

单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径

黄 捷 于 佳 王秀华 宋晓玲

麻次松 赵法箴 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 用单克隆抗体 ELISA 技术对 1994 年 5 月~7 月自山东和辽宁采集的虾池和海区材料, 包括对虾、浮游生物、小型甲壳类生物、鱼类、底泥及饲料等共 192 个样品进行了对虾暴发性流行病原 HHNBV 的检测。结果表明, 对虾中的 HHNBV 阳性与虾池发病情况基本相符, 用单抗 ELISA 方法可提前 20~40d 对虾池的发病可能性作出预报; 桡足类浮游生物的带毒率高于对虾, 且其阳性的出现早于对虾, 沿岸海区的桡足类浮游生物有较高的阳性率, 它可能是对虾暴发性流行病的主要病原携带者; 部分地区的卤虫也带有 HHNBV, 同时还从糠虾等小型甲壳类生物中检出了病原。

关键词: 对虾暴发性流行病 皮下及造血组织坏死病毒 传播途径
单克隆抗体

引起 1993 年对虾大面积死亡的病原为皮下及造血组织坏死杆状病毒 (Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, 简称 HHNBV)^[1], 该病主要通过对虾摄食病原携带者感染健康对虾^[2]。我们在对该病毒提纯后, 进行了其单克隆抗体的研制, 获得了抗 HHNBV 的单克隆抗体^[3]。应用单克隆抗体的酶联免疫技术是一种较组织切片更为快速、灵敏的检测方法。国外研制的针对 IHNBV (传染性皮下及造血组织坏死病毒) 的单抗, 由于存在 IgM 与正常对虾血淋巴非特异性结合的问题, 还未用到检测新鲜对虾及其它生物类。1994 年 4 月我们首次用该抗体对青岛地区几个育苗场的亲虾、虾苗进行了 HHNBV 的检测^[4]。1994 年 5 月, 我们又将这一抗体用于浙江对虾暴发性流行病的发病区各类样品的检测, 首次从海区张网捕捞的“鲜活”饲料和虾池甲壳类生物中查出了 HHNBV^[5]。本文报道我们用 HHNBV 单克隆抗体 ELISA 技术对山东、辽宁等地虾池样品的检测结果。

* 本文的部分样品采集工作得到了山东省海水养殖研究所病害研究室赵增元等, 青岛海洋大学水产学院俞开康, 大连水产学院养殖系李华等, 以及有关地区的水产局和生产单位的大力支持和热情帮助, 特此致谢!

收稿日期: 1995-07-10, 07-24 修回

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 单克隆抗体 含抗 HHNBV 单克隆抗体的 SP2/0 小鼠腹水由本实验室研制^[3], 贮存于 4℃, 用前以 0.1M PBS (NaCl, 0.1M; Na_2HPO_4 , 0.01M; NaH_2PO_4 , 0.005M; pH7.6) 稀释 5 倍。

1.2.1 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, 冻存于 -35℃, 用前以 0.1M PBS 稀释 1000 倍。

1.2 样品的采集

在山东寿光、崂山、沾化、即墨、乳山及辽宁大连等地的虾场采集对虾及其它生物、饲料、底泥样品。采集的各样品编号及内容如表 1。其中每个对虾样品为 1~3 尾, 取对虾头胸胃后部到前 1/4 肝胰腺部分; 浮游生物样品用 120 目筛绢网捞取; 其它虾类样品取整体或参照对虾样品方法采集; 蟹类样品取其胃部或鳃部; 贝类样品取其鳃部或消化道; 鱼类样品取其胃部或消化道; 底泥和饲料样品随机采取 1g 左右。

1.3 样品的处理

每个样品采集前, 所用剪刀、镊子等器械均用火焰灼烧消毒。各样品采集后分别置于预装有 0.1ml 2% NaN_3 的 1.5ml 塑料离心管中, 加入 5 倍体积的包被液, 用剪刀绞碎, 再经 1~3 次冻融, 在台式离心机上 7000g 离心 2min, 上清液即可用于 ELISA 检测。

