

大连地区中国对虾暴发性流行病病理学研究

李霞 刘淑范 李华 姜静颖 李君丰 邢殿楼

(大连水产学院, 116023)

摘要 本文报道1994年—1995年大连地区由杆状病毒引起的自然发病和人工感染实验中国对虾组织病理学研究。结果表明,自然发病虾和人工感染的虾组织病理相同,在胃、皮下、类淋巴、造血组织、鳃、中肠、后肠、肝胰腺、心脏等组织器官的上皮细胞、干细胞和结缔组织细胞中都可观察到显著胀大,呈空泡状或被苏木精浓染的细胞核。胃是病理变化出现最早且最严重的器官。在电镜下,胃、甲壳下上皮细胞核中可见大量长270~350nm,宽100~120nm的杆状病毒颗粒,细胞核、线粒体出现胀大,嵴断裂、消失情况。干细胞、上皮细胞和疏松结缔组织细胞为靶细胞。

关键词 中国对虾, 暴发性流行病, 组织病理学

1994年—1995年春夏,大连地区养殖对虾发生大面积暴发性流行病,给养虾业造成巨大经济损失,为研究病原以及发展情况,在先后进行多次人工感染实验基础上,对胃、类淋巴等12个组织和器官进行了显微和亚显微结构观察,认为是由杆状病毒引起的疾病。本文系统地报道了自然发病和人工感染实验的病虾的病理情况。

1 材料与方法

自然发病虾取自大连地区邓屯、七顶山、后石养虾场。

人工感染的虾取自室内实验缸。人工感染的方法有两种:①将除菌的组织匀浆液注射对虾体;②投喂带毒病虾,感染后每隔6hrs固定取材一次。

对照虾取自春季海捕亲虾和感染实验对照组。这些虾均抽样,经电镜检查不带病毒。

将以上虾胃、类淋巴、头胸甲壳下(皮下)、造血组织、鳃、心脏、肝胰腺、中肠前盲囊^[1]、中肠、后肠、腹部肌肉、性腺12个器官或组织取下以Bouin's液固定,石蜡切片,H.E染色,Olympus万能显微镜拍照。电镜样品用2.5%戊二醛固定,Epon812包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。

