

文章编号: 1000-0615(2001)01-0047-05

# 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性

朱建中, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

**摘要:**应用克氏原螯虾作为动物模型研究对虾白斑综合征病毒(WSSV)的感染增殖特性,涉及感染温度、感染途径、继发感染、半数致死量(LD<sub>50</sub>)、免疫保护及保存期等。结果显示,22~25℃时,接种WSSV的螯虾一般于2~7d内死亡,温度升高对病毒增殖影响不显著,30~32℃时,平均死亡时间2~6d,温度降低对病毒增殖影响较显著,15~19℃时,接种螯虾平均2~10d内死亡,8~10℃时,平均死亡时间3~13d。感染途径分别用腹节肌肉、腹节皮下注射及口服,均能使螯虾感染发病,而浸泡方式不能使螯虾发病。细菌分离和细菌定量结果表明,寄生于螯虾心脏、肝胰腺内的阴沟肠杆菌在感染后期大量增殖,菌量分别是正常螯虾的25和30倍,形成继发感染。用螯虾测定WSSV的LD<sub>50</sub>为10<sup>-6.5</sup> mL<sup>-1</sup>种毒液。将病毒56℃,30min灭活后免疫螯虾,不能使螯虾形成免疫保护。WSSV匀浆液-30℃冻存1年后失活,而-30℃冻存于螯虾体内WSSV保存1年后仍有活力。

**关键词:**克氏原螯虾;白斑综合征病毒;感染温度;感染途径

中图分类号: S945.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A

## Characterization of shrimp white spot syndrome virus(WSSV) infection in *Cambarus proclarkii*

ZHU Jian-zhong, LU Cheng-ping

(Key Lab of Animal Disease Diagnostic and Immunology,

The Ministry of Agriculture Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Crawfishes (*Cambarus proclarkii*) as animal were infected with white spot syndrome virus (WSSV) for studying various infection characters, including temperature, transfer route, successive infection, median lethal dose (LD<sub>50</sub>), immunity against virus and virus conservation etc. The results showed crawfishes usually died in 2-7d after infection at the temperature of 22-25℃, in 2-10d at 15-19℃, in 3-13d at 8-10℃ and 2-6d at 30-32℃. Below 5℃, the infected crawfishes could remain active for more than one month. By injecting and oral feeding, WSSV could infected crawfishes successfully and there was no significant difference between muscle injection and hypoderm injection. Soaking with WSSV failed to infect crawfishes. Bacteria examination in healthy and diseased crawfishes showed *Enterobacter cloacae* in the heart and hepatopancreas multiplied 25 and 30 times respectively, indicating that bacteria successive infection existed during the virus infection. The LD<sub>50</sub> was 10<sup>-6.5</sup> mL<sup>-1</sup> WSSV. Crawfishes which were immunized with WSSV inactivated at 56℃ for 30min could not obtain immunity protection from. WSSV from homogenate stored at -30℃ for 1 year could not be recovered but from crawfishes stored at -30℃ for 1 year could be recovered successfully.

收稿日期: 2000-01-05

第一作者: 朱建中(1971-)男,江苏兴化人,博士,主要从事病原微生物分子生物学研究。Tel: 025-6662910, E-mail: zhujianzhong71@yahoo.com

联系作者: 陆承平(1945-)男,上海人,教授,主要从事鱼虾病原微生物学及兽医微生物学等研究。Tel: 025-4395328, E-mail: dvmi@njau.edu.cn

**Key words:** *Cambarus proclarkii*; white spot syndrome virus(WSSV); infection temperature; infection route

1993、1994 年我国人工养殖对虾暴发性病毒病大流行,研究表明这次流行病的病原主要为白斑综合征病毒(WSSV,前称无包埋体对虾病毒 Non-occluded shrimp virus, NOSV)<sup>[1-4]</sup>。由于没有对虾的细胞系,病毒的增殖和鉴定难以进行,黄等<sup>[5]</sup>用对虾来进行人工感染研究取得了较好的效果,但对虾价格昂贵,饲养不易,因而实际应用受到限制。魏静等<sup>[6]</sup>用螯虾作为动物模型增殖病毒,螯虾价格便宜,易于饲养,给免疫测定、药物筛选等研究带来很大便利。本试验使用该动物模型对 WSSV 体内增殖特性作了较为系统的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

