

中国对虾暴发性流行病的血液病理研究

吴 垠 邢殿楼 祝国芹 桂远明 王 斌 李 华

(大连水产学院, 116023)

摘 要 对患暴发性流行病的中国对虾进行了血液生理生化指标检测。与健康虾比较,自然发病与人工感染病虾的血清总蛋白、白蛋白、血糖含量减少,而甘油三酯、尿素氮、肌酐含量及血清碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(GPT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性增加。对人工感染试验病虾跟踪检测显示,对虾在病毒感染后24 h,出现AKP升高、血清总蛋白、白蛋白、血糖含量下降,随着感染时间延长,出现变化的血液指标增多,变化幅度也急速增加。结果表明,中国对虾暴发性流行病是杆状病毒急性感染后所引起的一种全身性疾病,患病虾在营养物质代谢、抗病力、消化、呼吸、排泄等方面的生理功能迅即受到严重损害。

关键词 中国对虾,暴发性流行病,血液病理学

自1993年以来,我国沿海的养殖对虾(中国对虾 *Penaeus chinensis*、斑节对虾 *P. monodon*、日本对虾 *P. japonicus* 等)相继发生了暴发性流行病。国内有关学者都已证实其病原是1种在机体细胞内不形成包涵体的杆状病毒,属杆状病毒C亚群^[1-3],并在组织病理方面进行了诸多研究,但有关生理病理方面尚未见报道。本文对中国对虾感染杆状病毒后的血液生理生化指标变化进行了分析研究,并探讨其患暴发性流行病后的某些发病机理,旨在对该病的防治措施提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验用虾来源

健康中国对虾取自大连市金州区前石乡和瓦房店市横山乡对虾养殖场,体长6~10 cm,经电镜检测无病毒。自然发病虾采自大连市金州区七顶山乡、后石乡、瓦房店邓屯乡和庄河市、东港市等养虾区发病池,体长6~9 cm,经电镜检测机体携带杆状病毒。

1.2 人工感染试验

1.2.1 病毒组织悬液制备 取病虾头胸部分,去甲壳按W/V(1:10)加入PBS匀浆(pH 7.6),离心(3 500 r/min)20 min,取上清液加入青霉素、链霉素各1 000 $\mu\text{g/ml}$,置4℃冰箱过夜,

收稿日期:1997-10-23

取样用 2216 平板划线无菌落生出后备用。

1.2.2 人工感染试验 对照组包括自然对照(未经处理的健康虾)及注射无菌盐水 2 组, 每组 12 尾虾。试验组采用 3 种感染方式: ①投喂感染, 直接投喂保存于冰箱中的病虾组织; ②浸泡感染, 将病毒组织悬液和过滤海水混合于小容器中, 放入试验虾浸浴 2 h 后, 然后将虾及浸浴液移入大试验缸; ③注射感染, 在对虾体侧肌肉注射病虾组织液每尾 0.02~0.03 ml。感染试验均设 2 个平行组(每组 10~12 尾虾)。试验期间水温 23~25℃, pH 7.8~8.0, 每日换水 2/3, 间断充气, 溶解氧 4~6 mg/L。除对濒临死亡虾及时抽血进行检测外, 另对注射感染组虾在感染后 24、48、72 h 随机采样 4~5 尾抽血并检测。

1.3 血清制备及各项指标测定方法

用干燥洁净的注射器从对虾围心腔中插入心脏抽取血液, 将血液置于离心管中在 4℃ 冰箱中放置 1~2 h, 以 10 000 r/min 离心 20 min, 吸出血清, 置 0℃ 以下保存备用。

各项指标测定方法: 血清葡萄糖(血糖)采用邻甲苯胺法^[4], 胆固醇与甘油三酯采用酶试剂法(酶试剂盒由上海医学化学所提供), 血清总蛋白用双缩脲法^[4], 白蛋白用溴甲酚绿法^[4]与临床血液生化检测仪(大连医科大学附属二院提供, 以下简称仪器法)同时测定, 尿素氮采用二乙酰-脲法^[5]与仪器法, 肌酐用仪器法, 碱性磷酸酶(AKP)采用酶试剂法与仪器法, 谷丙转氨酶(GPT)采用赖氏比色法^[5], 乳酸脱氢酶(LDH)用仪器法。

2 结果

2.1 人工感染发病虾血液生化指标的变化

对人工感染后侧卧濒死和对照组健康虾的血液分析结果表明, 病虾的血液生化指标均呈现明显的病理变化: 出现血糖、胆固醇、血清总蛋白、白蛋白值的降低和甘油三酯、尿素氮、肌酐值的升高(见表 1), 除血胆固醇外, 其余指标感染试验组与对照组相比均差异显著($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$); 3 种方式感染发病虾之间血液生化指标比较则未见显著差异。人工感染试验死亡率观察结果显示, 3 种途径的感染均能使受试虾出现病症并逐渐死亡, 死亡高峰在第 3~5 d, 死亡率均达 100%, 显著高于对照组(对照组死亡率为 10%~23.5%)。

