

九孔鲍暴发性流行病的病原及病理

张朝霞, 王 军, 苏永全*, 郝庆枇, 池信才, 周化民, 周永灿

(厦门大学海洋学系, 厦门大学亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 1999 年 2~5 月, 东山县养殖九孔鲍暴发了大规模流行病, 不少养殖场全场覆没. 病鲍表现为分泌粘液增多、肝脏红肿、足部僵硬和反应迟钝. 应用磷钨酸负染、超薄切片的电镜观察和现场检测等方法, 对病鲍的病原及肝肠组织的病理情况进行观测, 结果表明引发这次养殖鲍暴发严重病害的主要病原是致病力很强的病毒和弧菌. 电镜观察到病毒发生在细胞质中的一种称为“封入体”的泡状结构中, 证实了病原的入侵造成九孔鲍肝及肠等组织、细胞产生病变, 描述了细菌和病毒混合感染导致九孔鲍细胞的病理变化.

关键词: 九孔鲍; 病原; 病理; 电镜观察

中图分类号: S 944.4

文献标识码: A

福建东山 1970 年开始养鲍, 因其优良的水域环境、丰富的饵料资源及适宜的养殖技术而迅速发展, 1998 年, 养殖面积近 40 万 M^2 , 目前已形成相当大的规模, 养鲍业已成为东山县水产养殖的重要产业之一. 但由于高密度养殖模式的发展、以及水质管理和疾病防治研究的相对滞后, 近几年来, 鲍病时有发生^[1]. 1999 年 2~5 月, 东山养殖九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 暴发了大规模的流行病, 不少养殖池全场覆没. 据已有资料报道, 引发鲍病的生物病原主要包括支原体、细菌、寄生虫、真菌和病毒^[2~6]. 有关病原病理学方面, 国外的 Gardner 等^[5] 认为立克次氏体 (*Rickettsiales*) 是黑鲍 (*H. cracherodü*) 坏死症的病原体, 造成黑鲍肠上皮产生严重病变, 李太武等^[8] 对河流弧菌引起的皱纹盘鲍脓疱病的足部细胞进行病理观察, 李霞等^[6] 报道了皱纹盘鲍足、外套膜、肝嗉囊和鳃内血细胞的细胞质中存在球状病毒粒子. 本项目组在对九孔鲍的流行病病原作出诊断的基础上, 探讨其病原的发生基质, 研究病原的入侵引起九孔鲍肝及肠组织和细胞的病理学变化.

1 材料与方法

1.1 材 料

病鲍是 1999 年 2~5 月取自东山鲍病重灾区的西埔镇 P 养鲍场、陈城镇 H 养鲍场和 L 养

收稿日期: 2000-06-29

作者简介: 张朝霞(1973-), 女, 工程师.

* 通讯联系作者, Tel: 2181589; E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

鲍场. 低温保存的活鲍 4 h 内带回实验室备用.

1.2 样品制备

负染样品: 无菌取活的九孔鲍内脏, 挑去结缔组织膜, 将内脏剪碎, 加入 3 mL PBS (pH 7.2) 匀浆, 4 5 000 r/min 离心 8 min, 留 0.5 mL 上清液用于细菌观察; 将其余的上清液在 4 12 000 r/min 离心 20 min 后, 再留 0.5 mL 上清液用于较大病毒粒子的观察; 最后将余下的上清液经 4 18 000 r/min 离心 40 min, 沉淀物用于较小病毒粒子的观察. 用铜网沾取上述离心处理的上清液和沉淀稀释液, 磷钨酸负染, 电镜观察.

超薄切片: 无菌操作取病鲍的肝及肠的组织块(大小约为 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$), 于 2.5% 的戊二醛中固定 4 h, PBS (pH 7.2) 冲洗后, 置于同一缓冲液中 4 保存. 取其中一些组织块放在 1% 醋酸中固定 2 h, 冲洗后经乙醇丙酮系列脱水, 环氧树脂包埋后用 LKB-1 切片机切片(厚度 50 ~ 80 nm), 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后, JEM-100 透射电子显微镜上观察.

