

草鱼出血病病原的研究

中国科学院水生生物研究所第三室病毒组*

提 要

草鱼出血病是草鱼种的一种严重疾病,通常在水温 25—30℃ 时发病,其症状表现为全身性组织器官充血。其病原悬液能通过赛氏滤器 (Seitz, EKS 石棉滤板),能在草鱼种体内及草鱼鳍单层细胞中传代繁殖,在草鱼肌肉单层细胞和性腺单层细胞中感染并出现细胞病变。病原悬液对脂溶剂乙醚敏感,耐热性强,对四环素类药物不敏感。试验结果,我们认为草鱼出血病的病原是病毒。

前 言

就目前所知,草鱼出血病是草鱼种饲养阶段危害最大的传染性疾病。它流行于湖北、湖南、广东、广西、江西、江苏、浙江等主要养鱼区。发病季节长,死亡率高,是养鱼事业的严重威胁。1970年夏,湖北省黄陂县滢口养殖场首先发现此病,通过多年来对天然和人工感染的病鱼观察和检查,从 0.8 寸左右的夏花草鱼即开始感染,以 2—3 寸的当年鱼种最为普遍而严重,一足龄以上的草鱼亦可发生,但严重程度则有下降趋势。它还可感染青鱼和罗汉鱼。

病鱼的症状主要是体内外各个器官和组织表现斑点状或块状充血。诸如鳍基、鳃、鳃盖、眼眶、口腔、下颚等表皮组织,不用解剖就可以看到,他如脑膜腔、肌肉、肠道、肠系膜、鳃壁、胆囊、肝、脾、肾等器官,也往往出现充血现象。2—3 寸的草鱼种,在温度最适宜的情况下,症状最为典型,即肌肉严重充血,同时,伴有其他组织和器官充血。但在水温偏低的情况下,肌肉充血症状往往不甚明显,有时代之以鳃丝斑点状或块状充血。在 4—5 寸以上的草鱼种,则以肠道、鳍基、鳃盖和口腔等出现充血为主,即所谓“红鳍红鳃盖”比较常见,而肌肉一般仅表现轻微充血或甚至不充血。

为了寻找有效的防治方法,我们最初采用抗菌素和磺胺类药物进行治疗试验,都没有取得满意的效果,同时采用细菌学方法反复地进行病原分离和感染试验^[1],也没有使感染鱼发生出血病死亡。因此,我们于 1972 年开始采用病毒学方法,对病原进行研究。几年来,对病原的分离和感染试验,进行了大量的工作,现将取得的结果报告如后。

* 执笔人: 陈燕桑。照片系何楚华同志协助,致谢。

材料与方 法

1. 病原材料来源

试验用的病鱼材料,是武汉市东西湖养殖场、黄陂县滢口养殖场以及本所试验场等有典型出血病症状的将死或刚死的草鱼。首先以70%酒精棉球轻抹鱼体表面,清除不洁之物,然后剥开皮肤,逐一取出肌肉、肝、脾、肾等器官组织,测其重量,随即置于50%磷酸缓冲甘油中,在-20℃低温下保存,或将新鲜的病鱼整体材料,在-20℃下冰冻保存备用。

2. 病原分离

取出甘油保存的材料,以无菌的0.65%氯化钠溶液洗4次。如系新鲜的病鱼材料,则直接置于无菌器皿中称重,剪碎,加入Earle氏平衡盐溶液或0.65%氯化钠溶液,匀浆,使成10%浓度的组织悬液,以每分钟3000转速度离心30分钟,吸取上清液,通过6号玻璃滤器或赛氏滤器(Seitz, EKS 石棉滤板)过滤除菌。然后将滤液分别接种入普通琼脂培养基、肉汤培养基、血琼脂培养基、厌气培养基、沙氏培养基等进行细菌培养。每种接种三皿,30℃培养;每种培养连续观察一星期,如未见菌落生长,则证明滤液无菌,始能将滤液供感染用。另一种方法是:将离心后的上清液每毫升加入青霉素800单位,链霉素800微克,置30℃处理2—4小时后供感染用。