2.2 虾池不同病程的病虾血液生化指标比较

将虾池发病虾的病程暂分为 2 期——发病初期与重症期。区别主要在于活动能力, 发病初期病虾空胃, 血淋巴抽出液可凝固, 行动尚活泼; 重症期除空胃外, 行动不活泼、游边, 极易捕捉。将不同病程虾分别抽血分析, 结果见表 1。可以看出发病初期病虾已经出现血糖、甘油三酯、血清总蛋白、白蛋白值下降, 尿素氮值升高(均与健康虾差异显著)。而重症期虾血清甘油三酯显著升高, 肌酐值在轻症期无变化, 在重症期则急剧上升, 其余指标虽与轻症期变化趋势相同, 但变化幅值更大(与健康虾差异非常显著)。可见, 随着病情发展, 病虾生理机能的改变在血液中得到反映。

2.3 发病虾血清酶类指标的变化

检测自然发病与人工感染致病虾的血清碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)及谷丙转氨酶(GPT)活性(表 2), 发病虾 3 种酶活性均发生变化。自然发病虾的酶类指标升高幅度大于同期人工感染虾。不同发病期血清酶类指标变化有差异, 发病初期病虾 LDH 与 GPT 活性变化不明显, 而 AKP 升高幅度为 54.78%; 至重症期病虾 AKP 升高幅度更大为 82.30%~93.70%, GPT 与 LDH 活性也较健康虾显著增加。由此说明, 重症期病虾的组织细胞受迫害

程度更严重。

表 1 人工及自然感染发病虾的血液生化指标变化

Table 1 The variations of serum biochemical indexes from experimentally and naturally infected *P. chinensis*

项目 items	人工感染 experimentally infected					自然感染 naturally infected		
	对照组 control group		试验组 infected group			健康虾 normal shrimp	发病虾 serious shrimp	
	自然对照 normal MI ± SD	注射生理盐水 injection 0.9% NaCl MI ± SD	注射感染 injection MI ± SD	投喂感染 feeding MI ± SD	浸泡感染 soaking MI ± SD	MI ± SD	发病初期 initial stage MI ± SD	重病期 serious stage MI ± SD
血糖/(mmol·L ⁻¹) plasma glucose	0.95 ± 0.05	0.85 ± 0.12	0.78 ± 0.13 ※	0.65 ± 0.08 ※※	0.67 ± 0.09 ※※	0.95 ± 0.05 ※※	0.65 ± 0.12	0.801 ± 0.08 ※
胆固醇/(mmol·L ⁻¹) cholesterin	0.89 ± 0.08	0.77 ± 0.10	0.79 ± 0.22 N.S.	0.83 ± 0.05 N.S.	0.71 ± 0.08 N.S.			
甘油三酯/(mmol·L ⁻¹) triglycerides	0.75 ± 0.11	0.61 ± 0.08	1.68 ± 0.25 ※※	1.72 ± 0.48 ※※	1.25 ± 0.23 ※※	0.63 ± 0.06 ※	0.40 ± 0.17	3.32 ± 0.19 ※※
血清总蛋白/(g·L ⁻¹) total plasma protein	49.29 ± 6.40	52.45 ± 5.68	27.65 ± 1.66 ※※	24.30 ± 0.85 ※※	21.94 ± 3.25 ※※	61.20 ± 10.28 ※	40.40 ± 2.75	35.13 ± 3.26 ※※
白蛋白/(g·L ⁻¹) albumin	20.12 ± 3.79	19.52 ± 4.14	8.32 ± 2.10 ※※	6.70 ± 1.47 ※※	4.90 ± 1.10 ※※	22.46 ± 5.32 ※	12.91 ± 1.85	5.48 ± 2.21 ※※
尿素氮/(mmol·L ⁻¹) ureanitrogen	3.35 ± 0.07	4.18 ± 0.12	5.77 ± 0.98 ※	6.02 ± 2.02 ※※	5.36 ± 1.47 ※	3.77 ± 0.59 ※	5.90 ± 1.54	7.31 ± 1.19 ※※
肌酐/(μmol·L ⁻¹) creatinine	46.44 ± 2.21	44.20 ± 1.87	48.20 ± 6.84 N.S.	89.11 ± 9.17 ※※		46.64 ± 0.28 N.S.	52.30 ± 13.20	134.87 ± 4.48 ※※

注: ※※ P ≤ 0.01 差异非常显著 very significant difference, ※ P ≤ 0.05 差异显著 significant difference, N.S. P > 0.05 差异不显著 nonsignificant. 后同 the same below.

