

首例斑节对虾越冬亲虾发生杆状病毒的皮下及造血组织坏死症研究*

黄 隽 王秀华 宋晓玲 杨丛海 于 佳

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 湛江长洪对虾苗种实验场的斑节对虾转入越冬池后3~10d内发生暴发性死亡, 症状与北方地区杆状病毒的皮下及造血组织坏死症一致。病理学研究表明, 所有发病虾样的皮下组织、造血组织、结缔组织、肝胰腺血窦、淋巴器官等细胞核均存在严重的HHNBV病灶, 只有20%的发病对虾肝胰腺中观察到轻微感染的MBV包涵体。HHNBV单抗的酶联免疫染色, 可对HHNBV的病灶产生特异性着色, 对虾组织结构和MBV包涵体均不着色。在山东培育三代并养殖16个月的斑节对虾中也观察到与湛江发病的越冬亲虾相同的情况。以上说明, 近年来在广东一带HHNBV是值得重视的病原, 其危害可能重于MBV。对于发生过对虾暴发性流行病的群体来说, 不宜用来作为亲虾。

关键词 斑节对虾 越冬亲虾 杆状病毒的皮下及造血组织坏死症 单抗酶联免疫染色

1993年以来对虾暴发性流行病在我国沿海地区的对虾养殖场大面积发生, 造成养殖对虾大量死亡。研究表明, 该病的实质是杆状病毒的皮下及造血组织坏死, 发病对虾空胃, 甲壳易于剥离真皮, 部分对虾在甲壳内面存在有典型的白斑, 光镜下可见皮下组织(包括对虾前肠、后肠上皮, 真皮, 以及鳃等), 造血组织, 触角腺, 肝胰腺血窦等细胞核内存在大量的包涵体样物质。病原为一种新的对虾病毒: 皮下及造血组织坏死杆状病毒(Hypodermal and hemotopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)^[1]。这种病毒能引起北方养殖的斑节对虾感染和发病^[1,2]。但亲虾的感染未见报道。1991年以来, 广东和福建发现斑节对虾有斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon*-type baculovirus, MBV)感染^[1]。对虾暴发性流行病似乎也始发于1991年, 当时发现有“头胸甲白斑、肝胰腺肿大综合症”, 患该病的对虾在一周内大量死亡^[3], 与1993年以来在北方地区发现的杆状病毒的皮下及造血组织坏死

* 本文的样品采集工作得到了有关对虾越冬育苗单位的热情帮助, 组织切片工作由本所养殖病害研究室张立敬同志完成, 特此致谢!

收到日期: 1995-07-10, 07-27 修回

(1) 徐利生, 陈福华, 胡俊楚, 魏乃伟, 1991, 我国大陆地区首例斑节对虾杆状病毒(MBV)病诊断研究。(个人交流)

症类似,但病原研究尚未明了,多数认为 MBV 在广东和福建地区的对虾暴发性流行病中是主要的病原(会议交流)。我们于 1993 年 12 月至 1994 年 5 月在湛江进行斑节对虾的越冬和育苗工作,遇到斑节对虾越冬亲虾大量死亡的情况,采集了数尾发病越冬亲虾,进行组织病理学和单克隆抗体组织化学研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 斑节对虾越冬亲虾

广东省湛江市长洪对虾种苗实验场从 2 个地点购进斑节对虾进行越冬或用于产卵。一为 1993 年 12 月 24 日至 1994 年 1 月 5 日自湛江市水产局养殖场购进 347 尾养成虾,平均体长 23.15cm,该虾池混养有尖吻鲈;二为 1994 年 4 月 12 日至 17 日自阳西县溪头镇丰头围虾场购进 12 尾越冬后的鱼塍斑节对虾,平均体长 18.6cm。这些亲虾的上一代均为东南亚进口亲虾。越冬期饲料主要为海区捕捞的杂虾(3~4cm)、乌贼、杂鱼和配合饲料等。

1.2 病症观察及样品采集

观察亲虾的摄食、行为、外观、血淋巴凝固时间等,记录各批亲虾的死亡率。发病对虾在头胸部肝胰腺内分 3~4 个部位注射 0.5ml Davidson's AFA^[4],用锋利的刀片切去腹节,将头胸部沿中线剖为两半,置于 Davidson's AFA 固定液内固定 24h,随后换为 50%乙醇,带回实验室。

