

# 栉孔扇贝感染急性病毒性坏死症病毒的组织病理学 与免疫荧光检测

付崇罗<sup>1,2</sup> 宋微波<sup>1\*</sup> 李 贇<sup>1</sup> 张永忠<sup>2</sup> 闫华超<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

(<sup>2</sup>聊城大学生命科学学院 聊城 252059)

**摘 要** 应用组织学和单克隆抗体免疫荧光技术(Immunofluorescence assay, IFA)对夏季养殖中后期大规模死亡(“急性病毒性坏死症”Acute virus necrobiotic disease, AVND)高峰期的患病栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)进行了检测。组织学检测结果显示,患病扇贝的大多数器官(外套膜、鳃、胃、肾等)的上皮组织细胞可见显著的细胞肿胀、嗜碱性增强、排列紊乱、部分脱落以至完全坏死脱落等显著的组织病理学变化。作为对照,利用针对 AVND 病毒的特异性单克隆抗体所建立的免疫荧光原位检测技术对患病扇贝进行检测发现,上皮组织的病理变化与病毒感染之间具有一致的对应关系。这一结果表明,AVND 病毒的感染可以对栉孔扇贝造成严重的病理性破坏。此为解释该病毒导致栉孔扇贝大规模死亡的机制提供了直接的组织病理学依据。

**关键词** 栉孔扇贝, AVND 病毒, 组织病理学, 免疫荧光检测

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0741-04

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)长期以来一直是我国北方沿海最重要的养殖贝类之一。但自 20 世纪 90 年代起,由于养殖中后期的“大规模死亡现象”而导致了该产业的巨大损失<sup>[1,2]</sup>。自 2000 年以来,作者及相关协作课题组在国家“973 项目”的资助下,利用组织病理学、流行病学、人工感染试验及免疫学检测等方法对此病害开展了系统的病原学和病理学研究。结果显示,一种球形 RNA 病毒是造成其大规模死亡的直接病原<sup>[1-7]</sup>。宋微波等将该种病害命名为“急性病毒性坏死症”(Acute virus necrobiotic disease, AVND)<sup>[1]</sup>。

鉴于国内目前有关 AVND 病毒对栉孔扇贝感染的途径、作用靶器官/组织以及致病机理等问题尚缺乏了解,作者利用本课题组新近制备的针对 AVND 病毒的单克隆抗体所建立的原位免疫荧光检测技术同时结合组织病理学方法,对自然发病的栉孔扇贝主要组织器官进行了检测,现将结果介绍如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

患病栉孔扇贝为 2003 年夏季发病高峰期采自青岛太平角海水养殖厂的一龄贝,壳长 4.3cm ~

5.6cm。它们具有爆发大规模死亡时所表现的典型症状:外套膜收缩、外套眼失去光泽、病贝对外界刺激反应迟钝、闭壳肌收缩无力。同时于不同时期采集外观健康的扇贝作为实验对照。

### 1.2 组织学观察

活体解剖扇贝,仔细检查扇贝外套腔内及各器官表面并无寄生性动物附着后,用 0.22 $\mu$ m 孔径过滤后的无菌海水将其冲洗干净。分别取病贝和健康贝的外套膜、鳃、闭壳肌、肾、胃、肠、消化盲囊、生殖腺等各主要器官组织,Davidson's 液中 4 $^{\circ}$ C 固定 48 h。常规石蜡包埋法制备组织切片(厚度 5 $\mu$ m),H-E 染色, Olympus 显微镜下观察、拍照。

### 1.3 免疫荧光检测(IFA)

单克隆抗体为本实验室自行制备的腹水单克隆抗体(3C8)。经胶体金免疫电镜技术鉴定表明,此单抗针对 AVND 病毒的特异性结合位点为病毒粒子的囊膜(有关该单抗制备及鉴定的研究待另文发表)。

上述常规石蜡包埋法制备的组织切片经脱蜡、复水,用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加腹水单克隆抗体(用 3% BSA-PBS 1:500 稀释),37 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育 1h。PBS 冲洗后,滴加 FITC-羊抗小鼠 IgG(华美

