

闽粤地区鲍暴发性流行病的病因分析和流行病学研究

陈月忠¹, 黄万红², 陈木¹

(1.福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2.福建漳浦鲍鱼研究所, 福建 漳浦 363205)

摘要: 1999 年以来, 福建、广东两省养殖鲍已连续多年发生了暴发性流行病, 死亡率可达 100%。结合病理学分析与流行病学调查结果分析, 认为球状病毒和弧菌并发感染是该暴发病流行的主要原因。电镜观察发现病鲍的肝细胞和肠上皮细胞内有大小约为 130~150nm 和 50~70nm 的 2 种球状病毒, 前者数量较多, 具外囊膜, 后者的病毒颗粒裸露, 未见外囊膜。感染造成了鲍的肝脏和肠等器官的细胞结构严重破坏。人工感染实验表明注射、混养、浸泡等方式均会导致感染。根据回归实验和流行特点调查, 结合病理分析结果, 该病多发生于 23℃ 以下的水温期, 主要是通过海水的流动和养殖水的交换和鲍的运销而传播, 25℃ 以上水温未见该病暴发。

关键词: 鲍; 流行病; 球状病毒; 病因。

中图分类号: Q96

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)08-0100-05

鲍具有很高的经济和药用价值, 20 世纪 70 年代陈木等^[1~4]进行了鲍人工育苗与养殖技术的研究、皱纹盘鲍的南移, 以及进行底栖硅藻优质种的选育, 为鲍的产业化打下了基础。特别是自台湾引入九孔鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis* Reeve) 及其集约式养成技术, 鲍的养殖规模发展更为迅速, 目前已成为世界养鲍大国。仅闽粤两省鲍的年产量就达 3000t 以上, 养殖与育苗面积达 55 万 m², 年育苗 5 亿多粒。然而随着鲍养殖规模的扩大和集约化程度的提高, 以及鲍场过于集中, 沿岸水质日趋恶化, 发生鲍病日益频繁, 且愈演愈烈, 导致人工养殖鲍大量死亡, 经济损失巨大, 严重地挫伤了养殖生产者的积极性。1999 年 2 月东山县某养鲍场从北方调入一批皱纹盘鲍, 几天后该批鲍全部发病死亡, 随后一个月内全县 95 家养鲍场有 90% 发生暴发性流行病, 导致部分养鲍场停产或关闭, 直接经济损失高达 3000 多万元。此后该病每年春冬季均有不同程度的暴发, 范围扩大到广东、海南等地, 严重地影响了鲍养殖业的健康发展。为此我们对该暴发性流行病的病因及其流行病学进行了研究, 结果报告如下。

1. 材料与方法

1.1 材料来源

病鲍样品采自福建东山、霞浦和广东饶平等地的养鲍场, 健康鲍取自同安大嶝养鲍场 (鲍质量为 18.1~22.2g)。

1.2 病理观察

分别将病鲍的肝脏、消化道、外套膜、吻和足部等组织器官切下, 用 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛混合液固定 24h, 再用 pH 为 7.2~7.4 的 0.5%~1.0% 的锇酸固定。采用环氧树脂包埋后进行超薄切片, 用醋酸铅和柠檬酸铅双重染色, 在透射电镜下进行观察。

1.3 病毒悬液制备

取病鲍内脏团 5g 加 10 mL 无菌水粉碎匀浆后, 在低温下以 8000r/min 高速离心 30min, 提取上清液在 4℃ 中保存备用。感染前用灭菌的 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 取滤液用于感染实验。

1.4 菌悬液制备

按无菌操作法取病鲍肝脏组织和肌肉在营养琼脂平板上划线分离、纯化获得纯菌株。菌种在斜面上培养和保存, 试验时用无菌生理盐水洗下, 制成含菌浓度为 10⁶~10⁷ 个/mL 的菌悬液 (菌龄 24h)。

1.5 感染实验

用 75% 的酒精轻擦试验鲍的肌肉表面, 用注射器分别将上述的病毒粗提液、细菌悬液及两者的混合液各 0.5 mL/只分别注射鲍的足部肌肉进行回归实验, 并以足部注射、浸泡 (10000 mL 的过滤海水中加入病毒悬液 1 mL) 及与病鲍 (1 只) 混养等方式进行感染试验, 生理盐水做对照。试验鲍各 5 只分别在室温 (15~18℃)、20、24、27℃ 条件下于 10000 mL 的过滤海水中进行充气养殖, 不投饵, 不换水, 观察发病情况。

