

黄鳍鲷结节病病理组织学研究*

张永嘉

(湛江水产学院, 524025)

提要 于1989年,以鲜活组织压片和组织切片镜检的方法对采自海水网箱养殖黄鳍鲷(*Sparus latus* Houuttuyn)所患的结节病作出了确诊。病理组织学观察结果表明:1.黄鳍鲷结节病是由分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)感染引起的。病原体系革兰氏阳性、不运动型的抗酸杆菌,其长短悬殊,约为4—12 μ m,平均9.4 μ m;直径则较一致,约为0.4—0.5 μ m。2.该病的主要特征是产生由上皮样细胞和巨细胞构成的局灶性肉芽肿结节;根据结节的结构特点,可将这些结节区分为四个类型,即无包膜的I型、有包膜的II型、有干酪样坏死中心和包膜的III型和有空洞和包膜的IV型。3.四类型结节的形成和发展过程是巨噬细胞杀灭和局限病菌,而病菌要求增殖、播散的炎症过程。4.黄鳍鲷结节病的巨细胞与哺乳类动物结核病的巨细胞差别在于其核的数量及排列方式。巨细胞内黑素颗粒的形态与结节上皮样细胞的坏死有关。结节的结缔组织包膜的形态变化与病原菌的数量、毒力和机体的抵抗力有关。

鱼结节病,又称鱼结核病,是水产养殖鱼类最危险的疾病之一^[2,5]。该病是由分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)感染造成的一种以局灶性肉芽肿为主要特征的慢性疾病^[3]。迄今,国内尚未见报道,国外虽然已有许多文章描述淡水、海水鱼患结节病,但所发现的易感鱼类亦未包括黄鳍鲷^[4-7]。

一、材料和方法

试验于1989年进行。病鱼采自广东省华南渔场。取外观无明显症状病鱼、濒死病鱼和口服四环素后两周的病鱼,分别解剖2,12和2尾。病鱼平均体长11.5cm、平均体重21g。

将病鱼作常规光学显微镜查检,并将发现有病菌的压片作革兰氏染色和齐尼二氏抗酸法染色,在油镜下观察病原菌并拍照。有结节的器官小块用Bouin氏液固定,石蜡包埋,切片厚6—8 μ m。分别用苏木精伊红染色法(H&E)、Mallory氏苯胺蓝三色法(Mallory氏法)、席夫过碘酸染色法(PAS)、Wade-Fite氏抗酸新染色法(Wade-Fite法)和Fortana黑素染色法(Fortana法)染色^[3],切片在光学显微镜下观察并拍照。

二、结果

1. 发病网箱概况和病鱼症状

网箱放置海区盐度在15—30S,水温在13—32 $^{\circ}$ C之间波动。检查时为4月份,盐度为25,水温为22 $^{\circ}$ C。

* 课题经费来自湛江水产学院。
收稿日期:1990年5月24日。

发病时,鱼懒于游动,食欲丧失,网箱内可见浮有死鱼和濒死的鱼。在一患病严重的网箱,10天持续死鱼总数约138尾,占网箱总放养量的11.5%(总放养量为1200尾)。濒死鱼腹部膨胀,偶有腹水;表皮有或没有溃疡,若有时,多在体侧、背鳍基等处;鳞片疏松易于脱落;鳍条折叠并常有鳍膜破损;眼眶常有水肿,严重时眼球突出或脱落。口服四环素治疗一星期后死鱼停止,但解剖见组织内仍有结节存在,坏死组织血管大量增生。病鱼肝、脾和肠系膜上均有针尖大小的结节隆起(图版 I:1),器官表面的结节大小不超过1.2mm。切开患病器官,切面上可见更多的结节。内脏器官萎缩,肠内无食物。肝脏呈土黄到粉红色,有深红的斑块。

肝、脾活组织压片内有大量结节,仅少数可见杆菌;肠系膜压片结节较少,但有较多杆菌,这些杆菌经革兰氏染色法和齐尼二氏染色法染色,均呈阳性(图版 I:6)。杆菌直或稍弯,长短悬殊,约为4—12 μm ,平均9.4 μm ;直径较一致,约0.4—0.5 μm 。菌体两端钝圆,以齐尼二氏染色法染色的杆菌,其外壁染色较淡。

2. 病鱼结节类型

病鱼各器官的结节无器官差异,位于器官表面的结节,一般仅1/3—1/2凸出器官表面,其结构与器官内部的结节相同;单个结节的直径在80—1400 μm 。患病器官的病灶有6种情况,其中包括4类型结节,另外两种情况无结节构造。

