

白斑症病毒在日本对虾体内的感染增殖

战文斌 王远红 铃木信一* 俞开康 福田颖穗*

(教育部水产养殖开放实验室, 青岛海洋大学, 266003)

(东京水产大学, 日本东京港区港南 4-5-7)*

摘 要 用投喂患白斑症病毒病的虾组织人工感染日本对虾稚虾。每日取样, 整虾冰冻切片, 单克隆抗体的荧光抗体方法, 原位观察病毒在虾体内的感染增殖。结果表明: 感染后三天内, 在感染虾的各组织器官内均未观察到明显的病毒感染的阳性细胞; 第四天首先在鳃丝腔内的小量血细胞观察到病毒感染; 第五天除血细胞外同时在血窦、鳃上皮组织、皮下组织内观察到; 第六天进而在心脏、胃上皮组织内观察到; 第七天进一步又在淋巴器官、中肠内观察到; 第八天和第九天观察的所有样品在以上组织器官中均为病毒感染阳性。整个观察过程中在肝胰腺没有发现病毒感染的阳性细胞。

关键词 日本对虾, 白斑症病毒, 感染增殖

在我国及东南亚地区广泛流行发生的对虾病毒病, 使对虾养殖业蒙受惨重的经济损失, 现已查明在养殖的中国对虾、日本对虾、斑节对虾、长毛对虾及墨吉对虾等人工养殖的对虾中发生。深入研究该病的病原、诊断、流行规律、病毒的入侵路径、病毒在虾体内的感染和增殖, 病毒感染的靶器官及其感染顺序等, 进而寻找有效的防治方法是当前对虾养殖业中急需解决的关键问题。本文报告该病毒在虾体内的感染增殖。

1 材料方法

1.1 对虾感染试验

健康的日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 稚虾, 体长 2~3 cm, 投喂对虾白斑症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 感染的病虾组织, 每天投喂三次, 投喂约 30 min 后将残饵清除, 养虾用人工海水, 试验过程充气, 水温 24~26℃。

1.2 试验对虾的检测

自感染日开始, 每天取 3~6 尾, 首取濒死或死亡的虾。整虾冰冻纵切(从虾体的一侧沿虾体纵轴切向另一侧), 每个组织器官区各取 3~5 片, 风燥后丙酮固定。单克隆抗体的荧光抗体方法原位观察。对照组同感染试验一样平行取样观察。

1.3 荧光抗体技术(FAT)

六种产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的培养上清[Zhan 等 1999]混合后作为第一抗体, 37℃ 孵育 60 min 后用 PBS-T (含 0.1%吐温 20 的磷酸缓冲液)洗三次, 每次 5 min。第二抗体为荧光素标记的羊抗鼠血清(稀释 200 倍), 同样 37℃ 孵育 60 min 后用 PBS-T 洗三次, 每次 5 min。最后用甘油封片, 荧光显微镜观察。

