

文章编号: 1000- 0615(2003)02- 0158- 05

鲈脾肿大症的病原及细胞病理学的初步研究

王国良, 金 珊, 陈惠群
(宁波大学海洋与水产系, 浙江 宁波 315211)

摘要:首次报道了鲈脾肿大症的发病情况。病鱼以脾脏肿大为主要症状,死亡率高达 50% 以上。对病鱼进行显微镜检查和细菌分离培养,未见寄生虫和病原菌。经电镜检查,在脾、肝等组织中发现大量病毒颗粒。该病毒颗粒为六边形,没有囊膜,衣壳直径 180~ 220nm,认为该病毒属虹彩病毒(Iridoviridae)。细胞病理变化表现为感染细胞肿胀,细胞超微结构破坏,细胞质出现大面积空泡。血细胞中出现大量异形淋巴细胞,占淋巴细胞总数的 50% 以上。

关键词: 鲈; 脾肿大症; 病原; 超微结构

中图分类号: S941. 41 文献标识码: A

Pathogen and cytopathology of splenomegaly disease in *Lateolabrax japonicus*

WANG Guo-liang, JIN Shan, CHEN Hui-qun
(Department of Oceanography and Fisheries, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: This paper first reports the splenomegaly disease of seawater-cage cultured *Lateolabrax japonicus*. The main symptom of diseased fish is splenomegaly. Mortality rate of diseased fish reaches 50%. Neither parasites were found on body surface, gill filaments and other organs by microscope examination, nor pathogenic bacteria isolated from internal organs. However, under an electron microscope, a lot of virus particles were observed in spleen and liver of the diseased fish. The virus was a non-envelope with hexagon in section and about 180-220nm in diameter. The virus was assigned to Iridoviridae. Cytopathological changes showed that the cells swelling and ultrastructure broke with large area vacuoles in cytoplasm. A lot of distinctive lymphocytes were found in blood cells, which occupies 50% of the total number of the lymphocytes.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; splenomegaly disease; pathogen; ultrastructure

鲈(*Lateolabrax japonicus*) 因其具有广温、广盐、生长快、适合养殖区域范围大、肉质好、营养丰富、国内外兼销、经济效益好等特点,因此近年来一直是我国海水养殖高品质的鱼种之一。就浙江而言,近几年来鲈鱼的养殖网箱一直占海水养殖网箱总量的 40% 左右。但由于养殖集约化程度过高、种质退化、近海环境污染、养殖场地老化等诸多原因,病害逐渐增多,不时出现新的疾病种类。最近二年,浙江的奉化、象山等地养殖鲈鱼出现一种以脾肿大为主要特征的疾病。该病危害严重,常造成大批鱼死亡。目前

收稿日期: 2002-09-05

资助项目: 浙江省自然科学基金资助(396269)

作者简介: 王国良(1955-),男,浙江定海人,副教授,从事水产动物病害研究。Tel: 0574- 87600373, E-mail: wanggl@nbip.net.cn

还没有见到国内有关该病的研究报道, 为此我们对该病的病原及细胞病理学进行了初步的研究。

1 试验材料

病鱼于2000年8月采集自浙江省奉化市裘村海水网箱养殖鱼排, 病鱼体长10~15cm, 体重30~50g。对照用的健康鱼取自不发病的奉化市桐照海水网箱养殖鱼排, 鱼体规格与病鱼相同。

2 试验方法

2.1 寄生虫检查

常规显微镜检查病鱼体内外寄生虫。

2.2 细菌分离培养

选取具典型症状的濒死病鱼, 无菌操作取少量的肝、肾、脾及心脏血液分别在PGY、2216E和TCBS平板培养基上划线分离, 25℃恒温培养24h后观察。

2.3 病毒学方法

取病鱼脾脏和肝脏, 用无菌水清洗后, 以1:5比例加生理盐水研磨, 以4000 r·min⁻¹离心20min, 取上清液, 按体积每毫升加双抗各1000U, 24h后进行人工感染, 每尾腹腔注射0.1mL, 对照组注射等量加双抗的生理盐水。

2.4 病毒简易诊断

按参考文献[1]的方法解剖病鱼, 取出脾脏, 刀片切开, 将切面在干净的载玻片上轻轻按压, 制成压迹片, 自然干燥, Giemsa染色法染色, 镜检。

2.5 电镜观察

取病鱼肝、脾、肾、肠和鳃, 切成约1mm³小块, 用2.5%戊二醛和1.0%锇酸双重固定, Epon包埋, LKB超薄切片机制片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 置于日立H-600型透射电镜下观察。

