

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16039

异育银鲫咽碘泡虫病组织病理与病理生理

李振伟, 陆宏达, 操艮萍, 刘俊杰, 毛毛

上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 咽碘泡虫(*Myxobolus pharynae*)病是近几年发生在江苏省盐城地区的大丰、射阳和滨海以及周边地区, 引起养殖异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)大批死亡的一种黏孢子虫病, 咽碘泡虫只特异地寄生在异育银鲫的咽部组织内, 为了阐明该病对鱼体的损伤作用, 我们对不同患病时期的异育银鲫的组织病理和疾病中期的病理生理进行研究。组织病理结果表明: 疾病初期病鱼咽部略有轻度充血, 咽碘泡虫以营养体阶段寄生在咽部黏膜下层的组织中, 并开始形成由成纤维细胞包裹的小孢囊, 其他组织器官无病理损伤现象; 疾病中期由于小孢囊数量增加和囊内营养体分裂增殖并逐步发育为成熟孢子后体积增大, 构成的大孢囊使咽部显著膨大, 包裹小孢囊的结缔组织囊壁充血, 逐步萎缩而变薄, 成纤维细胞核固缩坏死, 咽部黏膜层中的上皮细胞淡染、核固缩坏死, 味蕾失去应有的结构, 鳃组织细胞在鳃小片间严重增生, 肾部分区域出现细胞坏死, 肾小球肿胀, 肾小管上皮细胞出现滴状玻璃样变性, 肝、脾、肠和前肾无病理变化现象; 疾病后期小孢囊囊壁、黏膜下层和黏膜层组织细胞进一步坏死崩解, 出现孔洞, 成熟孢子、坏死组织和血液一并流出孔洞, 病鱼肠腔中有许多来自坏死的咽部组织细胞和成熟孢子, 其他组织器官病理变化与疾病中期相似。疾病中期病鱼的病理生理分析结果表明: 病鱼红细胞数量和大小、血红蛋白浓度、血栓细胞数量、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、血糖、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶都分别极显著低于健康鱼($P<0.01$), 出现贫血; 病鱼红细胞脆性、白细胞数、嗜中性粒细胞数、单核细胞数、总胆红素、肌酐、尿素和乳酸脱氢酶分别都极显著高于健康鱼($P<0.01$); 淋巴细胞数和嗜酸性粒细胞数与健康鱼相比, 无显著差异($P>0.05$)。由于咽碘泡虫的寄生部位鱼咽部严重膨大堵塞口咽腔并引发鳃组织增生、肾的损伤和贫血等变化, 进一步发展为咽部组织坏死破裂出现孔洞流血, 导致病鱼无法摄食和呼吸困难等功能障碍而死亡。

关键词: 异育银鲫; 咽碘泡虫; 疾病; 组织病理; 病理生理

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1339-12

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是银鲫卵子受异源精子刺激后雌核发育产生的后代。异育银鲫由于生长速度快、饲养周期短、营养价值高、适应能力强等特点, 在养殖生产中显示出良好的经济性, 且肉质鲜美, 是中国淡水养殖的主要种类之一, 在江苏盐城地区的大丰、射阳和滨海以及周边地区的精养面积达 $2.7 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 。但近几年来, 每年的 6—10 月, 养殖异育银鲫的池塘中会出现一种特异地寄生于异育银鲫口咽腔上咽部组织中的一种黏孢子虫病, 主要在鱼养成过

程中感染发病, 死亡率高, 目前尚无有效的防治措施, 给异育银鲫的养殖业带来了重大损失。感染该病后异育银鲫通常鱼体消瘦, 生长缓慢且会大面积的死亡。陆宏达等^[1]对该病病原形态学等进行了研究, 并根据引起该病的病原成熟孢子形态结构特点、寄主和寄生部位的专一性以及 18S rDNA 进行比对分析, 将该种黏孢子虫命名为咽碘泡虫(*Myxobolus pharynae*)。本研究着重探讨患病异育银鲫的组织病理变化过程和发病中期病理生理相关指标的变化, 旨在为了解该病的组织器官损伤

收稿日期: 2016-01-28; 修订日期: 2016-03-18.

基金项目: 水产动物遗传育种上海市协同创新中心(ZF1206); 上海市重点学科建设项目(Y1101).

作者简介: 李振伟(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为临床兽医学. E-mail: 15216835010@163.com

通信作者: 陆宏达, 教授. E-mail: hdlu@shou.edu.cn

和疾病本质以及该病的诊断和防治提供科学依据,也为该病的其他相关研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

依据异育银鲫咽碘泡虫病发展过程的特点,将该病分为 3 个时期。疾病初期:除咽部出现轻微发红充血现象外,无其他症状,咽部黏膜下层的结缔组织中已感染有寄生的咽碘泡虫营养体;疾病中期:咽部明显肿大,但孢囊尚未破裂,尚未出现孔洞;疾病后期:咽部孢囊破裂,出现孔洞。组织病理的样品分别取自 3 个时期的病鱼,病理生理测定分析的样品是处于疾病中期的病鱼。病理生理分析的患病鱼和健康鱼各 20 尾,病鱼取自江苏省盐城市海北农业科技有限公司,病鱼体长为 (22.41 ± 1.53) cm,体重为 (182.50 ± 40.38) g,健康异育银鲫采自无病史的盐城市某养殖场,健康鱼体长为 (21.92 ± 1.28) cm,体重为 (184.90 ± 35.99) g。

1.2 组织病理

分别取处于咽碘泡虫病初期、中期和后期的病鱼及健康鱼咽部组织、鳃、肾、肠、肝、脾和前肾新鲜组织,对后期已出现孔洞的咽部组织,首先用加温溶解冷却的 2%琼脂胶状液封住孔洞,防止成熟孢子与坏死组织等在采集、固定、脱水等处理时流出。采集的组织在 Bouin's 液中固定,24 h 后换成 70%乙醇保存备用;经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后进行组织切片,切片厚度 4~5 μm ,苏木精和伊红(HE)染色,中性树胶封片。用 NIS-Elements F 4.0 软件在 Nikon Eclipse 55i 显微镜下观察拍照。

1.3 病理生理

通过尾静脉采血的方式,用一次性无菌注射器对处于疾病中期的病鱼和健康鱼分别进行血液采集。每尾鱼采集的血液分为两份,一份抗凝血用于血液红细胞数、白细胞数和红细胞脆性的测定,按 100 IU 肝素钠抗凝 1 mL 血液的用量,用肝素钠溶液湿润无菌注射器的内壁,放入 37℃干燥箱内烘干后进行采血;另一份血液为未经肝素钠处理的无菌注射器采集血液,用于血红蛋白浓度测定、制备血清测定各生理生化指标和血涂片制作。

1.3.1 血细胞数及其相关的指标测定 用改进的 Dacie's 稀释液^[2]将抗凝血分别稀释 200 倍用 Neubauer 计数板在显微镜下进行红细胞计数和稀释 100 倍进行血栓细胞计数和白细胞计数。红细胞脆性测定采用浓度梯度法^[3],分别将一滴抗凝血滴加到浓度为 0.70%、0.65%、0.60%、0.55%、0.50%、0.45%、0.40%、0.35%、0.30%、0.25%的 NaCl 溶液中,在室温下静置 2 h 时观察并记录完全溶血的最高 NaCl 浓度,即为红细胞脆性。血红蛋白浓度的测定是将未抗凝血液注入血红蛋白测定管在迈瑞 BC-5180 全自动分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)上进行测定。血涂片制作是在洁净的载玻片上滴一小点新鲜全血,立刻将其推涂,室温干燥后用甲醇固定 5 min,滴加 Wright-Giemsa(珠海贝索生物技术有限公司,广东珠海)的 A 染液覆盖血膜 1 min,再将 B 染液滴加于 A 染液上,用洗耳球迅速将两液吹匀,染色 10 min 后用蒸馏水冲洗血涂片于空气中干燥。每尾鱼制作血涂片 3 张以上,在 Nikon Eclipse 55i 显微镜下随机观察 90 个成熟红细胞,用 NIS-Elements F 4.0 软件测量红细胞和其核的大小,同时随机观察 600 个白细胞进行白细胞分类计数。

