



凡纳滨对虾虾苗细菌性玻化症 (BVS) 的病原、病理分析

王印庚, 于永翔*, 刘 潇, 张永刚, 张 正, 廖梅杰,
李 彬, 蔡欣欣, 荣小军, 罗 坤

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室,
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为进一步查明对虾“玻璃苗”的主要致病原, 实验通过对河北省沧州市凡纳滨对虾苗种玻化症进行了流行病学调查及病原、病理分析。结果发现, 患病虾苗表现为活力降低、厌食直至空肠、空胃, 虾体消瘦、暗浊; 肝胰腺组织坏死性萎缩、轮廓模糊、颜色变浅呈淡黄色, 甚至肝胰腺区由正常的饱满褐色组织变为无组织结构的“玻璃化”状态。组织病理观察结果显示, 患病对虾肝小管上皮细胞坏死、脱落, 肝小管中充斥大量的碎片组织, 并逐步褐化、黑化, 甚至肝小管组织大面积坏死, 留有连片玻璃样均质化区域; 肠道内充斥大量的组织碎片, 绒毛膜脱落消失。超微组织病理观察发现, 患病对虾肝小管上皮细胞的细胞膜消融, 细胞器解体, 细胞核固化; 其后细胞解体、脱落, 甚至肝小管组织结构解体消融; 肝胰腺、肠道、胃黏膜周围发现大量细菌, 优势菌株为杆状菌且呈弧形, 未发现病毒粒子的存在。从患病虾苗分离出 2 株优势菌 (Lv-A 和 Lv-B), 经人工浸染实验发现, Lv-A 和 Lv-B 可致凡纳滨对虾 PL₇ 苗种出现与自然患病相同的玻璃化症状, 其半致死浓度分别为 1.62×10^3 和 5.38×10^3 CFU/mL, 致病力强。根据 16S *rDNA* 和 *gyrB* 序列分析结果发现, Lv-A 和 Lv-B 与溶藻弧菌、新喀里多尼亚弧菌和副溶血弧菌均有较高相似性。初步将该病命名为虾苗细菌性玻化症 (shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome, BVS)。药敏实验结果显示, Lv-A 和 Lv-B 均对米诺环素、多西环素、萘啶酸等敏感, 而对新霉素、吡哌酸、利福平等耐药。本研究为 BVS 的有效防控、保障对虾行业健康发展提供理论基础和技术支撑。

关键词: 凡纳滨对虾; 虾苗; 细菌性玻化症; 溶藻弧菌; 新喀里多尼亚弧菌; 副溶血弧菌; 病理

中图分类号: S 941

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界范围内重要的水产养殖种类, 由于其对盐度的广适性, 成为我国对虾养殖中占据绝对优势的主养品种, 是我国水产养殖产业的主要经济支柱之一。据统计, 2019 年我国海水和淡水养殖对

虾总产量为 212.1 万 t, 其中凡纳滨对虾产量高达 181.6 万 t, 占总养殖对虾产量的 85.6%。养殖产业的扩大带动了苗种的快速发展, 2019 年凡纳滨对虾虾苗产量也突破 1.5 万亿尾^[1]。优质苗种的持续供应成为保障我国对虾养殖产业可持

收稿日期: 2020-09-09 修回日期: 2020-12-31

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900102); 泰山产业领军人才项目 (LJNY201802); 广西壮族自治区科技专项 (桂科 AA17204081-4); 苏北科技专项 (SZ-LYG202028)

第一作者: 王印庚 (照片), 从事水产病害防控研究, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

通信作者: 于永翔, E-mail: yuyx@ysfri.ac.cn



续发展的首要因素。我国对虾苗种生产秩序规范化程度低,苗种育成质量逐步降低,且大部分苗种在不同养殖区内相互调运,进一步加大了病原的传播隐患,甚至导致苗种大量死亡^[2-3]。现有报道表明,副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)等多种细菌性病原均能引起对虾患病^[4-5]。同时,已构建完成多种对虾苗种特定病原检测技术^[6-7]。因此,作为对虾养殖稳定生产的限制性因子,进一步加强对对虾苗种细菌性病害的深入研究,对促进对虾养殖病害诊疗与防控技术研发具有重要意义。

2020年春季,对虾苗种场“玻璃苗”现象在沿海各地暴发,患病虾苗表现为活力弱、体色暗浊,空肠、空胃,肝胰腺轮廓模糊、颜色变苍白呈淡黄色,呈无组织结构的“玻璃化”状态,故称之为对虾苗种的“玻化症”。自2020年2月,该疾病在北部湾发生以后,在我国自南向北沿海呈现爆发性蔓延趋势,导致春季虾苗供应严重不足。玻化症一般出现在标苗后2~3 d的虾苗,出现症状后24 h内虾苗大部分死亡。为进一步查明对虾“玻化症”的主要致病原,实验对患有玻璃化症状的凡纳滨对虾虾苗进行病原分离、致病性和组织病理学分析,为对虾苗种玻化症的防控提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

患病凡纳滨对虾虾苗具有典型的“玻化症”症状,分别采自河北省沧州市5家对虾育苗场,其苗种来源涵盖外地采购和本土繁育。采样时同时选取发病症状明显和外观健康的虾苗进行实验室分析;同时,采集患病车间进水口水样和育苗池水样进行病原相关性分析。

人工感染用的健康凡纳滨对虾虾苗购自潍坊某育苗场,所处时期为PL₇。暂养环境为25 L水族实验缸,有效容积为20 L,养殖密度为50尾/L,水温(23±2)°C,持续充氧。暂养期间每日早晚投喂和换水各1次,换水量为总体积的2/3,暂养3 d后进行感染实验。

