

对虾病毒检测述评^{*}

罗文新 林元烧

(厦门大学海洋系、亚热带海洋研究所,厦门 361005)

池养对虾疾病的大规模暴发和广泛流行给各对虾养殖国带来巨大的经济损失,而病毒性疾病是引起对虾死亡的主要原因之一。感染病毒的对虾不具明显的临床症状,从外表及行为特征上难以进行诊断,而且,病虾常伴有寄生或共生的原虫或细菌性的二次感染,增加了及时准确诊断疾病的困难。

导致对虾疾病的因素很多。Brock^①认为,对虾弧菌病的直接致病因素是弧菌,但其根本原因是对虾感染了病毒,如BP、HPV、MBV,或其它因素如Vc缺乏等。国内外许多专家认为,对虾的许多疾病乃是由病毒原发性感染引起对虾营养衰竭,体质下降,而后细菌继发性感染的结果。因此,对虾病毒的早期诊断至关重要。本文归纳介绍对虾病毒检测的几种常用方法并略做一些评述,旨在为水产工作者提供参考资料。

1. 光学显微镜组织病理学检测法

最初的组织病理学对虾病毒检测法,是利用各种不同的染色方法将固定切片后的肝胰脏细胞内的病毒包涵体显示出来。所用染料包括Haematoxylin、Eosin、Giemsa、Feulgen等。通过光学显微镜,可观察致病细胞病变的发育过程,及病毒包涵体的形成部位、形状和大小。

Sapn^[5]用Feulgen染色,在草虾的淋巴器官细胞中发现LOV病毒形成的胞质包涵体,淋巴器官的细胞病灶中缺少中央淋巴管。病变细胞的细胞核膨大,染色质围边,细胞空泡化。Bonami^[6]用Eosin染色,在范氏对虾的淋巴器官中发现LOVV病毒形成的胞质包涵体。病灶的多个细胞形成一球状结构,也缺少中央淋巴管、病变细胞的细胞质高度空泡化,细胞核裂解。此外,用Brown and Brenn's Gran染色可检测到草虾的MBV形成的核内无定形包涵体;Giemsa染色应用于对虾幼体中的HPV诊断可提高检测的灵敏度。

Lightner和Redman^[7]曾经报道检查草虾是否感染杆状病毒的简易方法,即直接用肝胰脏涂片,然后用0.05%的孔雀绿染色,若见明亮兰绿色的圆形包涵体即为阳性虾,但

* 收稿时间:1997—07—18

① 原文未见,引自文献[4]

孔雀绿对包涵体并无特异性,使包涵体不容易与其它圆形物如脂滴或分泌颗粒区分。1993年,Vickers等^[8]报道了利用压片涂抹对虾的肝胰脏,分别用H-E染色和吡啶橙染色,都可以在不到1小时内检测出MBV包涵体。经吡啶橙染色的细胞,利用荧光显微镜观察,可见黄绿色的杆状病毒核内包涵体。吡啶橙对各种不同组合的蛋白质有不同程度的结合性,使细胞质为红色,脂滴为黑色,可避免孔雀绿染色的不准确性。

光学显微镜组织病理学检测法的操作简单,处理样品量大,且易于现场操作,现在仍是广为采用的方法。

2. 电子显微镜技术检查法

电镜技术已成为病毒学研究中不可缺少的手段,是病毒快速诊断的常规技术。电子显微镜,配合超薄切片技术,能清楚显示宿主细胞的细胞器、膜性结构和生物大分子的病理改变,以及病毒粒子的结构和复制过程,使对虾病毒的病理基础和病变过程的认识提高到分子水平。负染技术则具有简便易行、反差好、分辨率高的优点。

在电子显微镜下,LOV病毒颗粒为有被膜的杆状粒子,大小为 $163-200\text{nm}\times 36-63\text{nm}$,在细胞质中呈现晶格排列,核内则很少这种现象。LOVV为二十面体,直径为 30nm ,在细胞质内偶尔形成晶格排列,或成束存在。YHV的大小为 $150-170\times 40-50\text{nm}$,被膜的外面围绕着一层 11nm 长的球形突起。1995年,Wongteerasupara等^[9]于患病的草虾,用电子显微镜检查,发现SEMBV病毒位于细胞核内,无囊膜。有衣壳的完整病毒粒子呈椭圆形,有突出的多绒毛状附属物,大小约 $276\times 121\text{nm}$ 。Oweens^[10]在斑节对虾的鳃组织中观察到PHRV,病毒存在于细胞核和细胞质中,杆状,大小为 $588\times 119\text{nm}$,被较小的衣壳包装而变成V或U形。