1.3.2 血清生理生化指标测定 血清制备,将从患病中期病鱼和健康鱼采集的未抗凝血液静置于 4℃冰箱中过夜,吸取上层血清。选择测定的血清生理生化指标,包括总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, T-B)、肌酐(creatinine, CREA)、尿素(UREA)、血糖(glucose, GLU)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。这些指标均按照各测定指标试剂盒说明的方法在迈瑞 BS-200 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)上进行测定。球蛋白(globin, GLO)=总蛋白-白蛋白。

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 统计软件作方差分析,实验数据均以平均值 $\pm$ 标准($\bar{x}\pm\text{SD}$)差形式表示,并用 t 检验法对患病鱼组和健康鱼组的数值差异作处

理分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。

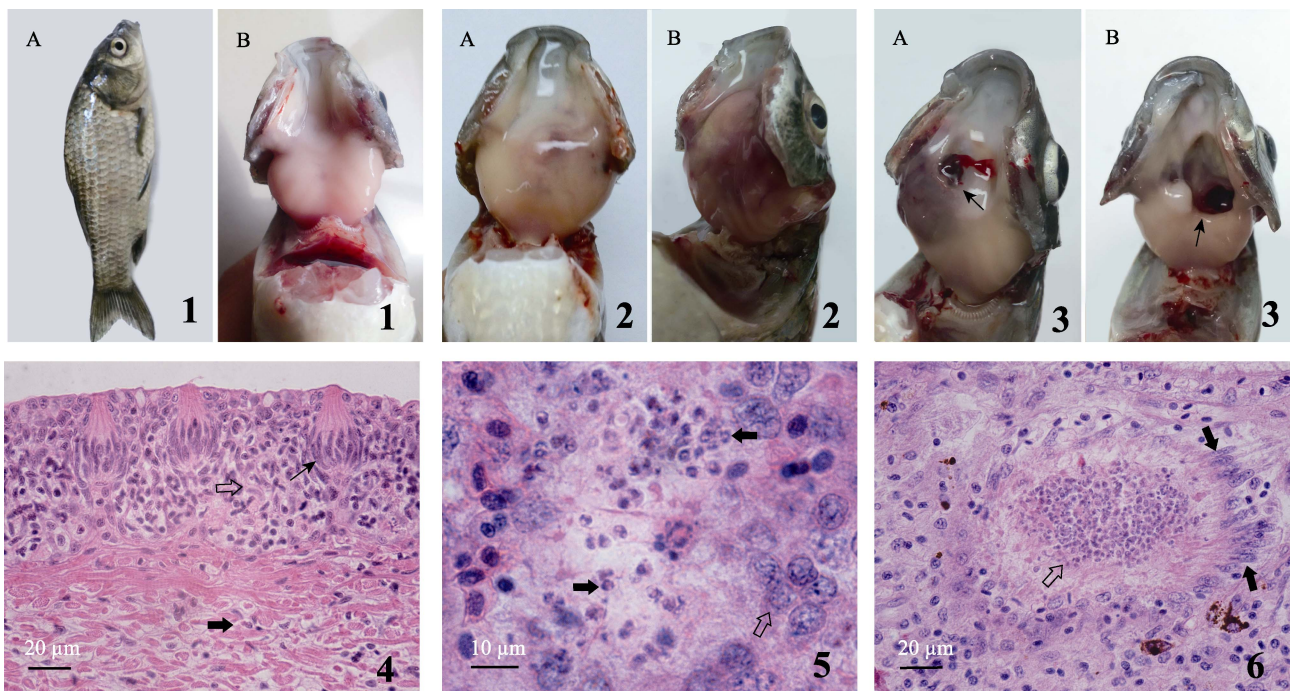
2 结果与分析

2.1 患病异育银鲫临床症状和组织病理

2.1.1 临床症状 疾病初期: 咽部轻微充血, 有咽碘泡虫寄生, 但由于孢囊较小, 咽部还未出现肿大现象(图版 I-1B), 鱼体游动能力未见异常, 一般用手抄网不易捕获; 疾病中期: 由于咽碘泡虫的大量增殖, 孢囊增大使得咽部肿大, 但尚未出现咽部破裂现象, 严重肿大的咽部可达原来大小的 2~3 倍以上(图版 I-2), 挤压鱼的鳃组织, 鳃盖张开不能完全关闭, 咽部充血, 病鱼体背发黑, 游动能力差, 反应迟钝, 较容易用手抄网捕获, 病鱼体高与体长比减小, 鱼体消瘦, 有病鱼死亡

现象; 疾病后期: 咽部破裂, 出现孔洞, 成熟孢子伴随血液从孔洞中流出(图版 I-3), 病鱼离群独游, 常在池边浮于水面慢游, 十分容易用手抄网捕获, 鱼体明显消瘦(图版 I-1A), 一般不久就会死亡。

2.1.2 咽部组织病理 健康异育银鲫的咽部组织结构类似于其他鱼的咽部组织结构, 主要是由黏膜层、黏膜下层和肌层组成^[4]。黏膜层由上皮、基膜和固有膜组成, 上皮表层细胞为复层扁平上皮细胞, 含有黏液细胞和味蕾; 基底层细胞呈矮柱状, 黏膜上皮的深部具有基膜, 基膜的深层是由致密结缔组织构成的固有膜, 固有膜向上皮的深层隆起形成乳头支撑着味蕾; 黏膜下层由疏松结缔组织组成, 含有胶原纤维和一些弹性纤维, 在结缔组织纤维之间含有纵行和斜行的横纹肌纤维束(图版 I-4)。



图版 I 不同发病期的病鱼和疾病初期病鱼的咽部组织病理(HE)

1A. 病鱼鱼体消瘦; 1B. 病鱼咽部轻微充血。2. 病鱼咽部显著膨大: A. 正面; B. 侧面。3A. 咽部开始出现小孔洞和流血(t); 3B. 进一步发展成较大孔洞和流血(t)。4. 健康鱼的咽部组织: 黏膜层(♂)、黏膜下层(♂)和味蕾(t)。5. 寄生于黏膜下层结缔组织中的咽碘泡虫营养体(♂)和周围组织细胞(♂)。6. 结缔组织中的成纤维细胞(♂)开始包裹营养体(♂), 初步形成小孢囊。

Plate I Diseased fish in the different stages and pharynx histopathology of diseased fish in the early stage of disease (HE)
1A. Diseased fish was thin; 1B. The pharynx with slight hyperemia. 2. Enlarged pharynx: A. The front view; B. The side view. 3A. A small hole with bleeding (t) in pharynx; 3B. A large hole with bleeding (t) in pharynx. 4. The pharyngeal tissue of healthy fish: mucosa (♂), submucosa (♂) and taste bud (t). 5. *Myxobolus pharynae* trophozoites (♂) parasitize in the submucosa of pharynx and are surrounded by tissue and cells (♂). 6. Fibrocytes (♂) surround trophozoites (♂) in the connective tissue, starting to form small sporocyst.

