

文章编号: 1004 - 7271(2007)01 - 0033 - 07

## 白斑综合征病毒感染梭子蟹试验 及组织病理学观察

许文军<sup>1</sup>, 绳秀珍<sup>2</sup>, 施慧<sup>1</sup>, 王忠发<sup>3</sup>, 胡则辉<sup>1</sup>

- (1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100;  
2. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;  
3. 舟山市疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316000)

**摘要:** 利用对虾白斑综合征病毒 WSSV, 采用注射和投喂方式, 对养殖三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 进行人工感染, 以确定 WSSV 对养殖梭子蟹的易感性和可能存在的潜在危害。结果发现, 在水温 24 ~ 25 °C 条件下, 病毒注射感染组全部发病, 10 ~ 16 d 全部死亡; 投喂组死亡率 33%; 对照组未出现死亡。采用荧光定量 PCR 对各试验组梭子蟹的肌肉和肝胰腺混合物进行 WSSV 检测, 发现注射感染组阳性检出率为 100%, 均为强阳性; 投喂组阳性检出率为 50%; 对照组的阳性检出率均为 0。光镜下可观察到感染梭子蟹的肝胰腺、肌肉组织、鳃组织的靶细胞核肿大、变形, 并出现以坏死为主的变质性病变; 电镜下病变组织细胞中可见形态、大小与 WSSV 一致的病毒粒子。由此表明: 对虾 WSSV 可以感染三疣梭子蟹, 并表现出明显的病理症状, 感染与病毒的数量以及梭子蟹自身的体质、环境条件密切相关。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 白斑综合征病毒; 人工感染; 病理组织学

中图分类号: S 945 文献标识码: A

## Artificial infection for *Portunus trituberculatus* by WSSV and histopathological observation

XU Wen-jun<sup>1</sup>, SHENG Xiu-zhen<sup>2</sup>, SHI Hui<sup>1</sup>, WANG Zhong-fa<sup>3</sup>, HU Zhe-hui<sup>1</sup>

- (1. Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China;  
2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;  
3. Zhoushan Center for Disease Control and Prevention, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** In order to ascertain the susceptibility and the potential danger of WSSV to the cultured *Portunus trituberculatus*, the healthy crabs were inoculated with WSSV by intramuscular injection and feeding. The results showed that the crabs in the group of intramuscular injection all became diseased and died at 10 to 16 days after being inoculated; the mortality of the group of feeding was 33%, and that of the control group was 0. Real-time PCR assay was developed in this study for quantitative analysis of WSSV in muscle and hepatopancreas. Detectable rates of WSSV from intramuscular, feeding and control groups were 100%, 50% and 0 respectively. Histopathological observation showed that the nucleus of target cells in the hepatopancreas, atrial muscle, and gill became swollen and distorted, severe vacuolation and necrosis of epithelial cells of

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 浙江省科技厅院所研究开发项目(2006F13002)

作者简介: 许文军(1970-), 男, 浙江舟山人, 高级工程师, 硕士, 主要从事海水养殖及病害方面的研究。Tel: 0580 - 3053386, 13967213800, E-mail: xwenjun@sina.com

hepatopancreas and gill, as well as the atrial muscle fibres were obviously observed. Under electron microscope, virus particles with the same size and morphological features as WSSV were seen in the abnormal tissue cells. In conclusion, the WSSV can infect *Portunus trituberculatus* and cause obvious histopathological changes in the crab tissues, and additionally, the degree of the infection of WSSV was closely related to the amount of virus, as well as the crab's health and environment conditions.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; WSSV; artificial infection; histopathology