3. 健康的材料鱼来源

用作感染试验的材料鱼,大部份是从本所试验场孵化出来的鱼苗,部份取自武汉市东西湖养殖场没有患出血病的鱼池。材料鱼的规格一般为2—3寸左右,有时也采用1寸左右的夏花草鱼。试验前,从鱼池捕来,暂养在室内大水族箱内,观察几天,证实确系健康鱼种才用作感染试验。

4. 感染方法

注射感染 将病原悬液配成 10^{-1} 浓度,从鱼的腹鳍基部进行腹腔注射。注射量视鱼种的规格大小,每尾注射0.2—0.4毫升。注射后,养在试验缸中,维持水温在25—30℃。另设对照组。

浸泡感染 将病原悬液以无氯自来水稀释成一定浓度,然后放入健康鱼种浸泡30分钟,移置试验缸中饲养,维持水温在25—30℃。另设对照组。

每次试验,连续观察到鱼种完全停止发病死亡为止(大约两星期左右)。试验鱼在水族箱饲养过程中,投喂新鲜的青草或青菜作饵料。不捞取池塘中的浮萍或浮游生物作饵料,以避免影响试验结果的准确性。

5. 细胞培养

依照草鱼组织细胞培养法(手稿),用0.25%胰酶(Difco 1:250)消化组织,消化后,将细胞悬浮在Eagle氏培养液中,培养液含10—15%犊牛血清,每毫升加入青霉素100单位、链霉素100微克,pH调节为7.2—7.4。培养器皿采用通常装链霉素的小玻瓶(容积10毫升),每瓶接种细胞悬液1毫升,在28℃的温度下静止培养。长出原代细胞层后,用0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)溶液与0.1克胰酶的混合液消化,使细胞离壁分散,然后分装在新的培养瓶中传代培养。接种细胞量约15—25万个/毫升。在28℃的温度下培养,通

常 3—4 天内,即长出密致的单层细胞。选择其中均匀而生长旺盛的单层细胞进行病毒接种。

试 验 与 结 果

1. 病原鉴定

(1) 病原悬液对鱼体感染

依 Amend 分离病毒的方法^[3],以 0.65% 氯化钠溶液制成 10^{-1} 浓度的病原悬液,10 倍连续稀释至 10^{-7} 浓度,对草鱼种进行感染试验。试验分为两组:一组为注射感染,分别以上述 7 种浓度的病原悬液对健康草鱼种进行注射;另一组分别以 7 种不同浓度悬液对草鱼种进行浸泡感染。另设对照组以资比较(表 1)。

表 1 注射和浸泡感染试验

病原悬液浓度	注 射 组		浸 泡 组		对 照 组
	死亡开始日/ 最后死亡日	死活比例	死亡开始日/ 最后死亡日	死活比例	死活比例
10^{-1}	5/6	6/6	9/13	6/6	0/6
10^{-2}	5/8	6/6	9/11	6/6	0/6
10^{-3}	7/10	6/6	9/16	5/6	0/6
10^{-4}	8/9	5/6	—	—	0/6
10^{-5}	6/9	5/6	10/13	5/6	0/6
10^{-6}	8/10	5/6	10/13	4/6	0/6
10^{-7}	10/11	3/6	10.5/	1/6	0/6

结果表明:不论注射或浸泡感染,均能使健康鱼感染发病,其症状与天然的颇相似。无论注射或浸泡感染,都有一个潜伏期,注射的比浸泡感染的要缩短 2—4 天,而且死亡的时间也较短。在同样水温下,随着病原悬液浓度的降低,发病死亡的时间延长,死亡率也随之减低。

(2) 病原悬液对鱼体传代感染

根据细菌外毒素具有象病毒一样能过滤器感染的特性,我们进行了如下传代感染试验:

将经过滤器除菌的滤液对草鱼种(2—3 寸)进行腹腔注射感染,注射后即将鱼置于水族箱中饲养,水温维持在 25—30℃,另设对照组。这样连续进行了传 4 代的试验(表 2)。

通过四次重复,病原物在草鱼体内连续传 4 代,每代均能使健康鱼致病死亡。通常在第 4—7 天,病鱼开始出现游动失常,不吃食物,对水流反应迟钝。继之,病鱼离群独游,或停留在水面,或沉卧于水底,有的身体失去平衡,时而在水面打转、抽搐,时而垂直在水中不动。出现这样情况的病鱼,在一天之内即行死亡。病鱼体表呈暗黑色、无光泽,口腔、头顶、眼眶、鳍条基部等处往往充血;下颚、鳃盖和腹部出现淡红色血斑;眼球外突,肌肉和鳃

表 2 鱼体传代感染试验

组 别	I		II		III		IV	
	感 染 率 代 次	项 目	感染(%)	对照(%)	感染(%)	对照(%)	感染(%)	对照(%)
1			50	0	88.8	0	100	0
2			55.5	0	100	0	70	0
3			90	0	90	0	90	0
4			60	0	100	0	100	0

丝往往出现斑点状或块状充血；严重者，全身肌肉充血而呈鲜红色，此时其鳃丝往往呈灰白色。内部器官比较常见的是全肠或局部呈鲜红色充血，肠内无食物，但肠壁仍较结实，不糜烂，腹膜、肝、脾、肾、鳔壁、胆囊、肠系膜及周围脂肪均出现点状充血，有时有腹水。

以上所列症状，并不是都在一尾鱼上同时出现，一般只出现其中一种或几种，甚至同一病原材料感染的鱼，在传代过程中，某一代表现肌肉充血为主，而下一代则表现肠道充血为主。这种情况与检查天然出血病病鱼时所遇到的基本上是一致的。

从表 2 所示第 4 代的感染死亡情况而论，除第一组的稍低（60%）外，其余三组均为 100%。这充分表明过滤物能在健康草鱼体内继续传代繁殖。因此相信，由细菌外毒素而使鱼致病的可能性是不存在的。

（3）病原对鳃细胞传代感染

将经过滤器过滤的病原悬液，接种于生长密致的鳃单层细胞，每次接种 5 瓶。结果，看不出明显的细胞病变。但将接种后培养 4—6 天的细胞培养物，对草鱼种注射感染，就发生出血病，死亡达 70—100%，而对照组则没有死亡。

为了搞清楚病原在单层细胞内虽不起病变，而是否能繁殖传代这一问题，我们进行了病原接种于鳃细胞中感染传代试验。这一试验，重复地进行了两次。第一次试验，采用经 - 20℃ 甘油保存 5 个月的病鱼材料，加入青霉素 800 单位/毫升和链霉素 800 微克/毫升制成的病原悬液，接种于鳃单层细胞，培养 6 天后将细胞培养物接种于新的鳃细胞。这样连续传代感染至 8 代。与此同时，还将每代的细胞培养物感染草鱼，以空白细胞培养液感染作对照。第二次试验，用新鲜的病鱼材料，以 Earle 氏溶液制成 1:40 浓度，经滤器过滤的病原悬液，在鳃单层细胞连续感染传代至 8 代，每代细胞培养物也进行了对鱼感染试验。

表 3 是上述两次传代感染试验的结果。病原在鳃单层细胞连续传至 8 代，每代的培养物对鱼感染，均能使鱼发病死亡。其中第一组共传代培养 61 天，第 8 代培养物对鱼感染的发病率为 80%；第二组共传代培养 78 天，第 8 代培养物对鱼感染的发病率为 60%。在第二组的第 6 代感染鱼时，由于水温偏低，致死亡率下降，当第 7 代的感染温度回升时，其死亡率又随着升高。在连续 8 代的传代感染中，都未能看出细胞有较明显的病变，但根据传至第 8 代的培养物仍能使鱼致病这一事实，我们相信，病原是在鳃细胞中继续生长和繁