2 结果

1999 年 2 ~ 5 月, 在东山暴发的鲍流行病中, 病鲍表现为分泌的粘液增多, 活力下降, 足部僵硬, 对触觉反应迟钝, 60% ~ 70% 的病鲍肝脏肿大, 严重者一周内全部暴死.

2.1 病原

现场调研和实验室电镜观察及回归感染结果表明, 此次东山九孔鲍流行病的主要病原包括细菌和病毒, 回归感染试验的结果另文发表.

病毒: 在病鲍的肝及肠的细胞中存在许多病毒粒子, 从形态上看有大小分别为 135 ~ 150 nm、95 ~ 110 nm 的两种球状病毒. 其中为数较多的是那些大小为 135 ~ 150 nm 的球状病毒, 中心为电子致密度高、直径为 100 ~ 110 nm 的核衣壳, 呈二十面体立体对称, 核衣壳外包全封闭囊膜, 囊膜上有纤突(图版 I-1).

在一些病鲍样品中可见到 95 ~ 110 nm 的球形病毒, 核衣壳也呈二十面体对称, 外具囊膜, 囊膜光滑无纤突(图版 I-1).

另外, 在 18 000 r/min 离心处理的负染样品中, 可观察到一种大小为 40 ~ 45 nm、基本结构包括核心和外膜的可疑颗粒(图版 I-2), 其电子致密程度不同于前两者, 但在超薄切片中未观察到.

超薄切片电镜观察结果显示, 两种较大的病毒粒子均不形成包涵体. 病毒出现在细胞质中一种具有双层膜的泡状结构中, 这种结构的周围可观察到颜色较深的嗜钨酸小体(图版 I-3). 图版 I-4 显示, 泡状结构内有许多裸露的核衣壳、空的囊膜和刚组装完的病毒粒子. 随着泡状结构的破裂, 病毒逸出(图版 I-5). 超薄切片观察到的病毒从核周腔排出核外, 通过内质网获得囊膜(图版 I-6 ~ 7).

细菌: 在负染样品中, 观察到两种细菌: 一种大小为 $0.8 \sim 1.2 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.6 \mu\text{m}$, 短杆状, 端生单鞭毛, 有的细胞正处于二分裂状态(图版 I-8); 另一种大小为 $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.8 \sim 2.5 \mu\text{m}$, 弧状, 也是端生单鞭毛(图版 I-9)(细菌种类鉴定另文发表).

在所观察的病鲍的肝肠组织样品中, 细菌分布的区域有: ①集中于细胞间隙(图版 I-10), ②突破基底膜后聚集于基底膜附近, 有的细菌已进入上皮细胞(图版 I-11), ③位于肝肠组织之间成片的细胞碎片中(图版 I-12).

2.2 病理观察

肠组织:正常的肠上皮细胞呈单层柱状,排列整齐、紧密,细胞核出现在细胞的 1/3 处,核质均匀,块状核仁明显,细胞质充盈,细胞器正常,基底膜紧贴于上皮层,完好无损(图版 I-13)。

在 1999 年 4 月 3 日和 4 月 13 日分别取自陈城镇的 H 养鲍场和 L 养鲍场病鲍的样品中,其肠组织出现严重的病变。由于肠上皮细胞萎缩的方向和程度不一样,肠上皮细胞排列松散,大小相差很多,但未被侵染的细胞核质均正常,形态及结构完好(图版 I-14)。有的病鲍的整个肠上皮层已不存在正常的细胞结构,只余下大小不一的空腔、包含病毒的泡状结构和不少细菌(图版 I-6,图版 I-12)。

电镜观察位于这些病鲍样品肠组织的细胞,其病变程度各有不同。有的细胞核膜肿胀成囊状,核变形,核质变性,线粒体肿大,嵴减少,细胞空泡化严重(图版 I-12),有的细胞自溶,只余细胞轮廓,细胞间充满了粗面内质网等细胞器(图版 II-15)。

肝组织:正常肝组织细胞大小虽然不一,但排列紧密(图版 II-16),细胞核膜完整,核仁明显,一些内质网和线粒体等细胞器均匀地分布在细胞质中,细胞质充盈(图版 II-16)。