2 结果

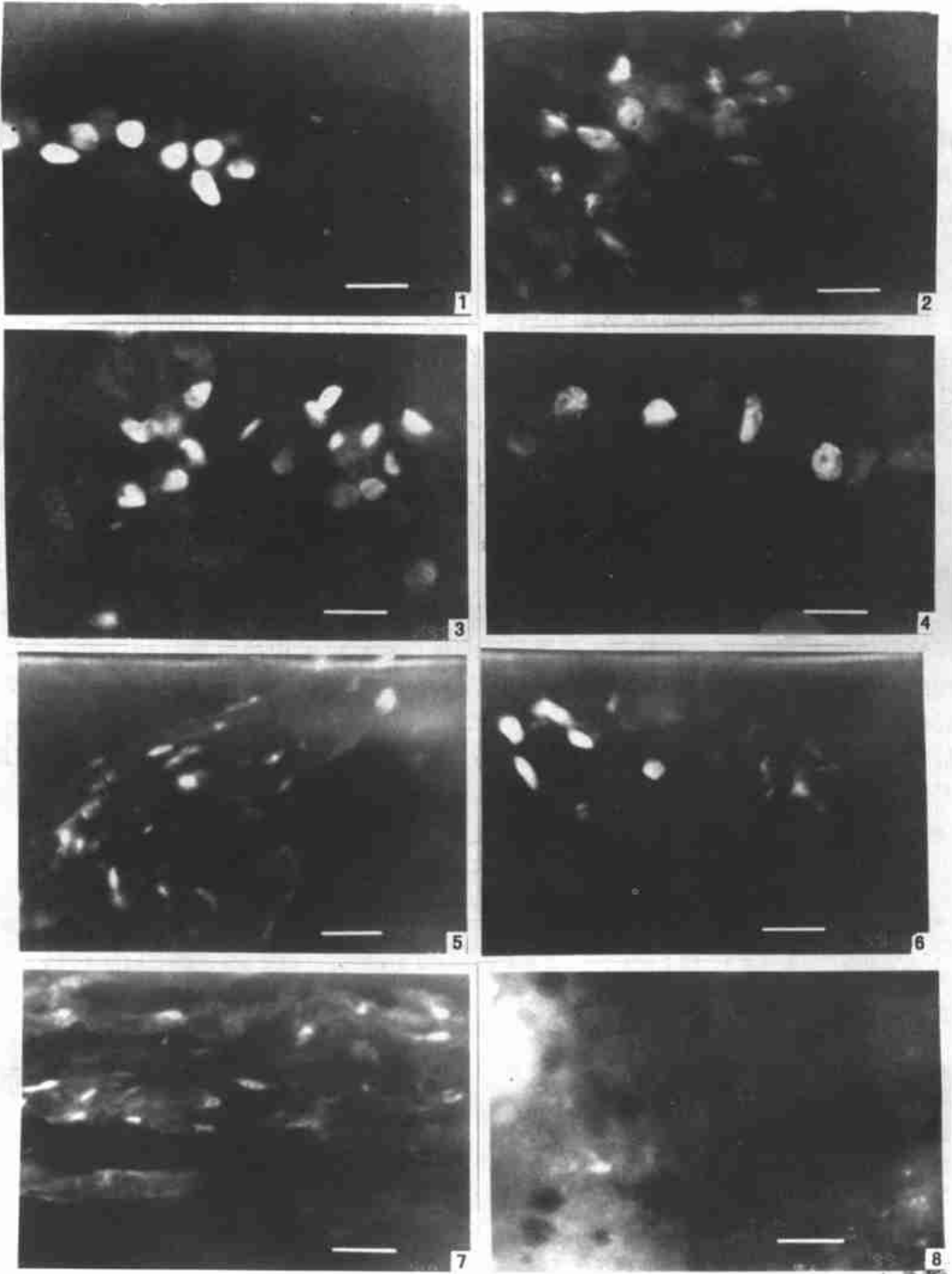
投喂感染后的前三天在虾的各组织器官中均未观察到病毒感染的阳性细胞。第四天检查的三尾虾, 表面观察无任何病症, 经 FAT 检测在其中一尾的鳃丝内观察到少量的病毒感染的阳性细胞(这些细胞是鳃丝腔内的血细胞并非鳃上皮细胞)。第五天开始感染组的小部分对虾出现活动、摄食异常。取异常和非异常虾各二尾检查, 在二尾异常虾的鳃组织、血窦(血细胞)、皮下组织中观察到病毒感染的阳性细胞, 非异常虾仅观察到鳃丝腔内的血细胞被感染。第六天有三尾垂死虾出现, 经检测三尾垂死虾和二尾非异常虾均被病毒感染。病毒感染的阳性细胞, 垂死虾出现在血细胞集中的血窦以及鳃组织、皮下组织、胃上皮、心脏等组织器官内。非异常的虾在鳃组织、皮下组织内观察到。第七天大部分虾出现异常, 垂死虾增多并有虾死亡。取死亡, 垂死, 异常虾各二尾。在血窦、鳃组织、皮下组织、胃上皮组织、心脏等组织器官内观察到病毒感染的细胞, 在二尾死亡虾和一尾垂死虾的淋巴器官以及中肠也观察到被病毒感染的阳性细胞。第八天大部分虾垂死, 死亡虾增多。经检测在血窦、鳃、皮下、胃、心脏、肠等组织器官内观察到大量病毒感染的细胞。第九天全部死亡。取四尾检查几乎在各组织器官内均观察到大量病毒感染的阳性细胞。整个感染检测过程, 在肝胰腺没有观察到病毒感染的阳性细胞(表 1, 图版-1~8)。对照组平行取样检测均为病毒感染阴性结果。

