

鱼类神经坏死病毒对军曹鱼仔鱼的致病性

闫云锋^{1,2}, 苏友禄¹, 郭志勋¹, 徐力文¹, 冯娟¹, 黄剑南¹, 喻达辉¹

(1.中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2.上海海洋大学生命科学与技术学院, 上海, 200090)

摘要: 为了确定鱼类神经坏死病毒对军曹鱼(*Rachycentron canadum*)仔鱼的致病性, 本研究通过肌肉注射、浸泡和共浴 3 种途径分别感染军曹鱼仔鱼, 观察了由其导致的发病死亡情况和病理学变化。结果表明, 3 种感染途径都能造成军曹鱼仔鱼出现厌食、体色发黑和螺旋游泳等典型的病毒性神经坏死症状, 累计死亡率分别达到 78%、44% 和 34%。肌肉注射 18 h 后, 利用 RT-PCR 方法在鱼的脑、眼、脊髓中均可检测到该病毒。患病鱼的脑、视网膜、脊髓等组织发生空泡化, 与其他鱼类感染该病毒发生的变化一致。因此, 军曹鱼仔鱼是鱼类诺达病毒的易感种群之一, 病毒能通过水平传播感染军曹鱼仔鱼。

关键词: 鱼类神经坏死病毒; 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)仔鱼; 致病性

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)04-0006-05

鱼类神经坏死病毒(Fish nervous necrosis virus, 简称 NNV), 又叫鱼类诺达病毒(Piscine nodavirus), 属于野田村病毒科(Nodaviridae)、乙型野田村病毒属(*Betanodavirus*), 是多种海水鱼类暴发性传染病的致病原。该病毒主要侵害宿主的脑部和视网膜等组织, 由其感染引起的疾病称为鱼类病毒性神经坏死症(Viral nervous necrosis, 简称 VNN), 又称病毒性脑病和视网膜病(Viral encephalopathy and retinopathy, 简称 VER)^[1]。该病毒分布很广, 能感染多种鱼类, 发病期主要集中在海水鱼类种苗生产阶段, 鱼苗死亡率高达 90% 以上, 对成鱼也有较高的致死率, 也能危害网箱养殖的鱼类^[2]。目前, 除非洲以外, 其他各大洲均有海水鱼类受到该病毒感染的相关报道, 受感染的鱼类达 40 余种, 除少数淡水鱼类和虾以外, 绝大多数为海水鱼类, 由于其极高的传染性和危害性, 被世界动物卫生组织(OIE)列为重要的鱼类病害^[3-5]。近年来, 该病毒感染的鱼种类和危害程度呈现不断增加的趋势, 严重影响了世界鱼类养殖业的健康发展。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)俗称海鲷、海龙鱼, 属于鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron*), 主要分布于中国南海、东海及黄渤海, 为暖水性海洋鱼类。该鱼个体大、生长快、抗病性强, 具有较高的营养价值和药用价值^[6], 已成为广东、海南、福建沿海的重要海水养殖

对象, 被称为海水网箱养殖中最有养殖前景的鱼类之一^[7]。Chi 等^[8]从发生大规模死亡的军曹鱼中曾检测到鱼类神经坏死病毒的存在, 但尚未进一步深入的研究。本实验采用肌肉注射、浸泡和共浴 3 种感染途径研究鱼类神经坏死病毒对军曹仔鱼的致病性, 从而为军曹鱼神经坏死病毒流行病学和控制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及饲养条件

试验用健康军曹鱼仔鱼购自海南省三亚市某育苗厂, 平均体质量 3.6 g, 平均体长 6.10 cm ± 0.1 cm。海水静置沉淀 24 h 再经沙滤后使用, 盐度约 30, pH 为 7.8 ~ 8.5, 水温为 25°C ± 1°C。试验过程 24 h 充气, 每天换水 1/2, 并清洗池底。

1.2 病毒液制备

取保存在 -80°C 的患 VNN 赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)鱼苗, 按 1 : 10 加入预冷 PBS(0.1 mol/L, pH7.2), 冰浴充分匀浆, 以 3 000 g,

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2009-04-07

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2003B21502, 2005B20301016)

作者简介: 闫云锋 (1980-), 男, 硕士研究生, 河南驻马店人, 主要从事渔业生物病害防治与研究, 电话: 020-89022636, E-mail: vetsyl@163.com; 郭志勋, 通信作者, E-mail: guozhixun1@163.com

