

# 一种球状病毒对近海几种贝类的感染

李霞, 王斌, 刘淑范, 许建和

(大连水产学院 农业部水产增养殖生态学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 报道了一种球状病毒对近海几种贝类的自然感染情况, 并分别采用投喂、浸泡、划伤等方法人工感染绣凹螺、滨螺和幼鲍。该病毒直径约 90~ 140 nm, 存在于血细胞或结缔组织细胞中, 在近海几种贝类体内有广泛分布, 但其致病性不同。同时还研究了病毒对温度的敏感性, 结果表明 20℃ 以上病毒的繁殖力降低。

**关键词:** 球状病毒; 贝类; 感染

**中图分类号:** S944.4

**文献标识码:** A

1995 年作者首次从皱纹盘鲍 (*Haliotis discus Hannai*) 体内观察到一种直径约 100 nm 的球状病毒粒子, 并对其致病性进行了研究<sup>[1, 2]</sup>。以后在自然发病贻贝体内又发现形态相似的病毒粒子。为研究该病毒对其他贝类的感染性及可能造成的危害, 作者于 1996~ 1998 年对滨螺 (*Turbo* sp.)、绣凹螺 (*Chlorostoma rusticum*)、贻贝 (*Mytilus edulis*)、皱纹盘鲍等在近海自然生长和养殖的贝类进行人工感染实验和电镜检测, 以期 为贝类病害研究和防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人工感染用滨螺和绣凹螺采自龙王塘海区, 贻贝取自旅顺龙王塘海区和大连湾, 幼鲍由大连碧龙海珍品有限公司供给。所有实验用贝均暂养于实验水槽内, 冲气培育, 每天换水 2 次。

### 1.2 方法

1.2.1 人工感染方法 采用投喂、浸泡和划伤浸泡三种方法。

1) 投喂方法 将被球状病毒感染的皱纹盘鲍去壳, 软体部匀浆, 以 1000 r/min 离心 10 min, 取上清液制成悬液拌入配合饵料中, 一般 1 mL/g 饵料, 每天投喂 1 次, 对照组喂以配合饵料。

收稿日期: 1999-06-28

基金项目: 大连市科委青年基金资助项目

作者简介: 李霞 (1961-), 女, 副教授。

2) 浸泡方法 将实验贝浸泡在用海水配置的病毒悬液 (组织液与海水的体积比为 1: 400) 中 3 h/d, 连续浸泡 7 d 后换入正常海水中培育。

3) 划伤浸泡方法 用消毒针头划伤绣凹螺足, 然后放入含病毒上清液的海水中浸泡, 时间为 3 h。

1.2.2 电镜样品制作 将实验用贝停喂带病毒饲料 2 d, 然后采用以下两种方法检测带毒情况:

1) 负染色方法 将贝软体部匀浆, 加入 pH 7.4 磷酸缓冲液, 以 8000~ 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液滴在铜网上, 用磷钨酸染色。

2) 超薄切片观察 主要器官用体积分数为 3% 的戊二醛和体积分数为 1% 锇酸双固定, Epon812 包埋, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM -1200 型透射电镜观察及拍照。

## 2 结果

### 2.1 病毒形态以及侵染细胞

电镜下观察了自然发病贻贝、幼鲍和人工感染发病的鲍苗、绣凹螺的足、鳃、肝胰腺和外套膜, 发现两种情况: 贻贝和鲍苗上述器官的组织和细胞都受到程度不同的损伤, 且鲍苗中所见到的病毒粒子形态同贻贝无异。该病毒粒子为球状, 直径 90~ 140 nm, 核衣壳直径 60~ 120 nm, 具光滑的双层囊膜, 厚约 8~ 10 nm (图 1- A)。病毒粒子外有似“封入体”样的双层膜状结构包被, 膜中常可见未装配好的病毒粒子和空囊膜 (图 1- B)。该病毒粒子存在于血细胞质中 (图 1- C), 有时可见颗粒细胞<sup>[3]</sup>的颗粒中夹有单个的病毒粒子, 但绣凹螺上述器官的组织结构完好, 细胞中尚未发现病毒粒子。

