

草鱼出血病的组织病理研究*

郑德崇 黄琪琰 蔡完其 陆宏达

(上海水产大学)

摘要 草鱼出血病是由呼肠孤病毒引起的一种急性传染病。病鱼全身出血, 鱼的红细胞、白细胞及血红蛋白都明显地低于健康鱼。病毒侵袭草鱼后, 小血管的内皮广泛受损, 引起弥漫性血管内凝血, 从而大量消耗了血液中的凝血因子, 引起广泛性出血。由于循环血量减少和小血管阻塞, 导致大多数组织和器官缺氧而变性和坏死; 尤其是造血组织的坏死, 更加速病鱼死亡。此外, 还在草鱼血液中首次发现嗜碱粒细胞, 查明了草鱼出血病同草鱼肠炎病的肠道组织病变之间的差异。

关键词 出血病、呼肠孤病毒、鱼类组织病理、草鱼

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.) 出血病是由呼肠孤病毒 (Reovirus) 引起的一种急性传染病^[3,4,6,7], 主要对当年和一足龄的草鱼形成危害, 这种病的发病快、流行广、死亡率高, 是严重影响淡水养鱼生产的主要鱼病之一。国外关于病毒性鱼病的病理研究已有不少文献发表^[11~13], 但没有关于草鱼出血病方面的研究; 国内虽也有鱼类组织病理研究的论文^[9,10], 但对于草鱼出血病在此以前的研究工作主要集中于病原及防治方法方面, 迄今尚未有组织病理方面的论文发表。在鱼病诊治的实际工作中, 以肉眼判别以肠道出血为主的草鱼的出血病和肠炎病, 确实存在较大困难, 也因为目前还缺少免疫法所需的生物制品, 故无法应用免疫荧光技术、酶标技术和血清学等快速诊断法进行诊断。为了阐明草鱼出血病的病理变化及其和肠炎病肠组织病理变化差异, 避免误诊, 本文除对草鱼出血病的组织病理变化作了研究之外, 还特别注意到草鱼出血病和草鱼肠炎病在组织病理上的差别。

材 料 和 方 法

1. 材料鱼的来源

用于本研究的材料鱼, 包括自然发病鱼和人工感染发病鱼, 主要取自浙江省菱湖地区池塘养殖的当年草鱼, 体长 9—12 厘米, 体重 14—31 克。用于病理组织切片的材料鱼除来自以上地点外还取自江苏省无锡县水产养殖场当年、一足龄和二足龄草鱼。自然发病鱼直接取自发病的养鱼池塘, 人工感染材料鱼由健康草鱼注射出血病除菌原毒组织浆感染

* 本研究得到浙江省淡水水产研究所的大力支持, 本院淡水渔业专业 77、78、79 届 10 位同学参加部分工作, 特此一并致谢。

发病而得。材料鱼在暂养和人工感染期间,每天投饲适量蚕蛹粉、浮萍或青草,并经常排污保持试验池水清净。

2. 人工感染法

在未曾发病的池塘中,捕捞健康草鱼,经抽样检查确认为无病者用作试验材料鱼。选用的健康草鱼先在水泥池中暂养 10 天以上(水温 25°C 左右),经抽样检查确认无病后,用 2% 食盐水浸洗 15—20 分钟,移入曝气的自来水小池内暂养 24 小时,供作人工感染和对照试验用。水泥池在蓄水前用 40ppm 漂白粉溶液浸泡消毒 24 小时,然后用自来水洗净,水池容积为 1×1×0.4 米。

人工感染源系采用自然发病鱼的除菌原毒组织浆,以 10% 浓度组织浆在背鳍基部作肌肉注射,每尾 0.2 毫升。每批注射 20 尾,待发病显症后即行取样。

3. 血液测定法

剖开材料鱼的围心腔,用装有 4 或 5 号针头的注射器插入动脉球抽取血液 0.1—0.5 毫升注入采血瓶。注射器和采血瓶预先洗净烘干,然后以 1.5% 肝素钠盐溶液湿润内壁,再放入 37—40°C 干燥箱内干燥。

