

• 海洋生物技术 •

## 不同途径感染白斑综合征病毒 (WSSV) 对日本沼虾的致病性

殷嵘<sup>1,2</sup>, 郭媛媛<sup>1,2</sup>, 韦章良<sup>3</sup>, 施定基<sup>4</sup>, 何培民<sup>1,2</sup>, 贾睿<sup>1,2</sup>

1 上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306

2 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

3 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301

4 中国科学院植物研究所, 北京 100093

殷嵘, 郭媛媛, 韦章良, 等. 不同途径感染白斑综合征病毒 (WSSV) 对日本沼虾的致病性. 生物工程学报, 2017, 33(6): 946–956.

Yin R, Guo YY, Wei ZL, et al. Pathogenicity of white-spot syndrome virus in *Macrobrachium nipponense* via different infection routes. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 946–956.

**摘要:** 日本沼虾肉质鲜美、经济价值高, 但其对白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 的易感性尚不明确。采用流行病学调查、感染试验和荧光定量 PCR (qPCR) 等方法, 研究了日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* 对 WSSV 的易感性、感染发病率以及 WSSV 在其体内的增殖情况。结果表明: 日本沼虾是 WSSV 的自然宿主, 上海市附近省份地区 120 个样本的自然携带率为 8.33%。日本沼虾可以通过注射、摄食、浸泡途径感染 WSSV, 10 d 内累计感染率均为 100%, 累计死亡率分别为 100%、75%和 0%。其中注射途径感染日本沼虾, 感染后 5 d 肌肉病毒含量达到感染后 1 d 的 1 000 倍, 8 d 死亡率达 100%。用注射 WSSV 感染日本沼虾死亡率来测量病毒致死日本沼虾的半数致死剂量 (LD<sub>50</sub>), 2.71×10<sup>5</sup> 病毒粒子/μL 能使日本沼虾死亡率达到 50% 以上。在养殖生产中, 日本沼虾可以通过摄食感染 WSSV 的病虾或死虾而感染 WSSV, 也能通过浸泡在含 WSSV 的水体中而感染, 并因此成为一种传播媒介, 从而影响了 WSSV 的迅速传播与致病。

**关键词:** 日本沼虾, 河虾, 白斑综合征病毒, 增殖, 半数致死剂量

**Received:** January 6, 2017; **Accepted:** March 23, 2017

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA093506), Shanghai Science and Technology Committee (No. 16391903500).

**Corresponding author:** Rui Jia. Tel: +86-21-61900449; E-mail: rjia@shou.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA093506), 上海市科委项目 (No. 16391903500) 资助。

网络出版时间: 2017-04-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170418.1111.002.html>

# Pathogenicity of white-spot syndrome virus in *Macrobrachium nipponense* via different infection routes

Rong Yin<sup>1,2</sup>, Yuanyuan Guo<sup>1,2</sup>, Zhangliang Wei<sup>3</sup>, Dingji Shi<sup>4</sup>, Peimin He<sup>1,2</sup>, and Rui Jia<sup>1,2</sup>

1 College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

4 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

**Abstract:** *Macrobrachium nipponense* is delicious and has high economic value, but its susceptibility to white-spot syndrome virus (WSSV) is unknown. Susceptibility, morbidity, and multiplication of WSSV in *M. nipponense* were studied by epidemiological survey, infection experiment and qPCR. *M. nipponense* was the natural host of WSSV, and the natural carrying rate was about 8.33%. *M. nipponense* could be infected with WSSV via oral administration, muscle injection and immersion, and the cumulative infection rate of 10 d exposure was 100%, and the cumulative mortality rates were 100%, 75% and 0%, respectively. The infection of WSSV is fast by muscle injection. The virus content after 5 day's injection is 1 000 times higher than that of the first day of infection, and the mortality rate reached 100% after 8 days. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) measured as the mortality of infected *M. nipponense* via injection indicated the LD<sub>50</sub> in the concentration of WSSV of  $2.71 \times 10^5$  virions/ $\mu$ L. In shrimp farming, *M. nipponense* can be infected by ingesting WSSV infected shrimp or dead shrimp, and also by soaking in WSSV-containing water and thus become a vector, consequently affecting the spread and pathogenicity of WSSV.

**Keywords:** *Macrobrachium nipponense*, river prawn, white spot syndrome virus (WSSV), proliferation, median lethal dose

日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* , 俗称河虾、青虾, 属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、长臂虾科 (Palaemonidae)、沼虾属 (*Macrobrachium*)<sup>[1]</sup> , 是许多亚洲国家养殖的主要淡水品种之一<sup>[2-4]</sup> 。我国日本沼虾养殖区主要集中于长江中下游一带<sup>[5-7]</sup> , 2009 年产量已超过 20 万 t , 日本沼虾已经成为我国重要的淡水经济虾类<sup>[8]</sup> 。我国虾类养殖品种众多, 养殖效益巨大, 然而近年来虾病频繁暴发, 已报道的虾类疾病种类有白头病、黑鳃病和软体病等<sup>[9-12]</sup> , 以及暴发快危害大的病毒病如: 对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus , WSSV)、桃拉综合症病毒 (Taura

syndrome virus , TSV)、传染性皮下造血器官坏死病毒 (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus , IHHNV) 等<sup>[13]</sup> , 给虾类养殖产业造成了巨大灾难, 尤其是 WSSV , 一旦暴发对虾几乎 100% 死亡, 目前尚无有效药物应用。