表 2 发病虾血清酶类指标变化

Table 2 The changes of serum enzyme indexes from diseased shrimp

项 目 items	健康虾 normal shrimp M ± SD	发病虾 diseased shrimp		人工感染虾 experimentally infected shrimp
		发病初期 initial stage M ± SD	重症期 serious stage M ± SD	投喂感染 feeding M ± SD
碱性磷酸酶/(In·L ⁻¹) AKP	97.96 ± 36.97	216.61 ± 23.31 ※※※	553.50 ~ 1 557.10 ※※※	200.60 ~ 552.786 ※※※
谷丙转氨酶/(In·L ⁻¹) GPT	< 15	12.20 ~ 22.15 N.S.	161.92 ± 21.64 ※※※	61.73 ~ 148.04 ※※※
乳酸脱氢酶/(In·L ⁻¹) LDH	45.29 ± 5.51	62.87 ± 12.21 N.S.	161.76 ± 25.9 ※※	

注: ※※※ P < 0.01 差异极显著 highly significant difference.

2.4 人工感染虾血液指标随时间的变化

对注射感染虾经 24、48、72 h 分别随机取样、测定各项血液指标,并同时与对照组样品比较,结果见图 1。随着感染后时间延长,血清总蛋白、白蛋白、血糖等指标出现递减趋势,甘油三酯、尿素氮、肌酐、AKP 指标则出现递增趋势。与对照组相比,感染后 24 h 发生明显变化的血液指标为血清总蛋白、白蛋白、血糖和 AKP。

3 讨论

(1) 血液组成及其含量变化与机体健康、营养状况、疾病等有着密切关系,因此当机体受病原体感染而发生病理变化时,必定在血液指标中得到反映。中国对虾患暴发性流行病的症状表现为发病前 2~3 d 停止摄食,胃肠空,虾体虚弱,离群孤游,逃避反应减弱,甲壳白斑

与表皮不粘连,肝胰腺颜色变淡,有肿大糜烂现象,濒死虾血淋巴不凝结。血液生理生化指标显示,病虾的血糖、胆固醇、血清总蛋白、白蛋白等指标下降,甘油三酯、尿素氮、肌酐、AKP、LDH、GPT 等指标大幅度上升,而且自然发病与人工感染的血液病理变化类似,说明中国对虾感染杆状病毒后,机体正常生理功能受到严重影响。病虾血清总蛋白、白蛋白、血糖指标降低一方面是由于胃肠道对营养物质消化吸收功能障碍,另一方面则由于组织器官病变导致机体消耗,丢失过多,说明机体处于严重贫血状态,氧的运输及抵抗疾病能力大大减弱。胆固醇降低、甘油三酯升高反映了病变过程中组织细胞在脂类代谢方面的变化,尤其肝胰腺细胞受病毒侵害时,对脂蛋白代谢产物的吸收和清除发生改变,甘油三酯酶活性下降,引起高甘油三酯血症。肌酐是磷酸肌酸的降解产物,尿素为甲壳类蛋白质分解的产物之一^[11],正常生理状态下血液中尿素氮与肌酐值相对恒定,而两者的变化说明了机体排泄功能的障碍。

AKP、GPT 和 LDH 主要分布于组织细胞中。AKP 是生物体代谢的关键酶之一,在磷酸化和其它营养物质的消化、吸收和转运过程中起着重要作用^[6,12]。GPT 和 LDH 参与蛋白质和糖类的代谢,控制着对虾的新陈代谢活动^[7,8]。在正常状况下血清中这些酶活性低且相对恒定,而患暴发性流行病的中国对虾血清酶活性则显著升高,尤其在重病期与健康虾相比差异非常显著,说明病毒侵袭机体后最终将导致组织细胞发生广泛而严重损害。这与赵维信等^[7]对罗氏沼虾组织转氨酶(GPT、GOT)的研究结论相类似。

血液指标的研究结果表明,经杆状病毒感染后的患病虾在营养物质代谢、抗病力、消化、呼吸、排泄等方面的生理功能受到严重损害。而病虾血液生理生化指标的变化与国内学者在其组织病理方面的研究结果一致:该病毒几乎对对虾外胚层和中胚层起源的所有组织细胞均具嗜性,病虾表现为全身性疾病^[9,10]。因此这种暴发性流行病对机体的危害具有广泛性和严重性,这也是患病虾群死亡率高(几乎达 100%)的原因。