1.2 病样检查及优势菌分离

取典型症状患病凡纳滨对虾虾苗,观察记

录发病虾苗的临床表现,通过体视显微镜和水浸片进一步检查患病虾苗各组织器官病变症状,以及有无寄生虫、霉菌等。

取具有典型症状的患病和健康凡纳滨对虾虾苗,用无菌1.5% NaCl溶液冲洗3次,将0.1 g虾苗用无菌研磨棒充分研磨后进行梯度稀释,育苗池水样同步进行梯度稀释,取稀释后的研磨液和水样涂布于胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS)培养基。28 °C培养24 h后,计算细菌和弧菌总数及弧菌占比,并统计优势菌种类及其优势度,经分离、纯化后的优势菌用含有1.5% NaCl的20%甘油溶液冻存于-80 °C冰箱内备用。

1.3 人工感染实验

挑取在TSB固体培养基上活化的优势菌单菌落接种于200 mL液体TSB培养基内,28 °C、180 r/min振荡培养16 h后离心收集菌体,无菌1.5% NaCl溶液重悬洗涤3次后制备成菌悬液,经平板计数法测定菌液浓度。

人工感染采用浸浴感染方式进行,每组使用健康凡纳滨对虾虾苗30尾,实验组浸浴感染有效浓度分别为Lv-A: 1.02×10¹、1.02×10²、1.02×10³、1.02×10⁴、1.02×10⁵和1.02×10⁶ CFU/mL; Lv-B: 1.30×10¹、1.30×10²、1.30×10³、1.30×10⁴、1.30×10⁵和1.30×10⁶ CFU/mL,以加入相同体积的1.5% NaCl溶液为对照。实验期间连续充气,水温(23±2)°C,每12 h换水1次,使用过滤海水,换水量为养殖水体的1/2。观察记录虾苗症状及其发病死亡情况,对患病虾苗进行病原菌分离鉴定,并根据寇氏法计算菌株的半致死浓度(LD₅₀)^[8]。

1.4 病原菌分类鉴定

挑取纯化后的单菌落重悬于100 μL去离子水中,99 °C金属浴15 min后离心取上清液作为PCR模板。利用细菌16S *rDNA*和*gyrB*引物分别扩增目标序列^[9],扩增产物经PCR纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,测序结果经BLAST进行同源比对。并同步利用ezbiocloud(www.ezbiocloud.net/)标准菌株数据库对16S *rDNA*测序结果进行比对。选取所获得同源性较高的标准菌株16S *rDNA*和*gyrB*序列,用

Mega 6.0 采用邻接法 (Neighbor-Joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.5 组织病理学观察

具有典型症状的凡纳滨对虾虾苗用 Davidson 氏固定液固定 24 h, 常规苏木精-伊红染色法 (H.E) 染色^[10]。使用 2.5% 戊二醛同步固定超微电镜虾苗样品, 进行超微病理观察^[11]。

1.6 药物敏感性实验

实验共选取 38 种药物, 采用纸片扩散法 (K-B 法) 对菌株进行药物敏感性测试。测试菌液浓度为 10^8 CFU/mL, 抗菌纸片购置于杭州天和微生物试剂有限公司。将 100 μ L 菌悬液涂布于 TSB 固体培养基, 贴附药物纸片后置于 28 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 测定抑菌圈直径, 并参照说明进行药物敏感性判读^[12]。

2 结果

2.1 患病对虾形态特征分析

患病凡纳滨对虾虾苗表现为活力减弱, 虾体消瘦、暗浊, 空肠空胃, 肝胰腺轮廓模糊、组织解体、颜色变浅至肝胰腺区由正常的饱满褐色组织变为空白的玻璃化状态。头胸甲区域

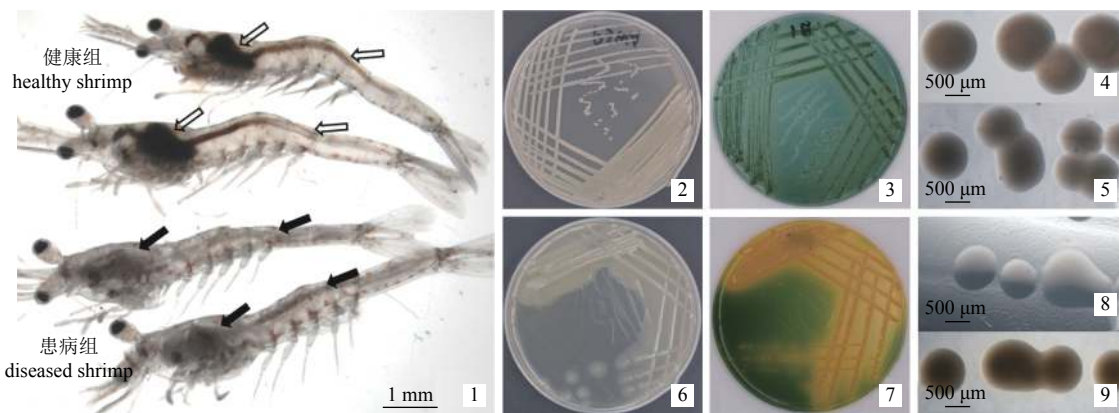
至腹部呈现瘦小、暗浊状态 (图版 I-1)。对患病虾苗的水浸片观察, 未发现霉菌和寄生虫, 但可见水浸片中存在大量细菌。

2.2 优势菌株形态特征分析

通过比较筛选共分离出 2 株优势菌, 编号分别为 Lv-A 和 Lv-B。Lv-A 在 TSB 培养基上呈乳白色圆形菌落, 在 TCBS 上呈绿色圆形菌落, 表面光滑、隆起、边缘整齐; Lv-B 在 TSB 培养基上呈乳白色且具有浸润现象的圆形菌落, 在 TCBS 上呈黄色圆形菌落, 菌落表面光滑、隆起, 周边有黄色显色圈 (图版 I-2, 3)。