疾病初期:患病鱼咽部略有轻度充血,处于营养体时期的咽碘泡虫已特异性地寄生于咽部黏膜下层的结缔组织中,有些分布在深层处,有些靠近黏膜层(图版 I-5)。随着营养体分裂增殖和数量的增加,结缔组织中的成纤维细胞开始包裹营养体,初步形成小孢囊,分裂出的新营养体靠近孢囊壁,营养体形成越早,越靠近小孢囊中心(图版 I-6),小孢囊外围逐渐出现胶原纤维对小孢囊进一步进行包裹。随着营养体增殖数量的增多和发育,小孢囊逐渐增大,小孢囊数量有所增加,形成由几个小孢囊构成的大孢囊,小孢囊间主要由结缔组织成纤维细胞分隔,此时胶原纤维和弹性纤维较少。

疾病中期:随着小孢囊数量的增加和孢囊内营养体逐步发育为双产孢体或四核产孢体和成熟孢子后体积的增大,小孢囊构成的大孢囊导致咽部显著膨大。小孢囊间由结缔组织成纤维细胞、胶原纤维和弹性纤维组成的囊壁分隔,分隔的结缔组织中分布着较多的血管,出现充血现象(图版 II-1,图版 II-2)。随着病程进一步的发展,靠近孢囊壁的营养体不再分裂增殖,营养体全部发育为成熟孢子,小孢囊也逐渐增大到最大,有些小孢囊直径最大可达到 0.14 cm,大孢囊的直径可达到 2 cm 以上。此时由成纤维细胞、胶原纤维和弹性纤维组成的结缔组织显著减少,小孢囊囊壁逐渐变薄,血管消失,成纤维细胞核固缩坏死,营养体全部发育为成熟孢子,只留下极薄囊壁(图版 II-3,图版 II-4)。咽部黏膜层中的复层扁平上皮细胞和靠近基底膜的矮柱状上皮细胞以及组成味蕾的细胞随着病程的发展而淡染,严重的区域这些细胞核固缩,细胞坏死,味蕾失去原有的结构(图版 II-5)。

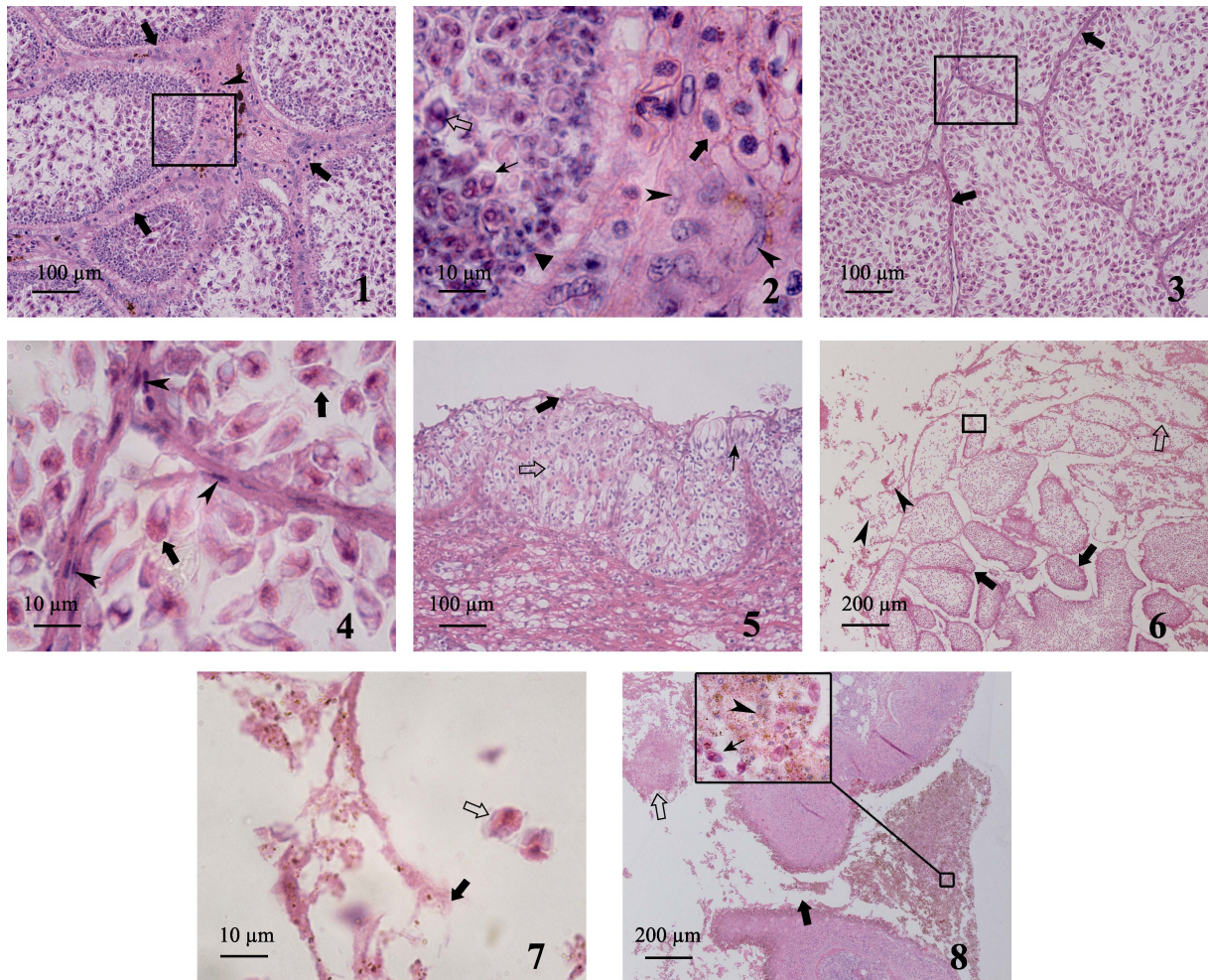
疾病后期:小孢囊囊壁中的成纤维细胞核进一步固缩,坏死崩解成无细胞结构的物质,小孢囊囊壁破裂,成熟孢子流出(图版 II-6,图版 II-7),大孢囊至咽表面间的黏膜下层和黏膜层组织坏死崩解,出现孔洞,成熟孢子与坏死组织和血液一并流出孔洞(图版 II-8)。

2.1.3 主要脏器组织病理 疾病初期:患病初期

病鱼除在寄生部位的咽部组织出现轻度充血外,肾、鳃、肠、肝、脾和前肾无病理变化;疾病中期和疾病后期主要脏器病理变化相似,主要损伤组织器官为病鱼鳃和肾,鳃组织主要出现细胞增生,鳃小片基部等部位上皮细胞增生,严重的部位鳃小片间被增生的细胞充满(图版 III-1)。肾小体是由一团网状毛细血管组成的肾小球和外面紧包着的肾小囊构成,病鱼大部分肾小球毛细血管扩张,毛细血管上皮细胞肿大,使得肾小球肿胀,肾小囊囊间腔变窄或无腔间隙,肾小管上皮细胞出现滴状玻璃样变性、肾小管内出现细胞管型(图版 III-2),肾部分区域出现细胞坏死现象(图版 III-3)。肠道组织包括向肠腔突起的褶皱和黏膜层等组织完好,无病理损伤现象,肠腔中无食物,但在疾病后期病鱼的肠腔中有来自于咽部坏死崩解脱落的细胞和咽碘泡虫的成熟孢子(图版 III-4)。肝、脾和前肾无明显的病理变化现象。