WSSV 于 20 世纪 90 年代初首先在我国台湾地区发现, WSSV 在全球暴发按亚洲-美洲-欧洲-非洲的顺序, 据报道 25 个国家发生 WSSV 感染<sup>[14]</sup> 。1992 年 WSSV 从我国台湾北部分离到后, 已经鉴定到它可感染 18 种对虾、7 种螯虾、7 种龙虾、8 种长臂虾以及 39 种蟹<sup>[15-17]</sup> , 涉及到我们常见的大部分虾蟹类水产品<sup>[18]</sup> 。其中, 造成经济损失最大的是对虾养殖。WSSV 感染

对虾后, 3–10 d 内其死亡率可达 100%<sup>[19-20]</sup>, 已成为全球养虾业中蔓延最广、传播最快、死亡率最高的病毒。它感染宿主范围很广, 在甲壳类和昆虫纲动物中均有其敏感的宿主<sup>[21-22]</sup>。另外有研究者<sup>[23]</sup>在浮游生物、海葵、糠虾、白虾、毛虾等动物中也检测出 WSSV<sup>[24-27]</sup>。然而关于 WSSV 感染沼虾方面的研究却很少, 虽有文献对比过罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*、拟长腕沼虾 *Macrobrachium idella* 等对白斑综合征病毒的抗性<sup>[28]</sup>, 但目前还鲜有关于日本沼虾是否能够感染 WSSV 以及感染途径、发病规律及病毒在其体内增殖的研究。

为此, 本研究通过 qPCR 以及流行病学调查方法, 初步研究了日本沼虾对 WSSV 的易感性、发病规律和 WSSV 在日本沼虾体内的增殖情况。实验结果进一步丰富了白斑综合征病毒对不同种类虾的感染, 同时也揭示日本沼虾在养殖过程中是否感染 WSSV 及其感染过程, 从而在日本沼虾感染 WSSV 时可以采取有效的预防措施, 为日本沼虾的健康养殖提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 野生日本沼虾体内 WSSV 携带率调查

实验所用野生日本沼虾收集于上海市附近省份地区, 40 尾/次。收集时间和日本沼虾生长阶段分别为: 2015 年 11 月, 成虾阶段, 雌雄比例为 18 : 22; 2016 年 4 月, 幼体与幼虾阶段, 雌性比例 21 : 19; 2016 年 9 月, 幼虾与成虾阶段, 雌雄比例为 23 : 17。收集后置于 -40 °C 冻存, 随后采用 PCR 方法检测 WSSV, 计算 WSSV 携带率。

### 1.2 材料

感染所用日本沼虾为养殖日本沼虾, 购买于上海市浦东新区古棕路市场。挑选个体健壮、

附肢完整的日本沼虾 (平均体长为  $(5.5 \pm 0.5)$  cm, 平均体质量为  $(1.8 \pm 0.2)$  g/尾) 暂养于长宽高分别为 55 cm、45 cm 和 20 cm 的室内养殖箱中。对暂养的日本沼虾进行随机取样, 经 PCR 检测为 WSSV 阴性。养殖用水为曝气 2 d 的自来水, 水温控制在  $(28 \pm 0.5)$  °C, 光暗比为 12 h : 12 h。每日投喂饲料 2 次 (9:00 与 21:00), 并及时吸除残饵和污物, 每天换水 1/3, 24 h 持续充气。

PCR 及 qPCR 实验所用各种试剂盒均购于天根生化科技 (北京) 有限公司。病毒定量缓冲液均购于生工生物 (上海) 公司。

### 1.3 病毒制备与定量

#### 1.3.1 病毒材料制备

WSSV 初始悬液来自于国家海洋局第三海洋研究所, 悬液由 WSSV 提纯方法<sup>[29]</sup>得到, 浓度为  $2 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L。将病毒悬液按 1 : 100 进行稀释, 然后对健康克氏原螯虾进行注射感染。注射剂量为 100  $\mu$ L/尾<sup>[30]</sup>, 注射部位为第 3 腹节处。收集濒死克氏原螯虾, 保存于 -80 °C 备用。

取人工注射接种 WSSV 濒死的淡水克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 3 尾 (在 6–7 d 濒死的最佳), 剥离头胸甲, 去除肝胰腺, 将剩余的所有组织称重, 并用剪刀剪碎于预冷的缓冲液 PBS (pH 7.4) 1 : 10 (W/V) 中, 然后将剪碎的组织在 10 000 r/min 下高速匀浆 5 s, 重复匀浆 3 次; 匀浆液在 4 °C、8 000 $\times$ g 下离心 5 min, 上清液先过 400 目筛绢, 再过 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 滤液分装在新离心管中, 全程在 4 °C 或冰上进行操作。病毒粗悬液可立即使用或是分装成病毒保存液, -80 °C 冻存备用。

取上述提取病毒粗悬液对健康克氏原螯虾进行注射感染, 收集大量感染病虾保存于 -80 °C 作为实验病毒材料待用。感染实验前重复上述

步骤,对 WSSV 进行活化后再使用。

### 1.3.2 病毒定量

取人工注射接种 WSSV 濒死的淡水克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 6 尾 (在 6–7 d 濒死的最佳),参照秦崇涛等<sup>[31]</sup>的病毒提纯方法,对 WSSV 进行纯化。提取过程中严格进行梯度离心,直至获得乳白色的 WSSV 悬液。然后,参照秦崇涛等定量测定 WSSV 悬液的方法,测定悬液的  $OD_{600}$ ,并参照公式: $C=OD_{600} \times 6.79 \times 10^8$  病毒粒子/ $\mu\text{L}$ ,计算悬液 WSSV 浓度。

