

综 述

我国水生动物病毒病研究概况

张奇亚

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

A REVIEW OF VIRAL DISEASES OF AQUATIC ANIMAL IN CHINA

ZHANG Qi-ya

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 水生动物; 病毒; 病毒病

Key words: Aquatic animal; Virus; Viral diseases

中图分类号: S 941.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)01-0089-013

80年代以来,我国水产业迅速发展,并且在农业产值中所占的比重逐年上升,已成为我国大农业的四大支柱产业(粮食、肉类、水产和禽蛋)之一。1998年,我国水产品年产量达3800万t,但令人遗憾的是水生动物疾病,尤其是因病毒引起的爆发性流行病明显增多,危害极为严重。水生动物分类地位相差甚远,除了鱼之外,还包括虾、贝等无脊椎动物和蛙、鳖等低等脊椎动物。自从Wolf分离到第一株鱼类病毒以来^[1],迄今见报道的鱼病毒已超过70种。已知水生动物病毒分类属于18个科(表1),在绝大多数动物病毒科中都有分布。水生动物病毒病已受到人们广泛关注,以研讨水生动物病毒病为主题、由国际著名专家倡导并组织的“国际低等脊椎动物病毒学术会议”每4年召开一次,现已召开过四次^[2, 3]。

水生动物存在病毒病、细菌病和寄生虫病等。其中病毒病具有潜伏期长短不一、症状复杂多变、传染性强、导致高死亡率的特点,且病原个体微小,侵染动物后在宿主细胞内复制,因而抗菌素对病毒的作用小或无;而化学药物在杀灭病毒前,就可能使宿主动物受损或致死。可见病毒是危害非常严重的一类病原,现就我国水生动物病毒病的研究概况作一简介。

收稿日期: 2000-06-17; 修订日期: 2000-09-18

基金项目: 国家自然科学基金(30170726); 中国科学院特别支持费(STZ-00-13); 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金资助

作者简介: 张奇亚(1957—); 研究员, 博士生导师; 主要从事水生动物病毒学及相关学科研究

表 1 水生动物病毒属及形态结构特征

Tab. 1 Listing of aquatic animal virus families and the characterizes of morphology

种类	形态	直径(nm)	囊膜	对称性	宿主动物
DNA 病毒					
细小病毒(Parvoviridae)	球形	约 20	—	二十面体	鱼虾
疱疹病毒(Herpesviridae)	球形	150—200	+	二十面体	鱼蛙鳖
虹彩病毒(Iridoviridae)	球形	120—300	+	二十面体	鱼虾蛙鳖
杆状病毒(Baculoviridae)	杆状	30—35 × 250—300	+, −	螺旋	鱼虾
腺病毒(Adenoviridae)	球形	70– 90	−	二十面体	鱼蛙鳖
痘病毒(Pox viridae)	砖或椭圆	300—450 × 70—260	+	螺旋	鳖
乳多空病毒(Papovaviridae)	球形	45—55	—	二十面体	蛙鳖
RNA 病毒					
正粘病毒(Orthomyxoviridae)	球形或多形	80—120	+	螺旋	鱼
副粘病毒(Paramyxoviridae)	球形或多形	100—300	+	螺旋	鱼鳖
冠状病毒(Coronaviridae)	球形	80—160	+	螺旋	鱼
逆转录病毒(Retroviridae)	球形	100—120	+	二十面体	鱼鳖
呼肠孤病毒(Reoviridae)	球形	70—80	−	二十面体	鱼虾鳖
双 RNA 病毒(Birnaviridae)	球形	50—80	−	二十面体	鱼
弹状病毒(Rhabdoviridae)	子弹形	70 × 180	+	螺旋	鱼虾鳖
嵌杯样病毒(Caliciviridae)	球形	30—38	−	二十面体	鱼蛙鳖
野田病毒(Nodaviridae)	球形	约 30	−	二十面体	鱼
小 RNA 病毒(Picornaviridae)	球形	20—30	−	二十面体	鱼虾
披膜病毒(Togaviridae)	球形	40—70	+	二十面体	蛙虾

1 鱼类病毒病

1. 1 重要病毒的种类及形态特征

我国水生动物病毒学研究始于 70 年代后期对草鱼出血病病原的分离鉴定。Wolf^[4]在对 70—80 年代国际上鱼类病毒学研究情况进行介绍时, 也收录了我国草鱼病毒研究的早期资料。近十年来, 国内外学者在对早期分离到的、有重要危害性的鱼类病毒进行研究的同时, 又发现和分离到新的鱼类病毒^[5]。列举一些重要的鱼类病毒及病毒病如下(表 2)。

1. 2 草鱼出血病与呼肠孤病毒

由呼肠孤病毒引起的出血病是草鱼种苗阶段危害性大、流行普遍的疾病, 也是我国最早发现和研究得最多的鱼类病毒病。超微观察显示, 在病鱼肾细胞中发现有呈球形或六角形、平均直径为 69nm 的病毒颗粒。病毒对酸(pH3) 和氯仿不敏感, 对热(56) 稳定。经丫啶橙染色及 DNA 合成抑制剂测试, 表明该病毒属双股 RNA 类型。对病毒的核酸进行电泳分析, 出现 11 个片段。因此将草鱼出血病病毒归类于呼肠孤病毒。近年对草鱼呼肠孤病毒的分子生物学、干扰素等的研究有较多报道。在采取随机引物反转录合成病毒各基因片段的 cDNA, 将其与载体连接、电转化感受态细胞之后, 用 PCR 测序, 获知病毒 RNA 第

11 片段的部分序列^[6]。通过细胞病变抑制法, 测定了呼肠孤病毒诱导草鱼外周血中干扰素产生的规律, 了解了其活性达到高峰的条件及干扰素的作用范围^[7]。利用紫外线灭活的病毒, 对在几种鲤科鱼培养细胞中诱导产生干扰素的能力及影响也进行了研究^[8]。将出血病病毒与随机噬菌体九肽库在体外作用, 通过对阳性噬菌体克隆插入序列的分析, 推导出抗此种病毒多肽的氨基酸序列^[9]。

