

中华绒螯蟹白斑症病毒病的诊断

雷燕^{1,2}, 肖洋^{1,2}, 王娟^{1,2}, 张文文^{1,2}, 戚瑞荣^{1,2}, 张会军^{1,2}, 王雪鹏^{3*} (1. 广州利洋水产科技股份有限公司, 广东广州 510515; 2. 广州金水动物保健品有限公司, 广东广州 510515; 3. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

摘要 [目的]对江苏省吴中地区养殖池塘患病的中华绒螯蟹进行诊断。[方法]结合临床流行病学调查和分子生物学鉴定,对江苏省吴中地区发病的中华绒螯蟹进行实验室检测与鉴定。参考 GenBank 中白斑症病毒(WSSV)的基因序列设计 1 对特异性引物,以从中华绒螯蟹的鳃、肝胰腺、肌肉等组织提取的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。[结果]经过解剖观察,发现病蟹内脏器官无明显变化。从病蟹的肝胰腺和肌肉中未分离到致病菌。通过 PCR 扩增,均能扩增出预期大小的特异性产物,测序比对显示扩增条带的基因序列与 WSSV 的基因序列同源性高达 99.6%。病理切片显示鳃和肝胰腺可见大量细胞核肿大细胞,与 WSSV 引起对虾组织的病变相一致。[结论]经初步诊断,确定引起中华绒螯蟹发病死亡的病原为 WSSV。

关键词 中华绒螯蟹;白斑症病毒;诊断;组织病理变化

中图分类号 S945.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)05-0089-03

Diagnosis of White Spot Syndrome Virus Disease in *Eriocheir sinensis*

LEI Yan^{1,2}, XIAO Yang^{1,2}, WANG Juan^{1,2}, WANG Xue-peng^{3*} et al (1. Guangzhou Liyang Aqua-Technology Co. Ltd, Guangzhou, Guangdong 510515; 2. Guangzhou Jinshui Animal Health Products Co. Ltd, Guangzhou, Guangdong 510515; 3. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018)

Abstract [Objective] To diagnose the diseased *Eriocheir sinensis* in culture pond of Wuzhong Region of Jiangsu Province. [Method] The laboratory detection and identification were made on diseased *E. sinensis* by using clinical epidemiological investigation and molecular biological identification. One pair of specific primers were designed according to WSSV sequence in GenBank. DNA was extracted from the gill, hepatopancreas, muscle and other organs of *E. sinensis* and taken as templates to make PCR amplification. [Result] It was found that there was no obvious change of visceral organs in diseased *E. sinensis* by anatomical observation. No pathogenic bacterium was isolated from liver and muscle of diseased *E. sinensis*. Specific products with predicted size were obtained from diseased *E. sinensis* by PCR. The sequencing comparison results showed that the homology of nucleotide sequences between the amplified brands and WSSV was 99.6%. By observing the pathological sections, it was found that there were a large number of cells with enlargement nucleus in the gill and liver of diseased *E. sinensis*, which was accordant with the lesions of shrimp infected by WSSV. [Conclusion] The pathogen of diseased *E. sinensis* was confirmed as WSSV by tentative diagnosis.

Key words *Eriocheir sinensis*; White spot syndrome virus(WSSV); Diagnosis; Histopathological changes

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹, 隶属甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)方蟹科(Grapsidae)绒螯蟹属(*Eriocheir*), 是一种重要的经济蟹类。我国中华绒螯蟹养殖业迅速发展, 已经形成规模化。然而, 细菌性疾病与病毒性疾病不断发生^[1-3], 严重影响中华绒螯蟹的健康养殖。随着消费量的不断增加, 为了提高养殖经济效益, 在生产中常采用多品种混养的养殖模式, 如克氏原螯虾与中华绒螯蟹混养等^[4]。然而, 近年来, 进入 6 月后经常发生克氏原螯虾大批量死亡后, 处于相同养殖池塘中的中华绒螯蟹随后出现大量死亡的现象, 严重时整个池塘的克氏原螯虾和中华绒螯蟹全部死亡, 给养殖户造成巨大的经济损失, 严重威胁中华绒螯蟹养殖业的健康可持续发展。

