

草鱼出血病潜伏期和发展期的 血液病理研究

朱心玲 贾丽珠 张明瑛

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

草鱼种经人工感染呼肠孤病毒后进行了血液学和血液化学的检查。红血球、血浆总蛋白和尿素氮在感染4天的潜伏期鱼体内,发现显著的减少。当进入发展期(第8天),红血球、血红蛋白、血浆总蛋白和尿素氮的含量减少更明显。SLDH同工酶谱的相对活性在潜伏期和发展期病鱼的血清内出现紊乱现象,同时,在某些感染鱼的血清中,明显可见一条多出的区带。

此病流行期间,早期的血液变化已经发生,某些生理变化已在红血球、血红蛋白、血浆总蛋白和尿素氮中得到反映,其含量的变化与人工感染组的结果相似。所测的血清钾含量明显增加;血清钙的含量明显减少。值得提出的是血红蛋白、红血球、血清钙和钾等被证实有早期变化。

关键词: 草鱼、鱼病、呼肠孤病毒、血液病理学

七十年代国外学者相继报道了鱼类的一些病毒、细菌、霉菌和寄生虫病的血液病理工作。揭示了鱼病血液病理变化现象,对血液检验作为诊断方法奠定了基础^[8-12,14]。

我国学者也陆续报道了草、鲢、鲤、鲫等鱼的血液生理的研究工作^[4-6]。杨端(1981)^[7]、朱蓝菲(1982)^[2]等分别做过水体污染对鱼类 SLDH 同工酶的酶谱及活性的影响和应用 SLDH 同工酶进行鱼类种群遗传和进化方面的研究。作者等也对草鱼稚鱼阶段的各项血液值进行了周年变化的研究,并确定了它们的正常值,为鱼类血液病理的研究提供了依据^[3]。

材 料 和 方 法

材料 人工感染材料鱼由本所养殖场和关桥养殖场提供,平均体重是14.56克。病毒毒源是本所鱼病室病毒组提供(来自本所及湖北省麻城县和广济县),使用时,按常规操作制成 10^{-3} 病毒上清液;感染用腹腔注射法,每尾鱼的注射量为0.2—0.4毫升。试验鱼饲养在水族箱中,自来水经去氯处理,水温控制在25—28℃。自然感染病鱼来自本所试验场、武汉市东西湖养殖场、湖北省林业科学院、湖北省天门县和沔阳县等渔场的鱼池。其

中发展期病鱼是逐尾捞取病池内症状明显的病鱼;潜伏期病鱼是在初发出血病的病池中,随意捕用无症状的鱼,平均体重是 15.88 克。

血液的收集和制备 用切开围心腔,以卡介苗注射器直接插入围心腔取血。 用作全血和血浆的制备时,以肝素作抗凝剂;血清制备则不用抗凝剂。 血样在 4℃ 冰箱中置放 30 分钟后,以每分钟 3,000 转离心 30 分钟,取上清液,血浆或血清置 0℃ 保存备用。

血液分析 红血球用电子血球计数器 (XQ-2 型) 计数;血红蛋白量用碱化法;血浆总蛋白用双缩脲法;血浆葡萄糖浓度采用邻甲苯胺法;血清尿素氮用二乙酰一肟法;血清钾、钠用火焰光度计测定;血清钙用 EDTA 法滴定;血清胆固醇用邻苯二甲醛直接显色法;血清白蛋白用溴甲酚绿法, SLDH 同工酶用醋酸纤维薄膜电泳法测定。

t 值检验 人工感染用两样本均数差异的显著性测验公式;自然感染用样本均数与总体均数差异的显著性测验公式,总体均数采用作者建立的各项血液正常值。

结 果

(一) 人工感染出血病病毒后的血液病理变化

试验鱼分 3 组进行血液检验,一组为潜伏期病鱼,即感染后第四天,试验鱼尚无明显症状的病鱼;一组为发展期病鱼,即感染 6—8 天有明显出血症状,处于垂死阶段的病鱼;一组为未感染病毒,仅用生理盐水注射作为对照。血液检验的项目有红血球数、血红蛋白量、血浆总蛋白量、血浆葡萄糖浓度以及血清尿素氮含量等 5 项(表 1)。