(1) 结节形成前期 器官在感染了细菌但尚未形成结节期间。其组织内可见白细胞浸润,在血管内也可见到大量的白细胞异常聚集。白细胞的胞质内大都具有嗜伊红小颗粒。在白细胞浸润的附近常常有杆菌呈分散或小团分布。浸润的细胞还包括巨噬细胞,其胞浆丰富,有均匀分布的嗜伊红小颗粒,细胞表面有突起伸出,但细胞的界限不清楚(图版 I:3)。

此外,在某些部位除白细胞渗出外,还可看到大量的渗出液(图版 I:4)。

(2) I型结节 是一类尚未形成结节包膜、中心仅由菌团和上皮样细胞构成的结节。上皮样细胞呈较一致的多角形或椭圆形,靠近结节边缘的上皮样细胞多为椭圆形且有较明显的细胞界限。上皮样细胞的核多为圆形,染色质甚少,故呈空泡状,内有1—2个明显的核仁;胞浆丰富,微嗜酸性,故可被伊红染成淡红色;胞质内偶有菌体存在,可在Wade-Fite氏染色法染色的切片中鉴别。细胞间常以胞质突起相互连结,故有时若网状。此型结节的后期可在个别部位出现包膜成分但不形成完整的包膜,也偶有巨细胞出现(图版 I:2,5,6)。

(3) II型结节 结节的外缘有由成纤维细胞和纤维等组分构成的完整的结缔组织包膜,结节中心未有干酪样坏死出现(图版 I:7,8;图版 II:1—5)。

用Mallory氏三色法可将结节内的上皮样细胞区分为四层(图版 II:3)。最中心层的细胞最先发生坏死,被染成品红色;大部分细胞已发生核溶解,少数为核固缩或破碎,胞浆浓缩;次中心层的细胞多为梭形,核固缩致密,胞浆有许多嗜酸性颗粒,细胞界限不清,被苯胺蓝染成蓝色;中心往外第3层的细胞界限清晰,核圆形且染色质较多,胞浆也有嗜酸性颗粒;最外层的上皮样细胞界限不清,核圆形而染色质甚多。结节的纤维性包膜有许多颗粒性白细胞浸润(图版 I:7;II:3)。

结节的另一组分是巨细胞。巨细胞具有多个胞核,从数个到十数个不等;核的形态与

上皮样细胞的核相似,但染色质较多;核呈不规则地排列在清亮的胞体的中心或一端。巨细胞的直径约为 40—50 μm ,最大达 62 μm ;胞膜明显,胞浆不甚丰富,故多呈空泡样(图版 I:8;II:1,2,6)。在部分结节内(图版 II:1,2)可见巨细胞含有黑素颗粒或团块,可占据细胞的大部分体积。

结节中心坏死的细胞呈 PAS 阳性反应(图版 II:4);在 Wade-Fite 氏法染色时,杆菌被染成鲜红色,较为显著(图版 II:5)。

(4) III 型结节 其显著的特征是中心形成干酪样坏死区,也有完整的包膜。结节的其它组分包括上皮样细胞和巨细胞,其形态特征类似 II 型的该类细胞。干酪样坏死区的细胞界限完全消失,除少数具有核碎片外,大部分均成为无核、无结构的颗粒性细胞残骸,它们也呈 PAS 阳性反应(图版 III:1)。数个这类型结节或结节内的数个干酪样坏死中心,可融合成相互连接的一块,由 Mallory 氏法可将其区分为内红外蓝两层。某些 III 型结节的干酪样坏死中心不发生融合,仅是其外层的细胞连通包围着数个坏死中心并共用一结节包膜(图版 III:2)。

III 型结节的包膜可有组分和厚薄的不同,甚至在同一结节的部位也有差异。主要有两类:其一是包膜较薄,仅由少量成纤维细胞构成;另一类则较厚,除由丰富的成纤维细胞和纤维细胞构成外,还有白细胞浸润其中。

(5) IV 型结节 结节内具有空洞。空洞内一般有干酪样坏死物液化后留下的物质,呈细致的网状,上有杆菌。有的空洞外有或缺上皮样细胞,但均有完整的纤维性包膜。结节的外围常有较多的白细胞浸润(图版 III:3,4)。