2.3 人工感染实验结果分析

感染实验共进行 72 h, 攻毒感染期间空白对照组死亡 1 尾, 但未发生玻璃化症状。Lv-A 实验组的凡纳滨对虾虾苗在感染后 12 h 出现持续性玻璃化现象, 24 h 开始出现死亡现象, 10^6 CFU/mL 实验组在 36 h 时全部死亡, 10^5 CFU/mL 实验组在 60 h 时全部死亡。Lv-B 实验组的对虾在感染后 24 h 出现持续性玻璃化及死亡现象, 10^6 CFU/mL 实验组在 60 h 时全部死亡, 在相同浓度下, Lv-B 凡纳滨对虾虾苗的毒力较 Lv-A 低 (表 1)。感染组虾苗对外界刺激反应迟钝, 活力下降, 肝胰腺轮廓模糊、颜色变苍白呈淡黄色,



图版 I 凡纳滨对虾虾苗细菌性玻化症症状及菌株 Lv-A 和 Lv-B 的形态观察

1. 健康和患病凡纳滨对虾虾苗表现症状; 2. Lv-A 在 TSB 上形态; 3. Lv-A 在 TCBS 上形态; 4. Lv-A 在 TSB 上菌落形态; 5. Lv-A 在 TCBS 上菌落形态; 6. Lv-B 在 TSB 上形态; 7. Lv-B 在 TCBS 上形态; 8. Lv-B 在 TSB 上菌落形态; 9. Lv-B 在 TCBS 上菌落形态; \rightleftarrows 健康虾苗; \blacktriangleright 患病虾苗

Plate I Bacterial vitrified syndrome of shrimp postlarva and morphology of strains Lv-A and Lv-B

1. apparent symptoms of healthy and diseased shrimp postlarva; 2. morphology of Lv-A strain on TSB medium; 3. morphology of Lv-A strain on TCBS medium; 4. colonial morphology of Lv-A strain on TSB medium; 5. colonial morphology of Lv-A strain on TCBS medium; 6. morphology of Lv-B strain on TSB medium; 7. morphology of Lv-B strain on TCBS medium; 8. colonial morphology of Lv-B strain on TSB medium; 9. colonial morphology of Lv-B strain on TCBS medium; \rightleftarrows healthy shrimp postlarva; \blacktriangleright diseased shrimp postlarva

表 1 菌株 Lv-A 和 Lv-B 对凡纳滨对虾虾苗的人工感染实验结果

Tab. 1 Results of artificial challenge to shrimp postlarvae using Lv-A and Lv-B

组别 group	攻毒浓度/(CFU/mL) infection concentration	尾数/尾 fish number	攻毒不同时间的死亡数量/尾 number of fish deaths after challenge at different time						累计死亡数/尾 cumulative deaths
			12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	
Lv-A	1.02×10 ⁶	30	0	29	1	0	0	0	30
	1.02×10 ⁵	30	0	20	1	7	2	0	30
	1.02×10 ⁴	30	0	2	9	10	3	0	24
	1.02×10 ³	30	0	1	0	7	1	1	10
	1.02×10 ²	30	0	2	0	1	0	0	3
	1.02×10 ¹	30	0	0	0	1	0	0	1
Lv-B	1.30×10 ⁶	30	0	5	20	1	4	0	30
	1.30×10 ⁵	30	0	0	0	10	8	4	22
	1.30×10 ⁴	30	0	1	3	3	5	8	20
	1.30×10 ³	30	0	0	0	2	2	3	7
	1.30×10 ²	30	0	1	2	0	1	1	5
	1.30×10 ¹	30	0	0	0	1	0	1	2
对照 control	1.5%NaCl	30	0	0	1	0	0	0	1

空肠空胃，与自然感染症状一致。再次从人工感染的虾苗中分离出的优势菌株的菌落形态和 Lv-A 和 Lv-B 一致，且 16S *rDNA* 序列经 NCBI 比对后与 Lv-A 和 Lv-B 一致，符合科赫法则，结果表明，Lv-A 和 Lv-B 是导致凡纳滨对虾虾苗玻化症的病原菌。利用改良寇氏法计算获得 Lv-A 和 Lv-B 对虾虾苗的 LD₅₀ 分别为 1.62×10³ 和 5.38×10³ CFU/mL。

2.4 病原菌 16S *rDNA* 和 *gyrB* 鉴定分析

菌株 Lv-A 和 Lv-B 的 16S *rDNA* 基因序列测定分别获得 1 411 和 1 409 bp 的有效基因序列，通过 Blast 比对分析发现，Lv-A 和 Lv-B 均与溶藻弧菌的序列同源性最高，相似度分别为 99.79% 和 99.86%。通过 EzBio 标准菌株数据库检索分析发现，Lv-A 与新喀里多尼亚弧菌 (*V. neocaledonicus*) 序列同源性最高，相似度为 99.64%；Lv-B 与溶藻弧菌序列同源性最高，相似度为 99.43%。*gyrB* 序列测定共获得 1 166 bp 和 1 409 bp 的有效基因序列，通过 Blast 比对分析发现，Lv-A 和 Lv-B 均与副溶血弧菌的序列同源性最高，相似度分别为 99.22% 和 99.30% (表 2)。16S *rDNA* 和 *gyrB* 的序列系统进化分析发现，Lv-A 与 Lv-B 聚为一簇，其中，基于 16S *rDNA* 的系统发育树中 Lv-A 和 Lv-

B 与溶藻弧菌和新喀里多尼亚弧菌聚为一支，基于 *gyrB* 的系统发育树中 Lv-A 和 Lv-B 与副溶血弧菌聚为一支 (图 1)。基于此，本实验暂无法确定 Lv-A 和 Lv-B 的具体菌株名称，因此将虾苗细菌性玻化症的致病原鉴定为弧菌 (*Vibrio* spp.)。后续拟通过组学技术进行菌株鉴定及其差异分析。

