

中国本溪虹鳟一株弹状病毒的分离及初步研究*

赵志壮 牛鲁祺

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150076)

提 要

1990年4月, 辽宁省本溪市虹鳟鱼种场的虹鳟稚鱼爆发大规模疾病, 死亡率近100%。取病鱼组织处理后接种于鱼类细胞, 出现明显的细胞病变, 测定细胞培养物中的病毒滴度, 最高达 $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.1ml。感染病毒的细胞用1%营养琼脂糖覆盖后可形成0.5—1.5mm的蚀斑, 分离到的病毒对氯仿敏感, 不耐热、不耐酸, 在细胞内复制的最适温度为15℃。室内人工感染的虹鳟稚鱼能复制出与天然发病相同的症状。对感染病毒的细胞制成超薄切片, 透射电镜观察, 病毒长为131—173nm, 平均148nm, 直径为58—91nm, 平均71nm, 形状为子弹状, 表明是弹状病毒, 有囊膜及纤突。采用挑斑法得到了纯化的病毒株, 暂称之为传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株 IHNV-B。

关键词 虹鳟, 弹状病毒, 传染性造血器官坏死病毒, 分离

迄今为止, 世界上已经报道共约50种鱼类病毒^[1], 属于弹状病毒科的虹鳟传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)是其中危害极为严重的一种, Amend等于1969年首次在美国分离出来, 继而Sano于1975年在日本分离得到^[2-4], 对于该病毒以及由其引起的疾病已有大量的研究报道^[5-7]。在我国, 从1985—1987年牛鲁祺等对东北地区的IHN和IPN进行了流行病方面的初步研究^[8]。1990年, 辽宁省本溪市虹鳟鱼种场虹鳟稚鱼爆发急性流行病, 死亡近100%, 采样后经细胞培养分离出一种弹状病毒, 经形态学观察、理化特性和生物学特性测定, 结果提示可能是传染性造血器官坏死症病毒, 现将报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源与病毒分离

1.1.1 取材 病鱼材料取自辽宁省本溪市虹鳟鱼种场人工繁殖鱼卵孵化后七周的虹鳟

* 电镜照片由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所电镜室协助拍摄, 在此致谢。

1991年5月4日收到。

(*Oncorhynchus mykiss*) 稚鱼, 长约 2.5cm, 体重约 0.2g, 低温运回实验室, -70°C 保存。

1.1.2 细胞培养 三种细胞为虹鳟性腺细胞 RTG-2、大鳞大马哈鱼胚胎细胞 CHSE 和黑头软口鲮细胞 FHM, M199 培养基, 内含 10% 胎牛血清, 青霉素 100IU/ml, 链霉素 100 μg /ml, 卡那霉素 100IU/ml, pH7.3, 18°C 培养。

1.1.3 病毒分离 取病鱼组织用生理盐水洗数次后称重, 剪碎、匀浆, 加入 10 倍量的 M199 培养液, 其中含青霉素 1000IU/ml 和链霉素 1000 μg /ml, 置 4°C 过夜。次日低速离心取上清液, 用 0.3 μm 过滤除菌。取长满 25cm² 培养瓶的 CHSE 和 RTG-2 细胞, 每瓶接种病毒悬液 0.1ml, 4°C 吸附约 40min 后加入维持液, 置于 15°C 培养, 并设对照, 逐日观察细胞病变 (Cytopathic effect, 简称 CPE)。

1.2 病毒的理化特性测定^[9]

半数细胞培养物感染剂量值 TCID_{50} (50% tissue culture infections dose) 的测定均按 Reed-Muench 两氏法在 96 孔滴定板中 CHSE 细胞上进行^[10]。

1.2.1 脂溶剂敏感性测定 取 1ml 病毒悬液, 加入 0.5ml 氯仿, 对照加入 0.5ml 磷酸盐缓冲液 (PBS), 4°C 振荡混合 10min, 然后再以 500r/min 离心 5min 分离氯仿, 吸取上清液, 处理样与对照的未处理样分别测定 TCID_{50} 值。