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是目前对虾养殖中危害最大的病毒性疫病之一,此病毒传播速度快,病原性强,宿主范围广,感染死亡率高,给对虾养殖业带来了沉重的打击。雷质文等<sup>[1]</sup>认为海水甲壳动物对 WSSV 普遍易感,中国对虾(*Penaeus Chinesis*)、南美白对虾(*P. vannamei*)、斑节对虾(*P. monodon*)、日本对虾(*P. japonicus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、脊尾白对虾(*Exopalaemon carinicauda*)等养殖对虾是 WSSV 的天然宿主;天津厚蟹(*Helice tientsinensis*)、日本大眼蟹(*Macrophthalmus japonicus*)、乳斑虎头蟹(*Orithyia mamillaris*)等蟹类亦皆可被 WSSV 侵染。海洋近岸及虾池中几乎所有的甲壳类、挠足类等动物均可检出有阳性个体<sup>[2]</sup>。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国海水大型经济蟹类,随着梭子蟹人工繁育和养成技术的突破,养殖发展迅猛,已成为继中国对虾以后我国主要海水甲壳类养殖品种之一。但近年来,不断有虾蟹混养池塘在对虾感染 WSSV 发生大量死亡后,继而会出现养殖蟹类死亡的报道<sup>[3,4]</sup>。三疣梭子蟹属甲壳类动物,其对 WSSV 的易感性如何? 是否可能存在象对虾一样暴发性发病死亡的可能? 本实验以患白斑病毒病南美白对虾病虾作为感染源,人工感染养殖梭子蟹,旨在确定白斑综合征病毒对养殖梭子蟹的易感性和可能存在的潜在危害,进一步为梭子蟹养殖的病害防治提供依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

感染用白斑综合征病毒 WSSV 来自患典型白斑病毒病的养殖南美白对虾。取经免疫金试剂条检测为阳性(中国海洋大学开发),进一步采用荧光定量 PCR 检测确认为 WSSV 感染发病致死的南美白对虾 500 g,保存于 -40 °C 冰箱中备用。

感染用梭子蟹来自浙江省海洋水产研究所西闪试验场当年人工育成的蟹种,体重 40 ~ 60 g,挑选活力强、无损伤、体色正常的健康蟹作为试验用蟹,于室内玻璃钢水槽中暂养 4 d 后作感染试验用,培养温度 23 ~ 25 °C。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 白斑综合征病毒 WSSV 悬液制备

取保存的病虾虾头 40 个,解冻后剥去甲壳,加 10 倍体积的无菌生理盐水在组织匀浆器中匀浆,4 °C 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液稀释至 1:10,1% 双抗 4 °C 处理过夜,再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,保存过滤液,作为注射感染实验的病毒液。

#### 1.2.2 感染试验

采用注射和投喂两种方式进行感染,同时分别设置对照组。试验随机分组,每组设 6 只蟹。病毒注射组:每只蟹注射 0.2 mL 病毒悬液,注射部位为第 4 对步足基部的肌肉处。对照组注射等量无菌生理盐水。病毒投喂组:每天每只蟹投喂 1 尾解冻的病毒虾。投喂对照组:每天每只蟹投喂 1 块鱼肉(约 5 g)。试验在 20 cm × 50 cm 玻璃钢水槽中进行,试验水温控制在 23 ~ 25 °C,充气培养,每天换水 1 次。观察梭子蟹的活动及死亡情况,统计死亡数量并保存样品作病理检查及病毒检测。

### 1.2.3 组织病理学观察

取具有典型病毒感染症状梭子蟹的肝胰脏、心脏、鳃、肌肉等组织,用过滤海水配置的 10% 福尔马林固定,常规方法制备石蜡切片, H. E 染色,光镜观察。另外,用 2.5% 戊二醛固定病毒感染蟹的肝胰脏、肌肉,制备超薄切片,进行电镜超薄切片观察。

### 1.2.4 病毒检测

感染试验结束,采用荧光定量 PCR 对所有个体(包括死亡保存个体和未死个体)的肝胰脏和肌肉混合物进行 WSSV 检测。

## 2 结果

### 2.1 人工感染及症状观察

不同方法感染梭子蟹的实验结果如表 1 所示。

病毒注射组梭子蟹于注射后第 2 天出现食欲减退现象,第 3 天起开始停止摄食,第 4 天出现 1 只不正常死亡,试验第 10 天开始出现死亡高峰,至第 16 天全部死亡。解剖发现,所有发病和死亡蟹出现肝胰脏发白,血淋巴白浊、不能凝聚等症状。