表 1 单克隆抗体的荧光抗体法原位检测白斑症病毒的感染组织器官结果

Tab. 1 Detection of WSSV infected tissues and organs by FAT using monoclonal antibodies

感染天数	3			4			5				6					7						8			9						
检查虾数	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4			
症状	---	---	---	---	---	---	++	+	+	-	+++	+	+	+	-	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+		
鳃	---	---	---	-(+)*-	---	---	++	(++)	---	---	++++	+	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	
血细胞	---	---	---	---	---	---	+++	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+
心脏	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+++	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+		
血窦	---	---	---	---	---	---	++	+	+	-	++++	+	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	
胃	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+++	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+		
淋巴器官	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+		
皮下组织	---	---	---	---	---	---	++	+	+	-	++++	+	+	+	+	+	++++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	
中肠	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+		
肝胰腺	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		

注: * 病毒感染的阳性细胞是鳃丝腔内的血细胞。



图版 Plate

1~7. WSSV 感染阳性。8. WSSV 感染阴性。标尺 20 μm。

1. 鳃, 2 血窦, 3. 皮下组织, 4. 胃, 5. 心脏, 6. 淋巴器官, 7. 中肠, 8. 肝胰腺

3 讨论

WSSV 的感染途径, 在人工感染时普遍采用注射、经口、浸泡等感染方法, 这些都证明 WSSV 可以引起对虾的感染。而在养殖虾池中的对虾感染途径主要是经口感染。本研究经口投喂的感染同时也存在浸泡感染途径, 这是由于投喂的病虾组织中的病毒粒子不可避免的也扩散到水体中。本研究的目的是病毒在虾体中的感染增殖, 因而经口和浸泡二种感染途径同时存在并不影响感染结果的可靠性, 实际上在养殖虾池中这二种感染情况也是同时存在的。注射感染是一种极端方式, 在养殖条件下几乎是不存在的, 为此本研究没有采取注射感染的途径。

已有研究结果表明 WSSV 在病虾的鳃、胃上皮、皮下, 淋巴等组织器官中观察到, 但病毒感染路径, 感染组织器官的顺序及其感染强度, 病毒在虾体内的感染增殖尚无研究报道。本研究利用单克隆抗体 FAT 的原位观察方法, 在感染后的第四天, 首先在鳃丝腔的血细胞中观察到病毒感染, 随感染时间的增长依次在血窦、皮下组织、上皮组织、心脏、淋巴器官、肠组织中观察到。感染后期几乎在所有的组织器官中都能观察到, 但在肝胰腺中没有发现。在鳃、皮下组织和血窦中感染强度最高。根据研究结果作者认为鳃应作为 WSSV 病诊断的主要检测组织。这不仅结果可靠, 而且取材准确方便。

