

中国对虾 1 种球形病毒及肝胰腺病变的电镜观察*

李秋芬* 包振民 胡景杰 徐怀恕 姜明 刘晓云

(※中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(青岛海洋大学, 266003)

摘要 在1994年山东地区对虾暴发性流行病学研究中,在未检出杆状病毒的中国对虾样品中首次发现1种球形病毒,电镜下观察到该病毒外有囊膜,直径200 nm左右,在细胞质中形成球形包涵体,以宿主肝胰腺和心脏为主要靶器官;受其感染的肝胰腺细胞的细胞器出现一系列病理变化:线粒体从增生、肿胀、内嵴溶解到出现纤维化,最后崩解;糙面内质网也明显增生、脱颗粒、排列紊乱,严重感染时,肿胀成泡状,甚至分解;细胞核出现病变较晚且较轻。人工感染实验证明该病毒可引起中国对虾暴发性流行病的症状,13 d 累积死亡率可达90%。

关键词 中国对虾, 暴发性流行病, 球形病毒, 肝胰腺, 超微病理学

自1974年 Couch^[1]在墨西哥湾桃红对虾中发现第1例对虾病毒—Couch氏对虾杆状病毒(BP)以来,已陆续在世界养殖对虾中发现约14种病毒^[2-5]。自1993年我国沿海养殖区发生对虾暴发性流行病以来,关于对虾暴发病的主要病原—杆状病毒(HHNBV)和宿主肝胰腺的病理变化研究已有不少报道^[6-9]。国内外关于中国对虾的球形病毒曾有肝胰腺细小病毒(HPV)的报道^[10,11]。其它球形病毒及其宿主病理变化的报道尚不多见。1994年我们在研究山东地区对虾暴发病时,从未检出HHNBV和HPV的中国对虾病虾样品中发现1种球形病毒,对其进行了电镜观察、分离提纯、人工感染实验及超微病理学研究。

1 材料与方法

1.1 材料来源

自然发病虾于1994年7、8月采自崂山、即墨、

胶南等地养殖场发病虾池,选取症状典型的濒死中国对虾;健康虾采自上述地区未发病虾池,选取健康活泼、经PCR抽样检查无杆状病毒的中国对虾**。人工感染病虾采自注射无菌病虾提取液致病的健康虾。电镜用样品现场立即解剖,戊二醛固定液固定,放入冰瓶,带回实验室。

1.2 电镜样品的制备及观察

按常规方法^[12]将各组织制成6 nm厚的超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,室温下干燥后,H-7000型生物透射电镜下观察并拍照。

1.3 病毒的纯化和形态观察

取-40℃下冻存病虾的去壳头胸部,加入等体积的TN缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4),12 000 r/min匀浆5 min,4℃下经5 000 g离心1 h,取上清液,经8 400 g离心20 min,再取上清液,经30 000 g离心1 h,取沉淀加少量TN缓冲液重新悬浮,将悬液滴于15%~60%(W/W)的蔗糖密度梯度垫上,经75 000 g离心2 h,收集病毒层各1 ml,稀释后,84 000 g离心3 h,将沉淀用少量TN缓冲液重新悬浮,即得纯化的病毒液。

将一部分病毒液滴于覆有碳膜的铜网上,用2%的磷钨酸(PAT, pH 7.4)负染,室温下风干,H

收稿日期:1997-03-31

* 国家“八五”攻关应急课题“对虾暴发性流行病的病原及病理学研究”,系李秋芬在青岛海洋大学所做硕士论文部分内容。

** 由农业部动物检疫所郭福生帮助完成,特此致谢。

-7000 生物透射电镜下观察。

1.4 人工感染试验

供试健康虾先在消毒海水中暂养 5 d 后,剔除过大、过小及活力减弱的个体,余下的随机分组实验,每组在 10 L 消毒海水中放养 20 尾虾。

分别用孔径为 0.8 μm 和 0.2 μm 的纤维素滤膜过滤检出球形病毒的病虾组织提取液,得到带菌组织提取液、无菌组织提取液和煮沸 10 min 的无菌组织提取液,分别对实验组对虾做注射感染,对照组对虾注射无菌 TN 缓冲液,注射剂量均为 0.02 ml/尾。注射前用 70% 酒精棉球对注射部位进行消毒。实验期间连续充氧,观察记录,及时清除死虾并取症状典型的病虾作病理学观察。