2.5 组织病理学特征分析

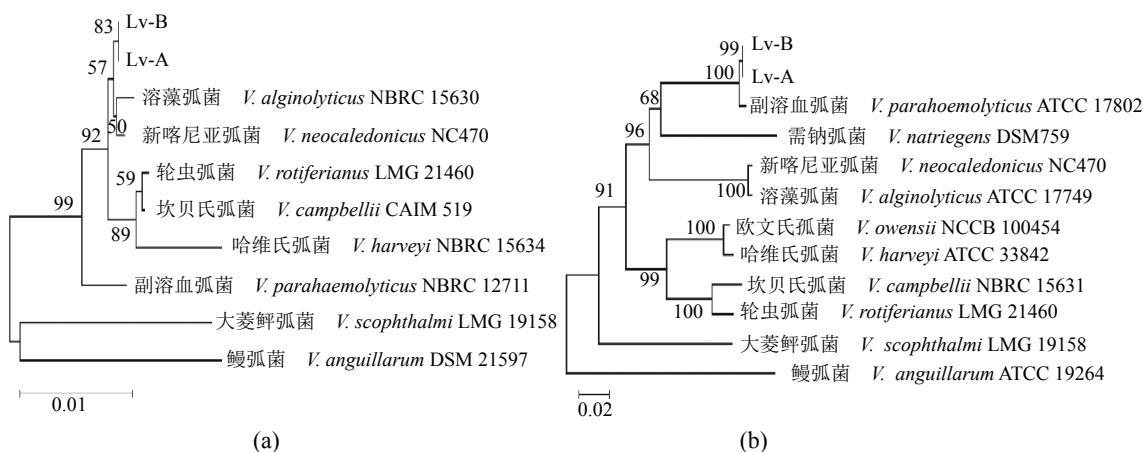
石蜡组织切片表明，患病凡纳滨对虾虾苗肝胰腺萎缩，肝小管上皮细胞坏死、脱落，肝小管中充斥大量的碎片组织并逐步褐化、黑化 (图版 II-1, 3)；随着感染程度的加剧，肝小管组织大面积坏死，残存少量的纤维化基质结构，甚至完全消失，使得肝胰腺组织逐步萎缩变小，留有大量的空白区域 (图版 II-2, 4)；肌原纤维结构散乱，细胞核固缩、深染 (图版 II-5)；肠道内充盈大量的褐化组织碎片，绒毛膜脱落、消失，肠壁出现缺失现象 (图版 II-6)。

超微组织病理检测表明，患病凡纳滨对虾虾苗肠道、肝胰腺及胃膜与肝胰腺胞膜间隙内发现大量细菌，优势菌株为杆状菌且呈弧形 (图版 III-1, 2, 4)。肝小管上皮细胞的细胞膜消融，细胞与细胞间界限模糊，细胞器解体，细胞核固化，细胞解体呈碎片并脱落到肝小管内

表 2 菌株 Lv-A 和 Lv-B 鉴定结果

Tab. 2 Results of the identification of Lv-A and Lv-B

基因名称 gene	数据库 database	菌株 strains			
		Lv-A		Lv-B	
16S <i>rDNA</i>	Blast	序列大小/bp	sequence size	1 411	1 409
		最大相似菌株	most similar strain	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>
		覆盖度/%	coverage	100	100
	相似度/%	identity	99.79	99.86	
	EzBio	最大相似菌株	most similar strain	新喀尼亚弧菌 <i>V. neocaledonicus</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>
		覆盖度/%	coverage	95.8	95.6
相似度/%		identity	99.64	99.43	
<i>gyrB</i>	Blast	序列大小/bp	sequence size	1 166	1 159
		最大相似菌株	most similar strain	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
		覆盖度/%	coverage	98	98
		相似度/%	identity	99.22	99.30

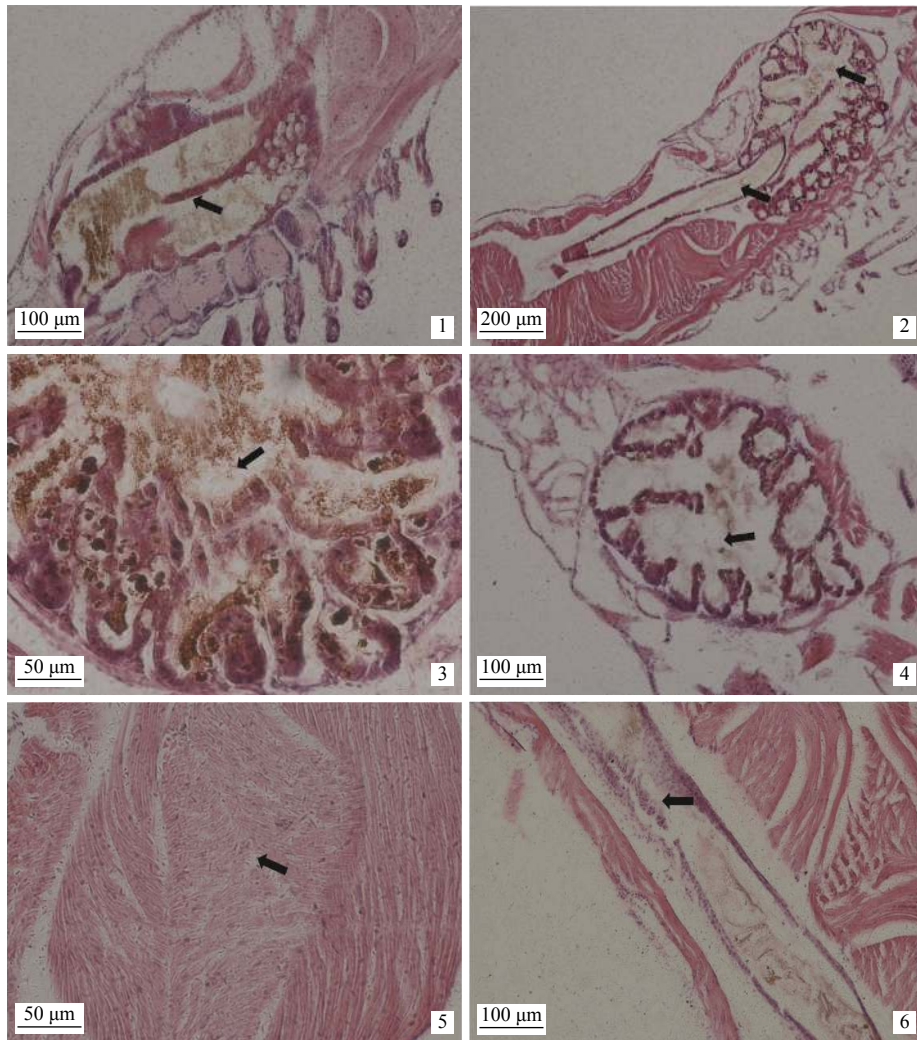
图 1 基于 16S *rDNA*(a) 和 *gyrB* (b) 的菌株 Lv-A 和 Lv-B 系统进化树Fig. 1 Phylogenetic trees of Lv-A and Lv-B based on 16S *rDNA* (a) and *gyrB* (b)