病毒投喂组梭子蟹于投喂病毒虾第 4 天,发现个别摄食减少,分别于第 8 天和第 9 天出现 2 只死亡,其它蟹至试验结束仍存活,并能正常摄食。死亡个体未出现血淋巴白浊现象。

注射对照组与投喂对照组,整个试验过程中均活动正常、摄食良好,未出现异常和死亡。

表 1 梭子蟹人工感染南美白对虾 WSSV 试验结果

Tab. 1 The challenge tests of *Portunus trituberculatus* with WSSV

试验组别	试验只数	试验期间死亡数(只)										死亡数 (只)	死亡率 (%)
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20		
病毒注射组	6	0	1	0	1	2	1	0	1	0	0	6	100
注射对照组	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
病毒投喂组	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	33
投喂对照组	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 2.2 组织病理观察

濒死的梭子蟹肝胰脏组织切片经 H. E 染色后在光学显微镜下观察,发现肝胰脏柱状上皮细胞呈空泡化变性,细胞排列紊乱,肝小管上皮细胞形态及界线模糊,细胞核溶解消失,呈现细胞坏死状态,无法区分肝胰脏的各种类型细胞。肝小管上皮细胞内有血细胞浸润现象。肝小管间的血腔隙及结缔组织间充满炎性坏死崩解物,可看到细胞核固缩(图版 I-1,2)。

鳃的初级鳃片内有许多嗜曙红颗粒细胞(图版 I-3);次级鳃小片水肿,上皮细胞分离,甚至整个次级鳃小片上皮细胞坏死、脱落,看不到细胞结构(图版 I-4)。

患病梭子蟹心肌纤维浊肿,有的空泡变性,大部分横纹消失,可见内皮巨噬细胞膨大(图版 I-5)。还可观察到局部性肌肉溶解坏死(图版 I-6)。

对照组梭子蟹鳃、肝胰脏、肌肉组织细胞中未观察到明显的病理变化,核膜、细胞膜结构清楚,细胞形态清晰可辨,组织结构完整。

电镜观察发现,有的肝胰脏细胞还具有细胞形态,可观察到细胞前端的微绒毛,但细胞界限不太清楚。许多细胞已失去细胞形态,细胞破裂,细胞中有病毒颗粒(图版 II-1)。肝胰脏上皮细胞的细胞核膨大,其中布满病毒颗粒(图版 II-2,3),成熟病毒粒子大小为(110~140) nm × (340~420) nm,横切面为圆形,纵切面为杆状而略带椭圆,完整病毒粒子有核心、衣壳和囊膜。可以看到处于不同发育状态的病毒,如成熟病毒外被囊膜;有的病毒外面无囊膜;有的则为空的核衣壳,无核心。

感染 WSSV 的梭子蟹的心肌纤维细胞的细胞核也发生膨大,几乎占据整个细胞,其中可观察到具有

同肝胰腺中的病毒相同形态的杆状病毒粒子(图版 II-4)。

对照组梭子蟹细胞结构和形态完整,未见有杆状病毒粒子。

### 2.3 定量荧光 PCR 病毒检测结果

感染试验结束,采用荧光定量 PCR 对死亡保存个体和未死个体的肝胰脏和肌肉混合物进行 WSSV 检测。结果发现,病毒注射组各蟹(包括 5 只死亡个体和 1 只濒死个体)均表现出 WSSV 强阳性,阳性检出率为 100%;病毒投喂组,2 个死亡个体当中一个为 WSSV 强阳性,另一只为弱阳性(死亡),其余 4 只未死个体有一只呈弱阳性,3 只呈 WSSV 阴性,阳性检出率为 50%。对照组所有个体检测均呈 WSSV 阴性,阳性检出率为 0(图 1 显示部分试验蟹定量荧光 PCR 检测结果)。

