

传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 感染途径、 宿主范围及对温度敏感性的研究*

S 941.41

曾 慷 何建国** 翁少萍 黄志坚

(广州中山大学生命科学学院, 广州 510275)

侯可挺✓ 罗均任 黄伟平 陈炯恒

(广东省南海市水产局, 广东南海 528200)

摘 要 传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 无细菌滤液通过肌肉注射、划痕浸泡、腹腔注射和口服等四种感染途径, 人工感染健康鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*), 四种途径都能引起典型的传染性脾肾坏死病毒病。通过腹腔注射感染途径, 病毒滤液在 25~34℃ 条件下, 能引起健康鳊鱼发病。另外, 用病毒滤液感染尼罗非鲫 (*Oreochromis niloticus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、乌鳢 (*Ophiocephalus argus*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 和尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 五种鱼, 大口黑鲈能够感染成功, 为 ISKNV 的宿主, 而其它鱼不能感染成功, 不是 ISKNV 的宿主。

关键词 传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV), 感染途径, 宿主范围, 温度敏感性, ISKNV, 鱼类疾病

鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 是一种淡水养殖的名贵鱼类。随着养殖规模和养殖密度的增加, 其发病率也不断上升^[1]。近年, 广东地区养殖鳊鱼普遍发生一种以脾肾肿大为主要症状的传染性强、死亡率高的疾病, 给养殖业造成了很大的危害。吴淑勤等^[2]和何建国等^[3]在病鱼体内观察到一种切面为五角形、六角形、二十面体、直径大约为 150 nm 似虹彩病毒的病毒粒子, 该病毒能够引起宿主细胞肿大, 强嗜碱性, 并且引起脾脏和肾脏坏死。因此, 将此病毒暂命名为传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)。近十几年, 由虹彩病毒引起的淡、海水鱼类的疾病不断增加, 已引起人们的高度重视, 其中一些疾病的病理表现与鳊鱼的 ISKNV 病相似^[4~8]。本研究着重研究 ISKNV 的感染途径、宿主范围和对温度的敏感性。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼来源 健康鳊鱼、乌鳢 (*Ophiocephalus argus*) 和 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 由南海市水产局提供; 尼罗非鲫 (*Oreochromis niloticus*) 和 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 由中山大学鱼类研究室提供; 尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 由东莞水产局提供。所有的实验健康鱼都取自无 ISKNV 发病史的地区, 养殖于本室水泥养殖池中, 温度控制在 28~30℃。

1.2 病毒滤液的制备 取典型的自然发病鳊鱼脾脏和肾脏, 按 1:10 (W/V) 加入 PBS (pH7.2) 和青霉素、链霉素分别为 1000 IU/mL、1000 μg/mL, 冰浴中匀浆 30 min 后, 5000 r/min, 4℃ 离心 30 min, 取上清液经 0.22 μm

* 广东省自然科学基金资助项目

** 通讯作者

滤膜抽滤后,4℃冰箱中保存。并将滤液接种于胰蛋白胨琼脂培养基上,培养温度为30℃,48h后,观察培养基上无细菌生长,此病毒滤液用于人工感染实验。

1.3 感染途径实验 实验共设五组,每组健康鳊鱼5尾,养殖温度为 30 ± 0.5 ℃,充气养殖于本室循环过滤控温水族箱中。(1)肌肉注射组:注射部位为背鳍前侧基部,注射病毒滤液按鱼体重计算为0.1 mL/100 g。(2)腹腔注射组:注射部位为腹鳍基部,注射剂量同肌肉注射组。(3)划痕浸泡组:鳊鱼背部去磷,划破皮肤,面积为1 cm²,在稀释1 000倍病毒滤液中浸泡2 h后,放入水族箱中养殖。(4)口服组:用圆头针头直接插入鱼胃中注射病毒滤液,注射剂量同肌肉注射组。(5)对照组:腹腔注射灭菌PBS,注射剂量按鱼体重计算为0.1 mL/100 g。

1.4 宿主范围实验 实验鱼种类为尼罗非鲫、草鱼、乌鳢、大口黑鲈、尖吻鲈。每种鱼分实验组和对照组,每组健康鱼5尾,实验组感染方法同腹腔注射组,对照组感染方法同上述对照组。另以病毒滤液感染健康鳊鱼作为阳性对照,方法同腹腔注射组。养殖温度为 30 ± 0.5 ℃,充气养殖于本室循环过滤控温水族箱中。

