

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

徐晓津^{1,2}, 徐斌², 王军², 苏永全^{2*}, 张之文², 陈心²

(1.集美大学水产学院,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021;

2.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:从患病大黄鱼病灶中分离出病原哈维氏弧菌,并人工回接感染大黄鱼,病鱼出现典型的皮肤溃疡症。测定大黄鱼血液各项指标发现,病鱼单核细胞、嗜中性粒细胞、血栓细胞百分率明显下降,而淋巴细胞百分率增加,均呈极显著差异($P < 0.01$)。患病大黄鱼总蛋白为 (12.8 ± 3.95) g/L,对照组为 (19.4 ± 4.33) g/L,病鱼球蛋白、甘油三脂、血糖含量也明显低于对照组($P < 0.01$)。然而病鱼谷丙转氨酶为 (37 ± 5.11) IU/L,对照组为 (28 ± 5.54) IU/L;病鱼谷草转氨酶为 (164 ± 47.19) IU/L,对照组为 (117 ± 21.84) IU/L,均呈极显著差异($P < 0.01$)。研究结果说明,病鱼肝脏和肾脏组织受损。对患病大黄鱼进行病理组织学观察,结果发现病鱼病变组织头肾、肝出现不同程度的变性以及坏死。细胞超微病变观察发现,头肾肾小管上皮细胞变性、坏死。肝细胞胞浆内脂滴积累多。血清指标的测定可以作为大黄鱼哈维氏弧菌细菌感染感染的指标。

关键词:大黄鱼;哈维氏弧菌;血液生化指标;组织病理

中图分类号:Q 592.1; S 941.42

文献标识码:A

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)是我国传统的海水经济鱼类之一。近年来,大黄鱼养殖业在福建、浙江、广东等沿海地区迅速发展。但随着养殖规模的扩大,各种传染性病害日益频繁地发生,尤其是哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)病,严重威胁着大黄鱼养殖业的健康发展。国内外学者对哈维氏弧菌的分离、鉴定做了较多研究^[1-4],对人类和牲畜感染细菌后血液有形成分及生化指标的测定和研究也取得许多成果。而有关鱼类的血液学测定在国内仅有少量报道^[5-7],对细菌感染大黄鱼鱼体后的血液学研究更未见报道。本试验对大黄鱼外周血相、血清中总蛋白、球蛋白、甘油三脂、血糖、谷丙转氨酶含量进行了测定,并研究了腹腔注射哈维氏弧菌后,大黄鱼病鱼血液各种细胞及血清生化指标的变化,以期对大黄鱼的免疫防御机制有更为深入的认识,并为鱼哈维氏

弧菌病的病因、诊断和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 哈维氏弧菌

分离自患病大黄鱼,并经回归感染证明具有较强毒力,经生化鉴定及16S rRNA序列的测定,确定该菌为哈维氏弧菌^[8],保存于本实验室-80℃超低温冰箱。

1.2 人工感染试验及取样

在福建宁德海星育苗场,取体重约350~450g的健康大黄鱼200尾,分2组暂养于养殖池,每组100尾。每天换水1次,投饵2次,水温24~25℃,暂养1周无异常后开始实验。试验菌株接种至2% NaCl的LB琼脂培养基,27℃培养1d,用0.85%的无菌生理盐水稀释至 8×10^7 CFU/mL备用。将实验组鱼麻醉后,每尾通过腹腔注射上

收稿日期:2009-10-22 修回日期:2009-12-17

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A405);国家自然科学基金项目(40976096);福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室(集美大学)基金;集美大学博士启动金资助项目

通讯作者:苏永全,E-mail:yqsu@xmu.edu.cn

述菌悬液 0.2 mL,将对照组鱼麻醉后,每尾注射 0.2 mL 灭菌生理盐水。取有典型病症和对照组鱼无病症样品,进行血液各细胞及血清生化各项指标测定。

1.3 血液生理指标测定

大黄鱼注射病原菌 3 d 后,分别取 10 尾健康鱼与 10 尾有典型症状的病鱼,尾静脉取血,每尾鱼取 2 mL 血液与 0.5 mL 3.8% 的柠檬酸钠抗凝保存。每次检测 1 尾鱼的样品。

