

眼斑拟石首鱼暴发性传染病病原初步研究

李凯彬, 石存斌, 李新辉, 黄志斌, 余德光

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘 要: 1999年8~10月广东沿海网箱养殖的眼斑拟石首鱼(*Sciaenop ocellatus*)流行一种暴发性传染病, 经抗菌药或杀虫剂处理均无效。为查明病因, 取病鱼镜检, 未发现寄生虫, 也分离不到细菌。电镜观察, 可见病鱼的脾脏细胞内有截面为六边形、直径约150 nm的病毒颗粒, 且脾、肝、肾都有一定程度的病变; 用2对日本所报道的虹彩病毒特异引物进行PCR扩增, 在病鱼的脾脏样品中扩增出2条大小与所报道的虹彩病毒扩增产物吻合的特征带, 故初步认定虹彩病毒是眼斑拟石首鱼暴发性传染病的主要致病原。

关键词: 眼斑拟石首鱼; 暴发性传染病; 虹彩病毒; PCR检测

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)01-0056-04

鱼类病毒病的流行给鱼类养殖业带来极大的危害, 如鲢鳙鱼类IPNV的感染, 造成鱼苗、鱼种很高的死亡率。据研究, IPNV能感染37种硬骨鱼类(包括海水鱼和淡水鱼)及3种虾类^[1], 引起近乎世界范围的流行, 给鱼病的防治带来困难。在海水网箱养殖中, 由于单位体积密度高且水流动性较大, 1种病毒危害多种鱼类的现象更是明显: 野田村病毒(Nodavirus)在太平洋、印度洋、地中海等地区感染石斑、鲷鱼、鲈鱼、虎斑等19种以上鱼类^[2]; 淋巴囊肿病毒(Lymphocystivirus)危害鲷、鲷等鱼类, 使其商品价值下降; 虹彩病毒(Iridovirus)感染石斑、石鲷、真鲷、条纹鲷、鲷鱼、鲈鱼、虎斑等不同科的多种鱼类, 且在日本、韩国、印尼、台湾等地都有流行^[3-6], 在内地真鲷幼鱼中也发现与虹彩病毒相似的病毒粒子^[7]。因而, 病毒病对海水网箱养殖的影响是不容忽视的。

眼斑拟石首鱼, 俗称美国红鱼(*Sciaenop ocellatus*), 是近年引进的养殖品种, 商品价值较高, 在福建、广东沿海多有养殖。通常美国红鱼病害较少, 但1999年8~10月, 广东省沿海发生了网箱养殖的美国红鱼暴发性死亡。先是在个别网箱开始发病, 继

而蔓延至整个养殖海区的美国红鱼, 具有明显的传染性; 发病网箱初期只是几尾发病, 接着死亡数量逐渐增多, 到后期, 有的网箱内鱼几乎全部死亡, 危害程度极为严重。发病期间, 养殖海区水质无大的变化, 其他养殖鱼类也未发现不正常死亡。美国红鱼发病后, 经抗菌药和(或)杀虫药处理均无效。为弄清发病原因, 除常规寄生虫检查和病原菌分离外, 还进行电镜观察和PCR检测。

1 材料和方法

1.1 病鱼来源和症状

发病鱼取自广东省阳江闸坡鱼排, 长约10 cm, 体重约20 g。病鱼漂浮于水面, 反应迟缓, 体色变深, 鳃丝苍白; 肝脏颜色变白, 呈失血状。

1.2 寄生虫检查

常规显微镜检查病鱼体内外寄生虫。

1.3 细菌分离培养

将濒死的病鱼用水冲洗干净, 消毒后用营养琼脂、2116E海水等培养基对鱼血液、肝、脾、腹腔等部位进行细菌分离、培养。

1.4 电镜观察

取病鱼肝、脾、肾, 切成约1 mm³块, 用2.5%戊二醛和1.0% 锇酸双重固定, Spurr包埋, LKB超薄切片机切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 于JEM100-CX II透射电镜下观察^[8]。