1.5 温度敏感性实验 实验分为20、25、28、30、34℃组和对照组。每组健康鳊鱼5尾,实验组感染方法同腹腔注射组,对照组感染方法同上述对照组,充气养殖于本室循环过滤控温水族箱中。

1.6 病理观察和细菌学检查 取发病濒死鱼,观察体表症状和内脏变化,无菌操作取脾脏、肾脏和肝脏组织块,加少量灭菌PBS,匀浆后,接种于胰蛋白胨琼脂培养基上,30℃培养48h后,观察细菌生长情况。并取肾脏和脾脏组织块,Bouin's液固定,常规石蜡切片,厚度5~6 μm,H-E染色,观察组织病理变化。取发病鱼脾脏于2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,丙酮系列脱水后Epon812包埋,超薄切片,经双重染色后于Philips CM10透射电镜下观察。

2 结果

2.1 感染途径

病毒滤液通过四种感染途径都能够引起健康鳊鱼发病并死亡,死亡率都为100%(见表1)。四种途径中,发病鱼平均感染后死亡时间:肌肉注射组为第10天,划痕浸泡组为第11天,腹腔注射组为第14天,口服组为第22天。濒死鱼表现嘴张大,呼吸加快、加深,身体失去平衡,鳃苍白,脾脏和肾脏肿大,部分鱼体表颜色变黑。组织切片观察,脾脏和肾脏中都能见到由病毒感染引起的强嗜碱性、肿大的细胞(见图1)。透射电镜观察,可见脾脏细胞中有大量切面为五角形和六角形的病毒粒子(见图2)。细菌学检查只有划痕浸泡组和肌肉注射组各有一尾鳊鱼的肾脏有少量细菌,其它鱼都无细菌感染。对照组在30天观察时间内正常。

表1 病毒滤液不同途径感染健康鳊鱼

Table 1 Mardrinfish challenged by different ways

组别 Name of group	尾数 Group size per trial	发病情况 Clinical disease	死亡情况 Deaths	平均死亡时间(d) Average life span	细菌学检查 Bacteriological exam.
肌肉注射组 Intramuscular inoculation	5	5/5	5/5	10	1/5
腹腔注射组 Intraperitoneal inoculation	5	5/5	5/5	14	0/5
划痕浸泡组 Wounded and bath exposure	5	5/5	5/5	11	1/5
口服 Oral inoculation	5	5/5	5/5	22	0/5
对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-

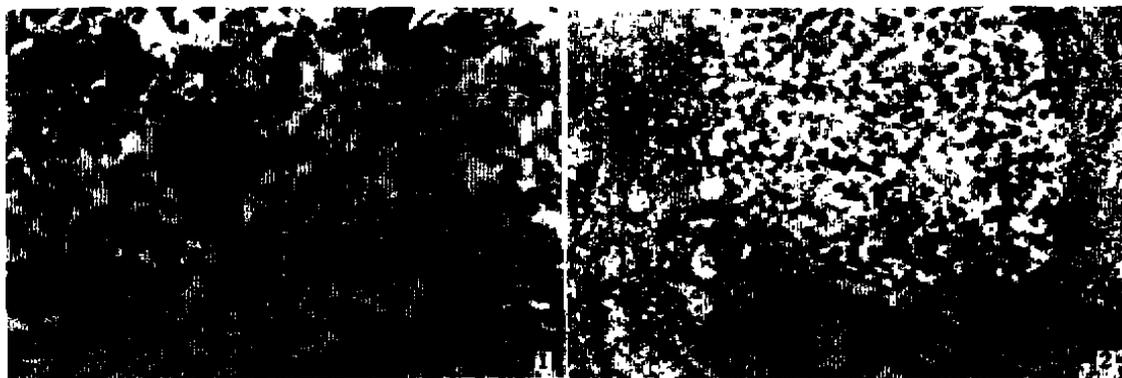


图 1 发病鳊鱼脾脏中的强嗜碱性、肿大细胞

Fig. 1 The basophilic enlarged cells in ISKNV-infected mandarinfish

图 2 透射电镜显示发病鳊鱼脾脏中的大量病毒粒子

Fig. 2 TE micrograph of ISKNV-infected mandarinfish spleen showing numerous five and six-sided virus particles