2 结果

2.1 外部病症

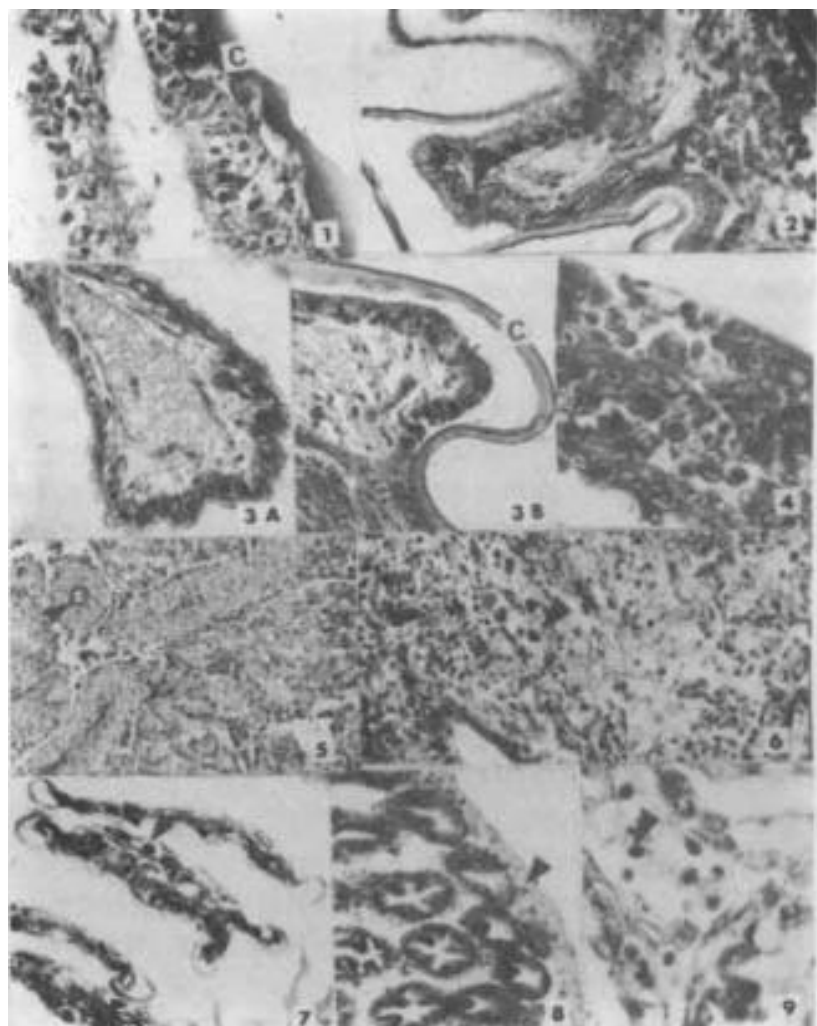
收稿日期:1995-11-13。

患病虾沿池边游动缓慢,胃空,体微红,头胸甲上有白色斑点,极易剥离,这种现象在 4~7cm 自然发病和人工感染个体较明显。8~11cm 以上的个体,尤其是人工感染的病虾,肉眼观察白色斑点不甚明显。

2.2 组织病理

人工感染和自然发病个体病理变化基本相同,其共同特点为病变的细胞核膨大,呈空泡状或被苏木精浓染成一个圆或多角形的深色颗粒,核仁消失。现将 12 个器官的病理变化分别叙述如下。

甲壳下组织(皮下) 该组织位于头胸甲下,主要由疏松结缔组织和单层柱状上皮细胞组成。大部分结缔组织细胞和上皮细胞核肿胀,被苏木精浓染(图版 I:1)。纤维断裂,网状结构消失。



图版 I 大连地区中国对虾暴发性流行病病理学研究

Plate. I The histopathological studies on the fulminating diseases of *penaeus chinensis* in Dalian

1. 自然发病虾头胸甲皮下组织。C, 几丁质膜, ▲, 细胞核, ×200
The cuticular tissue of spontaneously diseased shrimp. C, cuticle, ▲, nucleus. ×200
2. 健康虾胃上皮细胞, ▲, ×200
The epidermis in the stomach of healthy shrimp. ▲, ×200
- 3A. 自然发病虾胃切片示一个褶皱。▲, 典型的肥大被苏木精浓染的细胞核, ×200
A fold in stomach of spontaneously diseased ▲, typically hypertrophied nucleus stained homogeneously with hema toxylin. ×200
- 3B. 人工感染虾胃切片示一个褶皱。▲, 细胞核, C, 几丁质层, ×200
A fold in stomach of experimental infected shrimp. ▲, nucleus, C, cuticle. ×100
4. 患病虾造血组织。▲, 细胞核, ×200
The hematopoietic tissue of diseased shrimps. ▲, nucleus. ×200
5. 正常的类淋巴器官切片示鞘结构。▲, ×100
The lymphoid organ of healthy shrimp indicates the sheath structure. ▲, ×100
6. 患病虾类淋巴器官示鞘结构消失及变性核。▲, ×100
The lymphoid organ of diseased shrimp indicates the sheath have markedly degenerated with hepertrophied nuclei. ▲, ×100
7. 患病虾鳃细胞及变性核。▲, ×100
The gill of diseased shrimp indicates the cell and the nucleus. ▲, ×100
8. 病变较轻的肝胰腺。▲, 结缔组织细胞中的变性核, ×50
The lighter diseased hepatopancreas. ▲, the nucleus in connective tissue. ×50
9. 病变严重的肝胰腺。脱离的肝胰腺细胞中的变性核。▲, ×200
The severe diseased hepatopancreas. ▲, the nucleus in epidermis. ×200

胃 病理变化最严重的器官。病虾胃中均没有食物, 结缔组织和上皮细胞核被苏木精浓染成多角形颗粒, 数量达80%以上(图版I:2、3A、3B)。细胞界限不清, 变矮, 甚至脱落。