表 1 人工感染病毒发病草鱼的病理变化

Tab. 1 The hemopathologic changes of grass carp fingerlings artificially infected by Reovirus

血液参数 Blood parameters	对照组 Control group	潜伏期 Latent Period		发展期 Developing period	
	均数±标准差 Mean±S. D.	均值±标准差 Mean±S. D.	显著性 Significance	均值±标准差 Mean±S. D.	显著性 Significance
红细胞数 (10 ⁴ /mm ³) Red blood cell	259.10±43.80 (36)*	204.00±51.00 (11)	**	171.30±74.90 (48)	***
血红蛋白 (g%) Hemoglobin	6.20±1.08 (51)	5.64±1.64 (11)	N. S.	4.15±1.59 (57)	***
血浆总蛋白 (g%) total Plasma protein	2.88±0.53 (53)	2.27±0.66 (26)	***	1.79±0.43 (53)	***
血浆葡萄糖 (mg%) Plasma glucose	103.64±26.91 (31)	112.73±62.45 (10)	***	99.94±54.06 (38)	N. S.
血清尿素氮 (mg%) Serum urea nitrogen	7.51±2.65 (47)	4.95±2.91 (35)	***	5.16±2.06 (60)	***

*** P≤0.001 (非常显著), ** P≤0.01 (十分显著), * P≤0.05 (显著), N. S. = Not significant (不显著);括弧内数字表示测定鱼数。Data in brackets indicate number of fish examined.

表 2 池养自然感染发病草鱼种的血液病理变化

Tab. 2 The hemopathologic changes of the grass carp fingerlings naturally infected in the fish pond

血液参数 Blood parameter	正常值 Normal values	潜伏期 Latent period	发展期 Developing period
	均值±标准差 Mean±S. D.	均值±标准差 Mean±S. D.	均值±标准差 Mean±S. D.
红细胞数 (10 ⁴ /mm ³) Red Blood cell	235.00±55.00(470)	168.42±58.98(207) ***	116.92±50.42(7) ***
血红蛋白 (g%) Hemoglobin	6.40±1.57(467)	4.13±1.50(240) ***	2.82±0.98(7) ***
血浆葡萄糖 (mg %) Plasma glucose	113.68±48.30(436)	94.91±30.78(152) ***	98.14±64.93(7) N. S.
血浆总蛋白 (g%) total Plasma protein	2.94±0.75(417)	2.60±0.60(154) ***	2.64±0.24(6) *
血清钾 (mEq/l) Serum potassium	4.17±1.36(318)	6.13±1.94(189) ***	5.73±2.27(6) N. S.
血清钙 (mEq/l) Serum calcium	4.13±0.84(434)	3.07±0.64(200) ***	1.63±0.34(7) ***
血清尿素氮 (mg%) Serum urea nitrogen	7.26±3.22(375)	5.51±3.19(162) ***	4.96±0.99(7) ***
血清白蛋白 (g%) Serum albumen	1.81±0.58(215)	2.06±0.67(162) ***	1.35±0.23(7) **
血清胆固醇 (mg%) Serum cholesterin	240.04±53.48(213)	250.70±77.75(168) N. S.	137.88±36.72(19) ***

*** P≤0.001 (非常显著), ** P≤0.01 (十分显著), * P≤0.05 (显著), N. S. = Not significant (不显著);
括弧内数字表示测定鱼数 Data in brackets indicate number of fish determined.