(6) 结节外围的组织损害 结节外围的组织多数坏死,细胞排列紊乱,坏死灶微嗜酸性。组织中可见大量的毛细血管增生(图版 III:5);局部还可见到大量浸润的淋巴细胞和其他白细胞(图版 III:6)。

三、讨论和结论

1. 结节病确诊的依据和病原菌

国外学者认为^[2,3],用齐尼二氏法在结节中心和巨噬细胞内找到抗酸杆菌即可作出确诊。本文在鲜活组织压片和组织切片的坏死中心和巨噬细胞内均找到抗酸杆菌,故可确诊。从病原菌的菌体形态、感染症状、结节形态、慢性发病的形式和感染温热带种类(黄鳍鲷)等特征看,与国外学者所确定的分枝杆菌三个种中的海分枝杆菌(*M. marinum*)最为相符,确否尚待进一步证实。

2. 结节病的主要症状及其转化

黄鳍鲷结节病所表现的症状与国外学者所述大致相似,但本文则仅在肝、脾和肠系膜查到结节,并以肝、脾较严重。眼眶水肿、眼球脱落则是过去所未述及之处。

本文据结节及病灶的组织特点,将其系统地划分为六种情况四型结节,更有利于讨论其成分的来源及转化。

当病原菌侵入时,首先表现为结节形成前期以渗出为主的病变。渗出细胞和渗出液是早期机体对抗病菌的反应,有稀释病菌毒素、带走病灶内的代谢产物、局限和杀灭病菌的作用。白细胞浸润仅是短时现象,随后占优势的是巨噬细胞吞噬病菌并逐渐转变为上

皮样细胞。上皮样细胞聚集体即所谓 I 型结节,该型结节较易检出病菌。鱼类无骨髓,巨噬细胞主要来源于网状内皮和结缔组织。

由于变态反应的影响,结节中心的上皮样细胞开始坏死,并逐步向四周扩展,其先后及程度的不同反映出不同的染色层次(图版 II:3)。结节边缘的上皮样细胞可因机体细胞免疫反应而转变为成纤维细胞,该细胞与外围的成纤维细胞共同形成纤维包膜,进一步局限了病菌。即所谓 II 型结节。

II 型结节在较强变态反应的作用下形成 III 型结节。其中心坏死区发展成为干酪样坏死物。它们是一些 PAS 阳性反应的无结构颗粒,可能是菌体脂类和上皮样细胞解体生成的物质,故不易检出病菌。在较恶化的情况下,结节外围渗出增加,形成融合性大结节。这种结节因范围扩大而对组织损害更剧。

IV 型结节中形成空洞,空洞内的液化物和病菌可沿器官自然管道播散,产生新的结节。

因此,四类型结节的形成和转化,实质上是机体杀灭、局限病菌的特殊过程,而在这过程中,病菌本身也要求繁殖、播散。大量结节的形成,影响了器官的正常机能,同时病菌毒素也损害机体各部分组织,严重时造成鱼的死亡。

3. 巨细胞的来源及其作用

值得一提的是,国外学者在自然发生的结节病中尚未见到巨细胞出现^[1],本文在 II, III 型结节均可见到明显的巨细胞。这些细胞与哺乳动物结核病所见的朗罕氏巨细胞大致相似,但其核的数量较少,细胞体积也较小,此外,核的排列也不呈马蹄铁形。这可能与鱼类组织特性有关。从巨细胞的形态看,其尚未完全融合的胞膜暗示数个乃至十数个吞噬细胞为了围歼病菌相互融合而成。

某些巨细胞内有黑素颗粒存在(图版 II:1,2)。黑素颗粒均很黑,可能是脂褐质一类物质处于完全氧化之故。黑素有与芳香化合物、环状化合物及阳离子等结合的能力,其还原型辅酶 I(NADH) 的氧化作用及过氧化氢生成均有杀菌作用,故黑素的出现是机体抗病菌的反应之一。黑素颗粒的形状及数量提示逐步累积而成的可能,含黑素的细胞与巨细胞形态相似,可能有着共同的来源。

4. 包膜的组分及作用

包膜最初由成纤维细胞组成,以后逐渐转化为纤维细胞并有白细胞浸润,具有局限病灶的作用。其厚薄和组分不同,反映了结节形成过程中菌量、毒力和机体抵抗力强弱的关系。包膜上浸润的白细胞具滤过作用,但包膜并不是绝对的屏障,细菌毒素及代谢产物仍可透过而造成外围组织的大面积坏死。外围组织大量毛细血管增生和淋巴细胞等白细胞浸润证实了这点。