造血组织 分散分布在胃背、腹肌肉中的造血组织, 外覆结缔组织被膜, 实质由结缔组织将干细胞分割成一个个小单位, 病变较轻时, 只有结缔组织细胞核变性; 严重的情形, 结缔组织围膜消失, 干细胞肿胀, 膨大, 核内充满均质物质(图版I:4), 血细胞数量明显减少。

类淋巴器官 正常的类淋巴器官由结缔组织和淋巴细胞组成, 淋巴细胞或分散分布或被结缔组织围成同心圆排列的鞘状^[6](图版I:5)。患病较轻个体, 只有结缔组织细胞核膨大, 呈空泡状或蓝色均质状。严重的情况下, 淋巴细胞核坏死, 鞘结构消失, 细胞聚成一团(图版I:6)。

鳃 病虾鳃上皮萎缩, 细胞界限不清, 结缔组织和上皮细胞中都有坏死变性核, 但数量不多, 病变严重的个体约占10%(图版I:7)。

肝胰腺 病变较轻个体, 肝胰腺肝小管及上皮细胞均完好, 在结缔组织中有少量变性核。严重的情况表现在肝表面结缔组织围膜消失, 肝小管破裂, 大量的吸收细胞^[2,3]进入肝管腔内, 变性的结缔组织细胞核数量增加, 吸收细胞核也表现为肿胀, 核膜消失, 核内染色质固缩, 呈多个颗粒状(图版I:8、9)。

中肠前盲囊 横切面上有许多褶皱, 上皮为单层柱状细胞, 囊壁结缔组织细胞中有数量不等的变性核。但上皮细胞结构完好, 没有发现细胞核有变化(图版II:10)。

中肠 大多数个体变性核限在结缔组织中, 但少数上皮细胞中也有。除此之外, 上皮细胞界限不清, 变矮, 甚至脱落下来(图版II:11)。肠中均没有食物。

后肠 组织结构破坏严重,细胞界限不清。在结缔组织和上皮中有大量变性核(图版Ⅱ:12)。

心脏 病虾心脏血细胞数量减少,心肌纤维没有明显病变。但少数结缔组织细胞核出现肿胀或浓染现象(图版Ⅱ:13)。

性腺、肌肉 基本结构完好,极少数个体的结缔组织中发现变性核。

本实验对胃等 12 个器官做了病理观察,发现各个器官病变的轻重不同。

表 1 自然发病个体与人工感染个体 12 个器官病理变化

Table 1 The histopathological changes of 12 organs from spontaneously and experimentally diseased shrimp

器官 Organ	样 本 Sample							
	1	2	3	4	5	6	7	8
胃 Stomach	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
皮下 Cuticular epidermis	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
造血组织 Hematopoietic tissue	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
鳃 Gill	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
中肠 Midgut	++	++	++	+++	++	++	++	++
后肠 Postgut	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
中肠前盲囊 Anterior diverticulum	+	+	+	++	+	+	+	+
类淋巴 Lymphoid organ	++	++	++	++++	++	+++	++	++
肝胰腺 Hepatopancreas	+	+	+	+++	+	++	++	+
心脏 Heart	-	-	-	+	-	+	-	-
性腺 Gonad	-	-	-	+	-	+	+	-
肌肉 Muscle	-	-	-	+	-	+	+	-

1—4 自然发病虾;5—8 人工感染虾 1—4 Spontaneously diseased shrimp;5—8 Experimental infected shrimp

- 无变化 - Normal

+ 只有少量结缔组织细胞核变性 + A few of nucleus of connective tissue changes characteristic

++ 组织结构不完整,较多的结缔组织细胞核变性 ++ The structure is not complete, more nucleus of connective tissue cells change characteristics

+++ 组织结构破坏严重,少数上皮细胞或干细胞变性 +++ The structure is destroyed heavily, a few of epidermis or stem cells change characteristic

