文章编号：1674－5566(2015)05－0685－09

淡水养殖凡纳滨对虾 IHHNV-WSSV 共感染率调查分析及其对免疫相关酶活性的影响

胡文娟[1,2]，房文红[1]，江　敏[2]，张健龙[2]，王　元[1]，顾德平[3]，胡伟国[3]，于忠利[3]，周俊芳[1]

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室，上海　200090；2. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海　201306；3. 上海市奉贤区水产技术推广站，上海　201499)

摘　要： 对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus，WSSV)和传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus，IHHNV)均为需向 OIE 报告的虾类病毒，本研究于 2014 年对上海地区部分淡水养殖凡纳滨对虾 WSSV 和 IHHNV 的感染及共感染情况进行了跟踪、检测和人工感染分析。检测结果显示，WSSV 和 IHHNV 平均单感染率分别为 42.6% 和 38.5%，双病毒共感染率为 20.5%，其中，IHHNV-WSSV 共感染率与 WSSV 感染率呈正相关。病理和累计死亡率分析显示，尽管 IHHNV-WSSV 组的对虾累计死亡率比同一时间点 WSSV 组低，但是这两组濒死对虾鳃丝细胞的病变都很严重，病变程度无明显差异。免疫相关酶——超氧化物歧化酶和酸性磷酸酶活性分析表明，IHHNV-WSSV 共感染可以在一定程度上比单纯 WSSV 感染激起更高和更快些的免疫应答，但是，随着感染时间的延长，IHHNV-WSSV 共感染表现出比 WSSV 单感染更长时间的免疫抑制。研究表明，虽然 IHHNV-WSSV 共感染可在一定时间范围和一定程度内降低对虾累计死亡率，但是共感染可造成病毒致病性的叠加和宿主更长时间的免疫保护低下，因此，IHHNV-WSSV 共感染导致的损失可能比单病毒感染更大。

研究亮点： 调查发现，上海地区淡水养殖对虾的 IHHNV 和 WSSV 感染率及其发病率很高，其中 IHHNV-WSSV 共感染现象较为普遍，共感染率与 WSSV 发病率成正相关，因此，探究 IHHNV-WSSV 共感染的致病性以及对虾相应的组织保护机制，对寻求切合实际的 WSSV 防控策略有着重要的现实意义。

关键词： 凡纳滨对虾；白斑综合征病毒；对虾传染性皮下及造血器官坏死病毒；共感染；病理；超氧化物歧化酶；酸性磷酸酶

中图分类号： S 945.4

文献标志码： A

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)因其对盐度广泛的适应性，而成为我国海淡水养殖的主要品种。但是，自 20 世纪 90 年代对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus，WSSV)在该品种大规模流行以来[1]，至今仍然时有暴发[2]，并因其高致病性和高致死率，给对虾养殖产业带来巨大经济损失[3-4]。对虾传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus，IHHNV)最早于 1981 年在凡纳滨对虾和蓝对虾(*P. stylirostris*)中发现[5]，可导致凡纳滨对虾慢性矮小残缺综合征(runt-deformity syndrome，RDS)，感染虾外观畸形、生长缓慢[6]，因此，造成的经济损失亦很严重。

研究发现，近年来 WSSV 与 IHHNV 在国外对虾中的感染率依然很高，而且两者在对虾体内共存的现象亦很普遍[7]，国内海南、山东、江苏以及台湾等地也有过共感染现象的报道[8-11]。然而，迄今未见关于这两种病毒共感染后对对虾的

收稿日期： 2015-04-16　　**修回日期：** 2015-05-17

基金项目： 上海市虾类产业技术体系建设项目(沪农科产字(2014)第 5 号)；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2011T03)

作者简介： 胡文娟(1989—)，女，硕士研究生，研究方向为水产动物病害。E-mail：zhui_feng2008@126.com

通信作者： 周俊芳，E-mail：zhoujf@ecsf.ac.cn

组织损伤和对虾的免疫应答等的深入探究,而且这些 IHHNV-WSSV 共感染现象多发生在海水环境中,而我国内地多数地区已经实现了凡纳滨对虾的淡水养殖,为此,本研究于 2014 年对上海地区部分淡水养殖凡纳滨对虾进行了 IHHNV-WSSV 的共感染调查,并初步探究了两者共感染对对虾鳃丝组织和免疫酶活性的影响。

作为甲壳类动物,各种免疫相关酶在对虾的免疫应答中发挥了重要作用。超氧化物歧化酶(SOD)作为抗氧化系统的关键酶之一,可以平衡体内的氧自由基[12],在保护功能大分子不被破坏、增强机体免疫力等方面有着重要作用[13]。酸性磷酸酶(ACP)是巨噬细胞内溶酶体的重要组成部分,与吞噬作用密切相关,在破坏和消灭入侵病原、保护机体组织方面发挥着重要作用[14],本研究选取这两种免疫相关酶初步探究了 IHHNV-WSSV 共感染后对虾的免疫保护反应。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾

感染率调查用凡纳滨对虾:2014 年 5 - 9 月对上海地区两个凡纳滨对虾淡水养殖场(养殖场 1 和 2)进行跟踪采集(≥10 尾/次/池),并于对虾疾病暴发季节(7 月),增加采集了另外 4 个养殖场(养殖场 3 - 6),所有对虾样品均在采集后迅速用冰盒低温运回实验室待检。