在 1999 年 3 月 19 日西埔镇的 P 养鲍场和 4 月 13 日陈城镇 L 养鲍场病鲍的肝组织样品中,成片细胞坏死,细胞固缩,细胞间隙增大(图版 II-17)。在一些肝组织样品中,可观察到相邻的组织区域,一半细胞坏死,但另一半细胞结构仍然完整的现象(图版 II-18)。有的肝细胞甚至已不见细胞结构,只有大量的病毒粒子和滑面型内质网小池(图版 II-19)。

这些样品肝组织中的细胞受到严重破坏,细胞膜肿胀,核变形,核质无结构化,核仁消失(图版 I-20),线粒体肿胀,嵴受损,有的细胞内粗面型内质网大量增生(图版 II-21),另一些细胞核质均被破坏,只余下空泡、含病毒粒子的特殊蛋白结构和许多的滑面型内质网小池(图版 II-22)。

结缔组织:在所有检测的病鲍样品肝及肠的结缔组织中都出现了一些病理变化。细胞中同样也发现细菌和病毒的泡状结构,核变形,核内物质变性,着色深,线粒体肿大,嵴消失,有的细胞空泡化,有的结缔组织成片细胞均丧失完整结构,在细胞器和胶原颗粒的杂乱排列中有不少细菌(图版 II-23、24)。

2.3 细菌和病毒混合感染的病理症状

在所观察的样品中,细菌和病毒两种病原同时出现在同一个视野的有下列 3 种情况:① 细菌和病毒分处于基底膜的两边(图版 II-25),④ 肝组织中具有吞噬异物功能的血细胞周围包围着细菌(图版 II-26),④ 细胞解体,但细胞器尚未解体的肝及肠组织中的一些区域有时可观察到细菌和病毒共同存在(图版 II-27)。

细菌和病毒合并感染具有以下病理特点:① 基底膜和结缔组织等具有保护功能的结构被破坏,④ 合并感染区域的细胞往往只余成片的细胞碎片(图版 I-12),而单独存在多个病毒泡状结构的区域,有的细胞基本结构仍存在(图版 II-28),④ 肝肠组织中一些相邻区域经常出现一半细胞结构完好,而另一半结构荡然无存的现象(图版 I-14、图版 II-18),④ 合并感染区域的细胞或出现溶解样坏死,细胞空泡化严重(图版 I-12、图版 II-22);或出现凝固样坏死,细胞固缩,残存细胞轮廓(图版 I-6、图版 II-17)。

3 讨论

1999年初福建东山九孔鲍暴发性流行病的病鲍肝肠组织的超薄切片中,观察到的两种球状病毒粒子均为非包涵体病毒,大量出现在细胞质泡状结构中,这种病毒泡状结构具有双层膜,内含成熟的病毒粒子、核衣壳和外膜,本文将之称为“封入体”,这与非包涵体杆状病毒感染中国对虾后在其体内形成的“封入体”是相似的^[8]。我们的观察结果表明,病毒粒子可能在核内复制后排出核外,通过内质网等膜结构获得囊膜,并在细胞质中组装成熟。据报道,核衣壳呈二十面体立体对称又有被膜的只有疱疹科病毒(*Herpesviridae*)^[9]。而我们观察的感染病鲍的135~150 nm的病毒无论是细胞结构还是形状大小均与疱疹科病毒十分吻合,同此科的伪狂犬病毒(*Pseudorabies virus*)一样^[10],也大量出现在细胞质的空泡中。而95~110 nm的这种病毒,囊膜上无纤突,个体明显小于疱疹科病毒,其形态也与疱疹科病毒不同^[9]。要鉴定这两种病毒及可疑小颗粒有待于进一步的微细结构及核酸分析等方面的研究。我们观察到此次发病九孔鲍体内的两种病毒粒子及一种可疑颗粒,无论是形态的大小、囊膜微细结构和寄生部位,还是引起宿主的病变情况,均与李霞等报道的作为皱纹盘鲍“裂壳病”病原的一种囊膜上无纤突、大小为90~140 nm的球形病毒明显不同^[6]。

