

1993~1994年山东省中国对虾育苗期 病毒感染的流行病学调查^{*}

黄 健 于 佳 宋晓玲 孔 杰 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 1993年和1994年育苗期, 在山东省十余家育苗场采集了亲虾、受精卵、无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾等样品共56份。组织病理学切片观察说明, 所有样品均未检查出对虾暴发性流行病原HHNBV的病理变化; HPV的病理变化主要在亲虾、糠虾幼体和仔虾中检出, 蚤状幼体有HPV感染的可疑情况。1994年, 5.5%的糠虾幼体和5.1%的仔虾检出有HPV的感染。在糠虾和仔虾阶段, 海捕亲虾苗种的HPV带毒率为4.0%, 越冬亲虾苗种的带毒率为6.2%。HPV和HHNBV的单克隆抗体ELISA检测方法表明有3个样品为可疑的HHNBV阳性; 有12.5%~25%的糠虾期育苗池和70%的仔虾期育苗池存在有HPV的感染。

关键词: 中国对虾 育苗期 肝胰腺细小病毒 皮下及造血组织坏死杆状病毒 流行病学

感染中国对虾的病毒最早发现有肝胰腺细小样病毒 (hepatopancreatic parvo-like virus, HPV)^[1], 该病毒感染中国对虾成体, 在肝胰腺上皮细胞核内形成致密的球形包涵体。1993年5月, 对虾暴发性流行病造成了我国对虾养殖业巨大的经济损失, 在对该病的研究中, 我们发现了一种新的对虾病原: 皮下及造血组织坏死杆状病毒 (hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)^[2], 该病毒在对虾的皮下组织、造血组织、血淋巴细胞等细胞核内形成嗜酸性包涵体样物质, 而肝胰腺上皮细胞核无病变, 通过组织切片H-E染色和光镜观察, 就能在组织病理学上明确区分这两种病毒的感染。1993年底, 我们研制出了上述两种病毒的单克隆抗体^[3], 为这两种病毒感染的诊断增添了一种更灵敏的新的研究手段。目前对上述两种病毒的研究, 主要在中国对虾成体

• 国家海洋局一所王文兴副研究员、薛清刚副研究员, 中科院海洋所相建海研究员、李金花等, 美国德克萨斯A&M大学Paul F. Frelief副教授、Addison L. Lawrence教授等参加了本文的部分工作, 在此特表感谢。本文样品的制片工作主要由本所养殖病害研究室张立敬同志完成, 部分的样品采集工作得到了本所韩阿寿、蔡生力、李健、王崇明、席次松、梁亚全、于东祥等以及有关的育苗单位的大力支持和热情帮助, 特此致谢。
收到日期: 1995-07-10, 07-25 修回

中进行, 本文报道我们用组织病理学方法和单抗 ELISA 方法对中国对虾育苗期病毒感染的一些调查结果。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

1.1.1 1993 年虾苗样品采集 在黄岛电厂育苗场 (Hd)、牟平宁海育苗场 (Mn)、牟平供销育苗场 (Mg)、文登小观育苗场 (Wx)、和崂山海西育苗场 (Lh) 等地采集虾苗样品, 样品种类包括有卵 (E)、无节幼体 (N)、蚤状幼体 (Z)、糠虾幼体 (M)、和仔虾 (P) 等, 亲虾来源有海捕 (w) 和越冬 (o) 两种, 样品编号采用“年号+地点代号+池号”-“种类代号+亲虾来源”表示。所采集的样品固定于盛有 Davidson's AFA^[4] 的尖头塑料离心管中, 带回实验室 (表 1)。

表 1

1993—1994 年对虾育苗期样品采集记录

Table 1.