在人工感染的条件下,无论是潜伏期或是发展期病鱼,其病理变化可以在血液中得到反映,在潜伏期时,病鱼的红细胞数、血浆总蛋白和尿素氮的含量,均已出现显著的下降;而当进入发展期时,红细胞、血红蛋白、血浆总蛋白等下降的幅值更为显著,尿素氮则维持在潜伏期水平;血浆葡萄糖浓度在人工感染时并不显现变化的迹象。 这些血液值的变化表明,贫血是草鱼出血病病鱼普遍的病理变化。

(二) 鱼池中自然感染出血病病鱼的血液病理变化

病鱼的血液变化是十分明显的(表 2)。其中红细胞、血红蛋白、血浆总蛋白、血浆葡萄糖浓度和尿素氮的变化与人工感染所呈现的现象十分类似。所增测的血清钾呈现增值变化;血清钙显著下降;白蛋白和胆固醇的变化在潜伏期和发展期中则不相同,白蛋白在潜伏期为显著的增值,而在发展期为明显的降值;胆固醇在潜伏期无变化,而到发展期则急剧地下降,显然,不同的病程中,鱼类摄食、营养的变化,代谢的障碍在血液的变化中也得到了明显的反映。

由此说明,出血病病毒一旦在鱼池中传播,则池鱼都能被感染,至于症状的出现与否,只是病程潜伏期和发展期的不同表现形式。

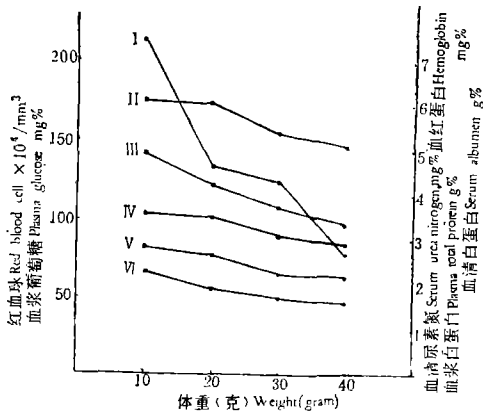


图1 潜伏期病鱼的体重与血清尿素氮、红细胞、血红蛋白、血浆葡萄糖、总蛋白、血清白蛋白之间的关系

Fig. 1 Correlation between body weight and serum urea nitrogen, red blood cell, hemoglobin, plasma glucose, total protein, serum albumen of diseased fish in the latent period

I 血清尿素氮 Serum urea nitrogen II 红细胞 Red blood cell III 血红蛋白 Hemoglobin IV 血浆葡萄糖 Plasma glucose V 血浆总蛋白 total Plasma protein VI 血清白蛋白 Serum albumen

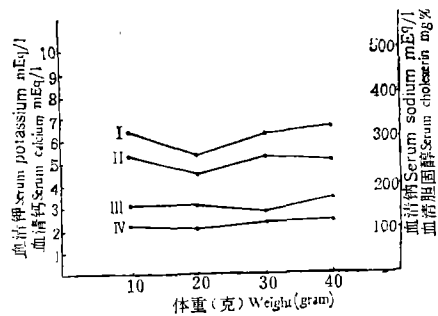


图2 潜伏期病鱼的体重与血清钾、钠、钙、胆固醇之间的相互关系

Fig. 2 Correlation between body weight and serum K⁺, Na⁺, Ca⁺, cholesterin of diseased fish in the latent period

I 血清钾 Serum potassium; II 血清胆固醇 Serum cholesterin; III 血清钙 Serum calcium; IV 血清钠 Serum sodium

(三) 潜伏期病鱼的体重和各血液值变化的相关性分析

潜伏期病鱼的红细胞数、血红蛋白、血浆总蛋白、血浆葡萄糖浓度、血清尿素氮、血清白蛋白等6项血液值的变化与体重之间,呈显著的负相关,即体重愈大,血液值下降的幅度愈大(图1);血清钾、钙等血液电解质的升或降,则不受体重的影响(图2)。因此,草鱼鱼种的早期检验以规格较大的鱼种为好。

(四) SLDH 同工酶的病理变化

正常草鱼种SLDH 同工酶谱型是5条区带,酶相对活性顺序是 SLDH₁<SLDH₂<SLDH₃<SLDH₄<SLDH₅,而病鱼在潜伏期和发展期的 SLDH 同工酶的相对活性

