

中国对虾白黑斑病组织病理学研究*

蔡生力 王崇明 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 报道了中国对虾白黑斑病的肝胰腺、鳃、血液、胃、肠和肌肉等组织的压制片、显微切片及亚显微切片的观察结果。病虾鳃上常见肉芽肿和菌团(37%),肝胰腺有细小样病毒(HPV)包涵体感染(41%),但这些组织均未出现有规律的因生物性病原侵入而引起的病理组织变化。肉眼所见的白斑和黑斑是由一些大小不等、形状不一的棕黄色和褐色团块状物质沉积而成。超微结构显示这些类似脂褐质物质内没有包被细菌等生物性病原。据观察结果分析,该病为生理性疾病,而非感染性疾病。还讨论了白斑、黑斑的形成与病虾的生理代谢、酚氧化酶作用之间的关系。

关键词 中国对虾, 白黑斑病, 组织病理

80年代中期,我国北方诸省养殖的中国对虾(*Penaeus chinensis*)出现了1种新的疾病—对虾白黑斑病。随着对虾养殖的发展,生态环境日益恶化,该病的危害也日趋严重。发病虾池轻者死亡率为10%~20%,重者可达60%~70%,个别虾池乃至绝产。

孟庆显和俞开康最早报道了该病,描述和分析了病症病因,并提出了防治方法^[1]。徐启家和刘梦使用抗菌素^[2]、高振亮用添加Vc的饵料^[3]对该病进行防治实验,都取得了一定的效果。Lightner曾提及南太平洋岛养殖的日本对虾(*P. japonicus*)和墨吉对虾(*P. merguensis*)也出现了类似疾病^[4],原因不明,也不见详细的研究报道。

最初发现中国对虾白黑斑病时,许多研究人员曾怀疑此病为细菌性疾病,并从病虾体内分离到了细菌,用抗菌素治疗有一定的效果,但人工感染均未成功。笔者对病虾的肝胰腺、血淋巴、病灶等组织的细菌进行分离,以及一系列感染试验(如注射感染、投喂感染或病虾与正常虾共栖感染),结果基本证实,其白黑斑病与细菌等生物性病原并无直接关系^[5]。

以上研究大多集中于病原、病因分析及防治方法,至今尚无人对该病的组织病理作较深入的研究和报道。为进一步探讨对虾白黑斑病与生物性病原的关系,查明病虾主要组织器官的病理变化,我们对病虾的肝胰腺、鳃、胃、肠、肌肉和病灶组织白黑斑进行了光镜和电镜的观察。

1 材料与方法

1.1 压制片制作与观察

将采集的病虾用蒸馏水冲洗干净,用手术剪剪取病灶部位的白斑和黑斑1小块,置于载玻片上,加1滴水,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察并摄影。

1.2 显微切片制作与观察

将病虾用 Davison' AFA 固定液固定^[6],并按刘介眉等^[7]方法,将病虾的肝胰腺、鳃等组织进行石蜡包埋,苏木精染色,伊红复染及中性树胶封片,然后在光学显微镜下观察并摄影。

1.3 亚显微切片的制作与观察

将病虾的病灶组织(白、黑斑)按要求剪成小块,固定于戊二醛固定液(戊二醛5%,0.4 M 磷酸盐缓冲液,pH 7.2)中,按朱丽霞等^[8]方法制片,进行透射电镜和扫描电镜的观察并摄影。