基金项目:国家“973 项目”(G1999012001);“长江学者奖励计划”资助项目

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-532-2032283; E-mail: wsong@ouc.edu.cn

作者简介:付崇罗(1964-),男,副教授,博士。研究方向为水生生物病理学及免疫学。Tel: 86-532-2032348; E-mail: fuchonglu@hotmail.com

收稿日期 2004-03-29,修回日期 2004-05-08

生物工程公司,1:10 稀释),37℃湿盒内暗处孵育 1h。后经 PBS 洗涤后用 50% 的缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察拍照。同时,设健康贝的组织切片为阴性对照,省去单克隆抗体为空白对照。

## 2 结果

### 2.1 组织学研究

与健康个体比较,患病扇贝的组织病理变化主要表现在上皮组织,包括上皮细胞肿胀变形、细胞排列紊乱、嗜碱性增强、部分坏死脱落或完全脱落(图 1)。出现上述病理变化的上皮组织主要为构成各器官外膜的保护性上皮(如外套膜、鳃、闭壳肌外膜、肾和生殖腺等器官的外膜上皮)和消化道粘膜上皮。

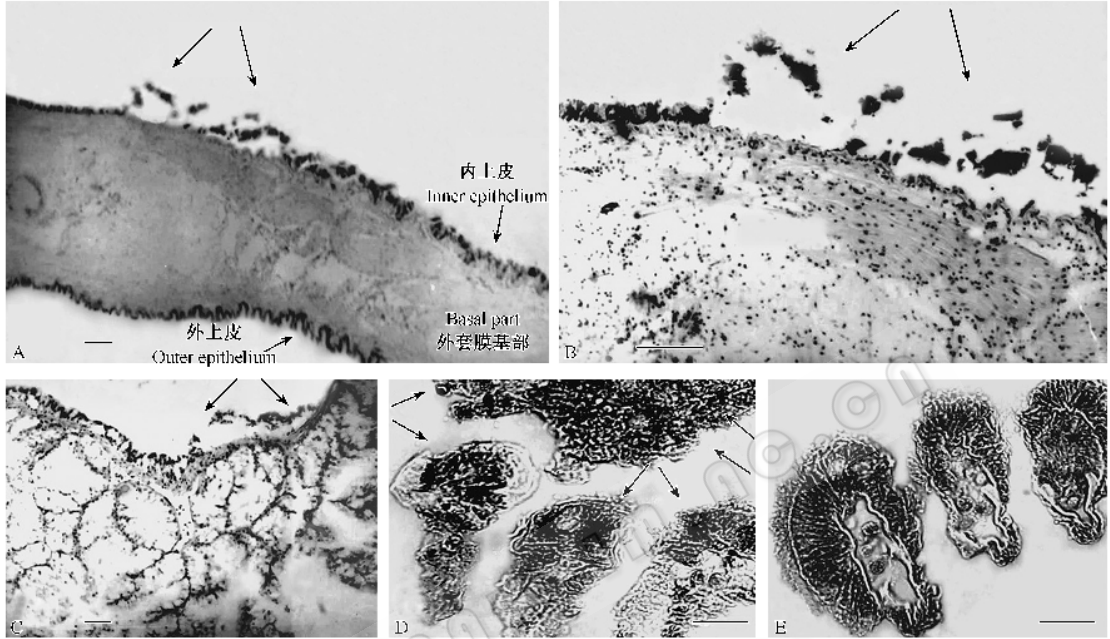


图 1 患病栉孔扇贝的组织病理学变化

Fig. 1 Histopathological changes in different organs of *Chlamys farreri*

A: The sloughing on inner epithelium near mantles' basal portion (larger arrows); B: The same portion as A, to show the sloughing epithelium (arrows); C: The sloughing on out epithelium of kidney (arrows); D: Gills from affected individuals compare with unaffected gills (E). Arrows show the disorder, necrosis and basophilic increase. Bars: 50 μm in A, B, C; 20 μm in D, E.

