

# 鳊暴发流行病病毒性病原研究<sup>①</sup>

何建国 翁少萍 黄志坚 曾 慷

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘 要** 患病鳊肾脏、脾脏、肝脏、心脏、鳃中发现二十面体病毒粒子, 肾脏和脾脏是其感染主要器官. 成熟病毒粒子直径 150 nm, 核心球状, 直径 105 nm. 受感染细胞肿大, 直径为正常细胞 3~4 倍, 细胞核萎缩, 为正常细胞核直径 1/3. 病毒粒子部分纯化后, 经腹腔人工感染, 第 7 天开始死亡, 10 d 内死亡率为 100%, 表现与池塘养殖状态相同症状, 并在人工感染鳊肾和脾中电镜观察发现大量相同病毒粒子, 命名为传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV).

**关键词** 鳊, 病毒, 传染性脾肾坏死病毒

**分类号** S 941. 41

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 肉质鲜美, 备受消费者欢迎, 是我国名优淡水养殖品种. 鳊人工繁殖和育苗的成功, 大大推动了鳊养殖业的发展. 随着鳊养殖规模的扩大, 养殖密度的提高, 养殖环境的污染, 以及养殖管理和养殖技术有待改进, 水产养殖的伴侣病害问题也就相继出现, 严重影响鳊养殖业的发展. 到目前为止, 养殖鳊病害种类较多, 有细菌病、病毒病和寄生虫病. 其中细菌性病原有柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris*)<sup>[1]</sup>, 鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)<sup>[2]</sup>, 温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*), 少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*), 脑膜脓毒性金黄杆菌 (*Chryseobacteria meringosepticum*), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*) 和鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)<sup>[1]</sup>. 吴淑勤等<sup>[3]</sup>在患病鳊中发现了直径 150 nm 的球形病毒, 并认为是鳊爆发性传染病的主要病原. 本文从患病鳊中发现了一种二十面体病毒, 并对其组织特异性、致病性等进行了研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 鳊来源

患病鳊取自广东省东莞市 1 个鳊鱼养殖池, 养殖池鳊病害暴发, 取濒死状态鳊. 健康鳊取自广东省南海市 1 个鳊养殖池, 身体质量 200~250 g, 共 16 尾, 先在中山大学生物系鱼池中饲养 1 周, 无病症状, 后移至 3 个可控温水簇箱中, 水体 120 L, 充气, 30℃, 养殖 1 周后无病症用于病毒人工感染, 共分 3 组, 其中 1 组对照, 2 组实验.

① 黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. '98 广东水产养殖与环境学术研讨会, 1998

收稿日期: 1998-06-25 何建国, 男, 36 岁, 教授

## 1.2 病毒粗提液制备

取经电镜确认感染病毒鳜脾和肾, 在冰浴中剪碎, 加 PBS 缓冲液 (pH 7.2, 0.01 mol/L), 每 g 组织加 2 mL PBS, 在冰浴中匀浆, 匀浆后再加 PBS, 最终质量浓度  $m(\text{组织})/g: V(\text{PBS})/\text{mL}$  为 1:10, 然后在  $4^{\circ}\text{C}$  5 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 经  $0.22\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 得滤液, 取少量于普通营养琼脂培养基  $27^{\circ}\text{C}$  条件培养 28 h, 无细菌者用于人工感染. 实验组每尾鳜每 100 g 身体质量腹腔注射 0.1 mL 病毒提取液, 对照组鳜每尾每 100 g 身体质量腹腔注射 0.1 mL PBS.

## 1.3 光镜观察

健康和患病鳜, 解剖分别取其肝脏、肾脏、脾脏、消化管、鳃、心脏、肌肉, 于 Bouin's 液中固定 24 h, 固定组织按组织切片常规技术制备切片, 切片经 HE 染色, 封片后光镜观察.

## 1.4 电镜观察

健康和患病鳜, 解剖分别取其肝脏、肾脏、脾脏、消化管、鳃、心脏, 切成约  $0.5\text{mm}\times 0.5\text{mm}\times 0.5\text{mm}$  大小组织块,  $w=2.5\%$  戊二醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 固定, 经磷酸缓冲液冲洗,  $w=1\%$  锇酸 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 后固定, 按电镜样品常规制备技术, 脱水, 渗透, 包埋和超薄切片, 切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色, 透射电镜观察.

