

# 福建南部养殖石斑鱼暴发性疾病流行调查

龚艳清<sup>1</sup>, 陈信忠<sup>1,2\*</sup>, 王 军<sup>2</sup>, 苏亚玲<sup>3</sup>, 俞秀霞<sup>3</sup>, 黄丽莎<sup>3</sup>, 苏永全<sup>2</sup>

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012; 2 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005; 3 厦门市水产技术推广站, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 近年来福建南部网箱养殖石斑鱼常暴发急性传染病, 经试验确认的传染病病原有神经坏死病毒、微孢子虫、本尼登虫以及多种弧菌. 由神经坏死病毒引起的病毒性神经坏死病表现典型的神经症状, 中枢神经组织和视网膜细胞严重空泡坏死; 微孢子虫病表现为腹部、生殖腺、肝脏、肌肉等组织寄生大量孢子囊; 本尼登虫主要寄生于石斑鱼的体表; 感染的细菌主要有溶藻弧菌、副溶血弧菌以及河流弧菌等 10 种, 这些菌多为条件致病菌. 调查结果表明, 病毒性神经坏死病是该地区养殖石斑鱼最常见危害也最大的传染病.

**关键词:** 石斑鱼; 神经坏死病毒; 微孢子虫; 本尼登虫; 流行病学

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1671-5470(2006)05-0532-06

## Investigation on the epidemic of fulminant infectious disease of cultured rock fish in the south Fujian

GONG Yan-qing<sup>1</sup>, CHEN Xin-zhong<sup>1,2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, SU Ya-ling<sup>3</sup>, YU Xi-xia<sup>3</sup>, HUANG Li-sha<sup>3</sup>, SU Yong-quan<sup>2</sup>

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361012, China; 2. College of Oceanography and Environment, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3. Xiamen Aquaculture Technical Service Station, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** Some cultured rockfish *Epinephelus* often suffered from a fulminant infectious disease in the south Fujian in recent years. It had been proved that the pathogens were viral nervous necrosis virus, *Microsporidians*, *Benedenia* and some *Vibrio*. The fish infected by nervous necrosis virus showed neurological disorders. Histological investigations revealed vacuolations in the grey matter of the brain and spinal cord and in the granular layers of the retina. The cysts of *Microsporidians* had been found frequently in the abdomen, gill, gonad, liver, muscle and other internal organs. *Benedenia* mostly parasitized on the body surface. More than ten kinds of bacteria such as *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. fluvialis* had been identified. Most of them were conditional pathogen. According to the investigation of epidemic, the most harmful disease to the rockfish in this area was viral nervous necrosis.

**Key words:** *Epinephelus* spp.; nervous necrosis virus; *Microsporidians*; *Benedenia*; epidemiology

石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 是海水养殖最名贵的经济鱼类之一, 经济价值很高, 在国内外市场供不应求, 日本、中东、东南亚国家以及中国大陆、台湾、香港地区, 尤其是华人、华裔社区极受欢迎. 我国香港地区从上世纪 70 年代开始人工网箱养殖, 80 年代起, 菲律宾、泰国、印尼以及我国广东、福建、浙江和台湾等地区也开始了大规模的网箱养殖. 近年来福建东山、漳浦等地还兴建了许多石斑鱼育苗场, 国内石斑鱼养殖网箱数量急剧增加, 养殖规模不断扩大. 在台湾, 近年来养殖石斑鱼常常暴发急性传染病造成大规模死亡, 已知的致病原大多为神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV)<sup>[1-3]</sup>. 在福建、广东、海南等主要石斑鱼养殖区, 近年来也常常发生急性传染病, 其病原包括多种细菌和 NNV<sup>[4-7]</sup>. 在福建南部地区, 每年的夏、秋高温季节暴发的各种急性传染病常常造成大批石斑鱼发病死亡, 一些石斑鱼育苗场也常因急性传染病导致大量鱼苗死亡, 给养殖业主带来了巨大经济损失. 由于大部分养殖场缺乏病原检测技术, 难以了解引发传染病的致病原. 因此, 开展养殖石斑鱼的暴发性病害的流行病学调查, 阐明其主要致病原, 进而制定有效的防控措施, 已经成为石斑鱼养殖业迫切需要解决的课题.

收稿日期: 2005-11-03 修回日期: 2006-04-04

基金项目: 国家“863”计划项目 (2003AA603011).

作者简介: 龚艳清 (1972-), 女, 兽医师. 研究方向: 水生动物病害防治.