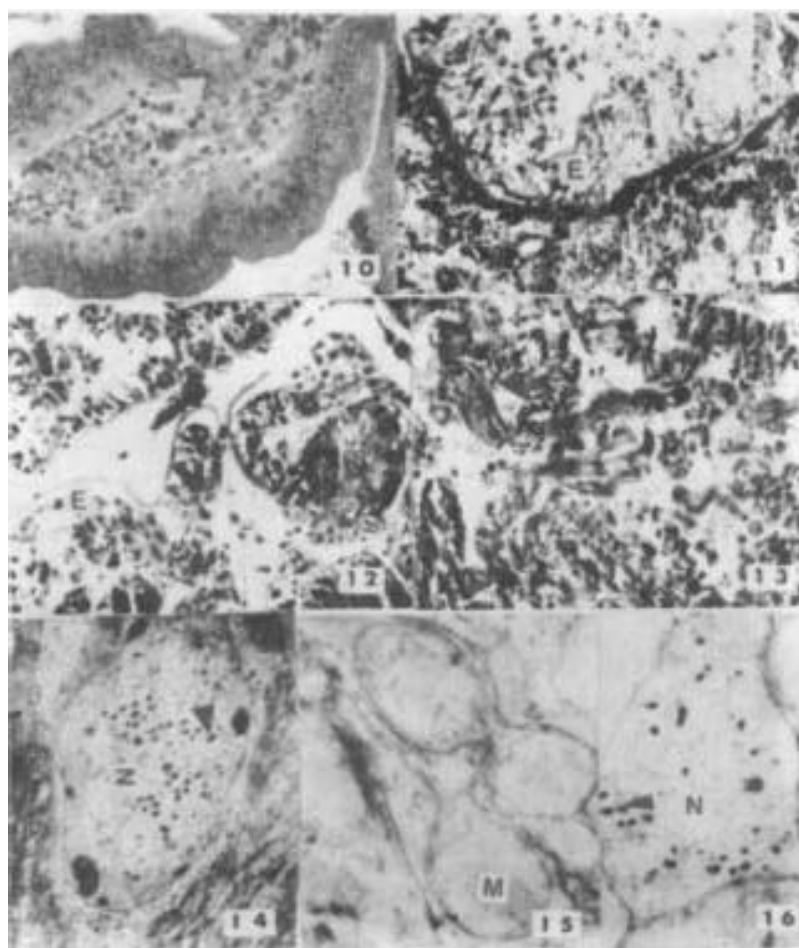
++++ 组织结构破坏严重,大部分上皮细胞核发生变化 ++++ The structure is destroyed heavily, the most of epidermis change characteristics

从表 1 可看出,全身各主要器官都有程度不同的病变。胃是变化最严重的,其次为皮下结缔组织和上皮、造血组织、类淋巴器官、鳃和后肠。肝、中肠前盲囊、中肠主要是结缔组织细胞核发生变化。

2.3 亚显微结构观察

对病变较重的胃和皮下进行亚显微结构观察,发现细胞器均解体或结构不完整,内质网膨大,线粒体肿胀,嵴消失,核膜间隙增宽,核内有大量长 270—350nm,宽 100—120nm 的杆

状病毒颗粒(图版Ⅱ:14、15)。胃壁肌肉细胞核中没有发现病毒颗粒,但在血窦边缘的一些多角形细胞中可见胀大的细胞核以及核内大量的杆状病毒颗粒(图版Ⅱ:16)。



图版Ⅱ 大连地区中国对虾暴发性流行病理学研究

Plate II The histopathological studies on the fulminating diseases of *penaeus chinensis* in Dalian

10. 患病虾中肠前盲囊切片。▲, 结缔组织中的变性核, ×200
The midgut anterior diverticulum in diseased shrimp. the nucleus in connective tissue. ×200
11. 患病虾中肠切片。E, 脱落的上皮细胞, ×200
The mid-gut of diseased shrimp. E, the cell fall off the wall. ×200
12. 患病虾后肠切片。E, 上皮细胞, ×200
The post-gut of diseased shrimp. E, epidermis. ×200
13. 患病虾心脏切片。▲, 位于肌纤维间的结缔组织细胞核, ×200
The heart of diseased shrimp. ▲, the nucleus of connective tissue in muscle fibre. ×200
14. 胃上皮细胞超微结构观察。N, 细胞核▲, 杆状病毒颗粒, ×7 500
The ultrastructure of epidermis in stomach. N, nucleus, ▲, baculovirus. ×7 500
15. 甲壳下上皮细胞超微结构观察。M, 线粒体肿胀, 嵴消失, ×20 000
The ultrastructure of epidermis in cuticle. M, mitochondria hypertrophied and the cristae degenerated.

