

暗纹东方鲀毛霉菌感染的组织病理学观察

杨鸢劫¹ 陈 辉² 张朝晖^{3*}

(1. 江苏省淡水水产研究所 南京 210017)

(2. 江苏省水生动物疾病预防控制中心 南京 210036)

(3. 江苏省海洋与渔业局 南京 2100003)

摘 要: 对病症表现为溃疡性疾病的暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)进行了病原菌培养和组织病理观察。镜检溃疡和肌肉组织,可见丝状型粗大、无隔、分枝,革兰氏染色阳性的真菌菌丝。心、肝、脾和肠组织有少量炎细胞浸润,未见真菌菌丝和明显组织病理变化。经 Sabouraud 培养基培养观察,37℃,24 h 菌丝顶端有淡黄色球形孢子囊;72 h 出现气生菌丝,孢子囊成熟,释放卵圆形孢囊孢子;120 h 后菌落充满平皿。肌体溃疡处皮下和肌肉组织切片镜检显示,大量菌丝体侵入皮下组织,炎细胞浸润,引起邻近肌肉组织变性坏死和间质水肿;粗大菌丝穿透粘膜入侵基底组织,同时导致小血管发生栓塞;菌丝着色显蓝色、分枝、呈直角。依据 Ainsworth 真菌分类系统鉴定为毛霉属(*Mucor* sp.)真菌。

关键词: 暗纹东方鲀, 真菌, 组织病理, 毛霉属

Histopathological Observation of Puffer *Fugu obscurus* Infected with Mucormycosis

YANG Yuan-Jie¹ CHEN Hui² ZHANG Chao-Hui^{3*}

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017)

(2. Jiangsu Provincial Aquatic Technology Extension Station, Nanjing 210036)

(3. Jiangsu Provincial Ocean and Fisheries Bureau, Nanjing 210003)

Abstract: Pathogens cultivation and histopathological observation was made on *Fugu obscurus* with the symptom of ulceration. Microscope examination on ulcers and muscle tissues which infected with fungal mycelium that was coarse, without branch, Gram staining positive. Heart, liver, spleen and intestine contained small amount of inflammatory cell invasion without fungal mycelium and obvious pathological changes. The result of Sabouraud medium culture with the temperature of 37℃ as follow: Mycelia had pale yellow spherical sporangium after 24 h; mycelium appeared, the sporangium matured and oval spores released after 72 h; glass utensil was full of colony after 120 h. Pathological examination of subcutaneous ulcer and muscle revealed that a large number mycelia and inflammatory cell invaded subcutaneous tissue, which caused neighboring muscle tissue degeneration, necrosis and interstitial edema; Coarse hyphae penetrated mucosal into the basement with the result of small vascular embolization at the same time. Mycelium contained blue color and branch looked like a right angle. According to Ainsworth classification system, the

pathogen was identified as *Mucor* sp.

Keywords: *Fugu obscurus*, Fungi, Histopathology, *Mucor* sp.

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鲀形目(Tetraodontidae), 鲀科(Tetraodontidae), 东方鲀属(*Takifugu* Abe), 为近海与河川肉食性, 中下层洄游性鱼类。随着暗纹东方鲀人工繁殖技术的日臻完善, 人工温室养殖已形成一定的发展规模。

近年来江苏某河鲀养殖场冬春季连续发生不明原因疾病, 发病死亡率达 100%。患病鱼发病初期体表现白点, 以后白点逐渐扩大可达数厘米, 颜色由白色逐渐变为黄棕色, 并形成环状的苍白圈, 病灶中心常出现糜烂溃疡, 可延伸至肌肉内, 随即死亡。经细菌和真菌培养检查结果发现为毛霉菌感染所致。国内对水生动物真菌性疾病的研究主要集中于水霉菌和鳃霉菌, 毛霉菌感染极少发现。相关水生动物毛霉菌引起的疾病仅见唐殿明^[1]、谭振^[2]和岩男^[3]对鳃毛霉菌病进行了报道, 对水生动物真菌性疾病的认识远不如对细菌性疾病和寄生虫病那样系统深入。本研究通过对暗纹东方鲀患病组织病理变化的观察, 为水生动物真菌性疾病的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 镜检检查

