

皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究

李 霞 王 斌 刘淑范
(大连水产学院养殖系, 116023)

刘明清 王 琦
(大连碧龙海珍品有限公司, 116044)

摘 要 1994~1996 年对大连地区患“裂壳病”的养殖鲍苗种进行光镜和电镜观察。通过观察和人工感染实验证实,该病的病原为一种大小 90~140nm 的球状病毒,该病毒主要侵染血细胞。病症为鲍壳薄,壳缘外翻,壳孔相互串连,摄食力降低,生长缓慢,逐渐死亡。并观察了外套膜、足、鳃、肝脏、嗦囊等主要器官的组织病理变化。

关键词 皱纹盘鲍,“裂壳病”,球状病毒,组织病理

关于贝类病毒病,国内外曾有一些研究。Farley 和 Banfield [1972]、Elston [1979]、Meyers [1979] 先后观察到存在于太平洋牡蛎和美国牡蛎的一种似疱疹病毒和呼肠孤病毒; Oprandy 等 [1981] 和 Lo 等 [1988] 分别在 *Mya arenaria* 和 *Meretrix lusoria* 发现病毒粒子,并研究其造成的危害。邵建忠等 [1995] 曾做过三角帆蚌瘟病的病原及组织病理研究。本文对存在于皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannii*) 体内的直径为 90~140 nm 的球状病毒以及由其引起的组织病理变化进行了研究。

1 材料与方 法

自然发病鲍取自大连市养殖场,健康鲍取自大连碧龙海珍品有限公司。

人工感染方法:①将带毒活鲍苗(1~1.5cm)去壳后在匀浆器中匀浆,制成组织液,喷洒在人工饵料上,投喂健康鲍。组织液喷洒量为 0.28g/g 饵料,投喂量 2~3g/日。②将健康鲍与带毒病鲍按 1:5 量混养。③对照组喂以人工配合饵料。试验期间,饲育温度为 17~20℃,日流量 800%~1 000%。

组织切片:取材部位为外套膜、鳃、足、肝、嗦囊、胃肠。样品用 Bouin 氏液固定,石蜡切片,H.E 染色。

电镜样品制作:①超薄切片:将外套膜、足、鳃、肝、嗦囊切成 1cm³ 小块,3%戊二醛预固定,1% 锇酸后固定,Epon 812 包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。②负染样品:鲍苗去壳后,所有内脏经匀浆器匀浆,卵及幼虫经振荡器打碎后,以 8 000 r/min 离心 15min,pH7.2 磷钨酸染色。

2 结 果

2.1 人工感染实验

人工感染实验共进行两次,时间分别于 1996 年 1 月 4 日~2 月 14 日,3 月 7 日~6 月 4 日,采用投喂含病鲍组织液的饵料和与病鲍混养两种方式(表 1 和表 2)。结果表明,在经 40 d 和

89 d 的投喂感染实验中,有 50% 鲍死亡,其它鲍摄食量和活动能力均有降低,电镜下抽样检查存活的实验组 7 枚鲍,都可检出病毒粒子。病鲍主要表现为摄食量下降,对光反应不敏感,白天不爬到波纹板下,壳变薄,色淡,壳孔相互连串,壳外缘上翻,生长速度明显减慢,足瘦,色黄,失去韧性,表面有大量粘稠状物质。

表 1 投喂方法人工感染实验结果

Tab. 1 The result of artificially infected experiments after feeding diseased abalone tissue

次别	组别	天数 (d)	实验数 (个)	存活数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)
1	实验组	40	18	9	9	50
	对照组	40	18	18	0	0
2	实验组	89	10	5	5	50
	对照组	89	10	9	1	11

表 2 混养方法人工感染实验结果

Tab. 2 The result of artificially infected experiments by mixed culture

次别	组别	天数 (d)	混养病鲍数 (个)	实验数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)
1	实验组	40	50	10	0	0
	对照组	40	0	10	0	0
2	实验组	75	50	10	0	0
	对照组	75	0	10	1	10*

