

三角帆蚌瘟病的研究

I. 一种新的病毒病

张治国 丁苏芳 许益民* 汪浩

(江苏省微生物研究所, 无锡)

三角帆蚌瘟病的暴发性死亡发生在夏、秋两季, 只侵害 2 龄以上的三角帆蚌, 死亡率高, 病程较长, 并与环境温度呈负相关。病蚌的消化腺及多种上皮细胞水泡变性, 内质网高度扩张, 胞浆内出现包裹着病毒样颗粒的层卷状结构。接种病蚌的除菌材料或提取的病毒可使健蚌罹病。发病症状、病程、组织病理均与自然发病蚌相一致, 并可连续传代。从不同疫点的、具致病性的人工感染材料以及病蚌细胞的超薄切片中, 均检出形态相似的球形、类球形病毒, 对照标本中则未发现。

关键词 三角帆蚌瘟病病毒; 珍珠; 软体动物

人工培育优质淡水珍珠的三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii* 简称帆蚌, 下同) 1978 年以来连续发生大面积死亡, 被称之为“三角帆蚌瘟病”。其病因国内尚存在多种意见。倪达书等^[1]曾报道, 这是由斑点气单胞菌的一个变种 (*Aeromonas punctata* subsp. *hyriopae*) 所引起的传染病。1982 年以来我们对 3 个省的 49 个疫点的流行病学调查与实验观察表明, 本病发生在夏、秋两季, 只侵害 2 龄以上的、已植片与未植片的帆蚌, 当年死亡率可达 80% 左右, 存活下来的帆蚌在下一个发病季节仍会继续死亡。病程较长并与环境温度呈负相关。发病蚌的排水孔与进水孔纤毛收缩, 排粪减少, 肠道壁轻度水肿, 晶杆体萎缩或消失。组织切片显示, 消化腺、斧足等上皮细胞水泡变性 (图版 I-1) 严重者气球样变, 生殖腺细胞间质浆液渗出或细胞膜破裂。以氯霉素、四环素、利福平等多种药物在现场与实验室注射、浸泡不能治愈本病。本文就三角帆蚌瘟病的属性进行较系统地探讨。

材料与方法

(一) 自然感染

试验帆蚌取自非疫区, 三龄、体长 8—10 cm。发病帆蚌取自不同疫点。试验蚌与病蚌在聚乙烯盆或金鱼池中混群感染。盆中饲养者, 每天换池塘水, 喂豆浆、菜汁。相同条件下饲养同批非疫区帆蚌作对照。

(二) 人工感染

试验帆蚌与饲养条件同自然感染试验。褶纹冠蚌 (*Crisaria plicata*, 简称冠蚌, 下同) 取自非疫区, 三龄, 9—11 cm。从不同疫点取发病帆蚌 2—3 只, 取消化腺、肠、肾, pH7.2 PBS1:5—1:10 稀释, 匀浆, 低速离心, 上清液交替采用下述方法除菌: 加青霉素、链霉素各 2,000—5,000 u (μ g)/ml, 4℃作用 16 小时; 或再用 8,000 \times g 离心 20 分钟, 取上清液; 经 0.3 μ m 微孔滤膜除菌过滤。除菌材料接种普通肉汤与巯基乙醇酸钠培养基, 37℃ 与室温分别培养 2 天, 无细菌生长。个别试验采用蔗糖线性密度梯度离心的病毒带 (密度 1.14—1.18) 适当稀释。取非疫区帆蚌相应组织, 平行处理作为对照组接种材料。每只试验蚌内脏团注射经上述稀释的除菌材料或病毒带或者对照材料 0.3—0.5 ml。

(三) 病毒提取、超薄切片与电镜观察

本文于 1985 年 4 月 8 日收到。

* 江苏农学院畜牧兽医系。

周涌同志协助电镜工作; 叶振荣、严雪芬、张克银同志参加部分工作。

表 1 不同疫点病蚌对非疫区帆蚌的自然感染试验

Table 1 Natural infection tests of diseased *Hyriopsis cumingii* of different epidemic regions to those of non-epidemic region

疫 点 Epidemic place	试验蚌死亡率 Mortality of tested mussels	最短病程(天) Shortest disease course (day)	平均病程(天) Mean disease course (day)	自然感染环境 Natural infection enviroment
H. CH.	9/10	11	16.4	25 升聚乙烯盆,每天换 池塘水,加喂豆浆、菜汁 25L polyethylene basin 8m ² ×1.2m 金鱼池 goldfish pond
J. ZH.	6/8	9	22.8	
N. W.	6/10	13	23.4	
W. Y.	6/7	8	26.2	
SH. CH.	3/5	19	27.8	
J. N.	12/13	11	22.7	
平均值 Mean	79.25%	11.8±3.9	23.2±3.6	