收稿日期: 2001-03-01。

基金项目: 国家海洋863资助项目(2001 AA 620205); 广东省自然科学基金资助项目(010675)。

作者简介: 李凯彬(1973-), 男, 助理研究员, 从事鱼病研究。

1.5 PCR检测

1.5.1 引物设计 在电镜观察的基础上,参照 Kurita 方法^[9],合成 2 对引物:1-F 5' TACAACATGCTCCGCCAAGA3', 1-R 5' GCGTTAAAGTAGTGAGGGCA3'; 2-F 5' CAAACCACAGCGCGGCAAGT3', 2-R 5' AGTAGCGCACCATGTCCTCC3'。

1.5.2 PCR 过程 取病鱼脾脏,冰浴匀浆,10 000 g 离心,去除细胞核、线粒体等细胞器和残渣,上清液用 RNase 和 DNase 处理后,100 000 g 离心获得沉淀,将沉淀悬于 PBS 中,加上终质量分数为 1% 的 SDS 和质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K,60 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,用酚、氯仿各抽提 2 次,用 2 倍体积的无水乙醇沉淀上清液中的核酸。离心,沉淀核酸干燥后用重蒸水溶解,作为 PCR 模板。PCR 法参照林万明^[10],引物 60 nmol/L, Taq 聚合酶 2.5 U, 4XNTP 各 20 mmol/L, Mg^{2+} 750 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 反应体积为 50 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 4 min 后,按 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 循环 30 次,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7

min。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖中电泳鉴定。

2 结果

2.1 寄生虫检查和细菌分离

鳃、腹腔、肠及体表经常规显微镜检查,未见寄生虫。

多种培养基上进行细菌分离,未见有细菌菌落生长。

2.2 电镜观察结果

电镜下观察到病鱼脾脏细胞内有许多病毒颗粒,病毒颗粒截面呈六边形,核衣壳直径约 150 nm,核中心约 90 nm 的电子致密区,膜与中心之间为电子非致密区,病毒位于细胞质内,有的成片存在,有的分散存在(图 1、2);肝脏和肾脏暂时未发现有病毒颗粒。病鱼的脾脏、肾脏和肝脏均有一定程度的病变,病变的脾脏细胞出现核浓缩,线粒体、内质网肿胀,有的细胞超微结构几乎全部破坏,细胞出现纤维化现象(图 3);肝脏细胞的内质网、线粒体也严重

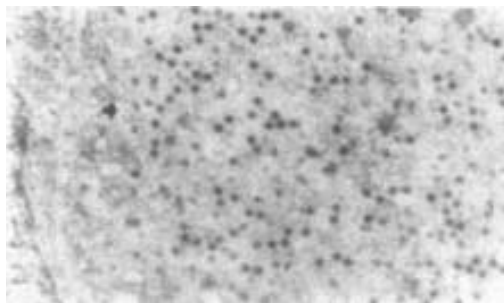


图 1 病鱼脾脏细胞内的病毒($\times 11\ 000$)

Fig. 1 Virons in *Sciaenop ocellatus* spleen cells

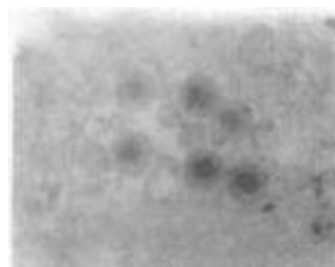


图 2 病毒颗粒截面呈六边形($\times 40\ 000$)

Fig. 2 Viron showing hexagon in section

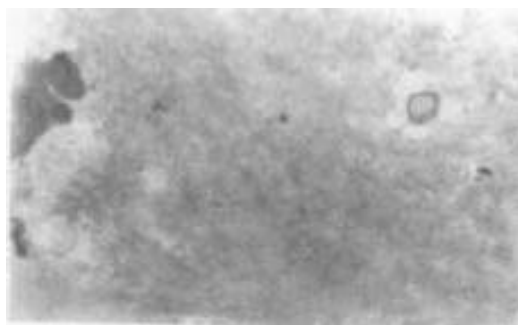


图 3 病鱼脾脏组织纤维化,有 1 分散病毒粒子($\uparrow$)($\times 10\ 000$)

