

栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究

艾海新^{1,2}, 王崇明¹, 王秀华¹, 刘英杰³, 李 赞², 黄剑宇¹, 贺桂珍², 宋微波²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 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. 中国水产科学研究院 渔业资源环境保护中心, 北京 100039)

摘要:从发病区栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)组织中分离出病毒和立克次体(*Rickettsia organism*, RO), 对健康栉孔扇贝进行人工感染。结果显示, 病毒注射组死亡率为75%, 病毒浸浴组死亡率为68.7%; RO注射组死亡率仅为18.7%; 灭活RO注射组死亡率为31%; 灭活病毒注射和空白对照组死亡率皆为12.5%; 病毒注射、浸浴组与灭活病毒注射组、空白对照组死亡率有显著差异。而RO注射组与灭活RO注射组、空白对照组死亡率没有显著差异。电镜复检结果显示, 发病扇贝的外套膜、鳃、消化腺组织中分布有大量病毒粒子, 该病毒粒子的形态特征、病理学特征与自然海区发病扇贝中的病毒粒子特征完全一致。人工感染实验结果证明, 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒(Acute Virus Necrobiotic Virus, AVNV)是栉孔扇贝大规模死亡的直接病原。

关键词:栉孔扇贝; 病毒; 立克次体; 人工感染实验

中图分类号: S944.43

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)05-0386-06

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国北方沿海重要的养殖经济贝类之一, 20世纪90年代以来, 随着养殖规模不断扩大, 病害问题日益严重, 经济损失不断增加。据统计, 仅1997~1998年, 山东省养殖扇贝因发病死亡而带来的直接经济损失就达40亿元人民币以上^[1-2]。作者自2000年起对山东省沿海主要栉孔扇贝养殖海区进行了系统的病原学和流行病学调查, 从环境理化因子、生物性因子和病理学等方面进行了病因调查和病原排查。结果显示, 栉孔扇贝大规模死亡可能与一种球形病毒和立克次体(*Rickettsia organism*, RO)^[3-7]有关。

有关海洋贝类病毒和RO感染的研究国内外报道较少, 感染贝类主要集中于牡蛎、贻贝、鲍鱼、扇贝等种类^[8-14], 这些研究大多只限于流行病学、病理学和病原生物学, 仅有少数文献涉及病毒或RO对宿主的致病作用。本研究设计了病毒和RO对栉孔

扇贝的人工感染实验, 旨在进一步确证栉孔扇贝大规模死亡的致病病原。

1 材料与方法

1.1 实验材料

栉孔扇贝取自中国海洋大学太平角实验基地, 壳长4.5~6.5 cm。实验水温控制在23~25℃, 扇贝放入水槽内暂养15 d, 取暂养存活扇贝供作感染实验。

1.2 毒种的处理

各组毒种的处理按以下方法进行, 处理得到的毒种液按常规方法进行电镜负染观察, 以证实相应毒种的存在。

1.2.1 病毒浸浴毒种的处理 取典型发病扇贝的外套膜和鳃40 g, 用2%灭菌生理盐水洗3遍, 加入10倍体积的2%灭菌生理盐水, 以FHX-1型高速分散器4 000 r/min冰浴研磨匀浆1 min。将上述组织匀浆液于4℃下1 000 g离心30 min, 上清液约为400 mL。取上清液300 mL加入抗生素(青霉素、链霉素、新霉素、四环素, 用量参照文献[15]), 作为病毒浸浴毒种液, 病贝组织含量为0.1 g/mL。

收稿日期: 2003-03-10; 修订日期: 2003-06-19.

基金项目: 国家重点基础研究规划项目课题资助(G1999012001).

作者简介: 艾海新(1977-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖和海洋生物病害研究工作。

通讯作者: 王崇明. E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

1.2.2 病毒注射毒种的处理 取上述组织匀浆上清液 25 mL 依次过 2 μm , 0.8 μm , 0.45 μm , 0.22 μm 滤膜, 病毒滤膜过滤液的终体积约为 20 mL, 取病毒滤膜过滤液 2 mL 加入抗生素, 作为病毒注射毒种液, 病贝组织含量为 0.1 g/mL。

1.2.3 灭活病毒注射毒种的处理 取病毒滤膜过滤液 2 mL 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭活病毒后, 加入抗生素以除去细菌等微生物作为灭活病毒注射毒种液, 病贝组织含量为 0.1 g/mL。