我们在病鲍肝及肠等消化器官中发为为数众多的细菌和病毒粒子,并根据病原回归感染试验结果(另文发表),可以推测病原有可能经口传染后入侵鲍体,以肝肠为靶器官,进而作用于整个鲍体。病原的入侵破坏了肝肠组织中的基底膜和结缔组织等保护结构,继而损伤细胞。病毒在细胞核内复制,干扰了宿主细胞核酸(DNA和RNA)的代谢,致使染色质异构,核仁消失,核膜囊壁化,细胞核遗传功能消失殆尽;内质网取代其它细胞器大量增生,线粒体肿胀,嵴破坏,细胞内出现一个或多个“封入体”,细菌和病毒“封入体”的周围常出现溶酶体(图版1-3)。当入侵的病原超过鲍本身的防御能力,就可能导致溶酶体功能紊乱,细胞无法区别自身的结构和异物而发生自溶现象,失去新陈代谢功能,进而导致整个组织的细胞溶解样及凝固样坏死,鲍因丧失了消化、免疫等机能,无法行使正常的生理功能而死亡。

电镜观察结果显示,有的病鲍肝肠组织细胞质内及细胞周围有多个病毒封入体,细胞结构仍基本存在。只有病毒入侵时,鲍体会渐渐出现一些病理变化,鲍生理功能紊乱,代谢受阻,对环境的适应力下降。但是,这种病理变化是较为缓慢的。而细菌总是分布在充满细胞碎片的细胞轮廓间隙中或成片坏死的肝肠组织中。细菌进入鲍体后,依靠其致病因子短期内大量繁殖、扩散,造成了肝肠等组织的广泛损伤,因此可以认为,带有病毒的九孔鲍因细菌的入侵而加剧了组织、细胞的病变,加速了病鲍的死亡。这与病毒和细菌共同入侵后引起甲壳动物出现严重细胞病变的情况类似^[11]。

参考文献:

- [1] 王军,苏永全,张蕉南,等. 1999年春季东山九孔鲍暴发性病害研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(5): 1-4.
- [2] 张明,李世英. 鲍的疾病与防治[J]. 中国水产, 1999, (1): 37-38.
- [3] Anguiano Beltran C, Searcy Bernal R, Lizarraga Partida M L, et al.. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on Larvae and postlarvae of the red abalone[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 33(2): 119-12.

- [4] Goggin C L, Lester R T G. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia[J]. Marine and Freshwater Research, 1995, 6(3): 639– 646.
- [5] Gardaner G R, Haaker J C, Togstad H A. Association of *Prokaryotes* with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 66(2): 111– 120.
- [6] 李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J]. 水产科学, 1998, 22(1): 61– 66.
- [7] 李太武, 相建海, 张健, 等. 皱纹盘鲍脓疱病的组织学和超微结构研究[J]. 动物学报, 1997, 43(3): 238– 242.
- [8] 张建红, 高学兴, 陈棣华, 等. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生[J]. 中国病毒学报, 1994, (4): 362~ 366.
- [9] 陈德蕙, 张贺秋, 王国华. 电镜在病毒感染诊断中的应用[J]. 电子显微学报, 1997, 16(5): 549– 568.
- [10] 李成, 刘树森, 王继科, 等. 畜禽病毒图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1984. 1– 21.
- [11] 陈细法, 吴定虎, 黄槐, 等. 对虾病毒病病毒和细菌合并工人的病理特点和诊断价值[J]. 病毒学报, 1997, 15(2): 146– 150.

Pathogeny and Histopathology of the Epidemic Disease in *Haliotis diversicolor supertexta*

ZHANG Zhao-xia, WANG Jun, SU Yong-quan, YAN Qing-pi,
CHI Xin-cai, ZHOU Hua-min, ZHOU Yong-can

(Dept. of Ocean. & Inst. of Sub. Ocean., Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: An epidemic of cultured *Haliotis diversicolor supertexta* was broken out in Dongshan, Fujian province during spring in 1999. Symptoms of the diseased abalones appeared mucus increasing, liver enlarging and activities descending. TEM-observation showed that the main pathogens of the ill abalones were bacteria and virus. There were three forms of viruses with the spheric type, 135~ 150 nm, 95~ 110 nm and 40~ 45 nm. Bacteria were of vibrio morphology. Cells in liver and intestines of the ill abalones turned up pathologic changes. The nucleus was deformed and its membrane was damaged, accompanied with those mitochondria expanding. Although there were several particular protein structures containing viruses, the cell structures around them were approximately normal. Conversely, a large number of cells were so necrosis that their cell membranes were left because of bacterial invading. Besides these, endoplasmic reticulums of liver cells were of proliferation. Based on the results, it is the bacteria and viruses that resulted in this epidemic of *H. diversicolor supertexta*, and adverse environment and abusing drugs as well.

