

2-30. 养殖中国对虾暴发性流行病病虾 现场快速诊断方法研究

董颖 熊再峰 吴敬南

(辽宁省海洋水产研究所, 大连 116023)

程 军 丛广权

(辽宁省东港市国营五四农场, 丹东 118300)

摘 要

通过人工投喂感染试验, 观察了中国对虾感染暴发性流行病病原后出现的特殊外观病症, 即与健康虾摄食期间的空胃和拒食, 在现场利用这种外观症状作排外诊断和鉴别诊断, 可以简便、快速地对判断出池虾群体中是否有病虾, 同时根据统计发病虾的概率, 也可以了解群体的发病进程。

关键词: 中国对虾 暴发性流行病 外观病症 快速诊断

现虽已查明, 1993 年以来辽宁省沿海地区养殖中国对虾暴发的急性流行病(下简称“流行病”)病原是杆状病毒, 属杆状病毒科 C 亚群^[1,2], 但适于养虾生产者应用的诊断方法迄今未获解决。首先是从虾群中找出需要进一步诊断的可疑早期病虾的方法, 其次是诊断的速度, 因为该“流行病”具爆发性, 个体和群体的发病速度很快, 如果取样后找不出可疑虾, 或者对可疑虾的诊断时间过长, 则诊断的意义就不大。我们根据发病虾的外观特殊症状, 应用排外诊断(Diagnosis by exclusion)和鉴别诊断(Differential diagnosis)方法, 结合适时取样, 可以在 1 小时至若干现场查明池虾群体中是否有病虾, 同时根据统计发病虾的概率, 还可以了解到群体发病进程。与已用的光镜石蜡切片、电镜法(超薄切片、负染)以及 T-E 染色等诸方法相比, 这一方法具有诊断快速、操作简便, 且能较早地在虾池中发现病虾等特点。本文报导了这

项研究结果, 仅供参考。

一、材料与方法

1. 人工投喂感染试验

感染试验在 4 个 30l 玻璃水族箱内进行, 设对照组。试验用海水经 30ppm 漂白粉消毒后放置一昼夜以上, 待余氯降至 0.1ppm 后使用。试验开始后, 连续充气, 不换水。待试验虾出现病症后, 每日清晨吸除水族箱底部污物, 换入消毒海水约 1/4。

感染试验用虾取自辽宁省东港市五四农场养虾场未发病虾池, 经过 2 天饲养, 确定无病, 并待出现空胃状后方进行投喂试验。病料取自五四农场发病虾池放出的濒死虾和刚死虾, 均经光镜检查确认其上皮和结缔组织中有大量细胞具空泡样病变胞核, 及其冰冻(-18℃)病虾投喂, 待确证试验虾吃到病虾组织并呈拒食状后, 清除掉病料残骸。待试验组虾出现空胃可拒

食病症后,即不再投喂;对照组虾持续投喂人工配饵。

试验虾出现病症后,每隔2小时,从3个试验组水族箱中取样1尾,用Davidson's AFA液固定,常规方法制石蜡切片,H-E染色及中性树胶封片,光镜下观察各个时间对虾组织病变情况。做电镜超薄切片的样品为取自胃前腔的小块组织,戊二醛固定液固定,共取样两次。

2. 虾池取样方法

取样工具,养殖前期(体长<6cm)用抄网,养殖后期(体长>6cm)用旋网。每日凌晨投饵后半小时在投饵带各处捞虾100尾左右,放入反差较大的容器(如白色脸盆)中进行活体观察。

二、结 果

1. 健康中国对虾胃的外观特征

对虾的甲壳薄而透明,活体在外观上可以清晰地看到胃的部分结构。中国对虾的胃分前

腔和后腔。后腔比较窄小,因肝胰腺包围,只可见前面一小部分。前腔前部透明,可以膨胀,内有两道腹侧长板及毛套一直延伸到后部,后部与之相连的是一个由胃磨侧齿及背中齿组成的三角形区域^[3],呈深褐色。对虾饱食后胃前腔呈现为一个膨大的椭圆形,且因食物不同而显示出不同的颜色。食物消化后,前腔紧缩成扁平状,从侧面看上下壁几乎紧贴,腔内无食物,腹侧长板及毛套清晰可见。如仔细观察,会看到整个前腔有规律地纵向收缩。根据对虾前腔内含物的多少,肉眼很容易将它们分为饱胃、半胃、残胃、空胃四个类别。对照组的健康对虾摄食配饵后消化速度很快,一般3个小时左右即排空,碰到饵料后会立即用颚足钳住食物,迅即送到大颚处而再次进食。

