

文章编号: 1000-0615(2000)05-0463-05

引起九孔鲍大量死亡的一种球状病毒

宋振荣¹, 纪荣兴¹, 颜素芬¹, 陈昌生¹, 钟幼平¹, 姜永华¹, 倪子绵²

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学测试中心电镜室, 福建 厦门 361005)

摘要: 对 1999 年初春福建省东山县工厂化养殖九孔鲍中发生的流行性死亡, 开展了九孔鲍的病理学研究, 电镜下发现病鲍的肝脏细胞质中有大量具被膜 20 面体、大小约为 100nm 的病毒粒子。通过感染实验, 推断该病毒是造成此次九孔鲍大量死亡的病原体; 由于肝脏细胞的大量病变和坏死引起九孔鲍的大量死亡。该病毒的种类和分类有待进一步研究。

关键词: 九孔鲍; 大量死亡; 球状病毒;

中国分类号: S944.3 **文献标识码:** A

A sphereovirus resulted in mass mortality of *Haliotis diversicolor aquatilis*

SONG Zhen-rong¹, JI Rong-xing¹, YAN Su-fen¹, CHEN Chang-sheng¹, ZHONG You-ping¹,
JIANG Yong-hua¹, NI Zi-mian²

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Anti-cancer Center, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

Abstract: Mass mortality of abalone *Haliotis diversicolor aquatilis*, occurred at abalone farms of Dongshan Prefecture, Fujian Province during the spring of 1999 and since then pathological study was performed. Electron micrography revealed mass enveloped, about 100nm in diameter, hexagonal particles in the cytoplasm of liver of diseased abalone. Artificial infected experiment revealed that the virus is the lethal pathogen of mass mortality, and histopathological changes and necrosis of the liver cell were the reason of death. A further study on specific classification of virus will be needed.

Key words: *Haliotis diversicolor aquatilis*; large amount of death; spherical virion

鲍在我国被誉为海产八珍之一, 有悠久的养殖历史, 北起辽宁省, 南至海南省都有养殖。主要养殖种类有盘鲍 (*Haliotis discus*)、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*)、九孔鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis*) 等。据国家统计局资料, 1997 年全国鲍的生产量为 2 050t, 若加上台湾的产量可超过 3 000t。九孔鲍自 1989 年由台湾引进中国大陆以来, 由于其生长速度较快, 集约式的工厂化养殖方式的推广, 近年在福建省、广东省的九孔鲍养殖面积及其产量有很大的发展。1998 年两省的鲍产量达 2 000t 以上。九孔鲍集约式的工厂化养殖, 由于养殖密度高, 如果养鲍的水环境处理不当将降低鲍的应激能力, 一但有病原体的存在就容易发生疾病, 尤其是病毒、细菌性疾病所造成的危害是非常严重, 至今有关九孔鲍疾病的报道尚少。本文通过对 1999 年初春发生在福建省东山县九孔

收稿日期: 2000-03-24

资助项目: 福建省科学委员会资助(98-Z-102); 福建省基金项目(C96033)

作者简介: 宋振荣(1968-), 男, 福建省泉州人, 副教授, 主要从事水产动物种苗、养殖及其疾病研究。Tel: 0592-6182723, 6180485, E-

mail: zsrong@jmc.edu.cn China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

鲍的工厂化养殖中大量死亡的调查,运用病理学的研究方法,发现病鲍的肝脏细胞核萎缩,细胞小器官解体,细胞大量坏死的现象,经电子显微镜观察,确认肝脏细胞质中有大量的病毒粒子存在。根据回归感染实验的结果,推断该病毒是造成此次九孔鲍大量死亡的病原体。由于肝组织的病变和坏死,引起肝功能障碍是此次九孔鲍大量死亡的主要原因。

1 材料

本研究的病鲍材料于1999年3-4月采集自福建省东山县九孔鲍工厂化养殖场,病鲍的大小为3.1~6.5cm的当年鲍苗和商品鲍;对照用和健康鲍取自不发病的厦门市大嶝岛养鲍场。

2 方法

2.1 病理组织学研究

将鲍软体部剥离,切下部分肝脏和肾脏,光学显微镜观察的材料用5%甲醛溶液(0.2M磷酸缓冲液,pH7.3)固定后,采用常规的石蜡包埋切片和H.E染色。电子显微观察的材料用2.5%戊二醛和2%甲醛混合液(0.2M磷酸缓冲液,pH7.3)固定,再用1%四氧化锇后固定,采用环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色。

2.2 病原感染实验

2.2.1 注射感染

将病鲍软体部剥离,切下内脏部,按重量1:5加磷酸缓冲液(PBS),在碎冰降温条件下进行组织磨碎,在4℃条件下以7000 r·min⁻¹的速度离心分离20min,提取上清液,按体积每毫升加青霉素和链霉素各1000单位(双抗),置4℃中保存。感染前用经灭菌的0.22 μm过滤膜过滤后,用70%酒精棉轻擦鲍肌肉表面,用微量注射器注射上述病毒悬液0.1mL到健康鲍体,对照组鲍是注射等量的PBS(加双抗)。在水温15℃、18℃、室温(19~22℃)、25℃条件下,分别充气、不投饵、不换水培养,观察发病情况。重复试验的病毒悬液是以上述试验的死鲍为材料,按相同方法进行。