表 3 病原对鳟单层细胞传代感染试验结果

I 组						II 组				
传代次	感染温度 (°C)	感染方法	感染剂量 (毫升)	感染组 死亡率 (%)	对照组 死亡率 (%)	感染温度 (°C)	感染方法	感染剂量 (毫升)	感染组 死亡率 (%)	对照组 死亡率 (%)
1	28	注射	0.2	50	0	26	注射	0.3	80	0
2	28	注射	0.2	80	0	25—28	注射	0.3	70	0
3	28	注射	0.2	100	0	26—28	注射	0.3	80	0
4	28	注射	0.3	90	0	—	—	—	—	—
5	28	注射	0.3	100	0	—	—	—	—	—
6	28	注射	0.3	75	0	20—23	浸泡	1:9	26.6	0
7	—	—	—	—	—	28	浸泡	1:9	53.3	0
8	28	注射	0.3	80	0	26—28	浸泡	1:9	60	0

殖。

(4) 病原对肌肉和性腺单层细胞感染试验

根据 Jensen^[6] 的感染方法。在无菌操作下取出病鱼的肾、脾组织，置玻璃小瓶内，在一 70℃ 冻结 10 分钟，解冻后，用一支细菌接种环取一环病原直接接种于生长均匀而密致的肌肉和性腺单层细胞内进行培养，维持液为 Eagle 氏溶液含 2% 的犊牛血清。在 28℃ 温度中培养。72 小时后两种细胞开始出现病变，最初细胞变暗，颗粒增多，继之，胞质收缩，细胞拉长变为针形，局部脱落形成空洞，最后脱落面逐渐扩大，使细胞层大面积脱落(图版 I: 1—4)。细胞出现病变的快慢与病原的毒力强弱有关。

把出现病变的肌肉和性腺单层细胞培养物，不经冻融而再接种于上述两种新的单层细胞中(每瓶接种 0.1 毫升)，病原在两种细胞中连续感染传代，在第 1—3 代细胞病变较容易出现，惟第 4 代病变不甚明显。将两种细胞的第 4 代培养物感染草鱼，感染率分别为 70% 和 100%，对照细胞感染则没有发病死亡。将上述感染发病鱼的肾脏，再分别接种于新的肌肉和性腺单层细胞中，细胞又同样地产生病变，并能再次分离到病原。

通过上述制备的病原悬液对鱼体以及细胞感染传代试验，病原在细胞中能繁殖和出现病变，证明在没有细菌、细菌外毒素、以及其他寄生虫性病原存在的情况下，病原悬液不仅能使健康草鱼种感染发病，而且发病的温度、时间和出现的症状，都与天然出血病的症状颇为一致。因此，我们认为草鱼出血病的病原是病毒。

2. 病原的一般特性

(1) 病原对温度的反应

在不同温度对病原悬液进行不同时间的加热处理，然后对草鱼种进行注射感染，每组 10 尾，同时设对照组，不加热处理(表 4)。

从表 4 看出：病原在 41℃ 处理 18 小时和 55℃ 处理 1 小时，感染鱼的死亡率仍达 100%。在 60℃ 处理 1—3 小时，死亡率虽逐渐下降，但经 3 小时的处理，仍有 10% 的死亡。在 65℃ 和 70℃ 分别处理 1 小时，都没有死亡出现，而 65℃ 处理 20 分钟，死亡率达

表 4 病原对温度的敏感试验

组 别	试 验 组								对 照 组
温度处理(℃) 时间(小时)	41 18	55 1	60 1	60 2	60 3	65 1	65 1/3	70 1	不加热处理
感染死亡率(%)	100	100	80	25	10	0	90	0	100