2. “流行病”的病虾的外观特征

感染试验共进行7次,在试验过程中,我们随时观察病虾的外观特征,记录出现症状和死亡时间,试验结果见表1。

表1 感染试验情况

试 验 时 间	试验组 对虾数 (尾)	对照组 对虾数 (尾)	平均 体长 (cm)	水 温 (℃)	试验对虾 出现空胃 症状时间	死 亡 时 间			备 注
						初始	50%	100%	
7月2日	12	6	4.00	23.0~24.9	12.0小时				投喂病虾组织后3小时 每隔2小时固定1条
7月7日	18	8	4.46	22.9~24.7	13.5小时	36.5小时	41.0小时	49.0小时	未分期固定
7月12日	18	4	5.10	26.4~27.5	12.25小时	36.7小时	45.2小时	50.0小时	未分期固定
7月18日	12	6	5.63	24.2~25.5	11.5小时	37.0小时	46.5小时	60.5小时	未分期固定
7月23日	18	6	6.20	26.8~28.5	12.0小时				投喂病虾组织后12小 时每隔2小时固定1条
8月24日	16	4	8.40	25.7~26.4	11.0小时				投喂病虾组织后12小 时每隔2小时固定1条
8月24日	8		8.34	25.7~26.4	11.25小时	36.0小时	46.0小时	*	未分期固定,有2条 至25日未死,后固定

上表可知,在水温25℃左右条件下,体长4~8cm的中国对虾吞食了病虾组织并出现饱胃。7月12日左右,都出现了空胃和拒食病症。与正常虾空胃在外观上很容易区别

开来。体长小于6cm的病虾,胃前腔无内含物,前期尚可观察到间断性的横向收缩动作,当前腔没有收缩功能后,前腔背面观膨胀呈椭圆形,充水,但仍透明,可见腹侧长板及毛套;体长大

于 6cm 病虾的空胃特征略有不同,一开始从背面观前腔膨胀成椭圆形,侧面观上壁几乎贴至甲壳,体积大小几同饱胃,前腔完全不收缩,内充满浅黄色液体,混浊半透明状。病虾的空胃状态一直保持到死亡。根据我们对分期固定样品观察,病虾出现空胃后 30 小时,剥离头胸甲时心区部分才不粘连真皮,有些病虾头胸甲开始出现白斑。

3、“流行病”病虾的现场诊断方法

1995 年 7~8 月间,我们根据中国对虾“流行病”发病虾的外观特殊病症,应用排外诊断和鉴别诊断的方法,结合适时取样,对辽宁省东港市五四农场的精养虾池进行了逐日监测,取得了满意结果。监测过程和监测结果如下:

监测过程:

①取样。每天清晨 5 点投饵后半小时内,在虾池饵料带取样约 100 尾,样品放入一个反差较大并装满池水的容器(如白色脸盆)中。

②排外。把“空胃”作为排外的标准,排除掉绝大部分的饱胃及半胃健康虾、刚蜕皮的空胃虾和其它病虾,留下少量可疑虾作鉴别用。蜕皮不久的空胃虾很容易排除,至于其它空胃病虾也易排除,因为辽宁省养殖对虾迄今发现的常见病多发病都有外观特异性症状,出现空胃都属发病晚期,极易根据各自的特殊病症予以排除。例如患有 HPV 病的对虾,只有在晚期才可以出现空胃,但那时对虾的肝胰腺已呈蓝绿色,明显萎缩溃烂,且虾体异常瘦小,皮色发暗等。这些特征极易识别。

③鉴别和统计。留下进行鉴别的空胃虾,如果有“流行病”病虾在内,根据病虾胃的特殊病症,很容易同健康空胃虾区别,一般不用再经投喂饲料后根据拒食与否来证明。鉴别出“流行病”病虾后,即可统计虾池内病虾与健康虾的比率。

监测结果:

应用上述方法,我们在辽宁省东港市国营五四农场精养虾池中监测到“流行病”不同暴发

情况的三个虾池:①1995 年 6 月 26 日,在 2 号池(22 亩)于早晨 5:40 取样,具空胃特征病虾约占 5%,池虾于 4 日后几乎绝迹;②1995 年 6 月 27 日下午 3 时,在 4 号池(19.8 亩)取样,空胃特征病虾达 20%,池边偶见病虾,后池虾大量死亡,于 3 日后几乎死光;③1995 年 8 月 30 日早晨 6 时,在 3 号池(22.4 亩)用旋网取样,发现具空胃特征病虾大于 5%,迅即收虾,产量达 70kg/亩,池底未见死虾。