1.3 组织切片与 H-E 染色

固定的对虾头胸部用解剖刀切取从胃中部到肝胰腺中部的一段,切削成约 1cm³ 的方块,按常规方法^[5]脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。切片经常规的苏木精—伊红(H-E)染色,镜下观察。

1.4 组织切片的单抗酶联免疫染色^[6]

HHNBV 单克隆抗体由本实验室研制^[7]。上述方法的石蜡切片经脱蜡复水至 0.1M PBS 中,用 0.1%胰酶消化切片 10min,加 10%小牛血清封闭非特异性结合位点,在湿盒内加 HHNBV 单克隆抗体,28℃孵育 60min,用 0.1M PBS 清洗 3 次,每次 4min,再加 HRP—羊抗鼠 IgG,28℃孵育 60min,按前步骤清洗后加上含 0.3mg/ml 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)的显色液,室温显色 30min,切片的一部分用 Ehrlich's 苏木精染色 5min,0.1% HCl 分色 1min 后,按常规方法脱水,透明,中性树胶封片,镜下观察。

2 结果

2.1 斑节对虾的发病与症状

2.1.1 亲虾病情观察 在二批斑节对虾养成池中,都有过程度不一的发病,剩下的少量虾苗在后来的养殖中一直未见有明显的发病,似乎是正常虾,但这些对虾经捕捞、运输,放入越冬池,暂养 2~3d 后相继出现病症。一般而言,对虾越冬入池后的 1~2d 内会出现少量受伤死亡,死亡率多在 5%以下,而从该场两个越冬池共 75 尾斑节对虾入池后死亡

的时间统计(图1)可看出,死亡高峰出现在第3~6d,在这四天中的死亡率达到50%。移池后发病死亡情况还在另一个池中出现,该池对虾入池后经过41d的暂养,病情已经基本稳定,转移到另一越冬池后,在5~10d内便又发生爆发性死亡。12尾鱼温越冬的斑节对虾也在入池后的3~5d内全部死光。

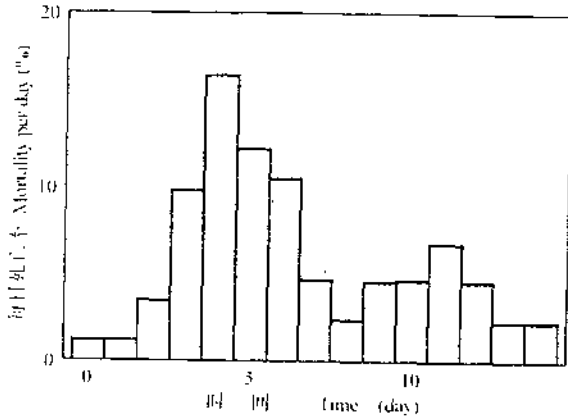


图1 斑节对虾越冬入池后发生爆发性死亡过程

Fig. 1. Explosive deaths of *Penaeus monodon* after transmigrating over winter ponds

2.1.2 亲虾发病症状 越冬池内发病的斑节对虾行为表现为不摄食,行动迟缓,腹部躬起,常常静卧池底,直到死后仍保持站立姿势。外观症状与杆状病毒的皮下及造血组织坏死症相同,多数病虾头胸甲出现直径约0.1~2mm的白点,位于甲壳内面,大小不等,呈分散或连接成片,分布不均,近额角侧沟附近较多而大,斑点一旦出现,则虾在短短几天内就会死亡;正常对虾在光线暗淡的越冬池中用手电灯光照射,会看到其眼球有明显的反光,越冬池中眼球不反光的个体多数是典型的病虾;正常对虾的血淋巴取出后1min内发生血凝,而发病斑节对虾亲虾血淋巴稀薄,不凝固;大部分发病的斑节对虾在临死或刚死后头胸部均不发黄,个别对虾也只是鳃盖区发黄,鳃和肝胰腺区未见发黄。