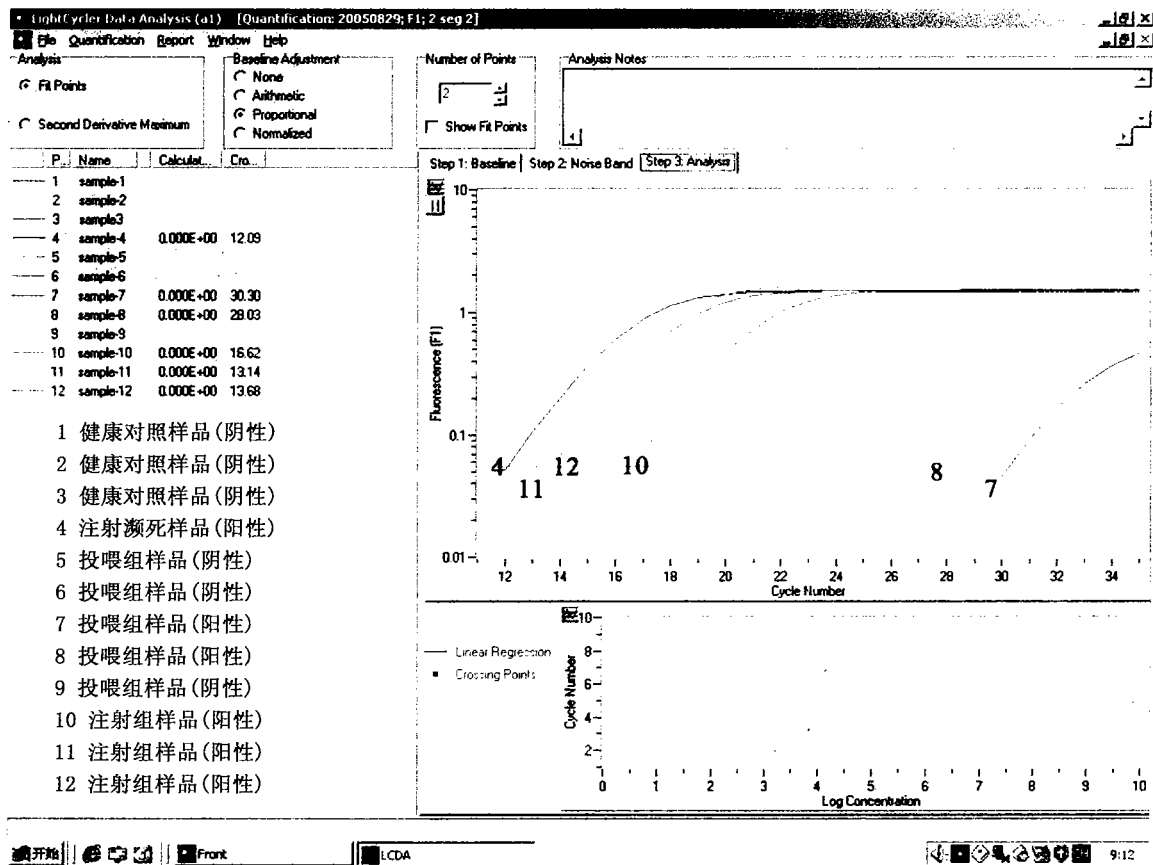


图 1 部分试验蟹定量荧光 PCR 病毒检测结果

Fig. 1 Detection results of WSSV by real-time PCR assay

## 3 讨论

从试验结果可以看出,不同的感染方式,其感染结果存在显著差异。病毒注射感染组,所有个体均出现食欲减退、停食、反应迟缓,解剖有肝胰腺发白,血淋巴白浊等明显的异常临床表现,且在感染第 10 天左右出现死亡高峰,16 d 全部死亡,对照注射生理盐水组未出现死亡。对感染濒死个体的组织病理观察可见,病蟹肝胰腺、肌肉、鳃组织的靶细胞核肿大、变形,并出现以坏死为主的病变,电镜下可在濒死蟹的肝胰腺、肌肉等组织细胞中观察到大量形态、大小与 WSSV 一致的病毒粒子。这些现象与对虾白斑病毒病感染的情况相类似<sup>[5]</sup>。进一步对发病死亡个体进行定量 PCR 检测,发现所有注射组个体均为 WSSV 强阳性,由此可以证明 WSSV 可以感染梭子蟹,并导致发病死亡。