\* 通讯作者: 陈信忠 (1964-), 男, 研究员. E-mail: xmchenx@tm.com.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在福建厦门、东山、漳浦等石斑鱼养殖和育苗基地选择数个养殖场,对各种病害的发生和危害进行记录和监测.在石斑鱼发病季节,深入网箱养殖现场,调查了解病情、临床症状以及季节消长变化,采集病鱼带回实验室进行病原学检测.用于组织切片的病鱼采自福建漳浦某石斑鱼育苗场,病鱼具有典型的病毒性神经坏死病症状.

试验所用的引物、RNA 抽提试剂、DNA 抽提试剂、Taq 酶、M-MuLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP 等由上海生工生物工程技术有限公司提供.

ABI9700 PCR 仪为 PE 公司产品;自动微生物检测仪 VITEK JR 和 GN1 鉴定卡由法国生物梅里埃公司生产;细菌微量生化鉴定管由北京陆桥医学生物技术中心生产.

### 1.2 细菌分离鉴定

从病鱼的肝脏及体表溃烂部位,按常规方法分离病原菌并用自动微生物检测仪进行鉴定.

### 1.3 病毒性病原检测

取病鱼的脑和视网膜,应用 RT-PCR 方法检测 NNV<sup>[7]</sup>,反向引物为: 5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3',正向引物为: 5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3',用于扩增 NNV RNA2 基因组的 421 bp 特异性片段.用 PCR 方法检测真鲷虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSV)<sup>[8]</sup>,上游引物为: 5'-CGG GGG CAA TGA CGA CTA CA-3',下游引物为: 5'-CCG CCT GTC CCT TTT CTG GA-3',用于扩增 RSV 基因组的 568 bp 特异性片段.

### 1.4 寄生虫病原检查

现场检查石斑鱼体表皮肤、鳃等寄生虫感染情况.采集病鱼带回实验室剖检,检查石斑鱼体表和体内的寄生虫.

### 1.5 水质监测

现场监测并记录养殖水体的水温、盐度、pH、溶氧量等水质参数,观察水质变化情况.

### 1.6 组织病理学观察

活体解剖取石斑鱼的脑、眼、肝、肾、心、脾、肠、鳃等组织,用 Davidson 氏固定液固定,经脱水、包埋、切片、苏木素-伊红染色,制成永久封片,观察组织病理变化.

## 2 结果与分析

### 2.1 病害流行基本情况

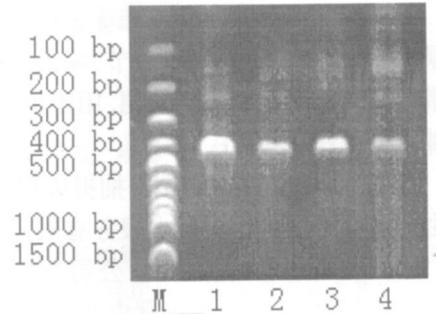
近几年福建南部地区网箱养殖的石斑鱼暴发急性传染病具有明显的季节性.每年 4 月下旬开始出现传染病情,随后厦门地区的各个石斑鱼养殖场均发现该病流行,成鱼和幼鱼的发病情况基本相同.发病初期死亡的病鱼,外观无明显临床病变,表现厌食,腹部朝上,漂游于水面,螺旋状或旋转游动,反应迟钝,部分病鱼腹部明显膨大.剖检病鱼,肝脏色泽变浅呈土黄色,脾脏暗红色,鳃充血、膨大,肾脏坏死、糜烂,脑表层发红.发病后期,病鱼消瘦,头大体小,部分病鱼的背鳍、尾鳍轻微充血,下颌部位常出现红肿、溃烂,部分病鱼身体其它部位也出现鱼鳞脱落、溃烂等病原混合感染的症状,多在发病后十多天衰竭死亡.发病季节水温约 18-26℃,盐度 25-31, pH 7.8-8.2 在阴天,溶氧低于 4 mg·L<sup>-1</sup> 时,发病鱼和死亡鱼数量明显增加.至 6 月中旬,水温上升到 28℃ 以上,病情有所缓解,死亡数明显减少.疾病流行期间各种石斑鱼均有发病,但病情最严重的是赤点石斑鱼 (*E. akaara*),其次是青石斑鱼 (*E. amouara*) 和斜带石斑鱼 (*E. coioides*).当年投放的幼鱼死亡率较高,累积死亡率可达 70%-90%.2 龄以上的成鱼也有发病,每个网箱每天死亡数十尾至上百尾,持续 1 个多月,总死亡率达 20%-40%.