感染用凡纳滨对虾:健康的凡纳滨对虾[(5.5 ±0.5) g]为本单位海南研究基地购买 SPF 亲虾子一代在淡水环境下自行繁育而成。感染前,对虾分别在 1 000 L 玻纤桶中暂养 3 d 后用于实验。对虾暂养用水盐度约 5,水温(28 ±0.5) ℃,pH 7.2 ~ 7.6;按对虾体质量的 5% 投喂颗粒饲料,每天投喂 2 次,24 h 不间断充氧。

1.2 PCR 检测

取对虾头胸部肌肉约 50 mg,按照产品说明书,用海洋动物组织基因组提取试剂盒(天根)提取总 DNA。IHHNV 和 WSSV 的套式 PCR 引物参考文献[15 - 17]合成(生工)。IHHNV 和 WSSV 外引物扩增片段分别为 648 bp 和 487 bp,内引物扩增片段分别为 309 bp 和 316 bp。外引物的 PCR 扩增条件为:首先 94 ℃预变性 4 min,接着 94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s 循环 30 次,最后 72 ℃延伸 10 min。内引物的 PCR 扩增条件除了把退火温度提高到 55 ℃外,其他条件与外引物相同。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳并在凝胶成像系统观察。

1.3 人工感染用病毒液的制备

IHHNV 病毒液的制备参照 TANG 等[18]的方法稍作修改:IHHNV 阳性对虾(本实验室于 - 80 ℃保存)去除头胸甲后取头胸部肌肉称重,用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4, $W: V = 1: 10$)匀浆,8 000 r/min 离心 20 min ,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤、分装,置于 - 80 ℃保存。

WSSV 病毒保存液的制备和病毒感染液浓度的确定参考文献[2]进行,经过预实验,确定本次 WSSV 病毒感染液的浓度为病毒保存液作 1×10^4 倍稀释。

1.4 病毒的人工感染

随机采集暂养的凡纳滨对虾进行 PCR 检测,结果表明,对虾均为 IHHNV 和 WSSV 阴性。接着,随机捞取 300 尾对虾,每尾对虾于第 3 腹节处肌肉注射 IHHNV 病毒保存液 25 μL;同时,随机捞取 300 尾对虾注射等量的 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)。感染对虾和 PBS 注射对虾分别暂养于 1 000 L 玻纤桶中(150 只/桶),感染期间正常喂食、换水和充氧,水温(28 ± 0.5) ℃。2 周后,IHHNV 感染组每桶取 10 尾虾的游泳足进行 PCR 和定量 PCR 检测,确认 IHHNV 感染成功,并且平均感染量约为每毫克组织 1×10^4 拷贝。随后,IHHNV 阳性对虾和 PBS 注射对虾用于 WSSV 感染实验。

WSSV 攻毒实验分为 4 组,每组 24 尾对虾暂养于一个 200 L 玻纤桶中:IHHNV 阳性对虾再感染 WSSV 实验组(IHHNV-WSSV)、PBS 注射虾再感染 WSSV 实验组(WSSV)、IHHNV 阳性对虾再注射 PBS 对照组(IHHNV)以及 PBS 注射虾再注射 PBS 对照组(control)。感染期间正常喂食、换水和充氧。本次实验重复 3 次。

1.5 死亡率观察

WSSV 感染后,每 4 h 观察一次,记录对虾发病和死亡情况,按时间节点计算各组累计死亡率。

1.6 病理分析

感染实验观察终止即 WSSV 感染 144 h 后,分别采集 IHHNV-WSSV 组和 WSSV 组各 3 尾濒死对虾的鳃丝,用 4% 中性甲醛溶液固定,并经乙醇梯度脱水和石蜡包埋后制成厚度约 5 μm 的切

片,H&E 染色后,置于光镜下观察并拍照。

1.7　酶活检测

重复前文 1.1、1.3 和 1.4 的过程,不同的是,WSSV 感染液浓度的确定参考文献[2]方法并稍作调整,即"以感染 7 d 内对虾累计死亡率低于 20% 的最小稀释度作为病毒保存液的稀释度"。经过预实验确定 WSSV 感染浓度为病毒保存液作 1×10^7 倍稀释;感染组和对照组每组 30 尾对虾暂养于 200 L 玻纤桶中。WSSV 感染后,以感染 0、24、48、72、96、120 和 144 h 为采样节点,每个节点每组采集 3 尾对虾,分别取肝胰腺和肌肉组织置于 -80 ℃保存,用于 SOD 和 ACP 活性测定。SOD 和 ACP 的酶活分析方法参考酶活检测试剂盒说明书(南京建成)进行。ACP 定义为每克组织蛋白在 37 ℃与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位;SOD 定义为在本反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位(U)。样品总蛋白采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定[19]。样品蛋白质含量计算公式为 $y = ax + b$。

1.8　数据处理与分析

应用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 Duncan 氏法比较组间差异,$P < 0.05$ 为显著性差异水平,用 Excel 2010 绘制相关图表。