表 3 正常鱼与病鱼 SLDH 同工酶活性含量比较

Tab. 3 Comparison of SLDH isozyme activity between diseased and normal fish

组 别 Series		SLDH-1 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.	SLDH-2 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.	SLDH-3 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.	SLDH-4 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.	SLDH-5 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.	SLDH-6 (%) 均数±标准差 Mean±S. D.
正常鱼 Control group		13.12±2.77 (10)	15.17±4.30 (10)	17.13±33.23 (10)	23.19±4.29 (10)	29.28±3.89 (10)	
自然感染病鱼(潜伏期) Naturally infected fish (latent period)		30.51±12.08 (20)	27.50±10.32 (20)	16.97±11.08 (20)	11.72±9.96 (20)	11.85±11.46 (20)	9.64±5.72 (3)
人工感染病毒来源 Source of virus for artificial infection	广济县 Guangji county	26.72±8.12 (28)	22.71±6.78 (28)	16.14±6.07 (28)	15.12±6.72 (28)	15.42±6.95 (28)	11.07±6.35 (10)
	水生所 Institute of Hydrobiology	26.75±12.73 (16)	22.88±6.70 (16)	17.29±11.54 (16)	10.79±6.79 (16)	17.43±9.39 (16)	10.69±9.13 (5)
	麻城县 Macheng county	16.41±11.08 (4)	18.65±2.08 (4)	17.34±1.60 (4)	16.43±4.59 (4)	18.38±3.75 (4)	17.06±7.16 (3)

注：括弧内数字表示测定的鱼数 Data in brackets indicate number of fish determined.

表 4 正常鱼和病鱼乳酸脱氢酶同工酶相对活性的顺序

Tab. 4 The order of relative activity of lactate dehydrogenase (SLDH) isozyme in diseased and normal fish

组 别 Series		SLDH 同工酶相对活性的顺序 The order of the relative activity of SLDH isozyme
正常鱼 Control fish		SLDH-1<SLDH-2<SLDH-3<SLDH-4<SLDH-5
自然感染病鱼(潜伏期) Natural infected fish (latent period)		SLDH-1>SLDH-2>SLDH-3>SLDH-5>SLDH-4>SLDH-6
人工感染病毒来源 Source of virus for artificial infection	广济县 Guangji county	SLDH-1>SLDH-2>SLDH-3>SLDH-5>SLDH-4>SLDH-6
	水生所 Institute of Hydrobiology	SLDH-1>SLDH-2>SLDH-3>SLDH-5>SLDH-4>SLDH-6
	麻城县 Macheng county	SLDH-2>SLDH-5>SLDH-3>SLDH-6>SLDH-4>SLDH-1

含量出现紊乱。并且在部分病鱼的电泳 SLDH 同工酶谱靠阴极位置明显多出一条区带，我们称为 SLDH₆。

水生所和广济县毒源人工感染发展期病鱼的 SLDH 同工酶相对活性顺序为 SLDH₁> SLDH₂> SLDH₃> SLDH₅> SLDH₄> SLDH₆。

湖北麻城县毒源人工感染发展期病鱼的 SLDH 同工酶相对活性顺序： SLDH₂> SLDH₅> SLDH₃> SLDH₆> SLDH₄> SLDH₁。

讨 论

草鱼出血病的症状,主要表现在鱼体各部位的充血,由于充血的部位不同,故病症为不同的类型,如肌肉充血型、红鳍红鳃盖型、肠炎型等。根据这些肉眼可见的症状,往往将此病笼统地归之于体表病或循环系统病。但从血液病理的研究结果分析,血液中红血球、血红蛋白大幅度下降,血清电解质紊乱,血浆总蛋白以及血清尿素氮、胆固醇下降等,明显反映出病鱼肝、肾器官受到损害的血液变化特征。随着病情的发展,血液病理变化造成鱼体生理功能严重失调,使毛细血管扩张,凝血作用减弱等,从而造成出血症。无疑,草鱼出血病是一种肝、肾器官的疾病。