对人工繁育的石斑鱼鱼苗,不同种类的发病时间及年龄有明显的差异.鞍带石斑鱼 (*E. lanceolatus*) 鱼苗发病多在春节前后,发病水温约 20-25℃.发病鱼体长多在 4 cm 以上;而青石斑鱼的鱼苗在孵化后数天即可发病,死亡率可达 100%.发病初期死亡的鱼苗无明显的外观临床病变,病鱼表现厌食,出现旋转状

游动,或静止时腹部朝上,部分个体鳃肿大,活动性和群聚性差,侧卧于池底或不正常游动.剖检可见病鱼脑部稍有红肿,肝脏色泽变浅或正常,其它器官无明显病变.发病后期,病鱼消瘦乏力,体表尤其是尾鳍和下颌常出现红肿、溃烂,病鱼衰竭死亡.

### 2.2 病毒性病原

从 2003 年 2 月至 2004 年 10 月,共检测各种石斑鱼 40 多批近 200 份样品. NNV 的阳性率为 60% - 100%, 平均阳性率约为 80%. 对于网箱养殖的石斑鱼,在发病高峰季节的 4 - 7 月份阳性率很高,而冬春季检测阳性率较低;在室内育苗池,刚孵化的仔鱼和鱼苗一旦出现临床症状, NNV 的感染率均可达 100%. 从青石斑鱼的鱼卵以及孵化 2 - 3 d 的仔鱼中多次检出 NNV. 来自同一批亲鱼的鱼卵育出的鱼苗连续两年暴发同样症状的急性传染病造成大量鱼苗死亡, NNV 检测均显示阳性结果. 同一海区不同规格不同种类的石斑鱼同时感染 NNV 发病死亡,说明石斑鱼对 NNV 病毒具有易感性. 图 1 是青石斑鱼 NNV 检测结果,样品 1、2、3 和 4 分别为来自厦门地区的 4 个网箱养殖的青石斑鱼,在 421 bp 附近均出现明显亮带,表明 NNV 呈阳性. 同时对上述病鱼样品进行 RSIV 检测,结果全部显示阴性,表明本地区石斑鱼尚未被 RSIV 感染.

