

浙江省平湖市南美白对虾虹彩病毒病 初步调查及防控措施

王甘翔 彭頔 宋之琦 杨庆 都月娥 沈佳健

(浙江省平湖市渔业技术推广与海洋资源服务中心, 浙江平湖 314200)

摘要: 为有效预防南美白对虾虹彩病毒病的发生, 对浙江省平湖市林埭镇的患病南美白对虾进行了临床症状观察、病理解剖、寄生虫检查和细菌分离。病虾症状为活力较差, 肝胰腺明显萎缩, 肌肉发白, 肠道发红、断裂, 空肠空胃, 鳃、步足及游泳足发黑。病虾的鳃、肝胰腺、肌肉中未发现寄生虫, 肝胰腺、鳃、血淋巴中未分离出致病弧菌。经套式聚合酶链式反应(PCR)检测, 确定引起此次南美白对虾集中连片死亡的原因是感染了虾血细胞虹彩病毒(SHIV)。同时检测发现, 附近河道中的浮游生物、河虾、鲫、螺蛳以及河蟹等也存在不同程度的携带或感染虹彩病毒情况。根据相关生物感染和携带病毒的情况, 提出了对虾虹彩病毒防控措施。

关键词: 南美白对虾; 虹彩病毒; 调查; 防控

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)是浙江省平湖市水产养殖的主导品种, 2017年养殖面积为1.1万亩(15亩=1hm², 下同), 占全市水产养殖总面积的57.7%。随着南美白对虾养殖业的不断发展, 病害问题日益突出, 尤其是对于病毒性疾病, 目前尚缺乏特效药物和有效控制方法, 因而常常使南美白对虾养殖业造成严重危害。

近年来, 虹彩病毒(iridovirus)陆续在鱼类^[1]、红螯螯虾^[2-4]等体内被发现。2017年, 中国水产科学研究院黄海水产研究所在南美白对虾中分离出一种新病毒——虾血细胞虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)^[5], 并提供了SHIV的套式聚合酶链式反应(PCR)检测方法。

2017年4月—6月, 平湖市南美白对虾养殖集中区域发生南美白对虾连片死亡情况。经过对病虾进行临床症状观察、病理解剖分析, 结合流行病学调查、SHIV套式PCR鉴定, 诊断其病原为虾血细胞虹彩病毒。根据发病池中其它水生动物的

病毒检出情况及养殖特点, 笔者提出了初步防控措施。本次调查和试验结果可为今后防止SHIV病大规模暴发, 保障南美白对虾养殖持续健康发展提供借鉴。

1 基本情况及症状

2017年4月, 平湖市林埭镇华丰村一带, 养殖的南美白对虾陆续出现摄食慢、活力差、游动迟缓、偷死等异常现象。南美白对虾发病池中的克氏原螯虾(小龙虾)也出现陆续死亡现象。

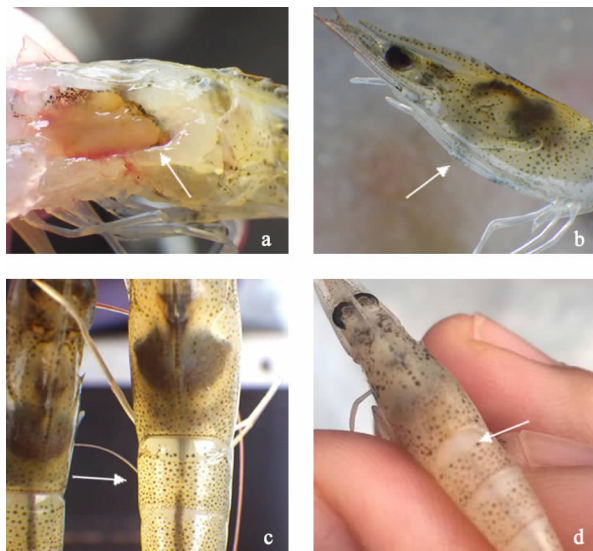
在全市南美白对虾养殖范围内开展全面调查后, 确定发病区域主要集中在林埭镇华丰村, 受影响的南美白对虾养殖面积达600多亩。病虾规格主要集中在体长5~6cm。出现病虾的养殖场, 苗种来源繁杂、品牌不一。随着时间推移, 南美白对虾的死亡面积扩大至1000亩左右, 死亡现象至黄梅季结束(7月5日)、高温天气开始后才停止。