克氏原螯虾(*Cambarus proclarkii*,以下简称螯虾),购自南京某农贸市场,实验室饲养一周以上,健康存活。

### 1.2 种毒处理

白斑综合征病毒青岛株(WSSV)经螯虾传 15 代,本室保存。将人工接种 WSSV 死亡的螯虾去除附肢、甲壳和肝胰腺,取头胸部称重,与  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS(pH7.4) 1:5( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 稀释,玻璃匀浆器匀浆,匀浆液  $3000 \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20min,上清液依次用滤纸和  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,  $-30^\circ\text{C}$  冻存备用。

### 1.3 温度对病毒体内增殖的影响

在 4 个温度范围( $8\sim 10^\circ\text{C}$ ,  $15\sim 19^\circ\text{C}$ ,  $22\sim 25^\circ\text{C}$ ,  $30\sim 32^\circ\text{C}$ ) 内进行实验,分别用种毒液腹节肌肉注射,接种量每尾 0.1mL,接种后观察并记录螯虾每天死亡数。

### 1.4 接种途径对病毒感染的影响

分别腹节肌肉、皮下注射、口服、浸泡(24h)途径对螯虾进行感染,然后分别观察并记录螯虾每天死亡数。

### 1.5 细菌继发感染的检查

#### 1.5.1 细菌观察及细菌分离

取正常螯虾和感染死亡螯虾各 5 尾,分别从心脏、肝胰腺无菌取样,分为两份,一份制成组织涂片,革兰氏染色后在显微镜下观察,另一份用 TSA 平板划线,于  $28^\circ\text{C}$  温箱中生长 24h,观察细菌生长。

#### 1.5.2 细菌定量

取正常螯虾和感染死亡螯虾各 5 尾,分别从心脏、肝胰腺无菌取样,称重后稀释,涂布 TSA 平板,于  $28^\circ\text{C}$  温箱中生长 24h,用平板计数法计算细菌数,以各样品平均值作为实验结果。

### 1.6 半数致死量的测定

将种毒液稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  等 7 个稀释度,分别腹节肌肉注射螯虾,每尾 0.1mL,记录螯虾死亡结果,按 Reed & Muech 公式计算  $\text{LD}_{50}$  值。

### 1.7 接种病毒的免疫保护

将种毒液  $56^\circ\text{C}$ , 30min 灭活,然后腹节肌肉注射螯虾,每尾 0.1mL,将螯虾分组,一组间隔 7d 后同样

再次注射,另一组不注射,15d后,用种毒注射攻击,每尾0.1mL。观察并记录结果。

## 1.8 种毒保存方式、保存期的检验

将上述种毒液置于-30℃,一年后取出腹节肌肉注射接种螯虾,每尾0.1mL,同时将感染螯虾冻存于-30℃,分别于3个月、1年取出处理后腹节肌肉注射接种螯虾,每尾0.1mL。

## 2 结果

### 2.1 不同温度接种病毒螯虾死亡情况

温度不同时,螯虾死亡时间不同,死亡高峰出现时间也不相同,随着温度的逐步升高,接种螯虾分别于3~13、2~10、2~7、2~6d内死亡,死亡时间逐渐变短,死亡高峰出现时间也相应提前,分别为8~10℃第6天、15~19℃第5天、22~25℃第3天、30~32℃第3天,降低温度对病毒增殖的影响要大于升高温度带来的影响(表1)。