Fig. 3 Tissues showing fibrosis in *Sciaenop Ocellatus* spleen

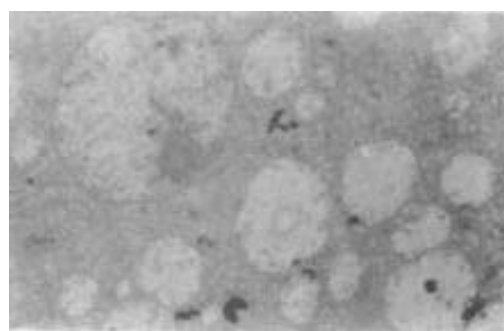


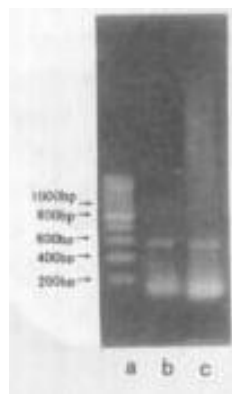
图 4 病鱼肝脏组织,线粒体、内质网肿胀($\times 45\ 000$)

Fig. 4 Mitochondria and endoplasmic reticulum ocellatus spleen swelling in *Sciaenop ocellatus* liver

肿胀, 线粒体内部的嵴等结构完全被破坏(图4)。

2.3 PCR 检定

引物 1 在病鱼脾脏组织中扩增出 1 个片段, 约为 560 bp, Kurita^[9]报道此对引物在 *Pagrus major* 虹彩病毒中得到的扩增片段为 564 bp; 引物 2 在病鱼脾脏组织中也扩增出 1 个约 560 bp 的片段, 此对引物在 *Pagrus major* 虹彩病毒 ATPase 基因 ORF 中扩增出片段为 563 bp, 这与本实验 2 对引物的扩增结果基本一致。



a. DNA 标准分子量 DNA marker; b. 引物 1 扩增出的片段 Fragment amplified by primers 1; c. 引物 2 扩增出的片段 Fragment amplified by primers 2

图 5 2 个 PCR 扩增片段

Fig 5 Two PCR amplified fragments

3 讨论

通过对多尾病鱼多个部位的细菌分离, 均未分离到细菌, 且一旦发病, 用多种抗菌药物均无效果; 体表、鳃、内脏也未发现有寄生虫; 电镜观察发现脾脏中有病毒粒子, 说明病毒感染很可能是眼斑拟石首鱼暴发性死亡的原因。

从病鱼的死亡症状看, 眼斑拟石首鱼的暴发性传染病与鳊鱼的暴发性传染病极为相似, 都是鳃丝苍白, 肝脏呈失血状; 初步的结果显示, 眼斑拟石首鱼和鳊鱼一样, 病毒主要在脾脏, 且大小、形状相似^[11], 此两种病毒的分类位置是否接近, 还需对其生物学特性及发病机理进行深入研究。日本也有报道多种海水鱼(*Pagrus major*, *Erynnis japonica*, *Oplegnathus punctatus*, *Latelabrax* sp., *Seriola quinqueradiata*, *Seriola anreovittata*, *Caranx delicatissimus*, *Takifugu rubripes*)感染虹彩病毒^[3,4], 已对

其某些序列深入研究, 且可通过 PCR 法检测。眼斑拟石首鱼暴发性传染病的发病症状及病毒粒子的形状, 都与其他海水鱼感染虹彩病毒的情况大体一致, 据此推测, 在眼斑拟石首鱼中观察到的病毒也可能为虹彩病毒, 因而根据 Kurita 的报道^[9], 分别合成了针对 *Pst* I 酶切片段和 ATPase 基因 ORF 的 2 对特异性引物, 并在病鱼脾脏组织中各扩增出 1 个约 560 bp 的片段。Kurita^[9]设计的引物在 *Pagrus major* 虹彩病毒的 *Pst* I 酶切片段扩增出 564 bp 的片段, 在 ATPase 基因 ORF 扩增出 563 bp 的片段。本实验结果与 Kurita^[9]报道极吻合, 所以初步认为此种病毒是虹彩病毒。由于琼脂糖电泳难以精确到 1 个 bp, 所以我们将继续克隆所得扩增片段, 测出其序列, 以进一步确定此病毒的种类, 并比较与其他虹彩病毒的同源性。

