形虫、肠袋虫等，一般都是寄生在后肠近肛门 1—2 寸的位置，复殖吸虫、绦虫、线虫和棘头虫等通常都是寄生在前肠（胃）或中肠。按上述方法检查完原生动植物后，可用剪刀小心地把整条肠剪开，剪的时候左手用镊子把肠夹住，右手用剪刀从后端插入，插入后肠里的一枝剪尖，要稍微向上翘起，避免把里面的寄生虫剪断，特别是比较大的绦虫，如果不小心，往往被剪成几段，变成不完整的标本，整条肠剪开后，先用肉眼观察，如果发现有大寄生虫先把它取出来，放在生理盐水里，同时注意肠内壁上有无白点，或溃烂和发红发紫等现象。如果有白点，通常是粘孢子虫，有时也会是微孢子虫。在青鱼肠里，有溃烂和表现白色瘤状，往往是球虫大量寄生。如果发红发紫，一般是肠炎，要注意发红发紫的程度。检查完毕后，可把肠按前、中、后三段剪断（如果是小鱼的肠可整条压），用压缩法检查，或把肠的内含物都刮下来，放在培养皿里，加入生理盐水稀释并搅匀，在解剖镜下检查，注意有无吸虫、线虫和棘头虫等的虫体、胞囊或虫卵等等。

此外，在剪开前肠（胃）检查时，同时要注意观察鱼的食物。如果是肉食类的鱼，胃里有小鱼，要注意吃的是什么鱼，数量多少，如有一些浮游生物及其它的个体或残余而未消化的碎片，，尽可能记录下来，必要时把食物的残余收集一些标本保存。了解鱼的食物，对解决某些寄生虫的中间寄主问题，有很大的帮助。

(9) 肝 检查肝脏，先用肉眼观察外表，注意它的颜色，有无溃烂、病变、白点和瘤等表现。在肝的表面，有时可发现复殖吸虫的胞囊或虫体。如果有白点，往往是粘孢子虫、微孢子虫或球虫。外表观察完毕，用镊子从肝上取少许组织放在载玻片上，盖上盖玻片，轻轻压平，在低倍和高倍显微镜下观察，可发现粘孢子虫、微孢子虫等孢子或胞囊，有时还发现吸虫的囊蚴，肝的每一叶

要检查两片，用压缩法检查。

(10) 脾 检查脾脏的手续和检查肝脏相同，往往可发现粘孢子虫的孢子或胞囊，有时也可发现吸虫的囊蚴。

(11) 胆囊 取出胆囊时要特别小心，不要把它弄破，否则胆汁溢出，既会沾染其它器官，产生寄生虫寄生部位的混乱，同时在胆汁中的许多寄生虫，随胆汁溢出，也就检查不出。取出胆囊后，放在培养皿里，先观察外表，注意它的颜色有无变化有无其它可疑的病象等，然后取一部分胆囊壁，放在载玻片上，盖上盖玻片，压平、放在显微镜下观察。胆汁另行检查，在胆囊里，可发现六鞭毛虫、粘孢子虫、微孢子虫，以及复殖吸虫和绦虫幼虫等寄生虫。胆囊壁和胆汁，除用载片法在显微镜下检查外，都要同时用压缩法或放在培养皿里用解剖镜或低倍显微镜检查。

(12) 心脏 用小剪刀剪开围心腔，剪下心脏，最好能把心脏和大的血管一起取下，放在盛有生理盐水的培养皿里。检查完外表之后，把心脏剪开，可发现血居吸虫和线虫。用小镊子取一滴内含物，用显微镜检查，可发现锥体虫、拟锥体虫和粘孢子虫。同时也用压缩法进行。在生理盐水里形成的沉淀物也要检查。

(13) 鳔 取出鳔时，不要把它弄破，先观察它的外表，再把它剪开，可发现复殖吸虫、线虫。用镊子剥取鳔的内壁和外壁的薄膜，放在载玻片上排平，滴入少许生理盐水，在显微镜下观察，可发现粘孢子虫的孢子和胞囊，同时用压缩法把整个鳔检查。