## 1.4 感染实验

### 1.4.1 注射感染

感染实验分 2 组,肌肉注射感染组和阴性对照各 1 组,每组 2 个重复,感染周期为 10 d。将暂养 4 d 且摄食稳定后的日本沼虾随机分成 4 箱,每箱 30 尾。肌肉注射感染部位为腹部第 3 腹节处,将病毒悬液 ( $OD_{600}=0.4$ ) 按 1 : 10 稀释注射病毒液 50  $\mu\text{L}$ /尾,注射剂量来自预实验,对照组以相同方法注射同等剂量 TM 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)。

### 1.4.2 口服 (摄食) 感染

感染实验分 2 组,口服感染组和阴性对照各 1 组,每组 2 个重复,感染周期为 10 d。将暂养 4 d 且摄食稳定后的日本沼虾随机分成 4 箱,每箱 30 尾。口服感染方法为投喂 WSSV 感染后濒死的克氏原螯虾尾部肌肉;阴性对照组投喂 WSSV 阴性健康克氏原螯虾尾部肌肉。投喂前进行饥饿处理 12 h,投喂当天取 5 尾感染克氏原螯虾,液氮下研磨并混匀,随机取 5 个样进行病毒含量测定,为  $5.6 \times 10^6$  copies/mg,余下部分进行投喂。投喂量为体重的 5%<sup>[32]</sup>,每天 2 次,连续投喂 2 d,后改为投喂普通饲料。

### 1.4.3 浸泡感染

浸泡感染实验分 2 组,浸泡感染组和阴性对照各 1 组,每组 2 个重复,感染周期为 10 d。将暂养 4 d 且摄食稳定后的日本沼虾随机分成 4 箱,每箱 30 尾。将人工注射感染濒死的克氏原螯虾参照 1.3.2 中方法对 WSSV 进行提纯和定量。使水体中病毒达  $10^5$  病毒粒子/L,对日本沼虾进行浸泡攻毒 4 h,阴性对照组添加同等剂量的 TM 缓冲溶液,然后转移到新鲜水体中进行培养观察。

### 1.5 养殖管理

感染后,每日投喂普通适口饵料 2 次,并及时吸除残饵和污物,每天换水 1/3,24 h 持续充气,光暗比 12 h : 12 h;每天观察 6 次,及时去除死亡沼虾并记录。

### 1.6 病毒 qPCR 检测

根据质粒制备方法<sup>[33]</sup>制备 WSSV 标准品并将标准品进行梯度稀释为  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  拷贝数构建标准曲线,另外按照 DNA 提取试剂盒使用说明,从 20 mg 尾部肌肉提取 DNA 作为 qPCR 模板。qPCR 使用引物<sup>[34]</sup>为 VP28-140Fw (5'-AGG-TGT-GGA-ACA-ACA-CAT-CAA-G-3') 和 VP28-140Rv (5'-TGC-CAA-CTT-CAT-CCT-CAT-CA-3'),长度为 141 bp。qPCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$  : 2  $\mu\text{L}$  的各 DNA 稀释模板,10  $\mu\text{L}$  SYBR Green, 0.6  $\mu\text{L}$  各引物 (300 nmol/L), 6.8  $\mu\text{L}$  无酶水。RT-PCR 反应在 FTC-3000 仪器上进行,反应条件为:95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min;94  $^\circ\text{C}$  30 s,61  $^\circ\text{C}$  30 s,72  $^\circ\text{C}$  30 s,扩增 35 个循环;72  $^\circ\text{C}$  延伸 5 min。荧光值在延伸阶段进行采集。

### 1.7 病毒感染日本沼虾的半数致死剂量 ( $\text{LD}_{50}$ )

为了测定日本沼虾体内增殖 WSSV 对其本

身的半数致死剂量 ( $LD_{50}$ ), 将实验分为 6 个感染组, 1 个阴性对照组, 每组 2 个重复, 每个重复 14 尾虾, 所用日本沼虾 PCR 检测为 WSSV 阴性。收集注射感染实验组中死亡的日本沼虾, 然后对 WSSV 进行提纯和定量方法同上述 1.3.2 部分; 定量后将病毒液进行连续 10 倍的稀释, 稀释倍数为  $10^0-10^5$ ; 然后对感染组每组日本沼虾进行病毒注射感染, 注射部位为第 3 腹节处, 剂量为  $50 \mu\text{L}/\text{尾}$ , 阴性对照组注射同剂量的 TM 缓冲液; 日本沼虾的死亡率和临床症状观察周期为 10 d, 养殖标准同 1.5 部分。

### 1.8 数据处理

记录各组日本沼虾死亡数量, 计算其死亡率并根据对照组死亡率进行校正:

$$\text{死亡率校正公式}^{[35]}: P=(P'-C)/(1-C)$$

其中  $P$  为死亡率,  $P'$  为实测死亡率,  $C$  为对照组死亡率。

实验结果采用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的表示方法, 数据用 Origin Pro8.0 处理和 SPSS 19.0 分析软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生日本沼虾 WSSV 检测

PCR 检测结果显示 (表 1), 每批日本沼虾都有部分携带 WSSV, 自然携带率约为 8.33%, 这些携带 WSSV 的日本沼虾检测结果为阳性和弱阳性, 未出现强阳性样本 ( $C_t$  值在 20 以内或电泳条带很亮)。此结果说明在自然环境中的日本沼虾能够携带 WSSV, 并因此使其处于潜伏感染状态。病毒携带率和携带量与该疾病的暴发密切相关。

表 1 野生日本沼虾体内感染 WSSV 的调查

Table 1 A survey on the WSSV in wild *M. nipponense*

Sample size (ind)	WSSV				Infection rate (%)
	-	+	++	+++	
40	37	2	1	0	7.50
40	38	2	0	0	5.00
40	35	3	2	0	12.5

Notes: -: negative; +: weak positive; ++: positive; +++: strong positive.