2　结果

2.1　IHHNV 和 WSSV 感染率调查

2014 年 5 - 9 月,对上海地区两个淡水养殖场(养殖场 1 和 2)凡纳滨对虾 IHHNV 和 WSSV 的感染率跟踪结果显示(表 1):养殖场 1 和 2 的对虾 WSSV 和 IHHNV 的感染率均在 31.5% 以上,其中,养殖场 1 的 IHHNV 感染率高达40.8%,而养殖场 2 的 WSSV 感染率高达 65.2%;IHHNV-WSSV 共感染率在 19.1% 以上,最高的池塘可高达 40%。但是,对比不同月份可见,感染率波动幅度较大。其中,养殖场 1 的部分跟踪池塘对虾于 6 月份暴发 WSS,而养殖场 2 的部分跟踪池塘的两批对虾分别于 7 月和 9 月暴发 WSS(两场暴发疾病池塘的 WSSV 感染率均为 100%),也在一定程度上抬高了当批跟踪对虾的平均感染率。养殖场 1 的对虾于 6 月相继暴发 WSS 后,8 - 9 月对重新放养的仔虾再次跟踪检测,新放养的对虾 WSSV 感染率和 IHHNV-WSSV 共感染率均较低(8.75% 和 6.3%),随着养殖时间的延长,到 9 月份时,两者的感染率都快速升高(37.7% 和 26.4%);IHHNV 的感染率与 WSSV 没有完全的相关性,但是,大多数情况下,随着养殖时间的延长也呈现上升趋势。养殖场 3 - 6 的检测主要是基于疾病暴发季节对疾病的诊断(表 2),因此,没有对 IHHNV 进行感染率检测。养殖场 3 和 4 的对虾样品均采自暴发疾病的池塘,对虾外观红体,在池边漫游,检测结果显示两个养殖场的样品全部表现为 WSSV 强阳性,证实对虾暴发 WSS。我们对养殖场 1、2 和养殖场 3、4 暴发疾病池塘对虾的诊断结果表明,WSS 是上海地区养殖凡纳滨对虾的主要疾病。

表 1　淡水养殖凡纳滨对虾 IHHNV 和 WSSV 感染率调查

Tab. 1　Investigation of IHHNV and WSSV in *P. vannamei* cultured in freshwater

养殖场 farms	月份 month	样品总数 total numbers	感染率/% prevalence		
			WSSV	IHHNV	IHHNV-WSSV
1	5	45	44.4	17.8	13.3
	6	51	64.7	37.3	29.4
	8	80	8.75	50	6.3
	9	106	37.7	45.3	26.4
1(平均) 1(average)		282	35.5	40.8	19.1
2	5	22	18.2	22.7	13.6
	7	47	72.3	31.9	23.4
	9	20	100	40	40
2(平均) 2(average)		89	65.2	31.5	24.7
1 +2(平均)1 +2(average)		371	42.6	38.5	20.5

表 2 发病季节(7 月)上海地区部分淡水养殖凡纳滨对虾 WSSV 感染率

Tab. 2 Prevalence of WSSV in clinically healthy and diseased *P. vannamei* cultured in freshwater in Shanghai in July 2014

养殖场 farm	采样池 sampling pond	样品数 number	WSSV/%
3	发病池塘	7	100
4	发病池塘	18	100
5	无症状池塘	9	33.3
6	无症状池塘	18	44.4

2.2 IHHNV-WSSV 感染对虾的累计死亡率

WSSV 感染 24 h 以后,感染组对虾相继出现发病和死亡情况,临床表现为红体、停食、水面漫游和头胸甲内面白点,而 IHHNV 组和 control 组对虾未出现以上特征,也没有出现死亡现象。累计死亡率分析显示(图 1),WSSV 感染组和 IHHNV-WSSV 共感染组的对虾随着感染时间的延长累计死亡率都逐渐升高,而且 WSSV 组对虾的累计死亡率始终高于同期 IHHNV-WSSV 组。至 WSSV 感染后 144 h 实验终止时,WSSV 组对虾的累计死亡率(83.3% ±6.8%)约为 IHHNV-WSSV 组(62.5% ±3.4 %)的 1.3 倍。

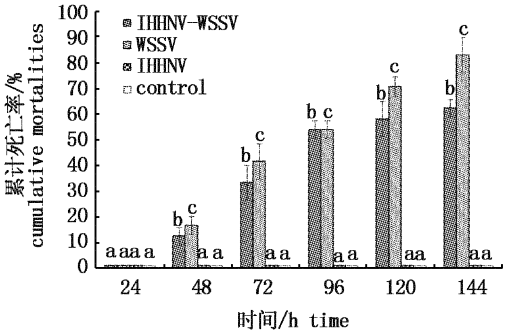

图 1 WSSV 感染后不同时间点每组凡纳滨对虾的累计死亡率

Fig. 1 Time-course of cumulative mortalities of each group of *P. vannamei* post-infection with WSSV

不同小写字母代表同一时间点不同组活性差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among different groups in the same period ($P < 0.05$).