表 2 部分重要的鱼类病毒
Tab. 2 Some of fish viruses

病 毒 名 称	宿 主	分 类	病 症
斑点叉尾 病毒 Channel catfish virus disease, CCV	斑点叉尾	疱疹病毒科	急性出血症
草鱼呼肠孤病毒 Grass carp reovirus, GCRV	草鱼	呼肠孤病毒科	出血症
鲑鱼疱疹病毒 Herpesvirus salmon disease, HS	虹鳟	疱疹病毒科	突眼腮失血 狂游粘液便、 贫血
传 染 性 造 血 器 官 坏 死 病 毒 Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV	鲑、鳟	弹状病毒科	鳍充血
传染性胰腺坏死病毒 Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV	鲑、鳟	双 RNA 病毒	眼突腹大鳍红 泳动失调
日本鳗鲡虹彩病毒 Japanese eel iridovirus	鳗鲡	虹彩病毒科	肛充血, 多粘液
马苏大马哈鱼病毒 <i>Oncorhynchus masou</i> virus, OMV	大马哈鱼	疱疹病毒	泳动异常呼吸障碍
鲈鱼虹彩病毒 Perch iridovirus	鲈鱼	虹彩病毒	泳动失去平衡
鲤春病毒血症 Spring viremia of carp virus, SVCV	鲤、鲢、鲫	弹状病毒	呼吸障碍与出血症
白斑狗鱼幼鱼弹状病毒 Pike fry rhabdovirus, PFR	狗鱼、草鱼	弹状病毒	使鱼突然大批死亡
病毒性出血性败血症病毒 Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV	鲑、鳟	弹状病毒	出血瘀血有腹水 肝脾肿大坏死
鳕鱼腺病毒 Atlantic cod ulcer adenovirus	鳕鱼	腺病毒	皮肤损伤和溃疡
鲑鱼鳔肉瘤病毒 Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus	鲑鱼	逆转病毒	产生肿瘤
神经坏死病毒 Striped jack nervous necrosis virus, SJNNV	鲑	野田病毒	神经坏死
鳊鱼病毒 <i>Siniperca chuatsi</i> virus, SCV	鳊鱼	待鉴定	致死性综合症
鲑鱼传染性贫血症病毒 Infectious salmon anaemia virus, ISAV	鲑鱼	副粘样病毒?	贫血症
流行性造血器官坏死病毒 Epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV	鳙鲢 等	虹彩病毒	造血器官坏死

除呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)外, 草鱼还有其它病毒分离株(或不同病毒)。如: 鱼呼肠孤病毒(Fish Reovirus, FRV), 其形态、大小、核酸类型及致病情况均与 GCRV 相同, 可能是 GCRV 的不同分离株; 呼肠孤病毒(Reovirus, RV), 其形态、核酸类型与 GCRV 也相同, 但直径较大, 使草鱼出现以肠出血为主的病症, 并可引起青鱼患出血病; 小核糖核酸病毒(Picornavirus, PRV), 直径约 20—30nm 无囊膜的球形病毒, 引起草鱼以肌肉出血为主的病症; 草鱼杆状病毒(Baculovirus of grass carp, GCBV), 大小为 150

×40nm、有囊膜的杆状 RNA 病毒,可使某些细胞形成和胞体^[10,11]。对从患痘疮病的鲤鱼中、濒死的鲮鱼中以及不同地区的草鱼中分离到的呼肠孤病毒进行了比较,结果表明它们的核酸电泳图谱和抗原性不同^[12]。

1.3 传染性胰腺坏死病(IPNV)

传染性胰脏坏死病是一种在虹鳟稚鱼阶段流行的急性病毒病,其流行范围遍及亚、欧、美各国,死亡率极高。1986 年在进口虹鳟鱼中分离到直径为 55—65nm 无囊膜的二十面体病毒,该病毒可在 RTG—2、R1、PG、CHSE 等冷水鱼细胞中繁殖,并引起不同程度的病变;对热和酸稳定,对脂溶剂不敏感。经血清学鉴定为 IPNV 的 S_p 株^[13]。在制备标准抗血清的基础上,建立了酶联免疫吸附(ELISA)的检测方法,可在 1—2d 内从病鱼组织中检测病原,并能鉴定出病毒的血清型^[14]。还建立了更为灵敏和迅速的生物素标记核酸探针检测 IPNV 的方法^[15]。

1.4 鲤痘疮病

痘疮病是鲤越冬前后常见、与水环境密切相关的传染性鱼病。该病的典型特征是皮肤增生,在患病鲤体表出现石蜡状的白色增生物斑点,即痘疮。痘疮与体表结合紧密,可不断变多变大,直至遍及体表,患病鱼商品价值降低或丧失。养殖温度在 14℃ 时,流行最为严重,病鱼体表布满痘疮,使鱼负载过重,消耗太多而导致死亡。病原是一种疱疹病毒,其直径约为 150nm,外有囊膜,呈球形,能在鲤上皮瘤细胞(EPC)中增殖并引起病变;在 15—18℃ 条件下,用划痕或注射的方式感染鲤,能使鲤体表出现痘疮^[16]。

1.5 鳊鲢病毒病

1.5.1 鳊鲢开口病 1991 年在福建养鳊场,出现了以出血及开口症为特征的流行病,很快引起鳊鲢的毁灭性死亡。病鱼口张开后不能合拢,口腔内膜充血,颅内、胸鳍和臀鳍出血,腹部有出血斑。经解剖可见肝呈灰白色或布满血丝。经电镜观察,在自然发病的鳊白细胞的胞质中有成团聚集的病毒颗粒呈晶格状排列。病毒为直径 40nm 的球形颗粒。用病鱼心、脾组织的除菌悬液,分别感染健康鳊,前者可引起鳊鲢出现与自然发病鱼一致的病症;但后者发病较轻。超微病变的表现是受感染的白细胞核膜变厚或形成不规则的褶皱,线粒体肿胀、变圆或空泡化^[17]。这是我国对鳊鲢病毒病首次报道。

