

文章编号: 1004 - 7271(2001)04 - 0364 - 06

·研究简报·

凡纳对虾白斑综合征病毒的检测和预防

Detection and prevention of the White Spot Syndrome Virus in *Penaeus vannamei*

蔡生力, 陈专静

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

CAI Sheng-li, CHEN Zhuan-jing

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 凡纳对虾; 白斑综合征病毒; 检测; 核酸探针试剂盒

Key words: *Penaeus vannamei*; White Spot Syndrome Virus; detection; nucleic acid gene probe case

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

20 世纪 90 年代以来, 日本、泰国、中国等许多亚洲国家和地区因虾病流行, 对虾养殖产量锐减, 造成重大经济损失。其中危害最严重的就是白斑综合征(white spot syndrome, WSS), 其病原体为白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[1-3]。1993 年 5 - 8 月, 我国沿海从南到北对虾养殖场发生了大面积的对虾爆发性流行病, 损失非常严重^[4,5]。关于 WSS 的研究已成为近年来国内外水产养殖病害研究的热点^[6-12]。随着 WSSV 研究的深入, 有关 WSS 的病原、病理、诊断方法、检测技术、传播途径及综合防治技术等方面取得了较大的进展, 对养殖生产的恢复起到了一定的作用。凡纳对虾(*Penaeus vannamei*) 又名南美白对虾, 是迄今所知世界养殖产量最高的三种对虾之一, 我国 1988 年首次从美洲引进凡纳对虾, 育苗和养殖在我国南北方逐步展开^[13]。近两年, 随着育苗技术的不断成熟, 养殖面积和产量也不断增加, 给养殖户带来可观的经济效益。但每年由于白斑综合征的肆虐, 也造成了不可估量的损失。由于病毒性疾病发病后难以治疗, 主要是采取及时合理的预防措施, 因此采取快速有效的检测手段跟踪整个养殖过程, 针对性地辅以科学的预防措施, 成为凡纳对虾健康养殖中的关键一环。为进一步稳定持续发展上海地区凡纳对虾的养殖, 本课题组承担了上海市农委下达的“河口区凡纳对虾的健康育苗和养成”科研项目, 首次在上海市河口地区进行凡纳对虾的育苗生产试验, 并在此基础上进行健康养成。本研究的目的是对可能成为凡纳对虾育苗和养成的 WSS 的传染源如: 亲虾、仔虾、天津厚蟹(*Helice tientsinensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenburgii*) 等进行病原检测, 准确、及时切断 WSS 病原的传播途径, 从而为预防该病的暴发流行起到科学的指导作用。

1 材料与方 法

1.1 检测样品种类和来源

试验样品的种类、来源以及取样时间和检测时间见表 1。

收稿日期: 2001-05-29

基金项目: 上海市农委科技兴农重点攻关项目[农科攻字(00)第 1 - 18 号]。

作者简介: 蔡生力(1957 -), 男, 浙江临安人, 副教授, 博士, 从事水产动物繁殖和发育生物学研究。Tel: 021 - 65710633

表 1 被检样品种类、来源及检测时间
Tab.1 Types, sources and detection dates of the detected samples