(图版 III-3); 坏死的组织聚集形成大量的电子密度较高的黑化颗粒(图版 III-6)。肠道绒毛膜上皮细胞坏死、脱落, 仅留下残存的固有层基质, 充斥着大量的组织碎片和细菌颗粒; 严重者, 肠道绒毛膜组织大面积脱落, 导致肠壁变薄(图版 III-1)。肌原纤维受损、萎缩, 导致肌束间间隙增大, 部分组织出现崩解现象(图版 III-5)。未发现病毒粒子或病毒包涵体的存在。

2.6 药敏实验

对 Lv-A 和 Lv-B 共进行 38 种药物的敏感性检测, 结果显示, Lv-A 和 Lv-B 的药物敏感性存

在一定的相似性, 在所检测的 38 种药物中, Lv-A 和 Lv-B 对红霉素、四环素、新霉素、吡哌酸、克拉霉素、乙酰螺旋霉素等 24 种药物均呈现不敏感特性; Lv-A 和 Lv-B 均对米诺环素、多西环素、萘啶酸敏感, 对新霉素、吡哌酸、乙酰螺旋霉素、链霉素、利福平、复方新诺明耐药。其中, Lv-A 特异性敏感药物为卡那霉素、头孢哌酸, 特异性耐药药物为红霉素、庆大霉素、丁胺卡那; Lv-B 特异性敏感药物为阿奇霉素, 特异性耐药药物为卡那霉素、呋喃唑酮、氯霉素(表 3)。



图版 II 患病凡纳滨对虾虾苗组织病理变化

1. 肝胰腺；2. 肝胰腺和肠道；3. 肝胰腺；4. 肝胰腺；5. 肌肉；6. 肠道 (用箭头指示)

Plate II The pathological changes of *L. vannamei* larvae associated with bacterial infection

1. hepatopancreas; 2. hepatopancreas and intestinal tract; 3. hepatopancreas; 4. hepatopancreas; 5. muscles; 6. intestinal tract (arrow mark)