90%。由此表明：病原对温度的反应比较稳定,即耐热性较强。通过反复试验,认为 65℃ 处理 1 小时,能有效地杀灭此病原。

(2) 病原对几种化学试剂的反应

将 10⁻¹ 浓度的病原悬液分装 3 小瓶,第一、二瓶分别加入盐酸、氢氧化钠使最终浓度为 0.1N,第三瓶加入乙醚使成 1:1 浓度,盖紧瓶塞,充分摇匀,在室温下处理 3 小时后,分别调至 pH7.0,而加乙醚的样品,经处理 2 小时后,打开瓶塞让乙醚挥发 1 小时。然后将三瓶病原分别对草鱼种注射感染,另设不加药样品的作对照(表 5)。

表 5 病原对酸、碱、乙醚的反应

药物(浓度)	盐酸(0.1N)	氢氧化钠(0.1N)	乙醚(1:1)	对 照
处理时间(小时)	3	3	3	不处理
死亡比例	1/10	3/10	1/10	9/10

从表 5 所示,此种病原对乙醚、酸、碱均敏感,而对酸比碱更为敏感。此外,将病鱼器官和组织置 50% 磷酸缓冲甘油中,在 -20℃ 低温下保存两年,仍可分离到病毒,至于最长的保存期,有待进一步研究。

(3) 几种清洁剂对病原的作用

以 10⁻¹ 浓度的病原悬液,分装 3 小瓶,分别加入合成洗衣粉、家用肥皂、去污粉,使成 1% 浓度,在室温下处理 60 分钟,然后对草鱼种注射感染,同时设不加药物组作对照。试验结果为:病原悬液经 1% 去污粉处理 60 分钟后对鱼感染,发病死亡率为 83%,病原毒力稍有降低;经 1% 洗衣粉以及 1% 肥皂处理 60 分钟的,感染鱼均没有出现发病死亡。重复试验,结果相符。表明后两种清洁剂有杀灭此病原的效果。

(4) 病原对四环素类药物的反应

将 10⁻¹ 浓度的病原悬液,分装 4 个小瓶,分别加入四环素、金霉素、红霉素、卡那霉素,使各个最终浓度为每毫升含 1000 微克,在 30℃ 处理 24 小时。另设不加上述药物的对照组,然后对当年的草鱼种(2寸)进行注射感染,再设不注射的鱼作空白对照。试验结果表明:无论加入上述任何一种药物处理的病原悬液对鱼感染后,都在第 4—5 天开始死亡,感染率为 100%,而不注射的对照鱼全部存活。由此可见,1000 微克/毫升浓度的四环素类药物对病原没有抑制作用。病原对上述药物不敏感。

(5) 病原对寄主的特异性

以 10⁻¹ 浓度的病原悬液,对青、鳊、鲢、鲤、团头鲂以及草鱼等鱼种,按每尾鱼 0.3 毫升

进行注射感染。通过连续 15 天的观察,青、草鱼都能发病死亡,而青鱼的死亡率比草鱼为低,症状也不及草鱼显著,鳙、鲢、鲤和团头鲂均没有出现出血病和死亡。这些情况与天然发病情况是一致的。同时也表明,这种病原对寄主具有较强的特异性。

讨 论

由于病毒和枝原菌均能通过滤器,为了排除出血病病原由枝原菌引起,我们曾经采用猪喘气病病原枝原菌的分离方法(培养液中改用犊牛血清)^[2],对草鱼出血病进行分离培养,都未曾分离到枝原菌。同时将使鱼发病的病原悬液,进行染色,于高倍显微镜下观察,也没有看到枝原菌存在。又根据文献报道,枝原菌对四环素类药物具有显著敏感的特点^[8],而出血病病原对四环素类药物则很不敏感。因此认为,出血病病原不可能由枝原菌引起。

出血病病原除注射和浸泡感染都能使鱼发病外,口喂病原悬液亦能使鱼致病;健康鱼与病鱼接触也同樣能使前者感染发病,他如用病鱼的肌肉、肝、脾、肾、肠道、脑、鳃等组织悬液单独对鱼感染也都能成功。上述情况表明,这种病原对草鱼种是具有高度的感染力。