1.6 水质检测

按海洋调查规范测定海水的水温、pH、COD、NH₄-N、NO₂-N、细菌总数、弧菌数。

收稿日期: 2005-04-11; 修回日期: 2005-07-05

基金项目: 福建省海洋与渔业局资助项目 (9808)

作者简介: 陈月忠 (1964-), 男, 福建厦门人, 研究员, 理学学士, 研究方向: 水产养殖、病害防治、微生物检测。电话: 0592-6010180, E-mail: chenyz0101@sina.com

2 结果

2.1 流行病的症状和特点

调查显示：鲍暴发性流行病具有发病急，传播快，感染力强、致死率极高，无种间和个体大小特异性的流行特点。鲍染病后活力下降，吸附力减弱，反应迟钝，摄食量显著减少或停止摄食；鲍体分泌出大量的粘液，并从呼吸孔渗出，造成养殖池的海水粘性增大，水质很快混浊污化；鲍的足部肌肉肉质变硬，颜色变褐；外套膜萎缩，严重时与鲍壳边缘脱离；而生殖腺、肝脏肿大突出壳缘。病鲍在症状出现后的3~5d内死亡，死亡率达100%。各地病鲍的发病症状基本相似，但2000年春季，

东山县鲍发病的死亡时间延至5~7d内，死亡率有所下降，呈亚急性状态。

2.2 流行病暴发时的水质情况

对东山县几个发病养鲍场的养鲍池水质测定结果如表1所示。发病池的细菌总数、弧菌数均较高，1、2池的COD值也较高，而pH值略有下降。由于1号、2号池已有50%以上的鲍死亡，水面上有不少泡沫，我们认为其COD值较高与病鲍死亡分解有关。海上养殖的情况也大致如此，表2是2000年3月霞浦县海上养殖鲍发病时的海区水质状况。其微生物指标高于附近养殖情况正常的海区，并且以弧菌为主。

表1 发病鲍养殖池的水质和死亡情况

Tab.1 Water quality of abalone farming pond

池号	水温 ()	pH	COD (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	细菌总数 (CFU/mL)	弧菌数 (CFU/ mL)	死亡率 (%)
1	16.2	8.03	30.84	0.005	0.051	9X10 ⁴	8X10 ³	>60%
2	16.7	7.86	27.60	0.007	0.063	5X10 ⁴	2X10 ⁴	>50%
7	16.3	8.12	5.78	0.013	0.139	7X10 ³	3X10 ³	20%
9	16.5	8.08	4.99	0.025	0.200	8X10 ³	5X10 ³	<20%
对照	16.3	8.05	1.28	0.028	0.303	2.15 X10 ³	9	0.05

表2 海区养鲍发病时的水质情况

Tab.2 Water quality of abalone-farming area

水样区	水温 ()	PH	COD (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	细菌总数 (CFU/mL)	弧菌数 (CFU/ mL)	死亡率 (%)
正常养殖区	15.6	8.18	0.98	0.006	0.018	4 × 10 ²	3.2 × 10	-
发病养殖区	15.3	8.26	1.03	0.007	0.013	1 × 10 ⁴	4 × 10 ³	>80%

2.3 病理观察

对采集于各养鲍场的病鲍和人工感染的病鲍进行病理观察，结果显示：病鲍的组织器官细胞结构受到严重破坏，其肝脏组织和消化道的病理变化尤为严重。从切片上可见病鲍的肠上皮细胞排列混乱，微绒毛膜严重破损，细胞坏死或脱落形成了许多空腔；许多受感染的细胞中出现了核膜水肿或破裂；细胞核萎缩或变形；内质网扩张和线粒体嵴扩张；高尔基体等细胞器数量明显减少或消失，而溶酶体数量却大量增加；甚至细胞完全溶解（图1a）等现象。