综上所述,在尚未形成结节前,杀菌抑菌以预防,是减少死亡的最有效措施;当结节形成后,应争取在 I,II 型结节期施药治疗,促进机体愈复;而在 III,IV 型结节期,则因组织受到严重的损害而不易得到理想的疗效。

参 考 文 献

[1] 芮菊生、杜懋琴、陈海明等,1980。组织切片技术。人民教育出版社,120—138页。

- [2] 里贝林, W. E. (华鼎可、陈耀祖译), 1982. 鱼类病理学. 农业出版社, 46—48 页。
- [3] 江草周三, 1978. 魚の感染症. 恒星社厚生閣, 235—239 页。
- [4] Austin, B. & D. A. Austin, 1987. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Ltd., pp. 61—67.
- [5] Amlacher, E. (D. A. Conroy & R. L. Herman translated), 1970. Textbook of Fish Diseases. Inc., Ltd, the British Crown Colony of Hong Kong, pp. 103—117.
- [6] Heinz-Hermann Reichenbach-Klinke (Christa Ahrens translated), 1981. Fish Pathology. Inc., Ltd, the British Crown Colony of Hong Kong, pp. 92—95.
- [7] Roberts, R. J., 1982. Microbial Diseases of Fish. Society for General Microbiology. Academic Press, pp. 131—149.

HISTOPATHOLOGICAL STUDIES ON THE TUBERCULOSIS OF BLACK BREAM, *SPARUS LATUS* HOUTTUYN

Zhang Yongjia

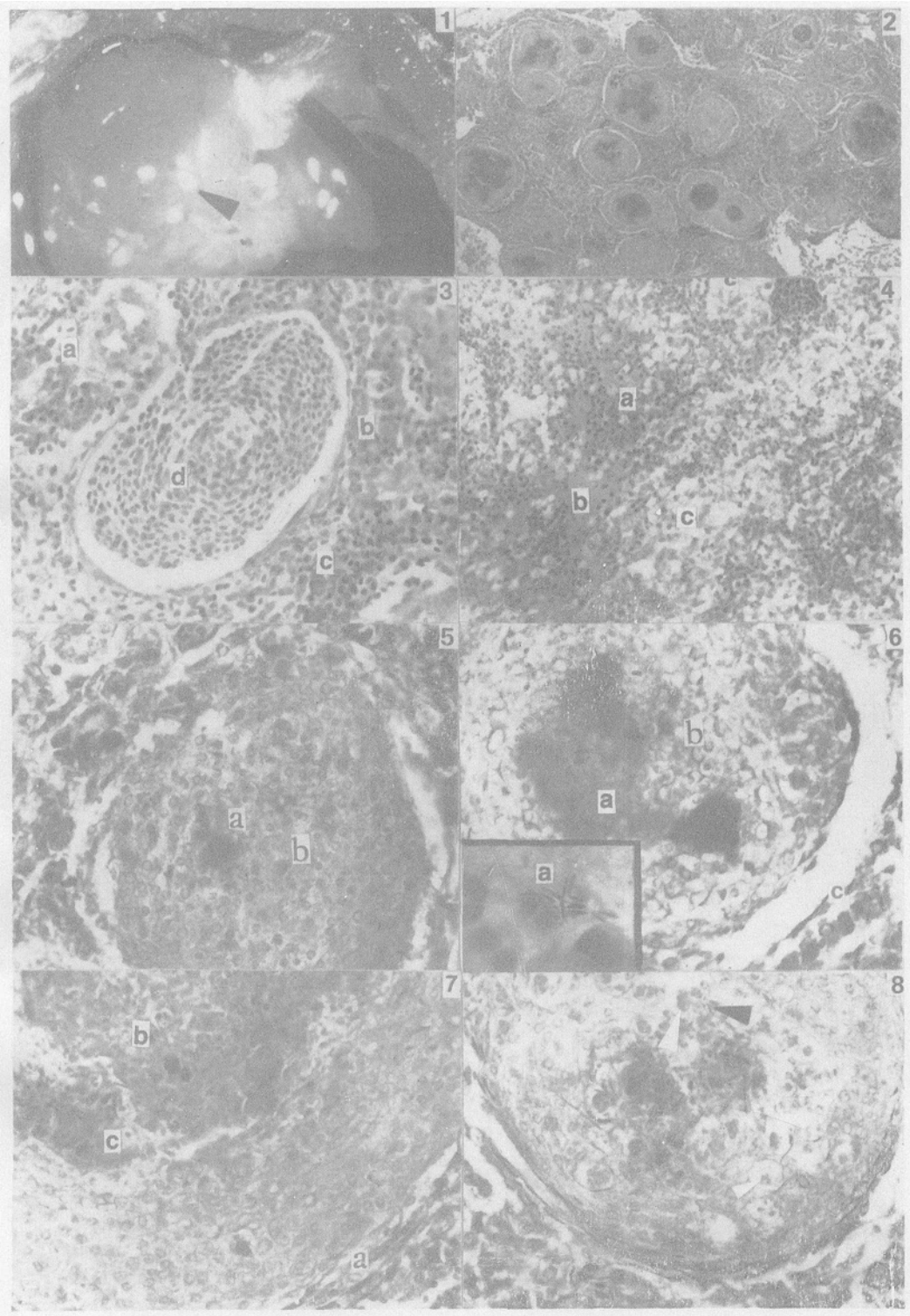
(Zhanjiang Fisheries College, 524025)