× 20 000

16. 胃壁多角形细胞超微结构观察。N, 细胞核, ▲, 杆状病毒颗粒, × 12 000

The ultrastructure of polygonal cell in the stomach wall. N, nucleus ▲, baculovirus. × 12 000

2.4 通过人工感染实验确定病毒感染进程

采用投喂方法人工感染对虾, 经 6、12、18 hrs 分别固定并做切片观察均没有发现细胞核有特殊病变, 感染虾活动状态正常。自 24 hrs 出现空胃, 切片观察在胃上皮细胞中首先发现核出现浓染、胀大。48 hrs, 胃上皮下的结缔组织中出现胀大的结缔组织细胞核, 虾伏池底不动。54~72 hrs, 虾侧游或不动, 濒死, 切片观察这些核在皮下、造血器官、鳃及后肠上皮和结缔组织中出现。

3 讨论

虽然在个体较小时, 可从头胸甲是否有白色斑点以及剥离难易程度来判断此病, 但准确率不是很高, 尤其在个体较大时更不易分辨。本文通过大量切片观察并与健康虾比较, 发现以胃、造血组织、头胸甲皮下、鳃上皮或结缔组织细胞中是否出现肿胀、空泡或被苏木精浓染的核来分辨健康与患病的虾是比较准确的。这是因为大量的杆状病毒存在于细胞核内, 使细胞核体积膨大, 如果核内病毒正进行旺盛的复制工作, 核酸的量会明显增多, 细胞核强嗜碱性, 能被苏木精浓染成一个体积比正常核大得多的蓝色颗粒, 如果病毒颗粒已从核内迁出, 光镜下会表现为大空泡。

自然发病和人工感染虾切片观察表明, 胃是病变最早最严重的器官, 说明病毒感染途径之一是口入, 后经胃上皮侵入到上皮下结缔组织中, 随结缔组织遍及全身。所以疏松结缔组织细胞和上皮细胞、造血组织干细胞是该病毒的靶细胞。疏松结缔组织在虾体中分布甚广, 加之开放式的循环系统, 病毒侵入有机体后, 在体内的传播速度极快, 以至每个器官都受到程度不同的影响。虾的消化、吸收、呼吸等活动都靠上皮细胞来完成。这些细胞受损、坏死, 加上造血器官被破坏后, 血细胞数量减少, 虾体免疫功能下降, 正常的代谢活动受阻, 短时间内即死亡。人工感染的虾 24 hrs 胃上皮中就可见变性核, 72 hrs 就能全部死亡, 说明此病流行极快, 危害很大。

关于中国对虾暴发性流行病的病理学研究目前尚未见系统报道。作者在对 12 个器官病理变化研究基础上, 对病变较重的胃进行电镜观察, 在核内见到大量长 270~350nm, 宽 100~120nm 的杆状病毒颗粒, 没有发现包涵体。国内已报道的对虾类杆状病毒长度均在 250nm 左右^[4,5], 发现的部位为胃、肠上皮细胞^[5]、肝胰腺细胞核内。国外已报道的对虾类无包涵体杆状病毒如表 2。病理变化上以细胞核显著胀大或被苏木精浓染为特征的有 BMNV^[8]、RV-PJ^[7]、YBV^[9]。BMNV^[8]靶器官是中肠腺和肠, 这与本文情形不符。YBV 病毒大小约 170nm, 靶器官为类淋巴和肝胰腺, 且血细胞质中有包涵体, 这与中国对虾不同。日本对虾 RV-PJ 病毒敏感器官为结缔组织、上皮组织、类淋巴器官, 尤其是胃结缔组织和上皮中具有被苏木精浓染的细胞核, 这与中国对虾相似。综上所述, 本文报道的大连地区中国对虾暴发性流行病的病理变化以及病毒大小与国内已发表的对虾类杆状病毒^[4,5]以及日本对虾 RV-PJ 病毒病相似。