### 2.2 日本沼虾口服感染 WSSV

日本沼虾口服经 WSSV 感染的螯虾组织后, 48 h 后出现了食欲减退、活动量降低等症状, 72 h 内还会进行少量摄食, 之后停止摄食, 并出现了静卧水体、反应迟钝等症状, 随后又出现了头胸部肿胀和附肢脱落等症状, 但日本沼虾感染后至死亡一直未出现白斑症状。在 84 h 时出现了少量死亡, 随后在 96-120 h 时出现了大量死亡, 然后死亡速度迅速下降, 在 192 h 后未出现死亡状况, 10 d 内总体死亡率分别为 76% 和 80%, 阴性对照组至实验结束分别死亡 1 尾和 2 尾 (图 1)。通过提取死亡及未死亡日本沼虾 DNA, 进行 PCR 及电泳实验后表明未死亡日本沼虾也已经感染 WSSV (图 2)。

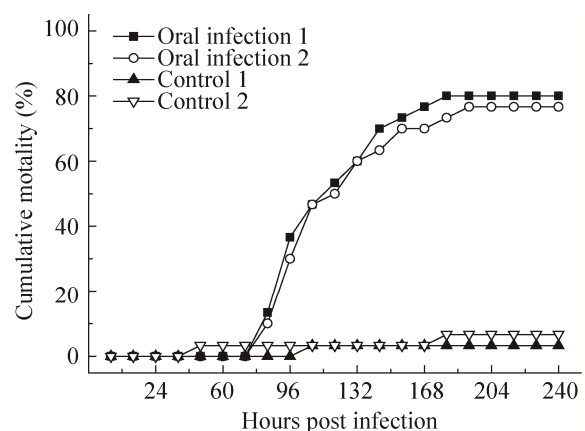


图 1 口服感染 WSSV 后日本沼虾累计死亡数

Fig. 1 Cumulative deaths of *M. nipponense* post oral infection.

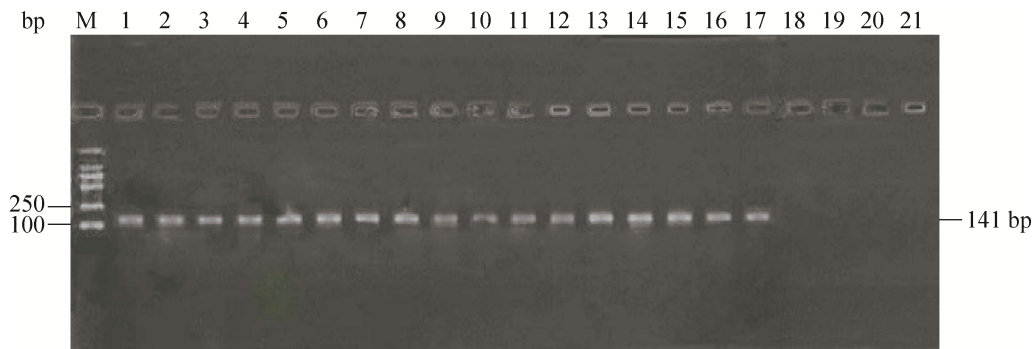


图 2 口服 WSSV 病虾后日本沼虾 WSSV 检测为阳性

Fig. 2 Detection of *M. nipponense* in the shrimp orally infected with WSSV. 1–10: death; 11–17: survival; 18–21: negative control; M: marker.

实验结果表明,日本沼虾可以通过摄食感染 WSSV 的病虾或死虾而感染 WSSV。

### 2.3 日本沼虾注射感染 WSSV

定量注射 WSSV 病毒液后,24 h 后日本沼虾出现了食欲减退状况,48 h 后几乎不进行摄食,并出现反应迟钝、头胸部肿胀等症状,随后又出现了部分脱落症状,而且日本沼虾感染后至死亡和口服感染一样也一直未出现白斑症状。在感染 48 h 后出现了少量死亡,72 h 时出现大量死亡,96 h 时累计死亡量超过 50%,随后死亡速度下降,192 h 时累计死亡率为 100%,另外两个阴性对照组至实验结束分别死亡 2 尾和 4 尾(图 3)。取日本沼虾的肌肉组织进行定量 PCR 检测发现,感染病毒 24 h 后肌肉组织中的 WSSV 含量随着时间增加急剧增加,96 h 后增长减缓,120 h 濒死的日本沼虾肌肉内 WSSV 含量是感染 12 h 时肌肉含量的 1 000 倍。研究结果表明,日本沼虾注射感染 WSSV 后,病毒可以在日本沼虾体内迅速增殖,并且当累计到一定量后可以导致日本沼虾发病甚至死亡。