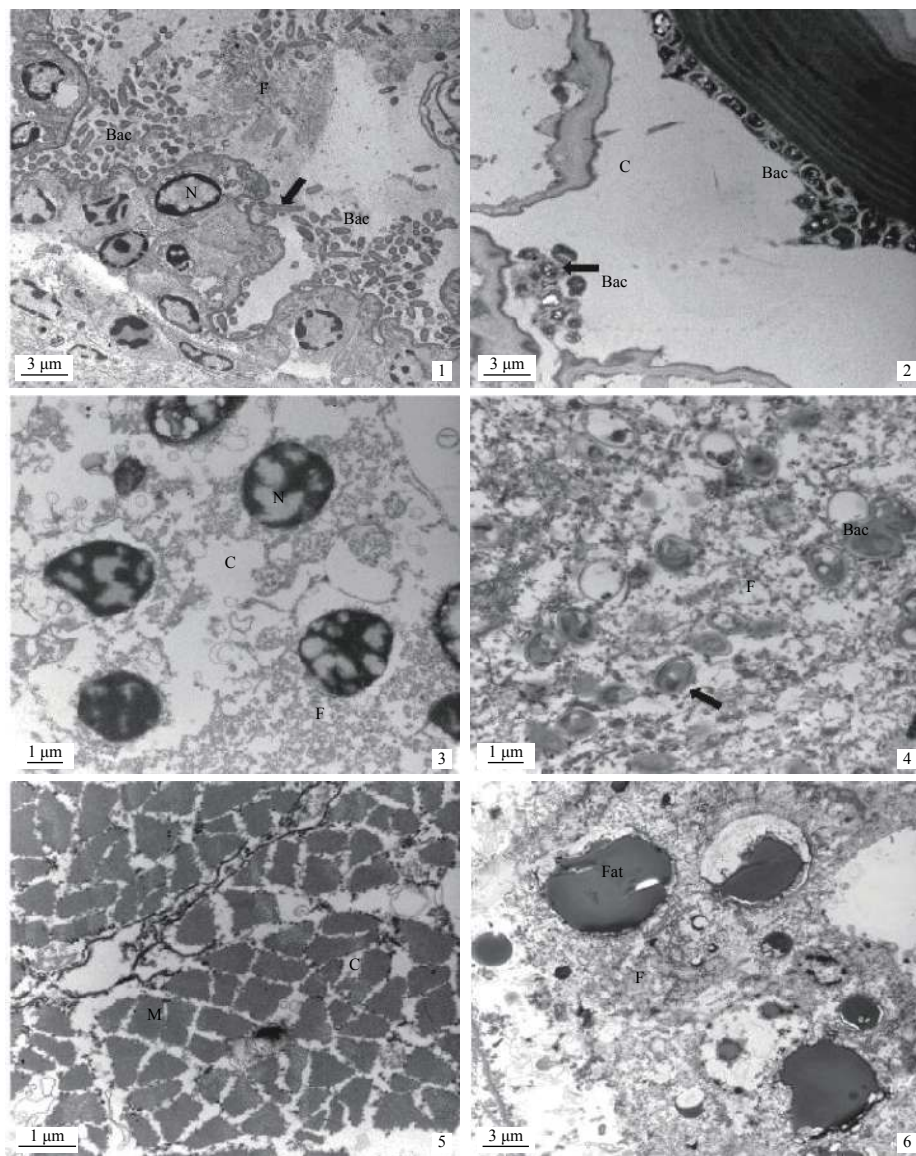
3 讨论

对虾育苗期间，幼体多次变态，饵料类型转换频繁，水体环境因子波动等因素均会导致苗种产生应激反应，进而增大病原菌侵染风险。本实验从导致对虾苗种玻璃化现象追踪入手，开展病原、病理学分析，自患有典型玻璃化症状的虾苗中分离得到 2 株弧菌，并通过人工感染实验证实该 2 株细菌是导致对虾玻璃化的致病原，菌株 Lv-A 和 Lv-B 浸浴感染均可导致虾苗产生与自然发病一致的症状，对凡纳滨对虾虾苗的 LD₅₀ 为 1.62×10^3 和 5.38×10^3 CFU/mL。根据流行病学特征和致病原种类，实验将该病命名为“虾苗细菌性玻化症”。

<https://www.china-fishery.cn>

细菌鉴定结果显示，基于不同数据库和鉴定基因，菌株 Lv-A 与溶藻弧菌、新喀里多尼亚弧菌和副溶血弧菌均有较高相似性；菌株 Lv-B 与溶藻弧菌和副溶血弧菌相似性较高。新喀里多尼亚弧菌是新近报道的一株与溶藻弧菌和需钠弧菌 (*V. natriegens*) 具有高相似性的弧菌，其分泌的胞外产物对涉海类材料具有一定的缓蚀作用^[13-16]。同时，于士翔等^[17]发现新喀里多尼亚弧菌是导致单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 患病死亡的致病原。溶藻弧菌和副溶血弧菌同属 *Harveyi* clade，报道表明，*Harveyi* clade 共包括轮虫弧菌、副溶血弧菌、哈佛氏弧菌、蓝弧菌 (*V. azureus*)、*V. sagamiensis*、坎氏弧菌、欧文氏弧菌、

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



图版III 患病凡纳滨对虾超微组织病理特征

1. 肠道, 2. 胃膜与肝胰腺间隙, 3. 肝小管上皮细胞, 4. 肝胰腺, 5. 肌肉, 6. 组织碎片和脂肪滴 (用箭头指示); F. 组织碎屑, Bac. 菌体, C. 空腔, N. 细胞核, M. 肌纤维, Fat. 脂肪滴

Plate III The ultrastructural pathology characteristics of *L. vannamei* larvae associated with bacterial infection

1. intestinal tract, 2. gastric membrane and hepatopancreas space, 3. hepatic tubular epithelial cells, 4. hepatopancreas, 5. muscles, 6. tissue fragments and fat droplets (arrow mark); F. tissue fragments, Bac. bacteria, C. cavity, N. nucleus, M. muscle fiber, Fat. fat droplets

溶藻弧菌、需钠弧菌、茉莉弧菌 (*V. jasicida*) 和贻贝弧菌 (*V. mytili*) 共 11 种^[18-19]。由于 *Harveyi* clade 内菌株的基因型相似性较高 (16S *rDNA*>97.6%, DNA-DNA reassociation values 约 70%), 常规的 16S *rDNA* 和 SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) 等技术无法将 *Harveyi* clade 内的菌株进行准确的区分和鉴定^[20-21]。Pascual 等^[22] 和 Cano-Gomez 等^[23] 的研究表明, 利用多位点序列分析

(MLSA) 的方法可将 *Harveyi* clade 内具有较高基因相似性的菌株进行鉴定分析。Bachand 等^[24] 通过全基因组测序技术对多株南美白对虾病原性 *Harveyi* clade 菌株进行种间差异性鉴定及其遗传特性分析。本实验中, 菌株 Lv-A 和 Lv-B 在不同鉴定基因和数据库中分别被鉴定为新喀里多尼亚弧菌、溶藻弧菌或副溶血弧菌, 无法确定病原菌株种类, 但同属于 *Harveyi* clade 菌株。后续

表 3 菌株 Lv-A 和 Lv-B 对抗生素的敏感性

Tab. 3 The drug sensitivity of Lv-A and Lv-B to different kinds of antibiotics

药物名称 antibiotics	药物含量/($\mu\text{g}/\text{片}$) contents	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition		敏感度 sensitivity	
		Lv-A	Lv-B	Lv-A	Lv-B
红霉素 erythromycin	15	12	15	R	I
米诺环素 minocycline	30	24	25	S	S
多西环素 doxycyclin	30	19	21	S	S
四环素 tetracycline	30	14	13	I	I
新霉素 neomycin	30	12	12	R	R
吡哌酸 pipemidic	30	15	17	R	R
萘啶酸 nalidixic acid	30	22	27	S	S
阿奇霉素 azithromycin	15	14	22	I	S
克拉霉素 clarithromycin	15	15	17	I	I
乙酰螺旋霉素 acetylspiramycin	30	0	0	R	R
链霉素 streptomycin	10	0	0	R	R
卡那霉素 kanamycin	30	18	0	S	R
庆大霉素 gentamycin	10	12	14	R	I
丁胺卡那 amikacin	30	13	14	R	I
头孢哌酸 salbactam acid	75/75	22	18	S	I
利福平 rifampicin	5	12	12	R	R
呋喃唑酮 furazolidone	30	15	11	I	R
复方新诺明 paediatric compound sulfamethoxazole tablets	23.75/1.25	0	0	R	R
新生霉素 novobiocin	30	18	23	I	S
多粘菌素B bpolymyxin B	300IU	10	0	R	R
氟罗沙星 fleroxacin	5	22	27	S	S
诺美沙星 lomefloxacin	10	14	22	R	S
环丙沙星 ciprofloxacin	5	19	25	I	S
氧氟沙星 ofloxacin	5	21	23	S	S
诺氟沙星 norfloxacin	10	17	20	S	S
头孢唑肟 ceftizoxime	30	15	20	R	R
头孢噻肟 cefotaxime	30	17	21	R	R
头孢曲松 ceftriaxone	30	18	20	R	I
头孢他啶 ceftazidime	30	13	10	R	R
头孢拉定 cefradine	30	0	0	R	R
青霉素 penicillin	10	0	0	R	R
苯唑西林 oxacillin	1	0	0	R	R
氨苄西林 ampicillin	10	0	0	R	R
头孢氨苄 cefalexin	30	0	0	R	R
头孢唑啉 cefazolin	30	0	10	R	R
氯霉素 chloromycetin	30	16	12	I	R
恩诺沙星 enrofloxacin	10	16	21	I	S
氟苯尼考 florfenicol	30	16	21	I	S