4、健康虾摄食病虾后的死亡速度

为确定对虾感染“流行病”病毒后的死亡时间,我们专门做了 4 次感染试验,结果见表 1。

从表 1 中不难看出,在水温 25℃ 左右条件下,体长 6~8cm 的健康虾摄食病虾组织后 12 小时左右即出现病症(空胃和拒食),50% 的死亡在出现空胃后 45 小时,100% 死亡率出现在 50 小时。全部试验虾中只有 2 尾空胃虾(8 月 24 日)虽未再进食,但仍生活到 8 月 28 日也未见死亡。固定后经光镜检查,未发现其胃上皮和结缔组织中有特异性的杆状病毒病病变细胞核,电镜超薄切片也未见病毒粒子。

5、几种诊断方法的比较

在感染试验中,我们定时固定,对 3 种诊断方法进行了比较,结果见表 2:

表 2 3 种诊断方法发现病虾的时间

投喂病 虾组织 后时间	12 小时	24 小时	30 小时	36 小时	48 小时
外观病 症诊断 方法	空 拒 食	胃 食 膨 胀	空胃拒食 膨胀甲壳 易剥离	同左	同左
光镜石 蜡切片 方法	胃上皮 及结缔 组织未 见病变 细胞	同左	胃上皮及 结缔组织 可见少量 空泡样核 病变细胞	同左 总面出 现病变 细胞	
电镜检查 结果*		可见病 毒粒子	同左	同左	同左

注: * 系大连水产学院和中科院沈阳应用生态研究所检测。

①利用外观空胃和拒食病症进行肉眼现

察,可以鉴别出感染病毒 12 小时后发病的病虾。2 分钟内即可完成;

②电镜切片技术,在对虾进食病虾组织 24 小时后方检测到病毒粒子。监测的最快速度需 48 小时方能得出结果;

③光镜石蜡切片方法,对虾感染病毒约 30 小时后,才能在胃上皮组织和结缔组织中观察到具嗜酸性空泡样核的病变细胞。全部监测工作至少需 24 小时方能完成。

三、讨 论

1. 这项诊断技术的局限性是仅适用于中国对虾感染“流行病”病原并已发病(即出现病症)后的那些个体,且必需活体观察。但它的优点也是显而易见的,因为应用这一方法不需要复杂的仪器设备,也不需要高深的专业知识,极易普及应用。千家万户的虾池不可能全部由科研推广单位的少数科技人员去监测,广大养虾生产者掌握了这一方法,不仅可以正确决策,减少经济损失,而且必能提供大量有关虾池对虾发病规律方面的统计信息。例如,根据 1995 年我们应用这一方法对少数虾池的检测结果表明,“流

行病”暴发出现了两种不同的形式:一种是开始虾池中只有小于 5% 的对虾发病。对这个虾池来说,“流行病”的暴发显然是健康虾摄食死亡病虾后造成的;另外一种情况是大风雨后,虾池对虾突然出现了大于 20% 的病虾。是应激反应诱发了病毒活性,还是虾池突然引入了大量病原后使疾病暴发? 这些情况无疑提供了关于研究虾池“流行病”暴发规律的线索。

2. 无论是室内感染试验,或者是野外观察,在 25℃ 左右,当健康虾(体长 4~8cm)摄食了死亡病虾后,几无例外都在 12 小时左右出现病症,病毒的潜伏期应该很短。至于弱毒感染,以及在低温条件下病毒感染后的发病速度问题,则尚需继续研究。

参 考 文 献

- (1) 国际组等, 1994. 辽宁沿海养殖对虾暴发性病害的病因分析. 电子显微学报, (5): 335.
- (2) 蔡生力等, 1995. 1993~1994 年对虾暴发病的流行病学研究. 水产学报, 19(2): 112~119.
- (3) 陈贻生等译, 1992. 对虾生物学, 23~25. 青岛海洋大学出版社.

A Simple and Rapid Diagnosis of Explosive Epidemic Disease for the Cultured Shrimp (*Penaeus chinensis*)

Dong Ying Xiong Zailong Wu Jingnan

(Marine Fisheries Research Institute of Liaoning, Dalian 116023)

Cheng Jun Cong Guangquan

(Local-operated Wusi Farm in Dandong city, Dandong 118300)

Abstract

Based on the infectious trials, the earlier cardinal symptoms (a characteristic feature of empty stomach and rejection of feeding) of the shrimp (*P. chinensis*) suffered from the explosive epidemic disease were observed by naked eye. By using the diagnosis by exclusion and differential diagnosis of these symptoms, a few of diseased shrimps can be rapidly separated from the healthy ones, and the probability of which can also be calculated in the growout ponds.

Keywords: *Penaeus chinensis*, the explosive epidemic disease, symptom by naked eye, rapid diagnosis