

乌鳢诺卡氏菌病的组织病理和超微病理观察

王 桢, 葛明峰, 徐益军, 王国良*

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用组织学方法, 获得患诺卡氏菌病乌鳢的脾、肾、肝、肌、鳃、肠 6 种组织, 利用组织切片及超薄切片电镜技术对患病组织的病理变化进行观察分析, 探究该病的致病机制。解剖病理症状为: 体表充血有溃疡, 腹部膨大有腹水, 脾、肾、肝等内脏有大量白色结节。组织病理显示: 病鱼各器官组织普遍存在慢性肉芽肿, 中心由坏死的组织碎片和聚生菌体组成, 外围有大量的炎性细胞浸润, 结节周围的实质组织主要表现为肿胀、萎缩、增生和坏死脱落现象。超微病理显示: 宿主器官组织细胞扩张, 细胞质内溶酶体增多, 核肿大或固缩溶解, 细胞器缺失溶解, 线粒体嵴断裂消失呈坏死性病变, 肾脏及肝脏细胞中有大量病原菌寄生, 细胞发生脂肪、空泡及纤维样变。实验结果表明: 乌鳢诺卡氏菌病的组织细胞结构发生明显的病理变化, 肾脏、肝脏和脾脏等主要组织器官受到严重的损伤病变, 从而影响鱼体的正常生理机能, 最终导致死亡。

关键词: 乌鳢; 诺卡氏菌病; 组织病理; 超微病理

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 02-0013-06

乌鳢(*Ophiocephalus argus*, Cantor)俗称黑鱼、乌鱼、蛇头, 隶属于鲈形目鳢科, 在我国分布广泛, 为凶猛的肉食性经济鱼类。随着养殖规模的快速扩大, 养殖面积和密度的不断增加, 加上养殖环境污染的日趋严重, 管理技术的落后, 使得乌鳢病害发生的频率与规模亦呈逐年上升趋势。近年来流行的乌鳢诺卡氏菌病在浙江、江苏、江西、安徽、广东等省份危害甚大, 因防治难度大而造成的经济损失亦很大, 并已引起高度重视。该病的病原菌为鳢鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*), 可导致鱼体表充血、溃烂, 脾、肾、肝等内脏肿大, 以脏器呈现大量乳白色结节为主要病症^[1]。浙江省的杭州、余杭、萧山和绍兴等地危害尤为严重, 平均发病率达 35%~45%, 发病死亡率高达 100%。目前尚无有效治疗方法。

组织病理观察是病理学研究的重要手段之一, 相关学者已对黄尾鲮(*Seriola quinqueradiata*)^[2-3]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[4]、大西洋鲑(*Sal-*

mo salar)^[5]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[6]等鱼类诺卡氏菌病进行了组织病理学研究。本研究从组织病理和超微病理层面对患诺卡氏菌病乌鳢主要病变器官的病理变化进行了观察分析, 以期探讨该病的病变过程及发生机理, 为临床诊断和防控研究提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

患病乌鳢于 2006 年 6 月及 2007 年 5 月分别采自浙江萧山和余杭乌鳢养殖池塘, 体长 30~35 cm, 体重 250~400 g。健康乌鳢采自同一地区的乌鳢养殖池塘, 经检查确认无病后作为对照使用。

1.2 实验方法

1.2.1 解剖观察

常规显微镜检查病鱼体内外有无寄生虫。活体解剖具典型症状的濒死乌鳢, 观察病鱼体表与内脏组织病变情况, 与健康鱼进行比较, 以确定

收稿日期: 2013-04-18.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734); 宁波市自然科学基金(2007A610069)。

第一作者: 王桢(1989-), 女, 浙江江山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 鱼病学研究。E-mail: 190447890@qq.com

*通信作者: 王国良(1955-), 男, 浙江舟山人, 博导/教授, 主要研究方向: 鱼病学研究。E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