2.2 患病中期异育银鲫病理生理

2.2.1 病鱼血细胞相关指标的变化 患病中期异育银鲫的血细胞计数及其相关指标的变化见表 1。患病鱼红细胞数量、血红蛋白浓度和血栓细胞数量分别为 $(0.85\pm 0.10)\times 10^6/\mu\text{L}$ 、 $(94.50\pm 14.94)\text{ g/L}$ 和 $(0.98\pm 0.23)\times 10^4/\mu\text{L}$,都分别极显著低于健康异育银鲫的 $(1.18\pm 0.06)\times 10^6/\mu\text{L}$ 、 $(120.05\pm 5.75)\text{ g/L}$ 和 $(1.79\pm 0.28)\times 10^4/\mu\text{L}$ ($P<0.01$),患病鱼的红细胞数和血红蛋白浓度分别为健康鱼的 72.03%和 78%;患病鱼除红细胞核短径 $[(4.47\pm 0.49)\mu\text{m}]$ 显著增加外($P<0.05$),红细胞长径和短径以及红细胞核长径分别为 $(16.84\pm 0.73)\mu\text{m}$ 、 $(11.18\pm 0.68)\mu\text{m}$ 和 $(7.82\pm 0.49)\mu\text{m}$,分别极显著低于健康鱼的 $(17.41\pm 0.66)\mu\text{m}$ ($P<0.01$)、显著低于健康鱼 $(11.48\pm 0.85)\mu\text{m}$ 和 $(8.06\pm 0.58)\mu\text{m}$ ($P<0.05$);患病鱼的红细胞脆性、白细胞数、嗜中性粒细胞数和单核细胞数分别为 $(0.40\pm 0.03)\%$ 、 $(3.55\pm 0.59)\times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $(1.23\pm 0.24)\times 10^4/\mu\text{L}$ 和 $(0.72\pm 0.15)\times 10^4/\mu\text{L}$,都极显著高于健康鱼的 $(0.31\pm 0.03)\%$ 、 $(2.93\pm 0.49)\times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $(0.91\pm 0.25)\times 10^4/\mu\text{L}$ 和 $(0.48\pm 0.16)\times 10^4/\mu\text{L}$ ($P<0.01$),病鱼的淋巴细胞数和嗜酸性粒细胞数与健康鱼无显著性差异($P>0.05$)。



图版 II 疾病中期和后期病鱼的咽部组织病理变化(HE)

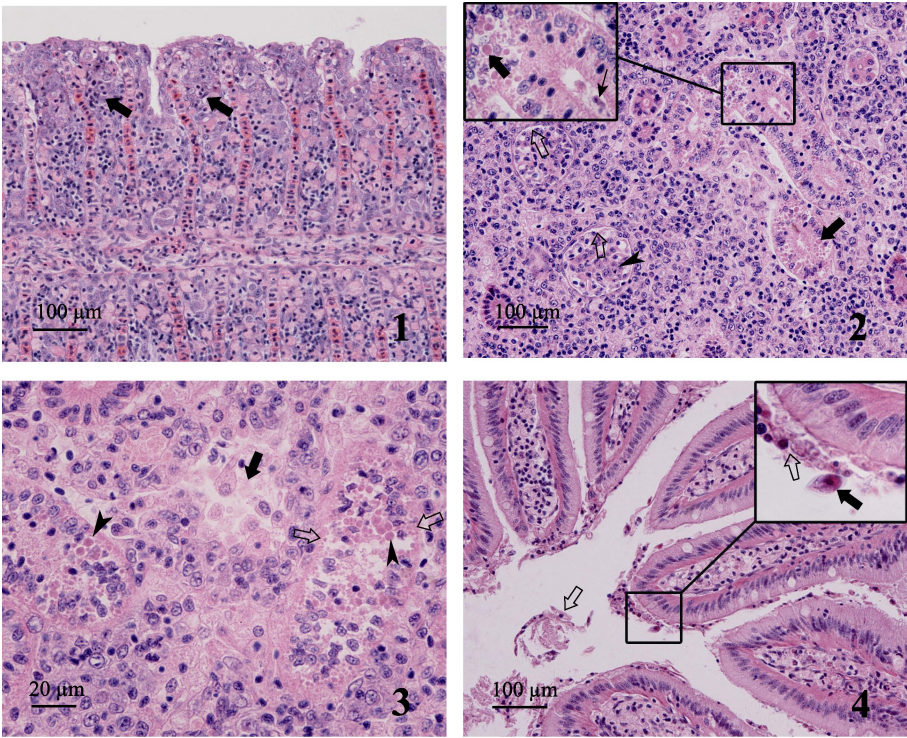
1. 小孢囊之间的囊壁(♣)中出现显著的充血(▲). 2. 图版 II-1 中方框的放大: 营养体(▲), 产孢体(†), 成熟孢子(♂), 孢囊壁中的成纤维细胞核(▲)和充血(♣). 3. 极薄的囊壁(♣), 小孢囊中的营养体全部发育为成熟孢子.
4. 图版 II-3 中方框的放大, 成纤维细胞核固缩(▲)坏死, 小孢囊内出现成熟孢子(♣), 囊壁变薄和血管消失.
5. 上皮细胞(♂)和组成味蕾的细胞(†)淡染, 表层上皮细胞坏死(♣). 6. 尚未破裂的小孢囊(♣)和破裂的小孢囊(♂), 坏死崩解的囊壁和成熟孢子混合物(▲). 7. 图版 II-6 中方框的放大, 小孢囊囊壁坏死崩解成无细胞结构的物质(♣), 成熟孢子(♂).
8. 孔洞(♣)内坏死组织(♂), 流出孔洞的坏死组织(▲)和成熟孢子(†).

Plate II Pharynx histopathology of diseased fish in the middle and late stages of disease (HE)

1. Hyperemia (▲) within the wall (♣) among sporocysts. 2. The amplification of pane in plate II-1: trophozoite (▲), sporont (†), mature spore (♂), nuclei of fibroblasts (▲) and hyperemia (♣) within the wall of sporocyst. 3. Very thin walls of sporocysts (♣). All of the trophozoites in sporocysts develop to be mature spores. 4. The amplification of pane in plate II-3, fibroblasts karyopyknosis (▲) and necrosis, mature spores (♣) in sporocysts, vasculature disappear within the thinned walls. 5. Epithelial cells (♂) and cells of taste bud (†) were stained palely. Epithelial cells on the surface of pharynx were necrotic (♣). 6. Non-broken sporocysts (♣) and non-broken sporocysts (♂). Mixed materials (▲) of mature spores with disintegrated walls of sporocysts. 7. The amplification of pane in plate II-6, disintegrated walls (♣) and mature spores (♂). 8. Necrotic tissues (♂) inside the hole (♣); mature spores (†) and necrotic tissues (▲) outside the hole (♣).

2.2.2 病鱼血清生理生化指标的变化 患病中期异育银鲫血清生化指标的变化见表 2。患病鱼血清总蛋白、白蛋白、球蛋白和血糖分别为(22.55±5.91) g/L、(12.63±3.03) g/L、(9.92±3.62) g/L 和(9.78±1.17) mmol/L, 都分别极显著低于健康鱼的(39.31±

2.35) g/L、(18.74±1.49) g/L、(20.57±2.82) g/L 和(13.19±1.60) mmol/L ($P<0.01$); 患病鱼的总胆红素、肌酐和尿素分别为(5.08±1.90) $\mu\text{mol/L}$ 、(67.10±15.93) $\mu\text{mol/L}$ 和(1.70±0.42) $\mu\text{mol/L}$, 都分别极显著高于健康鱼的(2.88±0.51) $\mu\text{mol/L}$ 、(38.33±3.60) $\mu\text{mol/L}$ 和(0.63±



图版 III 不同发病期的病鱼鳃、肾和肠组织病理(HE)

1. 鳃组织细胞严重增生, 鳃小片间被增生的细胞充满(▲). 2. 肾小球肿胀(▲), 肾小囊囊间腔变窄(⇧), 肾小管上皮细胞出现滴状玻璃样变性(◆)肾小管管内出现细胞管型(†). 3. 肾间组织细胞坏死(◆), 破裂坏死的肾小管上皮细胞(⇧)中有滴状玻璃样变性(▲). 4. 肠腔内有来自于咽部坏死崩解脱落的组织细胞(⇧)和咽碘泡虫的成熟孢子(◆).