1.5.2 鳊“狂游症” 1995—1997 年,在福建欧鳊养殖场中流行“狂游症”。病鳊在发病初期无明显体表症状,但呈逆水流或曲线状快速游动,食量剧减。随着病情加重,病鳊在水中上下乱窜,并伴有肌肉痉挛,腹部擦伤、甚至穿孔等。解剖仅见肝肿大,而病理检查可见肝、肾和心的细胞病变、坏死。经人工感染,显示病鳊比原发病鳊的组织病理学变化更严重,等量组织裂解液中的病毒含量为原发病鳊的 10 倍^[18]。根据形态观察,认为是鳊鲢冠状病毒样病毒,还可进行细胞培养^[19]。另有报道指出,从患“狂游症”的病鳊脑细胞中观察到一种弹状病毒,病毒颗粒大小为 50—80nm × 100—250nm,有包涵体;推测发病原因是病毒在脑内大量复制,引起脑细胞肿胀坏死,诱发神经系统功能紊乱,使鱼呈兴奋状的“狂游症”^[20]。

1.6 鳊病毒病

1996 年有关于鳊病毒(*Siniperca chuatsi virus*, SCV)的最早报道^[21],包括病毒的形态大小、回接感染、理化性质、病症和组织病理等。随后水产科学院珠江水产研究所^[22]、广

州中山大学^[23] 等对鳊病毒病也作了描述, 但观察到的病原不同, 是虹彩病毒^[24]。

在鉴定了鳊球形病毒(*Siniperca chuatsi* spherical virus, SCSV) 病原后, 研制了 SCSV 疫苗, 并在实验室取得明显免疫防治效果。但将 SCSV 疫苗用于大水面养殖鳊鱼的病毒病防治, 却难达到预期目标。进一步的研究结果显示, 这是由于在患病鳊组织中存在不同病毒的缘故, 分别观察到直径约为 280nm 的球形病毒、大小分别约为 120 × 250nm 和 100 × 200nm 的弹状病毒与杆状病毒^[25]。另外关于鳊球形病毒的病理、细胞培养以及纯化等研究也有新进展^[26]。

1. 7 真鲷病毒病

经超薄切片电镜观察, 从患狂游症的真鲷幼鱼脾和肠组织中检测到大量直径约 120nm 的六角形病毒颗粒, 主要位于细胞核内。感染的细胞肿胀, 有的比正常细胞增大 5—6 倍^[27]。

2 对虾病毒病

2. 1 对虾病毒的种类及其症状

人们习惯按病毒的形态及引起宿主的发病症状, 或按最先观察到病毒感染宿主的组织、器官以及出现病理变化的部位对病毒进行命名。关于病毒的中文译名, 遵循准确简明、约定成俗的原则^[28]。据此见报道的各种对虾病毒名列如下:

- 对虾杆状病毒(*Baculovirus Penaei*, BP);
- 斑节对虾杆状病毒(*Monodon Baculovirus*, MBV);
- 黄头杆状病毒(*Yellow-Head Baculovirus*, YBV);
- 白斑杆状病毒(*White-striate Baculovirus*, WSBV);
- 澳洲对虾杆状病毒(*Plebejus Baculovirus*, PBV);
- 淋巴组织杆状病毒(*Lymphoid Organ Baculovirus*, LOBV);
- 类呼肠孤病毒(*Roe-Like Virus*, RLV);
- 虾卵致死病毒(*Spawner Mortality Virus*, SMS);
- 对虾虹彩病毒(*Shrimp Iridovirus*, IRDO);
- 淋巴样器官细小病毒(*Lymphoid-Organ parvovirus*, LOPV);
- 中肠腺坏死杆状病毒(*Baculovirus of Midgut Gland Necrosis*, BMN or BMNV);
- 传染性皮下组织和造血器官坏死病毒(*Infectious Hypodermal and Haemopoietic Necrosis Virus*, IHNV);
- 肝胰腺细小病毒(*Hepatopancreatic Parvo-Like Virus*, HPV);
- 淋巴组织空泡化病毒(*Lymphoid Organ Vacuolization Virus*, LOVV);
- 对虾血细胞杆状病毒(*Penaeus Haemocytic Rod-Shaped Virus*, PHRSV);
- 血细胞非包涵体杆状病毒(*Hemocyte-Infection Nonoccluded Baculovirus*, HNBV);
- 日本对虾非包涵体杆菌状病毒(*Non-occluded Bacilliform Virus Infection in Penaeus japonicus*, PjNBV);
- 系统性外胚层和中胚层杆状病毒(*Systemic Ectodermal and Mesodermal*, SEMBV);
- Taura 综合症(*Taura Syndrome Virus*, TSV)^[29]

虾病毒归属 7 个病毒科, 感染无脊椎动物的病毒种类有 80% 以上在患病对虾中可以找到, 其中半数以上属于杆状病毒科。

2.2 对虾杆状病毒及病毒病

比较健康和感染草虾杆状病毒(MBV)的肝胰腺上皮细胞的超微病理变化,观察到感染细胞的核质中,随着包涵体和 MBV 增多,核染色质凝聚、核膜局部扩张,直至整个核崩解,胞质水肿,内质网增生、线粒体变性^[30]。从山东、厦门等虾场采集患病的中国对虾和日本对虾,制备病虾的组织切片和从病虾组织中提纯病毒,均可见大量杆状病毒。病毒颗粒直径为 70—100nm,长度为 300—360nm,酶解测定病毒核酸为 DNA,在日本对虾和中国对虾中观察到的杆状病毒在形态结构和大小上没有明显差别^[31]。比较了完整病毒颗粒和核衣壳的结构多肽,表明前者至少有 9 条,其分子量分别为 75kD, 65kD, 60kD, 50kD, 42kD, 32kD, 30kD, 28kD 和 15kD,而后者结构多肽较少,为 75kD, 65kD 和 15kD 这 3 条^[32]。