该病主要病变情况及病变部位,并以此为依据合理选择组织切片的病理材料。

1.2.2 组织病理样品制备及观察

取患病乌鳢与健康乌鳢的脾、肾、肝、肌、鳃、肠 6 种组织,用 Bouin's 液固定 24 h,直接用 70% 酒精洗数次,用 70%~100% 酒精逐级脱水 45~60 min,二甲苯透明,石蜡包埋, KD-202 切片机切片, H-E 染色,中性树胶封片, T2-7E03680 型 Olympus 显微镜下观察拍照。

1.2.3 超微病理样品制备及观察

取患病乌鳢与健康乌鳢的脾、肾、肝 3 种组织,切成 $0.5\sim 1.0\text{ mm}^3$ 的小块,用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定(戊二醛和锇酸均用 pH 7.4 的 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液,按照体积比配制), 4% 醋酸铀染色 30 min。酒精逐级脱水后,用 100% 丙酮脱水。无水丙酮与包埋剂渗透组织,震荡,包埋,并置烘箱内于 37°C 、 45°C 和 60°C 逐级聚合。修块,用 RMC 超薄切片机制备 $100\sim 120\text{ nm}$ 切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色, TECNAI 10 型透射电子显微镜观察拍照。

2 结果与分析

2.1 病鱼症状与解剖观察

病鱼体表溃烂,鳍条充血,部分病鱼眼球突出,腹部膨大,腹水严重。解剖观察,内脏有明显的病变,脾、肾、肝等内脏稍有肿大,且有大量乳白色结节(图 1),直径 $1\sim 5\text{ mm}$ 。取结节内物质作涂片,镜检发现大量长杆状、短杆状或分枝状的革兰氏阳性菌体。病鱼的体表及内脏器官经常规显微镜检测,未见有寄生虫。

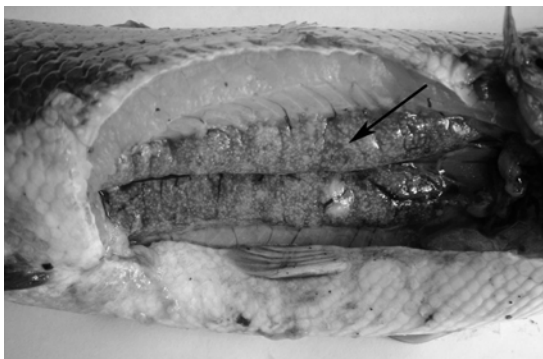


图 1 乌鳢诺卡氏菌病的解剖观察

2.2 组织病理变化

与健康乌鳢比较,患病乌鳢脾脏、肾脏、肝脏、

肌肉、鳃、肠道组织均表现有明显的病理变化。肉芽肿炎症普遍存在于患病乌鳢各器官,炎症中心滋生大量菌体,组织、细胞变性或坏死。

2.2.1 脾脏

健康乌鳢脾脏组织内部有脾髓,除淋巴细胞外,还含有大量红细胞及结缔组织的原纤维(图 2-1)。病鱼脾脏组织有大量结节(即肉芽肿),中心由坏死的组织碎片和聚生菌体组成,外包数层类上皮细胞和成纤维细胞;脾窦和脾索结构不清晰,脾内血管充血,可见大量渗出性红细胞(图 2-2)。

2.2.2 肾脏

健康乌鳢肾脏实质均匀,结构完整。肾小管上皮细胞排列整齐,界线清晰,管腔明显(图 2-3)。病鱼肾脏组织充满大量大小不等肉芽肿病灶,外层成纤维细胞增生并包围病变组织,其结构致密、分界清楚,且明显地压迫肾实质组织(图 2-4 及 2-5)。

2.2.3 肝脏

健康乌鳢肝脏组织结构清晰,肝索由中央静脉向四周呈放射状,肝细胞呈多角状,排列均匀规则。同大多数鱼类一样,乌鳢胰腺组织分散地位于肝组织之间(图 2-6)。病鱼肝脏组织有肉芽肿病灶,中心成纤维细胞转化为由胶原纤维组成的瘢痕,肝实质细胞病变严重,呈空泡样坏死,大量炎症细胞浸润,肝组织脂肪变性(图 2-7)。