1.4 ELISA 检测方法^[4]

以上各样品上清液分别依次加入一次性 40 孔微量酶标板 (浙江玉环芦浦塑化器械厂) 中, 每个样品加 2 孔, 每孔 100 μl , 用小牛血清作阴性对照。4℃ 包被过夜, 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, 再倒净; 如此清洗 3 次; 加入封闭液 (含 1% 小牛血清的清洗液), 30min 后倒净, 每个样品的 2 孔中分别加入 100 μl 稀释的抗 HHNBV 单克隆抗体腹水, 室温 2h, 倒净; 清洗 4 次; 各孔加入 100 μl 稀释后的 HRP-羊抗鼠 IgG, 室温 2h, 倒净; 清洗 4 次; 每孔再加入 100 μl 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 μl); 15~30min 后, 观察显色反应的强弱, 各孔加入 100 μl 终止液 (1N H_2SO_4), 用 511 型酶标分析仪在 492nm 处测定各孔的吸光度, 计算 P/N 值^[6], 判定 ELISA 反应结果。

表 1

样品序号及说明

Table 1.

Sample No. and description

样品序号	采样日期	说 明	样品序号	采样日期	说 明
Sample No.	Date	Annotations	Sample No.	Date	Annotations
001	20/5/94	寿 #102 中国对虾	051	02/6/94	配合饲料
002		光 浮游生物	052	20/6/94	对虾(喂卤虫)
003		海 底泥	053		对虾(喂配饵)
004		立 #104 中国对虾	054	02/6/94	寿 #3 底泥
005		养 浮游生物	055		首批放养
006		殖 底泥	056	20/5/94	越冬中国
007		公 #106 中国对虾	057		对虾苗种
008		司 浮游生物	058	02/6/94	筑 #4 购自南方
009		底泥	059		公司 本场中国
010		#111 中国对虾	060		对虾苗种
011		浮游生物	061	20/6/94	浮游生物
012		底泥	062	02/6/94	底泥
013		#112 中国对虾	063		寿 物资公司盐田卤虫
014		浮游生物	064	20/6/94	光 市售卤虫
015		底泥	065		养殖 中国对虾
016	02/6/94	#102 中国对虾	066		公司 浮游生物
017		浮游生物	067		#9 底泥
018		底泥	068	20/5/94	海 兰蛤
019		#104 中国对虾	069		区 杂色蛤
020		浮游生物	070	02/6/94	样 浮游生物
021		底泥	071	20/6/94	品 浮游生物
022		#106 中国对虾	072		浮游生物
023		浮游生物	073		糠虾
024		底泥	074		梭鱼
025		#111 中国对虾	075	03/6/94	昌 中国对虾
026		浮游生物	076		邑 #7 中国对虾
027		底泥	077		西营 中国对虾
028		#112 糠虾	078		糠虾(饵料)
029		进水 浮游生物	079	04/6/94	崂 #1 中国对虾
030		网上 小鱼	080		山 糠虾
031		取样 杂质	081		棘 饲料卤虫
032		#112 中国对虾	082		洪 昆虫(水中)
033		浮游生物	083		#2 中国对虾
034		底泥	084		滩 池底蝇蛆
035	20/6/94	#102 中国对虾	085		镇 小鱼
036		浮游生物	086		蓄 浮游生物
037		#104 中国对虾	087		水池 浮游生物
038		小蟹	088		蟹胃
039		浮游生物	089		蟹腿
040		#106 中国对虾	090		白虾
041		浮游生物	091		白虾
042		#111 浮游生物	092		脱鱼胃
043		#112 中国对虾	093		糠虾
044		中国对虾	094	08/7/94	#1 糠虾
045		浮游生物	095		#2 糠虾
046		#208 中国对虾	096	08/6/94	红 对虾越冬苗
047		#210 中国对虾	097		岛 对虾海捕苗
048		浮游生物	098		镇 #1 中国对虾
049		#211 蟹类	099		日本对虾
050	20/5/94	饵料用卤虫	100		白虾