Measures such as keeping good cultural environment, segregating pathogens and feeding slightly diseased abalones on some suitable drugs were effective to prevent and cure epidemics of the cultured abalones.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; pathogen; pathology

图 版 说 明

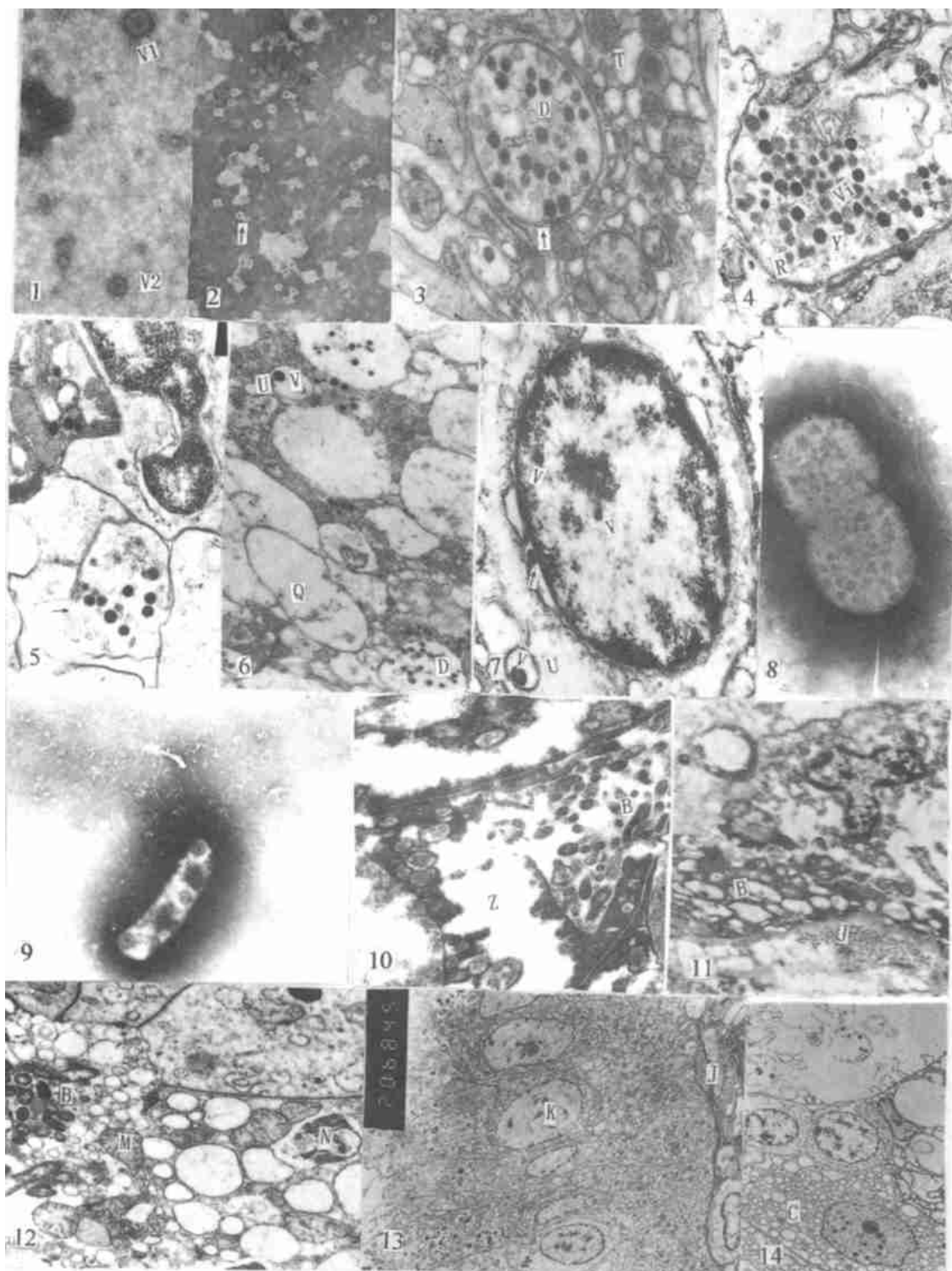
图版

图 1: 135 ~ 150 nm 的球形病毒(V1), 示囊膜上有纤突; 95 ~ 110 nm 球形病毒(V2), 囊膜光滑无纤突(× 27,000); 图 2: 40 ~ 45 nm、基本结构包括核心和外膜的可疑颗粒() (× 40,000); 图 3: 病毒成群出现在一种具有双层膜() 的泡状结构(D), 周围经常可观察到颜色较深的嗜锇酸小体(T) (× 20,000); 图 4: 泡状结构内有許多裸露的核衣壳(Y)、空的囊膜(R) 和刚组装完的病毒粒子(V_i) (× 14,000); 图 5: 随着泡状结构的破裂(), 病毒逸出(× 14,000); 图 6: 病毒(V) 通过内质网小池(U) 获得囊膜, 肠上皮层只余大小不一的空腔(Q) 和泡状结构(D) (× 10,000); 图 7: 复制后的病毒从核周腔排出核外(), 在内质网小池(U) 获得囊膜(× 14,000); 图 8: 短杆状细菌, 端生单鞭毛, 该细菌正处于二分裂状态(× 20,000); 图 9: 弧状细菌病原, 端生单鞭毛(× 10,000); 图 10 细菌(B) 集中于细胞间隙(Z) (× 20,000); 图 11: 细菌(B) 突破基底膜(J), 聚集于基底膜, 有的细菌已进入上皮细胞(× 8,000); 图 12: 肠细胞的碎片中存在不少细菌(B), 核变形(N), 线粒体肿大(M), 