

1994年浙江省对虾暴发性流行病病原 及传播途径的初步调查

黄 健 于 佳 宋晓玲 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 用 T-E 染色、单克隆抗体的 ELISA 现场诊断、组织切片和 H-E 染色和电镜观察等不同方法对 1994 年浙江省乐清和温岭两地区虾池及海区样品进行了现场和实验室检查。结果说明, 1994 年浙江省对虾暴发性流行病实质上是杆状病毒性的皮下及造血组织坏死, 病原为 HHNBV。检查到的 HPV 不是这场暴发病的病原。对非对虾类生物和对虾鲜活饲料的单抗 ELISA 检测表明, 海区张网饲料可能是 1994 年浙江对虾暴发性流行病的主要传染源, 病虾池中除对虾外, 其它甲壳类生物在该病的传播上可能也起到一定的作用。这些生物除了可能传播 HHNBV 外, 还可能传播 HPV。

关键词: 对虾暴发性流行病 皮下及造血组织坏死杆状病毒 传播途径
单克隆抗体

1993 年 4 月~8 月, 我国从南到北的养殖对虾发生了暴发性流行病, 整个对虾养殖业受到了严重打击。通过对该病病原的研究, 我们认为该病实质上是杆状病毒引起的皮下及造血组织坏死症。病原是皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV)^[1]。从感染实验的结果分析, 该病毒感染对虾的最可能的途径是通过摄食^[2]。1994 年 5 月, 浙江省乐清县养殖对虾首先发生了类似的暴发性流行病, 随后温岭也相继发病, 我们于 5 月 20 日~22 日去该地区采样和现场检测, 取得了初步结果。

1 材料与方法

1.1 现场 T-E 染色诊断

取虾池中空腹对虾, 按前文方法^[2, 3]进行 T-E 现场染色诊断。

1.2 单克隆抗体的 ELISA 现场检测

1.2.1 单克隆抗体 含抗 HHNBV 单克隆抗体的 SP2/0 小鼠腹水和含抗 HPV 单克

* 本文的工作得到了全国对虾顾问组张金诚、俞开康、岑丰, 浙江省水产局林子祥副局长、孙晓明, 乐清水产局, 温岭水产局, 温州水产研究所, 各对虾养殖单位等的热情支持与大力协助, 谨表感谢。

收稿日期: 1995-07-10, 07-24 修回

隆抗体的 SP2/0 小鼠腹水由本实验室研制^[4], 4℃ 储存。用时以 0.1M PBS (NaCl, 0.1M; Na₂HPO₄, 0.01M; NaH₂PO₄, 0.005M; pH7.6) 稀释 5 倍。

1.2.2 HRP-羊抗鼠 IgG 1:1000 的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (批号: 9206), 购自军事医学科学院微生物流行病学研究所。-35℃ 冻存, 用时以 0.1M PBS 稀释 1000 倍。

1.2.3 样品的采集与处理 自乐清与温岭两地采集样品 (表 1)。采集所用剪刀、镊子等器械均用火焰灼烧, 再用水冷, 样品分别置于预先装有 0.1ml 2% NaN₃ 的 1.5ml 塑料离心管中。剪碎, 加入等体积 0.05M CBS (碳酸盐缓冲液, pH9.6)。混匀, 置冰浴存放待测。

表 1 1994 年浙江乐清和温岭虾池样品采集记录
(用于 HHNBV 和 HPV 的单克隆抗体 ELISA 检查)

Table 1. The collecting record of the specimens from shrimp ponds of in Yueqing and Wenling of Zhejiang 1994 (for examination of HHNBV and HPV by ELISA with Mabs)

样品编号 Codes	样品种类 Species	数量 Qty.	采样地点 Position	池号 No. Pond	发病情况 Case	其它说明 Explain
94052001a	中国对虾	4 尾	乐清	#2 池	对虾已发病	投喂海区张网饲料,
94052001b	缢蛏 (混养)	2 只	紫福塘			虾池进水网 60 目
94052002	中国对虾	4 尾		#1 池		一直投喂配合饲料
94052003a	中国对虾	4 尾				
94052003b	野生糠虾	25 尾	乐清盐盆	#4 池		投喂海区张网饲料
94052003c	野生白虾	7 尾			对虾已发病	
94052003d	泥蚶 (混养)	4 只				
94052003e	张网饲料	2g	从海区捕获			主要是糠虾和桡足类
94052003f	张网饲料	6 尾				主要是白虾、毛虾等
94052102	日本对虾	4 尾	温州水产研究所	收捕	未发病	
94052200	海区蓝蛤	2g		—	—	当地作对虾鲜活饲料
94052201a	中国对虾	4 尾				进水网为 40 目
94052201b	野生白虾	3 尾		#16 池	怀疑发病	投喂过海区张网饲料
94052201c	野生小蟹	3 尾	温岭			
94052202a	中国对虾	3 尾	长新塘			
94052202b	野生小蟹	2 尾		#24 池	对虾已发病	进水网 40 目, 一直投喂蓝蛤
94052202c	野生虾虎鱼	1 尾				
94052203	中国对虾	2 尾		#14 池	未发病	一直投喂蓝蛤, 进水网 40 目