续表 1 continuation of table 1

样品序号	采样日期	说 明	样品序号	采样日期	说 明
Sample No.	Date	Annotations	Sample No.	Date	Annotations
101		卤虫	147		杂色蛤
102		#2 中国对虾	148		60 目网杂物
103		日本对虾	149	09/7/94	乳 #2 浮游生物
104		日本对虾	150		山 底泥
105		沙蚕	151		育 #3 中国对虾
106		蟹类	152		苗 浮游生物
107		水表昆虫	153		厂 底泥
108		海 白虾	154		#8 糠虾
109		区 毛虾	155		白虾
110		鼓虾	156		配合饲料
111		糠虾	157		鲜活饲料
112		进水网浮游生物	158		海区 浮游生物
113	13/6/94	沾 #16 中国对虾	159	20/6/94	三 #2 中国对虾
114		化 #21 中国对虾	160		虾 浮游生物
115		新 蟹类	161		场 #3 中国对虾
116		化 #23 中国对虾	162		#12 中国对虾
117		场 卤虫	163	09/7/94	浮游生物
118		农 #7 中国对虾	164		底泥
119		机 进水网幼蛤	165		蓄水 底泥
120		场 进水网杂物	166		池 浮游生物
121		进水渠小蟹	167	20/6/94	饵料 配合饲料
122		药饵	168		鲜杂虾
123	21/6/94	即 #8 中国对虾	169		冻糠虾
124	17/6/94	墨 #10 中国对虾	170		冻杂鱼
125	21/6/94	田 蟹类	171		冻熟贻贝
126		横 底泥	172		浪 北 #2 浮游生物
127		镇 #17 中国对虾	173		暖 底泥
128		蟹类	174		蓄水池浮游生物
129		白虾	175		邹 #8 浮游生物
130		泥螺	176		格 底泥
131		#18 中国对虾	177	18/6/94	东 港 中国对虾
132		蟹类	178	29/6/94	大 大 中国对虾
133		#19 中国对虾	179		连 魏 日本对虾
134		白虾	180		后 日本对虾
135		浮游生物	181		石 糠虾
136		底泥	182		虾 沙蚕
137		#20 中国对虾	183		场 小鱼苗
138		蟹类	184		鲑鱼胃内容物
139		海 中国对虾	185		端足类
140		区 白虾	186		冻饵中鼓虾
141		白虾	187		冻饵中毛虾
142		鲑鱼胃内对虾	188		冻饵中杂鱼
143		海葵胃内容物	189		七顶 中国对虾
144		蟹类	190		山周 蟹胃
145		蟹类	191		家虾 鲑鱼胃
146		杂鱼	192		场 牡蛎

2 结果

2.1 单克隆抗体 ELISA 对对虾样品的 HHNBV 检测

2.1.1 检测结果与虾池对虾暴发性流行病发生的关系 先后检测了 58 份对虾样品, 其中阳性为 24 份, 可疑为 14 份, 阴性为 20 份, P/N 值大于 1.75 的样品占 52% (表 2)。

表 2 单克隆抗体 ELISA 方法对不同虾池对虾样品的 HHNBV 检测结果

Table 2. Test of samples of Penaeid shrimp for HHNBV by ELISA with monoclonal antibody

样品序号 Sample No.	P/N+/-	附注 Case	样品序号 Sample No.	P/N+/-	附注 Case	样品序号 Sample No.	P/N+/-	附注 Case
001	-	7.11 发病池	055	3.7 +	至 7.12 尚未发病	113	1.0 -	6.13 未发病池
016	2.9 +		057	++ +	第 1 批苗发病	114	2.7 +	6.7 发病池
035	3.2 +		058	2.7 +		116	1.9 ±	6.13 已发病池
004	+	6.30 发病池	059	1.9 ±	第 2 批苗发病	123	2.1 +	6.21 已发病池
019	2.0 ±		060	1.1 -	第 3 批苗未发病	124	2.1 +	6.12 发病池
037	2.4 +		065	3.1 +	6.2 已发病池	127	3.8 +	6.21 未发病池
007	-	6.28 发病池	075	2.5 +	6.3 未发病池	131	2.7 +	6.21 未发病池
022	3.6 +		076	1.5 ±	6.3 已发病池	133	2.2 +	6.21 未发病池
040	1.1 -		077	2.9 +	6.3 已发病池	137	1.0 -	6.21 未发病池
010	± ±	6.26 发病池	079	1.2 -	至 7.31 未发病	139	1.3 -	
025	2.5 +		083	0.8 -	至 7.31 未发病	159	1.0 -	6.20 发病池
013	-	6.20 发病池	096	3.1 +	6.5 发病池	161	1.7 ±	6.20 发病池
032	2.1 +		097	1.4 -	8.21 发病池	162	1.7 ±	7.5 发病池
043	1.6 ±		098	1.8 ±	6.8 未发病池	151	1.4 -	至 9 月尚未发病
044	1.4 -		099	1.5 ±		177	2.2 +	6.15 已发病池
046	2.1 +	6.15 发病池	102	1.9 ±	6.8 未发病池	178	1.3 -	6.29 未发病池
047	2.2 +	6.20 发病池	103	1.6 ±		179	2.2 +	6.29 已发病池
052	1.5 ±	至 7.12 尚未发病	104	1.1 -		180	1.4 -	6.29 未发病池
053	1.3 -	至 7.12 尚未发病	118	1.7 ±	6.13 已发病池	189	1.0 -	6.29 已发病池
056	-	至 7.12 尚未发病						