用红细胞吸管吸取抗凝血,以 0.8% 生理盐水稀释 200 倍,用 Nénbamer 计算室计数;用白细胞吸管吸取抗凝血以血球计数稀释改良液^[6],稀释 20 倍,用 Nénbamer 计算室计数。白细胞分类计数是用抗凝血制成血液涂片,用 Wright 氏染色液染色,每一血涂片在显微镜下计数 200 个白细胞,统计各种白细胞的百分比。血红蛋白的测定是用经校正的沙利氏比色计进行比色测定。

4. 病理组织切片法^[1,6]

从自然发病鱼和人工感染发病鱼共计 27 尾和用作对照的 4 尾健康草鱼,取小块病变的骨骼肌,鳃,肠道,肝胰脏,肾和脾等脏器,分别用 Helly 氏溶液,Canary 氏溶液固定,按常法制成 5—6 微米厚的石蜡切片,用苏木精、伊红染色以及 Mallory 氏三色法染色。另外,还用汞溴酚蓝(Hg-BPB)法显示蛋白质;过碘酸—席夫试剂(PAS 反应)显示肝糖元和杯状细胞;用甲醛钙溶液固定、冷冻切片、苏丹黑 B 染色显示脂肪;用冷丙酮固定、石蜡包埋切片、Gomori 氏钙—钴法显示碱性磷酸酶(AKP)。

结 果

(一) 临 诊 症 状

病鱼常离群独游水面,游动缓慢,对外界刺激的反应迟钝,不吃食。体色发黑,尤以头部为甚。病鱼头顶部、下颏、口腔、眼眶、鳃盖、鳍和鳍基部有不同程度充血。剥去皮肤,可以看见肌肉呈点状或斑块状充血,严重时全身肌肉呈鲜红色。剪去鳃盖可看见鳃瓣为花斑状,呈淡红色、紫红色和苍白色。

剖开腹腔可以看见肠壁充血,呈鲜红色,肠内无食物;肠系膜和脂肪组织充血;脾肿

大,暗红无光泽,肝胰脏、肾脏、鳔和胆囊有出血点或血丝。也有一些病鱼的症状,主要表现在肠道、肝、脾和肾等脏器,体表的症状不明显。

(二) 血液病理变化

自然发病鱼和人工感染发病鱼血液的颜色多呈淡红色,后者的血色更为浅淡,健康草鱼的血液呈鲜红色。病鱼的血量也少于健康草鱼。

本研究对人工感染和自然发病的病鱼,以及健康草鱼血液的红细胞、白细胞、血红蛋白含量及白细胞血式作了测定,结果见下表。

附表 病鱼和健康鱼血液成分比较
Table A comparison of the ingredients of blood
between diseased and healthy fish⁽¹⁾

成分 Ingredients	组别 Groups	自然发病组 NDF ⁽²⁾	人工感染发病组 AIDF ⁽³⁾	健康鱼 Healthy Fish
血红蛋白含量 Hemoglobin content (g%)		4.52 ± 0.69(37)	3.7 ± 0.67(59)	7.06 ± 0.41(42)
红细胞 Erythrocytes (10000/mm ³)		112.4 ± 55.4(30)	91.3 ± 67.0(51)	228.4 ± 82.0(38)
白细胞 Leucocytes (1000/mm ³)		19.5 ± 9.4(30)	13.1 ± 5.9(51)	32.3 ± 12.8(38)
白细胞血式 Quantities of Leucocytes				
淋巴细胞 Lymphocyte(%)		58.5 ± 15.5(20)	70.9 ± 10.7(20)	79.0 ± 7.4(23)
单核粒细胞 Monocyte (%)		4.7 ± 4.0(20)	5.2 ± 5.1(20)	2.1 ± 1.1(23)
中性粒细胞 Neutrophil (%)		36.7 ± 14.8(20)	23.5 ± 10.7(20)	18.5 ± 7.3(23)
嗜酸粒细胞 Acidophil (%)		0-1(20)	0-2.5(20)	0-1.5(23)
嗜碱粒细胞(个) Basophil(ind.)		1(1)	2(1)	

(1) 括号内的数字是被检测的鱼的个体数,(The figures in brackets are numbers of tested fish);

(2) NDF—naturally diseased fish;

(3) AIDF—artificially infected fish.