Collecting records of samples of *Penaeus**Chinensis* from hatcheries in 1993 and 1994

序 No	编号 Code name	地点池号 Site Tank	种类 Stage	序 No	编号 Code name	地点池号 Site Tank	种类 Stage	序 No	编号 Code name	地点池号 Site Tank	种类 Stage
1	93Hd13-Eo	黄岛 13	受精卵	20	94Rs00-Eo	日照 ?	受精卵	39	94Ls20-Po	崂山 20	仔虾
2	93Hd10-No	电厂 10	无节幼体	21	94Rs00-No	石白 ?	无节幼体	40	94Ls21-Po	上马 21	
3	93Hd11-Zo	11	蚤状幼体	22	94Rs00-Zo	?	蚤状幼体	41	94Lh05-Mw	崂山 5	糠虾幼体
4	93Hd09-Mo	9	糠虾幼体	23	94Rs00-Mo	?	糠虾幼体	42	94Lh06-Mw	海西 6	
5	93Hd09-Bo	9	越冬亲虾	24	94Rs00-Po	?	仔虾	43	94L112-Mw	崂山 12	
6	93Hd11-Bo	11		25	94Wh00-Mo	文登 ?	糠虾幼体	44	94L114-Mw	流亭 14	
7	93Mn09-No	牟平 9	无节幼体	26	94Wh00-Po	华山 ?	仔虾	45	94L118-Mw	18	
8	93Mn11-Zw	宁海 11	蚤状幼体	27	94Wh00-Bo	?	越冬亲虾	46	94L128-Mw	28	
9	93Mn14-Zw	14		28	94Wh00-Bo	?		47	94Lx04-Po	崂山 4	仔虾
10	93Mn04-Zw	4		29	94Wz00-Eo	文登 ?	受精卵	48	94Lx05-Po	后楼 5	
11	93Mn01-Pw	1	仔虾	30	94Wz00-No	泽头 ?	无节幼体	49	94Lx06-Po	6	
12	93Mg07-Zw	牟平 7	蚤状幼体	31	94Wz00-Zo	?	蚤状幼体	50	94Lx07-Po	7	
13	93Mg13-Mw	供销 13	糠虾幼体	32	94Wz00-Mo	?	糠虾幼体	51	94Lx08-Mo	8	糠虾幼体
14	93Mg17-Pw	17	仔虾	33	94Lj03-Po	胶州 3	仔虾	52	94Lx09-Po	9	仔虾
15	93Wx10-Nw	文登 10	无节幼体	34	94Lj07-Po	湾 7		53	94Lr01-Mw	石老 1	糠虾幼体
16	93Wx08-Zw	小观 8	蚤状幼体	35	94Lj10-Po	10		54	94Lr02-Mw	人 2	
17	93Wx06-Zw	6		36	94Lj00-Bo	?	越冬亲虾	55	94Lr03-Mw	3	
18	93Wx04-Mw	4	糠虾幼体	37	94Lj00-Bo	?		56	94Li00-Mw	崂山 ?	
19	93Wx02-Pw	2	仔虾	38	94Lj00-Bo	?				西山	

1.1.2 1994年虾苗样品采集 采集地点为日照石臼育苗场(Rs)、文登华山育苗场(Wh)、文登泽头育苗场(Wx)、崂山海西育苗场(Lh)、崂山胶州湾育苗场(Lj)、崂山上马育苗场(Ls)、崂山西山育苗场(Li)、崂山流亭育苗场(Ll)、崂山后楼育苗场(Lx)、崂山石老人育苗场(Lr)等,编号按上述方法进行,所采集的样品按上述方法固定,另取Lj、Ls、Li、Lx、Lr各样品,每样品不少于60尾虾苗,置于预先加有0.1ml 0.2% NaN_3 的塑料离心管中,用于ELISA检测(表1)。

1.1.3 亲虾样品采集 1993年3月20日和4月18日从黄岛电厂育苗场采集两尾越冬亲虾,用Davidson's AFA按文献方法^[4]固定。1994年4月11日从文登华山育苗场采集2尾越冬亲虾,按上述方法固定。1994年4月18日从崂山胶州湾育苗场采取3尾越冬亲虾,取部分胃和肝胰腺区按上述方法固定,另取少量胃、肝胰腺、鳃组织,置于预先加有0.1ml 0.2% NaN_3 的塑料离心管中,用于ELISA检测,亲虾种类代号为B。