1.2.4 RO 注射毒种的处理 取过滤病毒的滤膜, 加入 2% 灭菌生理盐水至终体积 20 mL, 剧烈振荡, 充分洗脱, 取洗脱液 2 mL 作为 RO 注射毒种液, 病贝组织含量为 0.1 g/mL。

1.2.5 灭活 RO 注射毒种的处理 取 RO 洗脱液 2 mL, 加入抗生素作为灭活 RO 注射毒种液, 病贝组织含量为 0.1 g/mL。

1.3 实验方法

实验于 2002 年 9 月 15 日开始至 10 月 10 日结束。采用闭壳肌注射和浸浴 2 种方式进行感染, 经预实验注射扇贝存活 2 d 以上为安全剂量。注射组每只注射 100 μL ; 浸浴组每 15 L 海水加入 150 mL 病毒浸浴毒种液浸浴 4 h 后吸去海水, 再加入海水 40 L。感染实验分 6 组进行: (1) 病毒浸浴; (2) 病毒注射; (3) 灭活病毒注射; (4) RO 注射; (5) 灭活 RO 注射; (6) 空白对照组 (未作任何处理)。每组平行设 2 个 50 L 的水槽, 每槽 8 只扇贝, 连续充气。

1.4 日常管理

实验海水经砂滤池过滤, 每天投喂螺旋藻粉 1 次, 每天换水、吸污各 2 次, 换水率 80%。实验海水温度控制在 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。每天观察扇贝活动情况,

对于活力较差、具典型发病症状的濒死个体及时取出, 并作实验记录 (温度、pH、死亡数等)。

1.5 病原复检

取发病扇贝的外套膜、鳃、消化腺等组织立即用 2.5% 的戊二醛磷酸缓冲液进行固定, 同时把剩余外套膜、鳃、消化腺等组织于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 下冻存备用。

1.5.1 电镜超薄切片病原复检 取感染实验中已固定样品, 进行常规电镜超薄切片观察。

1.5.2 急性病毒性坏死病毒 AVNV 多克隆抗体 ELISA 病原复检 取感染实验中已冻存样品, 参照文献 [1] 进行 ELISA 检测分析。

2 结果

2.1 感染实验结果

典型发病栉孔扇贝的症状为外套膜收缩, 外套眼失去光泽; 外套腔中有大量粘液, 喷水无力; 闭壳肌收缩无力, 足丝脱落。

病毒注射组扇贝感染实验第 3 天开始死亡, 感染实验结束后累积死亡率为 75%, 半数死亡时间为 9 ~ 10 d; 病毒浸浴组扇贝感染实验第 3 天开始死亡, 感染实验结束后累积死亡率为 68.7%, 半数死亡时间为 11 ~ 12 d (图 1); RO 注射组扇贝感染实验第 9 天开始死亡, 感染实验结束后累积死亡率仅为 18.7%; 灭活 RO 注射组扇贝感染实验第 7 天开始死亡, 感染实验结束后累积死亡率为 31% (图 2); 灭活病毒注射组和空白对照组感染实验结束后累积死亡率皆为 12.5%。病毒注射、浸浴组死亡率与灭活病毒注射组、空白对照组死亡率有显著差异, 而 RO 注射组死亡率与灭活 RO 注射组、空白对照组死亡率没有明显差异。

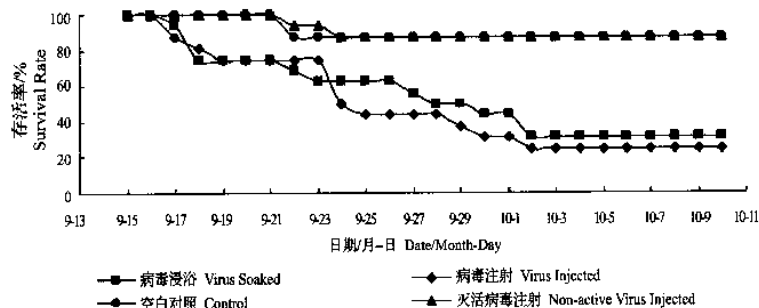


图 1 栉孔扇贝病毒感染实验存活状况

Fig. 1 Survival situation of *Chlamys farreri* infected by virus

1) 贺桂珍, 李 赞, 等, 2003. 栉孔扇贝的急性病毒性坏死症 (AVND) 病毒多克隆抗体的制备及 ELISA 分析. 高技术通讯 (待刊).