(14) 肾 肾脏紧贴在脊柱的下面，取出肾时，要尽量把整个肾完整地取出，也象检查肝和脾等器官一样进行检查，如果肾脏很大，用显微镜检查时，要前、中、后三部分各检查两片。在肾脏可发现粘孢子虫、球虫、微孢子虫，有时也可发现锥体虫或拟锥体虫；复殖吸虫、线虫等幼虫。

(15) 膀胱 取出膀胱时要特别小心，因为膀胱往往不大明显，容易被忽略。有些鱼类，例如鲤科鱼类，一般没有膀胱。要完整地取出膀胱，首先，要把接近膀胱附近的一部分肌肉一起剪下来，放在玻片上，仔细地找出膀胱和两根输

尿管，将它从附带的肌肉上分离出来，没有膀胱的鱼，则检查输尿管。取出膀胱和输尿管后，用小剪刀把它们剪开，用显微镜或解剖镜检查；分别检查它们的内含物和壁膜，可发现六鞭毛虫、粘孢子虫、复殖吸虫等。

(16) 性腺 性腺有左右两个，把左右两个性腺小心地取出来，先用肉眼观察它的外表，如果有很小的白点，往往是微孢子虫的胞囊。还可发现粘孢子虫、球虫、复殖吸虫囊蚴、绦虫的双槽蚴、线虫等寄生虫。

(17) 眼 用弯头镊子或小剪刀，从眼窝里挖出眼睛放在玻璃皿或玻璃片上，剖开巩膜，放出玻璃体和水晶体，在低倍显微镜或解剖镜下检查，可发现寄生在眼睛各部分的吸虫幼虫，这种寄生虫严重感染时，水晶体变成白色，混浊不透明，使眼睛变瞎。用载玻片法在显微镜下检查，在眼的结缔组织里，有时还可发现粘孢子虫。

(18) 脑 要取出脑，可用尖锐的解剖刀或剪刀，按水平方向，从后面向前，在后脑和眼睛之间剪开头盖骨上壁，可见充满着淡灰色泡沫状的油脂物质，用吸管把它吸出，放在玻皿里检查，吸净油脂物质后，灰白色的脑即显露出来，用剪刀把它完整地取出来，按检查肝、脾等器官一样检查，可发现粘孢子虫和复殖吸虫的胞囊或尾蚴。

(19) 脊髓 取出脊髓的方法，可从头部与躯干交接处把脊椎骨剪断，在把身体的尾部与躯干交接处的脊椎骨也剪断，用剪子从前段的段口插入脊髓腔，把脊髓夹住，慢慢地把脊髓整条拉出来，然后按检查肠和肾一样，分前、中、后三部分检查，可发现粘孢子虫和复殖吸虫的幼虫。

(20) 肌肉 检查肌肉，首先要用锐利的解剖刀，从身体的一侧前剖割开一部分皮肤，再用镊子把皮肤剥去；或用一根小棍棒（玻璃棒或竹棒）象卷纸筒一样，慢慢地把皮肤卷剥，剥取皮肤后，肌肉即露出来，用肉眼检查后，先在前、中、后等部分取一小片肌肉放在载玻片上，盖上盖玻片，轻轻压平，在显微镜下观察，再用压缩法检查。

肌肉也是许多不同种类的寄生虫寄生部位。例如粘孢子虫、复殖吸虫、绦虫、线虫等的幼虫都可发现，还可发现引起赤皮病和疥疮病的细菌。

四、病原体的计数标准

在鱼病的诊断过程中，除了肯定病原体之外，并要进一步辨别疾病的轻重，因此对病原体的数量，必须加以计算。但是在具体计算中难免产生不少困难，因为有许多病原体特别是原生动物，肉眼无法看到，即使在显微镜下，也不可能把所有的病原体逐个数清，只能采用估计法。估计法虽然不可能做到十分准确，但终究还有一个数字可凭，否则在进行材料总结时，就无法了解该地区各种鱼流行的严重情况。因此，我们根据过去几年来医治鱼病时的资料，拟出如下的统一数标准：