鱼类病毒病的研究,在国外开始于 1957 年,而在国内尚未见有这方面的报道。国外已报道的鱼类病毒有 10 多种^[10,11],其中多数是冷水性和海产鱼类的,淡水温水性鱼类病毒很少,只有四、五种,其中有一种河鲀病毒(Channel catfish virus, CCV)与草鱼出血病毒较为接近。Fijan (1968)^[5]第一个发现不满 1 龄的河鲀死亡率很高,从中分离到一种病毒,其临床症状为全身性出血,腹部肿胀及腹腔内充满黄色液体。最适发病温度为 25—30℃^[7],在 25℃ 用毒源注射可导致 94% 的死亡,在 19℃ 用毒源注射只有 24% 死亡。此外,对 1 龄以上的河鲀感染后,只是生长缓慢,而不导致死亡。河鲀病毒的颗粒直径为 95—105 nm,属于疱疹病毒(Herpes virus)类型^[9]。我们发现的草鱼出血病毒的最适温度和症状与河鲀病毒都极为相似。这两种病毒是否同属于一个类群,有待于进一步研究。

Ahne (1975)^[4]在德国饲养的 3 龄草鱼中分离到一种弹状病毒(Rhabdovirus of Grass Carp),其致病症状为:腹部出血发炎,鳞片基部出血,鳍条腐烂,前肠发炎,腹部有浆液。病毒的最适繁殖温度为 16—23℃,在 28℃ 时仅稍微生长。病毒颗粒为枪弹形,其直径为 10nm,长 90—140 nm。这与我们从鱼种上分离到的出血病病毒不大相同;草鱼在不同生活阶段,似乎有不只一种病毒类型的可能。关于这个问题有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 湖北省水生生物研究第三室, 1977. 草鱼肠炎病原研究的进展. 水生生物学集刊, 6 (2): 245—246.
- [2] 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 1975. 猪喘气病病原枝原菌的分离培养. 微生物学报, 15 (4): 302—309.
- [3] Amend, D. F. & J. P. Pietsch, 1972. An improved method for isolating viruses from asymptomatic carrier fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 101 (2): 267—269.
- [4] Ahne, W., 1975. A rhabdovirus isolated from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus* e. et V.). *Arch. Virol.*, 48: 181—185.
- [5] Fijan, N. N., 1968. Progress report on acute mortality of Channel Catfish fingerlings caused by a virus. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 67 (7—8): 1167—1168.
- [6] Jensen, M. H., 1965. Research on the virus of Egtved Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126:

422—426.

- [7] Plum, J. A., 1972. Channel Catfish virus disease. U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish. Dis. Leafk. No. 18, 4 P. (revised).
- [8] Razin, S., 1973. Handbook of Microbiology Vol. I Organismic Microbiology. CRY. Cleveland Ohio, U.S.A.
- [9] Wolf, K. & R. W. Darlington, 1971. Channel Catfish virus: A New herpesvirus of ictalurid fish. *J. Virol.*, 8:525—533.
- [10] Wolf, K., 1972. Advances in fish virology; A review 1966—1972. in L. E. Mawdesley-Thomas (ed.) Diseases of fish. Symposia of the Zoological Society of London, No. 30, Academic Press, London, England.
- [11] Wolf, K., 1976. Fish viral disease in North America, 1971—1975, and recent research of the Eastern Fish Disease Laboratory, U.S.A. *Fish Pathology*, 10(2):155—164.