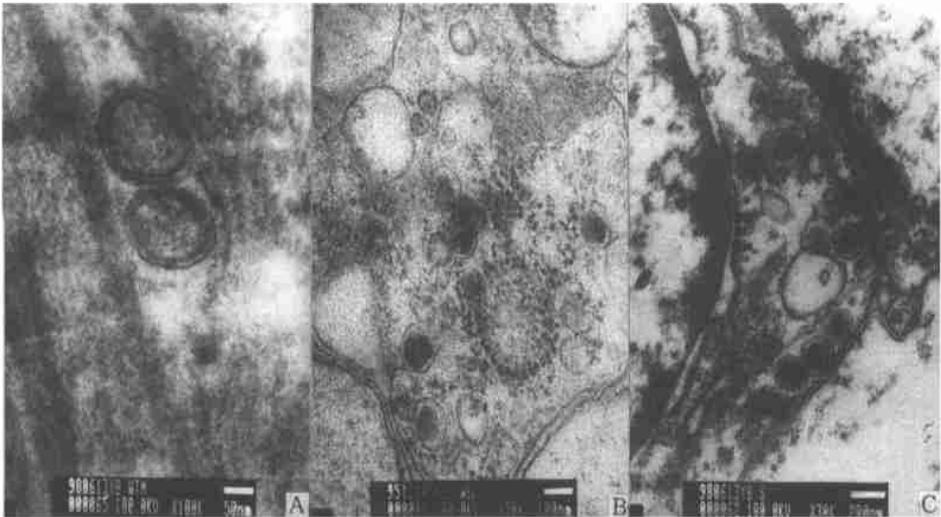


图 1 部分器官超微结构切片

A 贻贝外套膜超薄切片示病毒粒子,  $\times 100\ 000$ ; B 鲍肝、胰腺超薄切片示尚未装配好的病毒粒子,  $\times 50\ 000$ ; C 贻贝鳃超薄切片示血细胞质中存在的许多病毒粒子,  $\times 30\ 000$ 。

## 2.2 人工感染实验结果

实验前对滨螺、绣凹螺、鲍苗用负染色方法检查,全部不带病毒,实验后随即检查带毒情况和统计存活个数,结果见表 1、表 2、表 3。

表 1 球状病毒对滨螺的感染

组别	实验数/个	感染时间/d	感染方法	感染情况	死亡数/个	死亡率/%
对照 1	30	40	投喂	—	0	0
对照 2	30	40	投喂	—	0	0
实验 1	30	40	投喂	+	0	0
实验 2	30	40	投喂	+	0	0

表 2 球状病毒对绣凹螺的感染

组别	实验数/个	感染时间/d	感染方法	感染情况	死亡数/个	死亡率/%
对照 1	25	40	投喂	—	0	0
对照 2	25	40	浸泡	—	0	0
对照 3	25	40	划伤浸泡	—	16	64
实验 1	25	40	投喂	+	0	0
实验 2	25	40	浸泡	+	0	0
实验 3	25	13	划伤浸泡	+	25	100

表 3 球状病毒对鲍苗的感染 (5℃)

组别	实验数/个	感染时间/d	感染方法	感染情况	死亡数/个	死亡率/%
对照 1	15	40	投喂	—	0	0
对照 2	15	40	投喂	—	0	0
实验 1	15	40	投喂	+	6	40
实验 2	15	40	投喂	+	4	26

结果表明,采用投喂和浸泡的方法感染滨螺和绣凹螺,虽均能感染病毒,但没有引起死亡。划伤感染造成绣凹螺全部死亡,但发病症状为足肿胀,外翻,出现 1 个至多个脓疱,镜检脓疱液可见大量细菌,足收缩力减弱,其表现实为脓疱病<sup>[4]</sup>。对鲍苗仅采用投喂方法就可引起程度不同的死亡,病症表现为摄食量下降,对光反应不敏感,壳变薄,壳孔相互连穿,壳外缘上翻,生长速度明显减慢,足消瘦,色黄,失去韧性。

## 2.3 温度对病毒感染力的影响

在实验室环境箱中分设 5、12、20℃ 3 个温度梯度,采用投喂感染的方法对鲍苗和绣凹螺进行感染实验,结果见表 4。

表 4 不同温度下病毒对鲍苗的感染情况

组别	温度/℃	实验数/个	感染时间/d	感染情况	死亡数/个	死亡率/%
对照 1	5	20	40	—	1	5
实验 1	5	20	40	+++	9	45
对照 2	12	20	40	—	0	0
实验 2	12	20	40	+	3	15
对照 3	20	20	40	—	0	0
实验 3	20	20	40	+	0	0