2 结果与讨论

2.1 病虾的外观症状

病虾在发病初期表现为摄食力低,个体瘦小;中期时活力和应激力下降,常静浮于池边水底;后期则表现为空胃、肝胰腺肿大,甚至糜烂,肌肉发白,透明度下降,此时开始大面积死亡。池中一般较小个体先死,病情发展较缓慢,改善环境可有效缓解病情。以上症状与受杆状病毒感染时有所不同,如未出现受后者感染时体色微红,甲壳出现白斑,1~2 d 全池死亡,且较大个体先死等典型症状^[8]。

2.2 病毒的形态特征

在电镜下观察受感染的肝胰腺细胞,显示球形病毒粒子分散于胞浆中,直径大小有一定差异,平均为 200 nm 左右,最外层为囊膜,内部核心的电子密度明显高于衣壳,呈不规则球形,平均直径 180 nm (图版-1)。还可看到这种病毒在胞浆中发生、装配并形成球形包涵体,初期的包涵体体积较小,内部电子密度低且均匀一致;中期的包涵体体积增大,可见到空衣壳等病毒发生基质;成熟的包涵体则边界分明,电子密度明显高于周围,内部完整的病毒粒子清晰可见(图版-2、3),而这种包涵体在石蜡切片上经 H.E. 和孚尔根染色并不能显示。细胞核内未观察到这种球形病毒及其包涵体。提纯后的病毒粒子经负染在电镜下显示:病毒粒子呈不规则球形,平均直径 190 nm,较其在组织细胞中小,可能是因为囊膜脱落,内部物质有所损失所致(图版-4)。

Lightner^[13]、Yuannan^[5]等报道的 HPV 和 I-HHNV 虽同为球形病毒,但粒子大小、发生部位或核酸类型与本报道有所不符。Tsing^[4]报道的日本

对虾中弧肠孤病毒颗粒直径为 60 nm,小于本文观察到的病毒。目前依据这种球形病毒的上述形态特征尚不足以确定其分类地位,有关的分子生物学特征有待进一步研究。

2.3 宿主肝胰腺的超微病理变化

(1)病毒感染初期,首先观察到肝胰腺上皮细胞胞质中的细胞器发生病变,表现为线粒体大量增生,体积缩小,电子密度加深;内质网增生;细胞核无明显病变(图版-5)。

(2)随感染加重,病毒在胞质中不断增殖,线粒体体积增大,内、外膜间隙水肿,内嵴缩短变粗、部分溶解,浆液变得浑浊,同时胞质水肿,可看到许多泡状脂滴;糙面内质网出现脱颗粒现象,片层结构变得紊乱(图版-7a、7b)。

(3)感染后期,大量球形病毒及其包涵体出现在胞质中,线粒体严重肿胀,达到正常体积的 2~3 倍,内嵴和内膜消失,内部出现纤维化;内质网片层结构消失,浆液膨胀成囊状(图版-8);核膜出现轻微水肿,细胞核内异染色质聚集成团块向边缘靠拢(图版-6)。

(4)最后,线粒体完全崩解成一束束纤维;内质网亦随之断裂成不连续的小泡,至此线粒体和内质网的代谢功能完全丧失,病毒发生基质侵入该区域,作为新的病毒发生场所,最终导致整个细胞因机能紊乱而死亡(图版-9)。

通过以上观察发现,该球形病毒及其包涵体存在于宿主细胞质中,首先引起胞质中细胞器的一系列病变,再波及细胞核。这与日本对虾中的弧肠孤病毒的感染特征相似^[4],而与 MBV、HHNBV 等杆状病毒的存在部位和引起的病变不同^[8,14]。后者感染宿主细胞后,首先充满细胞核,破坏核物质;线粒体和内质网则出现病变较晚。这些差异可能与两类病毒完成增殖和装配的部位不同有关。

2.4 人工感染实验结果

注射带菌病虾组织提取液的实验组,第 3 d 即出现大批死亡,4 d 内全部死亡;注射无菌病虾组织提取液的实验组,从第 7 d 开始死亡,到第 13 d 累积死亡率达 90%,与自然发病情形基本一致。注射煮熟组织提取液的实验组和对照组的虾一直健康活泼,基本无死亡。