1.2.2 pH 稳定性试验 取 1ml 病毒悬液, 用 1mol/L 盐酸调到 pH3, 于 15°C 保持 1h 后, 再用 1mol/L 氢氧化钠调回到 pH7.2, 对照样加入与上述等体积的 PBS 液, 两组样分别测定 TCID_{50} 值。

1.2.3 热稳定性试验 取病毒悬液于 56°C 水浴中 1h, 对照于 15°C 中, 然后分别作 TCID_{50} 值测定。

1.3 病毒的形态学观察

将病毒悬液接种于 CHSE 细胞, 15°C 培养 9d 后, 待细胞全部脱落, 将培养物以 2000r/min 离心 10min, 取沉淀的细胞用 4% 戊二醛预固定, 经缓冲液冲洗后, 再用 1% 锇酸固定, 按常规方法 Epon812 包埋, 超薄切片制成后用醋酸双氧铀与柠檬酸铅双重染色, JEM-1200EX 型电子显微镜观察。

1.4 病毒的生物学特性测定

1.4.1 生长温度 取 5 瓶长满 25cm² 的 CHSE 细胞, 各接种 0.1ml 病毒悬液, 分别置于 4°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 和 25°C 培养箱中, 逐日观察 CPE, 记录出现 CPE 的时间。

1.4.2 宿主范围 取长满的 CHSE、RTG-2 和 FHM 细胞, 接种病毒悬液, 同时分别以未接毒的细胞为对照, 于 15°C 中培养, 逐日观察 CPE, 7d 后收集上清液, 在 CHSE 中测定 TCID_{50} 值。

1.4.3 增殖情况 取数瓶长满 25cm² 培养瓶的 CHSE 细胞, 各接种 0.1ml 病毒悬液, 另以未接毒的细胞为对照, 置于 15°C 培养, 在接毒后第 4、6、8、10 和 12d 分别测定 TCID_{50} 值。

1.4.4 鱼体感染试验 取接毒后发生 CPE 的 CHSE 细胞培养物, 低速离心后取上清液, 以 0.3 μm 孔径滤膜过滤后, 收集毒液, 对体重约 20g 的虹鳟稚鱼进行室内人工感染, 每尾肌肉注射 0.15ml, 共 30 尾, 对照组 30 尾注射 0.15ml/尾生理盐水, 饲养水温为 $10-12^{\circ}\text{C}$ 。

1.4.5 蚀斑形成及病毒株挑取 取病毒悬液接种 CHSE 单层细胞, 吸附后加入 1% 中性红琼脂糖覆盖, 中性红浓度为 1/3 万左右, 15℃ 中避光培养, 4d 后观察并测量蚀斑大小及形态。另以挑斑法连续两次挑取蚀斑, 得到纯化的病毒株, 记为 IHN_V-B。

1.4.6 病变细胞的显微观察 将培养瓶中长满 CHSE 单层细胞的小玻片接毒, 待产生 CPE 后不久, 将小玻片取出, 甲醇固定, Giemsa 染色后封片, 油镜下观察包涵体。

2 结果

2.1 病原分离

病鱼组织经匀浆过滤后, 接种到三种细胞单层上, 在 15℃ 培养下, CHSE、RTG-2 和 FHM 经 3—4d 出现 CPE, 且细胞培养液中 pH 值下降不明显(颜色无明显变浅), 单层细胞中间区域出现空洞, 其边缘细胞开始变圆, 膨大成水泡状, 少数细胞直径可为正常细胞的 2—4 倍, 细胞内出现颗粒, 几个至几十个细胞聚在一起, 呈葡萄状堆积, 细胞边缘之间出现拉长的针状连接, 伸展的长度约为细胞直径的 2—5 倍, CPE 出现 6d 后, 大部分细胞脱落。将出现 CPE 细胞上清液离心过滤后, 再接种于正常的单层细胞, 同一形态的 CPE 可重复出现, 测其滴度最高可达 $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.1ml。

接种了病毒悬液的单层细胞, 用 1% 中性红琼脂糖覆盖后, 4—5d 可形成直径为 0.5—1.5mm 的蚀斑(图版 I: 1)。经 Giemsa 染色后的病变细胞, 油镜下可见在细胞质中出现大量空泡, 细胞核变形明显, 染色质趋边, 这与电镜下观察结果一致, 但包涵体不明显。

2.2 病毒的理化特性

分离的病毒对脂溶剂敏感, 不耐酸, 对热不稳定, 表明有囊膜, 各滴度值见表 1。

表 1 病毒对各种理化因子的敏感性^{*}

Tab.1 Sensitivity of virus to physical and chemical factors

	氯仿 Chloroform	热 (56℃) Heat	酸 (pH) Acid
试验组 Test	0	0.	1.7
对照组 Control	6.0	6.0	5.2

^{*}表中数值为 TCID₅₀/0.1ml.