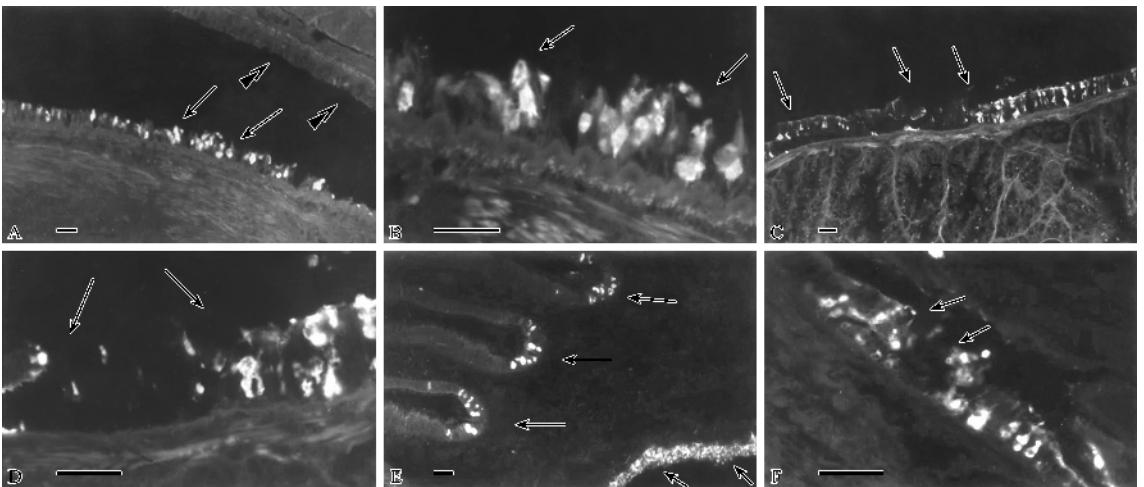


图 2 栉孔扇贝感染 AVND 病毒的免疫荧光检测

Fig. 2 AVND virus antigen was demonstrated on tissue sections of *Chlamys farreri* by IFA

A, B: Positive cells (arrows in A) on inner epithelium near mantles' basal portion, double arrow heads in A mark the unaffected epithelium; C, D: Positive cells on outer epithelium of kidney; E: Positive cells on stomachs' mucosa (larger arrows) and outer epithelium (smaller arrows); F: Positive cells on stomachs' mucosa and herein serious disruption (arrows). Bars: 30 μm.

## 2.2 免疫荧光检测(IFA)

利用作者新近建立的单克隆抗体 IFA 技术(文另发)对病贝所进行的原位检测显示,AVND 病毒可广泛侵染养殖中后期栉孔扇贝与外环境直接接触的器官组织,如外套膜和消化道黏膜上皮组织,并由此进一步侵染到皮下结缔组织(图 2)。另外发现,在某些器官,病毒对上皮组织的感染存在一定的规律性或感染靶位。如在外套膜,病毒主要感染靠近外套膜基部的内膜上皮(图 1-A, B;图 2-A, B);在胃内粘膜,则主要集中在皱襞的凹陷部位(图 2-E, F)。

## 3 讨论

国内外近年来的研究表明,贝类作为水生滤食性动物,各类致病性微生物在构成上非常复杂,迄今已经报道的至少有类立克次氏体、类支原体、衣原体、细菌、寄生原生动物以及病毒。往往在同一宿主体内同时发现几种病原生物的存在<sup>[8,9]</sup>。但在多数情况下,宿主可以承受这种感染而不引发疾病<sup>[10-13]</sup>。在病毒性疾病研究方面,由于国内目前尚无法建立贝类体外离体培养的细胞系以及缺乏可靠的分子生物学检测手段,对大多数由上述病原所引起的贝类病害研究主要集中于流行病学调查、病原报道以及常规的组织病理学探讨方面<sup>[14-17]</sup>。本工作为迄今国内首次结合病理组织学以及特异性单克隆抗体荧光免疫检测技术(IFA)所开展的扇贝 AVND 病的研究。