在鱼类病毒病中,河鲈病毒病 (CCV), 病毒性出血腐败病 (VHS) 和传染性造血器官坏死病 (IHN) 三种病的症状与草鱼出血病的症状比较相似。据 Wolf (1976)^[6]、Plumb 等 (1974)^[3] 的研究,这些病毒主要是损坏肾组织。王精豹等 (1980) 在进行此病病毒电镜观察时,从肾组织中发现病毒颗粒^[4]。从毒力试验结果来看,肾组织是草鱼出血病病毒侵袭最严重的器官。据杨端等 (1981) 的实验结果^[7],阐明了草鱼不同组织中的 LDH 同工酶谱型,并发现肝中还具有另一组分。Wilson 等 (1973) 也从肝中分离出很高活性的向负极游动的 LDH 同工酶带,这种肝组织中特殊的同工酶也存在于其它鲤科鱼中^[5]。研究表明在部分病鱼体内出现了第六条区带 (SLDH₆), 这条向负极游动的同工酶带似乎与肝中向负极游动的区带相似。由此可见,患出血病病鱼体内有可能因为肝组织遭受损伤导致 LDH 同工酶释放至血液中,因此,形成了 SLDH 同工酶第六条区带的出现。

病鱼 SLDH 同工酶活性含量出现 $SLDH_1 > SLDH_2$ 的病理变化,其原因可能是因病毒侵袭肾组织,使其功能受到损害,而产生严重贫血和肾功能失调。这与杨端等 (1981) 的结论较为一致^[7]。血液病理的研究表明,病毒所引起的鱼类肌体出血症状是因肝、肾组织器官受到损害所致。显然与他们的观察结果是吻合的。

草鱼出血病的症状,主要表现在鱼体充血的部位不同,由于不同部位的病灶,经常会造成误诊。为了正确判断病因,根据病鱼的一系列血液病理变化及 SLDH 同工酶出现第六条带比例不同,相对活性变化也不一致的结果推测,草鱼出血病的病毒类型很可能有异株存在。这与朱蓝菲 (1982) 把 LDH 同工酶应用到鱼类的遗传分类上作为监测手段的做法是一致的^[2]。对于这种推测是否准确,还需要进一步研究。

Amend 等 (1974) 报道^[8],虹鳟在人工感染 IHN 病毒后,第四天即可出现红细胞、血红蛋白、血清重碳酸盐以及乳酸脱氢酶同工酶的早期病理变化,而病鱼症状的出现则在 8—9 天后。这一结果在我们的研究中也同样地出现,并且出血病的早期血液变化内容更多,这就有可能为草鱼出血病的早期预报或预测提供可行的方法。由于草鱼病的病原体较多,几种主要草鱼病,如烂鳃、肠炎和赤皮病等的血液病理变化尚不明瞭,它们与出血病血液变化的差别还无法比较,环境因子对血液变化的关系中某些因子还需深入探索,准确的预测、预报还需费时日。但从我国草鱼鱼种培育阶段鱼病发病季节来看,除了出血病以外,严重的鱼病并不多,因此,即使几种鱼病的血液变化难以区别,只要能够作出鱼病可能

发生的早期预测,从而及时采取预防措施,对淡水渔业增产也是有利的。因此,如何简化血液检验的方法,选择血液检验项目,从而使血液检验能成为鱼病诊断、预测或检疫的一种有效方法,也应是鱼类血液病理研究的课题。