上述组织切片及涂片光学显微镜检测法,是根据有无包涵体确定对虾是否染有病毒,但在包涵体形成之前,却看不到任何病毒。因此根据包涵体检查病毒的方法,对潜伏期及早期的病毒感染是无能为力的,而且,BMNV、YBV等在对虾体内不形成包涵体,给该病诊断带来困难。电子显微镜检查虽可看到病毒粒子,但费时较长,不适宜于野外现场的对虾病毒快速诊断。随着细胞培养富集病毒研究的逐步发展和各种病毒纯化技术的应用而取得的成就,对虾病毒的检测已向免疫生物学和分子生物学方面发展,使检测方法更为准确快速。

3. 免疫生物学方法

免疫生物学方法是利用特异性抗原抗体反应来研究组织细胞特定抗原的定位和定量技术。为了显示和观察这种抗原抗体反应,需要预先将某种标记物结合到抗体上,借标记物的荧光或酶的可有色反应、放射性或高电子密度,在光镜或电镜下进行定性、定位或定量研究。

早在1986年,Lewis^[12]就报道了间接夹心ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法检测对虾杆状病毒,该方法可以检测到至少 10ng 的病毒蛋白。1988年,台湾的陈秀男等^[1]用免疫荧光染色法来检测草虾肝胰脏和排泄物所存在的MBV包涵体,病毒包涵体在荧光显微镜下显现绿荧光或橙红色。1995年,黄捷等^[2]则用单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下造血组织坏死病毒的病原体。到了1996年,Lu等^[13]发展了NC-EIA

(Nitrocellulose-enzyme immunoassay)法来检测 YHV。抗体与 HRP 偶联,底物为 TMB 时能检测到 0.4ng 的病毒蛋白。此方法还能检测到感染组织中 100TCID₅₀的病毒。

免疫荧光法需要特殊设备,不易作定量分析,而且对结果判定有一定的主观性。相对地说 ELISA、NC-EIA 检测的敏感性高,可达 ng 水平,且具有特异性强、简单、快速及易观察等特点,可作定性定量分析,适合于对虾病毒的早期诊断。

4. TCID₅₀病毒滴定法

1995 年, Lu 等^[11]应用 TCID₅₀(50% Tissue Culture Infectious Dose Assay),来测定 YBV 的感染滴度,被感染组织为用 96 孔组织培养板培养的虾淋巴器官细胞。测定 YBV 感染的虾的 15% 鳃匀浆液,其病毒滴度为 5.10(5.75)TCID₅₀/ml。这是首次报道的测定虾病毒浓度的检测手段。同年,他用同一方法检测了范氏对虾和草虾的 9 种不同的组织和器官,证明全都有 YHV 感染,且淋巴器官、鳃和头部软组织比其它组织的滴度高 10 到 800 倍,因而推测它们是 YHV 感染的最初靶组织和器官。

5. 分子生物学方法

核酸分子杂交技术以其特异和敏感为主要特点,应用于组织细胞中的病毒基因检测和定量。在杂交中所使用的克隆探针一般较寡核苷酸探针的特异性强,复杂度也高,可获得较强的杂交信号。细胞内原位杂交是核酸杂交技术之一,用来直接定位某些特定细胞或染色体上的病毒基因。核酸杂交技术能检测到几个 pg 的病毒核酸,比 ELISA 敏感上百倍。

1994 年, Bruce 等^[14]发展基因探针进行原位杂交,探针为 Bp-DNA 片段,用 digoxigenin 非放射性标记,检测对虾靶器官中的对虾杆状病毒(BP)。Mari 等^[15]将 HPV 的 DNA 基因组部分克隆,经内切酶消化得到一个 2.3Kbp 的片段,构建 2 个不同的 DIG-11dUTP 标记的探针,进行肝胰石蜡切片原位杂交,能与感染组织反应,探针在细胞核中产生强烈标记。严重感染的肝胰,细胞碎片与探针紧密结合,还可以在上皮细胞表面形成微小突起。Mari 等^[16]还抽提 IHNV 的核酸而得到少量 dsDNA,克隆到 pUC18,经过限制性内切酶分析,其中一个克隆, BQ31,用来构建不同大小的 DIG-11 dUTP 标记的探针。在原位杂交中,探针使靶细胞形成显著标记,特别是核内 Cowdry A 型包涵体。Arimoto 等^[17]将 BMNV 基因组 DNA 的部分 BamHI 酶切片段克隆,用 P-32-CTP 标记制成探针,从而检测病虾中的 BMNV。