实验次序	检测日期	样品种类	样品来源	取样日期	备注
I	2000.12.29 - 30	凡纳对虾亲虾	上海金山对虾育苗厂	2000.10.20	欲作亲虾用
		凡纳对虾亲虾	上海金山个体养殖池	2001.10.20	欲作亲虾用
		凡纳对虾幼虾 I	浙江平湖水产研究所	2001.10.20	
		凡纳对虾幼虾 II	浙江平湖水产研究所	2001.10.20	
II	2001.3.24 - 25	凡纳对虾亲虾	广东徐闻对虾育苗厂	2001.3.23	欲作亲虾用
		凡纳对虾仔虾	上海金山漕泾育苗厂	2001.3.23	幼体自广东
		凡纳对虾下带虾	上海金山漕泾育苗厂	2001.2.21	金山对虾育苗厂购进
		凡纳对虾患病虾	上海金山漕泾育苗厂	2001.2.21	金山个体养殖池购进
III	2001.4.29 - 30	天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	2001.4.24	
		罗氏沼虾仔虾	江苏吴江	2001.4.12	宏鑫育苗厂
		罗氏沼虾仔虾	江苏吴江	2001.4.12	新鑫育苗厂
		凡纳对虾亲虾	广东徐闻对虾育苗厂	2001.4.24	
IV	2001.5.9 - 10	凡纳对虾仔虾	金山漕泾育苗厂	2001.5.7	本厂培育
		罗氏沼虾成虾	广州	2001.5.8	市场购得
		天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	2001.5.7	
V	2001.5.11 - 12	凡纳对虾幼虾	上海奉贤	2001.5.11	样品送到时刚死亡
		凡纳对虾幼虾	上海奉贤	2001.5.11	样品送到时刚死亡
		凡纳对虾幼虾	上海奉贤	2001.5.7	尚存活
		天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	2001.5.11	
VI	2001.5.13 - 14	凡纳对虾幼虾	江苏吴江	2001.5.11	样品送到时刚死亡
		凡纳对虾幼虾	江苏吴江	2001.5.11	尚存活
		凡纳对虾幼虾	江苏吴江	2001.5.11	未患病
		凡纳对虾幼虾	江苏吴江	2001.5.11	未患病
VII	2001.5.22 - 23	罗氏沼虾成虾	金山漕泾育苗厂	2001.5.13	
		凡纳对虾亲虾	金山漕泾育苗厂	2001.5.13	已产卵;死亡
		凡纳对虾亲虾	金山漕泾育苗厂	2001.5.13	已产卵;濒死

1.2 样品的保存、取样部位和数量

所取样品检测前均放于冰箱中冷冻(低于 -24°C)保存。亲虾及各生长期对虾取其鳃部,幼虾、仔虾取整只,蟹类取鳃部。每份样品在 $0.1\sim 0.2\text{g}$ 。

1.3 试剂盒及检测方法

研究采用核酸探针点杂交检测试剂盒进行 WSSV 的检测。试剂盒购自中国水产科学院,黄海水产研究所。检测方法参照试剂盒说明书。

2 结果

2.1 亲虾检测结果

从表 2 可以看出,不同来源的亲虾 WSSV 的感染情况不同。对从上海金山对虾育苗厂和金山个体养殖池购进的亲虾检测结果显示,前者为阴性,后者为阳性,本应舍弃后者,但因检出阳性的金山个体养殖池的亲虾个体较大,且未见明显发病症状,便继续隔离养殖留待进一步观察。养殖一段时间后,在育苗前,由于开始逐渐升温,金山个体养殖池的亲虾已明显发病。此时对这两批亲虾又进行了第二次检测,其中来自金山对虾育苗厂的亲虾仍为阴性,来自金山个体养殖池的亲虾仍为明显阳性,所以对后者

立刻舍弃不用。对从广东引进的亲虾进行了两次检测,检出结果为阴性。在二批亲虾(分别自广东和金山对虾育苗厂购进,后已混合)产卵繁殖完毕之后,再次对其进行了检测,挑选濒临死亡和已死亡亲虾作为检测样品,结果并未检测出病毒,说明产卵后的亲虾并未感染 WSSV。

表 2 亲虾检测结果

Tab.2 The detection results of brood stock shrimp

样品种类	取样地点	检测日期	检测结果
凡纳对虾亲虾	上海金山对虾育苗厂	实验 I	-
凡纳对虾亲虾	上海金山个体养殖池	2000.12.29-30	++
凡纳对虾亲虾	广东徐闻育苗厂	实验 II	-
凡纳对虾亲虾(金山对虾育苗厂购进)	上海金山漕泾育苗厂	2001.3.24-25	-
凡纳对虾患病虾(金山个体虾池购进)	上海金山漕泾育苗厂		+++
凡纳对虾亲虾	广东徐闻育苗厂	实验 III	-
		2001.4.29-30	
凡纳对虾亲虾(产卵后将死)	金山漕泾育苗厂(广东和申漕公司购进)	实验 VII	-
凡纳对虾亲虾(产卵后已死)	金山漕泾育苗厂(广东和申漕公司购进)	2001.5.22-23	-