在进行对虾病毒超微观察时,比较注意病毒的囊膜和包涵体的有无、病毒在宿主细胞内的位置,这是杆状病毒的重要特征。从河北采集病虾样,观察到杆状病毒的平均大小为 $110 \times 250 - 300\text{nm}$,无核内包涵体,但在肝胰腺和中肠上皮细胞的胞核内出现了病毒发生基质^[33]。从上海郊区采集病虾样,经过病虾的腮、肝、胰腺或中肠组织进行超薄切片处理及电镜观察,发现细胞核内存在有囊膜包裹的杆状病毒,有时一个囊膜还可同时包裹两个病毒核衣壳。经有机溶剂处理、差速离心及密度梯度离心,可获得部分提纯的病毒。超薄切片中病毒粒子和核衣壳的大小分别为 $170 - 180 \times 440 - 500\text{nm}$, $110 - 140 \times 330 - 420\text{nm}$,而提纯的核衣壳为 $70 - 85 \times 350 - 400\text{nm}$;未见该病毒有包涵体^[34]。

组织病理学研究表明,杆状病毒感染的病虾甲壳上有典型白斑,肝胰腺颜色变淡;经苏木精-伊红染色,在其前肠上皮、后肠上皮、造血组织、腮、血细胞等的胞核内均有典型的核肿大和深染病变^[35]。对长毛对虾(*P. penicillatus* Alcock)组织切片进行电镜观察,在病虾中肠前段、肝胰腺上皮细胞核和质及腹肌纤维间质中看到了大量密集和散布的具囊膜的杆状病毒。这种病毒引起病虾中肠和肝胰腺上皮细胞的主要病变为细胞核肥大、畸形,核内被病毒占据、染色体着边、缩小,核仁解体分离、核膜增厚,内质网、线粒体减少^[36]。

用提纯的对虾病毒免疫兔子,获得较高效价的抗血清,初步建立了酶联免疫吸附测定方法,灵敏度达 60ng ^[37]。参考昆虫杆状病毒和 MBV 的多角体蛋白基因序列,设计了两对 PCR 引物,一对引物之间的序列包括决定多角体的全基因,另一对引物包括两个相对保守区。从对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒进行 PCR 扩增,分别获得 800bp 和 480bp DNA 片段^[38]。

2.3 对虾球形病毒及病毒病

从感病的中国对虾中分离到一种球形病毒,其直径约为 $20 \pm 4\text{nm}$,人工感染使对虾死亡率为 66%。用脱氧核糖核酸酶(DNase)和核糖核酸酶(RNase)作用,二苯胺染色,证实病毒含单链 DNA。SDS-PAGE 结果显示,该病毒含 4 条结构多肽,其分子量分别为 86kD, 79kD, 70kD 及 25.5kD,并将此病毒定名为中国对虾细小病毒(*Penaeus chinensis* Parvovirus, PcPV)^[39]。通过显微和超微技术,观察健康对照组、疾病始发组和濒临死亡组的草虾、中国对虾、日本对虾和长矛对虾的肝胰腺和中肠,在濒临死亡组的 4 种对虾中发现了病毒与细菌的合并感染,其中有 MBV、球形病毒和杆状病毒。病理变化表现为组织的保护层受损和坏死^[40]。

3 两栖动物病毒病

3.1 病毒种类

在已知虹彩病毒科的 5 个属: 蛙病毒(*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒(*Lymphocystivirus*)、类金鱼 型病毒(*Goldsish virus I-like viruses*)、昆虫病毒(*Iridovirus*) 和绿虹彩病毒(*Chloriridovirus*) 中, 已证实蛙病毒属是两栖动物重要的病原, 可使蝌蚪、幼蛙和蟾蜍致死, 但对于自然宿主中的成年蛙来说, 为条件致病病原。在 12—32 条件下, 能在多种动物培养细胞中生长。蛙病毒除蛙类以外, 有时也感染鱼、禽、哺乳动物。

3.2 蛙病毒及病毒病

我国养殖的美国青蛙又称沼泽绿牛蛙(*Rana grylio*), 原产于北美, 于 1987 年由国外引进。引起牛蛙疾病的病原有的是菌^[41], 有的是病毒。已经证实从我国最早分离到的美国青蛙病毒(*Rana grylio Virus*, RGV) 属虹彩病毒^[42], 该病原引起的病害主要流行于变态不久的幼蛙群中。发病初期, 蛙的体表有出血点, 继而扩展到腹部和四肢, 出现充血、出血或溃烂。解剖观察, 可见肠壁严重充血, 肠道内空而无物。此病病程短、蔓延极快, 一旦发病, 仅 2d 左右蛙群中的死亡率就可达 90%。用粗提的病毒液接种到长成单层的培养细胞上, 可引起不同鱼类细胞产生病变。培养温度对 RGV 扩增有明显影响, 在 20 —30 范围内, 随温度升高细胞病变时间缩短, 病毒滴度增加。对人工感染 RGV 的蛙组织切片进行显微观察, 显示肝、肾、心、脾、肠和肺中的组织和细胞结构不同程度受损, 并丧失功能。经电镜观察, 了解到病毒在细胞内的形态发生及与宿主细胞的相互作用, 揭示了 RGV 的感染机理^[43]。自 1995—1998 年, 已从不同地区和不同生长期的病蛙中分离到 3 株虹彩病