核酸分子杂交作为常规诊断方法受其技术复杂的限制,且其敏感度仍未达到实际标本中检测少量病毒的要求。PCR 技术的引入革新了对虾病毒的检测,其标本处理十分简单,检测 DNA 靶分子的灵敏度是其他方法难以比拟的,可以检测到单个病毒粒子。

国内外有不少学者报道了用 PCR 方法检测对虾中的 MBV、BP 病毒。1993 年,台湾大学的 Chang 等^[18]利用 PCR 技术对草虾杆状病毒(MBV)的 DNA 进行纯化和扩增,这是首次成功地利用 PCR 技术进行对虾病毒的 DNA 扩增。杨丰等^[3]则用 PCR 方法进行所分离的草虾杆状病毒(MBV)包涵体的鉴定,结果很理想。1996 年, Wang 等^[19]用 PCR 方法检测对虾中的 BP 病毒,并获得了预计的扩增产物。因为对虾组织中存在抑制 DNA 聚合酶的不明复合物的存在,准备 PCR 的样品非常关键。

总之,实验表明,采用分子生物学方法虽然仪器要求高、操作复杂,但检测灵敏、特异性高,在对虾病毒的早期诊断上已得到愈来愈广泛的应用。核酸扩增后再进行探针杂交实验,将是直接检测对虾病毒最敏感的方法。

参考文献

1. 陈秀男,张朴性,1989. 草虾杆状病毒(MBV)之诊断方法及其应用。养虾全集,养鱼世界杂志社
2. 黄捷等,1995. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下造血组织坏死病的病原及传播途径。海洋水产研究 16(1):40—49
3. 杨丰等,1995. 分离草虾病毒包涵体的一种新方法。台湾海峡 14(1):80—83
4. Main, K. J., 1993. A Review of the Disease of Cultured Penaeid Shrimp. in: Main, K. F. et al (eds), Proceedings on Int'l symp. on Shrimp Culture in Asia-Pacific Reg., The China Society of Fisheries (Beijing). pp. 38—46
5. Spann K. M. et al., 1995. Lymphoid organ Virus of *Penaeus monodon* from Australia. Dis. Aquat. Org., 23(2):127-134
6. Bonami J. R. et al., 1992. Partial characterization of a Togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. Dis, Aquat. Org., 14(2):145-152
7. Lightner D. V. et al., 1983. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. Invertebr. Pathol., 42:62-70
8. Vickers J. E. et al., 1993. An impression smear method for rapid for rapid detection of *penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in Australian prawns, Fish Dis., 16:507-511
9. Wongteerasupaya C. et al., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes monodon. Dis. Aquat. Arg., 21(1):69-77
10. Oweens L., 1993. Description of the 1st Haemocytic Rod-Shaped Virus from a Penaeid Prawn. Dis. Aquat. Qrg., 16(3):217-221
11. Lu Y. et al., 1995. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Dis. Aquadt. Org., 23(1):67-70
12. Lewis D. H., 1986. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. J. Fish Dis., 9(6):519-522
13. Lu Y. et al., 1996. Development of a nitrocellulose-enzyme immunoassay for the detection of yellow virus from penaeid shrimp. J. Fish Dis., 19(1):9-13
14. Bruce L. D. et al., 1994. Application of gene probes to determine target organs of a penaeid shrimp baculovirus using in situ hybridization. Aquaculture, 120:45-51
15. Mari J. et al., 1995. Partial cloning of the genoms of an unusual shrimp parvovirus (HPV); Use of gene probes in disease diagnosis. Dis. Aquat. Org., 22(2):129-134
16. Mari J. et al., 1993. Partial Cloning of the Genome of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus, an Unusual Parvovirus Pathogenic for Penaeid Shrimps-Diagnosis of the Disease Using a Specific Probe. J. Gen. Virol., 74(Part 12):2637-2643
17. Arimoto M. et al., 1995. Characterization and partial cloning of the genomic DNA of a baculovirus from *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 132(3-4):213-220
18. Chang P. S. et al., 1993. Purification and amplification of DNA from *penaeus monodon*-type

- baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.* , 62:116-120
19. Wang S. Y. et al. , 1996. Development of a PCR procedure for the detection of Baculovirus penaeid in shrimp. *Dis. Aquat. Org.* , 25(1-2):123-131