2.2.4 肌肉

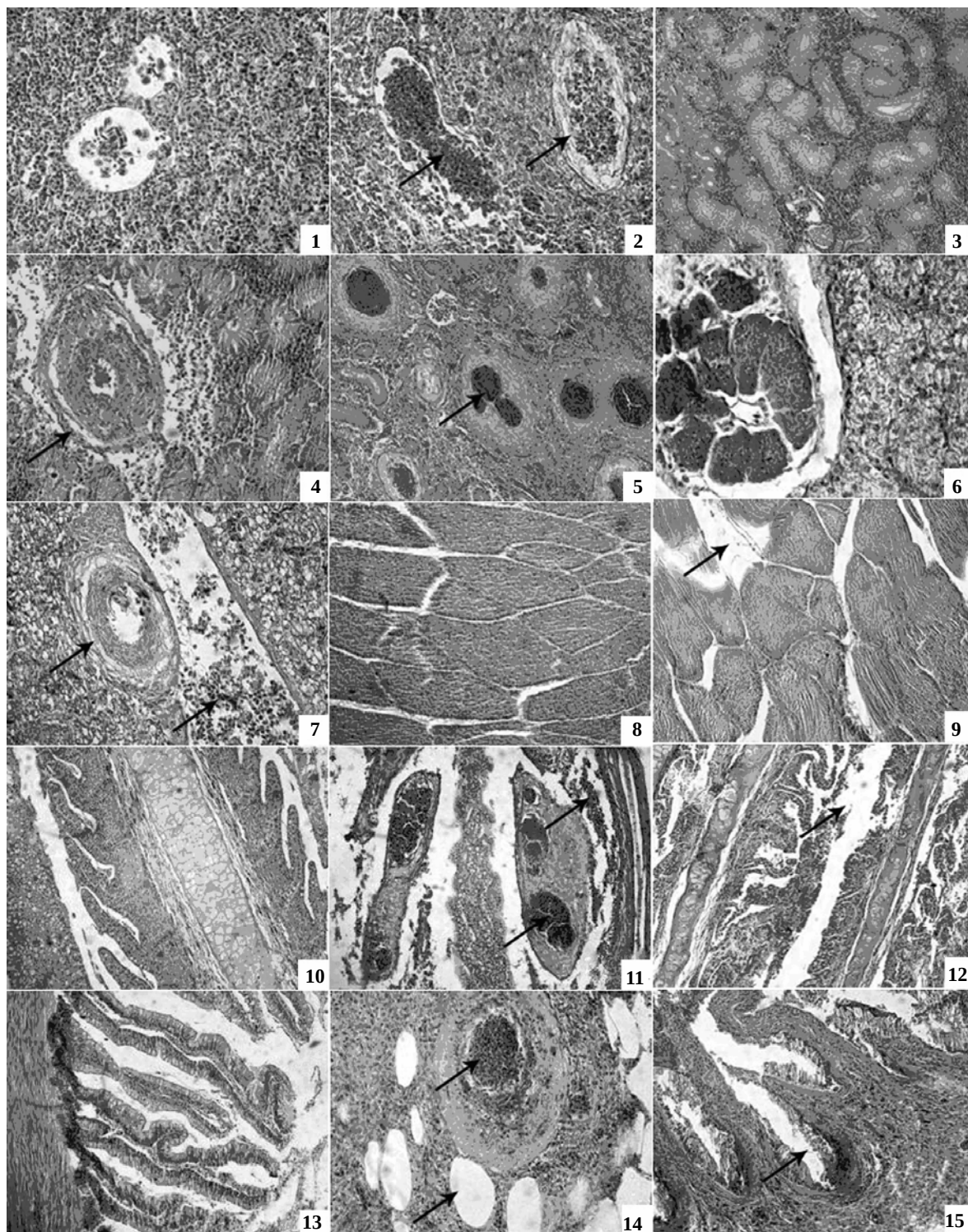
健康乌鳢肌纤维排列紧密有秩,横纹清晰,肌浆均匀充斥于肌纤维间质中(图 2-8)。病变肌肉组织中肌纤维肿胀变性、断裂和不规则聚集,整个肌纤维束呈团块状,横纹模糊不清或消失,肌间隙增宽,水肿(图 2-9)。