患病暗纹东方鲀取自江苏某河鲀室内养殖场。对病症明显的濒死暗纹东方鲀进行解剖, 取溃疡、肌肉、心、肝、脾和肠等组织, 置载玻片镜检检查, 同时用革兰氏染色检查细菌。

1.2 菌落观察

无菌选取病灶组织, 分别接种于 Sabouraud 氏琼脂平皿和高盐察氏斜面, 置培养箱分别在 25、37 和 43 条件下培养 48 h、72 h、96 h 和 120 h 后观察其生长情况。

1.3 病理检查

取濒死暗纹东方鲀溃疡、肌肉、心、肝、脾和肠等组织, Bouin's 液固定 24 h, 70%酒精洗涤, 修切, 酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片 2 μm ~5 μm , HE 染色, 镜检观察。

2 结果与分析

2.1 镜检检查

濒死暗纹东方鲀溃疡和肌肉组织压片镜检可见丝状型, 粗大、无隔、分枝菌丝, 革兰氏染色阳性, 呈紫色, 此症为真菌感染。心、肝、脾和肠组织未见真菌菌丝, 细菌检查革兰氏染色阴性。

2.2 菌落观察

培养物在 Sabouraud 琼脂平皿 25、37 和 43 条件下均能生长, 以 37 和 25 生长最为适宜。37、48 h 后形成直径 1.8 cm 的灰色菌落, 菌落粗糙呈绒毛状; 72 h 后菌落直径达 3.8 cm, 菌丝体在基质产气生菌丝, 高约 0.8 cm, 呈灰白色棉花样, 培养基底部呈黄色; 120 h 后菌落充满平皿, 直径 8 cm, 菌落高度 1.1 cm。高盐察氏斜面 37、48 h 后有铜钱大小的白色丝状菌落, 以后菌落中心逐渐变成黄色, 最后成灰黑色, 培养基底部为黄绿色。

镜检 37、24 h 培养物, 无葡萄菌丝和假根, 菌丝顶端有单生的球形孢子囊, 直径 20 μm ~40 μm , 呈淡黄色, 孢子囊下面无囊托。72 h 孢子囊成熟, 囊壁消解, 释放出无数卵圆形孢囊孢子, 直径 5.8 μm ~8.2 μm 。孢囊表面有粗糙的圆锥形突起, 配子囊柄光滑, 无附属丝。

根据 Ainsworth^[4]分类系统初步鉴定此菌株为毛霉科(Mucoraceae)、毛霉属(*Mucor* sp.)真菌。

2.3 病理组织学变化

患病暗纹东方鲀组织病理变化表现为溃疡性。心、肝、脾和肠组织有少量炎细胞浸润, 但未见明显组织病理变化^[5]。体表溃疡处皮下和肌肉组织中有大量炎症细胞, 引起表皮和皮下组织坏死(图 1); 大量毛霉菌菌丝体侵入皮下组织(图 2); 菌丝邻近组织肌肉细胞变性坏死, 间质水肿, 大量炎细胞浸润(图 3); 菌丝分枝, 呈直角, 兰染(图 4); 粗大菌丝穿透粘膜入侵基底组织, 在引起邻近肌肉组织变性坏死的同时粗大菌丝导致小血管发生栓塞(图 5); 菌丝侵入小血管内发生栓塞(图 6 横切面)。

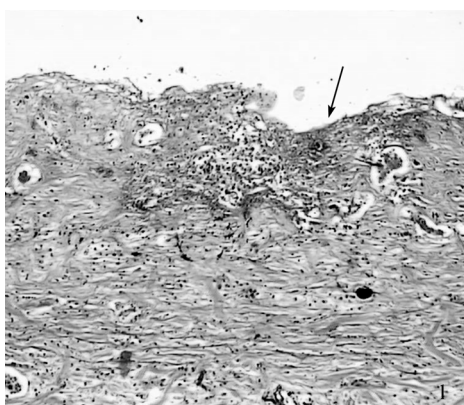


图1 表皮和肌肉组织坏死, 大量炎细胞浸润($\times 100$)
Fig. 1 Putrescence of epidermis and hypodermis, infiltration with a large amount of inflammatory cells ($\times 100$)