4℃离心 30 min 后, 取上清液以 6 000 g, 4℃离心 1h, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 4℃冰箱保存备用。

1.3 病毒感染及采样

实验分 A、B、C 和 D 4 组, 每组 50 尾健康鱼。A 组肌肉注射病毒液(50 μL/尾); B 组将病毒液用海水稀释为 1 : 1000, 浸泡感染 2 h; C 组为共浴感染组, 即把注射病毒鱼与 50 尾健康鱼共同养殖, 中间用滤网隔开; D 组注射 50 μL PBS 作为对照。

另设各感染实验组对应的采样组, 每组鱼 30 尾, 病毒感染 12、18、24、28、32、36、40、48、72 h 的各组取 3 尾鱼, 实验结束时取样 5 尾, 取鳃、脑、眼、脊髓、肠、肝、脾、肾和肌肉等组织用于组织病理学和 RT-PCR 分析, 实验过程中濒临死亡的鱼也采样保存。

1.4 组织病理切片

鱼样品用 10% 福尔马林固定, 经酒精脱水、二甲苯透明及浸蜡、石蜡包埋、切片、苏木素 - 伊红(H.E)染色后, 中性树胶封片, LEICA DL MB2 显微镜观察拍照。

1.5 病毒核酸的总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测

取患病鱼组织包括鳃、脑、眼、脊髓、肠、肝、脾、肾和肌肉, 用 Trizol 分别提取总 RNA, 采用世界卫生组织(OIE)(第三版)推荐的引物(由上海英骏生物技术公司合成), 应用 RT-PCR 方法检测神经坏死病毒^[5], 其中, 正向引物为: 5-CGTGTCAGT-CATGTGTCGCT-3, 反向引物为: 5-CGAGTCAACA-CGGGTGAAGA-3, 特异性 PCR 产物为 421bp。

2 结果

2.1 实验鱼发病情况及累计死亡率

肌肉注射感染病毒后, 前 3 d 实验鱼活动正常, 从第 4 天开始有部分鱼食欲下降、体色变深或发黑、游动无力、反应迟钝; 随后发病鱼增多, 症状加剧, 身体失去平衡, 有些鱼体弯曲, 呈螺旋状游动。如图 1 所示, 肌肉注射组死亡集中在攻毒后 6~10 d, 浸泡组和共浴组发病临床症状与肌肉注射组相同, 但发病时间较肌肉注射组晚, 累计死亡率较低。实验结束时肌肉注射组、浸泡组、共浴组和对照组的累计死亡率分别为 78%、44%、34%和 4%。

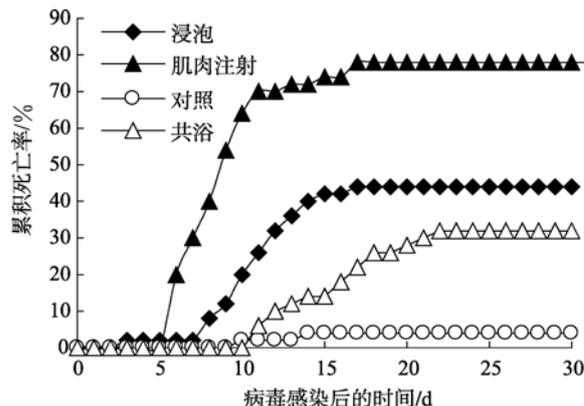


图 1 NNV 感染军曹鱼的累积死亡率
Fig. 1 Cumulative mortalities of the cobia infected with NNV

2.2 RT-PCR 检测结果

2.2.1 RT-PCR 对各个器官的检测

分别取肌肉注射组、浸泡组和共浴组患病鱼样品, 对鳃、脑、眼、脊髓、肠、肝、脾、肾和肌肉等组织进行 RT-PCR 检测, 在各组的脑、眼和脊髓中均能扩增出大小为 421bp 的特异性片段(图 2), 而在其他器官不能扩出(表 1)。