红细胞(erythrocyte blood cell, RBC)计数

将少量抗凝血用红细胞稀释液(0.089% 的 NaCl)稀释 200 倍,取 1 滴用 Neubauer 计数板在显微镜下统计红细胞数目,将结果换算为每毫升血液中所含红细胞总数。

白细胞(white blood cell, WBC)计数

同样取少量抗凝血用醋酸龙胆紫稀释液(2% 冰醋酸+1% 龙胆紫)稀 20 倍,取 1 滴在 Neubauer 计数板在显微镜下计数、换算。

白细胞分类计数(differential leucocyte count, DLC)值测定 按林光华等^[9-10]方法对淋巴细胞、粒细胞和单核细胞进行分类、计数和统计。试验组与对照组各取 10 尾鱼,每尾鱼制作 3 个血涂片,用 Wright 氏染液染色血液涂片,每片在油镜下观察的 200 个白细胞中数某种白细胞所占的百分率,并记录。

1.4 血清的制备及各项生化指标的测定

血清的制备及保存 分别从健康鱼与病鱼尾静脉用注射器取血,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,冰箱 4 ℃ 保存,供生化检测。

血清生化指标的测定 用全自动生化分析仪 Beckman Lx20 检测健康大黄鱼与患病大黄鱼血清总蛋白(total protein, TP)、球蛋白(globulin, GLB)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TRIG)、血糖(blood glucose, GLU)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、钾(K)、钠(Na)、氯(Cl)、钙(Ca)、磷(P)等生化指标值。

1.5 数据处理

全部数据用 SPSS 13.0 软件处理。

1.6 病理组织切片的制作及观察

光镜组织标本制作、观察 分别取对照组

和有典型病症大黄鱼的头肾和肝组织,用 Bouin 氏液固定,石蜡包埋。通过 Leica RM2128 型切片机横、纵向连续切片(厚 3 ~ 5 μm),于 Leica AUTOSTAINER XL 染色机中进行 H. E 染色,中性树胶封片。Leica DM 4500B 自动数码显微摄影系统观察、摄影。

电镜组织标本制作、观察 同样取健康鱼与病鱼的头肾、肝,以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,环氧树脂包埋,切片后醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,TEM 100CX II 电镜观察并摄影。

2 结果

2.1 临床症状

通过腹腔注射上述菌悬液实验的 100 尾鱼,第 1 天,有 8 尾鱼体表出现皮肤溃烂,死亡 2 尾。第 2 天,有 15 尾鱼出现以上病症。第 3 天,全部大黄鱼出现不同程度的溃烂,80% 以上的大黄鱼病症较严重:体表发白,游动迟缓,经常浮出水面离群独游,体表多处皮肤溃烂,伤口周围鳞片松散脱落,胸、腹部有弥散性出血,尾鳍基部充血,尾部严重溃烂(图 1),解剖病鱼,肝脏发白、糜烂。死亡 20 尾鱼。而对照组鱼无病症。在第 3 天将病鱼取样研究。



图 1 大黄鱼感染哈维氏弧菌后示皮肤溃烂(↖)

Fig. 1 Typical external signs of *P. crocea* challenged with *V. harveyi* showing the skin ulcer(↖)

2.2 哈维氏弧菌对大黄鱼外周血血细胞数量的影响

病鱼每毫升红细胞数为 $(8.94 \pm 2.82) \times 10^5$ 个,对照组为 $(10.81 \pm 4.04) \times 10^5$ 个(表 1)。经 *t* 检验,没有统计学差异。病鱼每毫升白细胞数为 $(4.57 \pm 0.28) \times 10^4$ 个,对照组为 $(3.91 \pm 0.72) \times 10^4$ 个。但病鱼淋巴细胞占白细胞 $(55.02 \pm 12.24)\%$,极显著大于健康鱼的 $24.10\% \pm 19.86\%$,但病鱼单核细胞、嗜中性粒细胞、血栓细胞百分率极显著下降($P < 0.01$),分别为 $13.4\% \pm 10.94\%$ 、 $11.82\% \pm 4.39\%$ 、 $19.78\% \pm$