2.2 宿主范围

5 种鱼腹腔注射病毒滤液后,大口黑鲈对 ISKNV 敏感,发病死亡,死亡率为 100% (见表 2)。平均死亡时间为感染后 17 d。其表现的的症状与鳊鱼的发病症状相似。组织切片中,脾脏和肾脏中能观察到病毒引起的强嗜碱性、肿大的细胞。电镜观察,脾脏细胞中存在大量同发病鳊鱼脾脏中相同的病毒粒子。濒死大口黑鲈的肝脏、肾脏和脾脏都不能检查到细菌,其它实验鱼在注射病毒滤液后 30 d 的观察时间内没有发病,无异常表现,组织病理检测也看不到由 ISKNV 引起的强嗜碱性、肿大的细胞。表明 ISKNV 不但能够感染鳊鱼,还能够感染其它种类的鱼如大口黑鲈,而对另一些种类的鱼不敏感。ISKNV 具有一定的宿主范围。阳性对照鳊鱼,平均在感染后 14 d 发病死亡。

2.3 温度敏感性

在 20、25、28、30 和 34 ℃ 养殖温度下,腹腔注射病毒滤液的健康鳊鱼在 25~34 ℃ 之间都能够发病死亡,死亡率都为 100% (见表 3)。发病鱼平均感染后死亡时间:25 ℃ 组为第 15 天,28 ℃ 为第 9 天,30 ℃ 组为第 9 天,34 ℃ 组为第 11 天,因此病毒滤液引起健康鳊鱼发病的最适养殖温度为 28~30 ℃。发病鱼表现的的症状与前述发病鳊鱼相同,组织切片中,脾脏和肾脏都能观察到病毒感染引起的强嗜碱性、肿大的细胞。电镜观察发病鱼脾脏细胞中存在大量病毒粒子。发病鱼的肝脏、肾脏和脾脏都不能检查到细菌。20 ℃ 组在 30 d 观察时间内正常,组织病理切片检测不到病毒引起的强嗜碱性、肿大的细胞。对照组在 30 d 观察时间内正常。

3 讨论

鱼类病毒病的传播方式,可以分为水平感染和垂直感染两种方式。水平感染主要是通过两种途径发生的。一种是食物,即口和消化道;另一种是通过水传播,鳃和破损的皮肤是感染的主要门户^[9]。ISKNV 滤液从四种不同的人工感染途径感染健康鳊鱼,都能够引起健康鳊鱼发病死亡,表明这两种水平感染的途径都可能存在。鳊鱼是一种肉食性鱼类,主要以小鱼为食。在广东地区鳊鱼养殖中,一般用草鱼、鲢鱼的鱼苗和其它小鱼作为饲料鱼,虽然实验表明

表2 宿主范围实验结果
Table 2 Host ranges of ISKNV

鱼的种类 Species	组别 Name of group	尾数 Group size per trial	发病情况 Clinical disease	死亡情况 Deaths	平均死亡时间(d) Average life span	细菌学检查 Bacteriological exam.
尼罗非鲫 <i>Oreochromis niloticus</i>	实验组 Experiment	5	0/5	0/5	-	-
	对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	实验组 Experiment	5	0/5	0/5	-	-
	对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-
乌鳢 <i>Ophiocephalus argus</i>	实验组 Experiment	5	0/5	0/5	-	-
	对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	实验组 Experiment	5	5/5	5/5	17	0/5
	对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	实验组 Experiment	5	0/5	0/5	-	-
	对照组 Control	5	0/5	0/5	-	-
鳊鱼 <i>Siniperca chautsi</i>	阳性对照组 Positive	5	5/5	5/5	14	0/5

表3 病毒滤液在不同温度下感染健康鳊鱼结果
Table 3 ISKNV challenging healthy mandrinfish under different temperatures

编号 No. of group	养殖温度(℃) Temp. of breeding	尾数 Group size per trial	发病情况 Clinical disease	死亡情况 Deaths	平均死亡时间(d) Average life span(d)	细菌学检查 Bacteriological exam.
1	34	5	5/5	5/5	11	0/5
2	30	5	5/5	5/5	9	0/5
3	28	5	5/5	5/5	9	0/5
4	25	5	5/5	5/5	15	0/5
5	20	5	0/5	0/5	-	-
对照组 Control	30	5	0/5	0/5	-	-