1.4 血细胞观察

收稿日期:1997-04-03

* 国家“八五”科技攻关项目所属课题验收材料,编号 85 15-03-03。

参照叶燕玲和陈宽智方法^[9],用装有3%的戊二醛磷酸缓冲液的注射器插入心脏取血,缓冲液:血液=4:1,将样品装入小瓶,混匀后,用显微镜观察和血球计数板计数。

2 结果

2.1 个体症状

中国对虾白黑斑最初出现,也是最典型的病症是腹部每节两侧甲壳的基部游离缘对称出现白色斑块,大致呈椭圆形,大小0.3~0.5 cm×0.5~0.8 cm(8~10 cm的虾),以后白斑部位发展至尾扇、头胸甲两侧、第2触角鳞片、游泳足、额角等部位。随着病情的发展,少数病虾的白斑(主要是腹部两侧甲壳游离缘)能转为黑斑或白黑斑共存。另外在第5步足的基部常可见一直径为2~3 mm的黑点。在虾池采样时,大多数病虾为白斑,只有约10%的存活病虾为黑斑,白黑斑共存现象更少,不到1%。病虾死亡后,大多数白斑转为黑斑,尤其是从虾池捞取的病虾搁置在空气中,1 d内多数由白变黑(图版I)。而,固定在Davision液中的病虾,白斑不久便消失,黑斑和黑点则长久不退。患病对虾多数仍能正常摄食,但游泳速度明显减慢,容易遭受健康虾的攻击被残食,因此经常可以发现正常虾抱着病虾啃咬,以及在池边丢弃的病虾残躯。发病虾池若采取适当措施如换水、投喂优质饵料,多数白斑病虾能自然恢复,而黑斑则不易消退。若环境营养条件得不到改善,许多病虾除遭同类残食外,还易并发和继发感染细菌性疾病如黑鳃病、败血病等。

2.2 组织病理观察

2.2.1 压制片 在光镜下,外观白黑斑的病灶的甲壳内结缔组织明显增厚,聚集着大量棕黄色和褐色的团块状物质,形状大小不一,这些蜡样质产物在白斑中以黄褐色为主,堆积层数很多,或形成大团黑色物质。分布于甲壳内层的树枝状细胞肿胀、裂解,或整个被这些蜡样质覆盖。在高倍镜下,这些团块状物质内部呈纤维化结构,分布均匀,白斑显示的纤维结构较清楚,而黑斑颜色太深,结构不易辨别(图版I)。

2.2.2 显微切片观察 白黑斑病虾病灶组织的病理切片显示有大团黑褐色物质沉积,周围有较丰富的血细胞和血淋巴液组织,后者染色成灰兰色,这些灰兰色物质预示将在酚氧化酶的作用下进一步变为黑色素,黑色素颗粒有的聚成大团,有的成分散状,

可能是白黑斑形成过程中不同阶段的产物。病灶内面表皮有时因大团黑褐色物质堆积而破裂(图版II:1-4)。

对白黑斑病虾的肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、淋巴样器官等组织也进行了病理切片观察,病虾的鳃常伴有黑鳃症状,可见较多的肉芽肿,轻重不一。黑鳃情况与发病虾池水质、底质等环境因子关系较大,有几批白黑斑病虾样品几乎无黑鳃并发症,有几批却高达80%,平均约37%。黑鳃病为常见的细菌或真菌性疾病,在其它虾病如病毒病、败血病中也常见,并非白黑斑病虾的特有症状,属并发症。

白黑斑病虾的肝胰腺细小样病毒(HPV)的阳性率为41%,与1991~1992年采集的非白黑斑病虾的HPV阳性率35%没有明显差异^[10],而比对虾软壳病虾中的HPV感染率76%低的多¹⁾,可见细小样病毒也非白黑斑病的直接病原,属并发感染或隐性感染。其它组织如肠、胃、心脏、肌肉和淋巴样器官均未发现明显的生物性病原感染和病理变化。

2.2.3 亚显微制片 对白黑斑块进行电子显微镜超微结构观察发现,在透射电镜下,这些黄褐色或褐黑色物质多为不规则椭圆形,外层有一层类似膜样物质,内部电子密度较高,分布均匀,没有任何结构,在这些团块物质之间没有观察到被包围其中的细菌或其它病原体。在光学显微镜下显示的纤维化结构在扫描电镜下变得更为清楚,结构单一,同样也未发现细菌等被包被其中(图版III)。

2.3 血液病理变化

除了因继发细菌感染而濒死的白黑斑病虾外,多数病虾的血液能凝固,但比正常虾稍慢,血细胞检查结果与正常虾明显不同(表1)。

3 讨论

笔者早先的报道,已基本排除了细菌等生物性病原为对虾白黑斑病直接病原的可能性,通过对该病的组织病理学观察,尤其是病灶组织的显微与亚显微观察,更进一步证实了这一结果。在甲壳内层积聚的褐黑色物质中,始终没有发现被吞噬或包被的细菌及其它生物性病原,说明这是一些生理代谢的产物,而非对虾体内吞噬细胞对异物进行抵抗发生炎症反应而形成的肉芽肿或菌团。因此可以认为该病为非感染性疾病。

1) 孙修勤. 对虾软壳病的防治技术研究. 国家“八五”攻关子专题验收材料, 1995.