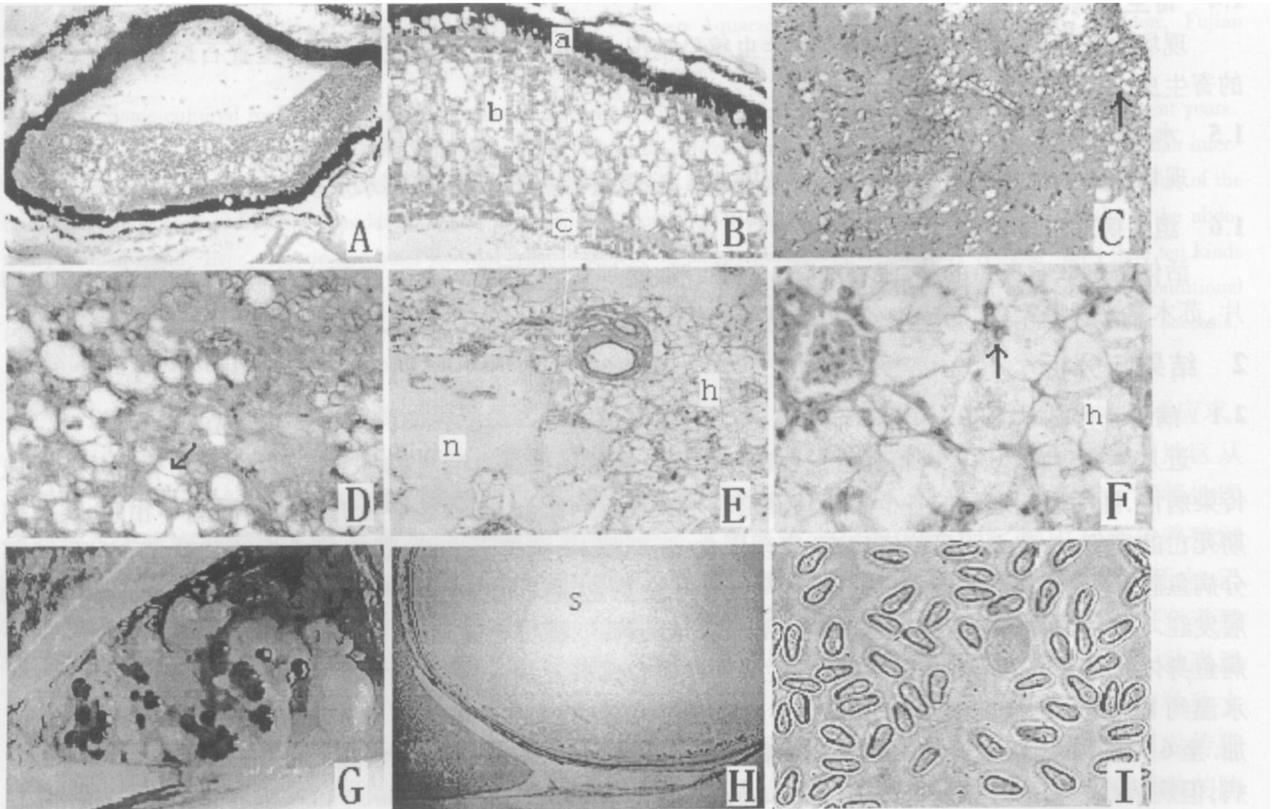


M. 100 bp DNA Ladder 1 - 4 采自 4 个不同养殖场的样品.

图 1 青石斑鱼 NNV 检测结果

Fig 1 Detection of nervous necrosis virus in *E. avocara*

对多批石斑鱼病鱼的各种组织进行组织病理学观察,其主要病变出现在脑和视网膜. 其它组织的病理损伤相对较少或不明显(图 2).



A、B. 视网膜组织病变 (a 为色素层及其空泡病变, b 为视细胞层的空泡坏死病变, c 为双极细胞层); C、D. 脑组织细胞空泡坏死 (箭头示空泡坏死病变); E、F. 肝组织病变及空泡坏死 (n 为淤血病变, h 为细胞坏死病变, 箭头示肝细胞核萎缩病变); G. 腹腔内大量黑色孢子囊; H. 肝组织切片 (示肝脏表面的孢子囊 s 为孢子囊); I 孢子虫形态.

图 2 石斑鱼病毒性神经坏死病及微孢子虫病组织病理观察

Fig 2 Histological findings of nervous necrosis virus and *Microsporidians* in rockfish



豆病”(图 2G)。少数孢囊银灰色,呈多角型,质硬。孢囊多寄生于腹腔肠系膜、生殖腺、肌肉或其它结缔组织,也有部分寄生于肝脏等内脏器官,少数游离于腹腔。每尾鱼感染数从数个到数十个不等,最多的孢囊数可达近百个。组织切片中孢囊囊膜完整,由颗粒层、黑色颗粒层组成。囊内充满子孢子,在组织切片中可见子孢子均匀分布,呈圆形或椭圆形(图 2H)。孢囊内的微孢子虫在生理盐水中呈葫芦形,长约  $4-5\ \mu\text{m}$ (图 2I)。微孢子虫病呈慢性病特点,一般不会导致石斑鱼大批死亡,但由于该虫的寄生,其营养体在寄主组织细胞内不断生长发育所产生孢囊和大量孢子可使组织遭受破坏,严重时引起器官发炎,机能失调,发育不良,生长缓慢,特别是对生殖腺的严重感染可使生殖力下降。由于形成大量的孢子囊,严重影响鱼体的形态和正常发育,还可能导致免疫力和抵抗力的下降,引发其它病原体的继发感染而使病情加重导致死亡,对成鱼还因其严重变形而影响其商业价值。

2.4.2 本尼登虫病 其病原包括本尼登虫(*Benedenia*)和新本尼登虫(*Neobenedenia*),是厦门海区各种海水养殖鱼类较常见的一种体表寄生吸虫,主要寄生于宿主的体表、鳃、鳍以及眼睛等部位。因虫体细小,外观像白芝麻而俗称“白芝麻病”。各种石斑鱼的成鱼、幼鱼均可感染,感染度差别很大,从数条到数百条不等。虫体大小差异较大,约  $2-6\ \text{mm}$ ,形态也有所不同。该虫少量感染时对鱼影响不大,但感染度高时可引起鱼烦躁不安,在眼部的寄生则可导致眼睛发白甚至失明,由于寄生引起的体表溃疡会引发其它病原的继发感染,从而导致更严重的传染病,引起石斑鱼大量发病死亡。该虫具有一定的季节性,在水温较高的 4-11 月份感染率较高。