收稿日期: 2018-02-02

作者简介: 王甘翔(1985—), 男, 工程师, 主要从事渔业生产管理及技术推广工作。

2 病虾解剖检查情况

病虾主要表现为活力较差。经解剖发现,其肝胰腺明显萎缩,肌肉发白,肠道发红、断裂,虾体出现明显的空肠空胃现象。多数病虾的鳃、步足及游泳足发黑(见图1)。



a. 肝胰腺萎缩; b. 鳃、步足等位置发黑;
c. 肠道断裂; d. 肌肉发白, 肠道发红

图1 病虾症状

3 寄生虫检查及细菌培养结果

经过制片后用显微镜观察,病虾的肝胰腺、鳃、肌肉中未发现寄生虫。无菌情况下取濒死病虾的肝胰腺、肌肉、血淋巴等置于营养琼脂和 TCBS 培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium)划线分离细菌,于 28℃ 恒温培养 48 h,未见细菌长出。

4 病虾 SHIV 的 PCR 检测

4.1 方法

4.1.1 引物设计

采用中国水产科学研究院黄海水产研究所的套式 PCR 检测方法检测病虾 SHIV。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

第 1 轮 PCR 引物: F: 5'-GGGCGGAGATGCT-GTTAGAT 3'; R: 5'-TCGTTTCGGTACGAAGATGTA 3'。

第 2 轮 PCR 引物: NF: 5'-CGGGAACGAT-

TCGTATTGGG 3'; NR: 5'-TTGCTTGATCGGCATC-CTTGA 3'。

4.1.2 DNA 提取

取病虾鳃、肌肉、足 3 个部位的组织样,剪碎混合,加入组织裂解液后,水浴使其充分破碎裂解。利用 CTAB 法(cetyltrimethyl ammonium bromide)提取基因组 DNA。提取的 DNA 模板在 -20℃ 下保存。

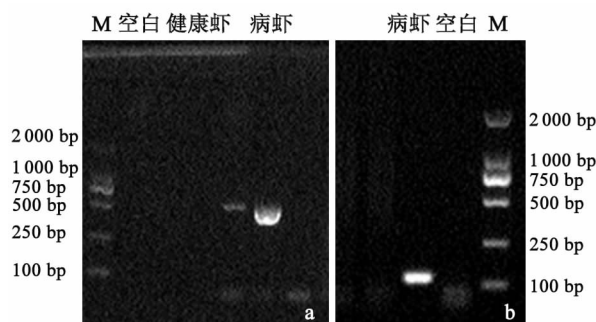
4.1.3 PCR 检测

通过合成的特异性引物 F 和 R 进行第 1 轮 PCR,反应体系为 25 L: 2XPCR Master Mix 10 L, 引物各 0.4 L, 模板小于 500 ng, ddH₂O 定量到 25 L。反应程序: 于 95℃ 预变性 3 min, 延伸 2 min, 在 4℃ 下保存。第 1 轮 PCR 预计目标条带为 457 bp。

第 1 轮的产物稀释 100 倍后作为第 2 轮的模板。使用第 2 轮 PCR 的特异性引物 NF 和 NR 再次进行 PCR。反应体系和反应程序与第 1 轮 PCR 一致。反应结束后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。预测目标条带为 129 bp, 将阳性条带回回收送检, 确定结果。

4.2 扩增结果及分析

经过 2 轮 PCR 后,PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中获得 1 条明亮的条带(见图 2), 条带大小与预期的大小一致, 将阳性条带送检后获得序列。通过与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性分析, 确定其为虹彩病毒。空白对照样以及正常南美白对虾样品未出现条带。



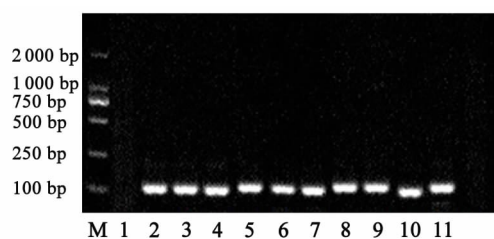
a. 第 1 轮 PCR 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果(第 1 泳道 M 为 Marker, 第 2 泳道为空白对照, 第 3 泳道为健康虾样品, 第 4 泳道为同塘游动迟缓的虾样获得的非特异性扩增条带, 第 5 泳道为病虾样品);

b. 第 2 轮 PCR 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果(第 1 泳道为病虾样品, 第 2 泳道为空白对照, 第 3 泳道 M 为 Marker)