2.2.2 浸渍感染

将上述病毒悬液按1:10添加过滤海水,健康鲍在其中浸渍2h后,放回水族箱培养。

2.2.3 交叉感染

将10只健康鲍单独置于养殖笼;另外将10只健康鲍与10只病鲍一起置于养殖笼中,在同一发病的养鲍池内饲养,观察发病情况。

3. 结果

3.1 病理组织学研究

光学显微镜观察表明,各养鲍场的自然发病鲍以及感染实验鲍的肝脏组织病理变化严重,大量的肝细胞核萎缩,细胞质溶解、细胞坏死^[1,2](如图版2所示)。病鲍肾曲小管上皮细胞颗粒变性严重,细胞核萎缩、崩解和坏死(如图版4所示)。通过电子显微镜观察病鲍的肝组织超薄切片,在肝细胞质中可发现大量大小约为100nm、具核衣壳(capsid)的六角形病毒粒子。被病毒感染的肝细胞质中,内质网、线粒体、高尔基体等细胞小器官数量减少,细胞核膜不平行,核质萎缩和核变型(如图版5所示)^[3-7]。

3.2 注射感染

15℃、18℃、室温(19~22℃)培养的试验鲍在注射病毒悬液感染后3~6d内,死亡率达100%;25℃、28℃,对照组在感染试验的16d内均无死亡(见表1)。

表 1 病毒悬液回归感染实验结果

Tab. 1 Results of infective test with virose suspension

组别	感染水温 (°C)	感染剂量 (mL)	试验鲍数 (个)	感染时间(d)/死亡数量(个)										死亡率 (%)			
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
1 #	15	0.1	3	0	0	2	1										100
对照组 *	15	0.1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 #	18	0.1	3	0	0	2	1										100
对照组 *	18	0.1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 #	19~22	0.1	7	0	0	3	2	2									100
对照组 *	19~22	0.1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 #	25	0.1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 #	25	0.1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 注射加双抗 PBS

从感染试验的死鲍提取病毒悬液进行的重复感染试验, 在 6d 内, 15 °C、18 °C、室温(19~22 °C) 试验组鲍的死亡率达 100%, 在感染试验的 10d 内, 25 °C、28 °C、对照组的试验鲍均无死亡(见表 2)。

表 2 重复感染实验结果

Tab. 2 Results of re infective test

组别	感染水温 (°C)	感染剂量 (mL)	试验鲍数 (个)	感染时间(d)/死亡数量(个)										死亡率 (%)			
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
注射组	15	0.1	10	0	0	5	5										100
对照组	15	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组	15	× 10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	15	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组	18	0.1	10	0	1	5	4										100
对照组	18	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组	18	× 10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	18	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组	19~22	0.1	10	0	0	5	3	1	1								100
对照组	19~22	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组	19~22	× 10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	19~22	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组	25	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	25	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组	25	× 10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	25	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组	28	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	28	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3 浸渍感染

病毒浸渍感染的试验鲍在试验的 10d 内均无死亡。

3.4 交叉感染

被单独饲养于发病池的健康鲍在试验的 15d 内均无死亡。与病鲍一起混养的试验鲍 15d 内, 4

只死亡、残活6只鲍的肝脏病变与自然发病鲍的症状相似。

4. 讨论

4.1 病原的探讨

从此次发病的情况来看,最早发生于一家由北方来源的皱纹盘鲍(8~10cm),然后传染到该场的九孔鲍个体。由于缺乏对鲍传染性疾病预防的认识,对污水、病鲍和死鲍缺乏科学性的处理,导致该海区其它几家养鲍场的九孔鲍相继发病和死亡。另外根据本课题的病毒感染试验结果,该病毒在水温25℃以上,供试鲍不会发病的结果,初步推断此次福建省东山县九孔鲍病毒性疾病的病源来自偏冷的海域。

4.2 水温对病原体活力的影响

根据回归感染试验的结果表明:本次九孔鲍发病的病毒在水温25℃以上,不论是注射感染、浸渍感染或是水平感染,供试鲍基本上不发病。养鲍业者也反映:当3月份的天气晴朗、气温升高时,病、死鲍的数量会减少;与此相反,如果有冷空气的影响,第二天的病、死鲍数量会增加。根据跟踪调查东山县九孔鲍工厂化养殖的情况,进入4月份,自然海区的水温开始回升(23℃以上),传染性的病毒性自然缓解,即使发病的,也只是在个别池中发生,病情也逐渐减弱。5~6月份部分养鲍场又开始购进外地健康鲍进行养成,大都无病害发生,因此推测水温升高是抑制该病毒活力的一个主要原因。根据10月份从原发病养鲍场采集的鲍苗进行低温(13℃)培养23d,供试鲍大部分存活结果,表明该病毒经夏天高水温期无感染力,但是该病毒是否具有潜伏性,还有待进一步研究。