本研究虽然不能完全解释病毒是如何进入虾体内的, 但从病毒在虾体内的感染动态分析, 有可能病毒首先是感染血细胞并在血细胞内增殖, 进而随循环系统感染其他组织器官的细胞。鳃、血窦和皮下是血淋巴较集中的地方, 因而在这些地方首先观察到病毒感染的阳性细胞。Zhan 等 [1998, 1999] 及其他研究者 Kimura 等 [1996], Inouye 等 [1996], Durand 等 [1996] 都从感染对虾的血淋巴中分离提纯出量多纯度高的病毒粒子, 也说明病毒在血细胞内得到了大量的增殖, 因此 Inouye [1996] 称该病为对虾急性病毒血症 (Penaeid Acute Viremia, PAV)。近几年的对虾养殖生产实践也证明了 WSSV 对血细胞严重感染, 因而引起对虾大量死亡这一观点, 王克行等 (1998) 经过多年对虾白斑病研究和生产实践提出: 造成对虾白斑病暴发的主要环境因子是水中溶解氧的下降。例如阴天和下雨都会因氧的分压下降及浮游植物光合作用减弱而降低水中的溶解氧; 浮游植物大量死亡使水中失去造氧来源; 浮游动物大量繁殖, 也能使池水溶解氧降低; 水质和底质污染与恶化, 不仅会分解出大量有毒物质, 而且有机物还会大量消耗溶解氧; 增氧机停机, 池中溶解氧下降, 2~3 天便会出现白斑病症状, 暴发死亡。作者分析了 对虾白斑病对水中溶解氧特别敏感的原因主要是病毒侵犯的靶器官是鳃及循环系统。鳃的病 变减少了氧气在鳃上交换, 血细胞的病变又减少了氧的输送, 没有足够的氧, 必然会影响对 虾的代谢, 降低对虾的抗病力, 造成对虾发病和死亡。

本研究采用整虾冰冻切片, 单克隆抗体 FAT 原位观察方法。整虾切片不仅有利于了解病毒在虾体内的分布情况, 而且还可以在同等水平上比较病毒在各组织器官的感染强度。单克隆抗体的高特异性和 FAT 的原位性能准确了解病毒的靶器官及其增殖场所。核酸探针的原位杂交技术在感染靶器官研究上已有应用 [Chang 等 1996, Durand 等 1996], 但用于病毒在虾体内感染增殖的研究上尚无报道。

(1) 王克行, 李晓浦, 马 焱. 1998. 对虾白斑病暴发的环境因子分析.

参 考 文 献

- Chang P S, Lo C F, Wang Y C, et al. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis Aquat Org*, 27: 131~139
- Durand S, Lightner D V, Nunan L M, et al. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 27: 59~66
- Inouye K, Yamano K, Ikeda N, et al. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol*, 31: 39~45
- Kimura T, Yamano K, Nakano H, et al. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathol*, 31: 93~98
- Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J Aquat Anim Health*, 10: 405~410
- Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. 1999. Production of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus. *J Aquat Anim Health*, 11: 17~22

INFECTION DEVELOPMENT OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN THE BODY OF *PENAEUS JAPONICUS*

ZHAN Wen-Bin, WANG Yuan-Hong, SUZUKI Shinichi^{*}, YU Kai-Kang, FUKUDA Hideo^{*}
(*Aquaculture Research Laboratory, Ocean University of Qingdao, 266003*)
(*Tokyo University of Fisheries, Japan*)^{*}

ABSTRACT Juvenile *Penaeus japonicus* were experimentally infected by feeding minced shrimp tissue of WSSV-infected. The experimental shrimps were sampled everyday and whole body of the shrimp was cryosectioned then WSSV was detected by FAT method using monoclonal antibodies in order to explain the virus development in shrimp body. The results indicated that in the first three days post-infection the virus was not detected in any samples; on the fourth day the virus was first detected in hemacyte in gill cavity; on the fifth day it developed to gill tissue, epidermal tissue and hemal sinus; on the sixth day to stomach and heart; on the seventh day to lymphoid organ and mid-gut; on the eighth and ninth days to all the detected tissues but not to the hepatopancreas.

KEYWORDS *Penaeus japonicus*, White spot syndrome virus (WSSV), Infection development