1.2.4 ELISA 检测方法 参照杜平^[5]方法进行, 样品离心后的上清液分别依次加入两块一次性 40 孔微量酶标板中, 每个样品加一列 (4 孔), 每孔 100μl, 阳性对照采用 T

—E染色确定的发病虾,阴性对照采用小牛血清。室温下过夜。倒出样品液,甩干;加入清洗液(0.1M PBS,含1%吐温20, pH7.6),静置2min。如此再清洗2次。加入封闭液(10%小牛血清,用清洗液稀释),30min后倒净。每个样品的A、B行加入100 μ l稀释的HPV单克隆抗体腹水。C、D行加入100 μ l HHNBV单克隆抗体腹水。室温下放置2h,倒净。清洗4次。各孔加入100 μ l稀释后的HRP—羊抗鼠IgG;室温下放置2h,倒净。清洗4次。每孔再加入100 μ l显色液(柠檬酸,0.73mg; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.186mg; 邻苯二胺,0.04mg; 30% H_2O_2 , 0.1 μ l); 15~30min后观察显色反应的强弱,判定检测结果。

1.3 组织学切片和H—E染色检查

采集对虾及其它生物样品,按文献^[6]方法用Davidson's AFA固定,进行组织病理切片与H—E染色。

1.4 电镜观察

按前文^[1]方法固定对虾样品,用于电镜切片观察。

2 结果与讨论

2.1 T—E染色现场诊断

2.1.1 肝胰腺细小病毒包涵体的现场诊断 HPV包涵体存在于对虾肝胰腺。通过T—E染色,其包涵体呈致密、均匀的深蓝色或紫色^[3]。从乐清繁福塘#1虾池所取的2尾对虾的肝胰腺中均检出HPV包涵体。盐盆所取的对虾中未检出。在温州水产研究所从海上收捕的一尾日本对虾亦未检出HPV包涵体。

2.1.2 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死病的现场诊断 从乐清繁福塘#2虾池中取出的2尾中国对虾,具有空胃等症状^[1]。通过T—E现场染色观察,该对虾的胃区上皮组织和结缔组织中存在大量的膨大、嗜伊红的空泡化细胞核^[2](图版I, A),证明其为发生暴发病对虾。从盐盆所取的2尾中国对虾中也有1尾为暴发病对虾。在温州水产研究所的一个未发病的暂养池(94052101)中所取的4尾中国对虾和从海上收捕的3尾日本对虾,经T—E检查确定未发生暴发病。

用于单克隆抗体ELISA检测HPV和HHNBV的阳性对照均为乐清繁福塘#2虾池的中国对虾。

2.2 单克隆抗体的ELISA现场检测

对HPV和HHNBV进行单克隆抗体ELISA现场检测,24h内即可得出检测结果(图版I, B)。ELISA显色的阴性和阳性对照差别明显,用肉眼就可轻易判别。

2.2.1 HPV的单抗ELISA现场检测 对940520组的样品进行了两次HPV检测,940521和940522组样品进行了一次检测,结果列于表2。

在乐清所采的样品中,通过HPV的单克隆抗体ELISA检测,显示繁福塘#2发病池(94052001a)和#1未发病池(94052002)的中国对虾样品均存在HPV。盐盆#4发病池的对虾样品(94052003a)为HPV阴性,温州水产研究所的日本对虾(94052102)为HPV阳性。非对虾样品中,缢蛏(94052001b)、泥蚶(94052003d)、野生白虾(94052003c)为HPV阴性。野生糠虾(94052003b)、两种海区张网饲料(94052003e, f)均为HPV阳

性。在温岭所采的样品中,除蓝蛤(94052200)为 HPV 阴性外,其它样品包括#16池的中国对虾(94052201a)、野生白虾(94052201b)、野生小蟹(94052201c),#24池的中国对虾(94052202a)、野生小蟹(94052202b)、野生虾虎鱼(94052202c),和#14池的中国对虾(94052203)均为 HPV 阳性。

表2 1994年浙江乐清和温岭虾池样品 HPV 和 HHNBV 的单抗 ELISA 检测结果
Table 2. Results of examination of HHNBV and HPV for the specimens from the ponds in Yueqing and Wenling of Zhejiang 1994 by ELISA with MABs

样品编号 Codes	第一次 HPV	First exam HHNBV	第二次 HPV	Second exam HHNBV	样品编号 Codes	HPV	HHNBV
94052001a	++++	+	+	+++	94052102	+	-
94052001b	-	-	-	-	94052200	-	-
94052002	+	-	++++	-	94052201a	++	++++
94052003a	±	++ ±	-	++	94052201b	++	-
94052003b	±	-	+++	±	94052201c	+++	++++
94052003c	±	++	-	±	94052202a	++	++++
94052003d	-	-	-	-	94052202b	-	+++
94052003e	++	++	+++	++	94052202c	+++	++
94052003f	++++	+	++	+	94052203	+++	+

注:“-”为阴性;“+”为阳性;“±”为可疑。

Note:“-”: negative results; “+”: positive result; “±”: dubious.