1.2 组织切片和H-E染色

1.2.1 预包埋 为了不至于丢失样品,对于虾卵、无节幼体和蚤状幼体采用预包埋。固定12h后的样品小心吸去固定液,加入少量溶化后在50℃保温的2%琼脂,迅速搅匀,在琼脂层上小心加入5倍体积的Davidson's AFA^[4]覆盖,静置24h,倒去固定液,加入50%的乙醇,静置直到琼脂块脱落为止。

1.2.2 制片及H-E染色 所有固定样品的制片及H-E染色按常规方法^[4]进行。

1.3 单克隆抗体ELISA检测

1.3.1 单克隆抗体 抗HPV和抗HHNBV的单克隆抗体的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10倍。

1.3.2 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,冻存于-35℃,用时以0.1M PBS稀释1000倍。

1.3.3 样品的处理 样品处理时所用剪刀、镊子等器械均用火焰灼烧,再入凉水冷却,仔细剪碎所采集的各样品,加入200 μl 0.05M CBS(碳酸盐缓冲液, pH9.6),混匀,在台式离心机上7000g离心2min,上清液即可用于ELISA检测。

1.3.4 ELISA检测方法 各样品上清液依次加入一次性40孔微量酶标板(浙江玉环芦浦塑化器械厂)中,每个样品加一列(4孔),每孔100 μl 。第一列4孔为空白对照,第十列为阳性和阴性对照。HPV和HHNBV的阳性对照分别采用纯化的HPV和HHNBV ($\text{OD}_{250}=0.005$),阴性对照采用小牛血清。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A、B行加入100 μl 稀释的抗HPV单克隆抗体腹水, C、D行加入100 μl 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,观察显色结果,各孔加入100 μl 终止液(1N

H₂SO₄)。用 511 型酶标分析仪测 492nm 处各孔的吸光度,求 P/N 值^[5],判定 ELISA 反应结果。

2 结果

2.1 1993 年对虾育苗期样品的组织病理切片

1993 年黄岛、牟平、文登采集的 17 个对虾育苗池样品,经组织病理切片观察,结果列入表 2。

表 2 1993 年中国对虾育苗期病毒感染的病理学观察结果
Table 2. The pathological statistics of viral infection
of *P. chinensis* in hatcheries in 1993

序 №	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV	序 №	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV	序 №	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV
1	93Hd13-Eo	0/56	0/56	8	93Mn11-Zw	±1/5	0/6	15	93Wx10-Nw	0/6	0/7
2	93Hd10-No	0/12	0/31	9	93Mn14-Zw	0/7	0/13	16	93Wx06-Zw	0/8	0/13
3	93Hd11-Zo	0/4	0/15	10	93Mn04-Zw	0/6	0/15	17	93Wx08-Zw	0/4	0/12
4	93Hd09-Mo	2/8	0/19	11	93Mn01-Pw	0/3	0/12	18	93Wx04-Mo	3/15	0/25
5	93Hd09-Bo	1/1	0/1	12	93Mg07-Zw	0/4	0/7	19	93Wx02-Po	0/1	0/4
6	93Hd11-Bo	0/1	0/1	13	93Mg13-Mw	0/4	0/10				
7	93Mn09-Nw	0/12	0/20	14	93Mg17-Pw	0/2	0/10				