表1 螯虾在不同温度接种病毒的死亡情况

Tab.1 Artificial infection of crawfishes with WSSV at different temperature

组别	感染温度(℃)	螯虾尾数	接种后每天螯虾死亡尾数											螯虾合计死亡尾数			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	13	
1	8~10	12			1	1	1	2	2	1	2		1		1		12
2	15~19	70		3	4	15	21	11	6	4	5	1					70
3	22~25	25		5	14	4			1	1							25
4	30~32	13		2	6	1	2	2									13

### 2.2 不同感染途径螯虾感染病毒情况

腹节肌肉注射、腹节皮下注射、口服均能使螯虾感染发病。腹节肌肉注射组和腹节皮下注射组螯虾分别于2~11d死亡,基本无差别。口服组如果与注射组接种同剂量(每尾0.1mL),死亡时间则明显迟于注射组,推迟到20d以后(结果未显示)。浸泡组存活时间在一个月以上,不能使螯虾发病(表2)。

表2 用不同感染途径接种病毒的死亡情况

Tab.2 Artificial infection of crawfishes with WSSV via different inoculation routes

感染途径	感染剂量	螯虾尾数	接种后每天螯虾死亡尾数											螯虾合计死亡尾数		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
腹节肌肉注射	0.1mL·尾 <sup>-1</sup>	13		1		1	3	3	2	1	1		1			13
腹节皮下注射	0.1mL·尾 <sup>-1</sup>	14			1		1	4	2	3	1			2		14
口服	0.3mL·尾 <sup>-1</sup>	16			1		3	5	2	1	0	2	2			16
浸泡	10×10 <sup>-6</sup>	13														0

注:浸泡组螯虾存活1个月以上。

### 2.3 细菌分离及定量

健康螯虾心脏和肝胰腺细菌总数分别为 $5.8 \times 10^2$  CFU·g<sup>-1</sup>、 $6.3 \times 10^2$  CFU·g<sup>-1</sup>,螯虾在接种病毒后,心脏和肝胰腺中的细菌总数分别为 $1.5 \times 10^3$  CFU·g<sup>-1</sup>、 $1.9 \times 10^3$  CFU·g<sup>-1</sup>,均有较大幅度的升高,分别约是接种前的25和30倍。细菌学检查发现,健康螯虾心脏和肝胰腺中主要存在一种革兰氏阴性短小杆菌,该菌在TSA平板上生长形成中等大小、湿润、透明的菌落,据bioMerieux Vitek细菌鉴定系统鉴定,经查该菌与肠杆菌科肠杆菌属阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)最为接近<sup>[7]</sup>。在接种病毒发病后期,螯虾心脏和肝胰腺中的阴沟肠杆菌数量增加,形成继发感染。

## 2.4 LD<sub>50</sub>的测定

据 Reed-Muech 公式计算出 LD<sub>50</sub>为  $10^{-6.5} \cdot \text{mL}^{-1}$  种毒液。不同稀释度接种螯虾死亡结果见表 3。

表 3 不同稀释度病毒人工接种螯虾的死亡情况

Tab. 3 Artificial infection of crawfishes with WSSV of different dilutions

接种病毒液 稀释度	螯虾尾数	接种后每天螯虾死亡尾数										螯虾合计 死亡尾数		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
$10^{-1}$	8			1	1		3	2	1					8
$10^{-2}$	7			1	1	2	2	1						7
$10^{-3}$	8			2	2		1	2		1				8
$10^{-4}$	8					2	3	3						8
$10^{-5}$	7				1	2	1	1	1			1		7
$10^{-6}$	8													0
$10^{-7}$	8													0

注:  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  两个稀释度接种螯虾存活一个月以上。

## 2.5 免疫保护

无论是一次接种还是二次接种病毒灭活物, 接种螯虾在攻毒后 2~ 8d 内仍全部死亡, 与正常螯虾攻毒死亡时间无显著差别, 显示接种灭活病毒并不能诱导螯虾的特异性免疫应答(表 4)。

表 4 螯虾病毒免疫接种后攻毒死亡情况

Tab. 4 Artificial infection of immunized crawfishes with WSSV

组别	螯虾尾数	接种后每天螯虾死亡尾数							
		1	2	3	4	5	6	7	8
一次免疫组	8			1	1	3	2		1
二次免疫组	13		1		2	2	4	2	2