(1) 计数符号用“+”表示：“++”表示多；“+++”表示很多。

(2) 各种病原体的计数

细菌、肠管炎、烂鳃、蛀鳍、赤皮、疥疮等病，均按所表现的症状，用文字描述。

水霉、鳃霉，按感染的情况、比例、大小，用文字或数字说明。

鞭毛虫、变形虫、球虫、粘孢子虫、微孢子虫、单孢子虫，在高倍显微镜视野下，约有 1~20 个以下的虫体或孢子记“+”，21~50 个时记“++”，50 个以上时记“+++”。

纤毛虫及毛管虫：在低倍显微镜视野下有 1~20 个虫体时记“+”，21~50 个虫体时记“++”，50 个以上的虫体时记“+++”，但小瓜虫除按上面标准计算虫体的数量外，如计算囊胞时，则用数字说明。

单殖吸虫、线虫、绦虫、棘头虫、蛭类，甲壳动物，软体动物的幼虫：在 50 个以下均以数字说明，50 个以上者，则说明估计数字。

[注]：(1) 检查时所用的接目镜及接物镜倍数都应注明，一般以接目镜 10× 为准；

(2) 计算病原体的数量，用载片法镜检时，都是以同一片中观察 3 个视野的平均数为准。

实验八 微生物的药物敏感性测定

细菌对抗菌药物的敏感试验，是指在体外测定药物抑菌或杀死细菌的能力。进行药敏试验主要有两个目的：一是帮助诊断者对感染性疾病选用效果最佳的药物治疗；二是进行流行病学调查，了解某些致病菌的耐药变迁的情况。

药敏试验的测定方法颇多，目前常用的抗生素敏感试验（AST）都是基于扩散法和稀释法两种。本试验要求掌握纸片扩散法试验，熟悉稀释法。

I 纸片扩散法

一、目的要求

学习并掌握纸片扩散法的基本原理和方法。

二、基本原理

将含有一定量的抗菌药物纸片，平贴在已经接种被测细菌的琼脂培养基上，纸片中的抗菌药物溶解于培养基内，并向四周呈球面扩散，药物在琼脂中的浓度随离开纸片的距离增大而降低。同时含菌琼脂经孵育后细菌开始生长。在琼脂内的药物浓度恰高于该药对待检菌的最低抑菌浓度，该菌的生长就受到抑制，在含药纸片的周围形成透明的抑菌环。该法操作简单、容易掌握，但受多种因素的影响，使结果不够准确。要使结果可靠，操作上的技术细节必须经过标准化并加以控制。

三、器材

菌种 培养基 含抗生素（青霉素、红霉素、链霉素等）或磺胺药的干燥纸片。

四、操作步骤

1、接种平板

用棉拭子蘸取菌液（菌液浓度为 1.5×10^8 cfu/ml）涂布整个培养基表面，反复几次，保证涂布均匀。或者往平板内加入 0.2ml 浓度为 1.5×10^8 cfu/ml 的菌液，再用涂布棒涂布均匀。（注意：避免用过浓的菌液，禁用未经稀释菌或其

它不标准菌液接种平板。)

2、贴纸片：

(1) 接种平板后，贴上药敏纸片。用镊子分别挟取含有不同抗生素的滤纸片，贴在已接种细菌的琼脂平板的表面，然后用镊子或针尖压一下纸片使其与培养基表面贴牢。纸片可以一个一个的贴，也可以用贴纸片机。纸片要贴的均匀，每个平板上贴 4~6 片，各纸片中心相距约 24mm，纸片距平皿边缘约 15mm，各纸片间距离相等；直径 150mm 的平板可贴 12 张纸片，直径 100mm 的平板可贴 5 张纸片。纸片贴后不应在移动，因为有些药物会立即扩散。

(2) 贴上纸片 15 分钟内，须把平板倒放在 35℃ 培养箱中进行孵育。

3、读取结果

(1) 经 37℃ 培养 16~18h 后，观察结果。菌液浓度合适且涂得好，抑菌环规则，细菌呈融合生长。如果出现单个菌落，说明接种量小，需重做试验，测量抑菌环直径需包含纸片直径。手持平皿从背面目测检查每块平板，借反射光（黑色无反光背景）观察抑菌圈的有无及其大小，并用卡尺、普通尺或特制的模板量取抑菌环直径，单位为毫米。培养基中如果加血液，须打开平皿，借反射光，从正面量抑菌环。如果是葡萄球菌或肠球菌，须培养 24h 后，经透射光检查苯唑青霉素和万古霉素的抑菌环内有无耐药菌株的生长。抑菌环内有任何生长的表现都表明是耐药菌株。