2.6 血细胞观察

将健康鱼和病鱼分别断尾取血, 常规方法制血涂片, Wright氏染液染色后晾干, 在显微镜油镜下观察血细胞的形态及类型。

3 结果

3.1 病鱼的症状及流行情况

患病初期, 病鱼体表无明显症状, 仅反应迟钝, 食欲下降, 上浮水面。随着病情加重, 病鱼体表两侧后半身皮肤肌肉充血、出血, 挤压鱼体表有多量血渗出。鳍条有血丝, 有的病鱼吻部充血, 鳃丝贫血呈苍白色。解剖观察, 病鱼肝、肾无明显异常, 肝稍肿, 肠中无食物, 而脾脏明显肿大, 为正常鱼的3~5倍(图版-1)。该病主要发生在浙江省宁波的奉化、象山等地。发病季节为6~9月, 主要危害当年鱼和2龄鱼。由于目前尚无有效的控制方法, 一旦发病, 死亡率可高达50%以上。

3.2 寄生虫检查和细菌分离

体表、鳃、肝、肾、脾、腹腔及肠经常规显微镜检查, 未见寄生虫。病鱼的肝、肾、脾及心脏血液在

PGY、2216E 和 TCBS 平板培养基上均未见有细菌生长。

3.3 病毒学试验和病毒简易诊断

腹腔注射病毒悬液的 5 尾试验鲈, 在感染后 3~6d 内, 死亡率达 100%, 死亡症状不如自然发病症状表现的充分, 对照组无死亡。据井上洁病毒简易诊断法, 置脾脏压迹片于油镜下观察, 发现有与正常细胞明显不同的异形肥大细胞, 且肥大细胞 Giemsa 染色着色较深, 说明该组织有虹彩病毒感染。

3.4 细胞超微结构观察

病鱼肝、脾组织细胞损坏严重, 细胞结构模糊不清, 细胞质中出现大面积空白区。粗面内质网核糖体脱落, 线粒体嵴断裂部分消失成为无结构的空泡(图版-2,3,4)。在肝、脾细胞内发现大量病毒颗粒, 病毒颗粒截面呈六边形, 由电子密度中等的衣壳及致密的核心两部分组成, 没有囊膜, 衣壳直径 180~220nm, 核心直径 100~135nm。病毒颗粒分散或呈晶格排列在细胞质内(图版-5,6), 属于虹彩病毒科的一种较大的二十面体型 DNA 病毒。肾、肠组织超薄切片未见病毒颗粒。

3.5 血细胞观察

比较健康鱼血细胞, 病鱼未成熟红细胞比例高于健康鱼, 健康鱼未成熟红细胞在 5% 以下, 病鱼达到 10%~15%。红细胞总体趋向于小型, 健康鱼红细胞长径 8.25~16.5 μm , 短径 6.25~11.25 μm , 病鱼红细胞长径 6.25~11.25 μm , 短径 5.75~8.25 μm , 表明病鱼成熟红细胞可能有所破坏, 新生红细胞比例增大。淋巴细胞的变化比较大, 健康鱼大部分为小淋巴细胞, 直径 3.6~7.2 μm , 核所占比例大, 胞质少且常有伪足样突起; 大淋巴细胞较少见, 个体较大, 直径 7.2~9.0 μm , 胞质稍多。而病鱼中出现大量的异形淋巴细胞, 个体比健康鱼小淋巴细胞大 3~5 倍, 胞质增多, 数目超过淋巴细胞总数的 50%。血栓细胞和嗜中性粒细胞在形态与数目上, 与正常鱼无明显区别。