1. 上述人工感染试验中,经 0.3 μ m 微孔滤膜过滤或 8000 \times g 离心的除菌材料,一份感染帆蚌引起发病死亡,另一份 160,000 \times g 离心 1 小时,沉淀物研磨悬浮,低速离心去沉淀,上清液加在由 0.01MPB pH7.2 配制的 20%、50%(W/W)双层蔗糖垫上,水平转子 130,000 \times g 离心 3 小时,取蔗糖界面的沉淀带,0.01MPB 稀释,超速离心或经 Sephadex G50 去蔗糖。部分试验再通过 20—60% (W/W) 蔗糖线性梯度。2%PTA (pH7.0) 负染,电镜观察。取对照组接种材料作平行处理。

2. 取 2 个疫点的 2 只病蚌消化腺、肠、肾,3.0% 戊二醛与 1% 锇酸双重固定,分级酒精脱水,618*环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸氧铀与柠檬酸铅染色,电镜观察。同时取非疫区帆蚌 2 只平行处理。

结 果

(一) 自然感染试验

试验帆蚌第 8 天开始死亡,平均病程 23.2 \pm 3.6 天,平均死亡率 79.25%。试验期间对照帆蚌或同池的金鱼正常生长(表 1)。

(二) 人工感染试验

1. 不同蚌种的死亡率:不同地区的 6 个疫点的除菌材料接种后 1 周左右帆蚌发

病死亡,继而连传 1—3 代,14 批试验中试验帆蚌平均死亡率 91.07%,对照组平均死亡率 1.98%,其中 4 个疫点的 6 批除菌材料同时接种冠蚌,试验冠蚌死亡率 2.44%,与对照组相近(表 2)。另外 8 个疫点的原代除菌病料接种帆蚌,引起同样发病死亡,平均死亡率 90.7%。接种超速离心的病毒带,试验帆蚌 6—8 天死亡,死亡率 7/7,对照组存活 7/7。

2. 病程: 1982—1984 年的不同季节进行了 22 批人工感染试验,最短病程平均 12.55 \pm 6.52 天,极个别试验蚌 4—5 天死亡,平均病程 18.01 \pm 6.02 天。尽管不同批次人工感染试验病程相差较远,但它们都与环境温度呈负相关。该回归方程与自然发病的回归方程十分接近,两者的差异低于显著性水平。

3. 症状与组织病理: 试验帆蚌的发病症状、解剖病变与自然发病蚌相一致。系统地检查了 5 个疫点人工感染发病蚌的组织切片,其病变部位、病理特征相互吻合并且与自然发病蚌相一致

(三) 电镜观察结果

1982—1984 年从 8 个疫点的 11 份自然发病蚌与人工感染发病蚌的除菌材料

表 2 不同疫点帆蚌的除菌材料的人工感染试验

Table 2 Artificial infection tests of the *Hyriopsis cumingii* by the bacteria-free materials

除菌材料 Bacteria-free materials		接种量 Inoculate amount (ml)		死亡率 Mortality		
疫点 Epidemic region	代数 Generation	稀释度 Dilution	体积 Volume	三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	对照组 Control group
J. N. 1982	原代*	1:8	0.3,0.4	8/8	1/10	1/8
	1代*	1:10	0.4,0.5	7/8	0/8	0/8
	2代**	1:10	0.4	7/7		1/6
	3代**	1:10	0.3	8/8		0/8
W. X. 1983	原代*	1:5	0.5	9/9		0/7
	1代*	1:5	0.5,0.5	7/8	0/8	0/8
W. D. 1983	原代**	1:5	0.5	10/10		0/7
	1代*	1:5	0.5	5/7		0/7
P. N. 1983	原代***	1:5	0.5	7/7		0/7
	1代*	1:5	0.5	10/11		0/7
N. Y. 1984	原代**	1:5	0.4	6/7		0/7
	1代**	1:5	0.4,0.5	7/7	0/7	0/7
H. CH. 1984	原代*	1:5	0.4	6/8		0/7
	1代***	1:5	0.4,0.5	5/7	0/8	0/7
平均死亡率 Mean				91.07%	2.44%	1.98%

* 青霉素、链霉素 2,000—5,000 单位 (μg)/ml, 4℃, 4—16 小时
Penicillin, streptomycin, 2000-5000u(μg)/ml, 4℃, 4-16 hr

** 0.3μm 微孔滤膜除菌过滤
0.3μm millipor filtrated and sterilized

*** 8,000×g 离心 20 分钟, 上清液加青霉素和链霉素
8,000×g centrifuged for 20min, supernatant added penicillin and streptomycin

中,发现形态相似的球形、类球形病毒粒子(图版 I-2)。在 6 份平行处理的非疫区帆蚌标本中则未检出此种病毒。此种病毒也见于两个疫点病蚌的超薄切片中,集聚于细胞浆内(图版 I-4)。病蚌的细胞浆内出现包裹着病毒样颗粒的层卷状结构(图版 I-3);内质网高度扩张、核糖体积聚(图版 I-4)。非疫区帆蚌的超薄切片中未发现这种病毒与超显微病变。