注: “+/-”中阳性和阴性的判别依据 P/N 值, P/N 值 ≥ 2.1 为阳性, $1.5 \leq P/N$ 值 < 2.1 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性。

Note: In the column “+/-”, Positive and Negative were based on the value of P/N. $P/N \geq 2.1$ was positive, $1.5 \leq P/N < 2.1$ was questionable, $P/N < 1.5$ was negative.

从检测结果与虾池发病情况的相关性来看, 58 份对虾样品采自 39 个虾池 (39 批不同的虾苗), 其中 22 份样品采集于发病后的虾池, 经检测, 阳性 12 份, 可疑 7 份, 阴性 3

份, 不相符率为 12.5%; 30 份样品采集于尚未发病的虾池, 经检测阳性 12 份, 可疑 7 份, 阴性 17 份。对 7 份阳性样品的未发病虾池跟踪调查表明, 在首次查出阳性后的 40d 之内, 这些虾池均发生对虾暴发性流行病。说明 HHNBV 检测结果与虾池发病与否有显著相关性。

2.1.2 单抗 ELISA 检测方法对对虾暴发性流行病的预报 对寿光海立公司 5 个虾池进行了跟踪采样检查, 102 号池在发病前 39d(016 号样品)和 21d(035 号样品), 104 号池在发病前 41d(004 号样品)、28d(019 号样品)和 7d(037 号样品), 106 号池在发病前 26d(022 号样品), 111 号池在发病前 37d(010 号样品)和 24d(025 号样品), 112 号池在发病前 18d(032 号样品)都查出了 HHNBV 阳性或可疑阳性结果。而在 102 号池发病前 52d(001 号样品), 106 号池发病前 39d(007 号样品)和 8d(040 号样品), 112 号池发病前 31d(013 号样品), 以及 097 号样品(发病前 73d)的检测中结果均为阴性, 由此说明, 单抗 ELISA 方法对对虾样品的 HHNBV 检测, 在发病前 20~40d 内可以对虾池的发病与否作出预报。

2.2 单克隆抗体 ELISA 对浮游生物 HHNBV 带毒的检测

在不同时间或从不同地区采集的浮游生物的种群结构存在一定的差异, 但几乎所有样品中的 90%~95% 以上的生物个体是桡足类, 因此, 本文所检测的浮游生物样品主要是指桡足类生物。

检测 36 份桡足类浮游生物样品, 其中阳性 16 份, 可疑 10 份, 阴性 10 份。P/N 值大于 1.75 的样品占 61%, 略高于对虾样品的检测结果(表 3)。其阳性样品分布与对虾基本一致。寿光 102~112 的 5 个跟踪采样检测的虾池先后全部发病, 6 月 2 日和 6 月 20 日的检测中对虾和桡足类的结果几乎完全相符; 152 号样品的虾池到 9 月份以后, 一直未发生过典型的暴发性流行病, 该池对虾和桡足类样品的测试结果均为阴性。

表 3 单克隆抗体 ELISA 对桡足类浮游生物样品的 HHNBV 带毒检测结果

Table 3. Test of samples of Copepod plankton for HHNBV by ELISA with monoclonal antibody

样品序号 Sample No.	P/N 值 P/N	+/-	样品序号 Sample No.	P/N 值 P/N	+/-	样品序号 Sample No.	P/N 值 P/N	+/-
002	—	—	014	+++	+	088	0.8	—
017	2.4	+	033	2.2	+	112	1.9	±
036	2.5	+	029	0.5	—	135	1.2	—
005	++	+	045	2.1	+	160	2.2	+
020	1.8	±	048	1.3	—	163	2.6	+
039	>3.5	+	061	1.3	—	166	0.8	—
008	+++	+	066	3.5	+	149	1.6	±
023	1.9	±	070	2.1	+	152	1.2	—
041	2.9	+	071	1.8	±	158	1.6	±
011	+	+	072	1.7	±	172	2.8	+
026	2.0	±	086	0.9	—	174	1.2	—
042	1.8	±	087	3.0	+	175	1.5	±