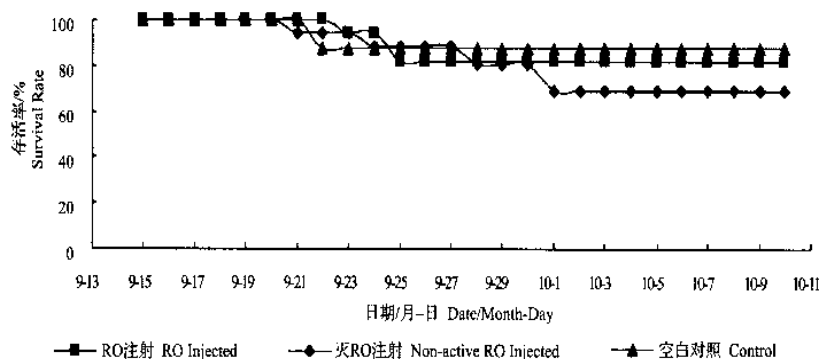


图2 栉孔扇贝 RO 感染实验存活状况

Fig. 2 Survival situation of *Chlamys farreri* infected by RO

2.2 电镜超薄切片复检结果

在病毒注射、浸浴组发病扇贝的肝胰腺、外套膜、鳃的电镜超薄切片中普遍发现形态相同的病毒粒子(图版 I -1~3),该病毒为球形,直径为 130~170 nm,具有囊膜,囊膜内可见均匀的高电子密度的核衣壳。具有明显的病理学特征,即细胞核出现肿胀、溶解,染色质边缘化,核仁溶解,核膜扩张或不清晰;细胞质内线粒体肿大,嵴崩解,内质网扩张,核蛋白体颗粒脱落,甚至形成髓鞘样小体,整个细胞出现解体现象(图版 I -3)。这与在自然海区发病扇贝组织所观察到的病毒粒子的形态特征和病理学特征完全一致^[3]。在灭活病毒注射组中未观察到病毒粒子。在 RO 注射组发病扇贝超薄切片中发现少量

RO 存在于栉孔扇贝的鳃、消化腺的上皮组织中,个体呈相对一致的长棒状,较紧密的排列在一起(图版 I -4),同时也发现少量病毒粒子,无明显的病理学变化。在灭活 RO 注射组中未观察到 RO,但观察到少量病毒粒子;在空白对照组中未观察到病毒粒子和 RO。

2.3 AVNV 病毒多克隆抗体 ELISA 复检结果

病毒注射组发病扇贝皆呈阳性反应,阳性率达到 100%;病毒浸浴组大部分呈阳性反应,阳性率为 83.3%;RO 注射组和灭活 RO 注射组阳性率较低,仅为 16.7%;空白对照组无阳性反应,阳性率为 0(表 1)。

表 1 2002 年栉孔扇贝人工感染实验 ELISA 检测结果

Table 1 Artificial infective experiment of scallop *Chlamys farreri* in 2002 detected by indirect ELISA technique

组别 Group	样品数 Sample numbers	OD ₄₉₂	P/N			阳性率/% Positive rate
			≥2.1	1.5 ≤ P/N < 2.1	<1.5	
病毒浸浴 Virus soaked	6	0.61~0.84	5	1	0	83.3
病毒注射 Virus injected	6	0.91~1.34	6	0	0	100
灭活病毒注射 Non-active virus injected	6	0.38~0.51	0	4	2	0
RO 注射 RO injected	6	0.24~0.58	1	1	4	16.7
灭活 RO 注射 Non-active RO injected	6	0.28~0.60	1	0	5	16.7
空白对照组 Control	6	0.18~0.36	0	1	5	0

注: P/N - 阳性率与阴性率之比。

Note: P/N means the ratio of positive rate to negative rate.

3 讨论

Farley 等^[8]于 1972 年首次报道了在海洋贝类

中发现病毒并描述了其危害情况。随着海洋贝类养殖中病害影响的加剧,国内外对海洋贝类病毒病的研究逐渐开展起来。迄今为止报道的贝类病毒主要

存在于牡蛎、贻贝及其他海洋贝类(如皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)、九孔鲍(*Haliotis diversicolor*)等)中^[8-14]。本研究报道的病毒与张朝霞等^[12]报道中引起九孔鲍暴发性死亡的病毒相似,但两者之间的关系有待进一步研究确认。

本实验中病毒注射组死亡率(75%)和病毒浸浴组死亡率(68.7%)与灭活病毒注射及空白对照组死亡率(12.5%)有显著差异,RO注射组死亡率(18.7%)与空白对照组死亡率(12.5%)无显著差异。电镜复检发现病毒注射、浸浴组病贝组织中分布有大量病毒粒子,且病理变化明显,多抗ELISA检测皆呈阳性反应(表1);RO注射组和灭活RO注射组病贝组织中发现少量RO且无明显病理变化,同时发现少量病毒粒子,多抗ELISA检测阳性率皆为16.7%(表1);空白对照组中未发现病毒粒子,多抗ELISA检测无阳性反应,阳性率为0(表1)。这说明多抗ELISA检测结果和电镜复检结果是一致的。