表 3 两栖类病毒
Tab.3 Listing of the amphibian viruses

病毒属	病毒名称
DNA 病毒	
虹彩病毒 (Iridoviridae)	蛙病毒 1—2 型(<i>Frog Virus 1- 2</i> , <i>FV1- 2</i>) 蛙肾腺癌病毒(<i>Frog Lucke adenocarcinoma virus</i> , or <i>Lucke-tum or 1- 4</i> , <i>LT1- 4</i>) 蛙病毒 3 型(<i>Frog Virus 3</i> , <i>FV3</i> ; <i>FV9- 23</i>) 牛蛙水肿病毒(<i>Tadpole Oededma Virus of Bull Frog or Tadpole Ededma Virus</i> , <i>TEV</i>) 蛙红细胞病毒(<i>Frog Erythrocytic Virus</i> , <i>FEV</i>) 蛙白细胞病毒(<i>Amphibian Leukocyte Virus</i> , <i>ALV</i>)
疱疹病毒 (Herpesviridae)	蛙病毒 4 型(<i>Frog Virus 4</i> , <i>FV4</i> or <i>Ranid Herpesvirus 2</i> , <i>RHV2</i>) 蛙疱疹病毒 1 型(<i>Ranid Herpesvirus</i> , <i>1</i> , <i>RHV1</i>) 蛙病毒 5—8 型(<i>Frog kidney tum or virus</i> , <i>Frog virus 5- 8</i> , <i>Lucke tumor virus</i>)
腺病毒 (Adenoviridae)	蛙腺病毒 1 型(<i>Frog Adenovirus 1</i> , <i>FAV1</i>)
乳多空病毒(<i>Papovaviridae</i>)	
RNA 病毒	
披膜病毒(<i>Togaviridae</i>)	辛德毕斯病毒(<i>Sindbis Virus</i>)
嵌杯样病毒(<i>Caliciviridae</i>)	

毒,中国科学院水生生物研究所的学者现正与美国学者合作,对蛙不同虹彩病毒分离株的分子结构进行比较研究。

4 爬行动物病毒病

4.1 病毒的种类

虽然 60 年前就有绿海龟纤维性乳头瘤(Green turtles fibropapillomas, GTFP)的记载,但直到 90 年代有关研究才有明显进展。观察到其它海龟中也出现类似的病害。通过多聚酶增强逆转录(Polymerase enhanced reverse transcriptase, PERT)技术,证明夏威夷群岛出现的 GTFP 是逆转病毒所致^[44]。此外爬行动物病毒研究的资料尚不多。

4.2 中华鳖病毒及病毒病

通过采集患病中华鳖样品,结合电镜观察及对多种细胞的感染性测定等,发现中华鳖病毒;并经人工感染试验证实病毒是引起中华鳖病害流行的重要病原^[45]。中华鳖病毒(*Trionyx sinensis* Virus, TSV)是直径为 30nm 的无囊膜球形病毒。TSV 有 5 条结构多肽,其分子量分别为 85kD, 60kD, 55kD, 18kD 和 12kD,其中 18kD 和 12kD 的多肽是该病毒结构蛋白的主要成分。TSV 增殖明显受温度的影响;TSV 可导致宿主细胞凋亡和坏死^[46]。近年,厦门大学、厦门水产研究所、中山大学、长江水产研究所、深圳动植物检疫局等多家研究单位和大学也相继开展了有关研究。应用电镜超薄切片技术,对福建省养鳖场采集的患出血病鳖样进行观察,见到一种直径为 35–39nm 的球形病毒,该病毒分布在鳖的肺、胃、咽喉粘膜和腹甲皮层,主要靶细胞是细小血管的内皮细胞^[47]。还从深圳一甲鱼场患‘红脖子’病的甲鱼中分离到虹彩病毒^[48]。

5 其它水生动物病毒

5.1 中华绒螯蟹病毒病

关于螃蟹病毒病原的研究,国外虽早些时候已对两种呼肠孤病毒(P&W)作了报道,但国内近年才开始这方面的研究,包括对中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究^[49]和对中华绒螯蟹小核糖核酸病毒及其组织病理等研究^[50]。经电镜在病蟹组织的超薄切片中观察到无囊膜、直径为 28–32nm 的球形病毒颗粒,根据病毒的形态和染色反应,推测该病毒为小 RNA 病毒,并进行了回接感染及病理分析^[50]。另在虾池中发现有蟹带病毒^[51]。

5.2 三角帆蚌病毒病

1978 年连续发生大面积、被称为“三角蚌瘟病”的传染性蚌病,1986 年确定为病毒病,1987 年分离到病原,经形态学初步鉴定为嵌沙样病毒(Arenaviridae),并定名为三角帆蚌瘟病毒(*Hyriopsis cumingii* Plague Virus, HcPV)^[52,53]。从自然发病的三角帆蚌中分离到蚌瘟病毒,这是一种呈球形或多形态、直径为 40—210nm 的病毒。病毒基因组由 33S、28S、22S、18S 和 5S 等 5 个分节段的单链 RNA 分子。病毒多肽有 4 个,分子量分别为 46kD、41kD、39kD 和 18kD^[54]。

5.3 皱纹盘鲍病毒病

1994—1996 年对大连地区患有“裂壳病”的养殖鲍苗种进行显微和超微观察,并通过人工感染证实,该病的病原是大小为 90—140nm 的球形病毒,该病毒主要侵染血细胞。病

症为鲍壳薄,壳缘外翻,壳孔相互串联,摄食力降低,生长缓慢,逐渐死亡。对外套膜、足、腮、肝、嗉囊及胃肠 7 个主要器官的组织病理变化进行观察,结果表明其病变的共同特征是结缔组织排列紊乱,细胞坏死^[55]。

6 病毒病的检测与诊断

及早发现和确诊水生动物是否被病毒感染,并采取相应措施防止病毒病流行扩散是减少生产中损失最有效的途径。病毒病的诊断方法虽多种多样,但可简要归纳为下述几类。

6.1 生物测定

利用某些宿主对病毒侵染易感的特点,将其作为指示动物,可对水生动物病毒病进行初步检测。如蓝对虾感染病毒后,症状很明显。当把怀疑带病毒的对虾组织投喂给它,或将这种对虾组织匀浆后的上清液注射到指示虾体内,观察反应。如果被检者带有病毒,则可传染指示虾,在实验 2—3 周将出现相应的病症,据此可诊断样虾是否被病毒感染。又如,在中国科学院院士曹文宣研究员的指导下,王剑伟博士养殖的稀有 鲫,是一种对草鱼出血病病毒很敏感的鱼,用含有病毒的匀浆液注射或浸泡后 1—2 周后,就可产生出血症。因此,可用稀有 鲫作为草鱼出血病病毒的指示动物。