对虾暴发性流行病的病理学研究、人工感染实验和流行病学调查的结果均说明, HPV 不是该病的病原^[1,7,8]。从浙江乐清和温岭对虾样品的 ELISA 检测结果来看, 94052003a 为发病对虾, HPV 为阴性;而 94052002 为未发病对虾, HPV 为阳性。这两个对虾样品的 HPV 检测结果与发病情况正好相反,亦支持上述结论。

另一方面,从非对虾样品的 HPV 检测结果可以看出,所检查的几种贝类均为 HPV 阴性。这预示贝类不是 HPV 的携带者。海区张网饲料及虾池糠虾、白虾均为 HPV 阳性,这些生物可能是 HPV 的传播者。

2.2.2 HHNBV 的单抗 ELISA 现场检测 表2同时列出了 HHNBV 的检测结果。在乐清所采的样品中,繁福塘#2发病池对虾(94052001a)和盐盆#4发病池对虾(94052003a)均为 HHNBV 阳性。繁福塘#1未发病池对虾(94052002)为 HHNBV 阴性,温州水产研究所收捕的日本对虾(未发病)(94052102)为 HHNBV 阴性。由此可见, HHNBV 的阳性结果与暴发性流行病的情况完全相符。

从乐清所取的非对虾类样品的 HHNBV 的单抗 ELISA 检测的结果可以看到,作为对虾“鲜活”饲料从海上张网捕获的甲壳类生物(94052003e 和 94052003f)显示出很强的 HHNBV 阳性结果,发病虾池中自然生长的白虾(94052003c)亦显示出强的 HHNBV 阳性;发病虾池中的糠虾(94052003b)、混养的缢蛏(94052001b)和泥蚶(94052003d)则为 HHNBV 阴性。

温岭的#14未发病池、#16怀疑有病池和#24发病池的对虾样品(94052203、94052201a和94052202a)均为HHNBV阳性。说明这三个池的对虾均发生了HHNBV感染, #14池未发病,可能是因为该病尚处于潜伏期。据了解,在#14池采样后的半月内,该池亦发生了暴发性流行病。

在非对虾类样品中,作为对虾饲料的蓝蛤(94052200)、#16池野生白虾(94052201b)和#24池中野生的小蟹(94052202b)为HHNBV阴性。而#16池野生小蟹(94052201c)和#24池中野生虾虎鱼(94052202c)为HHNBV阳性。

从以上单抗的ELISA检查结果来看,HHNBV是1994年浙江对虾暴发性流行病的病原。该病在浙江乐清和温岭部分虾池的传播是通过海区张网捕捞的甲壳类生物作为“鲜活”饲料投喂到虾池中而引起的。贝类可能不是病毒的携带者。虾池中野生的白虾、糠虾、蟹类及虾虎鱼等通过摄食病死虾或投喂的“鲜活”饲料而带有病原。因为杆状病毒只感染无脊椎的昆虫和甲壳动物^[9]。虾虎鱼的带毒现象可能是它胃中的病虾或其它带毒甲壳类动物所致。我们对山东几个地区的检查结果表明,桡足类浮游生物也经常出现HHNBV阳性^[10]。温岭几个虾场的进水网为40目,这不能阻挡海区桡足类浮游生物进入虾池。

2.3 组织切片和H-E染色检查

2.3.1 对虾类样品的组织切片和H-E染色 所采集的对虾类样品经组织切片和H-E染色,HHNBV和HPV包涵体的检查结果列于表3。

表3 1994年浙江乐清和温岭对虾样品组织切片检查结果
Table 3. The results of histopathological examination of specimens of shrimp from Yueqing and Wenling of Zhejiang 1994

样品编号 Codes of specimens	HHNBV 检查结果 Exam. of HHNBV			HPV 检查结果 Exam. of HPV		
	样品数 No. Sample	阳性数 Positive	感染程度 Infectiosity	样品数 No. Sample	阳性数 Positive	感染程度 Infectiosity
94052001a	6	4	严重 S	6	1	很轻微 VI
94052002	5	0	—	2	0	—
94052003a	8	8	极严重 VS	8	0	—
94052101	32	0	—	24	5	很轻微 VI
94052102	35	0	—	28	2	很轻微 VI
94052201a	7	0	—	1	1	中度 E
94052202a	8	8	极严重 VS	8	0	—
94052203	2	0	—	—	—	—

注:“感染程度”指阳性感染的对虾病灶组织细胞的感染程度。病灶组织细胞感染率在60%以上为“极严重”;在30%以上为“严重”;5%以上为“中度”;在0.1%以下为“很轻微”。

Notes: “Infectiosity” indicated the infective degree of the cells in the pathologic tissues of the shrimp infected. “VS”, “very serious”, the infective ratio of the cells was above 60%; “S”, “serious”, the ratio between 30% and 60%; “E”, “evident”, 5%~30%; “VI”, “very insignificant”, under 0.1% cells infected.

乐清繁福塘#2池(94052001a)、盐盆#4池(94052003a)、温岭长新塘#24池