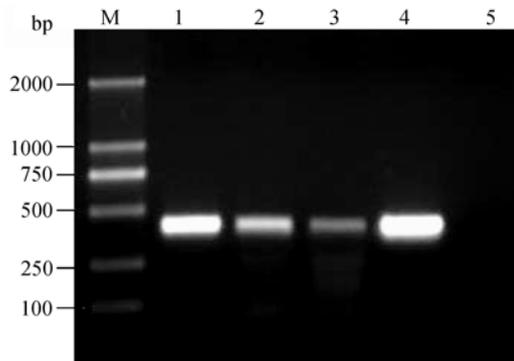


图 2 患病鱼的 RT-PCR 检测

Fig. 2 RT-PCR detection of infected cobia larvae
M. 标准分子量 DL2000; 1.患病鱼脑; 2.患病鱼眼; 3.患病鱼脊髓; 4.阳性对照; 5.阴性对照
M. DL2000 DNA marker; 1. brain of the infected cobia larvae; 2. eye of the infected cobia larvae; 3. spinal cord of the infected cobia larvae; 4. positive control; 5. negative control

2.2.2 病毒检出时间和检出情况

在感染实验中, 最早在鱼体中枢神经检测出病毒的时间是在肌肉注射后的第 18 小时, 浸泡感染、共浴感染分别在第 28、48 小时检出病毒。感染病毒 72 h 后, 肌肉注射组、浸泡组和共浴组 NNV 的检出率分别为 100%、67%和 33% (图 3)。在感染后的第 30 天, 幸存的较大个体的检测结果仍部分呈阳性。

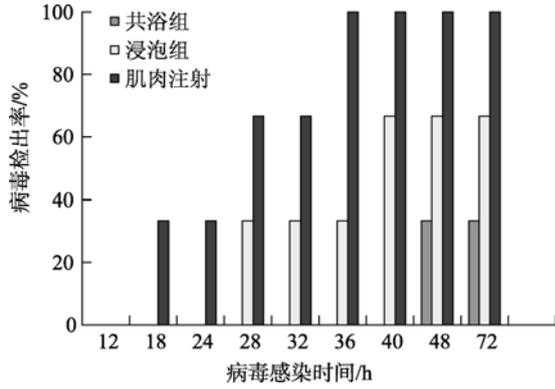


图 3 3 种感染方式不同时间的病毒检出率

Fig. 3 Detectable rate of virus in three ways of infected experiment at different time

表 1 患病鱼各器官的 RT-PCR 检测结果

Tab. 1 The result of RT-PCR detection in different tissues of infected cobia larvae

感染方式	脑	鳃	眼	脊髓	肠	肝	脾	肾	肌肉
注射	+	-	+	+	-	-	-	-	-
浸泡	+	-	+	+	-	-	-	-	-
共浴	+	-	+	+	-	-	-	-	-

注: + 表示阳性, - 表示阴性

2.3 组织病理观察

病鱼的脑部可见明显空泡, 主要存在于端脑、间脑、小脑和延脑, 前脑比后脑的空泡化更严重。患病鱼的脊髓和视网膜也有明显空泡化坏死病变; 鳃、心、肝、肾、脾、皮肤和肌肉在光镜下未发现明显的病理变化。神经元核周体细胞质出现大空泡, 感染细胞表现出明显的收缩、致密化和嗜碱特性, 脑神经细胞降解, 在神经细胞的细胞质中可见嗜碱性的包涵体(图 4)。相同感染时间内, 肌肉注射组中枢神经和视网膜组织损坏较为严重。病鱼组织损坏程度与感染时间相关, 濒临死亡个体较感染初期和病愈后的组织损伤严重。