2.2.5 鳃

健康乌鳢的鳃小片由上皮组织、结缔组织、毛细血管等构成,其上皮组织中扁平细胞单层有序排列,细胞核圆形或椭圆形。软骨组织细胞排列致密,核清晰可见(图 2-10)。病鱼结缔组织纤维化,细胞空泡样变性,出现大量肉芽肿病灶(图 2-11);鳃小片水肿,与软骨组织间隙增宽,上皮细胞肿胀、变性脱落(图 2-12)。

2.2.6 肠

健康乌鳢肠道组织可以分为黏膜、肌层和浆膜三层。黏膜层表面衬着单层柱状上皮细胞,杯状



1.健康乌鳢脾脏组织(200×); 2.脾脏肉芽组织, 血管充血(200×); 3.健康乌鳢肾脏组织(200×); 4.肾扁平上皮纤维样增生, 细胞脱落(400×); 5.肾实质中的肉芽肿病灶(200×); 6.健康乌鳢肝胰脏组织(200×); 7.肝脏组织肉芽肿性病灶, 炎症细胞浸润(200×); 8.健康乌鳢肌肉组织(200×); 9.肌纤维束呈团块状, 肌纤维肿胀(200×); 10.健康乌鳢鳃组织(400×); 11.鳃结缔组织中肉芽肿病灶, 纤维样变(400×); 12.鳃小片水肿, 上皮细胞脱落(400×); 13.健康乌鳢肠组织(200×); 14.肠道黏膜中的肉芽肿病灶, 结缔组织空泡样变性(400×); 15.肠黏膜上皮细胞坏死脱落, 细胞界限不明显, 杯状细胞消失(400×).

图2 乌鳢组织病理照片

细胞分布其中,细胞界限清晰,核靠近细胞基部(图 2-13).病鱼肠道黏膜下层明显增厚,可见较大的肉芽肿炎症病灶,边界清楚,纤维外膜较厚,结缔组织空泡样变性严重(图 2-14);黏膜上皮细胞肿胀,大多坏死脱落,细胞界限不明显,核聚生,杯状细胞消失;肌层增厚,肌纤维排列松散(图 2-15).

2.3 超微病理变化

电镜观察结果显示,在病鱼的脾、肾、肝等组织未见病毒颗粒、类立克次体等其它原核生物体,但组织细胞病理变化明显,观察到的菌体细胞形态结构与所分离的鲢鱼诺卡氏菌相同.

2.3.1 脾脏

正常乌鳢脾脏内淋巴细胞相对较多,呈圆形或椭圆形,核质比例较大,且位于细胞中央,核内异染色质浓聚(图 3-1).病鱼脾脏组织中红细胞聚集,细胞核空泡化甚至坏死;淋巴细胞内核变性或