注:检测结果一栏中,“+”表示弱阳性,“++”表示一般阳性,“+++”表示强阳性,“-”表示阴性。

2.2 仔虾及幼虾检测结果

表 3 仔虾及幼虾检测结果

Tab.3 The detection results of shrimp larva and juvenile shrimp

样品种类	取样地点	检测日期	检测结果
凡纳对虾幼虾 I	浙江平湖水产研究所	实验 I	-
凡纳对虾幼虾 II	浙江平湖水产研究所	2000.12.29-30	-
凡纳对虾仔虾(自广东)	金山漕泾育苗厂	实验 II	-
		2001.3.24-25	
凡纳对虾仔虾(本厂培育)	金山漕泾育苗厂	实验 IV	-
		2001.5.9-10	
凡纳对虾幼虾(濒死)	上海奉贤	实验 V	+++
凡纳对虾幼虾(死亡)	上海奉贤	2001.5.11-12	+++
凡纳对虾幼虾(尚存活)	上海奉贤	2001.5.11-12	+
凡纳对虾幼虾(死亡)	江苏吴江	实验 VI	++
凡纳对虾幼虾(尚存活)	江苏吴江	2001.5.13-14	-
凡纳对虾幼虾(未患病)	江苏吴江	2001.5.13-14	-
凡纳对虾幼虾(未患病)	江苏吴江	2001.5.13-14	-

注:检测结果一栏中,“+”表示弱阳性,“++”表示一般阳性,“+++”表示强阳性,“-”表示阴性。

表 3 显示了对不同来源的仔虾和幼虾的检测结果。浙江平湖水产研究所送检的幼虾为阴性;金山漕泾育苗厂自己培育和广东引进的仔虾为阴性;对上海奉贤和江苏吴江的养殖户先后送来的发病幼虾样品进行检测发现:奉贤的已死亡幼虾为强阳性,同池尚存活的幼虾为弱阳性;吴江的已死亡幼虾为一般阳性,同池尚存活的幼虾为阴性,未见发病症状的同批另一池幼虾检测结果亦为阴性。

2.3 其他样品检测结果

表 4 列出了与凡纳对虾养殖相关的天津厚蟹和罗氏沼虾的检测结果。对从凡纳对虾养殖池中及周围捕到的天津厚蟹两次取样,先后进行了三次检测,结果均未检出 WSSV;对罗氏沼虾也先后两次取样,检测结果亦为阴性。

表 4 其他样品检测结果

Tab.4 The detection results of other species

样品种类	取样地点	检测日期	检测结果
天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	实验Ⅲ 2001.4.29-30	-
天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	实验Ⅳ 2001.5.9-10	-
天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	2001.5.9-10	-
天津厚蟹	金山漕泾育苗厂	实验Ⅴ 2001.5.11-12	-
罗氏沼虾仔虾(宏鑫)	江苏吴江	实验Ⅲ 2001.4.29-30	-
罗氏沼虾仔虾(新鑫)	江苏吴江	2001.4.29-30	-
罗氏沼虾成虾	市场购得(广州)	实验Ⅳ 2001.5.9-10	-
罗氏沼虾成虾	金山漕泾育苗厂	实验Ⅶ 2001.5.22-23	-
罗氏沼虾成虾	金山漕泾育苗厂	2001.5.22-23	-

注: 检测结果一栏中, “+”表示弱阳性, “++”表示一般阳性, “+++”表示强阳性, “-”表示阴性。

3 讨论

对虾白斑综合征是一种危害严重的暴发性流行病, 近年来给对虾养殖业造成了巨大的损失。虽然凡纳对虾由于抗病力强等原因, 相对于中国对虾、斑节对虾等来说, 受白斑综合征病毒危害较轻, 但各地仍有因发病而造成严重损失的报道。随着凡纳对虾养殖的普及推广, 白斑综合征等对虾暴发性流行病的有效控制成为其养殖成功的关键环节之一。快速准确的疾病诊断手段能尽早发现病毒, 从而及时采取措施, 将损失减小到最低限度。为此我们在凡纳对虾养殖过程中, 用核酸探针点杂交检测技术跟踪检测了亲虾、仔虾以及其他一些相关甲壳动物的 WSSV 携带情况, 同时还对上海奉贤和江苏吴江等地因发病而送检的仔虾进行了病原检测, 从而为预防该病在上海市及周边地区的流行提供了科学依据。