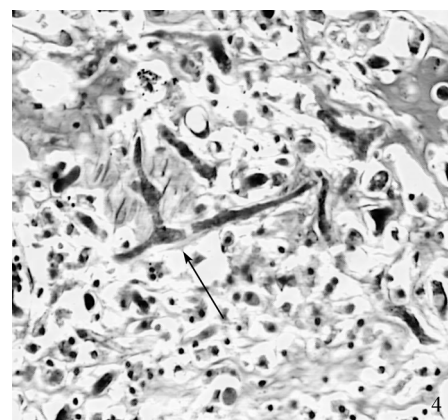


图4 菌丝分枝, 呈直角, 毛霉菌丝兰染($\times 400$)
Fig. 4 Hyphae branching and appearing rectangular in mucormycosis hyphae gram-stain ($\times 400$)

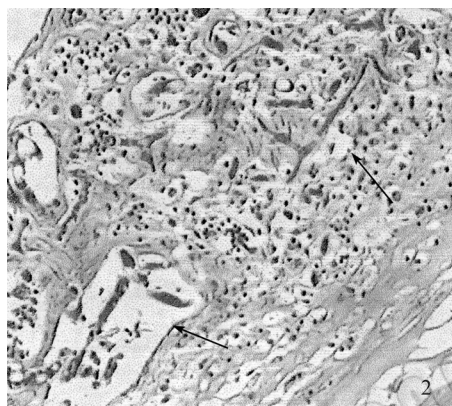


图2 菌丝体侵入肌肉组织($\times 400$)
Fig. 2 Large amount of hyphae invasion in muscle tissue ($\times 400$)

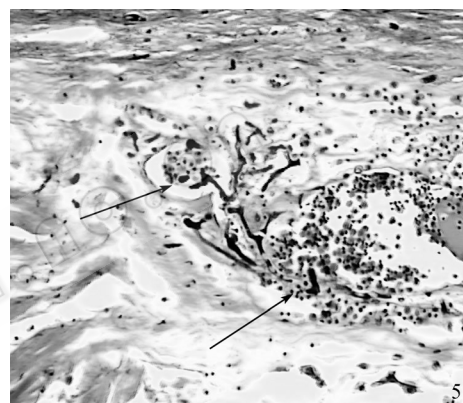


图5 菌丝侵入引起邻近肌肉组织变性坏死的同时粗大菌丝导致小血管发生栓塞($\times 200$)
Fig. 5 The adjacent muscles show denaturalization putrescence due to hyphae invading which simultaneously cause embolism of small vessels ($\times 200$)

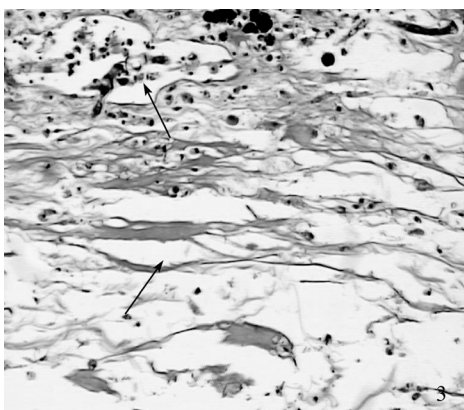


图3 皮下肌肉组织水肿, 大量炎细胞浸润($\times 200$)
Fig. 3 Edema around the hypodermis muscle tissue, infiltration with a large amount of inflammatory cells($\times 200$)



图6 菌丝侵入小血管内发生栓塞(横切面)($\times 400$)
Fig. 6 Embolism caused by hyphae invasion in small vessel (longitudinal section)($\times 400$)

3 讨论

毛霉菌在真菌分类学上, 隶属接合菌亚门(Zygomycotina)、毛霉纲(Trichomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、毛霉属(*Mucor* sp.)。广泛存在于空气、水体、土壤及腐败有机体中^[6]。通常在机体营养不良、抵抗力低下和体表损伤时侵入肌体组织, 是一类致命的条件致病菌^[7]。首例人类感染毛霉菌由德国人Kurchenmeister 1855年发现于肺肿瘤病人^[8], 国内外文献资料多次报道人类和动物因毛霉菌感染致死的病例^[9-14]。本病症是在人工温室养殖暗纹东方鲀中首次发现, 发病季节为冬春季, 且尚未在其它养殖鱼类发现该病的爆发和流行。