5月20日采集的寿光样品的阳性率,对虾不到40%,桡足类浮游生物则达到80%,这说明桡足类浮游生物的带毒先于对虾。值得注意的是,所采集的5份沿岸海区桡足类浮游生物样品,经检测,全为阳性或可疑,P/N值大于1.75的占了3份。这说明在传播途径上,桡足类可能作为一个传播载体将病毒通过水源自海区带进虾池。

2.3 单抗 ELISA 对小型甲壳类生物样品的检测

采集的40份小型甲壳类生物样品包括白虾、糠虾、卤虫、蟹类(主要为厚蟹)、端足类、鼓虾、毛虾等7类。检测结果为5份阳性,8份可疑,27份阴性,P/N值大于1.75的约占25%,阳性率显著低于对虾或桡足类浮游生物。按各类生物的阳性强弱排序为:卤虫(3/6阳性,1/6可疑)>糠虾(2/6阳性,2/6可疑)>毛虾(1/1可疑)>白虾(2/9可疑)>鼓虾(1/1可疑)>蟹类(1/12可疑)>端足类(1/1阴性)(表4)。

表4 单克隆抗体 ELISA 对小型甲壳类生物样品 HHNBV 带毒的检测

Table 4. Test of samples of small crustacean for HHNBV by ELISA with monoclonal antibody

样品序号	样品种类	P/N 值	+/-	样品序号	样品种类	P/N 值	+/-	样品序号	样品种类	P/N 值	+/-
Sample No.	Species	P/N		Sample No.	Species	P/N		Sample No.	Species	P/N	
038	蟹类	1.4	-	028	糠虾	2.5	+	091	白虾	0.9	-
049		1.1	-	073		1.3	-	092		0.6	-
090		0.7	-	080		1.3	-	100		1.6	±
089		1.3	-	094		1.9	±	108		1.3	-
106		1.4	-	095		2.8	+	129		1.8	±
115		1.4	-	111		1.4	-	134		1.3	-
121		1.4	-	154		0.6	-	140		0.9	-
125		0.5	-	181		1.8	±	141		1.0	-
128		1.3	-	050	卤虫	±	±	155		1.0	-
132		0.8	-	063		3.2	+	109	毛虾	1.9	±
138		0.7	-	064		2.1	+	110	鼓虾	1.6	±
144		1.9	±	081		1.0	-	185	端足类	1.1	-
145		0.5	-	101		1.0	-				
190		1.0	-	117		2.3	+				

在6份卤虫样品中,4份为阳性或可疑。这4份中3份取自寿光(050, 063, 和 064号样品),另1份沾化样品(117号),仍是寿光的卤虫;2份阴性样品(081和101号)均为崂山卤虫。这说明卤虫带毒可能有地区性差别。

呈阳性的1份糠虾样品(028号)是从60目进水网上取的,这实质上是沿岸海区的样品;1份可疑(181号)取自发病虾池;另2份阳性和可疑(094和095号)取自2个未发病虾池,这2个虾池在23d内未发生明显的对虾暴发性流行病,23d后的情况未知。

在所有检测的小型甲壳类生物中,有9份沿岸海区样品,其中阳性1份,可疑2份。

阴性 6 份, 阳性率低于海区桡足类浮游生物样品。

2.4 单抗 ELISA 对非甲壳类生物的检测

采集的 22 份非甲壳类生物样品包括鳃鱼、海葵、昆虫 (存在于虾池水中)、贝类、沙蚕、杂鱼类。从检测结果可以看到阳性主要分布在鳃鱼和海葵, 其它种类的 2 份样品 P/N 值较低, 为可疑 (表 5)。

表 5 单克隆抗体 ELISA 对非甲壳类生物 HHNBV 带毒的检测结果

Table 5. Test of samples of non-crustacean animals for HHNBV by ELISA with monoclonal antibody