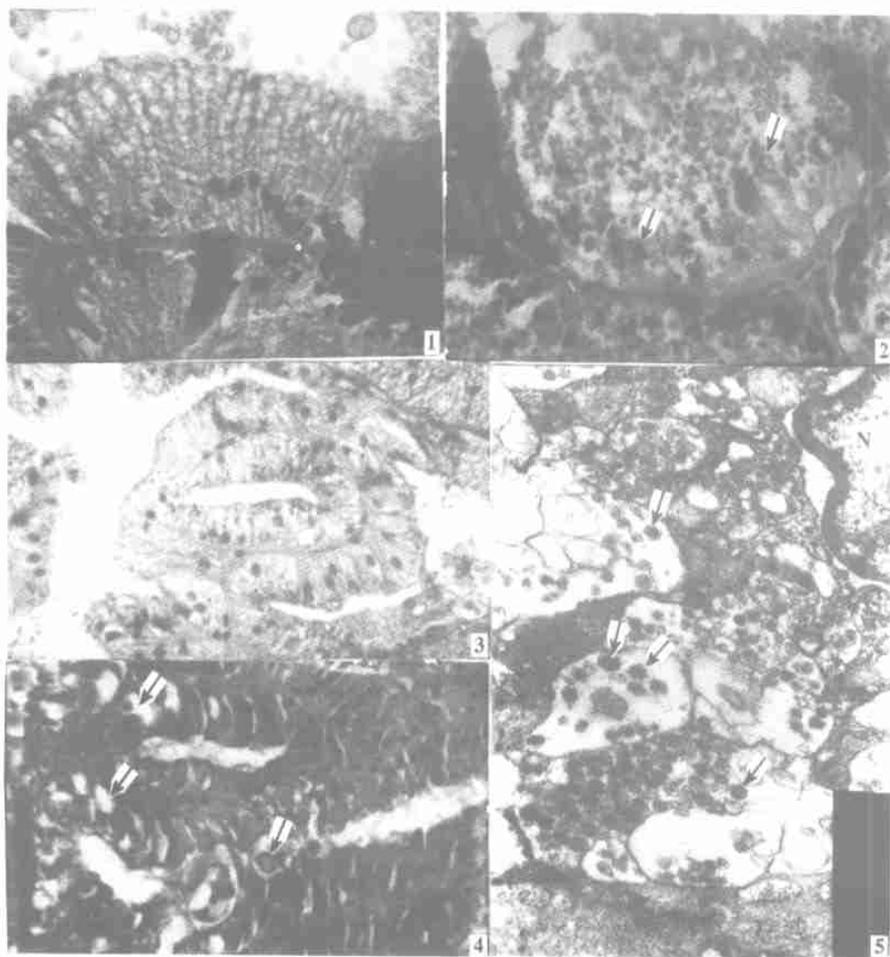
4.3 初步的防治措施与今后工作

有关病毒性疾病的治疗,一般认为尚无有效的药物,本病发生时,曾用咪喃类、抗生素和抗病毒复方药物进行治疗,均未见疗效。从使用沙井水、过滤海水较使用表面海水的发病时间推迟的现象来看,运用生态环境的改良和消毒处理,对该病毒性疾病的防治应有一定的作用,具体的作法有待进一步的研究。根据1999年10月至2000年2月连续使用聚维酮碘(PVP-I)的效果来看,该药物有一定的防治作用,具体效果有待进一步的研究。

有关九孔鲍病毒性疾病的研究,今后应开展该病毒的理化特性以及病毒学等方面的研究;确定该病毒的分类地位和种类;病毒的感染机理;水环境的改良和管理;通过实验开发对该病毒有效的杀毒药物。

参考文献

- [1] 李 鑫,王 斌,刘淑花,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.
- [2] 李太武,张 健,丁明进,等.皱纹盘鲍脓胞病的组织学和超微结构研究[J].动物学报,1997,43(3):238-342.
- [3] 李太武,丁明进,宋协民,等.皱纹盘鲍脓胞病病原菌—河流弧菌—II的抗药机制的初步研究[J].海洋与湖沼,1996,27(6):637-645.
- [4] 赵公报.皱纹盘鲍养成中死亡原因浅析[J].中国水产,1993,(1):14-16.
- [5] 大桥智志,吉越一马.黑鲍饲养中稚贝大量死亡的病理学研究[J].日本长崎县水产试验场研究报告,1992,(18):33-38.
- [6] 中津川俊雄.黑鲍稚贝肌肉萎缩症传染性的研究[J].鱼病研究,1990,25(4):207-211.
- [7] 殷 震,刘景华(主编).动物病毒学[M].北京:科学出版社,1996.10-35,105-132.



1. 健康鲍肝细胞(H.E染色, $\times 100$); 2. 病鲍肝细胞坏死(H.E染色, $\times 100$); 3. 健康鲍肾脏(H.E染色, $\times 100$); 4. 病鲍肾脏(H.E染色, $\times 100$); 5. 病鲍肝细胞质中大量球状病毒粒子的存在, N为细胞核 ($\times 20\ 000$ 电镜照片)