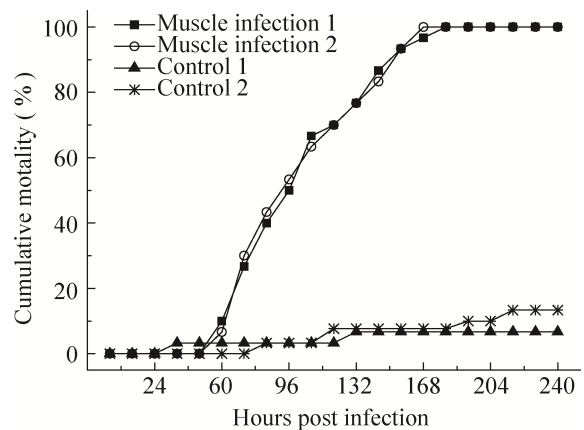


图 3 注射感染 WSSV 后日本沼虾累计死亡数

Fig. 3 Cumulative deaths of *M. nipponense* post intramuscular infection.

### 2.4 日本沼虾浸泡感染 WSSV

当用  $10^5$  病毒粒子/L 的水体浸泡日本沼虾后,结果显示,日本沼虾在 10 d 的观察期中均未出现死亡状况,但均出现了食欲减退、活力降低的症状,并且其中 2 尾出现了静卧趴伏不动症状。10 d 后,经 PCR 结果显示(图 4),日本沼虾虽未出现死亡,但都已感染 WSSV;其中静卧趴伏不动的 2 尾电泳条带明显较亮(图 4 中 9、10 泳道)。

## 2.5 WSSV 的半数致死剂量 ( $LD_{50}$ )

通过将提纯并测定浓度的 WSSV 进行梯度稀释, 然后对日本沼虾进行注射感染, 结果显示, 在  $10^0$ – $10^2$  稀释组的死亡率为 100%,  $10^3$  稀释组为 57.1%, 当稀释  $10^4$  倍时死亡率低于 50% (图 5)。另外, 高浓度病毒液都能引起日本沼虾 100% 的死亡, 并随着病毒液的稀释, 死亡率开始下降, 并且各组死亡率依次降低。由此, 可以计算出病毒导致发病死亡的  $LD_{50}$  为  $1.26 \times 10^5$  病毒粒子/ $\mu\text{L}$ 。实验结果也意味着在攻毒实验中可以用  $10^2$  稀释度作为攻毒剂量, 死亡率可达 100%, 此时病毒浓度为  $2.71 \times 10^6$  病毒粒子/ $\mu\text{L}$ 。

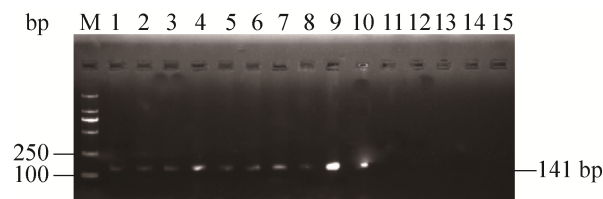


图 4 浸泡 WSSV 粒子 10 d 后日本沼虾 WSSV 检测为阳性

Fig. 4 The detection of *M. nipponense* was positive after 10 days of immersion of WSSV particles. 1–10: infection; 11–15: negative control; M: marker.

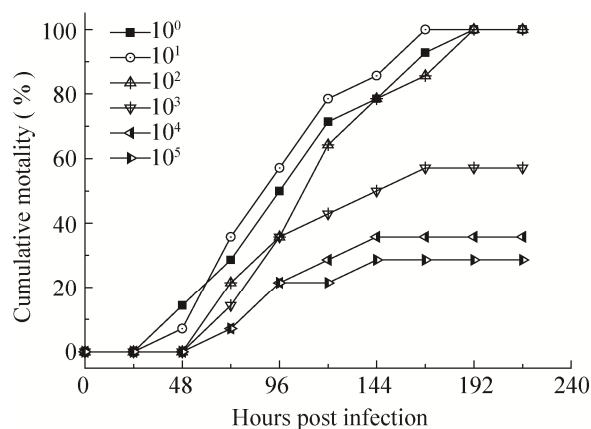


图 5 日本沼虾注射不同 WSSV 稀释液后累计死亡率  
Fig. 5 Cumulative mortality of *M. nipponense* intramuscularly infected with different dilutions of WSSV.

## 3 讨论

已有研究<sup>[36]</sup>表明 WSSV 宿主可以通过摄食和浸泡途径感染白斑综合症, 其感染的宿主十分广泛, 已鉴定到它可感染 40 种虾、39 种蟹。本研究结果表明, 日本沼虾是 WSSV 的自然宿主, 它可以通过摄食感染 WSSV 的病虾或死虾而使 WSSV 通过消化道进入血液并在其体内增殖, 也能通过浸泡在含 WSSV 的水体中通过腮和消化道而感染。因此越来越多的宿主通过水平传播方式参与了 WSSV 的感染, 同时由于当下海水虾蟹<sup>[37-38]</sup>的淡化养殖日益普及, 将咸淡水中 WSSV 的宿主都并联起来, 极大地增加了 WSSV 传播的可能性。所以, 在养殖生产中要充分考虑存在的各种 WSSV 宿主。