样品序号	样品种类	P/N 值	+/—	样品序号	样品种类	P/N 值	+/—	样品序号	样品种类	P/N 值	+/—
Sample No.	Species	P/N		Sample No.	Species	P/N		Sample No.	Species	P/N	
093	鳃鱼	0.8	—	146	其它鱼类	0.8	—	192	牡蛎	1.6	±
142		2.4	+	183		1.1	—	082	昆虫	1.2	—
184		1.9	±	068	蓝蛤	—	—	084		1.0	—
191		2.4	+	119		1.4	—	107		0.5	—
030	其它鱼类	1.4	—	069	杂色蛤	—	—	105	沙蚕	1.2	—
074		1.6	±	147		1.1	—	182		1.2	—
085		1.0	—	130	泥螺	1.3	—	143	海葵	4.6	+

鳃鱼的 4 份样品中 2 份阳性, 1 份可疑 ($P/N=1.9$), 如此高的阳性率可能是因为鳃鱼摄食发病对虾所致。其中 142 号为 1 尾海区样品 (体长约 15~20cm), 在解剖后见到其胃内有 1 尾完整的对虾, 体长约 6cm, 对该样品的检测与其说是对鳃鱼, 勿宁说是对对虾。因样品取自沿海岸海区, 说明海区对虾样品也存在发病情况。

海葵 (143 号样品) 的阳性结果非常强烈, 似乎出人意料。但考虑到海葵摄食海洋浮游生物, 这一结果正好说明了海区的浮游生物是带毒的。

2.5 单抗 ELISA 对虾池底泥及饵料等的检测

表 6 中的 37 份样品包括虾池底泥 23 份, 进水网杂物 1 份, 冰冻饵料 7 份, 鲜饵料 2 份, 配合饵料 4 份。检测结果表明, 底泥 1 份为阳性, 4 份可疑; 配合饵料 1 份可疑 ($P/N=2.0$), 冻饵和鲜饵各 1 份可疑 ($P/N=1.5$) (表 6)。

从底泥样品的检测结果可以看出, 即使在许多发病后的虾池中, 底泥样品也很少呈现阳性, 其中一个典型的阳性底泥样品 (176 号) 取自正在发病的虾池, 而对 10d 前发病的虾池底泥 (150 号样品) 的检测结果为阴性。

3 讨论

1994 年 5 月我们用 T-E 染色、单抗 ELISA、组织切片以及电镜观察等技术对浙江对虾暴发性流行病病原及传播途径进行了现场和实验室的调查研究, 所有技术方法均取得了一致的结果, 证实了 1994 年浙江对虾暴发性流行病病原是 HHNBV, 并首次查出虾池及海区小型甲壳类生物如白虾、糠虾、蟹类、桡足类等携带该病毒^[5]。

表6 单克隆抗体 ELISA 对虾池底泥及饵料 HHNBV 带毒的检测

Table 6. Tests of samples of pond sidements and feeds for HHNBV by ELISA with monoclonal antibody

样品序号 Sample No.	样品种类 Species	P/N 值 P/N	+/-	样品序号 Sample No.	样品种类 Species	P/N 值 P/N	+/-	样品序号 Sample No.	样品种类 Species	P/N 值 P/N	+/-
03	底泥	±	±	126		1.2	—	170		1.3	—
06		±	±	136		1.2	—	171		1.5	±
09		—	—	150		1.3	—	186		1.1	—
12		—	—	153		1.7	±	187		1.0	—
15		—	—	164		0.8	—	188		1.1	—
18		1.3	—	165		1.0	—	157	鲜饵料	1.5	±
21		1.3	—	173		0.4	—	168		1.3	—
24		1.1	—	176		2.7	+	51	配合饵料	1.1	—
27		0.4	—	31	进水网	0.4	—	122		1.2	—
34		1.3	—	120	杂物	1.8	±	156		2.0	±
54		0.8	—	148		0.9	—	167		1.1	—
62		0.8	—	78	冰冻饵料	1.2	—				
67		0.6	—	169		1.2	—				

对在发病和未发病虾池中采集的对虾样品的单抗 ELISA 检测结果表明, HHNBV 的阳性与虾池的发病情况基本相符。少数样品的检测结果与虾池发病情况存在差异, 这反映了对虾暴发性流行病的某些流行病学规律。在已发病虾池样品中检测出阴性结果, 说明虾池对虾发病时, 并非所有对虾都带有病毒。而在未发病虾池中检出阳性结果, 说明病原已进入虾池, 该虾池很可能会发生对虾暴发性流行病; 另一方面, 也说明带有 HHNBV 并不意味着虾池会立即发生对虾暴发性流行病。在许多养殖场, 包括寿光海立公司, 调查中观察到, 雨后常常许多虾池会同时出现对虾暴发性流行病, 这说明环境因子的突然变化对虾池发病可能起到一定的诱发作用^[7]。