STUDIES ON THE CAUSATIVE AGENT OF HEMORRHAGE OF THE GRASS CARP (*CTENOPHARYN- GODON IDELLUS*)

Section of Virus Study, Third Laboratory, Institute
of Hydrobiology, Academia Sinica

Abstract

This report deals with an investigation about the agent which causes the muscular hemorrhage of the grass carp. The disease is the most serious menace to the grass carp culture and causes much losses among both fry and fingerlings. The yearlings may also be infected but the mortality appears to be less. The epidemic occurs primarily during the warm summer months at a water temperature of 25 to 30°C. The clinical signs of diseased fish are hemorrhages, with some or all of the following signs: exophthalmia, hemorrhagic or else pale gill, hemorrhagic areas at the base of fins and gill covers. Internally, hemorrhagic areas may occur throughout the musculature, mouth cavity, intestinal tract, liver, spleen and kidney. The agent isolated from the hemorrhage of grass carp could pass through Seitz (EKS 2 asbestos) filter. The filtrates thus obtained were inoculated into the healthy fingerlings of grass carp, and on the 4th passage they still retained their infectivity to cause typical hemorrhagic symptoms, and cytopathic effect (CPE) has also been observed on monolayer cells of muscle and gonad of grass carp. Marked cytopathic effect usually appeared three to four days after inoculation at 28°C. In addition, several characteristics have been tested for this particular agent. It is relatively heat stable but sensitive to ether; its virulence can be maintained in 50% glycerol; and it is insensitive to tetracycline antibiotics. From these results it seems justified to infer that the agent responsible for hemorrhage of grass carp is a virus.

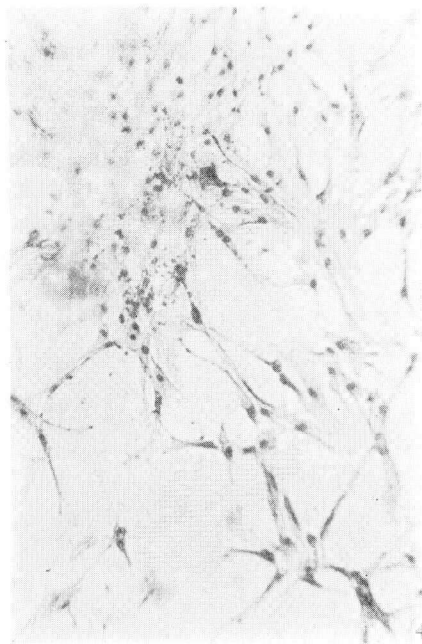
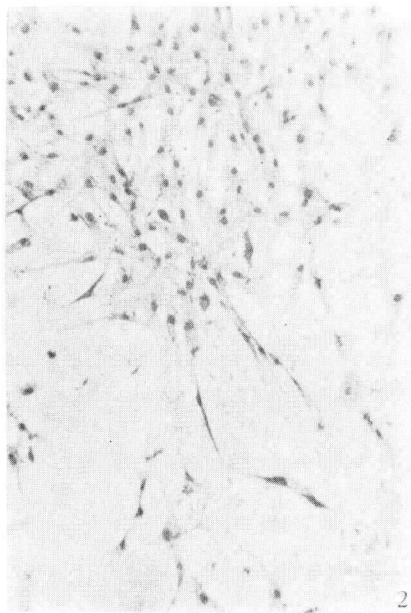
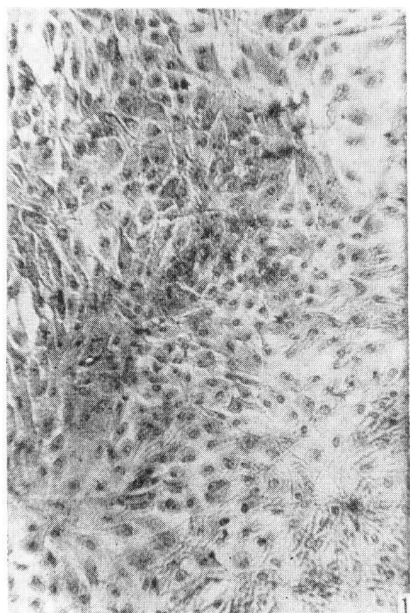


图1 肌肉单层细胞(对照)
图2 肌肉单层细胞感染出血病病毒第四天出现的细胞病变
图3 性腺单层细胞(对照)
图4 性腺单层细胞感染出血病病毒第四天出现的细胞病变
放大 150 倍, H、E 染色