2.4.3 其它寄生虫病 在病鱼鳃部还常常检出少数猫首吸虫(*Ancyrocephalus* sp.)、车轮虫(*Trichodina* sp.)和鱼虱(*Caligus* sp.)。但这些寄生虫感染度都很低,不足以引发石斑鱼的急性传染病。

## 2.5 水质监测情况

近两年的持续水质监测数据表明,福建南部沿海石斑鱼网箱养殖区的水质参数没有明显异常变化,石斑鱼发病季节前后的水体水温、盐度、溶氧量、pH 等基本在正常范围,同一海区养殖的其它鱼类较少发病。因此,水质因素不是引发石斑鱼急性传染病的主要原因。

## 3 讨论

石斑鱼发病季节的病原学检测结果表明,NNV 阳性率接近 100%,组织病理观察结果也证实这些石斑鱼的组织病变为典型的病毒性神经坏死病变。虽然从部分病鱼中也能分离到一些细菌和寄生虫,但感染率较低,一般不超过 20%,而且存在明显的个体差异,即同一海区或同一网箱内只有少数石斑鱼受感染。因此可以确认 NNV 是引发本地区石斑鱼暴发性传染病的主要病原。

由 NNV 引起的病毒性神经坏死病是养殖鱼类最严重的传染病之一,至今已在世界范围内的 40 多种养殖鱼类中流行,对鱼苗和幼鱼的致死率可达 100%<sup>[8]</sup>。Gomez et al<sup>[9]</sup>从日本的 2 个地理上相距遥远的海水养殖区采集了 30 种合计 131 条外观健康的鱼类,用 RT-PCR 方法检测鱼脑部的 NNV 感染情况,结果发现,野生和养殖鱼类的 NNV 感染率分别高达 92.8% 和 65%,表明该病毒在海区广泛存在,很多野生和养殖的海水鱼类隐性感染 NNV,成为 NNV 的重要携带者或保毒宿主。对鱼类 NNV 的研究表明,其传播途径包括了垂直传播和水平传播。Johans et al<sup>[10]</sup>认为,通过被感染亲鱼的垂直传播是 NNV 感染传播的主要途径。Peducasse et al<sup>[11]</sup>比较了 NNV 的细胞培养液采用肌肉注射、腹内注射、口服、浸浴、与病鱼混养等 5 种不同的人工感染途径感染舌赤鲈幼鱼的结果,证明该病毒可以水平传播。我们的调查也证明,许多鱼卵以及刚孵化的仔鱼中均能检测到 NNV,而且由同一批亲鱼生产的鱼卵孵育的鱼苗连续多批暴发同样的传染病,并被证实病原为 NNV,说明 NNV 可以通过亲子传播的方式行垂直传播;同一海区不同年龄的各种石斑鱼均可检出 NNV,则显示该种病毒可能通过养殖水体行水平传播。对鱼类病毒性传染病目前尚缺乏有效的防治方法,除了改善养殖环境,加强苗种检疫、疫情监测和病鱼隔离等措施,目前尚无实用的预防疫苗问世。最新的研究表明,鱼类虽属于低等脊椎动物,但已有较完善的免疫系统,其主要免疫器官和组织有:肾、脾、胸腺、淋巴组织以及血液等。而且鱼类也有类似哺乳动物的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞。因此,研究相应的疫苗是鱼类病毒性传染病最好的防治方法之一。基因重组疫苗是今后病害防治发展的方向,近年来在人类和兽医的传染病防治中已取得重大进展,但在水生动物传染病的防治方面还几乎是空白,有待于今后加强研究。