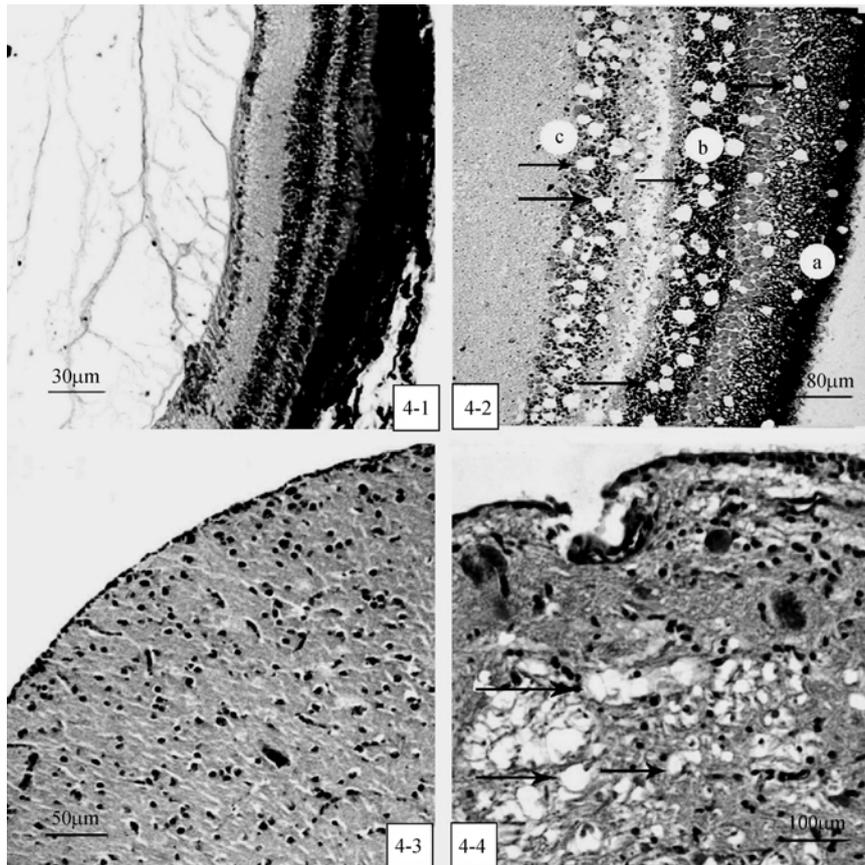


图 4 患病军曹鱼仔鱼的眼和脑的组织病理变化(H.E 染色)

Fig. 4 Pathological changes in brain and eye of infected cobia larvae (H.E staining)

4-1. 正常视网膜组织; 4-2. 病变组织(a.色素层; b.视细胞层; c.双极细胞层); 4-3. 正常脑组织; 4-4. 脑病变组织(箭头示组织空泡坏死病变)
4-1. normal retinal tissues; 4-2. virus-infected retinal tissues (a.chromatophores cell layer; b. optic cell layer; c. bipolar cell layer); 4-3. normal brain; 4-4. virus-infected fish brain.(arrow shows vacuolations in tissue)

3 讨论

鱼类感染神经坏死病毒后症状表现为体色变深、变黑,厌食,螺旋状或旋转游动或腹部朝上漂浮于水面,难于下沉,有的个体腹部肿大,鳃肿大充血,外观无其他明显病变^[9]。本实验中,通过不同感染途径致病的军曹鱼仔鱼在攻毒后第4天出现食欲下降、体色变深或发黑、游动无力和呈螺旋状游泳等典型的鱼类 NNV 感染的临床症状。

鱼类感染 NNV 引起的组织病理学变化主要表现在脑和视网膜的病变,视网膜受感染最严重,交感神经系统的神经节和脊髓神经节的神经元出现空泡化。Yoshikoshi 等^[10]报道患病条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的脊髓神经元出现坏死病变,仔鱼比幼鱼损伤更严重,最典型组织坏死病变是脑灰质细胞胞浆内出现空泡。Johnson 等^[11]发现被 NNV 感染的幼体庸鲷(*Hippoglossus hippoglossus*)的脑组织和视网膜细胞充满病毒包涵体,视网膜细胞内还含有色素颗粒,色素颗粒多位于包涵体内。Tanaka 等^[12]对七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)神经坏死病的组织病理学进行了研究,结果表明中枢神经系统的病变是脑炎的特征,而不是脑病。实验中各组感染仔鱼脑组织发生明显的空泡化,脊髓和视网膜也出现空泡、坏死病变,与上述病变相似。

由于灵敏度高、特异性好,RT-PCR 已成为诊断 VNN 的重要手段。检测 NNV 的 RT-PCR 方法最早应用于日本的黄带褐鲷(*Pseudocaranx dentex*)^[13],陈信忠等^[14]应用该方法成功地从青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)、紫石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、马拉巴石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)和云纹石斑鱼(*Epinephelus radiatus*)等5种养殖石斑鱼中检出 NNV,扩增片段长为421bp。本实验采用 RT-PCR 方法在各组患病鱼的脑、眼和脊髓中均能检测到 NNV 的特异性片段。