我们的工作显示,利用组织学方法所观察到的患病扇贝相关组织/器官的病理变化与已有报道非常一致<sup>[2,4]</sup>。同时,应用单抗 IFA 技术进行的检测证实,这种组织病理学变化与 AVND 病毒的感染部位完全吻合。此结果表明,栉孔扇贝 AVND 病毒的感染对宿主除去通常的致病机理外(如导致电镜水平上的细胞器变性、失活、炎症反应等),还同时可以造成直接而显著的结构破坏,因此具有极强的致死性。这也从组织病理学角度上解释了在养殖实践中何以形成如此强烈的集中死亡现象:染病扇贝往往在数日内完成从肉眼可观的病症发生至死亡这一全过程,宿主甚至来不及表现出消瘦或完全排空消化道即已经进入濒死状态<sup>[2]</sup>。

对患病扇贝所进行的免疫荧光检测还显示,AVND 病毒可能首先感染与外环境相接触的上皮组织,在感染较严重的器官,病毒可进一步侵染到皮下结缔组织的某些细胞(结果未展示)。这与本课题组此前电镜超薄切片的观察结果一致<sup>[5]</sup>。这个结果显

示,AVND 病毒的传播途径极有可能系通过水环境,即借助于水体实现病毒对扇贝的直接接触和由表而里的侵染,当环境合适时(如水温适宜),形成病毒的迅速繁殖而致病。这也一定程度上说明了在养殖实践中的一个常见现象:在同一养殖环境内的扇贝个体几乎总是同步(集中于数日内)发生大批(常常无一幸免)的死亡。

我们的工作还显示,在某些器官,感染的易发部位存在一定的规律性(如外套膜基部的内膜上皮细胞、鳃基部的上皮细胞、胃皱襞凹陷部位的粘膜上皮细胞等)。此点可能表明,病毒对宿主靶器官的侵染具有一定的选择。此外,本工作同时证实,病毒对上皮细胞感染的强度与造成的病理伤害程度直接相关。这提示,当外界环境条件(如温度)不适宜病毒繁殖时,少量潜伏的病毒对宿主的危害性可能不显著。

迄今所知,贝类和其它无脊椎动物一样缺乏特异性免疫机制,由上皮组织本身及其所分泌的黏液层共同构成屏障,防御外来病原的入侵<sup>[18,19]</sup>。根据本研究并接合迄今已完成的有关栉孔扇贝急性病毒性坏死症的流行病学和病原学研究结果,我们可以对 AVND 病毒的传播途径和致病机理绘出如下大略的草图:在养殖水体内的水温上升前,来源不明的少量 AVND 病毒借助水流机会性地侵染某些宿主体表的上皮组织(随后在水温升高前可能存在一休止期)。在高密度养殖条件下,受感染的上皮细胞发生坏死和脱落,病毒逃逸并借水流在相邻的扇贝群体中迅速传播(水平传播)。随着水温升高,病毒在宿主体内开始大量繁殖并进一步侵染到各关键部位从而引发扇贝原发性系统性感染以及大部分器官组织的功能丧失;同时,由于受感染的上皮细胞严重脱落,使扇贝的防御机能大大降低而招致严重的继发性感染。最终导致栉孔扇贝养殖群体迅速而大规模的死亡。

致谢 聊城大学生命科学院的孙震晓博士和中国海洋大学的任素莲、绳秀珍老师在组织学观察方面曾给予热情帮助,在此一并表示感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等.栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展.海洋科学,2001,25(2):23-26.
- [2] 王秀华,王崇明,李 筠,等.胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查.水产学报,2002,26:149-155.
- [3] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等.栉孔扇贝一种球形病毒的分纯化及其超微结构观察.水产学报,2002,26:180-184.