(2) 肉眼见不到细菌明显生长的区域为抑菌环边缘，有很难辨认的细小菌落者不算。如抑菌环内有大菌落长出，须再移种出来，重新鉴定，重新做敏感试验。变形菌在某些抗菌药物纸片周围可弥漫生长到抑菌的区域内，但抑菌环边缘清楚，弥漫生长不算。甲氧苄胺嘧啶和磺胺药的拮抗剂会支持细菌生长，因而测这些药时可忽略轻微生长（80% 以上受抑制），以浓密度生长的区域作为抑菌环的界限。用加血的培养基测链球菌，应量抑菌环，不包括溶血环。

(3) 参照附表 2 标准对抑菌环的大小作出解释，以敏感度，中介或耐药的形式解释结果。

II 琼脂稀释法

一、目的要求

学习并掌握琼脂稀释法的基本原理和方法。

二、基本原理

琼脂稀释法敏感试验是将不同剂量的抗菌药物，分别加入融化并冷至 45℃ 的定量琼脂培养之中，混匀，倾注成无菌平板、即为含有药物浓度递减的培养基。接种幼龄菌于该培养基上，经培养后观察被检菌的生长情况，最低药物浓度抑制细菌生长者为该菌的最低抑菌浓度。

三、器材

菌种 培养基 抗菌药物原液 麦氏比浊管（校正待检菌浓度用）。

四、操作步骤

1、制备含药琼脂平板，用无菌 100mm 平皿加一个浓度的抗生素 2.5ml，再加入琼脂培养基 25ml，充分混匀（接种前平板必须相当干燥）。

2、取已校正浓度的待检菌液（ 10^8 cfu/ml）接种于药琼脂的表面，操作时从最低浓度的琼脂种起，使每滴约 2 μ l 菌液，每一接种点的液滴直径为 5—8mm，注意勿使移动，待接种点干燥后，再与平板翻转置 35℃ 孵箱内孵育 16—24h 观察结果（接种方法有多种，可以用定量毛细吸管，或 1 μ l 定量接种环，最好用多头接头器，一次可接种大约 36 个菌株）。为了核对每个被检株的生长或污染况，可将每株被检菌悬液，用定量加液器吸取 1 μ l 菌液，接种在 1/2 无抗生素的琼脂平皿上，充分划线，每两日观察是否污染，菌落计数，菌数大约 10^4 cfu/ml。

3、结果读取

不出现菌落的琼脂平板上的最低药物浓度为其最低抑菌浓度。结果可用药物的浓度或几何滴度报告。若超过抑菌终点仍有数个明显菌落，应考虑试验菌的纯度而予以复试，如仅为单个菌落，可予以忽略。判定时应注意：1' 薄雾状生长不算；2' <5 个菌落不算；3' 若在数个平板上呈拖尾或跳管生长等现象，应该重做。

III 试管两倍稀释法

一、目的要求

学习并掌握试管二倍稀释法的基本原理和方法。

二、基本原理

试管二倍稀释法是在液体培养基中加入药物，使得药物的最终浓度成二倍浓度梯度，接入细菌后，观察细菌的生长情况，

三、器材：

1. 实验设备：常规的无菌操作实验设备，如蒸馏水、高压灭菌锅、恒温培养箱、干燥箱、净化工作台、无菌室以及玻璃器皿、试剂等。

2. 培养基配制：一般用普通肉汤细菌培养基即可。培养基应澄清透明，灭菌后分装于洁净无菌的试管中。一般用 15 支试管，每管装 1ml。

3. 供试药物的制备：供试药物用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液（PBS）溶解后稀释至准备进行试验的所需的浓度（统称原药液）。