细菌性病原对海水鱼类的危害性已有一些报道,黄志坚等<sup>[4]</sup>研究了溶藻弧菌对网箱养殖的鲑点石斑

鱼 (*E. fario*) 的危害性, 经小鼠毒性试验和石斑鱼感染试验, 证明该菌对小鼠有极强的毒力, 对石斑鱼等海水鱼类也有较强的致病性. 陈晓燕等<sup>[5]</sup> 对广东、海南两省的多个马拉巴石斑鱼养殖场发生的溃疡病病原进行了研究, 认为溶藻弧菌是主要致病原, 引起鱼体表溃疡, 腹腔积液, 肝肿大, 肾、脾充血等弧菌病症状. 覃映雪等<sup>[6]</sup> 报道, 哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 是网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原, 能引起肌肉溃疡坏死、眼球脱落、鱼骨暴露等症状. 但现在一般认为这些细菌性病原多为条件致病菌, 其致病性和鱼类自身的免疫力以及鱼类生活的水环境密切相关. 这些病原菌只有在饲养管理不善, 或环境条件恶化, 或鱼体受病毒、寄生虫或其它病原菌感染导致体质下降、免疫力降低时, 这些病原菌才会对鱼体造成损害, 甚至引发传染病, 使病情加剧. 病原菌常常附着在网箱表面、养殖水体中的各种动植物以及其它微粒上, 或自由漂浮在水体中. 因此, 要预防细菌性传染病主要通过改善水体环境、增强自身免疫力和抵抗力. 目前, 人工养殖石斑鱼多采用海区网箱养殖, 水体大, 流动性较好, 投喂的饵料多为海区捕捞后冷冻的小杂鱼, 在正常情况下较少暴发细菌性传染病. 但当养殖密度过大, 或饵料腐烂变质、或鱼体在运输和转箱过程中受伤等情况出现时, 病原菌就会趁虚而入. 因此, 只要保证合适的养殖密度, 投喂适量新鲜卫生的饵料, 加强水质管理, 就可破坏病原生存的环境. 对已经感染了病原菌的鱼类, 目前大多还是采用药物治疗, 根据病原菌的药物敏感性, 选择敏感药物进行预防和治疗, 可以取得很好的疗效. 国内在细菌疫苗的研究方面取得了一些进展. Zhou et al<sup>[12]</sup> 利用超声技术制作了青石斑鱼的弧菌疫苗, 用来预防弧菌病, 取得了一定的疗效, 但要大规模推广应用还有很多工作要做.

对体内寄生虫如微孢子虫, 由于其传播机制及系统发育史尚不清楚, 所以在预防和治疗方面至今尚无有效的方法. 目前国内很多养殖石斑鱼投喂的饵料多为野生小杂鱼, 一些小杂鱼也能感染微孢子虫而成为石斑鱼微孢子虫的感染源. 因此, 改变养殖方式, 做好饵料的处理, 加强病鱼的隔离, 同时定期投喂适当的体内驱虫药物, 对预防体内寄生虫病有一定效果. 大多数体表寄生虫对盐度变化等十分敏感, 改变盐度可有效地杀灭这些寄生虫. 因此, 对海水养殖石斑鱼体表寄生虫, 用淡水短时间 (10–30 min) 泡洗, 或用 0.15–0.20 mg·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (或 0.10–0.20 mg·L<sup>-1</sup> 福尔马林) 短时间浸泡, 虫体很快脱落死亡. 但由于目前绝大多数网箱养殖石斑鱼, 网箱之间以及养殖场之间没有有效的隔离措施, 而且养殖密度普遍较高, 很容易重复感染. 因此, 要从根本上避免寄生虫感染, 还必须选择水质较好的海区, 并加强管理.

#### 参考文献:

- [1] CHISG LO C F KOU G H et al Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery reared grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and *Epinephelus akaara* [J]. J Fish Dis 1997 20: 185–193
- [2] CHISG LO B J LN S C Characterization of grouper nervous necrosis virus [J]. J Fish Dis 2004 24: 3–13
- [3] CHISG SHIEH JR LN S J Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan [J]. Dis Aquat Organ 2003 55(3): 221–228
- [4] 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002 41(5): 64–67
- [5] 陈晓燕, 胡超群, 陈偿, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定 [J]. 海洋科学, 2003 27(6): 68–72
- [6] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原 [J]. 水产学报, 2004 28(3): 297–302
- [7] 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
- [8] OIE(世界动物卫生组织). 水生动物疾病诊断手册 [M]. 3 版. 国家质量监督检验检疫总局译. 北京: 中国农业出版社, 2000: 165–171.
- [9] GOMEZ D K SATO J MUSHOKE K et al PCR based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs [J]. J Fish Dis 2004 27(10): 603–608.
- [10] JOHANS R RANHEM T HANSEN M K et al Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus [J]. Dis Aquat Organ 2002 50(3): 161–169.
- [11] PEDUCASSE S CASTRIC J THERY R et al Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways [J]. Dis Aquat Organ 1999 36(1): 11–20.
- [12] ZHOU Y G HUANG H WANG J et al Vaccination of the grouper *Epinephelus awoara* against vibriosis using the ultrasonic technique [J]. Aquaculture 2002 203: 229–238.

(责任编辑: 施晓棠)