从流行病学调查可见, 该菌主要通过血行播散到全身各个脏器。对动物感染病程可分为急性型、亚急性型和慢性型3种类型^[15-17]。其中急性型以引起循环障碍为主, 也可局限于粘膜及粘膜下层出现炎症、血管壁坏死; 亚急性型有较高死亡率, 病灶可从表层粘膜向肌肉组织延伸, 菌丝可侵入血管内并形成血栓, 导致死亡; 慢性型以表面溃疡及病灶周围肉芽组织增生为主, 是死亡率极高的系统性深部真菌感染疾病^[18]。血管是毛霉菌侵袭的重要靶器官, 灶性坏死以血管为中心, 菌丝侵犯血管后可引起血栓, 导致血管梗塞, 同时使周围组织坏死, 坏死组织中均可找到大量粗大菌丝, 菌丝内不分隔, 呈直角分枝, 这也是与其它真菌感染的特征性区别。

通过对患病暗纹东方鲀组织病理研究发现, 该毛霉菌菌丝首先侵袭表体, 以腐物寄生形式存在, 继而侵入组织。粗大菌丝极易穿透粘膜侵入基底组织, 导致机体病灶中心出现糜烂溃破, 引起组织灶性坏死, 并伴随大量炎性细胞浸润。溃疡周围的病变组织中有大量毛霉菌, 还见有菌丝侵入多处血管, 引起血栓和梗死。由于坏死组织缺氧呈酸性, 为毛霉菌生长提供了适宜的环境, 使病变加剧, 最终鱼体呼吸困难直至死亡。

毛霉菌感染病程发展较快, 死亡率为100%, 而实验室分离培养时间较长, 疾病的诊断主要有赖于对相应病变组织进行毛霉菌的形态学诊断, 这给疾病的早期诊断带来一定的困难。该病的发生与养殖模式和鱼体自身的免疫能力有关, 为此在努力搞好养殖水体环境, 定期使用水体消毒剂和生物水质改

良剂控制水质的同时, 通过合理的营养提高养殖河鲀的免疫功能, 严格控制抗生素、皮质类固醇激素和免疫抑制剂的使用, 这将对此病的发生起到积极有效的预防作用。

参 考 文 献

- [1] 唐殿明. 从入境幼鳖中检出毛霉菌病. 中国动物检疫, 1995, 12(3): 14-15.
- [2] 谭 振. 鳖病防治技术. 河南科技, 1994, 12: 15-16.
- [3] 岩男昂, 王士莉译. 甲鱼的两例疾病. 国外水产, 1989, 2: 37.
- [4] Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS. The Fungi: An advanced Treatise. New York: Academic Press, 1973, pp. 221-286.
- [5] 里贝林 WE, 三垣 G. 鱼类病理学. 北京: 农业出版社, 1981, pp.17-67.
- [6] 余 贺主编. 医学微生物学. 第2版. 北京: 人民卫生出版, 1984, p. 449.
- [7] 王高松. 临床真菌病学. 上海: 复旦大学出版社, 1984, p. 163.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] 图布丹扎布, 郭景芳, 曹 跃. 雏鸡毛霉菌病的病原分离与鉴定. 中国兽医杂志, 1995, 21(1): 20.
- [10] 李国勤. 动物毛霉菌病. 中国兽医学报, 1996, 16(3): 309-312.
- [11] 汪昭贤, 谢毓芬, 秦 晟. 实验动物毛霉菌临床与病理学观察. 西北农业学报, 1999, 8(1): 11-14.
- [12] 汪昭贤, 谢毓芬, 李国勤, 等. 山羊毛霉菌临床与病理学观察. 畜牧兽医学报, 1998, 29(1): 83-87.
- [13] 李德荣, 李端秀, 李海艳, 等. 孔雀毛霉菌的诊治. 中国兽医科技, 2000, 30(9): 40.
- [14] 山口直士. 毛霉菌病. 日本兽医学会杂志, 1981, 34(3): 128.
- [15] Rippon JW. Medical Mycology. 2nd. Philadelphia: WB Saunders. Co. 1982, pp. 615-640.
- [16] 邱震东. 家畜病理解剖学. 长春: 中国人民解放军兽医大学出版社, 1984, pp. 270-271.
- [17] Jalexopoulos C, 明斯 CW. 真菌学概论. 北京: 农业出版社, 1983, p. 177.
- [18] 中山医学院. 病理学. 北京: 人民卫生出版社, 1978, p. 612.