2.3 IHHNV-WSSV 感染对虾的鳃组织

为了观察 IHHNV-WSSV 共感染和 WSSV 感染所致的组织损伤,WSSV 感染 144 h 后,分别采集两组各 3 尾濒死对虾的鳃丝制成病理切片。如图 2 所示,无论是 IHHNV-WSSV 共感染组(图 2a)还是 WSSV 组(图 2b),所有濒死对虾的鳃丝内大量细胞(上皮细胞和血细胞等)呈现核肿大、染色质边聚以及蓝染的现象,符合 WSSV 大量复制的典型特征。两组濒死对虾鳃丝细胞的病变程度和病变细胞的数量没有显著差异。

2.4 IHHNV-WSSV 感染对虾的免疫酶活性

为了分析 IHHNV-WSSV 共感染对淡水养殖凡纳滨对虾免疫相关酶活性的影响,本研究在实施较低浓度 WSSV 感染实验后,分析了对虾肝胰腺和肌肉组织中 SOD 及 ACP 的活性变化。

对肝胰腺 SOD 和 ACP 活性影响见图 3,WSSV 感染后,WSSV 组和 IHHNV-WSSV 组对虾肝胰腺中 SOD 活性呈现先降后升的走势,在攻毒后 24 h 内迅速下降而显著低于同期 IHHNV 组和 control 组($P < 0.05$)。其中,WSSV 组在 24 h 后仍然持续降低直至攻毒后 48 h 才开始逐渐升高,而 IHHNV-WSSV 组在 24 h 后即迅速升高,并在攻毒后 72 h 内与 WSSV 组同时到达最高值($P < 0.05$)。不同的是,IHHNV-WSSV 组对虾 SOD 活性峰值高于同期对照组,而 WSSV 组对虾的峰值低于同期对照组。随后,两组对虾肝胰腺内 SOD 活性下降,并很快低于同期对照组($P < 0.05$);肝胰腺 ACP 的变化总体上与 SOD 类似,不同的是,WSSV 组和 IHHNV-WSSV 组对虾肝胰腺内 ACP 活性均在感染 24 h 后开始上升,WSSV 组上升迅速,于感染后 48 h 到达高峰,而 IHHNV-WSSV 组在感染 72 h 后才到达最高值,并且,两组的 ACP 活性都始终低于同期 IHHNV 组。同期对照组(IHHNV 组和 control 组)对虾肝胰腺 SOD 和 ACP 虽然也出现小幅波动,但是差异均不显著($P > 0.05$)。

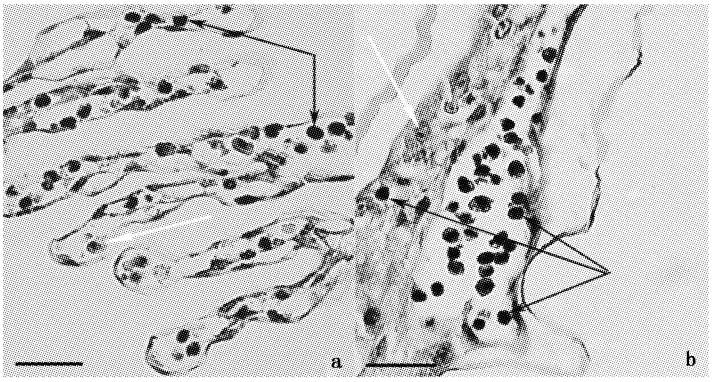

图 2　WSSV 感染 144 h 后 IHHNV-WSSV 组和 WSSV 组濒死凡纳滨对虾的鳃丝病理变化

Fig. 2　Histopathological changes in gills of moribund *P. vannamei* in the group of IHHNV-WSSV and WSSV and at 144h post-infection with WSSV

a. IHHNV-WSSV 组对虾鳃丝; b. WSSV 组对虾鳃丝。黑色箭头指向病毒感染的细胞,白色箭头指向正常细胞。标尺 =20 μm。

a. Gills of *P. vannamei* in the group of IHHNV-WSSV; b. Gills of *P. vannamei* in the group of WSSV. The black arrows point to virus-infected cells, the white arrows point to normal cells. (H&E). Bar = 20 μm.