讨 论

1982—1984 年上述地区暴发的帆蚌

大批死亡,经调查与实验观察发现,具有相同的流行病学特征,相似的发病症状与组织病理,病程较长并与环境温度呈负相关,在第 3 个安全的水体中进行的自然感染试验获得成功。事实表明,这些地区帆蚌的大批死亡系同一种传染病所致。建议采用目前通用的俗名,暂命名为三角帆蚌瘟病(*Hyriopsis cumingii* Plague, HcP)。

不同地区病蚌消化腺与其它上皮细胞水泡变性,细胞内质网普遍扩张,这符合一般动物病毒病的特征^[2]。氯霉素、四环素等多种药物治疗无效,以及本病的宿主偏

嗜性也表明, HcP 极可能是一种病毒病。

不同疫点的病料, 以不同方法除菌后, 人工感染非疫区帆蚌, 可复制出本病并可垂直传代, 但以同样材料不能使冠蚌罹病。试验帆蚌的病程也与环境温度呈负相关, 该回归方程与自然发病者十分接近。从这些具有致病性的原代与传代的人工感染材料中, 观察到形态相似的球形、类球形病毒。这种病毒也见于病蚌的细胞浆内, 以及层卷状结构中。用蔗糖线性梯度密度离心的病毒带也能引起试验帆蚌同样发病死亡。试验结果表明, HcP 是一种病毒病。建议将该病毒暂定名为三角帆蚌瘟病病毒

(*Hyriopsis cumingii* Plague Virus, HcPV)。

关于海洋软体动物的病毒病以往多有报道^[3-4], 但目前这种大面积连续暴发的淡水软体动物病毒病, 尚未见报道。HcPV 的特征与分类地位正在研究中。

参 考 文 献

- [1] 倪达书等: 淡水渔业, 5: 41-42, 1982。
- [2] 洪涛等: 《生物医学超微结构与电子显微技术》, 科学出版社, 北京, 第 524 页, 1980。
- [3] Bonami, J. R.: *Oceanis* (Doc. Oceanogr.), 3 (5): 154-157, 1976。
- [4] Farley, C. A.: *Mar. Fish. Rev.*, 40(10): 18-20, 1978。

STUDIES ON THE MUSSEL *HYRIOPSIS CUMINGII* PLAGUE

I. A NEW VIRAL INFECTIOUS DISEASE

Zhang Zhiguo Din Sufang Xu Yiimin* Wong Jie

(Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi)

A sort of pearl-producing mussels living in freshwater, *Hyriopsis cumingii*, has a high mortality in summer and autumn caused by a special disease named *Hyriopsis cumingii* plague. It takes place only on more than one year old *Hyriopsis cumingii*, and has a long disease course and a negative-relation to the environmental temperature. The digestive gland cells and other organs epithelial cells appear hydropic degeneration, the much serous exudate or the cell break are often found in the gonad. In ultrathin section, the endoplasmic reticulum is highly swollen, the ribosome are aggregate, and the lamina containing virus-like granules appear in cytoplasm.

The bacteria-free materials and viruses taken from field cases can induce the same disease and can be passaged from one generation

to another. The disease course caused by these materials has a negative-relation to environmental temperature, too, and the regression equation is closed with that one with field cases own. The spherical and spherical-like viral particles are observed in the cytoplasm and mentioned bacteria-free materials taken from field cases and artificial infections. These features have led to demonstrate that the *Hyriopsis cumingii* plague is a new viral disease.

Key words

Hyriopsis cumingii Plague Virus; Pearl; Mussel

* The Veterinary Department of Jiangsu Agricultural College

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 发病帆蚌的消化腺细胞肿胀,胞浆水泡变性。2. 球形、类球形病毒见于具致病性的蔗糖线性密度梯度离心的病毒带以及除菌病料中 (52,000 \times)。3. 发病帆蚌的细胞浆出现包裹着病毒样颗粒(↑)的层卷状结构 (86,000 \times)。4. 发病帆蚌的内质网高度扩张,核糖体积聚(↑),病毒颗粒积聚于泡浆中(↑↑)(30,000 \times)。

1. The digestive gland cells of diseased *Hyriopsis cumingii* are swollen, the hydropic degeneration appear in cytoplasm. 2. These spherical and spherical-like viruses are found in pathogenic viral band prepared by linear density gradient of sucrose and bacteria-free materials. 3. The lamina containing virus-like granules (↑) appear in cytoplasm of diseased *Hyriopsis cumingii*. 4. The endoplasmic reticulum is highly swollen and the ribosome are aggregated (↑), the viruses accumulate in cytoplasm (↑↑).