本研究结果显示, 口服感染组日本沼虾在摄食 WSSV 病虾组织后, 第 4 天 (84 h) 时开始死亡, 并且在第 8 天 (192 h) 时死亡率超过 75%; 注射感染组在注射病毒液后, 第 3 天 (60 h) 时开始死亡, 在第 8 天 (192 h) 时死亡率则达 100%; 另外, 口服与注射两组各自对应的阴性对照组死亡率分别为 5% 和 10%, 说明日本沼虾可以通过摄食 WSSV 感染的病虾而感染, WSSV 的感染和快速增殖是日本沼虾发病和死亡的决定因素。用含 WSSV 粒子水体浸泡日本沼虾结果显示, 浸泡方式能够引起其感染, 这与戴俊逸等<sup>[39]</sup>研究认为当水体 WSSV 浓度达到  $10^3$  病毒粒子/L 以上时能引起对虾感染相符, 但此浓度下 10 d 内未能导致日本沼虾死亡, 这可能与水体病毒粒子浓度和感染方式有关。注射感染能使日本沼虾迅速进入急性感染状态, 这也被多位研究者证明<sup>[40-41]</sup>; 摄食方式感染也能使日本沼虾进入急性感染状态, 但进入急性感染状态的时间比注射感染推迟 1 d 且死亡率未达 100%, 浸泡感染 ( $10^5$  病毒粒子/L)



方式使日本沼虾进入潜伏感染状态未出现死亡状况,这 3 种途径引发的不同死亡率现象可能与不同感染途径引发的免疫机制和不同途径下日本沼虾对病毒的耐受能力有关。另外实验结果也显示,口服、注射及浸泡 3 种感染方式都未使日本沼虾出现白斑症状;注射组在第 192 h 时累计死亡率才达到 100%,而口服感染组死亡率则未达 100%,与其他虾类感染 WSSV 48 h<sup>[42]</sup> 头胸甲处可见白斑和 96 h<sup>[43]</sup> 累计死亡可达 100% 不符。这可能与沼虾对 WSSV 易感性低所致。WSSV 的 LD<sub>50</sub> 经常用于攻毒实验中。本实验通过一系列病毒稀释液来确定日本沼虾的 LD<sub>50</sub>。日本沼虾死亡率达 100% 稀释倍数可以用于攻毒实验<sup>[44]</sup>,实验结果显示 WSSV 的稀释倍数从 10<sup>0</sup>-10<sup>2</sup> 时致死率为 100%,而 10<sup>3</sup> 稀释倍数时致死率为 57.1%,所以推测半数致死剂量 WSSV 的稀释倍数为 10<sup>3</sup> (1.26×10<sup>5</sup> 病毒粒子/μL)。因此,本研究建议 WSSV 的 10<sup>2</sup> 稀释倍数 (2.71×10<sup>6</sup> 病毒粒子/μL) 可以作为以后日本沼虾攻毒试验的病毒剂量。

目前尚无有效的药物应用于生产,主要以预防为主<sup>[45-47]</sup>。预防工作重点是针对其传播方式切断传染源,同时优化养殖环境,增强体质,提高抗病力,从而预防感染以及防止 WSSV 从潜伏感染转为急性暴发。WSSV 的传播途径主要有 2 种:水平传播、垂直传播。另外本文研究以及大量研究表明<sup>[13,48]</sup> WSSV 在注射、摄食、浸泡 3 种感染途径中,注射感染是使 WSSV 直接进入血液,口服是通过口腔-食道-胃途径,而浸泡感染则是通过腮-血液以及口腔-食道-胃途径。由于在自然条件下 WSSV 只会发生后两者的感染,即经口感染<sup>[49]</sup>,因此在生产预防工作中要重点切断水平传播途径,做好监测工作。

监测不但要注重食物来源的监控,同时要密切关注对水体中病毒粒子的监控,尤其后者往往会被忽略。另外在防治方面,目前有学者<sup>[50-51]</sup> 从 WSSV 囊膜蛋白方面进行免疫防治研究,也有比较显著的防治效果。虽然现在还鲜有报导关于日本沼虾暴发白斑综合征的情况,但日本沼虾作为 WSSV 的天然宿主,生产中依然要做好对该病的防范工作。另外本实验结果显示发病的日本沼虾均未出现 WSSV 特有的白斑症状,所以研究结果提醒在生产中判断日本沼虾是否感染 WSSV 需以科学的手段检测,如果单凭白斑来判断,则可能给生产带来巨大损失。

## REFERENCES

- [1] Zhang QY, Cheng QQ, Guan WB. Mitochondrial COI gene sequence variation and taxonomic status of three *Macrobrachium* species. *Zool Res*, 2009, 30(6): 613-619.
- [2] Hong YJ, Hu CY, Guan SF. Preliminary investigation on *Macrobrachium* Poyang Lake resources. *Res Fish*, 2003, 23(3): 38-39 (in Chinese). 洪一江, 胡成钰, 官少飞. 鄱阳湖沼虾资源的初步调查. *水利渔业*, 2003, 23(3): 38-39.
- [3] Huang YL. China's shrimp aquaculture overview. *Res Fish*, 2003, 23(1): 1-3 (in Chinese). 黄玉玲. 我国虾类淡水养殖概述. *水利渔业*, 2003, 23(1): 1-3.
- [4] Kong YQ. Japanese prawn (*Macrobrachium nipponense*) physiology of juveniles of copper in health[D]. Shanghai: E Chin Normal Univ, 2014 (in Chinese). 孔有琴. 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 幼虾的铜营养生理研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2014.
- [5] Li CC, Li Y, Xie QM, et al. Studies on the largest sustainable yield of *Pleurotus nebrodensis* and its exploitation. *Jiangxi Sci*, 1990, 8(4): 28-33 (in Chinese).