3.1 亲虾的检测

已有多家报道证实 WSSV 可垂直传播, 带毒亲虾可通过繁殖将病毒传给子代。江世贵等实验证实: 受 WSSV 感染的斑节对虾卵巢经 PCR 检测为 WSSV 阳性, 产出的卵子部分为阳性。由于被感染的亲虾能够完成产卵过程, 且产出了带 WSSV 的卵子, 因此认为, WSSV 具备垂直传播的条件^[14]。因此, 谨慎严格的亲虾筛选应是预防 WSSV 的首要环节。

对从上海金山对虾育苗厂和金山个体养殖池选购的用于繁殖的亲虾, 我们分别进行了两次病原检测, 舍弃了虽然个体较大但携带 WSSV 的金山个体养殖池的亲虾, 确保了不用带毒虾作为亲虾。我们对从广东引进的亲虾也先后进行了两次检测, 确保其不带病毒后, 才作为繁殖亲虾用。这样在亲虾的选择上严密把关, 杜绝了育苗中病毒通过可能的垂直传播传染给了子代, 确保了整个育苗期间所育的苗都为 WSSV 阴性。

在二批亲虾(分别自广东和漕泾育苗厂购进, 后已混合)产卵繁殖完毕之后对那些濒临死亡和已经死亡的亲虾进行了 WSSV 检测, 检查亲虾在产卵繁殖过程中有否感染 WSSV, 结果是否定的。排除了亲虾感染 WSSV 的可能后, 推测其死亡原因可能与产卵后虚弱、摄食不足、营养不良等有关。

3.2 仔虾和幼虾的检测

虾苗是否带病毒, 是凡纳对虾养殖中预防白斑综合征的最关键的一环。我们对金山漕泾育苗厂本厂培育的虾苗及从广东直接购进的虾苗进行了检测, 表明均未感染病毒。

2001 年 5 月 7 日至 11 日, 上海奉贤和江苏吴江的养殖户先后送来发病幼虾样品, 虾苗均来自福建厦门等地育苗厂。送检样品养殖不到一周, 仔虾刚长到 2cm 左右时, 虾体发红, 不摄食, 而后死亡。同池的小虾尚未发病, 但虾体色泽略显不正常, 长到 2cm 左右即发病。经对奉贤送检的患病虾池中死亡虾和未死虾进行检测发现, 死亡虾检测结果呈强阳性反应, 未死虾则表现为弱阳性反应, 表明前者已严重感染 WSSV, 后者有轻微感染。江苏吴江送检的死亡虾为阳性, 同池未发病虾的检测结果仍为阴性, 而另

外同批不同虾池养殖的未发病虾检测结果也为阴性,两地所送样品检测结果似有差异。我们认为这可能是由于奉贤的死亡虾为强阳性,即携带有大量病毒,导致同池未死亡虾亦很快受感染,只是程度较轻;而吴江的死亡虾为一般阳性,总体病情还较轻,只是因为是在淡水中养殖,环境条件不适宜,才导致其加速发病死亡。而同池未发病虾和同批不同池养殖的未发病虾未检测出病毒,其原因有可能是这批虾确实不带毒,也可能是感染病毒的数量还很少,尚难以检出。考虑到吴江地区远离海,此次养殖时间短,被横向传播的可能性较小,因此后者可能性更大。至于幼虾究竟是在育成时就已带毒,还是在养殖过程中感染了病毒而发病,需要作深入的流行病学调查才能确定。

江世贵等曾报道,在三个斑节对虾育苗场中均未检测到自然状态下亲虾及其卵、幼体和仔虾携带 WSSV,但这些育苗场的虾苗出售后,在养殖过程中有一部分养殖场发生了白斑综合征(WSS)。分析出现这种情况,主要原因应该是在养殖过程中出现了 WSSV 的水平传播,但这也并不能排除 WSSV 存在潜伏感染的可能,因为可能带毒而不发病的虾苗所携带的病毒数量较少,而检测方法的灵敏度有其局限性^[15],这一点与本研究相似。