对实验组病虾和对照组正常虾所做组织病理学观察结果表明,对照组的虾体内未检出球形病毒,而在实验组病虾中检出了上述球形病毒且发现了与自

然发病相似的组织病变。由此说明,球形病毒的感染可使健康虾患病而死,并且细菌和病毒同时感染时,发病提前、病情加重,短期内出现大批死亡。

调查中发现崂山上马镇养殖场的 5 个杆状病毒阴性、球形病毒阳性的虾池,在发生暴发性流行病症候时,立即采取措施如充氧或放掉一部分虾后,症状得到缓解,死亡逐渐停止。笔者认为这可能与受球形病毒感染有关,因为该类病毒主要危害宿主线粒体和内质网,造成有氧代谢和脂肪代谢障碍,但病毒增殖较慢,致病力较小,只有当环境恶化,水中溶解氧严重不足,使虾出现明显代谢障碍,体力迅速衰竭时,才会急性大批死亡。若及时改善环境,代谢障碍消除,部分虾可幸免于死。

国内关于杆状病毒已有不少报道,公认其为对虾暴发性流行病的主要病原。虽有文献提到球形病毒^[10,15],但未做详细研究亦未涉及它在暴发病中的作用。本文人工感染实验结果表明,球形病毒的感染可使健康虾患病而死,它虽不是暴发病的主要病原,但会使宿主长期处于慢性消耗状态,体力衰弱,在流行病发生期间,成为其它病原的易感虾群,因此这类病毒也是不容忽视的病原之一。搞清它的分类地位、生物学特性、传播途径及防治方法,对全面、彻底地防治虾病具有重要的理论和现实意义。

参 考 文 献

1 Couch J A. Free and occluded virus similar to baculovirus in hep-

atopancreas of penaeid shrimp. Nature, 1974, 247:229~231

2 Lightner D V. A review of the diseases of cultured penaeid shrimps/ or prawns with emphasis in recent discoveries and developments. Proceedings First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/shrimps Dec 1984. 79~100

3 Lightner D V. Recent advance in penaeid virus disease investigation. J World Mariculture Soc, 1995a, 16:267~274

4 Tsing A, et al. A new viral disease of the shrimp *Penaeus japonicus*. Bate Journal of Fish Disease, 1987, 10:139~141

5 Yuanan Lu, et al. A new virus isolated from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus(IHHNV) infected penaeid shrimps. J Virological Methods, 1991, 31: 189~196

6 王云祥,等. 天津地区对虾暴发病的病因、病理及传播途径的初步研究. 海洋科学, 1994(6):1~5

7 国际期,等. 对虾杆状病毒感染寄主细胞的超微结构观察. 海洋科学, 1996(6):38~42

8 黄捷,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学和病理学. 海洋水产研究, 1995 a, 16(1): 1~10

9 黄捷,等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究. 海洋水产研究, 1995b, 16(1):55~62

10 陈禄华,等. 中国对虾中一种球状病毒的分离提纯与检测. 中国病毒学, 1994(2):170~173

11 薛清刚,等. 对虾病毒及病毒病的研究现状. 鱼类病害研究, 1992, 14(2):16~21

12 黄立. 电子显微镜生物样品制备技术. 南京:江苏科技出版社, 1982

13 Lightner D B, et al. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. H Invert Path, 1985a, 45:47~53

14 陈细法,等. 草虾感染草虾杆状病毒(MBV)后肝胰腺上皮细胞病理变化电镜观察. 水产学报, 1994(18):265~269

15 肖连春,等. 中国对虾一种球状病毒的分离提纯及其核酸蛋白特性的研究. 中国病毒学, 1995, 10(4):357~361

Electron microscopic observation of spherical virus and pathological change of hepatopancreas in *Penaeus chinensis*