白斑病毒 WSSV 对中国对虾的致病力极强。黄捷等<sup>[6]</sup>报道,对虾白斑病毒 WSSV 可通过投喂进行

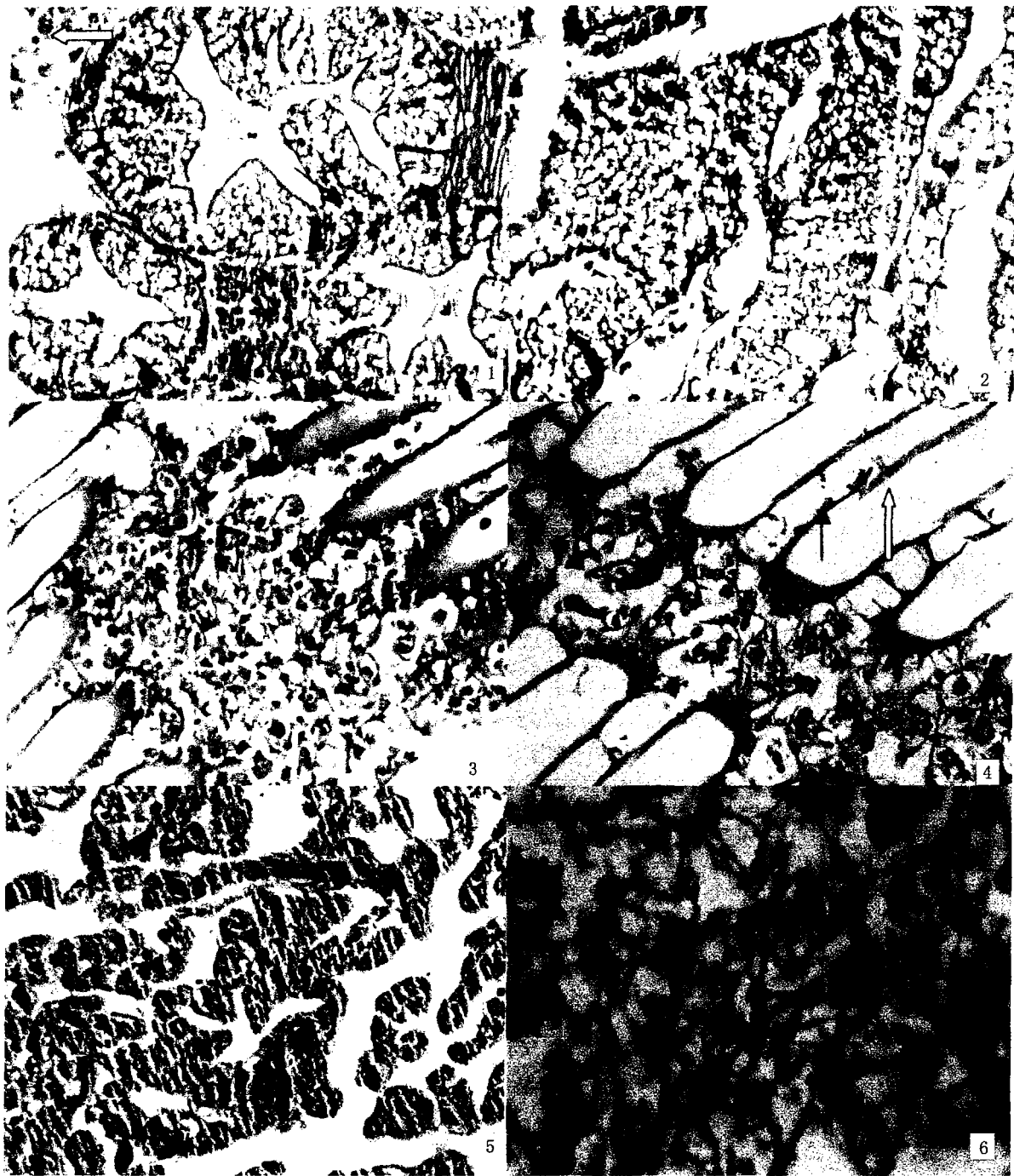
感染,体长 7 cm 的对虾感染病毒后 2~9 d 出现死亡,累积死亡率均为 100%。宋晓玲等<sup>[7]</sup>,刘萍等<sup>[8]</sup>,蔡生力等<sup>[9]</sup>的研究亦证实了中国对虾感染 WSSV 主要是经口传播而引起感染。根据本实验的结果,投喂感染组的阳性检出率为 50%,而对照投喂感染组的阳性检出率为 0,表明对虾 WSSV 可以通过摄食方式进行水平传播感染梭子蟹;同时根据,对 20 d 内各感染组的发病死亡率和阳性检出率比较,可见投喂感染组明显低于注射感染组,分析主要是由于注射感染组病毒进入蟹体的数量较投喂感染组多的原因,认为发病和死亡与蟹体内病毒的数量有较大关系。