- [ 4 ] 林晓凤,李 赟. 海湾扇贝和栉孔扇贝的组织病理学观察. 海洋湖沼通报 2002, (1): 71 - 75.
- [ 5 ] 贺桂珍,王秀华,李 赟,等. 急性病毒性坏死症病毒在栉孔扇贝不同器官的感染状况. 高技术通讯 2003, 13(7): 93 - 96.
- [ 6 ] 李 赟,贺桂珍,王秀华,等. 急性病毒性坏死症病毒感染的 ELISA 检测. 高技术通讯 2003, 13(7): 90 - 92.
- [ 7 ] 艾海新,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究. 中国水产科学 2003, 10: 386 - 391.
- [ 8 ] Hine P M, Wakefield S, Diggles B K, *et al.* Ultrastructure of a haplosporidian containing Richettsiae, associated with mortalities among cultured paua *Haliotis iris*. *Dis Aquat Org* 2002, 49: 207 - 219.
- [ 9 ] Hine P M, Diggles B K. Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis Aquat Org*, 2002, 50: 137 - 144.
- [ 10 ] Mortensen S H, Bachere E, LeGall G, *et al.* Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops (*Pecten maximus*). *Dis Aquat Org*, 1992, 12: 221 - 227.
- [ 11 ] Mortensen S H, Roald K N, Hjeltnes B. Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Dis Aquat Org*, 1998, 33: 67 - 71.
- [ 12 ] Elston R. Bivalve mollusc virus. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13: 393 - 403.
- [ 13 ] Muniain-Mujika I, Calvo M, Lucena F, *et al.* Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int J Food Microbiol*, 2003, 83: 75 - 85.
- [ 14 ] 李 霞,王 斌,刘淑范,等. 一种球状病毒对近海几种贝类的感染. 大连水产学院学报 2000, 15(2): 86 - 91.
- [ 15 ] Renault T, Lipart C, Arzul I. A herpes-like virus infects a non-osstreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis Aquat Org*, 2001, 45: 1 - 7.
- [ 16 ] Wu X Z, Pan J P. An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. *J Fish Dis*, 2002, 23: 409 - 414.
- [ 17 ] 任素莲,张艳艳,邱 红,等. “红肉病”文蛤的组织病理学. 水产学报 2003, 27: 462 - 467.
- [ 18 ] Allam B, Christine C, Ford S E. 2002 Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Org*, 2002, 48: 221 - 231.
- [ 19 ] 孙虎山,王宜艳,孙修勤,等. 栉孔扇贝外套膜酸性和碱性磷酸酶电镜细胞化学研究. 高技术通讯 2002, 12(5): 99 - 102.

## Histopathological Research and Immunofluorescence of AVND Virus Infection in Cultured Scallop *Chlamys farreri*

FU Chong-Luo<sup>1,2</sup> SONG Wei-Bo<sup>1\*</sup> LI Yun<sup>1</sup> ZHANG Yong-Zhong<sup>2</sup> YAN Hua-Chao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

(<sup>2</sup> College of Biological Science, University of Liaocheng, Liaocheng 252059, China)

**Abstract**: The naturally infected scallops *Chlamys farreri* sampled during mass mortality in summer of 2003 was detected by means of histopathological and MAb-based immunofluorescence assay (IFA). The results of histological examination demonstrated that a series of histopathological changes including cell swelling, basophilic increase, disorder, partial sloughing and excessive sloughing were always observed in epithelia of many different organs, e.g. mantle, gills, stomach, intestine and kidney. Additionally, the infected tissues were applied for *in situ* detection of the "acute virus necrotic disease" (AVND) virus by means of specific MAb-based IFA, and the result demonstrated that this pathological changes or lesions were perfectly coincident with the positive cells (fluorescing cells). The positive cells were denser in some local area of epithelia, and exhibited serious pathological lesions, which would reveal the roles of this virus in pathogenesis and further confirm that the AVND virus is the main causative agent of mass mortalities among cultured scallop *Chlamys farreri* farmed in northern coast of China.

**Key words**: Scallop, *Chlamys farreri*, AVND virus, Histopathology, Immunofluorescence assay

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G19990120001); The Chueng Kong Scholarship Programme

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-532-2032283; E-mail: wsong@ouc.edu.cn

Received date: 03-29-2004