了解病毒的感染途径对其流行病学和控制技术的研究是非常重要的。Tanaka 等^[12]用浸浴感染的方法评价 RGNNV 基因型的七带石斑鱼 NNV 对人工孵化的多种海水鱼幼鱼的致病力,结果表明,七带石斑鱼和牙鲆(*Paralichthys oliuaceus*)等都表现出典型的病毒性神经坏死症病理变化,导致发病和死亡。Peducasse 等^[15]采用口服感染导致加州鲈(*Micropterus salmoides*)幼鱼患病,证明 NNV 可经口服感染流行。Nguyen 等^[16]在长缟鲷(*Pseudocaranx*

dentex)自然发病鱼的皮肤上发现病毒抗原,从而认为病毒可通过与上皮组织相连的感觉神经或运动神经感染脊髓,增殖后再传播到脑和视网膜。本实验采用肌肉注射、浸泡和共浴等方式对军曹鱼仔鱼进行感染,结果证明3种感染途径均能使军曹鱼仔鱼发生有效感染,共浴感染的成功说明军曹鱼在自然条件下可通过水体感染 NNV。

以上结果表明,军曹鱼仔鱼是鱼类诺达病毒的易感种群之一,病毒能通过水平传播感染军曹鱼仔鱼。

参考文献:

- [1] Comps M, Pepin J F, Bonami J R. Purification and characterisation of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lateolabrax niloticus* and *Dicentrarchus labrax*[J]. *Aquac*, 1994, **123**(1-2): 1-10 .
- [2] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China[J]. *Fish Pathology*, 2001, **36**(3): 186-188 .
- [3] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, **25**(3): 127-142.
- [4] Tan C, Huang B, Chang S F, et al. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain[J]. *Journal of General Virology*, 2001, **82**: 647-653.
- [5] 世界动物卫生组织(OIE) 鱼病专家委员会. 水生动物疾病诊断手册(第3版)[M].北京: 中国农业出版社, 2001.1 080-1 083.
- [6] 李刘冬, 陈毕生, 冯娟, 等. 军曹鱼营养成分的分析及评价[J]. *热带海洋学报*, 2002, **21**(1): 76-82 .
- [7] 艾春香. 军曹鱼的养殖生物学特性及营养需求[J]. *饲料研究*, 2004, **2**: 41-44 .
- [8] Chi S C, Lo C F, Lin S C. Characterization of grouper nervous necrosis virus[J]. *Journal of Fish Disease*, 2001, **24**(1): 3-13 .
- [9] 陈晓艳. 鱼类病毒性神经坏死病研究现状[J]. *动物医学进展*, 2005, **26**(5): 17 -21.
- [10] Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*[J]. *J Fish Dis*, 1990, **13**: 69-77.
- [11] Johnson S C, Sperker S A, Leggiadro C T, et al. Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *J Aquat Anim Health*, 2002, **14**: 124-133.
- [12] Tanaka S, Mori K, Arimoto M, et al. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis[J]. *J Fish Dis*, 2001, **24**(1): 15-22.
- [13] 罗卫, 李惠芳, 刘荭, 等. 鱼类神经坏死病毒实时荧

- 光 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 506-510.
- [14] 陈信忠, 苏亚玲, 龚艳清, 等. 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 5 种养殖石斑鱼的神经坏死病毒[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 202-207 .
- [15] Peducasse S, Castric J, Thiery R, *et al.* Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 36: 11-20 .
- [16] Nguyen H D, Nakai T. Progression of striped jack nervous necrosis (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae[J]. *Dis Aquat Org*, 1996, 24: 99-105.

The research on pathogenicity of fish nervous necrosis virus to *Rachycentron canadum* juvenile

YAN Yun-feng^{1,2}, SU You-lu¹, GUO Zhi-xun¹, XU Li-wen¹, FENG Juan¹, HUANG Jian-nan¹, YU Da-hui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Received: Oct. 20, 2008

Key words: fish nervous necrosis virus; *Rachycentron canadum* juvenile; pathogenicity

Abstract: In this paper, the pathogenicity of fish nervous necrosis virus to *Rachycentron canadum* juveniles was studied by observations of the mortality and histo-pathological changes through three infected routes including intramuscular injection (IM), bath exposure and cohabitation. The results showed that the juveniles infected with NNV manifested the typical symptom such as severe sickness with anorexia, pale-grey pigmentation of body and whirling swimming. And the cumulative mortalities of infected fish via IM injection, bath exposure infection and cohabitation were 78%, 44% and 34%, respectively. NNV could be detected in the brain, eye and spinal cord of the infected *R. canadum* juveniles with RT-PCR at 18h post-IM injection. Microscopic observation revealed vacuolations in brain, retina and spinal cord of the infected juveniles. So the results demonstrated that *R. canadum* juveniles were susceptible to nervous necrosis virus and the virus could transmit horizontally among the juveniles by water.

(本文编辑: 谭雪静)