据调查,养殖生产当中至今尚未发现有单养梭子蟹暴发 WSSV 病毒的报道,但在虾蟹混养池塘,当混养的对虾因 WSSV 病毒病发生死亡时,同池的养殖梭子蟹往往亦会相继出现患病甚至死亡,经检测为 WSSV 阳性。推测病毒感染可能与其摄入病毒的数量、蟹体本身的体质以及环境条件等因素存在一定关系,在混养条件下,特别是在养殖环境恶化,混养对虾大批发病死亡,部分梭子蟹因摄食带病毒对虾,感染 WSSV 并引起死亡;而当摄入病毒量少,环境良好,蟹体体质好的情况下,不会引起死亡;有关梭子蟹个体大小对 WSSV 的易感性是否存在差异,有待于进一步研究。

本文得到普陀区海洋与渔业局蒋天水、普陀人民医院病理科应功武、浙江大学电镜室黎军英老师等的热忱帮助和指导,在此表示感谢。

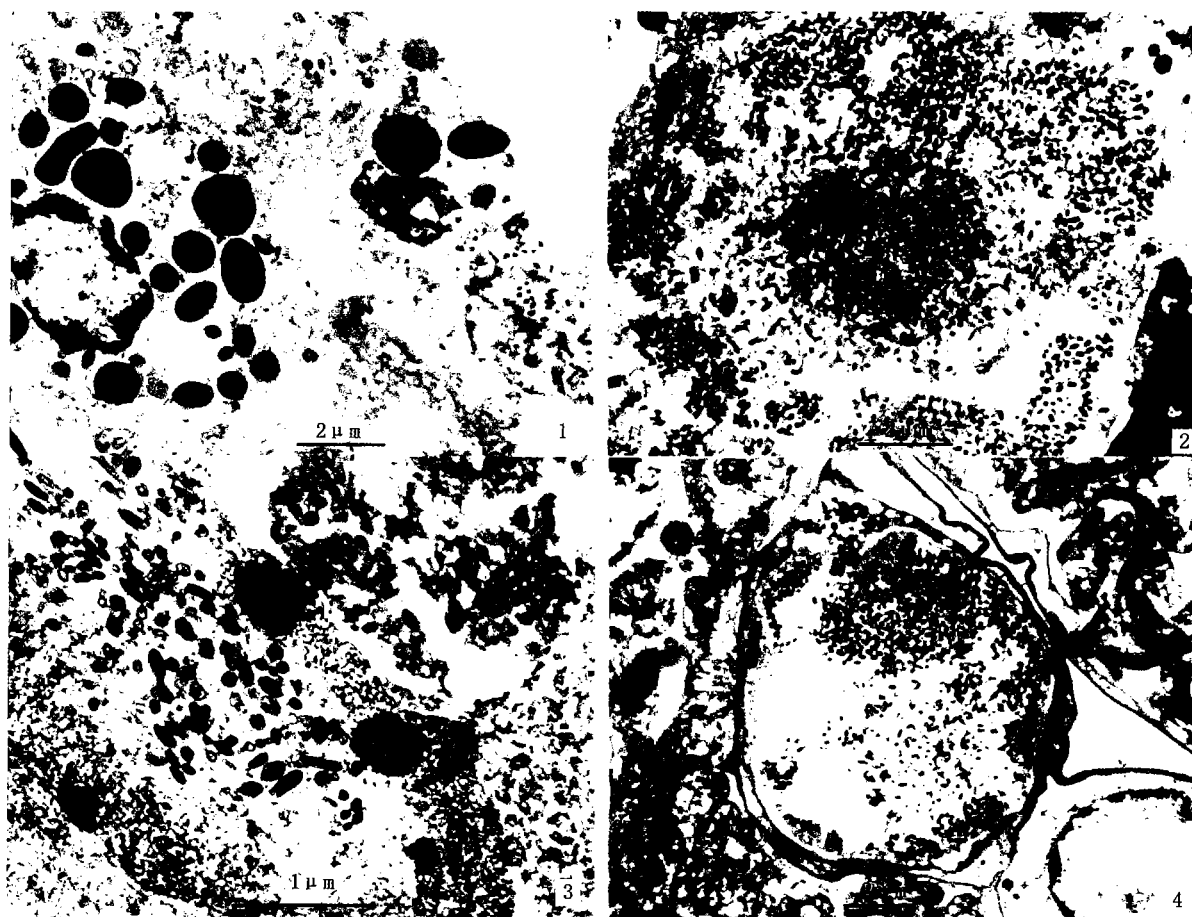
#### 参考文献:

- [1] 雷质文,黄 健,寇运同,等. 白斑综合征(WSSV)的分子流行病学研究现状[J]. 鱼类病害研究,2001,23(3): 9-38.
- [2] 莫照兰,雷质文,杨 冰,等. 对虾 WSSV 人工感染螯虾及其检测[J]. 海洋科学,2002,26(3): 43-46.
- [3] 李贵生,何建国. 虾蟹混养与病毒病的传播[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2001,22(3): 101-104.
- [4] 王虹玲. 从三疣梭子蟹中检出白斑杆状病毒的实验报告[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(1): 118.
- [5] 魏克强,许梓荣. 对虾白斑综合征病毒研究进展[J]. 中国兽医杂志,2005,41(5): 39-41.
- [6] 黄 健,于 佳,宋晓玲,等. 1994 年对虾暴发性流行病病原及传播途径的初步调查[J]. 海洋水产研究,1995,16(1): 91-98.
- [7] 宋晓玲,黄 健,王崇明,等. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染[J]. 水产学报,1996,20(4): 374-378.
- [8] 刘 萍,孔 杰,李 健,等. 暴发性流行病病原对中国对虾仔虾的人工感染实验研究[J]. 海洋科学,1998, 1: 1-4.
- [9] 蔡生力,黄 健,王崇明,等. 1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报,1995,19(2): 112-119.



图版 I Plate I

1. 肝胰腺上皮细胞空泡变性, 细胞坏死, 无法区分各种类型细胞。上皮内有血细胞浸润(→), 结缔组织中可见固缩的细胞核(空箭头)(10×40); 2. 肝胰腺上皮细胞空泡变性, 细胞坏死(10×40); 3, 4. 示初级鳃小片中嗜曙红颗粒细胞, 及次级鳃小片水肿(→), 上皮细胞分离、坏死、脱落(空箭头)(10×40); 5. 肌纤维横纹消失, 可见内皮巨噬细胞膨大(→)(10×40); 6. 局部性心肌纤维溶解坏死(10×40)



图版 II Plate II

- 1. 肝胰腺上皮细胞失去细胞形态,细胞中有杆状病毒颗粒(×10 000);
- 2. 肝胰腺上皮细胞的细胞核膨大,核内布满病毒颗粒(×10 000);
- 3. 肝胰腺上皮细胞内杆状病毒颗粒放大(×30 000);
- 4. 心肌纤维细胞的细胞核膨大,核内布满病毒颗粒(×8 000)