2.2 组织病理学观察

2.2.1 HHNBV感染的组织病理学 取样固定了11尾发病或死亡的上述斑节对虾,经组织切片和H-E染色,其中10尾的胃上皮组织、结缔组织、造血组织、肝胰腺血窦、淋巴器官、触角腺、鳃等组织细胞核均出现膨大和核内均匀的深紫红色着色,与极严重的杆状病毒性皮下及造血组织坏死症的组织病理变化^[1]完全一致(图版I, A);另1尾由于死亡时间过久,组织发生全面坏死,细胞结构及病变已无法观察。对虾眼球基部的结缔组织和上皮组织也有严重的感染,与正常对虾的眼相比,在顶部的晶体锥体中,出现大量的嗜酸性颗粒,颗粒直径最大的达2μm左右。这些颗粒可能导致光线的散射,因而虾眼反光消失。

2.2.2 斑节对虾亲虾肝胰腺内的组织病理变化 在所有样品中,有8尾亲虾的切片可观察到肝胰腺组织,其中6尾的肝胰腺除了血窦的血细胞出现典型的HHNBV感染的病理变化外,肝胰腺上皮细胞核未见有任何病毒感染的病理变化,另2尾肝胰腺血窦的血细胞有同样HHNBV感染的病理变化,5%以下的肝胰腺上皮细胞核还出现膨大,染深紫

色,并且在其内部可见到多块嗜酸性较强的包涵体,与 MBV 在肝胰腺上皮细胞核的病理变化^[8]相符,而病变程度很轻(图版 I.B)。说明这两尾存在 HHNBV 和 MBV 的共同感染,以 HHNBV 感染为主。

2.3 单抗酶联免疫染色

将组织病理观察到有 MBV 感染的患杆状病毒性皮下及造血组织坏死症亲虾切片用 HHNBV 单克隆抗体^[7]进行酶联免疫染色,可观察到组织病理学 H-E 染色的胃上皮组织、结缔组织、造血组织、肝胰腺血窦、淋巴器官、触角腺、鳃等组织的细胞核内 HHNBV 病灶有明显较深的着色,而对虾组织结构的着色浅而均匀,与 1994 年采集的山东崂山发病的中国对虾的 HHNBV 单抗酶联免疫染色结果一致^[7](图版 I.C)。在该斑节对虾的肝胰腺中,除血窦中病变的血细胞核有特异性着色外,MBV 的病灶部位未见有明显的特异性着色,深度与背景相近,而且在 MBV 病变的核内,酶联免疫染色对多角体的着色较背景还浅(图版 I.D)。因此,在未经衬染的单抗酶联免疫染色的病理切片中,HHNBV 感染的胞核易于观察,即使在低倍镜下也可轻易辨认,而 MBV 感染的胞核很难分辨。

2.4 在山东的斑节对虾亲虾的发病

在观察到广东湛江的斑节对虾越冬亲虾发病情况后,我们于 1994 年 10 月又在山东崂山上马对虾育苗场观察到了一次斑节对虾亲虾的发病。这批准准备用作亲虾的斑节对虾是在山东生长了 16 个月的斑节对虾,该苗种的历史为 1991 年购自福建的亲虾培育苗种后,当年养成,1992 年作为亲虾再培育第二代苗种,1993 年培育第三代苗种,养殖于黄海水产研究所青岛实验基地,1993~1994 年越冬期转至崂山上马对虾育苗场,计 300 余尾,体长约 6~8cm 不等。1994 年养成期养于该场室外水泥池内,进水未经任何过滤,在 6~9 月间该场虾池的中国对虾发生大面积对虾暴发性流行病时,该池斑节对虾亦出现发病。至 1994 年 9 月,约剩 30 余尾,体长达 20cm 左右,在转入室内产卵池 2~3 天后,准备催熟产卵时开始明显发病死亡,所表现的症状与在广东湛江所观察到的完全相同。该场同时还准备用发生过暴发性流行病后,虾池中的未死亡中国对虾进行越冬,但在对虾入池后的几天内也都发生暴发性死亡。山东的这批对虾经 T-E 染色^[9]诊断证实为杆状病毒的皮下及造血组织坏死症。

3 讨论

在我国北方地区包括浙江在内的对虾暴发性流行病,病原主要是 HHNBV,包括的对虾种类有中国对虾、日本对虾和斑节对虾,该病的实质是杆状病毒的皮下及造血组织坏死^[3]。广东和福建的对虾暴发性流行病早于北方地区 1~2 年,湛江一带 1991 年就发现有“头胸甲白点、肝胰腺肿大综合症”,发病对虾呈暴发性死亡,使用任何药物处理无效,病原不明^[3]。在最近的学术交流中,我们了解到 MBV 被认为是广东和福建对虾暴发性流行病的主要病原,类似 HHNBV 的感染未见报道。我们在湛江进行斑节对虾越冬和育苗的试验中,遇到的亲虾发生流行病,其症状与 1991 年湛江一带的“头胸甲白点、肝胰腺肿大综合症”有相似之处,与北方地区的杆状病毒性皮下及造血组织坏死症以及崂山发现的斑节对虾亲虾的暴发性流行病一致。病理学研究只在 20% 的发病对虾中观察到了轻度的