- 李长春, 李云, 谢钦铭, 等. 鄱阳湖虾类资源最大持续产量及其开发利用的研究. 江西科学, 1990, 8(4): 28-33.
- [6] Shi WG, Yan XM, Bing XW. Studies on biology and diet of Taihu Lake prawns. J Lake Sci, 1995, 7(1): 69-76 (in Chinese).  
施炜钢, 严小梅, 邢旭文. 太湖秀丽白虾生物学与食性的研究. 湖泊科学, 1995, 7(1): 69-76.
- [7] Jiang H, Xiao KY, He YL, et al. A preliminary survey of Hunan Yuanjiang southern Dongting Lake shrimp and crab resources. Res Fish, 2006, 26(5): 72-73 (in Chinese).  
江辉, 肖克宇, 何燕林, 等. 湖南沅江南洞庭湖虾蟹资源的初步调查. 水利渔业, 2006, 26(5): 72-73.
- [8] Fishery Bureau of Ministry of Agriculture. China fishery yearbook. Beijing: Chin Agric Press, 2010: 37 (in Chinese).  
农业部渔业局. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2010: 37.
- [9] Xu Y, Shen JY, Yao JY, et al. Studies on pathogen of main diseases of *Macrobrachium rosenbergii* in the Yangtze River Delta. Freshwater Fish, 2012(5): 27-32 (in Chinese).  
徐洋, 沈锦玉, 姚嘉赞, 等. 长三角地区罗氏沼虾成虾主要疾病的病原研究. 淡水渔业, 2012(5): 27-32.
- [10] Deng YH, Xiong GG, Zhou ZY, et al. *Macrobrachium rosenbergii* prevention and treatment of common diseases and technology. Jiangxi Fish Sci Technol, 2002(2): 44-45 (in Chinese).  
邓勇辉, 熊国根, 周智勇, 等. 罗氏沼虾常见病及其防治技术. 江西水产科技, 2002(2): 44-45.
- [11] Wu HX, Xue JZ, Tang LY. Pathological *M. nipponense* black branchiae disease study. Bull Sci Technol, 2002(1): 73-75 (in Chinese).  
吴惠仙, 薛俊增, 唐柳娅. 日本沼虾黑鳃病的组织病理学研究. 科技通报, 2002(1): 73-75.
- [12] Kang L. *Macrobrachium rosenbergii* drop star disease symptoms and prevention and control measures. Chin Fish Rep, 2015-08-24B02 (in Chinese).  
康乐. 罗氏沼虾滴星病症状及防治措施. 中国渔业报, 2015-08-24B02.
- [13] Dai JY. Study on the invasion routes of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp [D]. Xiamen: Third Inst Oceanogr, State Oceanic Adm, 2012 (in Chinese).  
戴俊逸. 白斑综合症病毒 (WSSV) 侵染对虾途径的研究[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2012.
- [14] Lightner DV. A hand book of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge: Louisiana State Univ Press, 1996.
- [15] Corbel V, Zuprisal Z, Shi Z, et al. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). J Fish Dis, 2001, 24(7): 377-382.
- [16] Lo CF, Ho CH, Peng SE, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis Aquat Org, 1996, 27(3): 215-225.
- [17] Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. J Fish Dis, 2008, 31(1): 1-18.
- [18] Lei ZW, Huang J, Shi CY, et al. White spot syndrome virus (WSSV) of the host. Oceanol Limnol Sin, 2002, 3(3): 250-258 (in Chinese).  
雷质文, 黄捷, 史成银, 等. 白斑综合症病毒 (WSSV) 的宿主调查. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 250-258.
- [19] Lo CF, Ho CH, Peng SE, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis Aquat Organ, 1996, 27(3): 215-225.
- [20] Nakano H, Koube H. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *P. japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. Fish Pathol, 1994, 29(2): 135-139.
- [21] Soowannayan C, Phanthura M. Horizontal