ABSTRACT

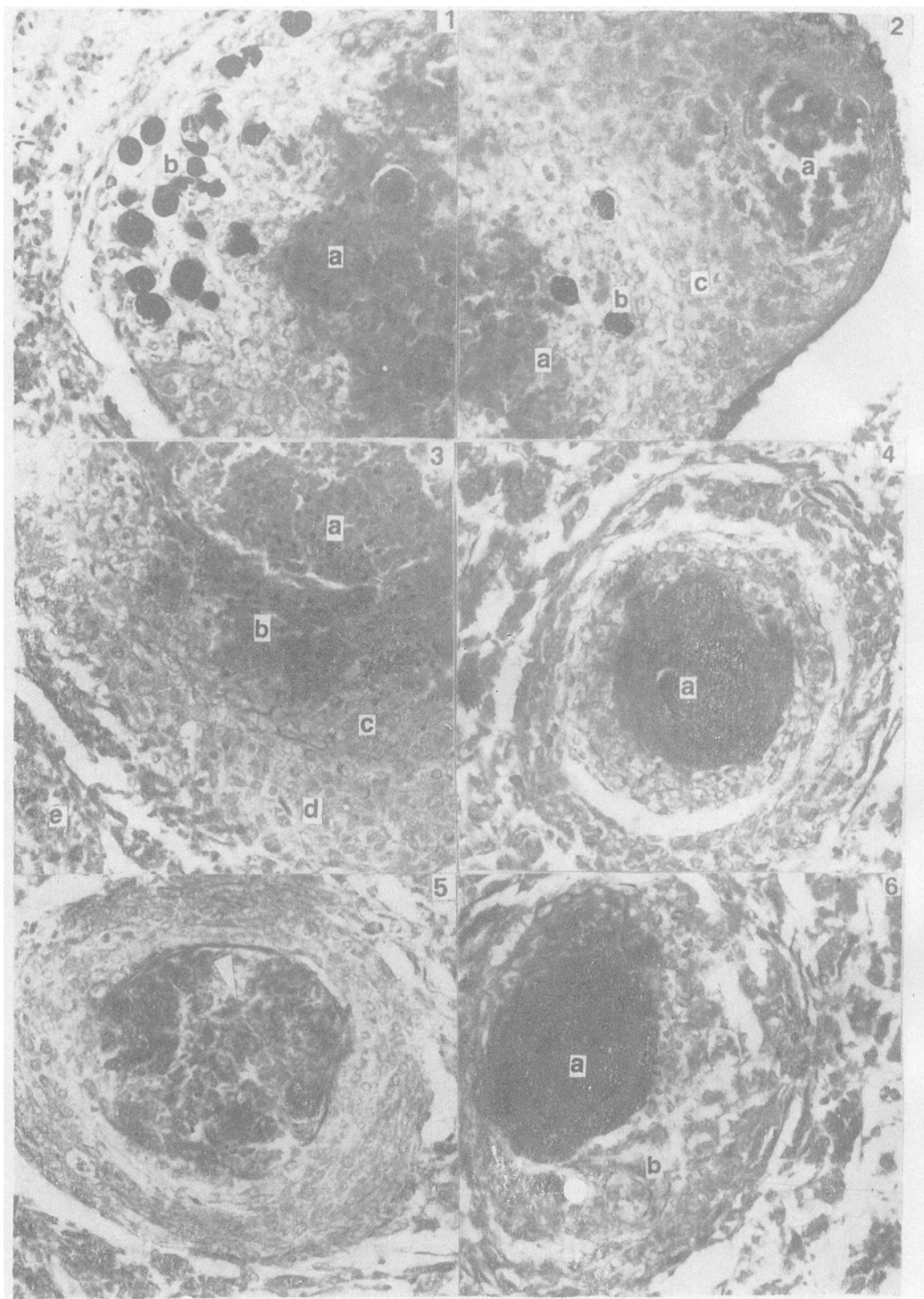
In 1989, the tuberculosis of black bream, *Sparus latus* Houttuyn, sampled from marine net cages, was given a definite diagnosis by the observation on the smears obtained by squashing tissue of the diseased organs and the histopathological sections under LM.