(2)对感染试验病虾所进行的跟踪检测(注射感染 24、48、72 h)结果表明,对虾受该病毒

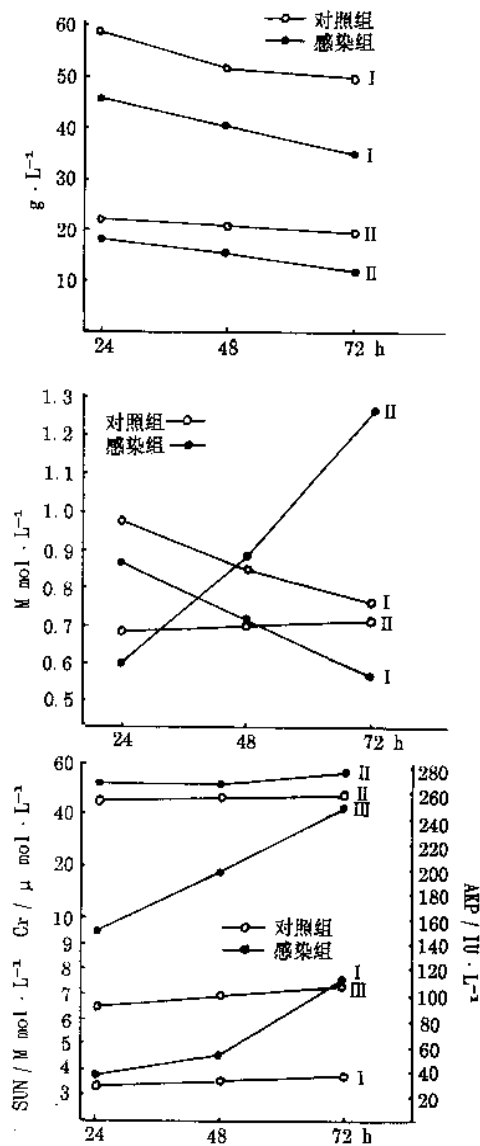


图1 人工感染 72 h 血液生化指标

Fig.1 The variation of serum biochemical indexes during the 72 h following infection

—○—对照组 control group —●—感染组 infected group

感染 24 h 后就出现血清总蛋白、白蛋白、血糖含量下降和 AKP 活性升高的早期变化, 而后随感染时间延长, 变化的血液指标增多, 其变化幅度也急剧增加, 72 h 后出现病虾死亡高峰, 这种变化与虾池发病虾的病情进展吻合。这进一步说明, 在中国对虾的最适生长季节(与水温有关)内, 无包涵体杆状病毒感染后的潜伏期很短, 属急性或特急性感染, 而不属持续性感染(如潜伏性感染、慢性感染等)类型。

参 考 文 献

- 1 李 华, 等. 1993 年中国对虾暴发性流行病原初步研究. 大连水产学院学报, 1994, 9(4): 74~79
- 2 战文斌. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒病的研究. 中国水产科学, 1995, 2(3): 22~28
- 3 周国英, 等. 上海河口地区对虾病毒病原鉴定及 PCR 检测方法的建立. 见: 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 1996. 7~10
- 4 上海市医学化验所主编. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 31~35
- 5 福州部队总医院主编. 临床医学检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1977. 301~303
- 6 陈清西, 等. 长毛对虾碱性磷酸酶性质. 厦门大学学报, 1996, 35(2): 257~261
- 7 赵维信, 等. 镉对罗氏沼虾组织转氨酶活性及组织结构的影响. 水产学报, 1995, 19(1): 21~27
- 8 陈楠生, 等译. 对虾生物学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992. 196~199
- 9 李 霞, 等. 大连地区中国对虾暴发性流行病病理学研究. 中国水产科学, 1997, 4(1): 52~59
- 10 黄 健, 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. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1~6
- 11 Dall W, et al. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns. Aquaculture, 1986, 55: 23~33
- 12 Harada M, et al. Protein phosphatase activity of calf intestinal alkaline phosphatase. Experientia, 1981, 37: 547~548

Hemopathologic of a baculovirus – caused epidemic disease of *Penaeus chinensis*

Wu Yin Xing Dianlou Zhu Guoqin Gui Yuanming Wang Bin Li Hua

(Dalian Fisheries college, Dalian 116023)

Abstract The blood physiological and biochemical indices were monitored for the epidemic diseased *Penaeus chinensis*. The results showed that the contents of total plasma protein, albumin, glucose of the diseased shrimps (pond cultured and artificially inoculated in our laboratory) decreased, and the contents of triglycerides, urea nitrogen, creatinine and enzymes of AKP, GPT, LDH increased more than those of healthy ones. 24 h after inoculation, the contents of plasma AKP of the diseased shrimp were upwards and contents of total plasma protein, albumin, glucose were downwards, and the longer the inoculation time last, the greater the ranges of these contents changed. The results indicated that the epidemic of cultured *P. chinensis* was acute or peracute systemic viral disease, and the most important physiological functions such as digestion, breath, excretion, metabolism and disease resistance were seriously destroyed very soon.

Key words *Penaeus chinensis*, epidemic disease, hemopathology