对虾暴发性流行病在对虾个体上表现为杆状病毒引起的对虾皮下及造血组织坏死, 其病症发展历时 3~10d^[1]。人工投喂感染的对虾, 从摄食病原到发病死亡, 历时 2~9d, 注射感染的对虾, 在 20~56h 发病死亡^[2]。这说明对虾在不同的环境条件下, 发病的潜伏期和病程不同。用单抗 ELISA 方法, 在虾池发病前 20~40d 能检测出 HHNBV 的阳性结果, 这说明池塘养殖的对虾从病原感染到疾病的发生可以有一段较长的时期, 病毒呈潜伏性感染状态, 这时病原的传染主要以中间宿主到对虾的方式进行。一旦外界环境发生突然变化, 且病原的传染积累到一定程度, 正常虾摄食病毒致死的对虾或带毒病虾, 疾病便暴发地流行。

目前大多数虾池早期进水仅通过一层 40~60 目的筛绢网过滤, 这不足以阻挡桡足类浮游生物进入虾池。通过对所采集样品的单抗 ELISA 检测发现, 桡足类浮游生物有较高的 HHNBV 带毒率, 发病虾池中的桡足类先于对虾带毒, 沿岸海区桡足类浮游生物的

带毒也较普遍,因此虾池的进水工艺必须进行改进,以阻止带毒的桡足类浮游生物进入养殖系统,或在外界水源与对虾接触之前,消灭掉带毒的桡足类浮游生物,才有可能切断对虾暴发性流行病的传播途径。

小型甲壳类,尤其是卤虫和糠虾的带毒也应引起高度重视,因为至今不少养殖单位仍在用这类鲜活饲料。另一方面,虾池内的小型甲壳类生物在从桡足类到对虾的病原传播中也可能起到某些中间环节的作用。

对虾发病时,对外界刺激反应迟钝,易于被捕食生物摄食,因此,一些对虾的天敌在减少病原传播方面可能起到一定的作用。对海区采集的鲢鱼胃中对虾的单抗 ELISA 检测证实了这一推测,其胃内的对虾经检测为 HHNBV 阳性。因为杆状病毒不能感染脊椎动物^[2],不用担心鱼类会成为对虾暴发性流行病病原的宿主。

海葵胃含物 HHNBV 的 ELISA 反应阳性说明它能摄食带有病原的浮游生物,这一发现是否具有生产上的意义值得进一步探讨。

配合饲料的可疑阳性(156号样品)可能是原料中含有病毒污染的成分。这种情况并不意味着该饲料会成为对虾暴发性流行病的传染源。因为 ELISA 等免疫学方法检测病毒的原理是对病毒的结构蛋白的检测,而不是检测其活性病毒粒子。无包涵体的杆状病毒粒子通常极不稳定^[8],对 HHNBV 的研究也证实了这一特性^[2],配合饲料的加工和储存过程完全能将它灭活,但原则上说,其结构蛋白还可以被 ELISA 方法检测到。

综上所述,在不投喂鲜活饲料或带病原的饲料的虾池中,对虾暴发性流行病的传播可能是由桡足类浮游生物作为传播载体,将 HHNBV 通过水源带入虾池,直接或经过某些中间环节被对虾摄食而完成的。海区或虾池的其它一些小型甲壳类生物在该病原的传播途径上可能也起到一定程度的作用。这一推论有待于感染试验的进一步证实。

参 考 文 献

- 1 黄健,宋晓玲,于佳,等.杆状病毒的对虾皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病理学.海洋水产研究.1995,16(1):1-10
- 2 黄健,蔡生力,宋晓玲,等.对虾暴发性流行病病原的人工感染研究.海洋水产研究.1995,16(1):51-58
- 3 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
- 4 黄健,于佳,宋晓玲,等.1993-1994年山东省中国对虾育苗期病毒感染的流行病学调查.海洋水产研究.1995,16(1):83-90
- 5 黄健,于佳,宋晓玲,等.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.海洋水产研究.1995,16(1):91-98
- 6 杜平.医用实验病毒学.北京:人民军医出版社.1985.167-178
- 7 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(2):112-119
- 8 吕鸿声.昆虫病毒与昆虫病毒病.北京:科学出版社.1985.6