2.11%, 对照组鱼分别为 26.5% ± 3.64%、15.12% ± 11.15%、34.30% ± 19.32%。

2.3 哈维氏弧菌对大黄鱼血清生化指标的影响

病鱼总蛋白、球蛋白、甘油三脂、血糖含量极显著下降 ($P < 0.01$)。病鱼谷丙转氨酶、谷草转

氨酶、K、Cl 含量升高, 差异极显著 ($P < 0.01$)。与健康鱼相比, 病鱼总胆固醇含量下降, 钙含量增加, 差异显著 ($P < 0.05$)。病鱼的乳酸脱氢酶、钠含量、磷含量变化不明显, 没有统计学差异 (表 2)。

表 1 注射生理盐水或哈维氏弧菌后大黄鱼外周血细胞数量变化
Tab.1 The variation of hematocyte numbers in peripheral blood of *P. crocea* after being injected with saline solution or *V. harveyi*

测定项目 measurement	健康鱼 healthy fish	病鱼 challenged fish	<i>P</i>
红细胞数 (10^3 ind/mL) erythrocyte count	10.81 ± 4.04	8.94 ± 2.82	差异不显著 no significance
白细胞数 (10^4 ind/mL) leukocyte count	3.91 ± 0.72	4.57 ± 0.28	
单核细胞 monocyte count	26.5 ± 3.64	13.4 ± 10.94	$P < 0.01$
淋巴细胞 lymphocyte count	24.10 ± 19.86	55.02 ± 12.24	$P < 0.01$
嗜中性粒细胞 neutrophilic granulocyte count	15.12 ± 11.15	11.82 ± 4.39	$P < 0.01$
血栓细胞 thrombocyte count	34.30 ± 19.32	19.78 ± 2.11	$P < 0.01$

表 2 大黄鱼对照组、哈维氏弧菌人工感染组血清中生化指标含量

Tab.2 Mean serum chemistry values for *P. crocea* collected from the controlled group and the challenged group
mean ± SD

测定项目 measurement	对照 healthy fish	病鱼组 challenged fish	<i>P</i>
总蛋白 (g/L) total protein	49.42 ± 4.33	42.81 ± 3.95	$P < 0.01$
球蛋白 (g/L) globulin	29.01 ± 0.91	23.12 ± 1.16	$P < 0.01$
谷丙转氨酶 (IU/L) alanine aminotransferase	28.09 ± 5.54	37.23 ± 5.11	$P < 0.01$
谷草转氨酶 (IU/L) aspartate aminotransferase	117.34 ± 21.84	164.23 ± 47.19	$P < 0.01$
总胆固醇 (mmol/L) total cholesterol	3.87 ± 3.49	2.19 ± 10.96	$P < 0.01$
甘油三脂 (mmol/L) triglyceride	5.42 ± 3.32	2.85 ± 0.91	$P < 0.01$
血糖 (mmol/L) blood glucose	4.81 ± 1.01	2.72 ± 0.98	$P < 0.01$
乳酸脱氢酶 (IU/L) lactate dehydrogenase	566.21 ± 101.23	575.12 ± 271.17	差异不显著 no significance
钾 (mmol/L) K	5.59 ± 0.45	7.42 ± 1.24	$P < 0.01$
钠 (mmol/L) Na	160.13 ± 16.52	155.35 ± 5.75	差异不显著 no significance
氯 (mmol/L) Cl	139.15 ± 17.13	152 ± 7.98	$P < 0.01$
钙 (mmol/L) Ca	2.32 ± 0.18	2.77 ± 0.27	$P < 0.01$
磷 (mmol/L) P	3.82 ± 0.76	4.04 ± 0.35	差异不显著 no significance

2.4 头肾、肝的显微及超微组织病理变化

头肾 大黄鱼肾脏由头肾和中肾组成, 头肾为淋巴样组织, 头肾无被膜, 外周仅有一层胶原纤维包裹。头肾实质中无肾单位, 属于网状淋巴组织。主要由网状细胞、淋巴细胞、颗粒细胞、单核细胞等组成, 有丰富的血窦。健康大黄鱼头肾各细胞结构正常 (图版-1)。感染哈维氏弧菌后, 大黄鱼头肾组织出现较多空泡。肾小管上皮细胞