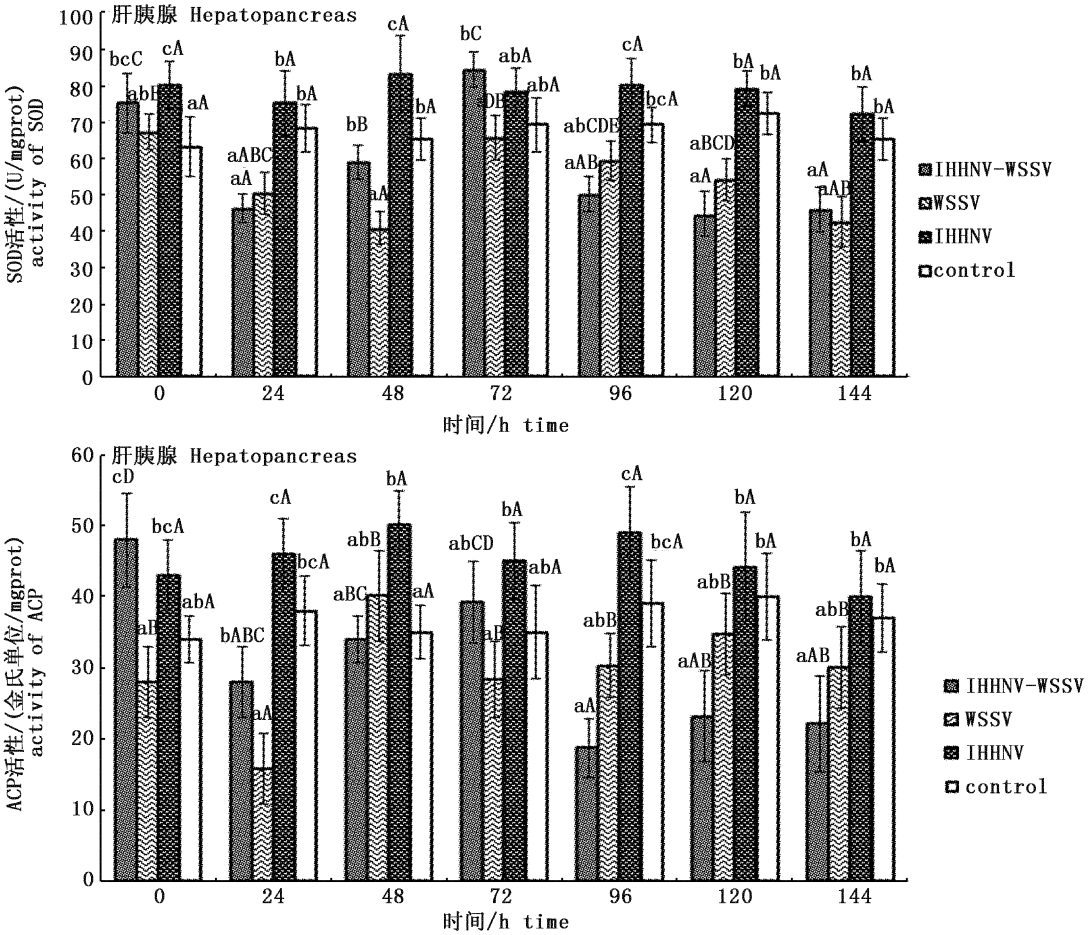

图 3　WSSV 感染后凡纳滨对虾肝胰腺中 SOD 和 ACP 的活性变化

Fig. 3　Time-course of activities of SOD and ACP in the hepatopancreas of *P. vannamei* post-infection with WSSV

不同小写字母代表同一时间点不同组活性差异显著($P<0.05$);不同大写字母代表同一组在不同时间点活性差异显著($P<0.05$);下图同此。

Different lowercase letters indicate significant difference among different groups in the same period ($P<0.05$); different capital letters indicate significant difference among the different period in the same group ($P<0.05$). The same case in the following figures.

对肌肉 SOD 和 ACP 活性影响:如图 4 所示,WSSV 感染后,WSSV 组和 IHHNV-WSSV 组对虾肌肉中 SOD 活性也基本呈现先降后升再降的变化趋势。两组在攻毒后 72 h 内 SOD 活性持续下降,并在感染后很快就低于同期 IHHNV 组和 control 组($P<0.05$)。随后,两组活性迅速上升并于感染后 96 h 同时到达峰值($P<0.05$)。感染 96 h 后,WSSV 组肌肉 SOD 活性下降缓慢,虽然始终低于同期对照组,但是一直高于 IHHNV-WSSV 共感染组($P<0.05$);肌肉 ACP 的变化总体上与 SOD 类似,不同的是,WSSV 组和 IHHNV-WSSV 组对虾肌肉 ACP 活性在攻毒后迅速降低,分别于感染后 48 h 和 24 h 到达最低值,随后,IHHNV-WSSV 共感染组的 ACP 活性持续升高,并于感染后 96 h 到达峰值,远高于 WSSV 组和对照组,差异极显著。同样地,在随后的下降过程中,IHHNV-WSSV 组的 ACP 活性迅速下降,很快低于同期 WSSV 组。同期对照组(IHHNV 组和 control 组)对虾肝胰腺 SOD 和 ACP 虽然也出现小幅波动,但是差异均不显著($P>0.05$)。