细胞中空泡化严重(P) (× 8,000); 图 13: 正常的肠上皮细胞排列整齐、紧密, 核仁明显(K), 细胞质充盈, 基底膜(J) 完好无损(× 2,000); 图 14: 受侵染的肠上皮细胞排列松散, 大小和方向各异, 但未被侵染的细胞(C) 结构完好(× 2,000).

图版

图 15: 肠细胞核膜肿胀成囊状(), 有的细胞只余细胞轮廓(G), 细胞间充满了粗面型内质网(W) 等细胞器(× 2,000); 图 16: 正常肝组织细胞大小不一, 排列紧密, 细胞核膜完整, 核仁明显, 细胞器均匀地分布在细胞质中(× 2,000); 图 17: 病鲍的肝组织细胞固缩, 细胞间隙增大(Z), 细胞成片坏死, 只余下一片空白(P) (× 2,000); 图 18: 病鲍的肝组织一半坏死, 另一半结构完整(× 2,000); 图 19: 肝组织只见大量的病毒粒子(V) 和滑面型内质网小池(U) (× 14,000); 图 20: 肝细胞的细胞膜肿胀(), 核严重变形(N), 有些区域只剩细胞碎片(S) (× 5,000); 图 21: 有的肝细胞线粒体水肿, 嵴受损(M), 粗面型内质网(W) 大量增生(× 10,000); 图 22: 一些肝细胞核质均被破坏, 只余下空泡(P)、病毒泡状结构(D) 和许多的滑面型内质网小池(U) (× 10,000); 图 23: 结缔组织细胞间隙中存在病毒的泡状结构(D), 核变形(N), 核着色深, 线粒体受损, 细胞质空泡化(P) (× 10,000); 图 24: 大片结缔组织细胞碎片, 细胞器和胶原颗粒() 的杂乱排列中有不少细菌(B) (× 5,000); 图 25: 细菌(B) 和病毒(V) 分处于基底膜(J) 的两边, (× 8,000); 图 26: 细菌(B) 和病毒(V) 存在于肝组织中具有吞噬异物功能的血细胞(X) 周围(× 10,000); 图 27: 细胞内细胞器尚未解体的肝及肠组织中的一些区域发现细菌(B) 和病毒(V) (× 10,000); 图 28: 存在多个病毒泡状结构(D) 的区域, 细胞基本结构仍存在(× 4,000).

图版



图版