2015 年 6 月, 江苏省苏州市吴中地区的克氏原螯虾与中华绒螯蟹混养池塘的克氏原螯虾出现大面积发病死亡, 约 7 d 后大部分克氏原螯虾发病池塘的中华绒螯蟹也出现大量死亡的现象。发病河蟹的主要外观症状为全身无力, 解剖未见其他明显病变。笔者参照文献^[5-6]从细菌学、病毒学和

组织病理学 3 个方面对江苏省吴中地区发病中华绒螯蟹进行实验室检测, 并结合临床流行病学调查及分子生物学鉴定对其进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料 发病中华绒螯蟹于 2015 年 6 月取自江苏省苏州市吴中地区部分克氏原螯虾和中华绒螯蟹混养池塘, 共选取 10 只发病的中华绒螯蟹; 2 只正常的中华绒螯蟹, 采自江苏省南京市某中华绒螯蟹养殖池塘。

2 × *Taq* PCR MasterMix、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DL2000 DNA Marker, 均购自天根生化科技(北京)有限公司; 营养琼脂, 购自青岛海博生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。 根据 GenBank 数据库中的白斑症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)基因的保守序列, 设计 1 对特异性的检测引物序列, 上游引物 WSSV-F 为 5'-GTG-TACTAGGAATATTGGAAT-3'; 下游引物 WSSV-R 为 5'-CGGCATCTTCATGGCTTCTG-3', 扩增片段长 441 bp, 引物由华大基因有限公司合成。

1.2.2 流行病学调查及临床检查。 对发病养殖池塘的水温、水质指标、水源以及发病中华绒螯蟹苗种来源、传染性、发病率和死亡率等进行现场调查, 观察发病中华绒螯蟹在养殖池塘中的活动情况, 分别选取正常中华绒螯蟹和发病中华绒螯蟹, 观察其体表症状, 然后打开中华绒螯蟹的背壳, 观察

基金项目 浙江省科技计划项目(2012F20029); 中央财政支持地方高校发展专项学科项目; 温州市重点科技创新团队项目(C2012004-02); 浙江省重大科技专项(2012C12017-3); 温州市科技计划项目(2011N0006)。

作者简介 雷燕(1983—), 男, 四川绵阳人, 工程师, 硕士, 从事水产动物病害研究。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事水生动物病害防控研究。

收稿日期 2016-12-29

内脏组织器官的病变情况。

1.2.3 细菌检查。无菌条件下,分别从发病中华绒螯蟹和正常中华绒螯蟹的肝胰腺和肌肉中,用营养琼脂培养基进行细菌分离,将分离后的培养皿包装好并带回实验室,置于恒温培养箱中 28 ℃ 培养 48 h,观察有无细菌生长。

1.2.4 DNA 提取。分别取中华绒螯蟹的鳃、肝胰腺和肌肉等组织器官,用玻璃组织匀浆器研磨后置于 -20 ℃ 冰箱中反复冻融 3 次,备用。DNA 提取采用酚-氯仿法,提取的 DNA 于 -20 ℃ 下冻存备用。

1.2.5 PCR 检测。采用设计合成的特异性引物 WSSV-F 和 WSSV-R,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(20 μL)为:2 × Taq PCR MasterMix 10.0 μL,灭菌双蒸水 6.0 μL,DNA 模板 3.0 μL,上下游引物各 0.5 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 循环变性 30 s,56 ℃ 退火复性 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存,反应结束后进行含 EB(溴化乙锭)的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,将阳性目的条带利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,并将其送至华大基因有限公司进行测序,测序结果提交 NCBI 网站进行序列比对。

1.2.6 病理学观察。在解剖并完成细菌分离培养后,分别取正常和发病的中华绒螯蟹的鳃、肝胰腺组织,用波恩氏液固定,梯度酒精脱水,再用二甲苯透明,石蜡包埋,切片切片机切片,厚度 5~6 μm,最后用苏木精-伊红(H-E)染色,于 Nikon E800 显微镜下观察组织病变并拍照。