排列紊乱, 细胞质内出现空泡, 细胞间隙不清, 细胞溶解, 胞核裂解。严重者肾小管上皮细胞脱落、坏死, 只留下肾小管轮廓 (图版-2)。

健康大黄鱼头肾超微结构中各细胞的细胞核、核质、核膜及线粒体等细胞器结构清晰 (图版-3)。患病大黄鱼头肾细胞的胞质小泡及内部胞器减少, 细胞质空泡化, 小型颗粒异常增多。核异质化降低, 核质少 (图版-4)。

肝脏 健康大黄鱼肝脏显微结构中细胞形状较规则,具有球形并带有核仁的细胞核,细胞核基本位于细胞的中间,脂肪滴小,各细胞结构保持正常形态(图版-5)。患病大黄鱼一部分肝细胞萎缩,许多肝细胞实质结构遭到明显破坏,呈现空泡化,随着病程的发展,肝细胞解体形成局灶性坏死(图版-6)。

健康大黄鱼肝脏超微结构中各细胞器结构清晰,细胞结构保持正常形态(图版-7)。病鱼肝细胞内脂滴增多,严重者细胞浆内有许多大小不等的脂滴,脂滴大面多,同时有融合现象(图版-8)。

3 讨论

3.1 哈维氏弧菌对大黄鱼的致病性

哈维氏弧菌(*V. harveyi*)为短杆状革兰氏阴性条件致病菌^[11-12],已逐渐成为水产动物,包括无脊椎动物(如虾)和脊椎动物(如鱼)养殖的一大杀手^[3,13],给我国尖吻鲈(*Lates calcarifer* Bloch)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)等海水鱼类带来严重的损失^[3-4,12,14]。本实验所用哈维氏弧菌分离自患病大黄鱼,确定菌株为弧菌属的哈维氏弧菌^[8],并经回归感染证明其对大黄鱼有毒力,人工感染大黄鱼体表病症与文献报道的其它海水鱼哈维氏弧菌的病症相近^[3],表明实验所用菌株能引起大黄鱼哈维氏弧菌病。

3.2 哈维氏弧菌对大黄鱼外周血细胞数量的影响

国内外学者对鱼类血液学的研究做了许多工作,大量的研究资料表明,鱼类患病会引起血液组成及含量发生变化^[15-17]。其中红细胞作为鱼类免疫细胞的一种,红细胞的表面拥有大量的补体片段(C_{3b})受体,它们能够介导病原菌与红细胞之间的结合,促进吞噬细胞对病原菌的清除。在本试验中发现,患病大黄鱼红细胞数比健康大黄鱼低,天然感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)或者注射分歧杆菌的罗非鱼^[16],都观察到红细胞数量的下降,与本研究结果相似。另外红细胞具有运输氧的功能,也说明大黄鱼病鱼红细胞下降,贫血,体内供氧不足,代谢能力受影响,表现为游动减少。

注射哈维氏弧菌能刺激大黄鱼白细胞的增

殖,与患败血症和狂游症的鲢^[17]、脊椎动物相似^[18-19],这是机体的适应性反应,机体被感染的证据^[20]。

淋巴细胞在鱼类的体液免疫和细胞免疫中都发挥着重要的作用。淋巴细胞是鱼体内参与特异性免疫反应的免疫细胞,鱼类的淋巴细胞也像高等脊椎动物那样能被抗原激活而产生相应的抗体和淋巴因子,其中T淋巴细胞还具有直接杀伤细胞的作用。患病大黄鱼淋巴细胞极显著增加($P < 0.01$),与虹鳟病毒性出血败血症病鱼的结果相似^[21],说明注射哈维氏弧菌能使机体的特异性免疫水平提高。