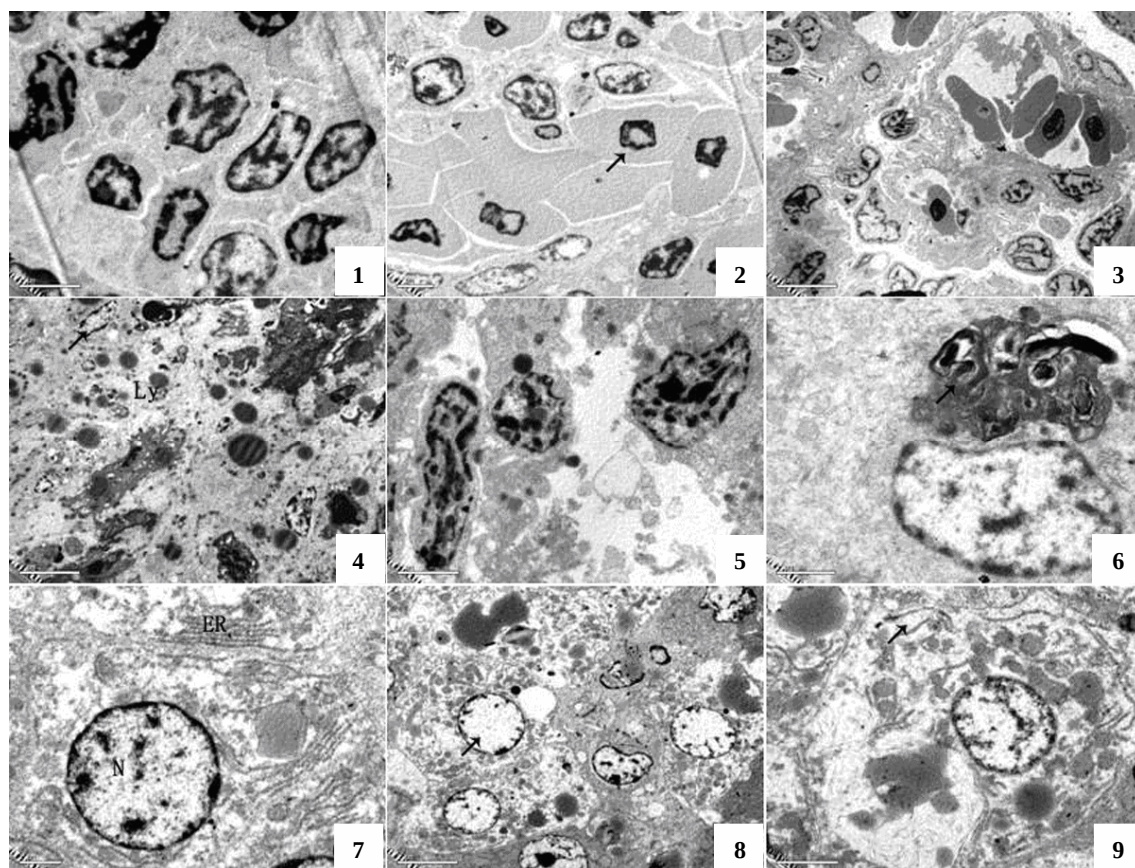
消失成空泡,核内染色质边集;细胞界限不清,胞质坏死,溶解(图 3-2).

2.3.2 肾脏

正常乌鳢肾小球上皮细胞足突清晰,类似微绒毛;血管球毛细血管管腔分明,红细胞清晰可见;近曲小管管壁由单层上皮细胞构成,游离端具刷状缘,排列紧凑,界限清晰(图 3-3).病鱼肾近曲小管上皮细胞颗粒变性明显,溶酶体大量增多,细胞内有大小不等的空泡,细胞结构消失,崩解(图 3-4);上皮细胞空泡化,细胞核染色质聚集,细胞趋向坏死(图 3-5);某些细胞在胞核附近有大量菌体聚集,外围被纤维变性胞质包裹缠绕,胞浆内线粒体结构模糊(图 3-6).

2.3.3 肝脏

正常乌鳢的肝细胞呈多边形,边界清楚,核圆形位于细胞中央,胞质含有丰富的细胞器及内含



1.健康乌鳢脾脏细胞(6 200×); 2.脾脏组织中红细胞聚集,核空泡化,淋巴细胞核变性,染色质边集(3 700×); 3.健康乌鳢肾小球结构(2 550×); 4.肾近曲小管上皮细胞空泡变性,溶酶体增多,细胞结构消失(2 550×); 5.肾脏细胞胞核染色质聚集、趋向坏死(6 200×); 6.肾脏细胞胞核附近聚生菌体,纤维变性胞质缠绕(12 500×); 7.健康乌鳢肝脏细胞(8 900×); 8.肝脏细胞界限不清,空泡化,核染色质稀薄(2 550×); 9.内质网肿胀,胞质纤维样变性(6 200×).