6.2 显微镜观察

从大量的镜检观察中,人们发现和总结出一些特征性的数据或指标,使显微镜技术成为用于对某种水生动物病毒鉴定和诊断的重要方法之一。显微镜观察既可采用光镜,也可通过电镜进行。以患病对虾镜检为例,在普通光镜下可见感染病毒的对虾组织甚至细胞发生病理变化,再配合使用适当的染色技术,还可观察到包涵体。如对 HPV 轻度感染的病虾组织切片进行观察,可见细胞核膨大,核内有包涵体。包涵体在形成早期为轻度嗜碱性,HE 染色呈紫红;而在后期包涵体为嗜酸性,HE 染色呈紫蓝。其它水生动物病毒,包括草鱼出血病病原、鲤鱼痘疮病原、鳊鲌开口病和狂游病原、对虾爆发性流行病多种病原、牛蛙病毒病原、中华鳖流行病不同的病毒病原,还有贝、蟹等的病毒病原,其中有相当多的资料是来自电镜观察。

现在电镜用于研究水生动物病毒的研究,其视野已不局限于观察细胞病变、病毒的形态大小和分类,而且扩展到用于了解病毒的感染和复制机理、病毒的形态发生等。病毒囊膜的有无是水生动物病毒的基本结构及分类特征之一,对此电镜观察能提供直接证据。如通过电镜观察和结构多肽分析表明,斑节对虾杆状病毒可以有囊膜和无囊膜两种形式存在,它们的结构多肽有差异,密度也不同,可通过密度梯度离心将它们分离^[32]。详细观察牛蛙病毒(RGV)的吸附、入侵、脱壳、复制与装配等全部增殖过程也是借助电镜完成的^[43]。

6.3 生化检验

在对淡水螯虾研究时发现:在对异物识别等免疫反应中,起关键作用的是其血细胞的酚氧化酶原系统。在此系统中当酶原被激活后,则可促进血细胞产生抗病毒应答反应。在研究感染病毒的中国对虾肝胰脏病理变化时,检测到病虾肝胰脏的酯酶(Esterase, EST)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的活性显著减弱,表明病虾代谢功能与

免疫功能明显衰退^[56]。由此可见:通过对某些特定生化物质的检测,可了解宿主动物被病毒感染与否及其应答情况。

6.4 细胞培养

细胞培养技术是病毒学研究的基础,也是用于病毒病诊断的经典方法之一(表4)。当然,不同病毒的敏感宿主细胞有可能不同。因此,在试图通过细胞培养的方法鉴定和分离病毒时,需事先了解某种细胞对病毒的敏感性。

表 4 不同鱼类病毒最初检出方法的比较

Tab. 4 Comparison of first detection methods for different fish viruses

病毒名称	最初检出方法	病毒名称	最初检出方法
斑点叉尾 病毒	分离培养	丽鱼病毒虹彩病毒	电镜
鲤鱼疱疹病毒	分离培养	金鱼缸彩病毒	分离培养
鲑疱疹病毒	分离培养	淋巴囊肿虹彩病毒	分离培养
大菱鲈疱疹病毒	电镜	红细胞坏死虹彩病毒	电镜
白狗鱼疱疹病毒	电镜	传染性造血器官坏死病毒	分离培养
马苏大马哈鱼疱疹病毒	分离培养	鲈鱼弹状病毒	分离培养
大口鲈疱疹病毒	分离培养	白斑狗鱼幼鱼弹状病毒	分离培养
六须鲇疱疹病毒	电镜	鲤鱼春季病毒血症病毒	分离培养
病毒性出血败血症病毒	分离培养		

6.5 分子生物学方法

建立敏感可靠的方法,以用于病毒病原的检测,对于控制水生动物病毒病流行具有积极意义。这些方法包括培养细胞的感染性、标记抗体试剂用于病毒蛋白的测定、核酸探针进行原位杂交或聚合酶链式反应(PCR)等。上述方法对诊断治疗人类与脊椎动物病毒病起到非常重要的作用,而这些技术方法在近年才逐渐引鉴到水生动物病毒病的诊断和防治中,其中有的在运用中还需进一步探索与完善,有的已取得明显进展。

6.6 几种病毒检出方法的比较

关于新的和改进的方法用于鱼类病毒 IHNV 的检测已有大量报道。虽然生化、免疫及分子生物学方法用于鱼类病毒病原的检测很灵敏、快速,但需有前期工作基础;培养细胞用于病毒检测,虽受限制因素较多,不够灵敏、费时,但这种方法还可作为研究病毒复制、感染、基因调控等基础理论问题的模型。将各种方法用于鱼病毒测定的优缺点作一比较(表5)。

在对虾病毒的检测中应用到 DNA 重组技术。构建中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV) DNA 文库,从中筛选了 3 个 DNA 片段,用光敏生物素标记成探针,用于对虾病毒的检测,取得满意结果^[57]。通过斑点免疫吸附 ELISA (Dot-ELISA) 快速检测草鱼出血病毒病(GCHV),并对该方法的灵敏度与葡萄球菌 A 蛋白协同凝集实验(SPA-CoA)的灵敏度作比较,结果表明, Dot-ELISA 检出 GCHV 的最低含量为 3pg,其灵敏度为 SPA-CoA 的 10—20 倍^[58]。