由上表可以看出:(1)病鱼组红细胞和血红蛋白量显著低于对照组健康草鱼,而人工感染组又低于自然发病组;(2)病鱼组白细胞低于对照组,而人工感染组又低于自然发病组;(3)病鱼组淋巴细胞百分率低于对照组,而自然发病组则低于人工感染组;病鱼组单核细胞百分率显著高于对照组,而自然发病组和人工感染组之间则差异不明显;自然发病组的中性粒细胞百分率显著高于人工感染组和对照组,而人工感染组和对照组之间没有显著差异。

在 2 尾病鱼(250 号和 265 号)的血液涂片上看到 3 个嗜碱粒细胞。细胞呈圆形,直

径 8.2—8.9 微米。细胞核呈马蹄形或分叶，偏于细胞的一侧。胞浆中含有极为粗大的嗜碱性颗粒，被 Wright 氏染色液染成深蓝紫色(图 1)。



图 1 草鱼的嗜碱粒细胞。Wright 氏染色, $\times 1500$
Fig. 1 The basophil of grass carp. Wright's, $\times 1500$.

(三) 脏器的组织病理变化

对病鱼的骨骼肌、肠道、肝胰脏、肾、脾和鳃等脏器病理组织作切片观察，可以看到不同程度的组织病理变化。

1、血管的组织病理变化

草鱼出血病导致上述各脏器小血管广泛性损害。毛细血管扩张充血，内皮细胞肿胀、坏死(图 2)。小动脉和小静脉的内皮和结缔组织，也有不同程度的肿胀和坏死病变，引起小血管破损出血。有些小血管内有微血栓形成(图 3)，或有血液淤滞。

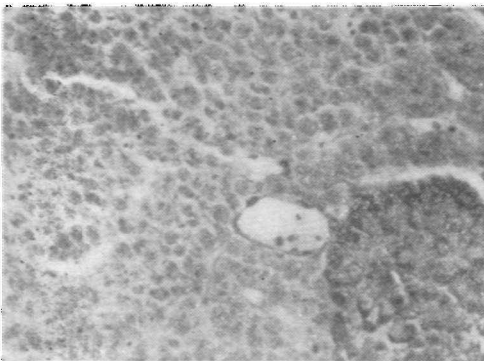


图 2 小血管内皮细胞肿胀，肝细胞胞浆中有嗜酸性包涵体。H-E 染色, $\times 720$ 。

Fig. 2 The endothelia of small blood vessels swelled, the acidophilic inclusion bodies existed in the cytoplasm of liver cells. H-E, $\times 720$.



图 3 小静脉内皮和结缔组织受损，微血栓形成。H-E 染色, $\times 200$ 。

Fig. 3 The endothelia and connective tissue of venule damaged, the microthrombus formed in the venule. H-E, $\times 200$.

2、骨骼肌组织病理变化

体壁骨骼肌纤维之间有大量红细胞浸润,病变早期肌纤维肿胀,肌原纤维稀疏,但明暗相间的横纹仍清晰可见(图4)。随着病情发展,肌纤维排列紊乱,横纹模糊不清乃至完全消失,肌原纤维断裂呈变性和坏死变化(图5)。病变区域巨噬细胞和淋巴细胞增多。

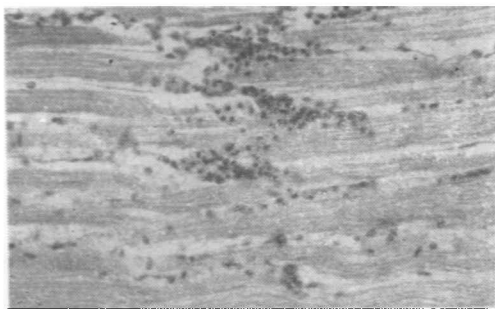


图4 骨骼肌纤维肿胀,横纹尚可见,红细胞浸润于肌纤维间。H-E染色,×400。

Fig. 4 The skeletal muscle fibers swelled, the striations can be seen yet; the erythrocytes infiltrated among muscle fibers. H-E, ×400.