本实验中RO感染毒种的获得是通过洗脱过滤病毒的滤膜获得的,电镜负染观察发现RO洗脱液中有较多的RO和少量病毒粒子存在,说明利用本方法可以获得RO感染毒种,但由于滤膜孔堵塞等原因,不可避免的会混有少量病毒粒子。这也可能是RO感染组仍存在一定数量的扇贝死亡现象的主要原因。立克次体一般对四环素、青霉素等抗生素敏感,而病毒一般对抗生素不敏感^[16-17]。经过四环素、青霉素、链霉素、新霉素4种抗生素灭活处理后的RO洗脱液的电镜负染观察中未观察到RO,但可见病毒粒子,表明这种处理方法是可行的。

在海洋双壳贝类中,RO寄生是一种较为普遍的现象,一般认为对宿主不形成严重的损伤,到目前为止,尚未有确凿证据证明RO感染可导致宿主大规模死亡^[7]。本实验中RO注射组死亡率仅为18.7%,与灭活RO注射组、空白对照组死亡率没有显著差异;在电镜复检中发现少量RO,但未见明显的病理变化。这也间接说明RO虽可导致宿主感染,但病理变化不明显,与栉孔扇贝暴发性大规模死亡无直接关系。

根据本感染实验结果,可以断定,栉孔扇贝大规模死亡是由栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒(Acute Virus Necrobiotic Virus, AVNV)所致,这与宋微波等^[5]提出的观点相同。

参考文献:

- [1] 张福绥,杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析[J]. 海洋科学,1999,1:44-47.
- [2] 王运涛,相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼,1999,30(6):770-774.
- [3] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报,2002,26(2):180-184.
- [4] 王秀华,王崇明,李 筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2):149-155.
- [5] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学,2001,25(2):23-26.
- [6] 贺桂珍,李 赞,王崇明,等. 栉孔扇贝和海湾扇贝病原体感染与疾病发生关系探讨[J]. 高技术通讯,2003,13(3):75-79.
- [7] 刘英杰,王崇明,朱洛壮,等. 栉孔扇贝立克次体自然感染调查及人工感染试验[J]. 中国水产科学,2002,9(4):346-352.
- [8] Farley C A, BANFIELD W G, KASNIC G, et al. Oyster herpes-type virus[J]. Science,1972,178:759-760.
- [9] Elston R. Special topic review: Bivalve mollusk viruses[J]. World J Microbi Biotechn, 1997,13:393-403.
- [10] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南:山东科技出版社,1999,122-149.
- [11] 王 斌,李 霞,高船舟. 皱纹盘鲍一种球形病毒的感染及发生[J]. 中国病毒学,1997,12(4):360-363.
- [12] 张朝霞,王 军,苏永全,等. 九孔鲍暴发性流行病的病原及病理[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2001,40(4):949-956.
- [13] Arzul I, Nicolas J L, Davison A J, et al. French scallop; a new host for ostreid herpesvirus-1[J]. Virology, 2001, 290:342-349.
- [14] 姜静颖. 海湾扇贝体内发现一种新病毒—疱疹病毒[J]. 山东农业大学学报,1997,28(增刊):26-28.
- [15] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997,209-238.
- [16] 魏 曦. 医用立克次体学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984.2-49.
- [17] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993.44-46.

Artificial infection of cultured scallop *Chlamys farreri* by pathogen from acute virus necrobiotic disease

AI Hai-xin^{1,2}, WANG Chong-ming¹, WANG Xiu-hua¹,

LIU Ying-jie³, LI Yun², HUANG Jian-yu¹, HE Gui-zhen², SONG Wei-bo²

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China;

2. Key Lab of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Center of Fishery Resources and Environment Conservation, China Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