表 1 对虾白黑斑病和其它病虾的病理学观察结果

Table 1 Histological observation of white and black spot disease and other disease of shrimp

	细小样病毒 HPV			黑鳃病变 black gill			血细胞 hemocytes	
	样品数 sample numbers	阳性数 positive numbers	阳性率/% positive rate	样品数 sample numbers	阳性数 positive numbers	阳性率/% positive rate	总数/mm ⁻³ total numbers	大颗粒细胞/mm ⁻³ large granule blood cells
正常虾 healthy shrimp	46	16	35	76	2	8	8 450	563
白黑斑病虾 white and black spot diseased shrimp	7	3	41	40	15	37	3 070	422
HHNBV 病毒病虾 shrimp infected by HHN-BV	20	3	15	20	3	15		
软壳病病虾 soft-shell diseased shrimp			76					

注:黑鳃病变指因细菌、真菌或原生动物侵袭所引起的炎症反应,形成肉芽肿或菌团,导致黑鳃。

Black gill refers to the inflammation caused by bacteria, fungus or protozoan, with granulations swelling or bacterial colonies emerging and gill showing black.

由于对虾白黑斑病的病灶出现部位与对虾保鲜、储存时发生黑变的部位非常一致,并且白斑病虾死后很快转为黑斑这一事实,我们认为这种黑变的生理机制可能是相似的。Ogana et al, Madero and Finne, 朱仕铭等^[11-13]人在分析研究对虾黑变的生理机制时指出,结构复杂的褐黑色物质是由存在于甲壳内层的酚氧化酶催化相关基质所形成的黑色素。正常情况下,甲壳内层积聚的酚氧化酶是用于脱壳代谢、催化新生甲壳硬化的,而当对虾处于应急状态或生理代谢受到障碍时,此处的酚氧化酶会被意外激活,催化一些相关基质产生黑色素,形成白黑斑。酚氧化酶和相关基质可能均来自于血液^[11-13]。我们认为这些基质有可能是对虾血液中吞噬细胞捕捉一些脂质代谢物质运行到甲壳内层的结缔组织中沉积下来的,经过酚氧化酶的作用变成黑色素。所以这些棕黄色或褐黑色团块状物质可能是一些难以利用的脂类代谢残渣,经氧化形成脂褐质过程中的不同阶段的产物。而那些出现白黑斑的病灶部位也就成了代谢上的惰性产物以及需要再循环物质的储存中心。

当前对虾养殖中所用的配合饵料多数营养不全或比例不当,有可能造成较多的未被消化吸收的脂质残渣,成为黑色素形成的先题条件。这一点在生产上已被证实,凡投喂优质配饵(如海马牌配饵)或新鲜贝类、小型甲壳类的虾池很少发生白黑斑病,而投喂低质配饵或冰冻杂鱼的虾池较易引发此病^[14]。

参 考 文 献

1 孟庆显,俞开康.中国对虾上新发现的两种疾病.鱼病简讯,1986

(1):33~34

- 徐启家,刘梦侠.中国对虾白黑斑病的初步观察.齐鲁渔业,1987,3:38~40
- 高振亮.中国对虾白黑斑病的防治技术研究.齐鲁渔业,1992,3:15~17
- Lightner D V. Handbook of Mariculture. Vol. Crustacean Aquaculture. J D Mercy editor. CRC Press, INC, Boca Raton FL, 1983, 289~320
- 蔡生力,王崇明,杨丛海,等.对虾白黑斑病的病原病因研究.水产学报,1996,20(4):325~331
- Bell T A, Lightner D V(eds.). A handbook of normal penaeid shrimp histology. Lawrence, Kansas. 1988
- 刘介眉,等.病理组织染色的理论和应用.北京:人民卫生出版社,1983
- 朱丽霞,等.生物学中的电子显微技术.北京:北京大学出版社,1982
- 叶燕玲,陈宽智.中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构、分类及其计数.青岛海洋大学学报,1993,26(2):68~78
- 蔡生力,黄捷,王崇明,等.1993-1994年对虾暴发病的流行病学研究.水产学报,1995,19(2):112~119
- Ogana M, et al. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. Bull Japan Sci Fish, 1984, 50(10):1763~1769
- Madero C F and G Finne. Properties of Phenoloxidase Isolated from Gulf Shrimp Proceedings of the 7th Annual Tropical and Subtropical. Fisheries Technological Conference of the America, 1982. 328~339
- 朱仕铭.应用虾鲜宝防治对虾黑变病.海洋渔业,1993(5):124~125
- 王崇明,蔡生力,杨丛海.中国对虾白黑斑病流行病学的调查研究.中国水产科学,1996,3(2):119~124