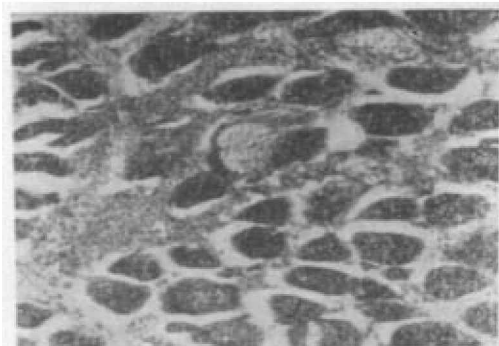


图5 骨骼肌纤维变性和坏死。H-E染色,×170。

Fig. 5 The skeletal muscle fibers showed degeneration and necrosis. H-E, ×330.

3、脾脏组织病理变化

脾肿大充血、有大量红细胞浸润和血液淤滞。网状细胞肿胀,造血组织有核固缩和核碎裂等细胞坏死病变。嗜酸粒细胞和巨噬细胞数量增加,并有局部的巨噬细胞聚集。

4、肾脏组织病理变化

肾脏毛细血管扩张充血,被膜附近的造血组织有红细胞浸润。肾小球毛细血管扩张充血,有些肾小球萎缩,肾小囊腔相对增大,更有少数肾小球坏死、解体。近曲小管上皮细胞水肿、颗粒变性,也有一些近曲小管上皮细胞出现玻璃样变(图6)。在红细胞浸润区附近的近曲小管坏死。有些近曲小管,虽然尚未呈现组织病变,但细胞顶部及刷状缘处的碱性磷酸酶(AKP)活性已消失,用 Gomori 氏钙—钴法显示时呈阴性反应。集合小管和集合管局部的上皮细胞变性、坏死,颗粒性游走细胞增加。管腔中有红细胞、白细胞和细胞碎屑形成的管型(图7)。

除了肾主质发生病变以外,造血组织也受损害。造血组织充血,造血细胞有核固缩、核碎裂等细胞坏死变化。

5、肝组织病理变化

病变初期可以看见肝血窦扩张充血,或没有血细胞(图8)。被膜附近的周边部的肝细胞没有明显的病变,此区肝细胞的结构清晰可辨,胞浆中含有PAS阳性反应物质,表



图6 肾小管上皮细胞玻璃样变。
H-E 染色, $\times 720$ 。

Fig. 6 The epithelial cells of uriniferoustubles showed hyaline degeneration. H-E, $\times 720$.

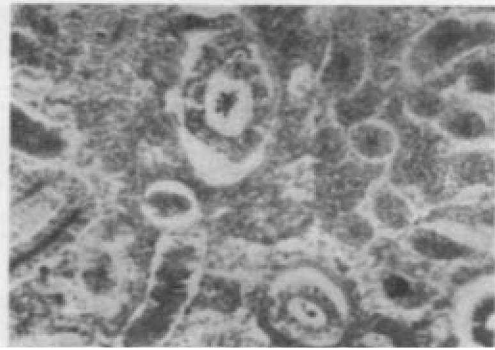


图7 集合小管内有细胞碎屑。
H-E 染色, $\times 330$ 。

Fig. 7 The broken cells existed in the collecting tubles. H-E, $\times 330$.

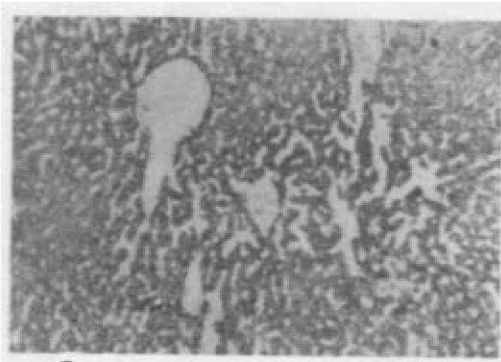


图8 肝静脉窦扩大。H-E
染色, $\times 110$ 。

Fig. 8 The sinusoids of liver dilated. H-E, $\times 110$.