鱼类吞噬细胞主要由单核细胞和粒细胞组成,吞噬细胞是组成非特异性防御系统的关键成分,在抵御病原生物感染中发挥重要的作用。单核细胞能进行活跃的变形活动,具有较强的吞噬能力,可通过伪足样胞突捕捉并融合外来物质以及自身的衰老细胞,进行吞噬消化。在病原菌感染后的较短时间内,造血器官加速了单核细胞的增殖发育和释放,使单核细胞吞噬能力增强,能对血液中的菌体和衰老细胞进行活跃的吞噬活动,随着感染时间的延长,单核细胞的数量因吞噬细菌后解体,呈下降趋势。经哈维氏弧菌感染后,大黄鱼外周血液单核细胞和粒细胞数量有极显著下降,Dalmo等^[20]认为单核细胞和粒细胞数量数目的急剧减少,可能与这二种细胞参与对细菌吞噬作用后解体有关,这也与兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuanensis*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等的研究结果相似^[21-25]。

血栓细胞是鱼类血液中具有凝血作用的细胞,相当于哺乳类的血小板。患病大黄鱼血液中血栓细胞显著下降,与鱼体多种器官充血或出血有关。而鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染海鳗(*Muraenesox cinereus*)后,观察到血栓细胞被单核细胞吞噬现象^[6],这可能也是造成病鱼外周血中血栓细胞数量显著下降的原因。

在感染哈维氏弧菌后,大黄鱼能通过红细胞减少和白细胞增殖等方式提高其对弧菌的免疫力,在感染的早期阶段非特异性免疫因子起主要作用,在感染后期阶段特异性免疫因子起重要作用。

3.3 哈维氏弧菌对大黄鱼血清生化指标及肝、头肾器官的影响

肝脏不仅是鱼体最大的消化腺,而且还是功能最多多样化的新陈代谢器官之一。肝脏是鱼体合成蛋白质的重要场所,肝细胞受损意味着蛋白质生产量下降,特别是白蛋白降低更为显著^[10],实验中可见人工感染哈维氏弧菌而患病大黄鱼整个肝脏发白、糜烂,病鱼肝脏细胞大面积脂肪变性,肝细胞线粒体、内质网等细胞器崩解,肝脏受损,最终引起肝功能障碍,肝脏解毒能力降低^[26-27],因此,病鱼血清总蛋白、球蛋白含量显著降低,除鱼体本身的消耗外,主要由于肝细胞受损而蛋白合成功能减退,肝功能受到严重的损坏所致。这也与被感染大黄鱼多次出血,蛋白质流失有关。

但由于血清蛋白水平受很多因素的影响,比如季节、生境、温度、生理状况等,其与大黄鱼的免疫功能的关系还需进一步的研究。而张新明等^[7]认为细菌 J210 的添加激活了凡纳滨对虾的免疫合成系统,血清的蛋白含量变化与血清中非特异性体液因子的变化有一些相似性,其变化有利于提高机体自身的抗病能力。

谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)是肝脏受损伤的重要指示酶^[5]。ALT、AST 主要存在于肝脏中,在正常情况下这些血清酶活性低且相对恒定,但当肝脏发生损伤时,组织内 ALT 和 AST 的活性将降低而且血清内这两种酶的活性将升高。本研究表明大黄鱼患哈维氏弧菌病后血清 ALT、AST 含量显著增加,表明鱼体在病原菌的作用下,肝脏组织受损,引起血清中酶的含量迅速上升,与欧洲鳗鲡患“狂游病”研究结果一致^[5]。

病鱼血清中的甘油三酯(TRIG)、胆固醇(TC)明显下降是大黄鱼病鱼营养不良的表现,由于患病期间病鱼拒食和饥饿所致。TRIG 主要通过肠道由食物中摄取。肝脏也是合成 TRIG 的主要器官,血清中 TRIG 含量变化是表示肝功能好坏的指标之一。实验结果说明大黄鱼病鱼肝功能受到严重的损坏,肝细胞受损合成功能减退,造成鱼体血清 TRIG 含量下降。

头肾是鱼类的免疫器官。人工感染患病大黄鱼头肾受损,鱼体肾小管发生病变,肾小球滤过功能发生障碍,病鱼头肾细胞器减少,影响了大黄鱼正常生理代谢,使鱼体免疫能力下降。在本研究中 K、Na、Cl 等含量的变化反映了肾小球的滤过