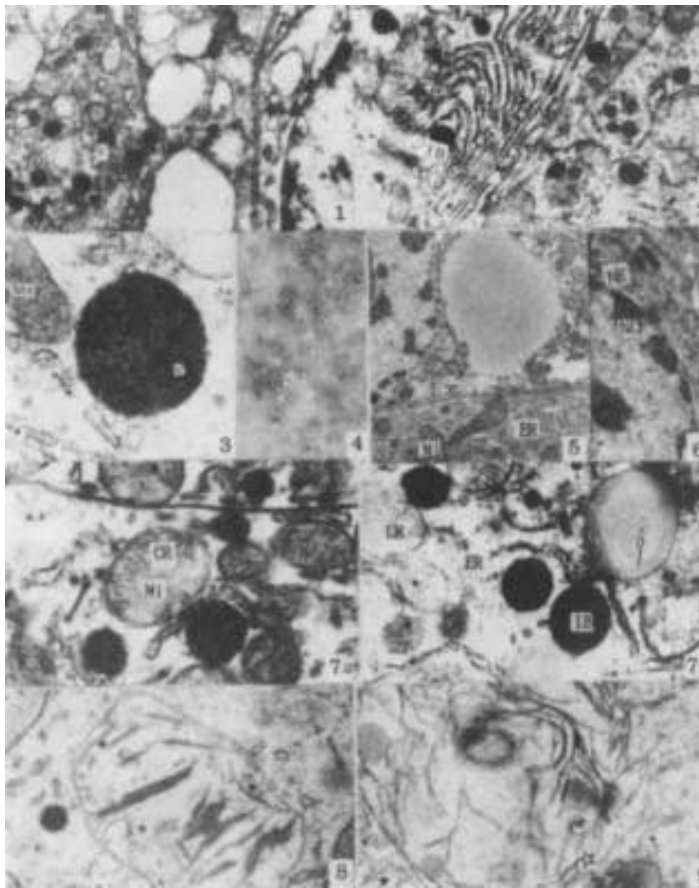
Li Qiufen^{*} Bao Zhenmin Hu Jingjie Xu Huaishu Jiang Ming Liu Xiaoyun

(^{*}Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(Ocean University of Qingdao, 266003)

Abstract With electron microscope, a kind of spherical virus was observed in farmed epizootic diseased *Penaeus Chinensis*, but no rod-shaped virus was found. The virus is covered with envelope whose diameter is about 200 nm, and contains spherical inclusion body in cytoplasm, mainly infecting hepatopancreas and hearts of its hosts. The infected epithelial cells of hepatopancreas showed a series of pathological changes in organoid that the mitochondria became hyperplastic and swollen, cristae disappearing and fibrillate up to decomposed. Meanwhile, the endoplasmic reticulum became hyperplastic obviously, granule-lost, disordered, even bubble-shaped up to decomposed when infected badly. The changes in nucleus appeared later but less seriously. Artificial infection shows that this virus can cause a sudden epizootic to shrimps with an accumulative mortality of 90% within 13 d.

Key words *Penaeus chinensis*, spherical virus, explosive epidemic disease, hepatopancreas, ultramicropathology



图版 Plate

1. 肝胰腺细胞中球形病毒粒子(V), × 20 000。Spherical virions in hepatopancreas epithelial cell.

2. 肝胰腺上皮细胞中的球形包涵体(IB), 示初期(↗)、中期(□)、后期(↘), × 5 000。Spherical inclusion bodies in epidermal cell of hepatopancreas at different phases.

3. 球形包涵体(IB)放大, 示内部清晰可见的病毒粒子(V), × 15 000。Enlargement of inclusion body showing virions.

4. 负染后的球形病毒粒子(V), × 16 000。Negatively stained spherical virions.

5. 感染初期的肝胰腺上皮细胞, 示线粒体(Mi)和内质网(ER)的增生, × 5 250。Hepatopancreas epithelial cell at initial infected stage showing hyperplasia of mitochondria (Mi) and endoplasmic reticulum (ER).

6. 感染中期的上皮细胞, 示核膜(NE)水肿, 染色质(NC)边集, × 8 000。Hepatopancreas epithelial cell at middle infected stage, showing swelling of nuclear envelope (NE), edging of nuclear chromatin (NC).

7. 感染中期的上皮细胞, a. 示线粒体肿胀, 内嵴(CR)缩短; b. 线粒体内嵴溶解, 内质网(ER)脱颗粒, 片层结构紊乱(→), 大量脂滴(B)、包涵体(IB), × 20 000。Hepatopancreas epithelial cell at middle infected stage, (a) swollen mitochondria and its shortened cristae (CR); (b) solution of cristae, particle loss of endoplasmic reticulum, disorder of structure, large of fatty bubbles (B) and inclusion bodies (IB) in mitochondria.

8. 感染后期的肝胰腺上皮细胞, 示线粒体脱膜消失, 内部出现纤维化(*), 内质网出现断裂, × 15 000。Hepatopancreas epithelial cell at later infected stage, disappearance of mitochondria, fibrillating inside, breaking of endoplasmic reticulum.

9. 感染末期的肝胰腺上皮细胞, 示线粒体崩解(☆), 内质网断成片段或小泡(★), × 14 000。Hepatopancreas epithelial cell at final infected stage, mitochondria decomposing, endoplasmic reticulum breaking into pieces.