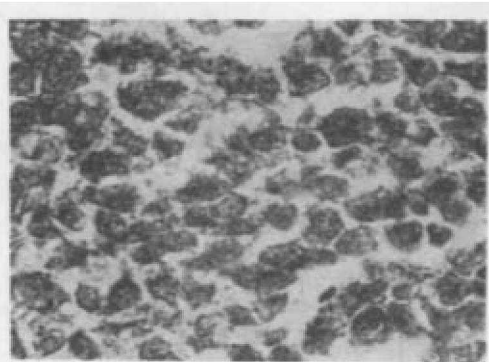


图9 近被膜的部份肝细胞仍含有肝糖元。PAS 反应, $\times 800$ 。

Fig. 9 The liver glycogen existed in the part of cytoplasm of liver cells near the cover membrane. PAS, $\times 800$.

明肝糖元仍然存在(图9)。深部的肝细胞,其病变则明显可见,轻则细胞肿胀,使本来就很狭窄的肝血窦变得更狭窄。稍重者肝细胞呈颗粒变性,胞浆中出现被 Hg-BPB 染成蓝色的细小颗粒,而这些小颗粒呈 PAS 阴性反应,表明它们是颗粒变性的蛋白质颗粒,而肝糖元则已消失。肝细胞的胞浆中含有嗜酸性包涵体(图2)。

随着病情加重,除了有颗粒变性的肝细胞之外,并有空泡变性的肝细胞出现,这些细胞的胞浆中出现空泡(图10)。也有一些病鱼的肝细胞呈脂肪变性,胞浆中出现被苏丹黑 B 染成深黑色的小脂肪滴。局部的肝细胞有核溶解等细胞坏死变化,更有一些肝细胞的结构模糊不清,染色浅淡、细胞解体,形成肝组织局灶性坏死(图11)。小静脉内有微血栓形成,并有胆汁淤滞。在坏死灶附近的胰腺泡细胞胞浆中的酶原颗粒消失,胰腺细胞坏死。

6、肠道组织病理变化

肠壁组织的病变以粘膜层最为突出,其它各层组织亦受损害。发病初期肠上皮细胞

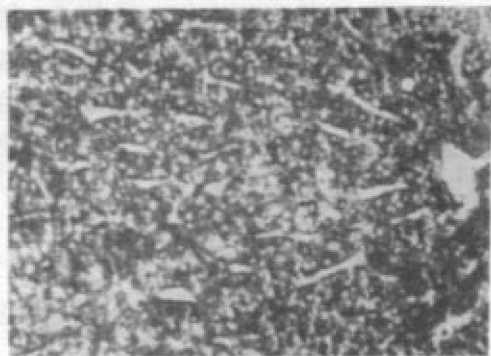


图 10 肝细胞空泡变性。
H-E 染色, $\times 110$ 。

Fig. 10 The liver tissue showed vacuolar degeneration. H-E, $\times 110$.

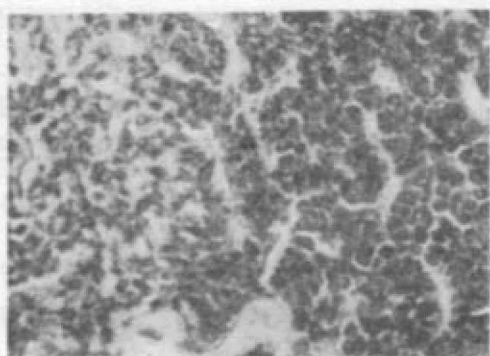


图 11 肝组织局灶性坏死。
H-E 染色, $\times 720$ 。

Fig. 11 The liver tissue showed local necrosis. H-E, $\times 720$.