与重吸收功能失调,肾脏机能减弱。另外由消化道、尿路失钠引起病鱼血清钠含量显著降低,说明病鱼肾功能不全或肾功能减退,同时引起大黄鱼血清无机磷滞留,使血清无机磷增高^[25],这也与本试验的结果相同。除此之外,肾脏是鱼类的另一个造血器官,肾脏遭到破坏,造血功能衰退,导致贫血,加速病鱼死亡。

哈维氏弧菌的感染严重损伤其内脏及免疫器官,造成鱼体自身生理代谢紊乱,免疫力和抗病力下降。很明显重要脏腑受损,内脏器官功能衰竭是造成感染哈维氏弧菌大黄鱼病鱼出现死亡的主要原因之一。

病鱼乳酸脱氢酶(LDH)含量增高,是病鱼肌肉组织受损的表征^[5]。在正常情况下 LDH 存在于许多组织细胞中,以横纹肌细胞内含量最高^[18]。本试验中大黄鱼 LDH 含量显著上升,说明了鱼肌纤维发生损伤、坏死,鱼体的肌肉组织发生代谢障碍,产生病变,这与大黄鱼患病后皮肤发生溃疡症状相吻合。

钙的主要生理功能之一是激活各类酶的活性。大黄鱼病鱼血液钙含量显著地提高,是由病原菌感染引起鱼体免疫反应增加,需要激活更多有关酶活性造成的。

注射哈维氏弧菌后大黄鱼病鱼血清中各种酶值与对照组相比有显著的提高,与添加细菌 J210 后凡纳滨对虾的研究结果相似^[7],说明哈维氏弧菌的注射对增强大黄鱼的非特异性免疫能力可产生积极的作用。

总之,病鱼的肝、肾等发生了严重病变,肝、肾功能不全,鱼摄食减少、营养不良,内脏器官衰竭而死。鱼体血液指标变化的研究,将有助于揭示大黄鱼哈维氏弧菌病的致病机理。

参考文献:

- [1] 毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(2):178-181.
- [2] 李军. 中国对虾幼体病菌哈维氏弧菌的分离及其生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼,1998,29(4):353-361.
- [3] 王国良,金珊,薛良义,等. 海水同箱鲈鱼皮肤溃烂病及其病原菌的研究[J]. 黄渤海海洋,2000,18(3):85-89.
- [4] 王保坤,余俊红. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧

- 菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学,2002,9(4):353-361.
- [5] 周玉,郭文场,杨振国,等. 欧洲鳗鲡狂游病血液生化指标研究[J]. 水生生物学报,2002,26(3):314-316.
- [6] 谢嘉华,袁建军,王立萍,等. 2种病原菌感染海鳗后外周血白细胞的病理变化[J]. 动物学杂志,2006,41(5):88-91.
- [7] 张新明,李健,刘淇,等. 细菌 J-10 对凡纳滨对虾非特异性免疫指标的影响[J]. 海洋水产研究,2004,(4):6-12.
- [8] 徐晓津,徐斌,王军,等. 哈维氏弧菌人工感染大黄鱼的组织病理学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2009,48(2):281-286.
- [9] 林光华,张丰旺. 兴国红鲤血液的研究—白细胞百分式和血细胞大小的测定[J]. 江西大学学报(自然科学版),1987,11(1):41-45.
- [10] 林光华,张丰旺. 性别和繁殖对兴国红鲤血液指标的影响[J]. 水生生物学报,1989,13(1):91-93.
- [11] 范文辉,黄健,王秀华,等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报,2005,45(5):665-670.
- [12] 陈献稿,吴淑勤,石存斌,等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学,2004,11(4):313-317.
- [13] 钟硬良,陈月忠,周宸. 环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J]. 中国水产科学,2001,8(1):41-45.
- [14] 中国科学院微生物研究所(译). 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第9版. 北京:科学出版社,1994.
- [15] Tavares D M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts [J]. Journal of Fish Biology,2006,68:1822-1833.
- [16] Ranzani-Paiva M J T, Ishikawa C M, Eiras A C, et al. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2004,47:945-953.
- [17] 余毅,吴宝华. 白鲢疯狂病血液的研究[C]//中国水产学会第四次全国代表大会暨学术年会论文集,1998,200-203.
- [18] Tierney K B, Farrell A P, Kennedy Y C J. The differential leucocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas* [J]. Journal of Fish Biology,2004,65:906-919.
- [19] Rough K M, Nowak B F, Reuters R E. Haematology and leukocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii* [J]. Journal of Fish Biology,2005,66:1649-1659.
- [20] Dalmo R A, Ingebrigsten K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to reticulo endothelial system (RES) [J]. Journal of Fish Diseases,1997,20:241-273.
- [21] Huang Q Y, Liu L Y, Fan L P. Pathophysiological studies on the hemolytic ascites of crucian [J]. Fisheries China,1992,16(4):316-2321.
- [22] 鄢庆彬,张俊杰,邹文政,等. 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响[J]. 水产学报,2007,31(2):250-256.
- [23] Kollner B, Kotterba G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunization with *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2002,12:35-48.
- [24] Suzuki K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas) and carp *Cyprinus carpio* L. [J]. Journal of Fish Biology,1986,29:349-364.
- [25] 胡成钰,洪一江,林光华. 柱状噬纤维菌免疫后兴国红鲤免疫细胞数量变化的研究[J]. 水生生物学报,2002,26(6):674-678.
- [26] Gibson-K S, Netto P, Ngoh-Lim G H, et al. The pathology of systemic iridoviral disease in fish [J]. J Comp Path,2003,129:111-119.
- [27] 王铁辉,易咏兰,陈宏溪,等. 草鱼出血病病毒人工感染稀有鮡鲫出血病鱼的组织病理观察[J]. 水生生物学报,1995,19(4):350-353.

Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi*

XU Xiao-jin^{1,2}, XU Bin², WANG Jun², SU Yong-quan^{2*}, ZHANG Zhi-wen², CHEN Xin²

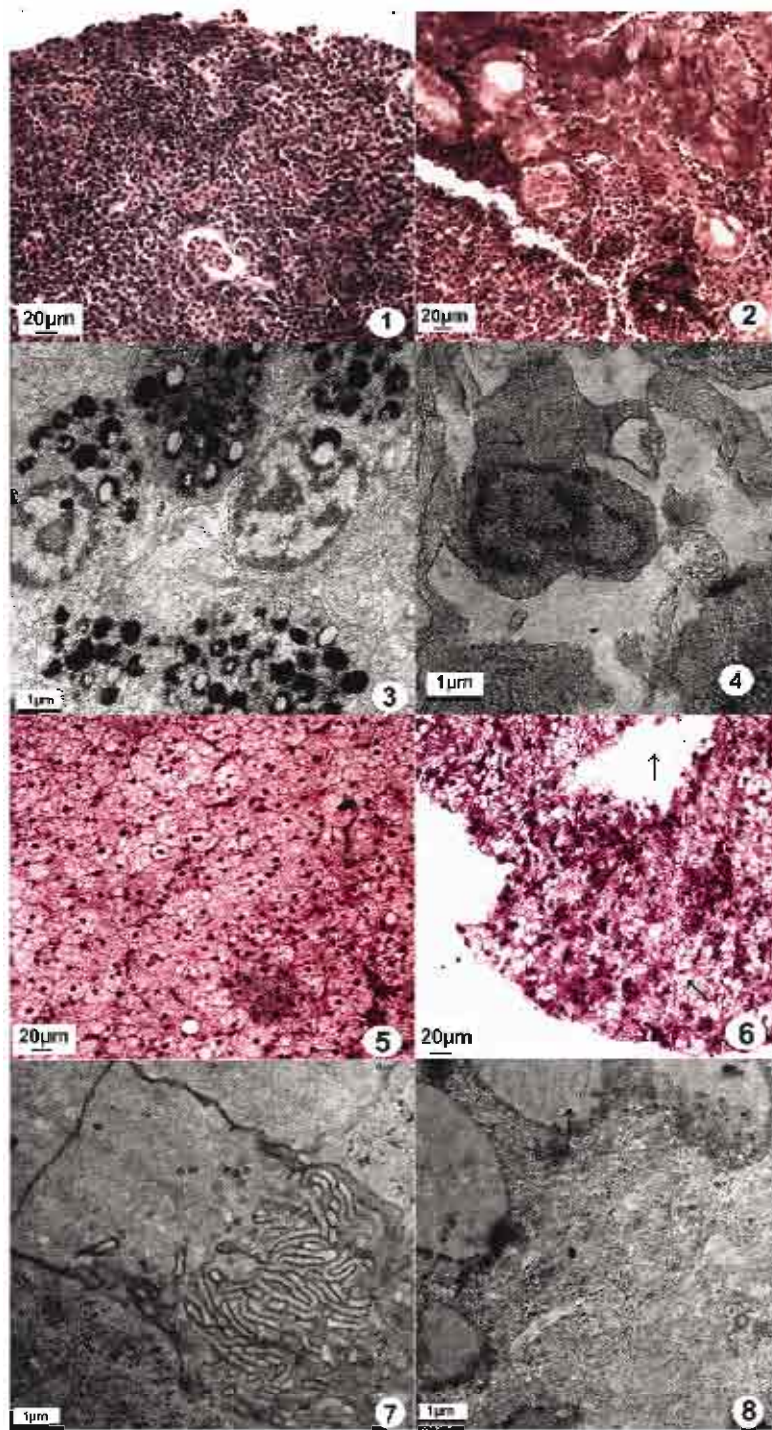
(1. The Key laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The pathogen *Vibrio harveyi* isolated from the focus of diseased *Pseudosciaena crocea* was infected back to the healthy *P. crocea* artificially. The challenged fish indicated the typical ulcerated syndrome. The blood chemistry parameters were tested. The challenged fish indicated significantly ($P < 0.01$) lower percentages of monocytes, polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN) and thrombocytes but higher percentages of leucocytes; it differed from the control fish. Significant decreases in total protein, globulin, triacyl glycerol and blood glucose concentrations were found in the challenged fish compared to the control fish ($P < 0.01$), with the total protein values at (12.8 ± 3.95) g/L and (19.4 ± 4.33) g/L, respectively. Significant increases of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) concentrations were found in the challenged fish compared to the healthy fish ($P < 0.01$). The concentrations of ALT and AST were (37 ± 5.11) IU/L and (164 ± 47.19) IU/L in the challenged fish, while in the control fish they were (28 ± 5.54) IU/L and (117 ± 21.84) IU/L. The results indicated liver and kidney damage, and disturbances in hepatic and osmoregulatory function of *P. crocea*. Observations by histopathology showed