- transmission of white spot syndrome virus (WSSV) between red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 2011, 319(1/2): 5–10.
- [22] Rajendran KV, Vijayan KK, Santiago TC, et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *J Fish Dis*, 1999, 22(3): 183–191.
- [23] Huang J, Yu J, Wang XH, et al. Detection of monoclonal antibody ELISA technique for hypodermal and hematopoietic necrosis disease pathogeny. *Mar Fish Res*, 1995, 16(1): 40–50 (in Chinese).  
黄健, 于佳, 王秀华, 等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血器官组织坏死病的病及其传播途径. *海洋水产研究*, 1995, 16(1): 40–50.
- [24] He JG, Zhou HM, Yao B, et al. Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *J Sun Yat-sen Univ: Nat Sci Ed*, 1999, 38(2): 65–69 (in Chinese).  
何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(2): 65–69.
- [25] Sahul Hameed AS, Yoganandhan K, Sathish S, et al. white spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, 2001, 201(3/4): 179–186.
- [26] Wang YC, Lo CF, Chang PS, et al. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, 1998, 164(1/4): 221–231.
- [27] Chang PS, Chen HC, Wang YC. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, 1998, 164(1/4): 233–242.
- [28] Sahul Hameed AS, Murthi BLM, Rasheed M, et al. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 2002, 204(1/2): 1–10.
- [29] Xie XX, Li HY, Xu XM, et al. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res*, 2005, 108(1/2): 63–67.
- [30] Sun Y, Li F, Xiang J. Analysis on the dynamic changes of the amount of WSSV in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during infection. *Aquaculture*, 2013, s376–379(6): 124–132.
- [31] Qin CT, Yang F. A simple and rapid method for the determination of white spot syndrome virus in Chinese white shrimp. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(20): 30–34 (in Chinese).  
秦崇涛, 杨丰. 一种简单快速测定对虾白斑综合症病毒浓度方法的建立. *中国农学通报*, 2014, 30(20): 30–34.
- [32] Brett F, Edgerton. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor albidus* to white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Org*, 2004, 59(3): 187–193.
- [33] Cheng XY, Liu QH, Huang J. Real time fluorescence quantitative PCR detection of white spot syndrome virus. *Anhui Agric Sci*, 2010, 38(26): 14265–14267 (in Chinese).  
程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 实时荧光定量PCR检测对虾白斑综合症病毒方法的建立. *安徽农业科学*, 2010, 38(26): 14265–14267.
- [34] Mendoza-Cano F, Sanchez-Paz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the white spot syndrome virus in marine crustaceans. *Virol J*, 2013, 10(1): 186.
- [35] Sun RY. *Quantitative Pharmacology*. Beijing: People's Med Publ House, 1987: 184–208 (in Chinese).  
孙瑞元. *定量药理学*. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 184–208.
- [36] Chou HY, Huang CY, Kou GH, et al. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture*, 1998, 16(1/4): 263–276.

- [37] Zheng SJ. Study on water quality regularity of *Litopenaeus vannamei* in desalination culture[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006 (in Chinese).  
郑善坚. 凡纳滨对虾淡化养殖水质规律研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [38] Liu CL, Hu F. Serrata desalination culture test. *Sci Fish*, 2005(7): 29 (in Chinese).  
刘春玲, 胡方. 锯缘青蟹淡化养殖试验. *科学养鱼*, 2005(7): 29.
- [39] Dai JY, Li WT, Yang F. Studies on the invasion routes of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp and virus titer. *J Appl Oceanogra*, 2013, 32(1): 67–72 (in Chinese).  
戴俊逸, 李文婷, 杨丰. 白斑综合症病毒 (WSSV) 感染对虾的途径及滴度研究. *应用海洋学学报*, 2013, 32(1): 67–72.
- [40] Phuoc LH, Corteel M, Thanh NC, et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on coinfection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2009, 290(1/2): 61–68.
- [41] Zhu F, Quan HZ. A new method for quantifying white spot syndrome virus: Experimental challenge dose using TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*, 2012, 184(1/2): 121–124.
- [42] Dai JY. White spot syndrome virus (WSSV) infection of shrimp pathway[D]. Xiamen: Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, 2012 (in Chinese).  
戴俊逸. 白斑综合症病毒 (WSSV) 感染对虾途径的研究[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2012.
- [43] Zhang L, Tang XQ, Sheng XZ, et al. Analysis on dynamic changes of WSSV amount in *Procambarus clarkii* through Quantitative Real-time PCR. *Chin Anim Health Insp*, 2015(6): 69–74 (in Chinese).  
张玲, 唐小千, 绳秀珍, 等. 实时荧光定量 PCR 检测克氏原螯虾体内白斑症病毒 (WSSV) 的动态变化. *中国动物检疫*, 2015(6): 69–74.
- [44] Prior S, Browdy CL, Shepard EF, et al. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Dis Aquat Organ*, 2003, 54: 89–96.
- [45] Zhang MY. The pathogenesis and prevention of white spot syndrome in shrimp. *J Aquac*, 2013(2): 55 (in Chinese).  
张忙友. 对虾白斑综合症的发病规律及防治方法. *水产养殖*, 2013(2): 55.
- [46] Wu JW. Study on prevention and treatment of white spot syndrome of *Penaeus vannamei*. *Agric Jilin*, 2011(3): 259 (in Chinese).  
吴俊文. 南美白对虾白斑综合症防治技术探讨. *吉林农业*, 2011(3): 259.
- [47] Xie KL. How to control the white spot syndrome of crawfish? *Fish Guide to be Rich*, 2016(14): 50–51 (in Chinese).  
谢康乐. 怎样防治小龙虾白斑综合症? *渔业致富指南*, 2016(14): 50–51.
- [48] Di Leonardo VA, Bonnichon V, Roch P, et al. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. *J Fish Dis*, 2005, 28(9): 565–569.
- [49] Deng D, Liu P, Kong J. Medium mediators in the transmission of WSSV virus disease. *Prog Fish Sci*, 2004, 25(5): 35–41 (in Chinese).
- [50] 邓灯, 刘萍, 孔杰. 卤虫在 WSSV 病毒病传播中的媒介作用. *渔业科学进展*. 2004, 25(5): 35–41.
- [51] Kulkarni A, Rombout JH, Singh IS, et al. Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: an uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(1): 159–166.
- [52] Valdez A, Yepiz-Plascencia G, Ricca E, et al. First *Litopenaeus vannamei* WSSV 100% oral vaccination protection using CotC: Vp26 fusion protein displayed on *Bacillus subtilis* spores surface. *J Appl Microbiol*, 2014, 117(2): 347–357.

(本文责编 陈宏宇)