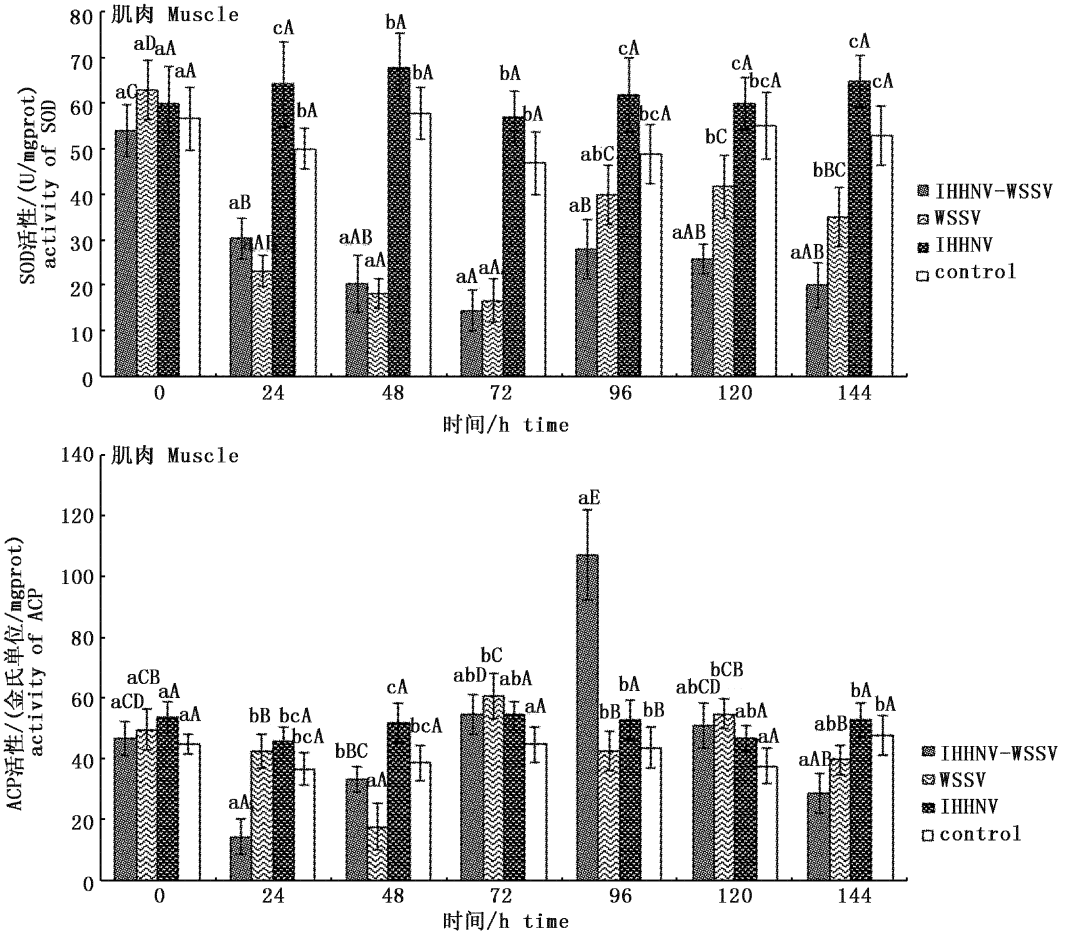

图 4 WSSV 感染后凡纳滨对虾肌肉中 SOD 和 ACP 的活性变化

Fig. 4 Time-course of activities of SOD and ACP in the muscle of *P. vannamei* post-infection with WSSV

3 讨论

3.1 WSSV 和 IHHNV 感染率调查

检测结果表明,跟踪调查的两个淡水养殖场对虾都存在较高的 WSSV 和 IHHNV 共感染现象,共感染率平均为 20.5%,养殖场 2 于 9 月暴发 WSS 时共感染率更是高达 40%。近几年相关研究报道也证实,IHHNV-WSSV 共感染的现象普遍存在:郁晓维等[20]的调查结果表明,浙江省养殖凡纳滨对虾中 IHHNV 和 WSSV 的共感染率高达 46.7% ~93.3%;国外的调查结果也显示[7],养殖凡纳滨对虾中检测到 IHHNV 和 WSSV 的共感染率可高达 60%。可见,IHHNV-WSSV 共感染的现象在养殖凡纳滨对虾中长期、持续存在,而

且始终维持在较高的感染水平。虽然本研究中养殖场 2 在 9 月份对虾样品存在特殊性(采自 WSS 暴发池塘),但是 2 个养殖场的跟踪检测结果均显示,IHHNV-WSSV 共感染率与同批次对虾的 WSSV 感染率成正相关。由于多点检测表明,上海养殖凡纳滨对虾的疾病以 WSS 为主,因此,探究目前流行的 IHHNV 和 WSSV 的共感染问题,对于 WSSV 的预防与控制有着重要的现实意义,据我们所知,目前还没有关于 IHHNV 和 WSSV 共感染的组织损伤及对虾免疫保护的相关研究。

综合 2 个养殖场 5 - 9 月的跟踪检测结果,我们发现,上海地区 WSSV 和 IHHNV 的平均感染率均较高,分别为 42.6% 和 38.5%。但是纵观全年的跟踪结果,我们发现从虾苗投放到收获,WSSV 的感染率随着管理、季节等变化而出现较大波动,尤其是在疾病暴发季节(7 月),其感染率迅速大幅提高,而 IHHNV 的感染率走势较为温和,具体表现为在虾苗刚刚投放之时其感染率可能高于 WSSV,而到疾病暴发之时却低于 WSSV 的现象。值得注意的是,疾病暴发季节的“健康”凡纳滨对虾 WSSV 平均感染率高达 40.74%(养殖场 5 和 6),表明在 WSS 暴发季节,同地区“健康”凡纳滨对虾暴发 WSS 的风险远高于其他季节的对虾,需要养殖企业更为精心地管理与防控。另外,我们注意到,养殖场 1 在 5 月采集的对虾虽然没有处于疾病暴发季节,也未发现发病对虾,但是,其 WSSV 感染率高达 44.4%,远高于未发病季节健康池对虾的 WSSV 检出率(如 8 月养殖场 1 的 8.75% 和 5 月养殖场 2 的 18.2%)。跟踪发现,部分池塘于 20d 后暴发 WSS。可见,“健康”对虾体内 WSSV 的高感染率预示了 WSS 暴发的潜在风险。此调查也说明病毒的跟踪检测对于 WSS 暴发预警的重要性。