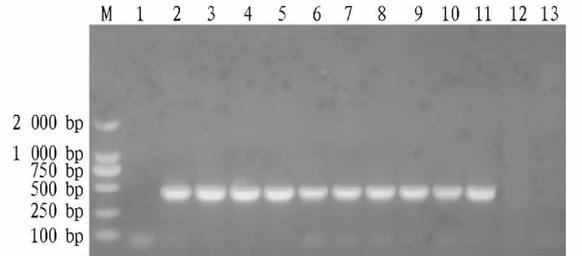
2 结果与分析

2.1 发病情况和流行病学调查 近年来,江苏地区小龙虾、河蟹混养池塘经常发生小龙虾发病大量死亡后中华绒螯蟹也大量死亡的情况,主要发生在每年 6 月,池塘水温升至 28 ℃ 左右,发病率为 60%,发病池塘死亡率达 80%,严重时养殖池塘每天死亡河蟹 200~300 只,直至全部死亡。发病过程中使用抗生素无明显治疗效果,使用水质、底质改良剂调水、改底有一定的效果。发病中华绒螯蟹趴在水草上,活力差,四肢无力,解剖各个内脏组织器官无明显病变。

2.2 细菌的分离结果 从发病池塘选取的 10 只发病中华绒螯蟹的肝胰腺和肌肉接种营养琼脂培养基,28 ℃ 下恒温培养 48 h 后,仅见 2 只中华绒螯蟹的肝胰腺中长出少量细菌;从正常中华绒螯蟹也未分离出细菌。

2.3 病毒的 PCR 扩增结果 利用设计的特异性引物,以中华绒螯蟹的鳃、肝胰腺、肌肉组织抽提的 DNA 为模板,进行 PCR 检测,得到与预期目的条带大小相符的特异性片段,其中 10 只发病中华绒螯蟹的组织病料中均能扩增出 441 bp 大小的目的条带(图 1),而 2 只正常中华绒螯蟹未扩增出目的条带。将扩增的阳性目的条带送至华大基因有限公司进行测序,经序列比对发现该测序结果与 GenBank 数据库中 WSSV 的基因序列同源性为 99.6%。

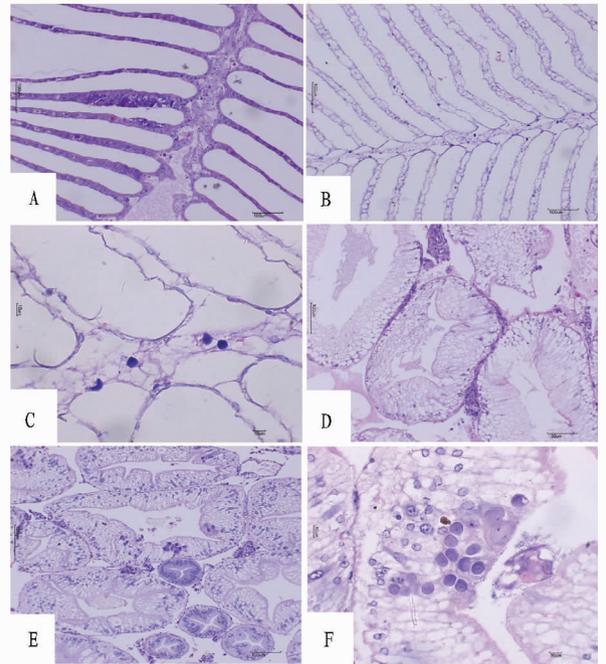
2.4 组织病理变化观察结果 染色后进行观察,感染 WSSV 的中华绒螯蟹鳃内可见大量细胞核肿大细胞,零星细胞坏死(图 2B、C);肝胰腺腺管上皮中大量细胞核肿大细胞,腺管间



注:M. DL 2000 DNA Marker;1. 阴性对照;2~11. 10 只发病中华绒螯蟹的 PCR 产物;12~13. 2 只正常中华绒螯蟹的 PCR 产物
Note:M. DL 2000 DNA Marker;1. negative control;2~11: PCR products of ten diseased *E. sinensis*;12~13: PCR products of two healthy *E. sinensis*

图 1 白斑症病毒的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR detection results of white spot syndrome virus 少量细胞增生、增生细胞有坏死,腺管间轻微水肿(图 2E、F),而正常中华绒螯蟹的鳃(图 2A)和肝胰腺(图 2D)未见明显病变。



注:A. 正常鳃(100×);B. 病鳃(100×);C. 病鳃(400×);D. 正常肝(100×);E. 病肝(100×);F. 病肝(400×)

Note:A. healthy gills (100 ×); B. diseased gills (100 ×); C. diseased gills (400 ×); D. healthy liver (100 ×); E. diseased liver (100 ×); F. diseased liver (400 ×)