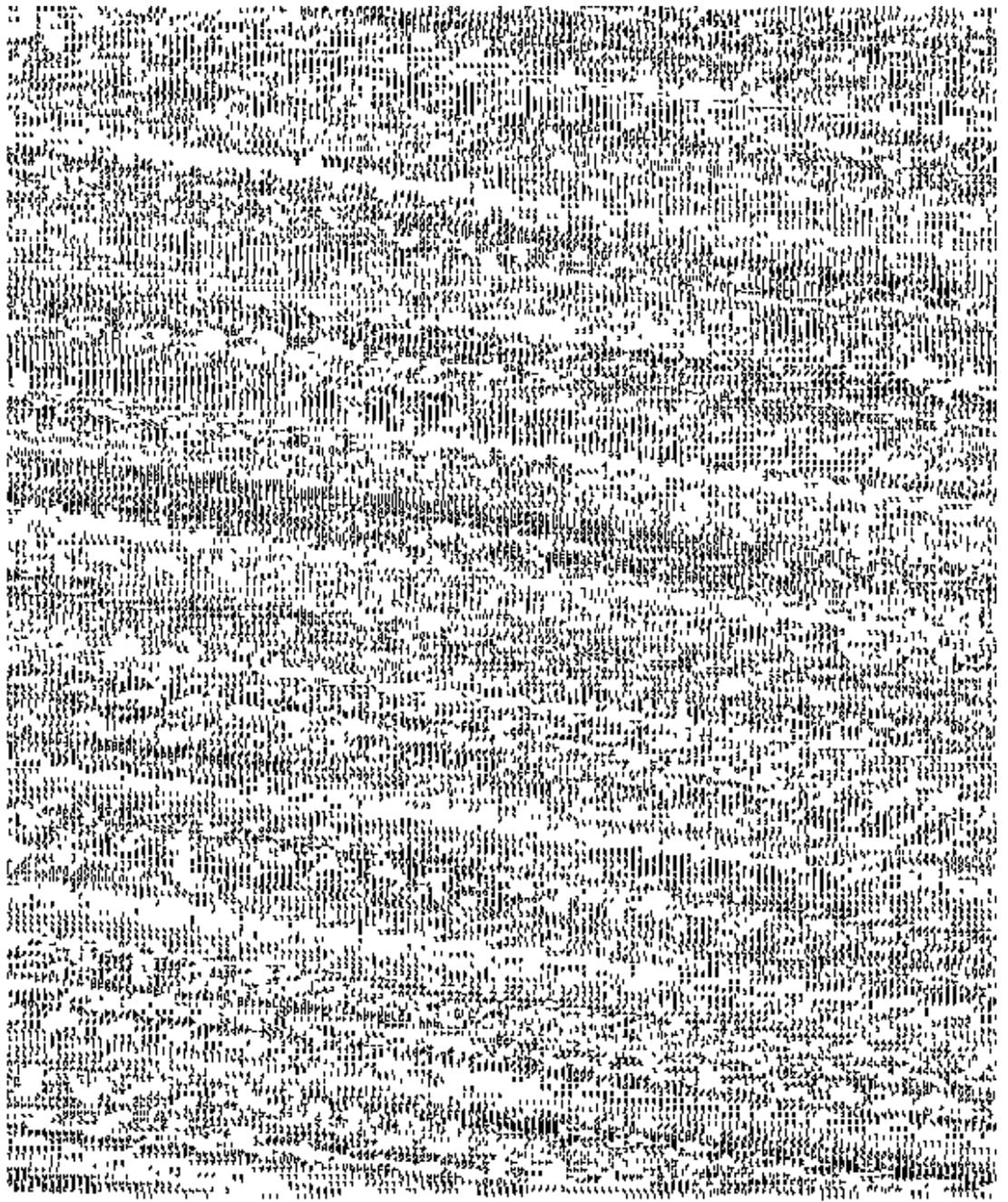
* 负染方法检测不带毒

2.2 病毒形态

2 年中,采用超薄和负染方法共检测自然发病鲍样 30 个。负染观察结果是病毒大小为 90 ~ 140nm,球形,囊膜内还有一层内膜包围着核衣壳(图版 I -1)。超薄切片中病毒粒子由二部分组成,最外为双层囊膜,全封闭,表面光滑,无纤突存在,厚约 8 ~ 10nm,核衣壳直径: 70 ~ 100nm(图版 I -2)。这些病毒单个存在于发生基质中。发生基质位于血细胞质中,由中等电子密度细颗粒聚集而成,外有双层膜包被,形成“封入体”[张建红和高学兴 1995],在发生基质中有许多空套膜和刚组装完的病毒粒子。经常可见“封入体”一侧破裂,病毒粒子从破口处逸出(图版 I -3)。