3.2　IHHNV-WSSV 共感染对淡水养殖凡纳滨对虾的致病性

WSSV 感染后,观察期内 IHHNV-WSSV 组凡纳滨对虾的累计死亡率始终略低于同期 WSSV 组,这与之前的相关研究报道一致。TANG 等[21]在蓝对虾中发现,同时感染 WSSV 后,携带 IHHNV 的蓝对虾比未感染 IHHNV 的蓝对虾存活的时间更长。此后,研究人员在斑节对虾(*P. monodon*)和凡纳滨对虾中也发现过类似现象[22-23],并推测可能是因为 IHHNV 在宿主细胞内竞争了 WSSV 的受体,从而延缓了 WSSV 复制速度的缘故[23]。我们的研究表明,尽管共感染在一定程度上减慢了对虾的死亡速度,但是,两者在感染一定时间后,组织细胞的病变数量和病变程度并没有显著差异;另一方面,由于 IHHNV 可导致凡纳滨对虾慢性矮小残缺综合征,感染虾生长缓慢,饲料回报率大幅降低,因此,综合而言,IHHNV-WSSV 共感染的最终经济损失可能比单纯 WSSV 感染更大。

3.3　IHHNV-WSSV 共感染对淡水养殖凡纳滨对虾 SOD 和 ACP 活性的影响

免疫相关酶 SOD 和 ACP 在清除氧自由基、吞噬入侵病原和保护机体组织方面发挥着重要作用[12-14]。综合本研究 SOD 和 ACP 检测结果,我们发现,WSSV 感染后,WSSV 组和 IHHNV-WSSV 组对虾肝胰腺和肌肉中两种酶的活性都呈现降—升—降的变化趋势。无论 IHHNV-WSSV 组还是 WSSV 组,两种酶在观察期内活性高于 control 对照组的实际时长均不到 72 h,更长时间是两组的酶活同时显著低于同期两个对照组(肌肉 SOD 活性始终低于对照组),可见,WSSV 感染后激发机体的免疫力只是暂时的,更多时候表现为免疫抑制,这可能与 WSSV 强大的组织破坏能力密切相关,这或许也可以作为解释对虾感染 WSSV 后容易继发感染其他病原如气单胞菌等致病菌[24]的一个原因。

比较 IHHNV-WSSV 组和 WSSV 组的酶活变化趋势还可见,除了肌肉组织 SOD 外,IHHNV-WSSV 组相对于 WSSV 组可以在一定程度上激发更早、更高一些的免疫应答,但是,短时间高峰过后,所有 IHHNV-WSSV 共感染组的 SOD 和 ACP 活性均出现快速下降,很快显著低于同期 WSSV 组并在低位维持到观察期结束。可见,虽然 IHHNV-WSSV 共感染可以更高、更快地激活机体的免疫保护,但是,随着感染时间的延长,IHHNV-WSSV 共感染表现出比 WSSV 单感染更长时间的免疫抑制,这是否是由于双病毒感染导致组织损伤的叠加所致,值得继续探究。除此之外,还有一个现象值得注意,IHHNV 组对虾肝胰腺和肌肉中两种酶的活性在感染过程中一直较为稳定,并始终高于同期 control 组。据我们多次实验观察,这种较高的活性可以维持到 IHHNV 感染后 35 d

左右。可见,在没有 WSSV 的参与下,单纯 IHHNV 感染对对虾表现为长期低水平的免疫激活。

综上分析,淡水养殖对虾 WSSV 和 IHHNV 的感染率很高,时刻威胁着上海地区养殖企业的经济效益。作为需要向 OIE 报告的重要对虾病毒,两者单独感染均可导致养殖企业比较严重的经济损失,而共感染还存在组织损伤叠加和更长时间的免疫保护低下等问题,因此,生产企业在防控 WSSV 感染的同时,尤其要严防 IHHNV-WSSV 的共感染现象。

参考文献:

[1] INOUYE K, MIWA S, OSEKO N, et al. Mass mortality of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus [J]. Fish Pathology, 1994, 29(2): 149-158.

[2] 周俊芳, 杨先乐, 万夕和, 等. 不同靶点 shRNA 干扰对虾白斑综合征病毒增殖效果分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 105-108.
ZHOU J F, YANG X L, WAN X H, et al. Effect of the viral interference effects of shRNAs targeting different sites in white spot syndrome virus genome [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(1): 105-108.

[3] 马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合症病毒的概述[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2012, 35(4): 90-100.
MA X Y, LI P, YAN J, et al. A review on shrimp white spot syndrome virus [J]. Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition, 2012, 35(4): 90-100.

[4] SÁNCHEZ-PAZ A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern [J]. Veterinary Research, 2010, 41(6): 43.

[5] LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1983, 42(1): 62-70.

[6] BELL T A, LIGHTNER D V. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 1984, 38(3): 185-194.