受精卵 1 份,共 56 粒;无节幼体 3 份,共 58 尾个体,其中有肝胰腺切面的 30 尾,在受精卵和无节幼体中,HPV 和 HHNBV 的病理变化均未检出。镜下观察到卵的每个细胞都含有大量的卵黄,没有明显的细胞分化;无节幼体可见到有肝胰腺和上皮细胞的分化。蚤状幼体 7 个育苗池样品共 81 尾,38 个肝胰腺,牟平宁海育苗场 1 尾 HPV 可疑阳性。由于肝胰腺上皮细胞着色过深,类似 HPV 包涵体的结构难以确认;HHNBV 的病理变化在所有蚤状幼体中未曾发现。糠虾幼体 3 个育苗池样品共 54 尾,27 个肝胰腺,5 尾糠虾发现有 HPV 包涵体,分布在黄岛电厂和文登小观育苗场的 2 个育苗池;所有糠虾幼体未曾发现 HHNBV 的病理变化。仔虾 2 个育苗池样品共 16 尾,4 个肝胰腺,HPV 和 HHNBV 的病理变化均未发现,这可能是取样量过少所致。另有 2 个样品为黄岛电厂育苗场越冬亲虾,其中 1 尾检出 HPV 的感染,两尾皆为 HHNBV 阴性。

按亲虾来源来分类,越冬亲虾苗种有 2 个育苗池样品有 HPV 感染,均为糠虾幼体,海捕亲虾苗种有 1 个育苗池的蚤状幼体怀疑有 HPV 感染。

2.2 1994 年对虾育苗期样品的组织病理切片

1994 年检查 31 个育苗池样品,其中受精卵 2 份共 54 粒;无节幼体 2 份共 15 尾,8 个肝胰腺;蚤状幼体 2 份共 31 尾,14 个肝胰腺。以上三类样品在 HPV 和 HHNBV 的病理变化上均为阴性。糠虾幼体 13 个育苗池样品共 230 尾,90 个肝胰腺,采自 3 个地区的

8家育苗场,在崂山海西育苗场和崂山后楼育苗场有3个育苗池样品共5个肝胰腺发现有HPV的病理变化,占所调查的13个糠虾幼体期育苗池的23%或230尾糠虾幼体的5.5%;HHNBV的病理变化在230尾糠虾幼体中均未发现。仔虾为12个育苗池样品共447尾,196个肝胰腺,采自3个地区6家育苗场,在文登华山、崂山上马、和崂山后楼3个育苗场共7个育苗池10个肝胰腺观察到HPV病变,占所调查的12个仔虾期育苗池的58%或447尾仔虾的5.1%。HHNBV的病理变化在447尾仔虾中均未发现。文登华山育苗场所采集的2尾亲虾均为HPV,而崂山胶州湾育苗场的3尾亲虾中有1尾检查出HPV阳性,所有检查亲虾均为HHNBV阴性(表3)。

表3 1994年中国对虾育苗期病毒感染的组织病理学检查结果

Table 3. The pathological statistics of viral infection of *P. chinensis* in hatcheries in 1994

序 No	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV	序 No	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV	序 No	编 号 Code name	HPV 阳性 + HPV	HHNBV 阳性+ HHNBV
20	94Rs00-Eo	0/19	0/19	33	94Lj03-Po	0/17	0/23	46	94Ll28-Mw	0/12	0/35
21	94Rs00-No	0/1	0/1	34	94Lj07-Po	0/46	0/126	47	94Lx04-Po	4/11	0/25
22	94Rs00-Zo	0/11	0/26	35	94Lj10-Po	0/23	0/57	48	94Lx05-Po	1/5	0/24
23	94Rs00-Mo	0/5	0/11	36	94Lj00-Bo	1/1	0/1	49	94Lx06-Po	1/5	0/21
24	94Rs00-Po	0/27	0/38	37	94Lj00-Bo	0/1	0/1	50	94Lx07-Po	1/9	0/25
25	94Wh00-Mo	0/3	0/7	38	94Lj00-Bo	0/1	0/1	51	94Lx08-Mo	2/5	0/8
26	94Wh00-Po	1/11	0/23	39	94Ls20-Po	1/6	0/22	52	94Lx09-Po	0/27	0/37
27	94Wh00-Bo	0/1	0/1	40	94Ls21-Po	1/9	0/24	53	94Lr01-Mw	0/8	0/18
28	94Wh00-Bo	0/1	0/1	41	94Lh05-Mw	2/7	0/21	54	94Lr02-Mw	0/3	0/8
29	94Wz00-Eo	0/34	0/34	42	94Lh06-Mw	1/2	0/5	55	94Lr03-Mw	0/3	0/12
30	94Wz00-No	0/11	0/14	43	94Ll12-Mw	0/9	0/19	56	94Ll00-Mw	0/17	0/33
31	94Wz00-Zo	0/3	0/5	44	94Ll14-Mw	0/6	0/30				
32	94Wz00-Mo	0/2	0/7	45	94Ll18-Mw	0/8	0/16				