## 1.5 细菌培养

鳜体表经  $70\%$  的酒精消毒处理, 在超净工作台上用无菌器械解剖, 取其肝脏、肾脏、脾脏、心脏、鳃, 于 PBS 中匀浆, 滴样涂布, 或用接种环直接划线于肉汤营养琼脂培养平板, 于  $27^{\circ}\text{C}$  条件下培养 24 h, 观察结果. 病毒粗提液按同样方法细菌培养.

# 2 结果

## 2.1 鳜病毒病病症

鳜病毒病暴发流行与季节有关, 南方 6~11 月是其暴发流行期, 当年 12 月至次年 5 月不发生暴发流行. 在发病期, 活动力弱, 静止塘边, 对外界干扰不敏感, 10 d 内死亡率接近 100%. 患病鳜表现症状为: 头、鳃盖、下颌、眼眶、胸鳍和腹鳍基部、腹部肝区、尾鳍等有出血点; 鳃粘液增多, 糜烂, 暗灰色, 贫血状. 解剖示肝肿大, 灰白色, 或土灰色, 或白灰相间呈花斑状, 有小出血点; 肾脏肿大, 充血, 糜烂, 暗红色; 脾脏肿大, 糜烂, 紫黑色; 空胃, 小肠有黄色透明流晶样物体; 心脏淡红色, 呈缺血状.

## 2.2 病毒感染组织特异性

病毒粒子在宿主细胞质中复制、装配和成熟, 受染细胞肿大, 直径为正常细胞 3~4 倍, 细胞核萎缩 (图 1-1). 病毒感染鳜的肾脏、脾脏、肝脏、心脏、鳃等组织器官, 尤以肾脏和脾脏严重, 细胞感染率达 40% 左右 (图 1-2, 3). 肝脏、心脏和鳃感染轻微, 未对其组织造成损伤 (图 1-4, 5). 消化道也偶见病毒感染, 但不是其主要感染器官.

受病毒感染细胞肿大, 核萎缩, 形状不规则, 直径相当于正常细胞核 1/3. HE 染色, 受染细胞质区呈蓝色, 嗜碱性, 质均一; 细胞核紫黑色. 通过鳜肾脏和脾脏组织切片, HE 染色观察, 组织病理特征为细胞明显肿大, 核萎缩, 质着色均一, 嗜碱性等, 这些特点可以作为鳜病毒检测指标.

### 2.3 病毒粒子形态结构

成熟病毒粒子二十面体,横切面示六边形,直径 150 nm. 成熟病毒粒子由 3 部分组成,由中心向外依次为核衣壳、电子非致密区和囊膜. 核衣壳球形,直径 105 nm,电子非致密区厚 26 nm,囊膜约 20 nm,由 2 层膜性结构组成(图 1-6, 7, 8).

### 2.4 病毒人工感染

健康鳊, 身体质量 200~ 250 g, 共 1 尾, 腹腔注射病毒粗提液, 在 30℃ 条件下饲养, 第 7 天开始死亡, 第 10 天全部死亡, 10 d 内死亡率 100%. 人工感染患病鳊与池塘养殖鳊发病特征相同, 外观表现为头、鳃盖、下颌、眼眶、胸鳍和腹鳍基部出血; 鳃粘液增多, 糜烂. 解剖示肝外观正常, 在肝尖部有出血点; 肾脏肿大, 充血, 糜烂, 呈暗红色; 脾脏肿大, 糜烂, 紫黑色. 濒死前活力减弱, 呼吸频率快, 张口, 不能消化吞食饲料鱼, 饲料鱼整条排出, 形态保持完整. 对照组 5 尾鳊正常, 未发病.

对人工感染病毒呈濒死状态鳊的肝脏、肾脏、脾脏进行细菌培养, 结果阴性, 说明人工感染鳊未有细菌合并感染. 病理检测, 均表现与池塘发病鳊脾脏和肾脏相同的病理特征: 受染细胞肿大, 直径为正常细胞 3~ 4 倍, 核萎缩, 约为正常细胞直径 1/3; 受染细胞 HE 染色呈蓝色, 嗜碱性. 对照组未发现此病理特征. 电镜观察, 在两组织中均发现大量病毒, 检出率为 100%. 在脾脏和肾脏中, 电镜观察未发现细菌等寄生物. 在对照组中, 未检出病毒.