[7] OTTA S K, ARULRAJ R, PRAVEENA P E, et al. Association of dual viral infection with mortality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in culture ponds in India [J]. Virus Disease, 2014, 25(1): 63-68.

[8] CHEN Y B, ZHOU J F, WAN X H, et al. Establishment of a multiplex PCR and an investigation of co-infection rate of WSSV and IHHNV in *Penaeid vannamei* in northern of Jiangsu [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 11(2): 181-185.

[9] YEH S P, CHEN Y N, HSIEH S L, et al. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus [J]. Fish&Shellfish Immunology, 2009, 26(4): 582-588.

[10] TAN Y, XING Y, ZHANG H, et al. Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007 [J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(9): 777-784.

[11] YANG B, SONG X L, HUANG J, et al. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(5): 301-305.

[12] 林庆斌, 廖升荣, 熊亚红, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究和应用进展[J]. 化学世界, 2006, 47(6): 378-381.
LIN Q B, LIAO S R, XIONG Y H, et al. Progress in the study and application of superoxide dismutases [J]. Chemical World, 2006, 47(6): 378-381.

[13] 张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响[J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 22-25.
ZHANG M, WANG L, GUO Z Y, et al. Effect of lipopolysaccharide and Vibrio anguillarum on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine Science, 2004, 28(7): 22-25.

[14] 刘晓云, 张志峰, 马洪明. 中国对虾血细胞酶细胞化学的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 259-265.
LIU X Y, ZHANG Z F, MA H M. Study on enzyme cytochemistry of blood cells in *Penaeus chinensis* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 32(2): 259-265.

[15] RAI P, PRADEEP B, KARUNASAGAR I, et al. Detection of viruses in *Penaeus monodon* from India showing signs of slow growth syndrome [J]. Aquaculture, 2009, 289(3/4): 231-235.

[16] TANG K F, NAVARRO S A, LIGHTNER D V. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 74(2): 165-170.

[17] HOSSAIN M S, CHAKRABORTY A, JOSEPH B, et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction [J]. Aquaculture, 2001, 198(1/2): 1-11.

[18] TANG K F, POULOS B T, WANG J, et al. Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(2): 91-99.

[19] 李志江. 考马斯亮蓝 G250 染色法测定啤酒中蛋白质含量

[J]. 酿酒, 2008, 35(1): 70 -72.
LI Z J. Study on determination of protein content of beer by Coomassie Brilliant G-250 dye binding [J]. Liquor Making, 2008, 35(1): 70 -72.

[20] YU X W, WANG J P, ZHANG W, et al. Prevalence of Three shrimp viruses in Zhejiang Province in 2008 [J]. Virologica Sinica, 2011, 26(1): 67 -71.

[21] TANG K F J, DURAND S V, WHITE B L, et al. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-a preliminary study [J]. Aquaculture, 2003, 216(1/4): 19 -29.

[22] MOLTHATHONG S, JITRAKORN S, JOYJINDA Y, et al. Persistence of *Penaeus stylirostris* densovirus delays mortality caused by white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9(7): 33.

[23] BONNICHON V, LIGHTNER D V, BONAMI J R. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 72 (2): 179 -184.

[24] 李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 109 -113.
LI J Q, TAN B P, MAI K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15 (1): 109 -113.

Investigation and analyses of IHHNV-WSSV co-infection in *Penaeus vannamei* cultured in freshwater and its effects on immune-related enzymes

HU Wenjuan[1,2], FANG Wenhong[1], JIANG Min[2], ZHANG Jianlong[2], WANG Yuan[1], GU Deping[3], HU Weiguo[3], YU Zhongli[3], ZHOU Junfang[1]

(1. *Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Shanghai* 200090, *China*; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*; 3. *Shanghai Fengxian Fisheries Extension Station, Shanghai* 201499, *China*)

Abstract: As white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) were both shrimp-infecting viruses and should be reported to the OIE. A follow-up investigation of prevalence of WSSV and IHHNV in *P. vannamei* cultured in freshwater in Shanghai was carried out in 2014. Results showed that the average single infection rate of WSSV and IHHNV was 42. 6% and 38. 5% respectively, while co-infection rate of the two viruses was about 20. 5%. The prevalence of IHHNV-WSSV co-infection was positively correlated with that of WSSV. Analyses of histopathology and cumulative mortality indicated, although the cumulative mortality of shrimp in the IHHNV-WSSV group was always lower than that in the WSSV group at the same time point, gill tissues of moribund shrimp in the two groups were both damaged seriously, and no significant difference between them was found. The activities of immune-related enzymes (superoxide dismutase and acid phosphatase) demonstrated, compared to the single infection of WSSV, the dual infection of IHHNV and WSSV was able to activate the body's immune system faster and kept the immune response at a higher level during a short period; however, IHHNV-WSSV usually led to an higher and longer immune suppression post activation, which, together with the dual damages caused by IHHNV and WSSV, suggested that co-infection of IHHNV-WSSV would cause greater economic losses than a single infection.

Key words: *Penaeus vannamei*; white spot syndrome virus (WSSV); infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV); co-infection; histopathology; superoxide dismutase (SOD); acid phosphatase (ACP)