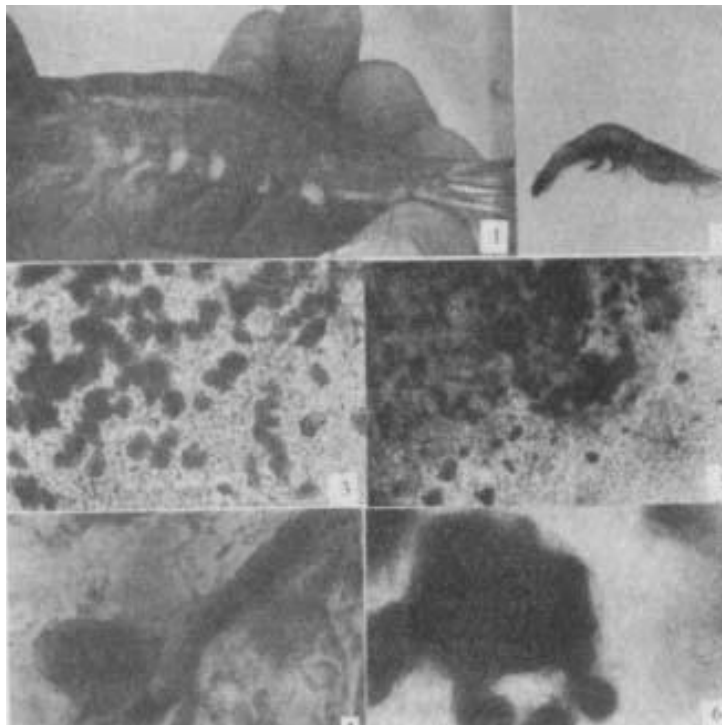
Histopathological study of white and black spot disease of shrimp *Penaeus chinensis*

Cai Shengli Wang Chongming Yang Conghai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Histopathology of white and black spot disease on shrimp *Penaeus chinensis* was studied with light and electron microscope examination. The results showed that there was no obvious or regular histopathological change in most part of tissues (hepatopancreas, gill, blood, stomach, gut, muscle, etc.) in diseased shrimp. Though about 37% of gills had granulations, and 41% of hepatopancreas were infected with HPV (Hepatopancreatic Virus), that had no direct relation with white and black spot disease. White and black spot mainly appeared on both sides of each abdomen segment, tail fan, both sides of carapace, antennal scale and rostrum etc, which resulted from deposit of brown and black melanin pigment. According to the analysis, the melanin was formed by phenoloxydase stimulating relative substrates. Both enzyme and substrates were considered from blood. Relationships between formation of white and black spot and physiological metabolism were discussed.

Key words *Penaeus chinensis*, white and black spot disease, histopathology



图版 I 对虾白斑病病灶组织的水浸片观察

Plate I Photomicrograph of wet mounts of focus tissue from shrimp with white and black spot disease