2.3 病毒感染细胞超薄切片的电镜观察

在细胞质中出现大量病毒, 核内未发现病毒颗粒, 提示病毒可能在细胞质内复制; 细胞质内出现大量的空泡(图版 I: 2); 细胞核的形状发生改变, 核内染色质趋边; 病毒颗粒呈子弹状, 一端钝圆, 另一端平直, 外观有囊膜, 表面可见纤突(Outer fringe), 病毒的长度为 131—173nm, 平均为 148nm, 直径为 58—91nm, 平均为 71nm, 形态显示是一种弹状病毒(图版 I: 3), 有少数病毒颗粒只有空的蛋白囊膜, 病毒以出芽方式释出细胞(图版 I: 4)。其形态大小与已报道的 IHN 病毒极为相似。

2.4 病毒的生物学特性

2.4.1 生长温度 接种病毒的 CHSE 细胞在不同的培养温度下出现 CPE 的时间不同(表 2), 在 15℃ 时出现 CPE 最早, 4℃ 和 25℃ 下在第 10d 时仍未出现 CPE。

表 2 不同温度细胞病变出现的天数

Tab.2 Time, for the appearance of cytopathic effect of the virus at different temperatures

温度 Temperature	4℃	10℃	15℃	20℃	25℃
出现 CPE 天数 CPE days	无	7	3	5	无

2.4.2 在三种细胞中的增殖 接毒的 CHSE、RTG-2 和 FHM 三种细胞, 3—4d 出现 CPE, 7d 后取上清液测定滴度(表 3), 结果表明该病毒在这三种细胞中的增殖情况接近, 对照组滴度均为 0。

表 3 病毒在不同细胞中的增殖*

Tab.3 Replication of virus in different cells

细胞系 Cell line	CHSE	RTG-2	FHM
病毒滴度 Titer of virus	6.3	6.0	6.2
对 照 Control	0	0	0

* 同表 1。

2.4.3 在 CHSE 中增殖情况 CHSE 细胞接毒后培养物中病毒滴度逐渐上升, 到第 8d 达最高峰, 然后逐渐降低, 对照滴度为 0, 结果见表 4。

表 4 不同时间病毒在 CHSE 上增殖情况*

Tab.4 Replication of virus in CHSE cells in different days

接毒后天数 Day	4	6	8	10	12
病毒滴度 Titer	2.0	4.8	6.3	4.3	3.7
对 照 Control	0	0	0	0	0

* 同表 1。

2.4.4 鱼体感染试验 接种病毒的虹鳟稚鱼从第 7d 开始死亡, 10d 左右达到死亡高峰(表 5), 其结果表明, 该病毒对虹鳟鱼苗有明显的感染力, 能造成较高的死亡率。发病症状也与天然病鱼一致, 表现出严重的神经症状, 狂游乱窜, 眼突体黑, 腹部膨大, 鳃丝苍白, 肛门拖着长的粘液状粪便, 剖检可见肝脾发白, 胃肠中无食物, 有大量透明液体。

表 5 病毒对虹鳟稚鱼的人工感染情况

Tab.5 Infection test of virus on rainbow trout

	样本数 Total No.	死亡数 No. of deaths	死亡率 Mortality
试验组 Test	30 尾	26 尾	87%
对照组 Control	30 尾	2 尾	7%