从亲虾来源角度分析,越冬亲虾苗种8个育苗池样品有HPV感染,仔虾期有7个,糠虾期有1个,海捕亲虾苗种2个育苗池样品有HPV感染,由于采样时间较早,所有海捕亲虾苗种中均还没有仔虾期。

2.3 单抗ELISA对1994年虾苗样品的检测

用单克隆抗体对1994年崂山地区的19个育苗池样品进行了HPV和HHNBV的检测,对于HPV的感染,糠虾幼体期8个育苗池样品中有1个阳性和1个可疑,仔虾期10个育苗池样品有7个阳性,崂山胶州湾育苗场的3尾亲虾有2尾阳性。对于HHNBV感染,所有样品未测出阳性,单崂山流亭的1个糠虾期育苗池、崂山后楼的3个仔虾期育苗池样品中检测结果为HHNBV可疑(表4)。

表4 单克隆抗体 ELISA 对 1994 年对虾育苗期样品的病毒检测

Table 4. Test of specimens of *P. chinensis* from hatcheries in 1994 by ELISA with monoclonal antibody

序 No	编 号 Code name	HPV	HHNBV	序 No	编 号 Code name	HPV	HHNBV	序 No	编 号 Code name	HPV	HHNBV
33	94Lj03-Po	-	-	43	94Ll12-Mw	-	±	51	94Lx08-Mo	+	-
34	94Lj07-Po	-	-	44	94Ll14-Mw	±	-	52	94Lx09-Po	+	±
35	94Lj10-Po	-	-	45	94Ll18-Mw	-	-	53	94Lr01-Mw	-	-
36	94Lj00-Bo	+	-	46	94Ll28-Mw	-	-	54	94Lr02-Mw	-	-
37	94Lj00-Bo	-	-	47	94Lx04-Po	+	±	55	94Lr03-Mw	-	-
38	94Lj00-Bo	+	-	48	94Lx05-Po	+	-	56	94Li00-Mw	-	-
39	94Ls20-Po	+	-	49	94Lx06-Po	+	±				
40	94Ls21-Po	+	-	50	94Lx07-Po	+	-				

单抗 ELISA 检测结果按亲虾来源来分类,越冬亲虾苗种的 8 个育苗池样品为 HPV 阳性,7 个为仔虾期育苗池,1 个为糠虾幼体期育苗池。海捕亲虾苗种 1 个育苗池样品为 HPV 可疑。HHNBV 的 4 个可疑样品中,3 个为越冬亲虾苗种的仔虾期育苗池,1 个为海捕亲虾的糠虾期育苗池。

3 讨论

1993 年和 1994 年在山东省发生了对虾暴发性流行病,采样的育苗场所在地区均有该病的发生,但从虾苗的调查情况来看,组织病理学检查的所有样品为 HHNBV 阴性,单抗 ELISA 的检查有 3 个样品为可疑,这样的结果并不能用来作出判断,它存在实验操作误差的可能性。1993 年和 1994 年对虾养成期的暴发性流行病的发生,虾池和海区的桡足类浮游生物以及一些小型甲壳类是病原的中间宿主^[6,7],而与对虾苗种的来源并没有很大的关系,因此我们认为,1993 年和 1994 年对虾暴发性流行病的发生与苗种的关系不大。在苗种中是否会有 HHNBV 的带毒,由于本文所得到的单抗 ELISA 检测结果最多只有可疑的情况,该问题还有待于进一步研究。