2.3 病变器官的显微结构观察

系统观察了外套膜、足、鳃、肝、嗦囊及胃、肠 7 个主要器官的组织病理变化得知,其共同特点是结缔组织排列零散,部分血细胞坏死,没有发现包涵体,上皮细胞的变化也以坏死为主。足上皮由色素细胞、柱状细胞组成,病变情况下,表皮细胞排列散乱,脱离基底膜,细胞坏死,肌纤维断裂,神经纤维外围细胞和血窦中细胞均有坏死现象(图版 I -4)。肝由许多肝小管组成,外覆结缔组织被膜,病变情况下,肝小管破裂,结缔组织纤维变得稀疏,断裂,肝组织广泛受损,血细胞有固缩现象(图版 I -5)。外套膜表皮由分泌细胞、感觉细胞和柱状细胞组成。病变情况下,细胞排列零乱,高度变矮,核固缩(图版 I -6)。分泌细胞数量减少,血细胞变性,没有发现“聚合体”[李霞 1992](图版 I -7)。鳃丝由鳃上皮、血管及支持结构组成,病鲍鳃上皮变矮甚至脱落,血窦中时常能发现坏死血细胞(图版 I -8)。嗦囊位于消化腺腹面,囊壁为单层柱状上皮,肌肉层较厚,囊腔可见食物残片。病变情况下上皮变矮,排列不整齐,甚至局部脱离基底膜,结缔组织暴露出来(图版 I -9)。胃、肠组织尚未发现明显病变。



图版I Plate I

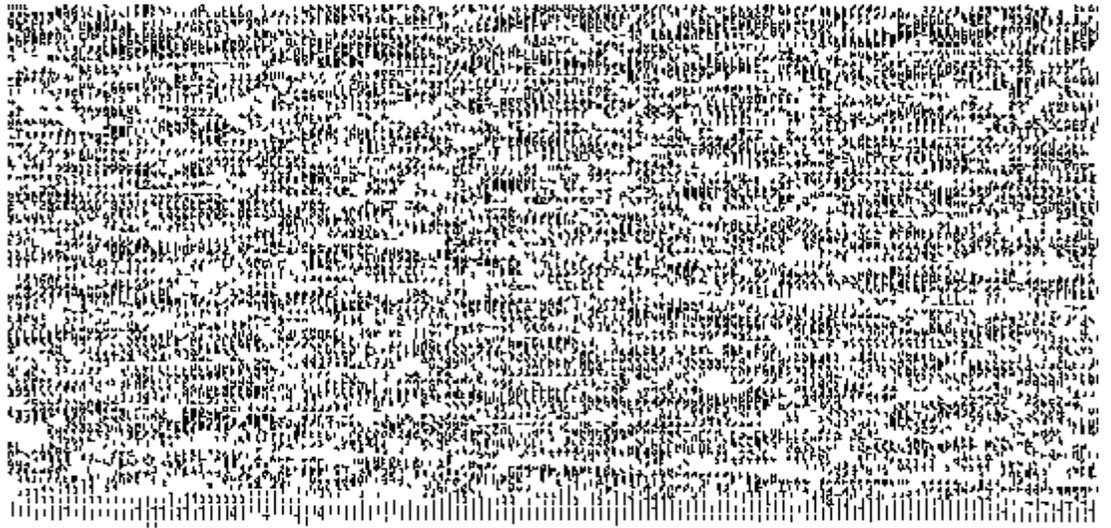
- 1. 球状病毒负染照片。×60 000; 2. 球状病毒超薄切片, 双层囊膜▲ 病毒发生基质 M。×60 000; 3. 封入体内的球状病毒, 有些已逸出。×50 000; 4. 包围足神经纤维的细胞坏死▲。×200; 5. 肝小管破裂, 肝脏大面积坏死 N。×200;
- 6. 外套膜表皮细胞固缩▲。×200; 7. 外套膜结缔组织紊乱, 血细胞变性▲。×200; 8. 鳃上皮细胞坏死, 脱落▲。×400;
- 9. 嗅囊上皮细胞脱离基底膜 基膜 B, 腔中食物残屑 F。×200