that head kidney and liver of the tested *P. crocea* were severely damaged and various denaturalization and necrosis. Denaturalization and necrosis emerged in the epithelial cell of renal tubule under electronic microscope. Fat was accumulated in the cytoplasm of hepatic cells. The serum chemistry parameter determination was a good indicator of bacterial infection of the challenged fish.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; *Vibrio harveyi*; blood chemistry indices; histopathology

Corresponding author: SU Yong-quan. E-mail; yqsu@xmu.edu.cn



图版 哈维氏弧菌对大黄鱼头肾、肝的影响(显微与超微结构组织病理切片)

1. 健康大黄鱼头肾图; 2. 病鱼头肾肾小管上皮细胞坏死、脱落, 标示为(↖); 3. 健康大黄鱼头肾各细胞器结构清晰; 4. 病鱼头肾细胞器减少(→); 5. 健康大黄鱼肝脏图; 6. 病鱼肝细胞萎缩(↖), 肝细胞坏死、崩解(↑); 7. 健康大黄鱼肝脏各细胞器结构清晰; 8. 病鱼肝细胞内脂滴积累多(↑)。

**Plate Effect of *V. harveyi* on the head kidney and liver of *P. crocea*
(histopathological and electronic microscope section)**

1. The structure of the head kidney of heathy *P. crocea*; 2. Epithelia of renal rubules of head kidney of diseased fish undergo degeneration, necrosis and desquamation(↖); 3. The structure of organelles in cells of the head kidney of heathy *P. crocea* were clear; 4. In the head kidney of diseased fish cell organelles decreased(→); 5. The structure of the liver of heathy *P. crocea*; 6. Liver cells of diseased fish were atrophy(↖), necrotic and collapse(↑); 7. The structure of organelles in cells of the liver of heathy *P. crocea* were clear; 8. Livers of diseased fish shows fatty degeneration of hepatocyte(↑).