## 3 讨论

1 2

经回归感染, 证明本文发现的是鳊病原. 该病毒具有很强的致病性, 在 30℃ 条件下, 腹腔注射和体表创伤浸泡感染在 7~ 10 d 内死亡率为 100%, 死亡时间比较集中, 由此该病毒致鳊发病呈暴发现象, 由于可以从创伤体表感染, 从而又表现为很强的传染性, 故该病毒是鳊暴发传染性的一种病原.



图 1 ISKNV 感染组织及形态结构

Fig. 1 The structure and histopathology of

ISKNV in *Siniperca chuatsi*

1 受 ISKNV 感染鳊肾细胞, 细胞肿大, 核萎缩 (箭头示)  $\times 165$ ; 2 受 ISKNV 感染的肾脏切片 (箭头示感染细胞)  $\times 83$ ; 3 受 ISKNV 感染的脾脏切片 (箭头示感染细胞)  $\times 83$ ; 4 受 ISKNV 感染的鳃切片 (箭头示感染细胞)  $\times 83$ ; 5 受 ISKNV 感染的心脏切片 (箭头示感染细胞)  $\times 83$ ; 6 ISKNV 感染脾脏电镜照片, 细箭头示病毒发生基质, 粗箭头示鳊脾毛细血管细胞核  $\times 2730$ ; 7 ISKNV 形态结构  $\times 51100$ ; 8 ISKNV 感染鳊肾脏细胞 (箭头示萎缩受感染细胞的细胞核)  $\times 4627$

从形态结构和大小看, 本文发现的病毒与吴淑勤等在鳊中发现的鳊病毒 (*Siniperca chuatsi* virus) 相近, 应属同一种病毒. 根据本文的研究, 该病毒感染肾脏、脾脏、肝脏、鳃和心脏, 主要感染器官是肾脏和脾脏, 严重时细胞感染率达 40% 以上, 并有大量红细胞浸润, 造成肾脏和脾脏糜烂坏死. 肝脏、鳃和心脏偶见细胞感染, 未造成严重伤害. 由于鳊是否仍有其他病毒感染目前还不知道. 这种病毒除感染鳊之外, 同样感染加州鲈鱼和草鱼等, 不仅限于感染鳊鱼, 并且该病毒所造成危害主要是鱼的肾脏和脾脏, 因此建议采用传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 之命名.

ISKNV 为细胞质内寄生的具囊膜二十面体病毒, 直径大小为 150 nm. 根据 1999 年国际病毒分类委员会第 6 次报告, 二十面体病毒共有 36 个科或属, 而具有囊膜的二十面体病毒只有虹彩病毒 (iridoviridae) 和疱疹病毒 (herpesviridae) 2 种<sup>[4]</sup>. 从文献看, 本文所发现的 ISKNV 与流行性造血组织坏死病毒 (epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV)<sup>[5]</sup> 和虹彩病毒所致疾病相似<sup>[6]</sup>, 可能是虹彩病毒.

### 参 考 文 献

- 1 陈昌福, 史维舟, 赵桂珍, 等. 翘嘴鳊烂鳃病原菌的分离及初步鉴定. 华中农业大学学报, 1995, 14 (2): 263~ 266
- 2 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌—鳊鱼暴发性死亡的新病原. 微生物学通报, 1997, 24 (2): 104~ 106
- 3 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究. 水产学报, 1997, 21 (增刊): 56~ 60
- 4 Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy. Archives of Virology, 1995 (Suppl): 1
- 5 Langdon J S. Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. Journal of Fish Diseases, 1989, 12: 295~ 310
- 6 Rodger HD, Knobs M, Macartney A, et al. Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein). Journal of Fish Diseases, 1997, 20: 69~ 70

## Identification of Outbreak and Infectious Diseases Pathogen of *Siniperca chuatsi*

He Jianguo\* Wong Shaoping Huang Zhijian Zeng Kang

**Abstract** A virus was found in spleen, kidney, heart, gut, gill and liver of moribund cultured *Siniperca chuatsi* from Guangdong province by lightmicroscope and electron transmission microscope. The virus has icosahedral symmetry, and is 150 nm in diameter. The main organs of the virus infection are spleen and kidney of *Siniperca chuatsi*, and it caused spleen and kidney necrosis. Experimental infection identify that virus is pathogen of outbreak and infectious disease of cultured *Siniperca chuatsi*, we named it infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV).

**Keywords** *Siniperca chuatsi*, virus, infectious spleen and kidney necrosis virus

\* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China