2.4 主要病变器官超微结构观察

将足、外套膜、肝、嗦囊、鳃作超薄切片观察,在上皮细胞中均没有发现病毒粒子,而在上述所有器官松散的组织间隙和血窦中的血细胞质内都见到过相当数量的球状病毒粒子。

足部肌原纤维断裂,横纹模糊,部分线粒体膨大,嵴消失,糖元粒等极其少见(图版II-1)。

肝细胞核膜溶解,线粒体外膜和嵴解体,尚存的痕迹还依稀可辨。内质网、溶酶体等细胞器显著减少,由于这些细胞器解体,细胞质中出现大片空白区(图II-2)。外套膜上皮细胞界限不清,表面纤毛脱落或排列不整齐,高尔基体、线粒体等细胞器数量显著减少(图版II-3)。嗦囊上皮细胞高度变矮,细胞器很少见,细胞内只有空泡状结构(图版II-4)。囊壁肌纤维间存在许多含病毒粒子的“封入体”(图版II-5)。鳃上皮细胞界限消失,游离面纤毛零乱,细胞器解体(图版II-6)。



图版II Plate II

1. 足部断裂肌纤维 F 和结构不完整线粒体 M. $\times 5000$; 2. 肝细胞肿胀线粒体 M, 嵴消失. $\times 10000$; 3. 外套膜上皮细胞纤毛脱落 C, 细胞器解体, 部分核固缩 N. $\times 5000$; 4. 细胞器均消失的嗦囊上皮细胞. $\times 5000$; 5. 嗦囊壁肌纤维间的血窦中游离“封入体” V. $\times 50000$; 6. 坏死的鳃上皮细胞 细胞质呈空泡状. $\times 10000$

2.5 卵及幼虫负染色检测

将鲍卵、担轮幼虫及面盘幼虫破碎并离心处理后,负染色在电镜下观察,尚未发现病毒粒子。

3 讨论

3.1 “裂壳病”的病原

从自然发病和人工感染皱纹盘鲍看,其典型病症为生长缓慢,壳薄,壳孔不愈合,壳缘外翻,以至逐渐死亡,据此,作者认为可将此病暂定名为“裂壳病”。鲍的病毒病研究,国内外所做

工作较少。中津川俊雄[1990]报道的日本养殖鲍所患一种病症同我们报道的相似,人工感染30d后死亡,但尚未观察到病原,只是推测其为病毒所致。本实验从自然发病鲍中发现大小为90~140nm的球状病毒粒子,后经人工感染实验和病理观察,发现实验鲍症状和病理变化同自然发病鲍,电镜下可检出相同的病毒粒子。该病的病原为球状病毒已无疑。

3.2 组织结构的病变,影响器官的功能

电镜下发现病毒主要侵入血细胞。Sandra[1991]报道扇贝3种类型血细胞并提出血细胞的5种生理机能即创伤修复、壳修复、营养运输、排泄和内部防御。鲍血细胞形态同扇贝相似。光镜下,外套膜、足、鳃等器官的病理变化主要为上皮细胞坏死,但在这些细胞的超薄切片中均没有发现病毒粒子。作者认为这是由于存在于血细胞中的病毒粒子破坏了血细胞功能,而造成上述器官贫血,其细胞发生坏死样病变,功能丧失。足部肌纤维断裂,表皮细胞脱落,神经细胞形态改变,造成鲍运动能力减弱,敏感性降低;肝脏分泌消化酶和代谢能力减弱,嗦囊组织结构被破坏,从而影响其摄食,以至日趋消瘦;外套膜主要功能是感觉和分泌贝壳,其结构的变化直接影响贝壳形态,造成壳薄、壳孔相互连串。

3.3 病毒感染途径的讨论

一般认为病毒传播途径为由母体带来的垂直传播和个体之间水平传播两种。本实验说明鲍球状病毒垂直传播途径是不存在的,而水平传播的最大可能性是经口进入体内。作者跟踪观察了卵、无节幼虫和面盘幼虫,结果三者均不带毒,这可能是由于担轮和面盘幼虫不摄食,从而阻断病毒从口进入的途径。感染实验也证实这一点。将病鲍组织匀浆液喷洒在人工饵料上投喂健康鲍,可使健康鲍患病、死亡,而将健康鲍与患病鲍混养,健康鲍未得病,说明鲍体之间接触不感染。病理切片中发观嗦囊上皮细胞坏死和脱落现象严重,结缔组织直接暴露出来,与嗦囊中食物接触,病毒可由此进入结缔组织中,并侵染了血细胞,随血液循环传遍全身。生产中由于放苗密度较大,死鲍苗没有及时清除,鲍可蚕食死亡鲍苗,通过此途径,病毒得以传播开来。至于可做为鲍饵料的其他生物带毒情况还需进一步研究。