The results of the histopathological studies indicated:

1. The tuberculosis of black bream is caused by *Mycobacterium* sp. infection. The pathogen is a Gram positive, non-motile, acid-fast rod, with a very variable length (about 4—12 μm , mean 9.4 μm) and a resembling diameter (about 0.4—0.5 μm). 2. The disease is characterised by focal granulomas composed of epitheloid cells and giant cells. According to the structure of the tubercles, they are classified into four types, i.e. I, the tubercles without shell; II, with shell; III, with cheese necrotic center and shell; and IV, with a hollow and shell. 3. The formation and development process of the four types of tubercles is an inflammatory process in which macrophages killed and limited the bacilli, and the bacilli demand for proliferation and transmission, exhibiting various symptoms and different lesion to fish in the disease stages. 4. The differences between the giant cells of the tuberculosis of black bream and those of mammal are the numbers and arrangement of the nuclei. The appearance of melanin in giant cell is related to the necrosis of epitheloid cells of tubercles. The morphology of the connective tissue shell varies with the quantity, virulence of the pathogen and the resistance of the organism to the bacteria.



1. 患结节病黄鳍鲷腹腔, 箭头示肝脏表面隆起的结节, $\times 8$ 。2. 黄鳍鲷脾切片, 示各类型结节, H&E, $\times 40$ 。3. 结节形成前期病灶: a. 致病菌; b. 增生的巨噬细胞; c. 渗出的白细胞; d. 血窦内白细胞异常聚集, H&E, $\times 400$ 。4. 脾切片: a. 渗出的白细胞; b. 渗出液; c. 巨噬细胞; H&E, $\times 200$ 。5. I型结节: a. 菌团; b. 上皮样细胞; H&LE, $\times 400$ 。6. I型结节: a. 抗酸杆菌; b. 上皮样细胞; c. 结缔组织包膜开始形成, Wade-Fite 法, $\times 400$; 左下角小图 a 示结节内的杆菌(压片经抗酸法染色, $\times 1000$)。7. II型结节: a. 包膜; b. 核溶解; c. 核固缩; H&E, $\times 400$ 。8. II型结节: 白箭头示巨细胞内核的排列; 黑箭头示杆菌; Wade-Fite 法, $\times 400$ 。



1. II型结节: a. 杆菌; b. 黑素颗粒; Fortana 法, $\times 400$ 。 2. II型结节: a. 结节中的两个坏死中心; b. 黑素颗粒; c. 上皮样细胞有丰富的胞浆, H&E, $\times 400$ 。 3. II型结节: a, b, c, d 示四个层次的上皮样细胞; e. 浸润包膜的颗粒性白细胞; Mallory 氏三色法, $\times 400$ 。 4. II型结节: a. 中心坏死区显示出 PAS 阳性反应, $\times 400$ 。 5. II型结节坏死中心的抗酸杆菌, Wade-Fite 法, $\times 400$ 。 6. III型结节: a. 中心干酪样坏死; b. 巨细胞, H&E, $\times 400$ 。



1.III型结节: a.中心干酪样坏死区显示 PAS 阳性反应, $\times 400$ 。2.数个 III 型结节融合: a.中心干酪样坏死区; b.次中心区, Mallory 氏三色法, $\times 400$ 。3.IV 型结节: a.干酪样坏死物液化后留下的网状物; b.浸润的颗粒性白细胞, H&E, $\times 400$ 。4.IV 型结节: a.示纤维性包膜, Mallory 氏三色法, $\times 400$ 。5.肝脏切片: a.结节外围的肝组织中有许多增生的毛细血管; b.坏死的肝细胞, H&E, $\times 400$ 。6.脾表面膜有许多渗出的各类型白细胞 (a), H&E, $\times 400$ 。