肿胀, 细胞各部结构清晰可辨, 但细胞顶端及纹状缘 AKP 活性降低, 用 Gomori 氏钙-钴法显示呈弱阳性反应。杯状细胞略有增加, 固有层毛细血管充血, 并有红细胞浸润。因血管通透性增加血浆渗出, 在粘膜褶的顶部, 肠上皮与结缔组织剥离, 进而上皮破裂并脱落。肠腔中有红细胞、脱落的肠上皮和纤维索样物质。粘膜下层的毛细血管也轻度充血, 肌层没有明显病变(图 12)。

病变严重时, 肠上皮几乎完全脱落, 固有层及粘膜下层有大量红细胞浸润, 肌层也有红细胞浸润。肠腔中有大量红细胞和脱落的、成片的肠上皮, 纤维索样物质较病变早期为少(图 13)。结缔组织中的巨噬细胞, 淋巴细胞, 嗜酸粒细胞和中性粒细胞都有所增加。

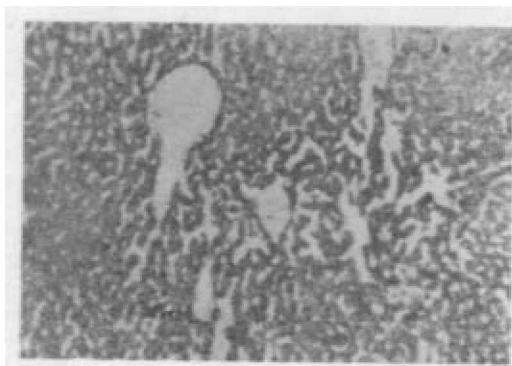


图 12 病变早期少量肠上皮脱落, 肠腔有大量纤维索样物质和少量红细胞。H-E 染色, $\times 110$ 。

Fig. 12 A few of intestines epithelia fell, a great amount of fiberoid substance and a small amount of erythrocytes existed in intestines cavity in early period. H-E, $\times 110$.

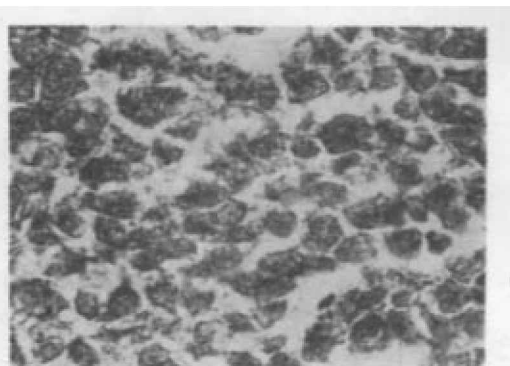


图 13 病变后期肠壁严重充血, 上皮几乎全部脱落, 肠腔内有很多红细胞。H-E 染色, $\times 110$ 。

Fig. 13 The intestines wall congested seriously, whole epithelia fell nearly, and much erythrocytes existed in the intestines cavity in late period. H-E, $\times 110$.

肠炎病肠道组织的病理变化与出血病肠道的组织病变明显不同, 粘膜层病变的差别尤其明显。肠炎病病变的早期, 肠上皮呈炎性水肿, 进而上皮细胞的顶端及纹状缘受损, 粘膜褶顶部的固有层毛细血管扩张充血。粘膜褶底部的上皮细胞结构仍清晰可辨, 杯状

细胞显著增加,肠腔中有大量粘液和渗出的纤维素样物质。病变后期,肠上皮细胞坏死崩解。此时肠腔中可以看到大量崩解脱落的上皮细胞和小片的肠上皮,以及少量红细胞,固有层的毛细血管扩张充血,粘膜下层和肌层的毛细血管有不同程度扩张充血,结缔组织的胶原纤维肿胀变性,染色浅淡,平滑肌细胞变性。巨噬细胞,淋巴细胞,嗜酸粒细胞和中性粒细胞都有明显增加。

7、鳃组织病理变化

鳃小片毛细血管扩张充血,呼吸上皮细胞水肿,由于毛细血管通透性增加,有蛋白质性渗出物和一些血细胞渗出。有少数鳃小片上皮坏死,有些鳃小片缺血、萎缩。

讨 论

1、草鱼出血病的组织病理变化,主要表现为全身性小血管损伤。体壁肌肉,肠道,肠系膜,胆囊,肝胰脏、肾、脾和鳃等器官的小血管扩张充血,组织变性、坏死。由于小血管内皮损坏,激活了凝血因子,产生弥漫性血管内凝血,形成微血栓。因而耗去大量凝血因子,引起出血,使循环血量大为减少。另一方面由于微血栓形成和血液淤滞,阻闭了局部的微循环,正常代谢发生障碍,引起脏器组织梗死样病变,而使受损害脏器和造血组织丧失其应有的机能,从而加速了病鱼的死亡。