3.4 病毒形态及致病性

目前已有报道的贝类球状病毒有似疱疹病毒和呼肠孤病毒[Farly和Banfield 1972, Meyers 1979]前者存在于胞核内并有包涵体,而后者无囊膜且大小在60~80nm,皱纹盘鲍病毒是在血细胞质中装配的球状病毒粒子,具双层囊膜,无包涵体,该病毒形态及致病性为国内外首次报道,其基本特征如核酸类型、病毒蛋白的结构多肽以及其分类地位尚需进一步研究。

陈棟华[1994]报道存在于中国对虾体内,大小为80nm的一种球状病毒,并认为该病毒导致对虾生长缓慢,体弱即所谓“老头虾”。在鲍体内存在的这种病毒致病性与其相似,但与一些杆状病毒引起的暴发性疾病明显不同[陈细法等1995,战文斌和俞开康1995],表现为病程长,死亡不形成明显高峰,人工感染实验也证实这一点。另外该病毒不形成包涵体,细胞病理变化也以坏死为主,在光镜下尚未发现有明显病变时,电镜下已能检出病毒粒子,所以不宜以病理变化做诊断,血清学诊断方法将是今后研究的主要内容。

参 考 文 献

- 李霞, 刘淑范, 王琦. 1993. 皱纹盘鲍外套膜组织学研究. 大连水产学院学报, 7(4): 43~48.
- 邵健忠, 项黎新, 李亚南. 1995. 三角帆蚌瘟病的组织病理研究. 水产学报, 19(1): 1~7.
- 陈棣华. 1994. 中国对虾一种球状病毒的分离、提纯与检测. 中国病毒学报, 9(2): 170~173.
- 陈细发, 吴立虎, 黄槐. 1995. 斑节对虾杆状病毒的超微结构. 水产学报, 19(3): 203~209.
- 刘文斌, 俞开康. 1995. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒病的研究. 中国水产科学, 2(3): 22~28.
- 张建红, 高学兴. 1994. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生. 中国病毒学报, 9(4): 362~366.
- 中津川俊雄. 1990. 鲍肌肉萎缩症的病理研究. 鱼病研究, 25(4): 207~212.
- Ekton R. 1979. Viruslike particles associated with lesions in larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*). J Invert Path, 33: 71~74.
- Farley C A, Banfield W G. 1972. Oyster herpes-type virus. Science, 178: 759~760.
- Lo C F, Hong Y W, Huang S Y, et al. 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of calm *Meretrix lusoria*. fish Path, 38: 45~51.
- Meyers T R. 1979. A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). J Gen virol, 43: 203~212.
- Oprandy J J, Chang P W, Pronovost A D, et al. 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. J Invert Path, 38: 45~51.
- Sandra E S. 1991. Developments in aquaculture and fisheries science, 21. Scallops: biology, ecology and aquaculture. 164~171.

STUDIES ON PATHOGENY AND HISTOPATHOLOGY OF “CRACK SHELL DISEASE” OF *HALIOTIS DISCUS HANNI*

LI Xia, WANG Bin, LIU Shu-Fan

(Department of Aquaculture, Dalian Fisheries College, 116023)

LIU Ming-Qing, WANG Qi

(Dalian Bilong Seafood Co. Ltd., 116044)

ABSTRACT This paper reported the observation about “crack shell disease” of cultural abalone baby by microscope and electronic microscope. The symptoms are as follows: the shell is thin, the edge is turndowning, the hole is linking, the absorbing abilities decrease, and the growing rate is much low. The pathogen is a kind of spherical virion which was determined by observation and artificially infected experiment. The virion mainly invaded the blood cells. This studies also observed the histopathological changes of mantle, feet, gill, liver and crop and pointed out the infection-like change appeared in epidermis and connective tissue cells of main organ and the ultrastructure changes is the mitochondrion expansion, the ridge disappearing, and the endoplasm disintegrating. The necrosis of digestive respire and move organs accelerated the death of the abalone. The infecting channel is horizontal. Meanwhile the pathogenic characters were discussed.

KEYWORDS *Haliotis discus hannii*, “crack shell disease”, Spherical virion, Histopathological changes