4. 试验菌液的制备：试验前从保存菌种的斜面上蘸取少许菌苔，接种于普通肉汤细菌培养基中，在该菌的最适温度下培养 18—24h（或适宜时间），摇匀后取出少许菌液作为原菌液，再用普通肉汤培养基将原菌液作 1：1000 稀释后备用（亦可根据菌体的生长情况适当调节稀释倍数）。

四、操作步骤：

1. 在无菌操作室内将 15 支装有无菌肉汤培养基的试管排在试管架上，并编号。

2. 加入供试药液并进行稀释，采用两倍稀释法，于第 1 支试管中加入供试原药液 1ml，混匀后取出 1ml 加入第 2 支试管中，同此法依次稀释至第 14 支试管，从 14 支试管中取出 1ml 弃去，使所有 14 支试管中的药物浓度成为系列递减浓度。第 15 支试管为不加药物的阳性细菌生长对照管。

3. 加入菌液：每支试管中加入配制好的菌液 0.2ml

4. 培养：将试管中的药物和菌体摇匀，在适宜的恒温条件下培养 18—24 小时，观察细菌的生长情况。

5. 结果判定：经培养后，试管中澄清透明，振匀后仍未澄清透明的，视为该管内无菌生长；若培养管内出现混浊状态，则视为有菌生长。从无菌生长的各管中找出药物浓度最低的培养管，该管的药物浓度即为最低抑菌浓度（MIC），而最低杀菌浓度的确定是将上述无菌生长的各管继续培养 48 小时，再观察管中有无菌生长现象。若仍呈现澄清透明的无菌生长状态，则此时的最低抑菌浓度即为最低杀菌浓度（MBC）；若有的培养管出现混浊，则最低杀菌浓度应为无菌生长的试管中的药物浓度。需指出的是，最低抑菌浓度与最低杀菌浓度两者可能一致，也可能不同。

实验九 水产动物的药物毒性试验

一、目的要求：了解水产药物不同给药浓度对实验水产动物的毒性作用。

二、基本内容：观察不同给药浓度对水产动物可能发生的毒性作用。

三、材料：

水产动物（鱼），玻璃缸，常用水产药物（如硫酸铜，高锰酸钾，甲醛等）等。

四、操作步骤：

1. 试验前的准备：试验前每个小组应准备 6 只干净的玻璃缸，并编好号 T0, T1, T2, T3, T4, T5，其中 T1, T2, T3, T4, T5 组用作药物毒性试验，T0 组为不加药物的空白对照组。

2. 水体的计算：根据玻璃缸的形状，测量与计算其面积 m^2 和水体深度 m ，然后根据公式：水体体积 $m^3 = \text{水体面积 } m^2 \times \text{水深 } m$ ，计算出水体的体积。

3. 每个玻璃缸中放养相同尾数、规格一致的鱼，并使试验条件基本一致，如温度、氧气等。

4. 药物剂量的计算：药物的量（g）= 给药的浓度（g 药 / m^3 水体） \div 水体体积 $V (m^3)$ 。根据此公式，采用药物浓度 2 倍递增的方法计算、称量所对应组应加的药物量。

5. 将所称量的药物加入到相应的玻璃缸中，然后每隔 2 小时观察鱼的活动情况，并做好纪录。

要求：

1. 根据试验情况，分析药物浓度、用药时间对鱼体的毒性。
2. 根据上述结果，确定用药安全浓度。

实验十 水产动物疾病的病理组织观察

I、目的要求

通过本实验的学习，使学生加深体会水产动物细胞组织病理学基础理论；掌握水产动物器官组织细胞的基本构造和病理组织学研究的基本方法；同时了解经济水产养殖动物主要疾病的组织细胞病理变化；提高学生运用病理学手段进行水产动物疾病诊断、防治的科研工作技能。

II、实验内容与学时安排：

一、 鱼类器官组织观察及其细胞组织病理变化 (4 学时)

(一) 目的：

掌握鱼类各器官组织结构及其细胞组织的病理变化。

(二) 原理：

利用光学显微镜观察鱼类各器官的细胞组织结构，比较健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。

(三) 材料：

1. 健康和患病的鱼类各器官组织的石蜡切片。
2. 光学显微镜。

(四) 要求：

1. 掌握鱼类各器官的组织学结构。
2. 比较鱼类健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。
3. 描述鱼类病变细胞组织的形态特征。
4. 撰写实验报告。