MBV 感染,更严重的病变在所有病虾的皮下及造血组织中出现,因此我们认为 HHNBV 是上述斑节对虾越冬亲虾暴发性流行病的病原,该结论与 MBV 是广东地区对虾暴发性流行病的主要病原不符。

湛江的发病斑节对虾亲虾的上一代来自于东南亚,但我们认为这批虾的发病与黄头病毒(Yellow-head virus, YHV)无关,其一,黄头病虾体色灰白,肝胰腺和鳃淡黄^[10],本文未观察到这一现象,所见的甲壳上明显的白斑在黄头病虾中未见报道;其二,两者的组织细胞病理变化不同,黄头病是细胞质内的病变^[10],本文所见是典型的细胞核病变;其三,在山东培育了三代并养殖 16 个月的斑节对虾发生暴发性流行病的症状及病情与湛江亲虾的完全相同;其四,HHNBV 特异的单克隆抗体能与该发病对虾的细胞核病灶特异性结合,与 MBV 细胞核病灶不发生反应;而 YHV 属于弹状病毒科^[8],与杆状病毒科的成员发生交叉反应的可能性极小。由于本文采用 Davidson's AFA 固定了所有样品,不利于电镜制片和观察,我们仍将进一步尝试用电镜对病毒粒子大小进行测量。

对虾暴发性流行病与环境因子的突变有很大的相关性,大排大灌和大雨后养殖对虾暴发性死亡的情况屡见不鲜,本文观察到斑节对虾在转入越冬池或移池后 3~10d 内暴发性死亡,也属此类原因诱发所致。这说明在入池前,这些对虾可能已经发生了 HHNBV 的感染,由于虾龄大,抵抗力强,病毒的感染呈潜伏状态,环境的突变,使对虾发生应激反应,虾体生理机能改变,导致潜伏感染的病毒暴发。

在对虾暴发性流行病的大批死亡之后,池塘内常可见还有少量对虾的存活,在能否用这种对虾作为亲虾进行越冬的问题上,尚存有疑问。或这种对虾具有抗病能力,能产生抗病的子代;或这种对虾是潜伏性带毒,会将病毒传给子代。从所观察到的情况来看,后者的可能性是存在的,因此,对于发生过对虾暴发性流行病的群体来说,不宜作为亲虾的来源。

参 考 文 献

- 1 黄健,宋晓玲,于佳,等. 杆状病毒的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病病原病理学研究. 海洋水产研究, 1995, 16: (1)1-10
- 2 蔡生力,黄健,王崇明,等. 对虾暴发性流行病的流行病学研究. 水产学报, 1995, 19(2): 112-119
- 3 胡绍群. 广东沿海养殖对虾疾病流行特点及病因分析. 全国对虾养殖病害防治学术讨论会论文摘要汇编, 1993: 83-85
- 4 Bell, T. A., & Lightner, D. V. (eds.). A handbook of normal penaeid shrimp histology, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 1988, 2-6
- 5 刘介眉,严庆汉,路英杰,等. 病理组织染色的理论方法和应用, 北京: 人民卫生出版社, 1983: 41-120
- 6 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术, 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1980: 102-111
- 7 于佳,黄健,宋晓玲,等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的研制. 海洋水产研究, 1995, 16: (1)24-30
- 8 陈秀男,张朴生,郭光雄. 草虾杆状病毒之特性. 台北, 1994: 10-45
- 9 黄健,符丛海,于佳,等. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断. 海洋科学, 1995, (1): 32-38
- 10 Flegel, T. W., Sriratanana, S., Wongteerasupaya, C., Boonnsaeng, V., Panyim, S., Withyachumnarnkul, L. Progress in characterization and control of Yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: Browdy, C. L., and Hopkins, J. S. (eds.) Swimming through troubled water, Proceedings of the special session on shrimp farming. Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1995: 76-83