3.3 天津厚蟹的检测

为进一步探索 WSSV 的可能传播途径,我们对从凡纳对虾养殖池中及周围捕到的天津厚蟹两次取样进行了检测。因为许多学者的实验证明:虾池中的底栖甲壳类是对虾暴发性流行病病原的可能寄主,并认为防治对虾病毒性疾病应把清除虾池中这类生物作为主要措施之一^[16,17]。战文斌等^[18]报道,在对虾白斑症病毒病发生期间,养殖虾池内的蟹类也往往出现异常甚至死亡。他们通过对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的人工感染证实了其感染性。蟹类对 WSSV 的敏感性较对虾低,为此蟹类有可能是 WSSV 的携带者或传播者。孙伯伦等^[16]在 1993-1995 年用电镜多次检查养虾池塘中的几种与对虾养殖密切相关的海洋生物:天津厚蟹、桡足类、糠虾、沙蚕、卤虫、蓝蛤等,只在天津厚蟹中检得杆状病毒。我们虽未在天津厚蟹中检出 WSSV,但考虑到现在还未到白斑综合征病毒暴发期,还有待进一步定期检测,因此不排除蟹类携带 WSSV 的可能。

3.4 罗氏沼虾的检测

虽然近年来未见有罗氏沼虾携带 WSSV 或暴发 WSS 的报道,但现在许多养殖场和养虾户都以养过罗氏沼虾的养殖池来养殖凡纳对虾,因此,确定罗氏沼虾是否为 WSSV 的携带者具有重要意义。通过我们此次对来自不同地区的罗氏沼虾进行检测,结果没有发现罗氏沼虾感染 WSSV,可以基本排除罗氏沼虾为 WSSV 传播途径的可能性。由于罗氏沼虾为淡水养殖种类,除育苗期间,须有一定的盐度,其他时间均在淡水中生活,感染该病毒的可能性较小,因此,曾养殖过罗氏沼虾的池子养殖凡纳对虾可以说是比较安全的。

青岛黄海水产研究所黄捷、杨冰等在核酸探针检测技术方面给予了热心培训和指导,谨致谢忱。

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, 29:149-158.
- [2] Lo C F, Ho C H, Cheng C H, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods[J]. *Disease of Aquatic Organism*, 1996, 27:215-225.
- [3] Lo C F, Kou G H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review[J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(4):365-371.
- [4] 蔡生力,黄捷,王崇明,等.1993-1994 年对虾爆发病的流行病学研究[J]. *水产学报*, 1995, 19(2):112-119.
- [5] Zhan W B, Yu K K, Meng Q X. Study on baculovirus disease of *Penaeus chinensis*[J]. *J Fishery Science of China*, 1995, 2:22-28.
- [6] Lo C F, Ho C H, Cheng C H, et al. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs[J]. *Disease of Aquatic Organism*, 1997, 30:53-72.
- [7] Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C, et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, and lobsters from India[J]. *J Fish Diseases*, 1999, 22:183-191.

- [8] Peng S E, Lo C F, Liu K F, et al. The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by perieopod excision[J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(4):395-400.
- [9] Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China[J]. *J Aquatic Animal Health*, 1998, 10:405-410.
- [10] Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. Production of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus[J]. *J Aquatic Animal Health*, 1999, 11:17-22.
- [11] 何建国,周化民,江静波. 白斑综合征病毒致病性特征[J]. *热带海洋*, 1998, 18:59-67.
- [12] 何建国,周化民,姚 泊,等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(2):65-69.
- [13] 张伟权. 世界重要养殖品种——凡纳对虾生物学简介[J]. *海洋科学*, 1990, (3):72.
- [14] 江世贵,任建国,吕 玲,等. 白斑综合征病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000(增刊), 164:171.
- [15] 江世贵,何建国,马之明,等. 白斑综合征病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000(增刊), 172:176.
- [16] 孙伯伦,刘家贵,张国清,等. 天津厚蟹感染对虾杆状病毒及对虾爆发性流行病防治途径的初步研究[J]. *水产科学*, 1997, 16(2):3-6.
- [17] 王文兴,罗挽涛,宋庆云,等. 脊尾白虾感染和传播中国对虾爆发性病毒的初步研究[A]. 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[C]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1996, 89-93.
- [18] 战文斌,张利峰,王远红,等. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)对蟹类的感染[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000(增刊), 154:158.