在感染实验中，对照 1 组曾出现过 1 个死亡，但镜检不带病毒。其他实验组都出现程度不同的发病反应，但实验 1 组表现最为严重，实验后期几乎不摄饵，死亡率达 45%。在同样温度条件下对绣凹螺进行了投喂感染实验，并在实验结束时对其进行了随机镜检，结果是所有的实验组均可检出病毒粒子，但实验 1 组（5℃）病毒量最高。整个实验无一例死亡。

## 2.4 近海常见贝类病毒检测

采用负染色方法，检测大连地区几种常见贝类带病毒情况，结果见表 5。

表 5 近海几种贝类病毒检测结果

名称	采集地	采集日期	带病毒情况
紫贻贝	大连龙王塘	1998-03	+++
紫贻贝	大连湾	1998-02	+++
杂色蛤	大连小平岛	1998-03	+
鲍苗	大连龙王塘	1998-11	+++
成鲍	大连龙王塘	1998-11	++
大连湾牡蛎	大连湾	1998-04	+
绣凹螺	大连龙王塘	1998-03	—
滨螺	大连龙王塘	1998-03	—

注：+ 表示有病毒，— 表示没有检出病毒。

## 3 讨论

### 3.1 球状病毒的感染特性

从本实验可看出该球状病毒对贝类具有广泛的感染性，但目前的研究只能说明发生在皱纹盘鲍幼苗阶段的“裂壳病”是由其引发的<sup>[1]</sup>。近几年大连地区养殖贻贝连续死亡，由于尚未找到不带病毒的贻贝，使人工感染实验不能进行，导致病原不能确定，作者多次从患病贻贝体内检出球状病毒粒子，故推断该病毒作为病原之一，具有极大的可

能性。作者曾借鉴王铁辉等<sup>[5]</sup>的方法,希望能找到一种贝作为该病毒的研究材料,从表 5 可以看出滨螺和绣凹螺不带病毒,且具有易捕获易培养的优点,是理想的实验材料,但本实验结果表明,这两种螺虽经负染检测可被球状病毒感染,但超薄切片中尚未发现有病毒粒子存在于细胞中,即使划伤感染后全部死亡,仍为细菌性感染,其症状同“脓疱病”。所以选择这两种螺作为该病毒的实验材料不适合。

### 3.2 温度对病毒感染力的影响

对贻贝死亡较严重的大连湾海区进行流行病学调查,结果表明 3 月份(5~6℃)贻贝含病毒量较大,5 月份以后,水温升至 20℃,贻贝体内病毒量明显减少。对鲍苗的追踪调查也可看出同样的发病规律。中津川俊雄<sup>[6]</sup>曾报道日本鲍患“肌肉萎缩症”,其发病规律和症状同皱纹盘鲍,当水温超过 23℃时,病情好转,说明随温度升高,病毒的感染力逐渐减弱。在以温度为指标设计的实验中,可看出 5℃时存在程度不同的死亡,而 20℃基本不死,所以该病毒为低温繁殖种类,建议生产上通过升温等措施抑制该病毒的大量繁殖。

### 3.3 贝类病毒研究以及该病毒分类地位的探讨

关于贝类病毒病的研究,所见报道不多,国内仅见姜静颖<sup>[7]</sup>在扇贝体内发现与疱疹病毒粒子相似;邵健忠等<sup>[8]</sup>报道三角帆蚌瘟病的病原及组织病理学研究;作者<sup>[1]</sup>报道了引起皱纹盘鲍幼鲍大量死亡的一种球状病毒。本研究中,作者通过对大连地区近海的几种贝类电镜检测和人工感染实验,进一步研究了该球状病毒对其他贝类的感染性。

目前已报道的贝类球状病毒有疱疹病毒和呼肠弧病毒<sup>[7,9,10]</sup>,前者存在于胞核中,并有包涵体,大小约 200 nm,而后者则无囊膜,大小约 60~80 nm。本研究报道的球状病毒形态及发生不同于上述已报道的病毒,该病毒存在于胞质中,大小 100~140 nm,具双层囊膜,无包涵体,这些特征同反录病毒科中肿瘤亚科的牛白血病病毒和鼠白血病毒形态相似<sup>[11]</sup>,尤其类似后者,而且该病毒以血细胞为靶细胞,故不能排除属于反录病毒科的可能性,但由于贝类与脊椎动物尤其是哺乳类进化地位相差甚远,要确定为何种病毒为时尚早,今后在病毒提取、回接、纯化核酸类型、病毒多肽等方面尚需进行大量的研究。