图2 PCR 扩增结果

5 养殖池塘及周边水域的生物检测

鉴于本次发病情况的特殊性,除对病虾进行采样检测外,同时在发病集中区域的养殖池塘及其附近河道(养殖水源)的水体中开展生物虹彩病毒检测。利用上述 4.1 节中的方法进行检测,结果表明,养殖塘中发病的南美白对虾体内病毒含量较高,经 1 轮套式 PCR 即可直接检测到,未发病的虾经 2 轮检测显示病毒携带阳性。附近河道中的浮游生物、河虾、鲫、螺蛳以及河蟹等都不同程度携带或感染虹彩病毒(见图 3)。经检测,所有样品均呈虹彩病毒阳性。



1. 空白对照; 2. 南美白对虾苗种 1; 3. 南美白对虾苗种 2;
4. 南美白对虾苗种 3; 5. 养殖塘中的南美白对虾病虾;
6. 南美白对虾苗种 4; 7. 浮游生物; 8. 周边河道的河虾;
9. 周边河道的鲫鱼; 10. 周边河道的螺蛳; 11. 周边河道的河蟹

图 3 养殖池塘发病南美白对虾及附近河道生物虹彩病毒检测结果

6 防控措施

目前,对于对虾虹彩病毒病的治疗尚无特效药物,仍以预防为主,及早发现、确诊且采取有效措施防止病害扩散是生产中减小损失的有效途径。

6.1 切断病毒传播途径

选择健康虾苗。购买虾苗时索要苗种的检疫合格证,选择未携带虹彩病毒的健康虾苗。在缺乏有效检测手段的情况下,尽量选择大品牌、直营场的虾苗。

落实安全隔离措施。养殖用水用孔径小于 150 μm 的筛绢网过滤,并使用漂白粉、生石灰进行彻底消毒。养殖过程中,发病池塘(包括疑似发病池塘)与正常池塘使用的工具、操作人员必须严格隔离、消毒,防止交叉感染。

无害化处理病虾。及时对病虾、死虾进行无害化掩埋或高温焚烧处理。

根据检测结果,河道中的鱼类、河蟹等都可成

为虹彩病毒的携带者。为防止病害扩散,对发病池塘的池水须用强效消毒剂消毒,严禁直接将养殖池水排入河道。同时,鉴于 SHIV 最早在红螯螯虾中被发现,对克氏原螯虾有较强的致病力,在用淡水养殖南美白对虾的地区,其周边水域通常有丰富的克氏原螯虾野生群体,应加强对周边水域克氏原螯虾携带病毒的检测。特别是有南美白对虾 SHIV 发病史的养殖场周边,需重点检测和防范。

6.2 生物防控

在南美白对虾养殖过程中,利用不同生物食性和生态位不同的特点,混养一定数量的甲鱼、草鱼、胡子鲶等,通过这些混养的水产动物摄食病弱的对虾,可有效切断病毒传播途径。同时,加强养殖日常管理,科学投喂,每天定时投喂 1~2 次经乳酸杆菌或芽孢杆菌发酵的饲料,以增强对虾的抗病力。一旦发现病虾,需停止投喂 3 d 以上。注重水质管理,定期消毒水体、施用底质、水质改良剂,保持水体稳定,减少对虾的应激反应。

7 结语

通过对病虾的病理解剖、寄生虫检查、细菌分离、套式 PCR 检测等手段,确定此次引起平湖市南美白对虾集中连片死亡的原因是感染了虾血细胞虹彩病毒(SHIV)。本次调查和试验结果为南美白对虾养殖病害防控提供了依据。今后将重点研究对虾 SHIV 的来源、感染途径以及感染机制等,以期更有效地预防南美白对虾虹彩病毒病的发生,进一步降低养殖风险。

参考文献

- [1] 文琳,雷燕,戚瑞荣,等. 尖吻鲈 *Lates calcarifer* 虹彩病毒病的诊断[J]. 水产学杂志,2015,28(4):28-32.
- [2] XU L, WANG T, LI F, et al. Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 120(1):17.
- [3] 王甜甜. 红螯螯虾虹彩病毒(CQIV)与白斑综合症病毒(WSSV)感染的组织细胞特异性以及感染途径的研究[D]. 厦门:国家海洋局第三海洋研究所,2016.
- [4] 潘长坤,袁会芳,王甜甜,等. 红螯螯虾虹彩病毒在两种螃蟹内的研究[J]. 应用海洋学报,2017,36(1):82-86.
- [5] 邱亮,陈蒙蒙,万晓媛,等. 南美白对虾中分离到的一种新病毒——虾血细胞虹彩病毒[C]. 中国水产学会鱼病专业委员会 2017 年学术讨论会,2017.