4 讨论

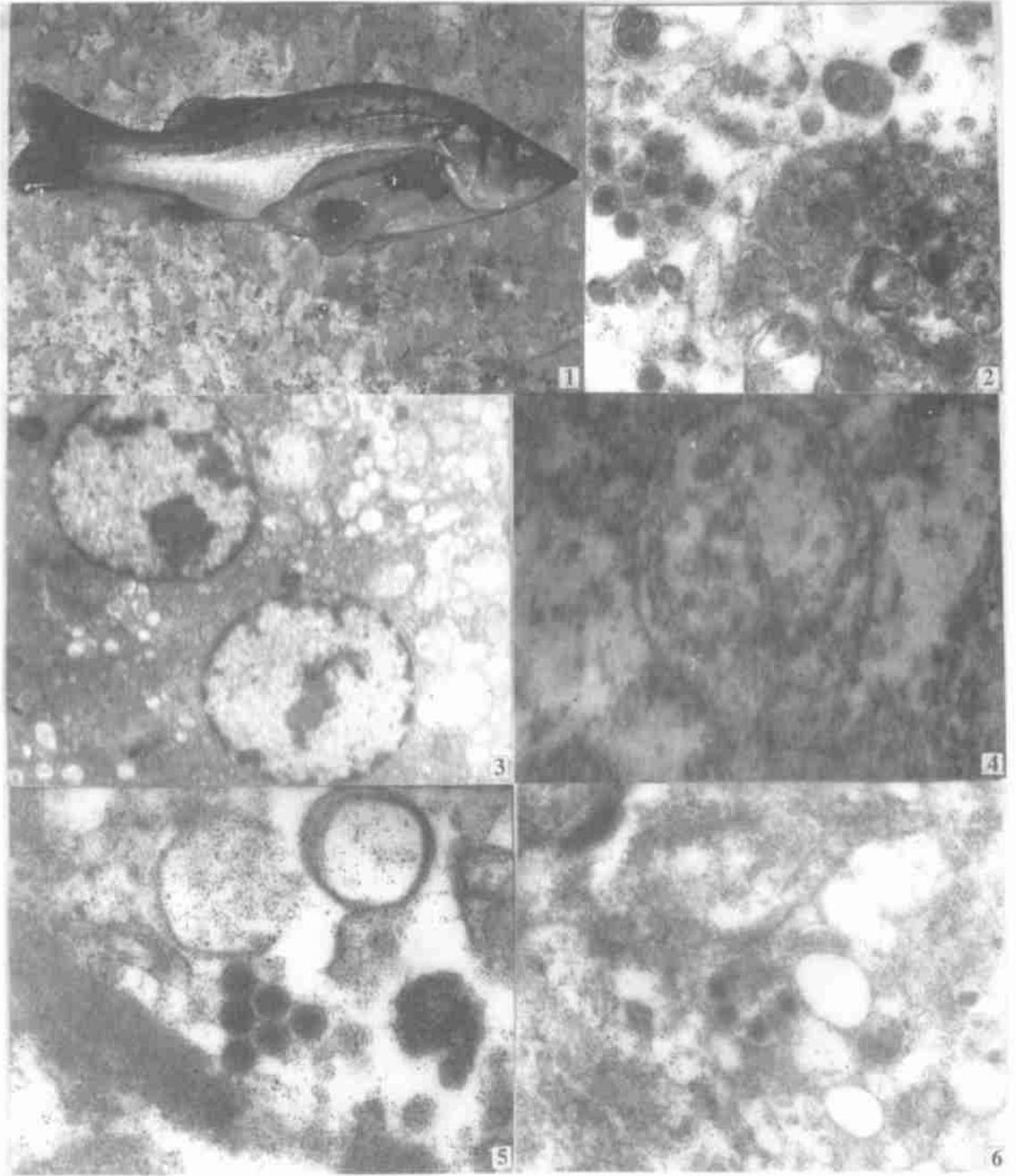
海水鱼类病毒性疾病的研究, 在许多方面仍然是一个较为落后的领域, 尤其是我国在这方面的研究还较薄弱, 相关研究报道较少。目前国内已报道的鲈病毒主要包括淋巴囊肿病毒和 2 种未定种的球形病毒^[2-4], 而作者于 2000 年在鲈脾、肝中检出的病毒, 超微形态上与上述报道明显不同, 且检出的部位也不同, 而与 Chua 等^[5] 对石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、真鲷 (*Pagrosomus major*) 等的虹彩病毒病的症状描述相似, 再结合井上洁的虹彩病毒感染病的简易诊断法, 作者认为此次在鲈脾、肝组织中检出的病毒应属于一类虹彩病毒, 具体分类地位有待进一步研究。虹彩病毒能感染石斑鱼、真鲷、鲈等不同科的多种鱼类, 且在日本、韩国等东南亚地区都有流行^[6,7], 广东沿海网箱养殖的美国红鱼中也发现与虹彩病毒相似的病毒粒子^[8]。因此, 在我国海水鱼类网箱养殖中对病毒病的危害应引起重视。

通过对病鱼组织的电镜观察, 发现病鱼脾、肝组织中有大量病毒粒子。而病鱼的肝、肾、脾、血液等的细菌培养, 未分离到病原菌; 体表、鳃、内脏组织的显微镜检查, 也未发现寄生虫存在。而用病鱼脾、肝组织浆感染健康鲈, 能使试验鲈致死, 结合养殖场采用多种抗菌药物进行治疗均无效, 说明该病是由病毒引起。由观察结果分析, 病毒以脾、肝组织为主要侵染器官, 以细胞质作为侵染及增殖的主要场所, 致使细胞器严重破坏, 导致上述组织器官呈现出明显的病理变化, 引起鱼死亡。养殖场同时饲养的其它鱼, 如大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、美国红鱼 (*Sciaenq ocellatus*)、黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 等则不受感染。有关该病毒的生物学特性和发病机理还需深入研究。