图 2 中华绒螯蟹鳃和肝胰腺的病理变化

Fig. 2 The pathological changes of gill and liver in *E. sinensis*

3 讨论

白斑症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是当今对虾养殖业危害的最大的病毒^[7-9],目前已经在我国虾类养殖场中广泛流行。近年来,随着养殖环境的不断恶化,WSSV 的致病力呈增强的趋势,其宿主范围也在不断扩大。

江苏省是河蟹的主要养殖区域,近年来,随着养殖环境的不断恶化,河蟹疾病也呈暴发性发生,每年进入 6 月后水

温升至 28 ℃ 左右,养殖的小龙虾和河蟹就陆续发病,死亡量巨大,使用各种抗生素无明显效果,可能是病毒感染所致。

克氏原螯虾是 WSSV 的易感宿主之一,曾作为 WSSV 的实验动物模型^[10-11],因此在大力发展虾蟹混养的同时,要注意防范 WSSV 带来的风险。WSSV 为一种无包涵体病毒,宿主范围广泛,流行范围大,传染性强,目前尚无有效的治疗药物,还不能有效地控制疫情。

WSSV 主要侵害皮下组织、表皮角质层组织、触角腺、造血组织、鳃、血淋巴器官等组织器官,在对虾严重患病组织中可见明显的细胞核肿大细胞。对发病的中华绒螯蟹鳃和肝胰腺进行组织切片观察,其鳃和肝胰腺均可见大量核肿大细胞,该病变与 WSSV 引起的虾组织病变相一致。

该研究对江苏省吴中地区的虾蟹混养池塘的发病中华绒螯蟹进行了调查研究,通过流行病学、细菌学、病毒学和组织病理学 3 个方面的调查,确定引起中华绒螯蟹发病的病原为 WSSV。该研究结果可为今后中华绒螯蟹养殖疾病的防控提供理论依据。

(上接第 46 页)

菌的发酵温度在 2 d 内能够达 55 ℃,CK 需要 4 d;发酵的结果表现为复合菌微生物数量生长繁殖活跃,菌数和速效 N、P、K 含量均高于 CK,发酵周期也大大缩短,其中复合菌为 15 d,CK 32 d,复合菌发酵颜色黑褐色,无臭味,而 CK 为浅色,有臭味。发酵 15 d 后复合菌和 CK 的 C/N 分别为 15.3、22.3,C/N 愈低,表示微生物对堆肥有机物料中纤维素降解作用越好。从菌数、速效养分、C/N、气味和发酵周期效果来看,加入复合菌对有机物料的腐熟和除臭都有促进作用。

3 结论与讨论

(1) 该研究表明,由 TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ 和 TARE2008LS 菌株组成的复合菌具有较强的纤维素、蛋白质分解能力及除臭能力,综合性能高于任何单一菌株,作为有机物料腐熟剂进行应用后,从菌数、速效养分、C/N、气味和发酵周期效果来看,对有机物料的腐熟和除臭都起到了显著的促进作用。柳玲玲等^[2]对不同腐熟菌剂对鸡粪堆肥效果的影响研究表明,鸡粪堆肥通过接种微生物菌剂,可以明显提高堆肥初期的发酵温度,加快堆肥物料的水分挥发,缩短堆肥发酵周期,促进堆肥快速腐熟。赵晓锋等^[8]分离筛选出细菌 KB217、放线菌 KA46 和真菌 KF21 这 3 个菌株,使鸡粪堆肥的氨气释放量分别降低了 59.40%、55.05% 和 56.38%。3 种菌株之间无拮抗作用,三者混合制剂能使氨气释放量降低 67.33%,且缩短氨气释放时间,这与该研究结果相似。

(2) 微生物菌株是一种容易变异的生物,生长繁殖受环境影响也非常大,因此,微生物腐熟剂或除臭剂的特性易变异,性能不稳定,对有机物料的腐熟和除臭效果也会造成不同程度的影响,今后应该在这方面加大研究力度。