从不同时期的 HPV 调查情况来看,亲虾存在有 HPV 的带毒,这种带毒可能是引起 HPV 在虾苗中带毒的主要原因。卵和无节幼体均没有检出 HPV 的感染,蚤状幼体也只检查到 1 尾可疑的感染情况,说明蚤状幼体期的 HPV 感染很轻微或呈潜伏状态。而从糠虾幼体开始 HPV 的感染就大量出现,1994 年糠虾幼体期育苗池有 23% 带有 HPV (单抗 ELISA 测试结果为 12.5% 或 25%),仔虾期育苗池有 58% 带有 HPV (单抗 ELISA 测试结果为 70%)。这说明从糠虾到仔虾的过程中,许多育苗池发生了 HPV 的感染。但是,从个体统计的情况来看,糠虾幼体期和仔虾期的个体感染率分别为 5.5% 和 5.1%,两者差别不大,这可能说明 HPV 的感染会引起糠虾幼体的死亡。从这一原理来推论,根据组织

病理学的检查结果,感染 HPV 的糠虾幼体在变成仔虾的过程中的死亡率为 63.2%,即从糠虾幼体到仔虾,因 HPV 感染会造成 3.5%的个体死亡。

评价越冬亲虾和海捕亲虾苗种在病毒带毒率上的差异,用育苗池样品为单位来进行比较会造成较大的误差,因为本文 1994 年所分析的样品的海捕亲虾苗种主要为糠虾幼体期,而越冬亲虾苗种以仔虾期占多数,在糠虾幼体期和仔虾期之间,育苗池样品的带毒率存在较大差异。但以虾苗个体为单位则可进行比较,因为 HPV 的糠虾幼体期个体感染率(5.5%)与仔虾期个体感染率(5.1%)相近,所有糠虾幼体和仔虾可合并计算。1994 年的越冬亲虾苗种有 13 尾检查出 HPV,占越冬亲虾苗种 211 尾糠虾幼体和仔虾的 6.2%;海捕亲虾苗中有 3 尾检查出 HPV,占海捕亲虾苗种 75 尾糠虾和仔虾的 4.0%。从这可以看出,海捕亲虾苗种的 HPV 带毒率略低于越冬亲虾苗种。由于缺乏对海捕亲虾的调查数据,造成这种差异的原因有待研究。

单抗 ELISA 检测样品的序号从 33 到 56,不包括 41 和 42,将这些样品的检测结果与病理学结果比较,可看到,单抗 ELISA 检测结果中 HPV 阳性的样品序号为 36、38、39、40、47、48、49、50、51、和 52,共 10 个,病理学检查结果 HPV 阳性的样品序号为 36、39、40、47、48、49、50、和 51,共 8 个,其中 38 和 52 号样品在单抗 ELISA 检测中为阳性而病理学检查未检出,这是因为取样的差别和 ELISA 方法的高灵敏度所致。

参 考 文 献

- 1 Lightner, D. V., & Redman, R. M.. A parvo-like virus disease of Penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.* 1985, 45: 47~53
- 2 黄健,宋晓玲,于佳,等.杆状病毒的皮下及造血组织坏死一对虾暴发性流行病的病原病理学.海洋水产研究,1995,16(1):1-10
- 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 Bell, T. A., and Lightner, D. V.. A handbook of normal Penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Louisiana. 1988. 2~6
- 5 杜平.医用实验病毒学.北京:人民军医出版社.1985. 167~178
- 6 黄健,于佳,宋晓玲,等.1994 年对浙江省对虾暴发性流行病原及传播途径的初步调查.海洋水产研究,1995, 16(1):91-98
- 7 黄健,于佳,王秀华,等.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.海洋水产研究,1995,16(1):40-50