参考文献:

- [1] Hill B J. Infectious pancreatic virus and its virulence in microbial disease of fish[M]. London: Roberts R J Academic Press, 1983. 7-45.
- [2] Arimoto M, Mori K, Nakai T. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex*[J]. J Fish Dis, 1993, 16: 461-469.
- [3] Nakajima M, Sorimachi. Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus[J]. Fish Path, 1995, 30(1): 47-52.
- [4] Nakajima K, Minoru Sorimachi. Biological and physico-chemical properties of iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*[J]. Fish Path, 1994, 29(1): 29-33.
- [5] Lai Y-S, Mulali S, Ju H-Y. Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper and partial characterization of grouper iridovirus[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 379-388.
- [6] Jung S J, Oh M J. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch in southern coastal areas of the Korean peninsula[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 223-226.
- [7] 何爱华, 郑永和, 郭永健, 等. 真鲷幼鱼狂游症病毒病原学初步研究[J]. 中国水产科学, 1998, 15(1): 127-129.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 205-253.
- [9] Kurita Jun, Kazuhiro Nakajima, Ikuro Hirano. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV)[J]. Fish Path, 1998, 33(1): 17-23.
- [10] 林万明, 杨瑞霞, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995. 8-147.
- [11] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊鱼暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 56-60.

Pathogen of infective outbreaking disease in *Sciaenop ocellatus*

LI Kai-bin, SHI Cun-bin, LI Xin-hui, HUANG Zhi-bin, YU De-guang

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: From Aug. to Oct. 1999, a kind of infective outbreaking disease occurred in seawater-cage cultured *Sciaenop ocellatus* along Guangdong coastal sea. Neither parasites were found on body surface, gill filaments and other organs by microscope examination, nor pathogenic bacteria isolated from internal organs (such as liver and kidney). However, under the electron microscope, a lot of virus particles were observed, and the virion was hexagon in section and about 150 nm in diameter. Some pathological changes were found in internal organs (spleen, liver, kidney). Using two pairs of PCR primers of *Iridovirus* reported by Jun Kurita, a single DNA band was amplified with each pair of primers, and the expected molecular size was similar to that reported. It indicates that the major pathogen of the infective outbreaking disease in the *Sciaenop ocellatus* is *Iridovirus*.

Key words: *Sciaenop ocellatus*; infective outbreaking disease; *Iridovirus*; PCR diagnosis

《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院渔业综合信息研究中心主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地公开发行的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。本刊为全国优秀水产刊物,2次获全国水产优秀期刊一等奖,1次获全国科技文献检索期刊二等奖,3次获全国科技文献检索期刊三等奖。系《中文核心期刊要目总览》(第3版,2000年)中“水产、渔业”核心期刊评定依据(检索工具)之一。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量3000条以上。每年第1期刊登本刊引用主要期刊一览表。年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。本刊备有自1985年创刊至2001年度的《中国水产文献数据库》光盘和软盘,需要者可来函联系。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行,国内统一刊号:CN 11-2813/S,国际标准连续出版物号:ISSN 1002-1612;邮发代号:18-126,国外代号:BM 4104。每期定价12.00元,全年6期共72.00元。读者既可在当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅(邮局汇款或银行转账均可)。编辑部开户银行:北京工商银行永定路分理处;账号:144428 28;户名:中国水产科学研究院。编辑部地址:北京市永定路南青塔村150号,邮政编码:100039;联系电话:(010)68673921;传真:(010)68676685、68673931;E-mail:zgscwz@mail.cafs.ac.cn 或 zjb_163@163.net。