图3 乌鳢超微病理照片

物,线粒体多,嵴排列规则,内质网绕细胞核质呈环状排列(图3-7)。病鱼肝脏细胞胞膜消失,界限不清,出现较多合胞体结构,脂滴大量增多,空泡化病变,细胞核染色质稀薄或解体(图3-8)。内质网肿胀、变性,细胞中有大量菌体,附生部位胞质均伴有纤维样变性(图3-9)。

3 讨论

乌鳢诺卡氏菌病典型病症是鱼体腹部膨大且充满腹水,心脏、脾脏、肾脏、肝脏有大量乳白色结节,与资料报道的大西洋鲑、花鲈、大黄鱼、斑鳢等水产养殖动物感染诺卡氏菌病症状相似^[5-8,11]。

组织病理学研究表明,乌鳢诺卡氏菌病与不同地区患诺卡氏菌病的五条鲈^[3]、大西洋鲑^[5]、花鲈^[6]和斑鳢^[11]等组织病理学研究具有相似的病理学特征。病鱼病变组织中的大量结节为典型的肉芽肿,中心由坏死的组织碎片和聚生菌体组成,外围有大量的炎性细胞浸润,外包数层类上皮细胞和成纤维细胞(即肉芽组织)。而结节周围的实质组织主要表现为肿胀、萎缩、增生和坏死脱落现象,并伴有脂肪变性、空泡变性和纤维样变性,另有大量炎症细胞浸润。此外,本研究在肉眼观察症状不典型的鳃和肠道组织中,也出现一定数量的肉芽肿病灶。尽管肉芽肿病灶普遍存在,但各组织器官肉芽肿炎症病灶的多少、中心坏死区的大小和周边纤维外膜的厚薄等均有差异。这可能跟病原菌对器官和组织的嗜性有关,如病鱼的脾脏、肾脏、肝脏均有大量肉芽肿炎症病灶分布,且中心坏死区较大,某些炎症中心还包含几个大小不等的肉芽组织,其中尤以肾脏最为典型。但因鱼的种类不同,导致病变程度及器官亦有差异,资料报道曾在大口黑鲈的鳃中发现结节^[4],斑鳢的卵巢和肌肉内发现肉芽肿^[11]以及虹鳟鱼的脑中发现结节性坏死^[10]。

超微病理学研究发现,患病乌鳢主要内脏器官超微病理变化严重,脾脏、肾脏和肝脏细胞均出现明显的病变。肾脏和肝脏细胞中均有大量病原菌寄生,宿主细胞明显扩张,核肿大或固缩,并开始溶解;细胞器稀少,并伴有肿胀、溶解,如线粒体嵴断裂消失,呈坏死性病变。部分细胞胞质内容酶体增多,肾脏和肝脏细胞发生脂肪样变、空泡样变和纤维样变。这些均是器质性、不可逆转性的超

微病理变化。该病以鱼体脏器炎性肉芽肿为主要症状,此与资料报道养殖乌鳢类立克次氏体感染的超微病理研究结果相似^[12-13]。这反映了不同病原体可引起相似的病理变化特征,仅从超微病理观察判定某种疾病种类是不够的,还应准确鉴定病原体。

诺卡氏菌在自然界中广泛分布,如土壤、活性污泥和水体中。淡水环境中诺卡氏菌的含量不明,且诺卡氏菌属内种类是否均有致病性尚无定论,但作为乌鳢诺卡氏菌病病原菌的鲈鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)对水产动物的致病性已被广泛证实^[6-7]。笔者在前期进行的人工感染试验结果显示,病原菌可从鱼类的鳃、消化道和损伤部位进入体内,引起脾、肾、肝等内脏器官发生严重结节性病变^[14]。因内脏器官均是与血液循环紧密相连,组织病理观察发现病鱼鳃和肠道组织中均有大量菌体聚生的肉芽肿性炎症病灶,由此推断病原菌可能从鳃和消化道部位进入,通过血液循环而到达各内脏器官,在其中寄生并大量繁殖,形成菌丝体或菌团。在机体免疫反应的作用下,形成结节性的肉芽肿,并逐步造成周围实质组织发生病变,从而影响器官的正常生理机能。