注: R. 耐药; I. 居中; S. 敏感

Notes: R. resistance; I. intermediate; S. sensitivity

将通过多种生物学方法和组学技术对菌株 Lv-A 和 Lv-B 做进一步鉴定分析。

石蜡组织病理和超微组织病理分析是疾病

学研究的重要范畴^[10-12]。电镜观察发现,弧菌感染虾苗后可在其体表发现大量附生细菌,肝小管上皮细胞溶解、崩裂和坏死,肝胰腺小管内

可见大量杆状或球状细菌^[25]。哈维氏弧菌和副溶血弧菌感染导致的虾苗早期死亡综合症组织病理表现为肝胰脏异常肿大, 颜色呈淡黄色, 腺细胞间隙变大, 细胞缩水变小, 有一定的自溶现象, 管壁组织脱落并散落于肠腔内^[26]。副溶血弧菌感染导致的对虾急性肝胰腺坏死病 (AHPND) 组织病理表现为肝胰腺组织坏死脱落形成空腔、肝小管组织间出现血细胞浸润现象、肝小管间隙内可见大量细菌^[27]。患有典型玻化症的虾苗肝胰腺萎缩, 肝小管组织大面积坏死、脱落, 留有大面积的空白区域; 肠绒毛膜脱落、消失。超微组织病理检测显示, 肝小管上皮细胞的细胞膜消融, 细胞与细胞间界限模糊, 细胞器解体, 细胞核固化, 细胞解体呈碎片并脱落到肝小管内。同时, 超微病理学分析未发现病毒粒子或病毒包涵体的存在, 且患病虾苗肠道、肝胰腺及胃膜与肝胰腺膜间隙内发现大量细菌, 优势菌株为呈弧形的杆状菌, 进一步佐证了沧州地区虾苗细菌性玻化症是一种由细菌而非病毒导致的对虾苗种细菌性疾病。

综上所述, 本实验完成了对虾虾苗细菌性玻化症的病原、病理以及防治药物的初步分析。结果显示, 虾苗细菌性玻化症可能是一种由多种致病原联合感染导致的虾苗细菌性疾病, 也进一步表明其他地区对虾细菌性玻化症的致病原可能存在多样性。在此基础上, 后续仍需进行病原及其致病机制的深入分析。同时, 为适应绿色养殖和产业质量安全的需要, 按照细菌性致病原的疾病特性, 以生物安保为指导, 提高选购无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 亲虾、加强苗种检疫、减少长距离苗种运输、做到提前预防、高效治疗等防控理念, 以期实现对对虾苗 BVS 的有效防治。

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [2] Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, *et al.* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries <https://www.china-fishery.cn>
- Vibriosis associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2592-2597.
- [3] FAO. Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America[R]. Rome: FAO, 2003: 450.
- [4] Kumar B K, Deekshit V K, Raj J R M, *et al.* Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 247-251.
- [5] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [6] 郑晓叶, 许俊榆, 郑天伦, 等. 浙江省南美白对虾苗种五种流行病原检测与分析[J]. *中国动物检疫*, 2018, 35(8): 17-22.
- Zheng X Y, Xu J Y, Zheng T L, *et al.* Detection and analysis on five kinds of pathogens in white shrimp (*Penaeus vannamei*) in Zhejiang Province[J]. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35(8): 17-22(in Chinese).
- [7] 叶键, 许婷, 施礼科, 等. 3种虾肝肠胞虫PCR检测方法的应用比较分析[J]. *水产科学*, 2019, 38(3): 411-415.
- Ye J, Xu T, Shi L K, *et al.* Comparison of three PCR methods for detection of Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(3): 411-415(in Chinese).
- [8] Finney D J. The median lethal dose and its estimation[J]. *Archives of Toxicology*, 1985, 56(4): 215-218.
- [9] 王凯, 王印庚, 姜勇, 等. 一株感染深水网箱养殖许氏平鲷的病原菌分离与鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 119-126.
- Wang K, Wang Y G, Jiang Y, *et al.* Isolation, identification, and biological characteristics of a pathogenic bacterial strain from cage-cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 119-126(in Chinese).
- [10] 郝继光, 王印庚, 廖梅杰, 等. 饲料中添加3种不同投入品对筏式浅海网箱刺参 (*Apostichopus japonicus*) 养殖生长的影响[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 102-110.
- Hao J G, Wang Y G, Liao M J, *et al.* The effects of three