Plate III Gill, kidney and intestine histopathology of diseased fish in the different stages of disease (HE)

1. Serious hyperplasia of in gill and secondary gill lamellae were filled with hyperplasia cells (▲). 2. Narrowed interstice (⇧) of renal capsule in swollen glomerulus (▲), dropwise hyaline degeneration (◆) in the epithelial cells of renal tubular, cell debris in renal tubule (†). 3. Necrotic cell (◆) in inter-renal tissue, hyaline degeneration (▲) appeared in necrotic epithelial cells (⇧) of renal tubulars. 4. Necrotic tissue and cells (⇧) coming from pharyngeal tissue and mature spores (◆) in the intestine.

表 1 患病和健康异育银鲫血细胞数及其相关指标的比较

Tab. 1 Comparison of blood cells and other hematological parameters between diseased and healthy *C. auratus gibelio*
n=20; $\bar{x} \pm SD$

血液指标 hematological parameter	患病鱼 diseased fish	健康鱼 healthy fish
红细胞数/($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) red blood cell counts	0.85 $\pm$ 0.10**	1.18 $\pm$ 0.06
红细胞长径/ μm long diameter of erythrocyte	16.84 $\pm$ 0.73**	17.41 $\pm$ 0.66
红细胞短径/ μm short diameter of erythrocyte	11.18 $\pm$ 0.68*	11.48 $\pm$ 0.85
红细胞核长径/ μm long diameter of erythrocyte nucleus	7.82 $\pm$ 0.49*	8.06 $\pm$ 0.58
红细胞核短径/ μm short diameter of erythrocyte nucleus	4.47 $\pm$ 0.49*	4.24 $\pm$ 0.50
血红蛋白浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) haemoglobin	94.50 $\pm$ 14.94**	120.05 $\pm$ 5.75
红细胞脆性/(NaCl%) erythrocyte osmotic brittleness	0.40 $\pm$ 0.03**	0.31 $\pm$ 0.03
血栓细胞数/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) thrombocyte	0.98 $\pm$ 0.23**	1.79 $\pm$ 0.28
白细胞数/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) white blood cell counts	3.55 $\pm$ 0.59**	2.93 $\pm$ 0.49
淋巴细胞/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) lymphocyte	1.59 $\pm$ 0.40	1.55 $\pm$ 0.24
单核细胞/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) monocyte	0.72 $\pm$ 0.15**	0.48 $\pm$ 0.16
嗜中性粒细胞/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) neutrophil	1.23 $\pm$ 0.24**	0.91 $\pm$ 0.25
嗜酸性粒细胞/($\times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) eosinophil	0.0072 $\pm$ 0.0060	0.0073 $\pm$ 0.0065

注: n 为样本数; “*” 表示差异显著(P<0.05); “**” 表示差异极显著(P<0.01).
Note: n is the number of samples; “*” denotes significant difference (P<0.05); “**” denotes extremely significant difference (P<0.01).

表 2 患病和健康异育银鲫血清生理生化指标的比较
Tab. 2 Comparison of serum biochemical parameters between diseased and healthy *C. auratus gibelio*
n=20; $\bar{x} \pm SD$

指标 parameter	患病鱼 diseased fish	健康鱼 healthy fish
总蛋白/(g·L ⁻¹) TP	22.55±5.91**	39.31±2.35
白蛋白/(g·L ⁻¹) ALB	12.63±3.03**	18.74±1.49
球蛋白/(g·L ⁻¹) GLO	9.92±3.62**	20.57±2.82
血糖/(mmol·L ⁻¹) GLU	9.78±1.17**	13.19±1.60
总胆红素/(μmol·L ⁻¹) T-BIL	5.08±1.90**	2.88±0.51
肌酐/(μmol·L ⁻¹) CREA	67.10±15.93**	38.33±3.60
尿素/(μmol·L ⁻¹) UREA	1.70±0.42**	0.63±0.19
谷丙转氨酶/(U·L ⁻¹) ALT	5.08±2.32**	7.86±0.84
谷草转氨酶/(U·L ⁻¹) AST	159.12±45.41**	245.46±33.34
碱性磷酸酶/(U·L ⁻¹) ALP	67.78±11.93**	84.15±6.14
乳酸脱氢酶/(U·L ⁻¹) LDH	471.05±168.60**	272.25±39.2

注: n 为样本数; “*” 表示差异显著(P<0.05); “**” 表示差异极显著(P<0.01).
Note: n is the number of samples; “*” denotes significant difference (P<0.05); “**” denotes extremely significant difference (P<0.01).

0.19) μmol/L (P<0.01); 患病鱼的谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶分别为(5.08±2.32) U/L, (159.12±45.41) U/L 和(67.78±11.93) U/L, 都分别极显著低于健康鱼的(7.86±0.84) U/L、(245.46±33.34) U/L 和(84.15±6.14) U/L (P<0.01), 而患病鱼的乳酸脱氢酶极显著高于健康鱼(P<0.01)。

3 讨论

咽碘泡虫隶属于黏孢子纲、双壳目、碘泡科、碘泡虫属。碘泡虫属是种类数最多的一个属, 2011 年报道碘泡虫属种类数已经达到约 850 种^[5], 大部分寄生于鱼类, 对寄主和寄生部位是否存在特异性在不同种类中有很大的差别。有些黏孢子虫对鱼和组织器官都没有严格的选择性, 如库班碘泡虫(*Myxobolus kubanicum* I. et B. Bychowsky, 1940)和鲤碘泡虫(*Myxobolus cyprini* Doflein, 1898)都能寄生在鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等许多鱼的体内外主要组织器官^[6]; 有些黏孢子虫对科内鱼类寄生无特异性, 但对组织器官具有特异性, 如 *Myxobolus cerebralis* 只寄生于鲑科许多鱼类的头部和脊髓骨的软骨组织中^[7]; 有些对寄

生鱼种类具有特异性, 但对组织器官无特异性, 如丑陋圆形碘泡虫(*Myxobolus turpisrotundus*)不感染同池混养的其他淡水鱼, 只寄生于淡水鱼混养池的异育银鲫, 在其口唇、鳃盖、鳍等体表部位形成孢囊^[8-9]; 有些对所寄生的鱼种类和组织器官都有特异性, 如 *Myxobolus basilemellaris* 只寄生于鲤鱼靠近鳃弓处的鳃丝基部^[10-11]。咽碘泡虫是这类寄生虫之一, 它只特异地寄生于异育银鲫口咽腔咽部黏膜下层的组织内。

不同种类的碘泡虫能否形成孢囊、孢囊大小和寄生部位特异性的差异造成危害性和死亡率存在很大差别, 一般不形成孢囊的散在性孢子的种类其危害性相对较小, 形成孢囊大的种类比形成孢囊小的种类危害性要大, 不是重要组织器官如在鳍上等寄生形成孢囊的种类危害性小, 一般不会引起死亡现象, 只是对生长略有影响。丑陋圆形碘泡虫寄生在异育银鲫的口唇、鳃盖和鳍等体表部位, 高发于冬季, 由于寄生部位不是重要组织器官且形成的孢囊小, 一般孢囊直径在 0.4~5.6 mm, 所以不会引起鱼死亡, 只是影响鱼的商品价值, 孢囊自然破裂释放孢子后鱼体于翌年春季会恢复健康^[8]。有些寄生部位是重要组织或器官, 大孢囊形成后进一步发展, 严重妨碍组织器官的功能等综合因素作用, 发病后死亡率很高。咽碘泡虫属于这一类危害大、流行广、引起鱼高死亡率的种类, 患咽碘泡虫病的异育银鲫死亡率可达 90%以上, 是继异育银鲫鲤疱疹病毒 2 型(cyprinid herpesvirus 2)病和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)细菌性病后的又一种异育银鲫重大病害, 近几年在江苏异育银鲫主养区每年由于该病造成的经济损失占异育银鲫病害损失的 10%以上。本研究从组织病理和疾病中期的病理生理方面进行观察和分析, 对了解危害大和死亡率高的该病显微损伤作用和疾病本质具有重要意义。