二、 虾蟹类器官组织观察及其细胞组织病理变化 (2 学时)

(一) 目的：

掌握虾、蟹各器官组织结构及其细胞组织的病理变化。

(二) 原理:

利用光学显微镜观察虾蟹各器官的细胞组织结构，比较健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。

(三) 材料:

1. 健康和患病的虾、蟹各器官组织的石蜡切片。
2. 光学显微镜。

(四) 要求:

1. 掌握虾、蟹各器官的组织学结构。
2. 比较虾、蟹健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。
3. 描述虾、蟹病变细胞组织的形态特征。
4. 撰写实验报告。

三、 贝类器官组织观察及其细胞组织病理变化 (2 学时)

(一) 目的:

掌握贝类各器官组织结构及其细胞组织的病理变化。

(二) 原理:

利用光学显微镜观察贝类各器官的细胞组织结构，比较健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。

(三) 材料:

1. 健康和患病的贝类各器官组织的石蜡切片。
2. 光学显微镜。

(四) 要求:

1. 掌握贝类各器官的组织学结构。
2. 比较贝类健康与病变器官组织的形态差别，分析病理。
3. 描述贝类病变细胞组织的形态特征。
4. 撰写实验报告。

四、 水产动物细胞超微结构及病毒形态的电镜观察 (2 学时)

(一) 目的:

掌握电子显微镜的操作级观测水产动物组织细胞的超微结构及其细胞病理变化的形态特征;病原微生物的形态特征。

(二) 原理:

利用电子显微镜观察水产动物各器官的细胞组织结构,比较健康与病变器官组织细胞的形态差别,分析病理。

(三) 材料:

1. 健康和患病的水产动物组织的树脂超薄切片。
2. 电子显微镜。

(四) 要求

1. 掌握水产动物组织细胞的超微形态结构。
2. 比较水产动物健康与病变器官组织细胞的形态差别,分析细胞病理。

附录:

表1 McFarland 比浊管制法

用同质量同大小的试管 10 支按下表加入药品:

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl ₂ (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H ₂ SO ₄ (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当每毫升的 细菌数	3 亿	6 亿	9 亿	12 亿	15 亿	18 亿	21 亿	24 亿	27 亿	30 亿

表2 抑菌环解释标准和相应 MIC 分界点

抗生素	纸片含量 (ug/克)	抑菌环直径解释标准 (mm)			相应的 MIC (ug/ml)	
		耐药	中介	敏感	耐药	敏感
青霉素	10	≤28	—	≥29		≤0.1
氯霉素	30	≤12	13~17	≥18	≥32	≤8
氨苄青霉素	20/10	≤13	14~17	≥18	≥32/16	≤8/4
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15	≥8	≤4
四环素	30	≤14	15~18	≥19	≥16	≤4
环丙氟哌酸	5	≤15	16~20	≥21	≥4	≤1
利特灵	300	≤14	15~16	≥17		
链霉素	10	≤11	12~14	≥15	—	—
红霉素	15	≤13	14~22	≥23	≥8	≤0.5
复方磺胺	1.25/23.75	≤10	11~15	≥16	≥8/152	≤2/38
先锋霉素	30	≤14	15~17	≥18	≥32	≤8
卡那霉素	30	≤13	14~17	≥18	≥25	≤6
丁氨卡那	30	≤14	15~16	≥17	≥32	≤16
磺胺嘧啶	250	≤12	13~16	≥17	≥350	≤100
头孢菌素类	30	≤14	15~17	≥18	≥32	≤8
阿莫西林	20/10	≤13	14~17	≥18	≥16/8	≤8/4
环丙沙星	5	≤15	16~20	≥21	≥4	≤1
诺氟沙星	10	≤12	13~16	≥17	≥16	≤4
利福平	5	≤16	17~19	≥20	≥4	≤1
万古霉素	30	≤9	10~11	≥12	≥32	≤4