- types of feed supplements on the growth of *Apostichopus japonicus* cultured in cages[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 102-110(in Chinese).
- [11] 张正. 养殖半滑舌鳎常见疾病的病理学观察与感染微生物生态分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Zhang Z. Study on histopathology and infectious microbiology of common diseases in cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [12] 安沛, 王印庚, 廖梅杰, 等. 金乌贼幼体弧菌性坏死病的病原、组织病理特征和药物敏感性[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 193-202.
An P, Wang Y G, Liao M J, et al. Histopathological characteristics, pathogen, and drug sensitivity of vibriotic necrosis disease in the golden cuttlefish (*Sepia esculenta*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 193-202(in Chinese).
- [13] Chalkiadakis E, Dufourcq R, Schmitt S, et al. Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov, from New Caledonia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(6): 1702-1712.
- [14] Lin T, Gómez-Betancur I, Guo S X, et al. Complete genome of *Vibrio neocaledonicus* CGJ02-2, an active compounds producing bacterium isolated from south China sea[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(10): 2665-2673.
- [15] Moradi M, Song Z L, Xiao T. Exopolysaccharide produced by *Vibrio neocaledonicus* sp. as a green corrosion inhibitor: production and structural characterization[J]. *Journal of Materials Science & Technology*, 2018, 34(12): 2447-2457.
- [16] Moradi M, Song Z L, Xiao T. Introducing a novel bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp., with the highest corrosion inhibition efficiency[J]. *Electrochemistry Communications*, 2015, 51: 64-68.
- [17] 于士翔, 纪元, 李新, 等. 一株单环刺螠致病弧菌的分离鉴定、生长特性研究及药敏分析[J]. *海洋科学*, 2019, 43(7): 112-121.
Yu S X, Ji Y, Li X, et al. Isolation, identification, characterization, and sensitivity analysis of gut pathogenic *Vibrio* of *Urechis unicinctus*[J]. *Marine Sciences*, 2019, 43(7): 112-121(in Chinese).
- [18] Busico-Salcedo N, Owens L. Virulence changes to *Harveyi* clade bacteria infected with bacteriophage from *Vibrio owensii*[J]. *Indian Journal of Virology*, 2013, 24(2): 180-187.
- [19] Ruwandeepika H A D, Jayaweera T S P, Bhowmick P P, et al. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 59-74.
- [20] Turner J W, Tallman J J, Amanda M, et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio diabolus* and six taxonomic synonyms: a first look at the distribution and diversity of the expanded species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1893.
- [21] Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson F L. Inferring the evolutionary history of *Vibrios* by means of multilocus sequence analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21): 7932-7936.
- [22] Pascual J, Macián M C, Arahal D R, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S *rRNA*, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 154-165.
- [23] Cano-Gomez A, Høj L, Owens L, et al. Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(8): 561-565.
- [24] Bachand P T, Tallman J J, Powers N C, et al. Genomic identification and characterization of co-occurring *Harveyi* clade species following a vibriosis outbreak in Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734628.
- [25] 宋庆云, 罗挽涛, 王文兴, 等. 中国对虾虾苗体表细菌的扫描电镜和病理学观察[J]. *海岸工程*, 1997, 16(1): 36-40.
Song Q Y, Luo W T, Wang W X, et al. Scanning electron microscope and pathological studies on the adherent bacteria of surface cuticle of *Penaeus chinensis* during hatching period[J]. *Coastal Engineering*, 1997, 16(1): 36-40(in Chinese).
- [26] 苏树叶. 凡纳滨对虾“早期死亡综合症”的初步研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
Su S Y. Preliminary study on the early mortality syndrome of *Penaeus vannamei* [D]. Hainan University, 2013.

- drome of *Litopenaeus vannamei*[D]. Haikou: Hainan University, 2013 (in Chinese).
- [27] Lai H C, Ng T H, Ando M, *et al.* Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006-1014.

Pathogens and histopathological characteristics of shrimp postlarvae bacterial vitrified syndrome (BVS) in the *Litopenaeus vannamei*

WANG Yingeng, YU Yongxiang*, LIU Xiao, ZHANG Yonggang, ZHANG Zheng, LIAO Meijie, LI Bin, CAI Xinxin, RONG Xiaojun, LUO Kun

(Qingdao National Laboratory for Marine Sciences and Technology, Laboratory for Marine Fisheries and Food Production Processes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The shrimp postlarva vitrified syndrome broke out in spring of 2020 and spread explosively along the coastal areas from south to north of China. In order to find out the main pathogenic agents of shrimp postlarva vitrified syndrome, in this study, the pathogen was isolated and identified, and the histopathology was investigated. The postlarva symptoms included emaciation, dark cloud, decreased activity, anorexia, empty intestinal tract and stomach. The hepatopancreas showed atrophy, blurring of contour, paleness and even vitrified syndrome. Histopathological analysis showed that the epithelial cells of liver tubule were necrotic and exfoliated, liver tubule was filled with a large amount of debris tissue, leaving continuous glassy homogeneous areas. The intestinal tract was filled with tissue fragments, chorionic membrane fell off and even disappears. Ultrastructural pathological examination showed that the membranes of epithelial cells were ablated, organelles disintegrated, and nuclei were solidified. Subsequently, the cells disintegrated, fell off, and even the hepatic tubular tissue structure was ablated. The bacteria were found in the hepatopancreas, intestinal tract and gastric mucosa. The dominant strain was rod-shaped and curved, and no virions were found. Two dominant bacteria (Lv-A, Lv-B) were isolated from the diseased shrimp postlarvae. Artificial infection experiments illustrated that the strains of Lv-A and Lv-B were the causative pathogens with a median lethal dose of 1.62×10^3 CFU/mL and 5.38×10^3 CFU/mL, respectively. Based on molecular analyses (16S *rDNA* and *gyrB*), Lv-A and Lv-B were highly similar to *Vibrio alginolyticus*, *V. neocaledonicus* and *Vibrio parahaemolyticus*, preliminarily named shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome (BVS). The chemotherapeutant sensitivity tests illustrated that Lv-A and Lv-B were sensitive to minocycline, doxycycline, nalidixic acid, etc. and resistant to neomycin, pipemidic, rifampicin, etc. This study provides theoretical basis and technical support for the effective prevention of BVS and the healthy development of shrimp industry.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; shrimp postlarvae; bacterial vitrified syndrome (BVS); *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio neocaledonicus*; *Vibrio parahaemolyticus*; histopathology

Corresponding author: YU Yongxiang. E-mail: yuyx@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R&D Program of China (2019YFD0900102); Taishan Industry Leading Talent (LJNY201802); The Special Funds of Innovation-driven Development of Guangxi (AA17204081-4); The Policy Guidance Program of Jiangsu Province (SZ-LYG202028)