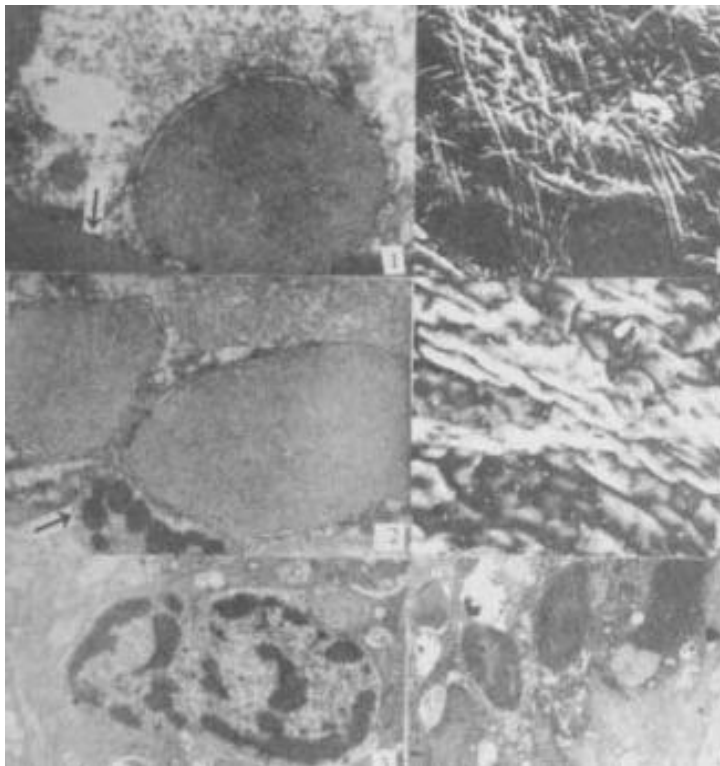
1. 白斑病虾。Shrimp with white spot disease.
2. 黑斑病虾。Shrimp with black spot disease.
3. 病灶组织水浸压片(白斑病虾), 大量不定形黄褐色团块物质沉积, $\times 250$ (未染色)。Focus tissue from white spot disease of shrimp, accumulation of large quantity of yellowish materials (no stain).
4. 树枝状色素细胞裂解, 黄褐色团块物质内似纤维状结构, $\times 1\ 000$ (未染色)。Necrosis of branch chromatophore (no stain).
5. 水浸压片(黑斑病虾), 大量成团物质堆积, $\times 250$ (未染色)。Brownish materials amplification (no stain).
6. 水浸压片, 大量黑褐色物质, $\times 1\ 000$ 。Large quantity of brown and black materials.



图版 II 对虾白斑病组织病理切片显微观察

Plate II Photomicrograph of histopathology of white and black spot disease of shrimp

1. 成团黑褐色物质, 箭头所指为甲壳层内面, $\times 1\ 000$ 。Black - brownish accumulation, arrow shows inside of shell.
2. 成团黑色物质, 箭头所指为血细胞, $\times 1\ 000$ 。Black - brownish accumulation, arrow shows hemocytes.
3. 似黑色素颗粒沉积, $\times 1\ 000$ 。Melanin - like accumulation.
4. 病灶横切面, 箭头所指为外甲壳, $\times 250$ 。Cross section of focus tissue, arrow shows cuticular shell.
5. 肝胰腺, 箭头所指为肝胰腺细小样病毒 (HPV), $\times 1\ 000$ 。Hepatopancreas infected with HPV (arrow shows)



图版 III 对虾白斑病病灶组织电镜观察

Plate III Electromicrograph of focus tissue from shrimps with white and black spot disease

1. 黑色斑块物质, 内部结构均匀化, 箭头所指为甲壳(透射电镜), $\times 12\ 000$ 。Black granular structure, masses of electron - dense materials, arrow shows shell, (TEM).
2. 黑色团块物质, 箭头所指似脂肪颗粒(透射电镜), $\times 12\ 000$ 。Black granular structure, masses of electron - dense materials, arrow shows fat - like granule structure, (TEM).
3. 正常细胞核, 与 1 和 2 区别(透射电镜), $\times 12\ 000$ 。Normal cell nucleus, distinguished from granule structure (TEM).
4. 黑褐色团块物质(扫描电镜), $\times 4\ 000$ 。Black - brownish accumulation (SEM).
5. 病灶组织内表面, 纤维状结构(扫描电镜), $\times 4\ 000$ 。Fiber - like structure in surface of focus tissue (SEM).
6. 病灶组织内表面, 纤维状结构(扫描电镜), $\times 8\ 000$ 。Fiber - like structure in surface of focus tissue (SEM).