草鱼对 ISKNV 不敏感,但众多其它饲料鱼中不排除有 ISKNV 的保存宿主,因此由食物传播的可能性是存在的。而鳊鱼的养殖,一般采用封闭式养殖方式,当发病鱼存在时,病鱼排出的病毒粒子吸附并感染健康鳊鱼是完全可能的,而水质的恶化更能加剧疾病的流行,很显然,通过水体体表感染途径也是存在的。

ISKNV 滤液对其它五种鱼:大口黑鲈、草鱼、乌鳢、尼罗非鲫、尖吻鲈的感染实验,大口黑鲈对 ISKNV 敏感,而其它四种鱼不敏感。由此可见,ISKNV 具有一定的宿主范围,它不仅能够感染鳊鱼,而且也能够感染其它种类的鱼。

病毒感染鱼使其发病,与鱼生活的水体环境温度有密切的关系,也与病毒发育的最适温度有关^[7,8]。ISKNV在不同温度条件下对健康鳊鱼感染实验结果,表明25~34℃都是ISKNV适合流行的水温,而28~30℃是其最适流行水温,这与广东地区7月至10月的气温高、鳊鱼ISKNV病发病率高是一致的。而20℃条件下,鳊鱼不发生ISKNV病,显然温度是ISKNV病暴发流行的限制性因子。因此生产中,为了预防ISKNV病的暴发流行,应该注意养殖水温的变化,特别在发病温度范围内。而在低于发病的水温时,要注意一些细菌性病的发生。

参 考 文 献

- 1 王春,董斌,刘琳.鳊鱼暴发性流行病病因初探及预防对策.中国水产,1995,(3):24~25
- 2 吴淑勤,李新辉,潘厚军等.鳊鱼暴发性传染病病原研究.水产学报,1997,(增刊):56~60
- 3 何建国,翁少萍,黄志坚等.鳊鱼暴发性传染病病毒病原研究.中山大学学报(自然科学版),1998,(5):25~31
- 4 Inouye K, Yamano K, Maeno Y *et al.* Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathology, 1992, 27:19~27
- 5 Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. J Fish Diseases, 1988, 11:92~96
- 6 Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. First isolation from Australia fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. J Fish Diseases, 1986, 9:263~268
- 7 McGrogan D G, Ostland V E, Byrne P J *et al.* Systemic disease involving an iridovirus-like agent in cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* L.—a case report. J Fish Diseases, 1998, 21:149~152
- 8 Rodger H D, Kobs M, Macantney A *et al.* Systemic iridovirus infection in fresh water angel fish, *Pterophyllus scalare* (Lichtenstein). J Fish Diseases, 1997, 20:69~72
- 9 黄琪琰主编.水产动物疾病学.上海:上海科学出版社,1993.65~85
- 10 Whittington R J, Philbey A, Reddacliff G L *et al.* Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. J Fish Diseases, 1994, 17:205~218
- 11 [英]罗伯茨 R J 主编,李耀祖,华鼎可译.鱼病学教程.北京:农业出版社,1988.123~130

Transmission, Host Range, Temperature Sensibility of Infectious Spleen and Kidney Necrosis (ISKN) Virus from *Siniperca chuatsi*

Zeng Kang He Jianguo Weng Shaoping Huang Zhijian

(School of Life Sciences, Zhong Shan University, Guangzhou 510275)

Hou Keting Luo Junren Huang Weiping Chen Jiongheng

(Nan Hai Aquatic Bureau, Guangdong Province, Nan Hai, Guangdong Province 528200)

Abstract The infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), derived from diseased *Siniperca chuatsi*, was identified that (1) the virus caused ISKNV disease when challenging healthy *Siniperca chuatsi* by four ways: intramuscular inoculation, intraperitoneal inoculation, wounded and bath exposure and oral inoculation; (2) the virus infected healthy *Siniperca chuatsi* under 25~34℃ and the optimum temperature for infection was 28~30℃; (3) *Micropterus salmoides* was susceptibility for the virus, *Oreochromis niloticus*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Ophiocephalus argus* and *Lates calcarifer* are not the host of ISKNV.

Key words Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), Transmission, Host range, Temperature sensibility