病鱼血细胞, 尤其是淋巴细胞的较大变化, 出现大量的异形淋巴细胞这一现象。张奇亚等^[9] 认为这是转化的淋巴细胞, 袁仕取等^[10] 在鳊鱼外周血中也观察到这种细胞, 认为可能是特化的淋巴细胞或是完全分化的浆细胞或是两者之间的过渡状态。本研究观察到病鱼外周血中出现大量特异的淋巴细胞, 可能是鲈鱼受病毒感染导致特异性免疫功能, 尤其是体液免疫功能增强的标志。

参考文献:

- [1] Hua D K. The cage cultured technique of marine fish and its diseases prevention and cure[M]. Taiwan: Fish World Editorial, Fishery Press, 1999. 96- 99. [华鼎可. 海水鱼网箱养殖及其疾病防治[M]. 台湾: 养鱼世界杂志社、水产出版社, 1999. 96- 99.]
- [2] Xue L Y, Wang G L, Xu X L, et al. Preliminary study on lymphocystis disease of marine cage cultured *Lateolabrax japonicus* [J]. Mar Sci, 1998, 2: 54- 57. [薛良义, 王国良, 徐兴林, 等. 海水网箱养殖鲈鱼淋巴囊肿病的初步研究[J]. 海洋科学, 1998, 2: 54- 57.]
- [3] Zhang Y J. Preliminary study on lymphocystis disease of marine cultured fish[J]. J Researches on Fish Disease, 1992, 14(4): 7- 8. [张永嘉. 海水鱼淋巴囊肿病的初步研究[J]. 鱼类病害研究, 1992, 14 (4): 7- 8.]
- [4] Xue L Y, Wang G L, Xu X L, et al. A viral disease in marine cage cultured bass *Lateolabrax japonicus* [J]. J Oceanography of Huanghai & Bohai Seas, 1998, 16(1): 28- 31. [薛良义, 王国良, 徐兴林, 等. 海水网箱养殖鲈鱼的一种病毒性疾病[J]. 黄渤海海洋, 1998, 16 (1): 28- 31.]
- [5] Chua F H, Wee J Y, Loo J J, et al. Investigation of outbreaks of a novel disease, sleepy grouper disease, affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tawina* [J]. J Fish Disease, 1994, 17: 417- 427.
- [6] Nakajima K, Minoru S. Biological and physico-chemical properties of iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major* [J]. Fish Path, 1994, 29(1): 29- 33.
- [7] Jung S J, Oh M J. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch in southern coastal areas of the Korean peninsula [J]. J Fish Dis, 2000, 23: 223- 226.
- [8] Li K B, Shi C B, Li X H, et al. Pathogen of infective outbreaking disease in *Sciaenq ocellatus* [J]. J Fish Sci China, 2002, 9(1): 56- 59. [李凯彬, 石存斌, 李新辉, 等. 眼斑拟石首鱼暴发性传染病病原初步研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 56- 59.]
- [9] Zhang Q Y, Li Z Q, Luo X C. The microscopic observation and comparison of the blood corpuscles of turtle, frog and fish[J]. Reservoir Fisheries, 1999, 19(3): 1- 3. [张奇亚, 李正秋, 罗晓春. 鳖、蛙、鱼血细胞的显微观察与比较[J]. 水利渔业, 1999, 19(3): 1- 3.]
- [10] Yuan S Q, Zhang Y A, Yao W J, et al. Micro and ultrastructure of peripheral blood cells of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilew sky) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1998, 22(1): 39- 45. [袁仕取, 张永安, 姚卫建, 等. 鳊鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1998, 22(1): 39- 45.]



图版 Plate

1. 患脾肿大症的鲈; 2. 病鱼脾脏细胞空泡化, $\times 30\ 000$; 3. 病鱼肝脏细胞空泡化, $\times 10\ 000$; 4. 病鱼肝脏细胞线粒体嵴断裂, $\times 40\ 000$; 5. 病鱼脾脏细胞内的病毒, $\times 30\ 000$; 6. 病鱼肝脏细胞内的病毒, $\times 25\ 000$

1. *Lateolabrax japonicus* having splenomegaly disease; 2. Vacuoles in spleen cells of disease fish, $\times 30\ 000$; 3. Vacuoles in liver cells of disease fish, $\times 10\ 000$; 4. Mitochondria ridges break in liver cells of disease fish, $\times 40\ 000$; 5. Virous in spleen cells of disease fish, $\times 30\ 000$; 6. Virus in liver cells of disease fish, $\times 25\ 000$