参 考 文 献

- [1] 王精豹, 1980. 草鱼出血病病原的研究 II. 电镜观察. 水生生物学集刊, 7(1): 85—80.
- [2] 朱蓝菲, 1982. 几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较. 水生生物学集刊, 7(4): 539—545.
- [3] 朱心玲、贾丽珠、张明瑛, 1985. 草鱼血液学的研究 I. 九项血液常数的周年变化. 水生生物学报, 9(3): 248—257.
- [4] 米瑞美, 1982. 草鱼、鲤和鲢血液学指标的测定. 淡水渔业, (4): 10—16.
- [5] 林光华, 1979. 鲫鱼血液的研究. 动物学报, 25(3): 210—219.
- [6] 赵明蓓、苏泽古、黄文郁、王祖熊, 1979. 池养鲤和草鱼血液学指标的研究. 水生生物学集刊, 6(4): 453—464.
- [7] 杨端、周仁珍, 1981. 青、草、鲢、鳙的乳酸脱氢酶同工酶谱及其与毒物作用的关系. 环境科学学报, 1(3): 250—257.
- [8] Amend, D. F. & Smith, L., 1974. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Early changes in blood and aspects of the immune response after infection of IHN-virus. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 1371—1378.
- [9] Barham, W. T., Smit, G. L. & Schonbee, H. J. 1980. The hematological assesment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 17: 275—281.
- [10] Harbell, S. C. Hodgkins, H. O. and Schiewe, M. H., 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) *J. Fish Diseases*, 2(5): 391—404.
- [11] Lowe-Jinde, L., 1979. Some observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected with *Cryptobia salmositica*, *J. Fish Biol.*, 14: 297—302.
- [12] Lowe-Jinde, L., 1980. Observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected with *Cryptobia salmositica*, *J. Fish Biol.*, 17: 23—30.
- [13] Plumb, J. A., Gaines, J. L., Mora, E. C. & Bradley, G. G., 1974. Histopathology and electron microscopy of channel catfish virus in infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.*, 6: 661—664.
- [14] Richards, R. H. and Pickering, A. D., 1979. Changes in serum parameters of *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* L., *J. Fish Diseases*, 2(3): 197—206.
- [15] Wilson, F. R., Gregory, S. Whitt and Prosser, C. L., 1973. Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns in tissues of temperature-acclimated goldfish (*Carassius auratus* L.) *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 105—116.
- [16] Wolf, K., 1976. Fish viral diseases in North America, 1971—75, and recent research of the Eastern Fish Disease Laboratory, U. S. A., *Fish Pathology*, 10(2): 135—154.

HAEMOPATHOLOGICAL STUDY ON LATENT AND DEVELOPING PERIOD OF HEMORRHAGIC DISEASE OF GRASS CARP FINGERLINGS

Zhu Xinling Jia Lizhu and Zhang Mingying

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

The paper describes some of the early changes in blood of the grass carp following artificial infection of Reovirus. The activities of serum lactic dehydrogenase (SLDH) isozyme of Reovirus-infected fish were compared with normal individuals. Hematological changes of fish naturally suffering from this disease were studied at the epizootic area. All data obtained were treated statistically.

Hematological and blood chemical changes were examined after fish were infected artificially by Reovirus. Significant reduction of red blood cell (RBC), total plasma protein and urea nitrogen occurred in the latent period by 4—5 days, although there were no obvious symptoms. When entering the developing period by 8 days, fish were moribund with typical hemorrhagic symptom, with RBC, hemoglobin (Hb) and total protein reduced even more obviously. However the urea nitrogen of the diseased fish was still maintained at the level of latent period. The plasma glucose concentration also changed insignificantly. The relative activity of SLDH isozyme seemed to be deranged during the latent and developing periods of the disease. In the control fish, its order was $SLDH_1 < SLDH_2 < SLDH_3 < SLDH_4 < SLDH_5$ but in the infected fish, the order was reversed into $SLDH_1 > SLDH_2 > SLDH_3 > SLDH_5 > SLDH_4 > SLDH_6$, in which the last band (SLDH₆) was detected near negative pole on the cellulose acetate membrane electropherogram of some infected fish.

The early hemopathologic changes in fish occurred during epizootic period. Two groups of fish were examined. One group consisted of fish with pronounced symptom, and the other group was taken randomly from the same fish pond. Results showed that changes in RBC, Hb, total protein, glucose concentration, urea nitrogen and SLDH isozyme occurred in both groups and were similar to those found in artificially infected fish. Moreover, there was a marked increase in the level of serum potassium and an obvious reduction of serum calcium. Correlation between body weight of infected fish in the latent period and various blood parameters was analyzed. It showed that the contents of RBC, Hb, total protein, glucose concentration, urea nitrogen, albumen were negatively correlated to body weight. But the relations of body weight to the levels of serum potassium and calcium were inconspicuous.

Key words Grass carp, diseases of fishes, Reovirus, hemopathology