## 参考文献:

- [1] 李霞,王斌,刘淑范,等.皱纹盘鲍裂壳病的病原及组织病理学研究[J].水产学报,1998,22(1):462-467.
- [2] 王斌,李霞,高船舟.皱纹盘鲍一种球状病毒的感染及其发生[J].中国病毒学,1997,12(4):360-363.
- [3] 翟玉梅,丁秀云,李光友.软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J].海洋与湖沼,1998,29(5):558-562.
- [4] 刘金屏,聂丽苹,李太武,等.皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)脓疱病的研究[J].中国水产科学,1995,2(2):78-84.
- [5] 王铁辉.稀有驹鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究[J].水生生物学报,1994,18(2):144-149.
- [6] 中津川俊雄.养殖稚鲍肌肉萎缩症的传染特性[J].鱼病研究,1990,25(4):207-211.
- [7] 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.
- [8] 邵健忠,项黎新,李亚南.三角帆蚌瘟病的组织病理研究[J].水产学报,1993,17(1):1-7.

- [9] FARLEY C A, BANFIELD W G. Oyster hepes- types virus[J]. Science, 1972, 178: 759- 760.
- [10] MEYERST R. A reo- like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*)[J]. J Gen Virol, 1979, 43: 203- 212.
- [11] 殷震主编. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985. 575- 602.

## The infection to a few kinds of shellfish inshore by a kind of virus

LI Xia, WANG Bin, LIU Shu-fan, XU Jian-he

(Dept. of Key Laboratory of Maricultural Ecology Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries Univ., Dalian 116023, China)

**Abstract:** A kind of spherical virus with the size of 90- 140 nm was detected in some coastal shellfish by negative staining method. The virus was mainly found in the blood cells and connective cells, which could be observed in ultra-thin section of mussel and juvenile abalone. The artificial infections of juvenile abalone, *Chlorostoma rusticum*, *Turbo* sp. were conducted by feeding, immersing and scratching. The pathogen had different features. The relationship between virus and temperature was examined and breeding rate of virus decreased at temperature of over 20°C.

**Key words:** spherical virus; shellfish; infection

### 大连水产学院三项科研成果通过鉴定

新年伊始, 大连水产学院又有 3 项科研成果分别于 2000 年 3 月 25 日、28 日和 30 日通过了大连市科委组织的鉴定。

“大连地质景观在城市发展中作用研究”是将大连地质景观作为一种自然资源, 研究其在城市发展中作用的应用课题。以土木系彭丽君副教授为主的研究人员, 经过多年有的放矢的调查, 先后在大连市区、金州区、普兰店、瓦房店、华铜、皮口、营口、鲅鱼圈等地野外录像、踏查, 将拍摄的素材进行编辑, 融科学性、艺术性、趣味性、实用性与一体。该成果具有高层次水平和实际应用特点, 同时又注意到学科进展和新技术方面的应用。有关专家一致认为, 该成果整体质量优秀, 在滨海城市地质景观研究方面处于国内领先水平, 同时对大连的规划、开发和建设, 特别对城市旅游资源的开发有着重要的社会效益和巨大的经济效益。

“鲈鱼人工育苗及当年养成研究”也是大连市科委下达给大连水产学院的科研课题。鲈鱼由于肉味鲜美、生长快、适应能力强, 因而国内外市场需求量大。以姜志强副教授为主的课题组自 1997 年开始, 在秋、冬季节采用室内人工育苗的方法, 在中国北方地区首次培育出 10 cm 以上的大规格鲈鱼苗种, 为鲈鱼在北方地区养成创造了条件。该课题组在育苗中采用不同方法提高鲈鱼苗种成活率, 加速了苗种的快速、健康生长, 并研究了环境因子对鲈鱼苗种生长的影响, 找出了鲈鱼幼鱼生长的最佳盐度、温度、光照强度等定量数据, 为更好地开展鲈鱼人工育苗提供了科学依据。该成果在 (下转 102 页)