2. 在试验观察过程中,我们看到病鱼的二片血液涂片标本上有3个嗜碱粒细胞。这在过去所发表的文献中未曾见有草鱼血液中具有嗜碱粒细胞的报道,其原因尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院病理解剖教研组,1978. 病理检验技术. 上海科学技术出版社。
- [2] 中山医学院主编,1978. 病理学(上、下册). 人民卫生出版社。
- [3] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1983. 草鱼出血病病毒的电显微镜观察初报. 淡水渔业,(8):39。
- [4] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984. 草鱼出血病病毒精细结构的研究. 淡水渔业,(2):21—22。
- [5] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984. 草鱼出血病病原——鱼呼肠孤病毒核酸特性的研究. 淡水渔业,(4):7—9。
- [6] 刘介眉等,1983. 病理组织染色的理论方法和应用. 人民卫生出版社。
- [7] 陈燕梁、江育林,1983. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究. 科学通报,28(18):1138—1140。
- [8] 郭植森,1980. 一种改良的鱼类血球计数的稀释液. 淡水渔业(5):35。
- [9] 黄琪琰、郑德崇、蔡亮其、陆宏达,1983. 草鱼细菌性烂鳃病的组织病理研究. 水产学报,7(2):95—104。
- [10] 郑德崇、黄琪琰、蔡亮其、陆宏达,1984. 草鱼中华鱼蚤病的组织病理研究. 水产学报,8(2):107—113。
- [11] 江草周三等,1979. 魚の病理組織学. 東京大学出版社。
- [12] Ribelin, W. E. and Migaki, G., 1975. The pathology of fishes. 247—271. Univ. Wisconsin Press.
- [13] Sano, T., 1971. Studies on viral disease of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: Pathogenicity of the isolate. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 37: 499.
- [14] Takashi, Hibiya, 1982. An atlas of fish histology—Normal and pathological features. Kodansha Ltd. Tokyo.

- [15] Wolf, K., and Quimby, M. C., 1971. Salmonid viruses: Infectious pancreatic necrosis virus, morphology, pathology, and serology of first European isolations. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **34**: 144.
- [16] Yasutake, W. T., Parisot, T. J. and Klontz, G. W., 1965. Virus diseases of the Salmonidae in western United States. II. Aspects of pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 520.
- [17] Yasutake, W. T., 1970. Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases, 341—350. In A symposium on diseases of fishes and shellfishes, ed. S. F. Snieszko., *Amer. Fish. Soc., Spec. Publ.* No. 5. Washington, D. C.
- [18] Yasutake, W. T., and Amend, D. F., 1972. Some aspects of the pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis, *J. Fish Biol.*, **4**: 261.
- [19] Yasutake, W. E., 1979. Histopathology of yearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) infected with infectious hematopoietic necrosis (IHN). *鱼病研究* **14**(2):59—64.

HISTOPATHOLOGICAL STUDIES ON THE HEMORRAGE DISEASE OF GRASS CARP

Zheng Dechong, Huan Qiyan, Cai Wanqi and Lu Hongda

(*Shanghai Fisheries University*)

ABSTRACT The hemorrhage disease of grass carp (*Otenopharygodon idella*) is an acute infection caused by Reovirus. The symptoms of the disease is that the whole body and all organs of the fish appears bleeding. The number of erythrocyte, leucocyte and hemoglobin of the diseased fish are obviously less than the healthy one, and that of artificially infected fish are much less than that of naturally diseased fish. The bassphils is first found in the fish blood. The small blood vessels are extensively damaged and the microthrombi are formed. The muscle, intestines, livers, spleen, kidneys and gills of the fish appear bleeding, degenerated and necrotic. There are acidophilic inclusive bodies in the cytoplasm of liver cells.

KEY WORDS Hemorrhage disease, Reovirus of Grass Carp, Fish histopathology, Grass carp