此外,从组织病理特征和人工感染病症复制时效分析,病原菌的毒性可能较小,它并非依靠分泌毒素而危害宿主,而是通过病原菌数量增殖,造成组织器官的严重损伤。所以,诺卡氏菌病为慢性感染症,病程较长,前期无症状或症状不明显,这给该病的早期诊断和预防带来困难,一旦发现有病症出现,内脏器官已经受到严重损害,而难以治愈。因此研究早期诊断技术对预防和控制该病的发生和发展具有重要的理论意义和实际应用价值。

参考文献:

- [1] 王国良,徐益军,金珊,等.养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J].水生生物学报,2009,33(2):277-283.
- [2] Kubota S, Kariya T, Nakamura Y, et al. Nocardial infection on culture yellow tail (*Seriola quinqueradiata* and *S.purpurescens*). II. Histological study[J]. Fish Pathology, 1968(3):24-33.
- [3] Kumamoto H, Horita Y, Hatai K, et al. Studies on fish nocardiosis. I. Comparison in the histopathology of both yellow tails, *Seriola quinqueradiat*, experimentally inoculated and those naturally infected with *Nocardia*

- kampachi*[J]. Bulletin of the Nippon Veterinary Zootechnical College, 1985, 34:100-118.
- [4] Lai K C, Chen S N, Kou G H. Studies on the infection of *Nocardia* sp. in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*, Lacepede)[J]. Coa Fish Ser, 1991, 29:1-15.
- [5] Bransden M P, Carson J, Munday B L, et al. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(1):83-85.
- [6] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(5):299-307.
- [7] Wang G L, Yuan S P, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson)[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28:339-345.
- [8] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2):137-139.
- [9] Friedman C S, Beaman B L, Chun J, et al. *Nocardia crassostreae* sp nov, the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998(1):237-246.
- [10] Snieszko S F, Bulloch G L, Dunbar C E, et al. Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of bacteriology, 1964, 88: 1809-1810.
- [11] Chen S C, Tung M C, Tsai W C. An epizootic in Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede), caused by *Nocardia asteroides* in fresh water pond in Southern Taiwan[J]. Coa Fish Ser, 1989, 15:42-48.
- [12] 郭琼林, 贾伟章, 孙晓凤, 等. 养殖乌鳢类立克次体感染的组织病理学研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 45-52.
- [13] 郭琼林, 孙晓凤, 贾伟章, 等. 养殖乌鳢类立克次体感染的超微病理学研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(2): 265-271.
- [14] Wang G L, Xu Y J, Jin S, et al. Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor[J]. Aquaculture, 2007, 271: 54-60.

Histopathological and Ultrapathological Observation on Nocardiosis of *Ophicephalus argus*

WANG Zhen, GE Ming-feng, XU Yi-jun, WANG Guo-liang*

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The spleen, kidney, liver, muscle, intestine and gill obtained from *Ophicephalus argus* infected with Nocardiosis are pathologically analyzed using tissue slices and ultramicrocut electron microscopy techniques. The pathogenic mechanism of this disease is then discussed. The anatomical symptoms show ulceration hemorrhage on surface, abdomen intumescence with ascites. Spleen, liver, kidney and other viscera show abundant white nodules. The histopathology indicate that chronic granulomatous is widespread in the organs and tissues of the infected fish, and its center consists of necrotic tissue fragments and poly wild type strain surrounded by a large number of inflammatory cell infiltration. In addition, parenchyma surrounding nodules reveal swelling, atrophy, hyperplasia and necrosis. The findings in ultrastructure indicate the expansion in host tissue cell, the increasing lysosomes in the cytoplasm and nuclear enlargement or condensation dissolved. Organelles are missed or dissolved, mitochondrial cristae are disappeared and become necrotic lesions. Kidney and liver cells carry abundant parasitic pathogens and fat, vacuoles and fiber degeneration occurred. The results manifest that pathological changes of Nocardiosis are widely found in the tissue cells, causing serious damage to body organs such as spleen, kidney and liver. The loss of the normal physiological metabolism is the major cause leading to their eventual death.

Key words: *Ophicephalus argus*; nocardiosis; histopathology; ultrastructure

(责任编辑 章践立)