3 讨论

据现有资料, 目前已经从虹鳟鱼中分离到两种弹状病毒(Rhabdovirus), 即传染性造

血器官坏死病毒 (IHN) 和出血性败血症病毒 (VHSV, 三种亚型为 VHSV₁、VHSV₂ 和 VHSV_{23.75}), 这两种病毒在许多方面 (如形态、理化及生物学特性等) 都很相似, 但两者也存在差异, 除血清学外, 其不同之处还在于: (1) 发病区域不同, IHN 仅在北美和日本出现, 在欧洲尚未发现, 而 VHS 只是欧洲的地方病^[11,12]; (2) 在感染鱼体年龄上, IHN 急性流行时对虹鳟鱼苗造成极大的损失, 死亡率可达 100%, 而 VHS 在急性流行时, 各种年龄的鳟鱼均可患病, 其死亡率可达 80%。另外在 IHN 流行期间, 将鱼池水温升到 15℃ 以上 (使鱼体产生干扰素和抗体) 是一种有效的防止鱼苗死亡的措施。以我们分离到的弹状病毒与上述两种相比较, 从危害程度、发病温度、病鱼症状、产生的细胞病变情况、病毒的增殖温度、理化和生物学特性以及形态大小等诸多方面, 都与 IHN 病毒相同; 另外, 本溪市虹鳟鱼种场爆发此病时, 患病鱼苗几乎全军覆没, 但未发现一龄鱼种和成鱼死亡, 将患病鱼苗放入 16℃ 水浴中饲养试验, 可使大部分存活。鉴于上述测定与观察分析, 分离到的病毒虽与 IHN 非常相似, 但因尚未与北美及日本的 IHN 做血清学中和试验, 还不能最后确认其为 IHN 病毒, 故暂称为传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株 IHN-B。

参 考 文 献

- [1] 柯丽华、方勤、蔡宜权。一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性。水生生物学报, 1990, 14(2): 153—159。
- [2] Amend D F, Chambers V C. Morphology of certain viruses of salmonid fishes I. In vitro studies of some viruses causing hematopoietic necrosis. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 1970, 27: 1285—1293.
- [3] ————. Morphology of certain Viruses of salmonid fishes II. In vivo studies of infections hematopoietic necrosis virus. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 1970, 27: 1385—1388.
- [4] Sano T, et al. Studies on viral disease of Japanese fishes. VI. Infections hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *J. Tokyo. Univ. Fish.*, 1977, 63: 81—85.
- [5] Amend D F. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) Virus disease. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife service, Division of Cultural Methods Research. FDL, 1974: 39.
- [6] Sano T. Viral disease of cultured fish in Japan. *Fish pathology*, 1985, 10: 223—226.
- [7] Yasutake W T, Amend D F. Some aspects of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J. Fish Biol.*, 1972, 4: 261—264.
- [8] 牛鲁祺、赵志壮。东北地区虹鳟IHN和IPN流行病学的初步研究。水产学报, 1988, 12(4): 327—332。
- [9] 江育林等。虹鳟传染性胰脏坏死病病毒 (IPNV) 的初步研究。水生生物学报, 1989, 13(4): 353—358。
- [10] 殷震、刘景华。动物病毒学。北京: 科学出版社。1985: 274—285。
- [11] Ahne W. Important viral diseases in European fish culture. *Symp. Biol. Hung.*, 1984, 23: 3—15.
- [12] Ellis A E. Fish and Shellfish Pathology. London: Academic press. 1985: 295—300.

ISOLATION AND PRELIMINARY STUDY OF A RHABDOVIRUS FROM RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IN BENXI, CHINA

Zhao Zhizhuang and Niu Luqi

(*Heilongjiang Fisheries Research Institute,*

Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150076)

Abstract

In April 1990, an acute infectious disease broke out among the rainbow trout fry at Benxi Rainbow Trout Farm, causing a nearly 100% loss of trout fry. A viral agent was isolated from rainbow trout fry in the farm. It can replicate in the rainbow trout gonad cells (RTG-2), chinook salmon embryo cells (CHSE) and fathead minnow cells (FHM). A maximum titer of $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.1ml was attained in the CHSE cells. The optimum temperature of replication was 15°C. Plaques can be formed in CHSE monolayer cells measuring 0.5–1.5mm in diameter. The agent is unstable to chloroform treatment and does not resist heat or acid. Electron microscopy revealed rhabdovirus particles measuring 58–91nm in diameter and 131–173nm in length. The results showed that this virus is probably an infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV).

Key words Rainbow trout, Rhabdovirus, Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), Isolation