表 5 用不同方法测定 IHNV 的比较
Tab. 5 Comparison of different assays for IHNV

技术方法	测定时间	灵敏度	优 点	缺 点
感染性	14—21d	1PFU= 500 颗粒	灵敏	费时
与球菌凝集	5min	1 × 10 ⁶ PFU/ml	快速简便	无敏感试剂, 应用不广
PCR	2—4h	1 × 10 ³ PFU/ml	快速简便	要有熟练技术、引物
免疫荧光	1h	不能测精、卵	快速	仅观察血涂片肾印片
血清中和反应	14d	1PFU		费时
电泳	48h	1 _{ng} 2. 5 × 10 ^{- 3} PFU		技术要熟练、放射性标记
过氧化物酶 Ab	50h	50ng 病毒蛋白	定型	技术要熟练、高滴度抗体
I ¹²⁵ Ab	66h	25ng 病毒蛋白	定型	技术要熟练、放射性
ELISA	12h		快速	需有效试剂、抗体
荧光免疫	49h		定型	需免疫荧光显微镜
生物素标记探针	5d			技术要熟练、探针有效
免疫细胞化学	4h	1PFU	病毒定位	单抗
PCR	24h	非感染性病毒	组织定位	技术要熟练、需有效引物

PFU: Plaque forming unit, 空斑形成单位。

6. 7 疫苗的制备与病毒病的防治

对于病毒性疾病, 目前尚无特效药。专家们一贯反对滥用药物, 认为那样不仅会降低鱼虾等水生动物亲本产卵的质量; 而且也会降低养殖动物自身的抗病能力, 并留下残毒, 污染水体和环境。筛选或通过细胞工程、基因工程培育抗病品种, 是很有希望并能从根本上进行病毒病防治的途径。

灭活疫苗、减毒疫苗、细胞工程疫苗等对草鱼出血病的防治作出重要贡献, 然而, 在它水生动物中, 疫苗的制备与病毒病的防治尚处于经典方法的应用阶段, 还有大量研究工作有待展开。近年相继问世的亚单位疫苗、合成疫苗基因工程疫苗、核酸疫苗已领先在人类病毒病防治中得到应用, 这为水生动物病毒病的免疫治疗提供了借鉴。单克隆抗体作为新的、高效免疫制剂, 有加强研制, 开发使用的前景。利用基因转移技术, 将表达某种抗原的基因导入体内, 通过抗原基因的表达, 诱导保护性抗体, 刺激机体产生抗病毒免疫反应。中国科学院院士朱作言在国际上首次获得转基因鱼的成功经验, 为鱼类病毒抗原基因转移提供了理论和技术依据。

参考文献:

[1] Wolf K, Snieszko S F, Dunber C E. Infectious pancreatic necrosis, a virus-caused disease of fish [J]. *Excerpta Med.* 1959, **13**(sect. 1): 228

[2] Ahne W, Kurstak E. Eds. *Viruses of low vertebrates* [M]. New York: Soringe-Verlag Berlin Heidelberg, 1989

[3] The Fourth International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates Book of Abstruacts [C]. Weymouth UK, 1998

- [4] Wolf K, Fish viruses and fish viral diseases [M]. Cornell University Press. 1988
- [5] Dannevig B H, Falk K, Namork E, Isolation of the causal virus infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon heas kidney [J]. *J. General Virol.* 1995, **76**: 1353- 1359
- [6] 田静, 邹桂平, 方勤, 等. 鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及部分序列分析[J]. 中国病毒学, 1999, **14** (1): 87—92
- [7] 邵健忠, 钱凯先, 项黎新, 等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究[J]. 病毒学报, 1998, **14** (4): 246—351
- [8] 王铁辉, 张义兵, 李戈强, 等. 鱼类培养细胞干扰素的诱导[J]. 病毒学报, 1999, **15** (1): 43—49
- [9] 王冰, 柯丽华, 田波. 抗草鱼出血病病毒多肽的结构分析[J]. 中国病毒学, 1998, **13** (4): 358—363
- [10] 华鼎可. 我国鱼病学研究的现状与进展(一) [J]. 现代渔业信息, 1995, **10** (3): 9—15
- [11] 黄琪琰, 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993, 65—94
- [12] 江育林, 李燕, 李正秋. 对几种草鱼呼肠孤病毒株的比较和评价[C]. 鱼病研究论文集(第二辑), 1995, 3—8
- [13] 江育林, 徐伯玄, 李伟, 等. 虹鳟鱼传染性胰腺坏死病毒病(IPNV) 的初步研究[J]. 水生生物学报, 1989, **13** (4): 353—358
- [14] 江育林, 于平, 李正秋. 用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病病毒[J]. 水生生物学报, 1990, **14** (3): 276—279
- [15] 周建玲, 童章亮, 宫云浩. 用生物素标记核苷酸 DNA 探针快速检测鱼传染性胰腺坏死病病毒 IPNV [J]. 水产学报, 1995, **19** (4): 310—314
- [16] 江育林, 李燕, 李正秋. 鲤痘疮病病原的电镜观察初报[J]. 水生生物学报, 1991, **15** (2): 193—195
- [17] 陈燕新, 陈宏, 韩先朴, 等. 我国发生一种鳊鳊病毒性流行病[J]. 科学通报, 1992, **23**: 2190—2192
- [18] 陶增思, 黎诚耀, 杨盛华, 等. 鳊鱼“狂游病”病原学研究[J]. 中国兽医学报, 1997, **17** (1): 30—32
- [19] 岳玉环, 黎诚耀, 杨盛华, 等. 鳊鱼冠状病毒样病毒的细胞分离与培养[J]. 水产学报, 1998, **22** (3): 230—233
- [20] 黄印尧, 陈信忠, 颜江华, 等. 欧鳊(*Anguilla anguilla*) “狂游症”病研究[J]. 鱼类病害研究, 1997, **19** (3—4): 62
- [21] 张奇亚, 李正秋, 桂建芳. 特种水产养殖动物病毒病及其防治的生物技术研究[C]. 中美农业科技与发展研讨会论文集, 北京: 中国农业出版社出版, 1996, 168—17
- [22] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊鱼爆发性传染病病原的研究[J]. 水产学报, 1997, **21**(增刊): 50—56
- [23] 何建国, 翁少平. 鳊鱼爆发性流行病病原的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, **37** (5): 74—77
- [24] 李新辉, 吴淑勤, 潘厚军等. 一种检测鳊鱼病毒方法[J]. 中国水产科学, 1997, **4** (5): 112—113
- [25] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到 3 种病毒[J]. 科学通报, 1999, **44** (2): 192—195
- [26] 张奇亚, 李正秋. 鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析[J]. 水生生物学报, 1999, **23** (2): 17—21
- [27] 何爱华, 郑永和, 郭永建, 等. 真鲷幼鱼狂游症病毒病原初步研究[J]. 中国水产科学, 1998, **5** (1): 127—128
- [28] 陆承平. 最新脊椎动物病毒分类简介[J]. 中国兽医学报, 1996, **16** (1): 94—100
- [29] Lightner D V, Redman R M, Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas [J]. *Fish Pathology*, 1998, **33** (4): 165—180
- [30] 陈细法, 吴定虎, 黄槐, 等. 草虾感染草虾杆状病毒(MBV) 后肝胰腺上皮细胞病理变化的电镜观察[J]. 水产学报, 1994, **18** (4): 265—270
- [31] 江育林, 张奇亚, 刘荭, 等. 我国对虾爆发流行病病因初探[J]. 水生生物学报, 1995, **19** (2): 187—187
- [32] Zhang Qiya, Jiang Yuli, Li Yan, et al. Isolation and characterization of nucleocapsids and envelop virions of *Penaeus monodon* baculovirus [J]. *Acta Hydrobiological Sinica* 1998, **22** (Suppl): 1—5
- [33] 张建红, 陈康华, 肖连春, 等. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生[J]. 中国病毒学, 1994, **9** (4): 362—365
- [34] 彭宝珍, 任家鸣, 沈菊英, 等. 急性致死性对虾的杆状病毒病原研究[J]. 病毒学报, 1995, **11** (2): 151—157
- [35] 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下造血组织坏死——对虾爆发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, **16** (1): 1—7
- [36] 吴友吕, 王方国, 洪健. 长矛对虾杆状病毒研究[J]. 电子显微学报, 1994, (4): 356
- [37] 涂小林, 钟江, 高双诚, 等. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法[J]. 水产学报, 1995, **19** (4): 315—321