参考文献

- [1] 姜静颖,邢殿楼,王斌,等.池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察[J].大连水产学院学报,1996,11(1):51-53.
- [2] 陆宏达,范丽萍,薛美.中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J].水产学报,1999,23(1):61-68.
- [3] 沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究[J].中国水产科学,2000,7(3):89-92.
- [4] 严维辉,唐建清,刘炜,等.小龙虾、河蟹与鱼高效混养技术[J].水产养殖,2008,29(2):26-27.
- [5] 雷燕,戚瑞荣,唐绍林,等.褐篮子鱼虹彩病毒病的诊断[J].大连海洋大学学报,2014,29(3):236-240.
- [6] 雷燕,戚瑞荣,崔龙波,等.大口黑鲈鱼种弹状病毒病的诊断[J].大连海洋大学学报,2015,30(3):305-308.
- [7] 蔡生力,黄捷,王崇明,等.1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J].水产学报,1995,19(2):112-117.
- [8] INOUE K, MIWA S, OSEKO N, et al. Mass mortalities 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.
- [9] LIGHTNER D V, REDMAN R M, POULOS B T, et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp[J]. Rev Sci Tech, 1997, 16(1): 146-160.
- [10] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 47-51.
- [11] 朱建中, 陆承平. 用动物模型检验消毒剂对对虾白斑综合征病毒的灭活效果[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2): 6-7.

参考文献

- [1] 郜玉环,李彦,孙明,等.山东省可农有机废弃物的利用现状与技术分析[J].山东农业科学,2011(7):98-101.
- [2] 柳玲玲,范成五,苟久兰,等.不同腐熟菌剂对鸡粪堆肥效果的影响[J].耕作与栽培,2015(5):18-19.
- [3] 梁雄.不同秸秆腐熟剂应用效果对比研究[J].安徽农学通报,2011,17(15):127-129.
- [4] 刘军.产高温蛋白酶高温菌的筛选[J].武汉工业学院学报,2004,23(4):22-23.
- [5] 翁海波,敬蔚然,杨丹丽,等.产高温碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J].郑州大学学报(工学版),2010,31(1):70-73.
- [6] 杨冠东,杜少平,杨砾华,等.产碱性蛋白酶的嗜热菌株筛选及发酵条件研究[J].食品与发酵工业,2008,34(10):71-73.
- [7] 刘月,许修宏,徐杰,等.功能菌剂对堆肥中木质纤维素降解的影响[J].中国土壤与肥料,2014(4):81-86.
- [8] 赵晓锋,于文清,田艳洪,等.鸡粪除氨菌株的分离、筛选与菌剂配制[J].黑龙江农业科学,2012(6):85-87.
- [9] 徐大勇,黄为一.接种外源腐熟菌剂对牛粪高温堆肥的影响[J].安徽农业科学,2012,40(13):7759-7762.
- [10] 熊骏生,魏姣姣,陆倩,等.垃圾堆肥过程恶臭污染及其控制技术的研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2015,14(4):405-411.
- [11] 曾苏,李南华,贺琨,等.垃圾微生物除臭剂的筛选、复配及其培养条件的优化[J].微生物学杂志,2015,35(2):72-77.
- [12] 席锋,高颖,吴良政,等.生物除臭剂的制备及除臭效果测定[J].贵州畜牧兽医,2011,35(3):1-3.
- [13] 梁军,罗洪,罗英,等.生物除臭剂对鸡粪除臭处理的研究[J].四川环境,2012,31(S1):13-17.
- [14] 刘胜洪,周玲艳,刘文,等.生物除臭菌对猪粪堆肥腐熟效果的影响[J].南方农业学报,2014,45(3):425-428.
- [15] 张云峰.嗜热蛋白酶生产菌的筛选[J].西南师范大学学报(自然科学版),2006,31(2):157-161.
- [16] 陆文龙,崔广明,陈浩泉,等.微生物除臭剂对污泥和生活垃圾臭气抑制效果的中试研究[J].环境卫生工程,2012,20(2):23-25.
- [17] 赵晓锋,隋文志.微生物除臭剂研究进展[J].现代化农业,2011(6):26-28.
- [18] 刘胜洪,程驹,郭长江,等.微生物除臭菌对改善畜禽养殖场环境的应用初探[J].天津农业科学,2011,17(4):25-27.
- [19] 杨伯杰,张淑娟,林剑发,等.污泥堆肥恶臭气体生物处理技术的研究进展[J].广东化工,2014,41(16):124-125.
- [20] 李南华,胡子全,赵海泉,等.新型生物除臭剂在垃圾渗滤液除臭效果评估[J].广州环境科学,2013,28(1):18-19,30.
- [21] 崔玉雪,郭广寨,黄皇,等.用于填埋场恶臭气体控制的微生物除臭剂筛选及其除臭机制研究[J].环境污染与防治,2014,36(1):60-63.