## 2.6 种毒保存方式及保存期

冻存整体螯虾方式保存的种毒 3 个月后接种健康螯虾, 螯虾 2~ 9d 内死亡; 冻存 1 年后全螯虾的种毒接种健康螯虾, 螯虾 6~ 10d 内死亡, 通过匀浆液冷冻保存的种毒, 保存 1 年后则完全失活。保存种毒复苏时连续传 2~ 3 代后, 接种螯虾一般稳定于 6~ 7d 左右全部死亡(表 5)。

表 5 种毒保存方式及保存期

Tab. 5 Examination of conservation manner and period of WSSVZ

保存方式	保存期(月)	螯虾尾数	接种后每天螯虾死亡尾数											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
冰冻含毒	3	25		2	1	3	1	6	4	4	4			
整体螯虾	12	5						1	1	1	1	1		
冰冻含毒 螯虾匀浆	12	12												

注: 冰冻匀浆液接种螯虾存活一个月以上。

## 3 讨论

用螯虾作为动物模型取代对虾增殖 WSSV 非常有利, 魏静等<sup>[6]</sup>成功地用对虾 WSSV 感染螯虾, 为研究该病毒开创了一条新路。但 WSSV 在螯虾体内的增殖性及影响因素尚不了解, 本试验正是这一研究的深入和继续。对虾白斑征病毒病的流行病学资料表明, 该病在气温 26~ 29℃、水温 22~ 25℃ 时处于高发期, 温度下降则发病减少, 试验显示, 人工接种螯虾与对虾自然发病病毒的增殖过程有相似性, 25~ 30℃, 接种螯虾一般 7d 左右全部死亡。温度下降螯虾死亡时间延长, 如果温度低于 5℃, 接种螯虾 1 个月以上不死。

螯虾和对虾作为亲缘关系很近的甲壳类动物, 都是开放性的体内系统, 体内存在一些非致病菌或条

件致病菌, 因此螯虾和对虾在感染病毒后都存在并发感染和继发感染的可能性。黄 等<sup>[5]</sup>在对虾人工感染病毒死亡后, 用病理学方法检查出感染对虾组织存在一些细菌性肉芽肿, 本试验也证实螯虾感染后存在阴沟肠杆菌继发感染。因此处理种毒时, 用细菌滤膜过滤细菌, 以保证病毒充分增殖, 非常重要。

应用动物模型可以很方便地计算出  $LD_{50}$ , 在此基础上可以准确掌握人工感染接种的病毒量<sup>[8]</sup>。本试验显示, 经灭活病毒两次免疫的螯虾不能抵抗病毒的攻击, 证实甲壳类动物不具备有效的特异性保护系统, 这对生产实践有重要指导意义。

上海出入境检验检疫局吴仲梁先生协助鉴定细菌, 谨此致谢。

#### 参考文献:

- [1] 高 玮, 张立人. 对虾病毒病害的研究进展[J]. 中国病毒学, 1997, 12(1): 8~ 13.
- [2] 黄 , 宋晓玲, 于 佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1~ 10.
- [3] Lu C P, Zhu S, Guo F S, et al. Electron microscopic observation on a non-occluded baculo-like virus in shrimps [J]. Arch Virol, 1997, 142: 2073~ 2078.
- [4] 彭宝珍, 任家鸣, 沈菊英, 等. 急性致死性对虾病的杆状病毒病原研究[J]. 病毒学报, 1995, 11(2): 151~ 157.
- [5] 黄 , 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 51~ 58.
- [6] 魏 静, 陆承平, 黄 , 等. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(4): 78~ 82.
- [7] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of Determinative Bacteriology(9th ed) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 1080~ 1082.
- [8] Tapay L M, Lu Y, Gose R B, et al. Development of an *in vitro* quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of Penaeid shrimp[J]. J Virol Methods, 1997, Feb, 64(1): 37~ 41.