- [38] 孔杰, 张岩, 刘萍, 等. 对虾一种杆状病毒多角体蛋白基因的 PCR 扩增[J]. 海洋水产研究, 1995, **16**(1): 63—67
- [39] 肖连春, 石正丽, 高玮, 等. 中国对虾一种球状病毒的分离及其核酸蛋白特性的研究[J]. 中国病毒学, 1995, **10**(4): 356—361
- [40] 陈细法, 吴定虎, 黄槐, 等. 对虾病毒和细菌合并感染的病理特点和诊断价值[J]. 病毒学报, 1997, **13**(2): 146—150
- [41] 张奇亚, 李正秋, 吴玉琛, 美国青蛙“旋游症”病原菌的分离鉴定及其组织病理学观察[J]. 中国兽医学报, 1999, **19**(2): 152—155
- [42] 张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 1996, **20**(4): 390—392
- [43] Zhang Qi-Ya, Li Zhen-Qiu, Gui Jian-Fang, Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line [J]. *Aquaculture*, 1999, **175**: 185—197
- [44] Casey R N, Quackenbus S L, Work T M, et al, Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian islands [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, **31**: 1—7
- [45] 张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 中华鳖病毒病病原的发现[J]. 科学通报, 1996, **41**(21): 1987—1990
- [46] 张奇亚, 李正秋, 桂建芳. 中华鳖病毒病引起宿主死亡的细胞病理学研究[J]. 病毒学报, 1999, **15**(1): 50—54
- [47] 陈平, 池信才, 陈细法, 等. 养殖中华鳖一种球形病毒的电镜观察[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, **36**(4): 426—428
- [48] 陈在贤, 郑坚川, 江育林. 从患“红脖子病”甲鱼体分离到虹彩病毒[J]. 中国兽医学报, 1998, **18**(2): 135—139
- [49] 何介华, 贺路, 曾令兵, 等. 中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究[J]. 淡水渔业, 1999, **3**: 10—11
- [50] 陆宏达, 范丽平, 薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, **23**(1): 61—68
- [51] 严携箕. 虾池中蟹病毒的研究[J]. 水产科学, 1995, **14**(3): 14—15
- [52] 张治国, 丁苏芳, 许益民, 等. 三角帆蚌瘟病毒的研究——一种新的病毒病[J]. 微生物学报, 1986, **26**(4): 308—312
- [53] 张治国, 丁苏芳, 汪浩, 等. 三角帆蚌瘟病毒的研究——三角帆蚌瘟病的病原——一种嵌沙样毒病[J]. 微生物学报, 1987, **27**(2): 116—120
- [54] 邵建忠, 项黎新, 毛树坚, 等. 三角帆蚌病毒的精细结构与基因组及多肽的研究[J]. 病毒学报, 1993, **9**(2): 160—166
- [55] 李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J]. 水产学报, 1998, **22**(1): 61—66
- [56] 蔡完其, 陆宏达. 患爆发性病毒病的中国对虾肝脏病理变化[J]. 上海水产大学学报, 1994, **3**(1—2): 27—33
- [57] 刘萍, 张岩, 孔杰, 等. 中国对虾皮下造血组织坏死杆状病毒(HHNBV) DNA 探针的制备及应用[J]. 海洋水产研究, 1995, **16**(1): 63—66
- [58] 邵建忠, 项黎新, 李亚南, 等. 应用 Dot-ELISA 技术快速检测草鱼出血病病毒的研究[J]. 水产学报, 1996, **20**: 6—12