咽碘泡虫寄生后对异育银鲫的主要损伤是寄生的咽部组织, 咽部组织病理过程是该寄生虫营养体寄生在黏膜下层的结缔组织中, 随着营养体分裂增殖和发育, 形成由许多小孢囊构成的大孢囊, 其大小可达到 2.0 cm 以上, 小孢囊内营养体全部发育为成熟孢子时, 黏膜下层的结缔组织细胞

和间质中纤维,尤其小孢囊间的囊壁中成纤维细胞核固缩逐渐坏死,血管消失,只留下极薄的囊壁最终破裂崩解,孢囊至咽表面之间的黏膜层和黏膜下层组织细胞坏死崩解后形成孔洞,坏死组织与成熟孢子以及血液混杂一起流出体外。在此过程中,营养体增殖和发育需要从鱼体夺取大量营养物质,同时由于咽部膨大,从进食困难到无法进食,疾病中期肠中无食,造成鱼体消瘦。其他脏器的病变主要发生在鳃和肾,鳃紧靠咽碘泡虫寄生的咽部,膨大的咽部直接对鳃瓣有压迫刺激作用,会引起鳃组织产生增生的防御反应,鳃小片间充满增生细胞,不利的一面是增生过度,一方面会影响鳃氧气交换的呼吸功能,另一方面影响鳃的调节水平衡和排泄作用。鳃排泄能力减弱一般需要增强肾的排泄作用才能达到排泄平衡,肾小球出现肿胀可能是增强排泄功能的一种反应。部分病鱼咽部没有出现孔洞就死亡,这些病鱼因咽部严重膨大堵塞口咽腔,影响水进入鳃呼吸器官进行氧气交换、引发鳃组织增生等病理损伤以及贫血等变化造成呼吸困难而死亡。部分病鱼出现孔洞后死亡,从孔洞中血液流失造成失血,加重病情发展,加速病鱼的死亡。

疾病中期的异育银鲫红细胞数和血红蛋白浓度极显著减少,分别为 $(0.85\pm 0.10)\times 10^6/\mu\text{L}$ 和 $(94.50\pm 14.94)\text{ g/L}$ 。王玉佩等^[12]在进行鲤吉陶单极虫(*Thelohanellus kitauei* Egusa 1981)病的血液学研究中,参照人类红细胞数和血红蛋白低于正常对照组的 80%为贫血的诊断依据,将患鲤吉陶单极虫病的鲤鱼确定为贫血。患病的异育银鲫红细胞数和血红蛋白浓度分别仅仅是健康鱼 $(1.18\pm 0.06)\times 10^6/\mu\text{L}$ 和 $(120.05\pm 5.75)\text{ g/L}$ 的 72.03% 和 78%,也处于贫血状态,外周循环系统的红细胞数减少与一定数量的红细胞进入咽部组织中引起充血有一定关系。红细胞通过血红蛋白实现运输氧气和二氧化碳的功能,病鱼贫血会直接影响鱼携带氧气的能力导致呼吸机能下降。患病异育银鲫除红细胞核短径显著增加外,红细胞长径和短径以及红细胞核长径显著减少;红细胞体积显著减小,这是病鱼对贫血的一种适应性反应,已有研究表明红细胞体积的大小与其运输氧气的能力成反比,

红细胞体积减小,增大了红细胞表面积与红细胞体积比,缩短了氧气弥散距离,会加速血红蛋白对氧气的结合和释放,从而增强红细胞运送氧气的的能力^[13-14],弥补了患病鱼贫血对运输氧气的影响。病鱼的红细胞脆性极显著高于健康鱼,抵抗低渗溶液的能力减小,病鱼在疾病后期咽部出现孔洞后,孔洞中的红细胞会接触到养殖池水,会更容易破裂;另外红细胞脆性大,其生命周期短^[15],与健康鱼相比,会更容易引发红细胞减少导致贫血。血液中的胆红素主要来源于红细胞内的血红蛋白分解代谢^[16],患病异育银鲫的总胆红素为 $(5.08\pm 1.90)\text{ }\mu\text{mol/L}$,极显著高于健康鱼,这可能与患病鱼的红细胞脆性增加,导致红细胞的生命周期缩短,相对较多死亡红细胞释放,相对较多的血红蛋白转化为总胆红素有关。

患病中期的异育银鲫血栓细胞数为 $(0.98\pm 0.23)\times 10^4/\mu\text{L}$,显著低于健康鱼的 $(1.79\pm 0.28)\times 10^4/\mu\text{L}$,血栓细胞的大量减少对患病鱼的凝血系统有一定的影响,血液不容易凝固,在疾病的后期孢囊破裂出现孔洞时,血液容易从孔洞流出。在进行鱼类血栓细胞计数时有关血栓细胞归属问题仍然比较混乱,有些研究将鱼的血栓细胞归属于白细胞^[17-18],有些研究将血栓细胞作为白细胞以外的单独一种血细胞进行计数^[19-21]。白细胞在机体发生炎症、过敏反应和特异性免疫过程中发挥重要作用,是机体防御和保护机能的重要组成部分,它是血液中除红细胞和血小板以外的一类细胞^[22]。鱼类血栓细胞主要功能与人类血小板凝血功能相似,释放凝血酶,使纤维蛋白原变成纤维蛋白而产生凝血作用,因此从功能上表明血栓细胞是完全不同于白细胞的一种细胞,血栓细胞与白细胞分开单独计数比较合适。

鱼类在患病时,特别是出现炎症时,白细胞常表现为增多^[18, 23-24]。患病中期的异育银鲫白细胞数为 $(3.55\pm 0.49)\times 10^4/\mu\text{L}$,与健康鱼的 $(2.93\pm 0.49)\times 10^4/\mu\text{L}$ 相比显著增多。咽碘泡虫感染后,异育银鲫会出现防御反应,结缔组织成纤维细胞和胶原纤维等将营养体包裹形成孢囊,无论是刚感染时的咽碘泡虫处于营养体时期还是形成孢囊时期,营养体和形成的孢囊作为异物都会引起非特异性

的细胞免疫反应, 病鱼白细胞增多主要是单核细胞和嗜中性粒细胞显著增多, 分别为 $(0.72 \pm 0.15) \times 10^4/\mu\text{L}$ 和 $(1.23 \pm 0.24) \times 10^4/\mu\text{L}$, 淋巴细胞无显著变化。单核细胞和嗜中性粒细胞都具有吞噬清除异物的能力, 由于孢囊随着孢子发育逐渐增大和其包裹的特殊结构, 这些白细胞已无法对孢囊发挥吞噬作用, 但对孢囊的非特异性细胞免疫反应依然存在。在寄生虫感染中单核细胞和嗜中性粒细胞一般是最活跃的白细胞, 例如, 感染隐藏新棘虫(*Neosentis celatus*)和胃瘤线虫(*Eustrongylides* sp.)的黄鳢(*Monopterus albus*), 随着寄生虫感染数量的增加, 其单核细胞和嗜中性粒细胞也随之增加^[25]。