表 2 已报道的对虾类无包涵体杆状病毒

Table 2 The reported baculovirus of shrimps without inclusion bodies

病毒 Virus	寄主 Host	敏感器官 Sensitive organ	作者 Author
RV - PJ	日本对虾 Kuruma shrimp	上皮 Epidermis 结缔组织 Connective tissue 类淋巴器官 Lymphoid organ	Kazuo Momoyama
BMNV	日本对虾 Kuruma shrimp	肝胰腺 Hepatopancreas 中肠 Mid - gut	Sano et. al
YBV	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	类淋巴器官 Lymphoid organ 肝胰腺 Hepatopancreas	Boonyaratpalin
PHRV	Hybrid	血细胞 Blood cell 皮下组织 Cuticular epidermis	Owens
RV - CM	兰蟹 blue crab	血细胞 Blood cell 造血组织 Hematopoietic tissue	Johnaon

参 考 文 献

- [1] 陈宽智, 1988. 东方对虾消化系统解剖和组织学研究. 青岛海洋大学学报, (1): 43~51.
- [2] 李霞等, 1992. 正常和患红腿黄鳃病的中国对虾肝胰腺组织学研究. 大连水产学院学报, 7(1): 11~15.
- [3] 李华等, 1995. 1993 年中国对虾暴发性流行病病虾肝胰腺组织病理研究. 大连水产学院学报, 10(1): 22~28.
- [4] 陈细法, 1994. 养殖对虾的一种病毒的超微结构观察. 电子显微镜学报, (5): 357.
- [5] 国际翔, 1994. 辽宁沿海养殖对虾暴发性病害的病因分析. 电子显微镜学报, (5): 355.
- [6] 桃山和夫等, 1994. 1993 年日本西部发生养殖对虾大量死亡: 病理观察. 鱼病研究, 29(2): 141~148.
- [7] 井上洁, 1994. 1993 年日本西部发生的养殖日本对虾大量死亡: 病因病毒的电镜观察. 鱼病研究, 25(2): 149~158.
- [8] Sano T. 1981. Baculovirus infection of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. Fish pathol. (5): 185 - 191.
- [9] Boonyaratpalin S. 1983. Non - occluded baculo - like virus the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*penaeus monodon*). Fish pathol. (28): 103 - 190.
- [10] Owens L. 1991. Lymphoidal parvo - like virus in Australian prawns. Dis Aquat Org. (11): 129 - 134.
- [11] Johnson P T. 1988. Rod shaped nuclear viruses of crustaceans: hemocyte - infecting species. Dis Aquat Org. (5): 111 - 122.

HISTOPATHOLOGICAL STUDIES ON FULMINATING DISEASES OF *PENAEUS CHINENSIS* IN DALIAN

Li Xia Liu Shufan Li Hua Jiang Jingying Li Junfeng Xing Dianlou

(Dalian Fisheries College, 116023)

ABSTRACT This paper reported the histopathological studies on spontaneously diseased and experimentally infected shrimp of Dalian in 1994 - 1995. The result shows that there are the same histopathological changes for spontaneously diseased and experimentally infected shrimp. The hypertrophied, hollow nucleus or heavily dyed nucleus by Hematoxylin are observed in epithelial cell, connective tissue cell and stem cell of stomach, cuticular tissue, lymphoid organ, hematopoietic tissue, gill, midgut, postgut, hepatopancreas, and heart and so on. The earliest and severest histopathological changes appears in epidermis of stomach. A great deal of baculovirus of 270~350 nm long and 100~120 nm wide are observed in nucleus of stomach and cuticular epithelial cells. The nuclei and mitochondria hypertrophied and degenerated. The epithelial cells and connective tissue cells and stem cell are target.

KEYWORDS Histopathology, Fulminating diseases, *Penaeus chinensis*