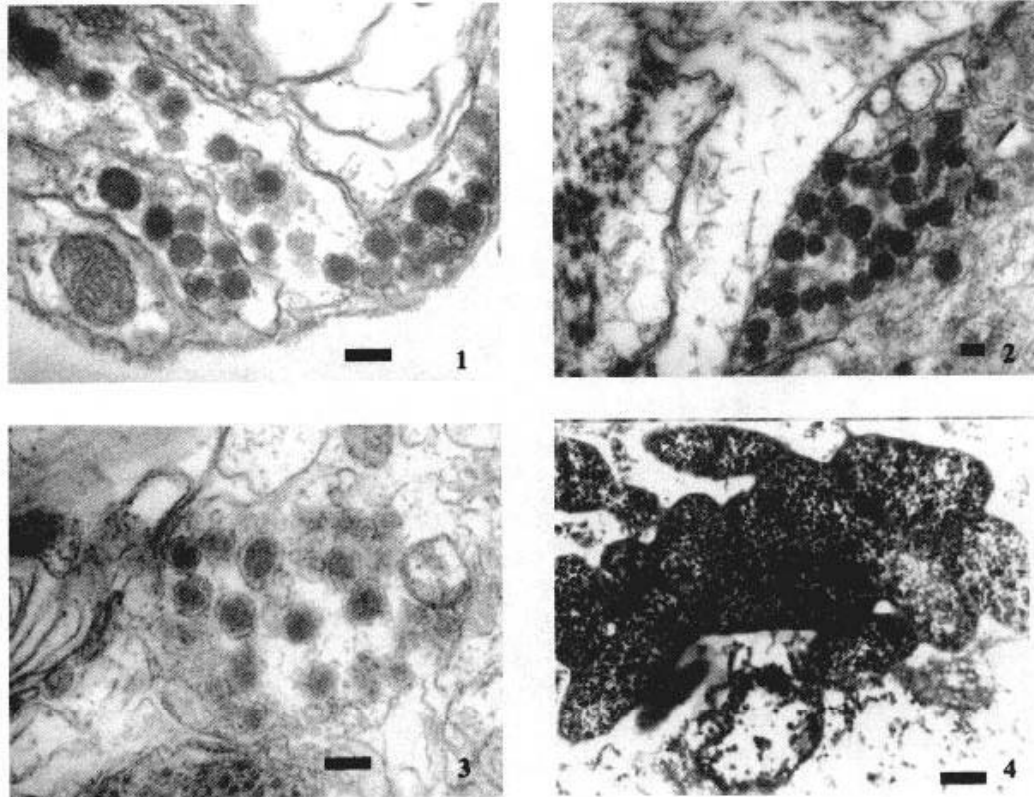
Abstract: Since 1997, the disease outbreaking in cultured scallops along Shandong coastal line has caused great deal of death in *Chlamys farreri*. The infectious virus and infectious Rickettsia organism (RO), which were isolated from the moribund *Chlamys farreri* in the outbreak area were used to infect the healthy cultured scallop *C. farreri*. The experimental results indicated that the mortality of the scallop reached 75% while the median lethal time was 9 – 10 d after the virus injection. The mortality of the scallop reached 68.7% and the median lethal time was 11 – 12 d after the infection by virus soaking. The mortality of the scallop only reached 18.7% by RO injecting, only slightly higher than that in the control (12.5%). The mortalities of the scallop infected by virus-injecting and by virus-soaking were obviously different from those infected by non-active virus-injecting and in the control. But for the RO-infected groups, the mortalities among the injected group, the non-active-injected group and the control had no significant difference. The electron microscopic examinations revealed the presence of spherical virus in the mantle, gill and digestive gland, and the morphological and pathological characters of the virus were identical with those found in those diseased in natural sea waters. The results of the infection exhibited that the pathogen of the massive death of the scallop was acute virus necrobiotic virus.

Key words: *Chlamys farreri*; pathogen; virus; Rickettsia organism; infective experiment

Corresponding author: WANG Chong-ming.

艾海新等：栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究

Al Hai-xin et al: Artificial infection of cultured scallop *Chlamys farreri* by pathogen from acute virus necrobiotic disease



图版 I Plate I

1. 外套膜皮下结缔组织中病毒粒子的电镜照片, Bar=200 nm.
2. 消化腺消化小管管间结缔组织中病毒粒子的电镜照片, Bar=100 nm.
3. 消化腺结缔组织细胞质中病毒粒子的电镜照片, Bar=200 nm.
4. 鳃上皮细胞中立克次体包涵体及其超微结构的电镜照片, Bar=800 nm.
1. Virions in the hypodermal of connective tissue in mantellum on TEM. Bar=200 nm.
2. Virions in the cytoplasm of connective tissue in digestive gland on TEM. Bar=100 nm.
3. Virions in the cytoplasm of connective tissue in digestive gland on TEM. Bar=200 nm.
4. RO in the cpithelial cell of gill showing the ultrastructure of tightly packed RO on TEM. Bar=800 nm.