血清中总蛋白是白蛋白和球蛋白总和, 病鱼这 3 种蛋白指标分别为 (22.55 ± 5.91) g/L、 (12.63 ± 3.03) g/L 和 (9.92 ± 3.62) g/L, 都显著降低。血清中总蛋白和白蛋白含量与代谢、营养、疾病等密切相关, 当长期处于营养不良状况下, 白蛋白的含量会明显下降^[22]。患病的异育银鲫摄食受到了很大的影响, 病鱼由于堵塞无法摄食, 其蛋白质得不到外源性的补充, 而同时咽碘泡虫发育和增殖需要消耗大量的营养, 导致血清中总蛋白和白蛋白含量的下降。血清中球蛋白在机体防御和免疫方面起重要作用^[22], 一般寄生虫等病原感染都会导致球蛋白含量增加, 如鲑隐鞭虫(*Cryptobia salmositica*)感染的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鳃锥体虫(*Trypanosoma hemibagri*)感染的大鳍鲃(*Mystus macropterus* Bleeker), 虫体上的抗原刺激机体产生特异性抗体, 两种鱼的球蛋白含量都显著增加^[26-27]。特异性抗体的产生需要经巨噬细胞处理表面暴露出抗原活性物质, 再经过巨噬细胞的递呈, B 细胞与抗原接触并且 B 细胞表面的抗原受体受到异物表面的抗原活性物质的刺激, B 细胞开始大量增殖分化, 一部分分化为记忆细胞, 一部分分化为浆细胞分泌产生特异性抗体。咽碘泡虫感染的患病鱼球蛋白不增加反而显著降低, 可能和咽碘泡虫在发生和发展过程中都在孢囊中进行的感染特点有关, 尽管在小孢囊间有较多的血管分布, 但小孢囊是由宿主的结缔组织成纤维细胞、胶原纤维和弹性纤维形成囊壁等包裹而成, 被包裹的咽碘泡虫虫体抗原不能直接与白细胞接

触。包裹起到屏障作用, 孢子不能暴露出表面抗原活性物质刺激 B 淋巴细胞分化为浆细胞, 不能产生球蛋白特异性抗体的免疫反应, 而原有球蛋白也会由于病鱼体消瘦随着分解代谢的作用而含量降低, 说明病鱼无咽碘泡虫表面抗原的特异性免疫反应。病鱼的淋巴细胞数无显著变化, 可能是由于没有受到抗原刺激作用, 同样体现了无特异性的免疫反应。是否如此有待于进一步的证实。

血糖在血液中以葡萄糖形式存在, 患病中期的异育银鲫血糖为 (9.78 ± 1.17) mmol/L, 极显著低于健康鱼的 (13.19 ± 1.60) mmol/L; 这是病鱼咽部肿大, 口咽腔被堵塞, 导致摄食困难, 长期处于饥饿状态下, 无外源性的血糖所致。但病鱼血糖还处在较高的水平, 主要通过未受到损伤的肝释放贮存血糖进行维持, 使血糖保持在一定范围内。长期饥饿和分解代谢高于合成代谢, 使病鱼消耗贮存的能量导致鱼体消瘦。

尿素和肌酐分别是机体内蛋白质和肌酸的代谢产物, 经肾小球滤过, 最终由肾分解排出, 因此血清尿素和肌酐浓度在一定程度上反映肾小球滤过功能, 各种肾病、急性或慢性肾功能衰竭等肾病变严重时, 它们在血液中的含量会升高^[28]。患病中期的异育银鲫的肾小管上皮细胞出现滴状玻璃样变性, 大部分肾小球毛细血管扩张, 肾小球肿胀, 肾小囊囊间腔变窄或无腔间隙, 影响肾小球滤过功能, 部分区域出现细胞坏死现象, 肾出现严重的病理损伤, 从而不能有效地过滤排出, 导致病鱼尿素和肌酐含量分别达到 (67.10 ± 15.93) $\mu\text{mol/L}$ 和 (1.70 ± 0.42) $\mu\text{mol/L}$, 显著高于健康鱼的水平。

谷丙转氨酶主要存在于肝中; 谷草转氨酶主要存在于心脏和肝等组织细胞内, 一般心肌细胞中含量最高, 肝中次之, 这 2 种转氨酶的变化能敏感地反映肝的功能, 肝受到了损伤这两个指标会升高^[29]。血清中碱性磷酸酶主要来自肝和骨骼, 用于肝疾病损伤的辅助指标之一^[28]。患病异育银鲫组织病理表明肝没有受到病理损伤, 血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶均没有上升, 而是出现显著下降, 这与饥饿实验鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的这 3 种酶显著降低的现象^[30]类似, 也与寄生在鲤鱼肠黏膜下层的鲤吉陶单极虫病的这

3 种酶显著降低的现象^[12]相似。吉陶单极虫形成的孢囊向肠腔突出,引起肠梗阻,食物无法通过病鱼肠道,造成类似于饥饿的营养不良,而鲤鱼脾、肾和心脏无病理损伤变化,肝细胞除变小外也无其他病理损伤现象。因此患病异育银鲫的谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶显著降低是由于中期病鱼无法摄食、营养不良、分解代谢高于合成代谢,与鱼体消瘦有关。乳酸脱氢酶广泛地分布于动物细胞的胞质中,病鱼只要有组织的损伤,血清中乳酸脱氢酶含量就升高,特异性较低^[31];当肾受到损伤时,该酶含量会增加^[28]。患病中期的病鱼肾为主要损伤组织,乳酸脱氢酶的增多可能来自于肾坏死崩解的细胞。

参考文献:

- [1] Lu H D, Cai S J, Zhu Y T, et al. Morphological and molecular analysis of *Myxobolus pharynae* n. sp. (Myxosporidia) causing high mortality of *Carassius auratus gibelio* in pond aquaculture, China[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(4): 406–416. [陆宏达, 蔡水局, 竹攸汀, 等. 引起池养异育银鲫高死亡率的黏孢子虫新种咽碘泡虫形态和分子分析[J]. 海洋渔业, 2012, 34(4): 406–416.]
- [2] Blaxhall P C, Daisley K W. Routine haematological methods for use with fish blood[J]. J Fish Biol, 1973, 5(6): 771–781.
- [3] Gui Y M. Function Experiment for Aquatic Animals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 180–182. [桂远明. 水产动物机能学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 180–182.]
- [4] Lou Y D. Histoembryology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 95–97. [楼允东. 组织胚胎学[M]. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 1996: 95–97.]
- [5] Molnár K. Remarks to the validity of Genbank sequences of *Myxobolus* spp. (Myxozoa, Myxosporidae) infecting Eurasian fishes[J]. Acta Parasitol, 2011, 56(3): 263–269.
- [6] Chen Q L, Ma C L. Fauna Sinica: Myxozoa, Myxosporidia[M]. Beijing: Science Press, 1998: 348–528. [陈启鏊, 马成伦. 中国动物志: 黏体动物门(黏孢子纲)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 348–528.]
- [7] El-Matbouli M, Hoffmann R W, Schoel H, et al. Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 35(1): 1–12.
- [8] Zhang J Y, Wang J G, Li A H, et al. Infection of *Myxobolus turpisrotundus* sp. n. in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), with revision of *Myxobolus rotundus* (s.l.) Nemeček reported from *C. auratus auratus* (L.)[J]. J Fish Dis, 2010, 33(8): 625–638.
- [9] Liu Y, Gu Z M, Luo Y L. Some additional data to the occurrence, morphology and validity of *Myxobolus turpisrotundus* Zhang, 2009 (Myxozoa: Myxosporidia)[J]. Parasitol Res, 2010, 107(1): 67–73.
- [10] Kovács-Gayer É, Molnár K. Studies on the biology and pathology of the common carp parasite *Myxobolus basilamellaris* Lom et Molnár, 1983 (Myxozoa: Myxosporidia)[J]. Acta Vet Hung, 1983, 31: 91–102.
- [11] Dayoub A, Molnár K, Salman H, et al. Myxobolus infections of common carp (*Cyprinus carpio*) in Syrian fish farms[J]. Acta Vet Hung, 2007, 55(4): 501–509.
- [12] Wang Y P, Li J, Wang R, et al. The pathogenesis and hematology analysis of *Cyprinus carpio* infected with *Thelohanellus kitauei* Egusa 1981[J]. Tianjin Fisheries, 2005(4): 24–27. [王玉佩, 李军, 王蓉, 等. 鲤吉陶单极虫(*Thelohanellus kitauei* Egusa 1981)发病机制及血液学分析[J]. 天津水产, 2005(4): 24–27.]
- [13] Holland R A B, Forster R E. The effect of size of red cells on the kinetics of their oxygen uptake[J]. J Gen Physiol, 1966, 49(4): 727–742.
- [14] Jones D A. The importance of surface area/volume ratio to the uptake of oxygen by red cells[J]. J Gen Physiol, 1979, 74(5): 643–646.
- [15] Sun D G, Li Y M, Ka W B, et al. The impact of the changes of red cell membrane structure on RBC brittleness[J]. Journal of Medical Biomechanics, 2000, 15(2): 100–101. [孙大公, 李玉梅, 喀蔚波, 等. 红细胞膜结构的改变对红细胞脆性的影响[J]. 医用生物力学, 2000, 15(2): 100–101.]
- [16] Li Q H, Shao Y. Research progress of metabolism and regulating mechanism of bilirubin in the liver[J]. Chinese Hepatology, 2012, 17(1): 56–59. [李秋红, 邵勇. 胆红素在肝脏的代谢及调节机制研究进展[J]. 肝脏, 2012, 17(1): 56–59.]
- [17] Chen G, Zhou H, Zhang J D, et al. Hematological study and observation on development of blood cells in cobia, *Rachycentron canadum*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(5): 564–570. [陈刚, 周晖, 张健东, 等. 军曹鱼血液指标及血细胞发生的观察[J]. 水生生物学报, 2005, 29(5): 564–570.]
- [18] Xu X J, Xu B, Wang J, et al. Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 618–625. [徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 618–625.]
- [19] Rey Vázquez G, Guerrero G A. Characterization of blood

- cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)[J]. *Tissue Cell*, 2007, 39(3): 151–160.
- [20] Erhunmwunse N O, Ainerua M O. Characterization of some blood parameters of African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. *American-Eurasian J Toxicol Sci*, 2013, 5(3): 72–76.
- [21] Ncha O S, Michael P B, Nnabuchi U O, et al. Effect of diets with moringa leaf meal on growth, carcass composition and haematology of *Clarias gariepinus*[J]. *Int J Fish Aquat Stud*, 2015, 3(2): 397–401.
- [22] Wen H S. *Aquatic Animals Physiology*[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2009: 120–140. [温海深. 水产动物生理学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2009: 120–140.]
- [23] Zhao H P, Pu D Y, Tao W J, et al. Pathologic changes of blood corpuscle parameters for *Spinibarbus sinensis* Bleeker spontaneously infected with “muscle ulceration”[J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(2): 8–11. [赵海鹏, 蒲德永, 陶文静, 等. 患肌肉溃烂病中华倒刺鲃血细胞数量及形态变化[J]. 淡水渔业, 2007, 37(2): 8–11.]
- [24] Lin H R. *Fish Physiology*[M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999: 84–85. [林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 84–85.]
- [25] Luo Y L, Liu X L, Zhang G R, et al. The changes of blood cells of *Monopterus albus* infected with two kinds of parasites[J]. *Reservoir Fisheries*, 1999, 19(5): 41–43. [罗宇良, 刘小玲, 张桂荣, 等. 2种寄生虫感染黄鳝引起的血细胞变化[J]. 水利渔业, 1999, 19(5): 41–43.]
- [26] Mehta M, Woo P T. Acquired cell-mediated protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, against the haemoflagellate, *Cryptobia salmositica*[J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(11): 956–962.
- [27] Zhong Z P, Jin L, Zhang Y G. Hematological and histological observation on *Mystus macropterus* infected by *Trypanosoma hemibagri*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(6): 34–40. [钟正苹, 金丽, 张耀光. 患鳃锥体虫病大鳍鲃的血液学和组织学观察[J]. 淡水渔业, 2009, 39(6): 34–40.]
- [28] Xu K Q, Li Y. *Clinical Biochemistry*[M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2014: 109–110, 202–206, 254–260. [徐克前, 李艳. 临床生物化学检验[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2014: 109–110, 202–206, 254–260.]
- [29] Han N N, Shi C Y. The application of blood indexes in ichthyological research[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(33): 18877–18878, 18880. [韩娜娜, 史成银. 血液指标在鱼类学研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18877–18878, 18880.]
- [30] Qian Y X, Chen H Q, Sun J F. Effects of starvation on hematological and blood biochemical indices incultured *Lateolabrax japonicus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(2): 133–137. [钱云霞, 陈惠群, 孙江飞. 饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 133–137.]
- [31] Huang Q Y, Liu L Y, Fan L P. Pathophysiological studies on the hemolytic ascitesosis of crucian carp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(4): 316–321. [黄琪琰, 刘丽燕, 范丽萍. 异育银鲫溶血性腹水病的病理生理研究[J]. 水产学报, 1992, 16(4): 316–321.]

Histopathology and pathophysiology of *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxobolus pharynae*

LI Zhenwei, LU Hongda, CAO Genping, LIU Junjie, MAO Mao

College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Myxosporean disease caused by *Myxobolus pharynae* has led to high annual mortality in cultured *Carassius auratus gibelio* in Yancheng City, Jiangsu Province, China, in recent years. The pathogen specifically parasitizes the pharyngeal tissue of *C. auratus gibelio*. To examine the lesions of diseased *C. auratus gibelio*, histopathological observations at different stages of the disease, and pathophysiological analyses in the middle stage of the disease, were carried out. Histopathological results showed that, at the trophozoite stage, *M. pharynae* parasitized the pharyngeal submucosa of fish, resulting in slight hyperemia of the pharynx, and sporocysts were formed by fibroblast packages, but no pathological changes were found in other tissues and organs at this early stage of the disease. The pharynx was greatly enlarged in the middle stage of the disease due to the increasing number of small sporocysts and proliferation of trophozoites, which developed into mature spores that formed a large sporocyst. Serious congestion appeared within the walls of sporocysts, which were mainly composed of the connective tissue of fibrocytes, collagenous fibers and elastic fibers. The nuclei of fibrocytes underwent karyopyknosis and necrosis, and there was atrophy in the connective tissue in the walls, which gradually thinned. Pale staining was seen in epithelial cells and taste buds in the pharyngeal mucosa, which eventually became necrotic. Cell hyperplasia mainly appeared in secondary gill lamellae. Renal glomeruli expanded, hyaline degeneration appeared in renal tubular epithelial cells and necrocytosis occurred in some parts of the kidney. No pathological changes appeared in the liver, spleen, intestine or in the head of the kidney. Further necrotic tissues and cells in the walls of sporocysts, and in the pharyngeal mucosa and submucosa, resulted in holes through which mature spores and necrotic tissues passed into the blood stream during the late stage of the disease. Many necrotic cells and mature spores came from necrotic pharynx regions in the intestine. Histopathological changes in other organs and tissues were similar to those in the middle stage of the disease. Pathophysiological analysis in the middle stage of the disease showed that the number and size of red blood cells, hemoglobin, thrombocytes, total protein, albumin, globin, glucose, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in the diseased fish were significantly lower than those in the healthy fish ($P < 0.01$). Erythrocyte osmotic brittleness, numbers of white blood cells, neutrophils and monocytes, and total bilirubin, creatinine, urea and lactate dehydrogenase were significantly higher in the diseased fish than those in the healthy fish ($P < 0.01$). There were no significant differences in lymphocytes and eosinophils between diseased fish and healthy fish ($P > 0.05$). Diseased fish eventually died because of feeding difficulty and respiratory dysfunction caused by the enlarged pharynx, which blocked the oropharyngeal cavity, leading to hyperplasia in secondary gill lamellae, kidney lesion, anemia and other changes and further necrotic pharyngeal tissues forming a bleeding hole.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Myxobolus pharynae*; disease; histopathology; pathophysiology

Corresponding author: LU Hongda. E-mail: hdlu@shou.edu.cn