2.4 病毒形态观察

在病鲍样品的肝细胞和肠上皮细胞中均发现有大小约为130~150nm 和50~70nm 的2种球状病毒颗粒（图1b）。前者的病毒粒子数量较多，分布于细胞质中，病毒粒子的中央为电子密度很高的核心，核外包裹着核衣壳，具外囊膜（图1c）。数十个病毒粒子聚集在一起，外有双层膜包被，形成“封入体”。后者也为球状，但未见外囊膜，病毒粒子是裸露的。在发生暴发性流行病的病鲍之病变组织中经常可观察到病毒颗粒和细菌并

存的现象（图1d）。

2.5 病菌分离

采用无菌操作技术在病鲍体内可分离到弧菌，经VITEK-32微生物自动分析仪药敏与鉴定系统检测，并参照伯杰氏细菌鉴定手册确定。多数菌株为溶藻弧菌（*Vibrio alginolyticus*），少数为副溶血弧菌（*V.parahaemolyticus*）。

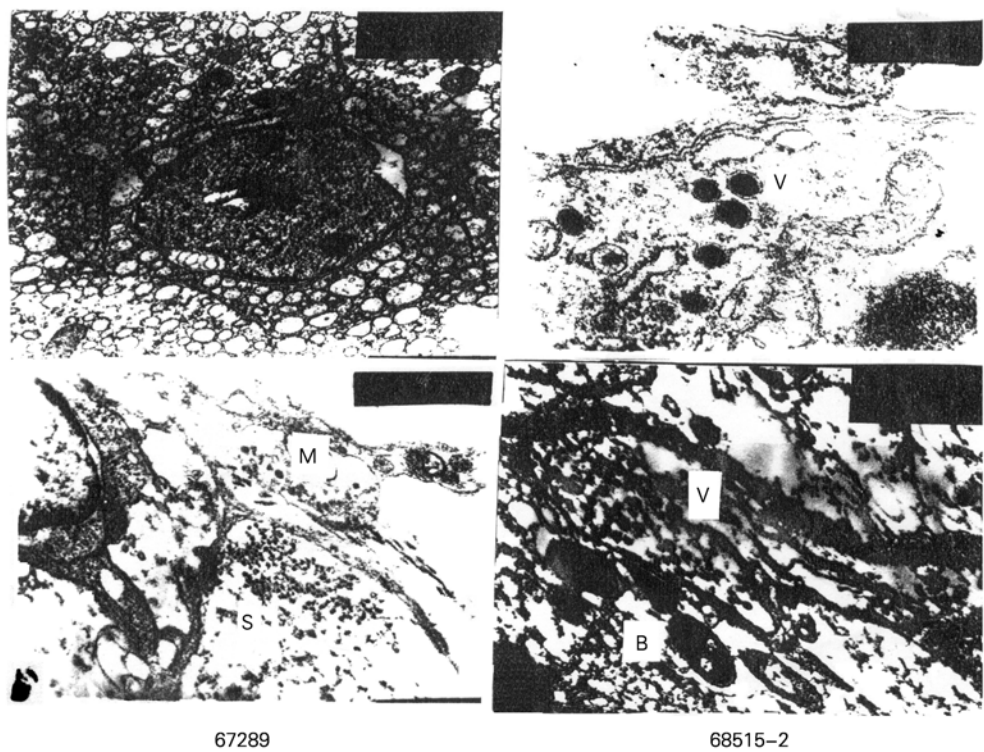
2.6 回归实验

用病毒悬液感染健康鲍，结果试验鲍的发病症状相似，5d内的死亡率达90%以上，并且复感染也是相似的结果。而用溶藻弧菌和副溶血弧菌感染健康鲍，

鲍也发生死亡，但症状不尽相同：实验鲍在5d之后才开始出现死亡，发病的主要症状为足吸附力减弱，足部肿胀、出现脓胞和溃疡，脓胞液内含有大量的细菌。

将病毒悬液和溶藻弧菌混合感染，则鲍的死亡加快，鲍体尚未出现明显的症状即已发生死亡，3~4d内的致死率可达100%（表3）。

在病鲍样品的肝细胞和肠上皮细胞中均发现有大小约为



67289

68515-2

图 1 病鲍的肝肠超微结构电镜照片

Fig.1 SEM photograph of jecura and enteron of balone

a.鲍肝细胞的核膜上有异常膜水肿，核间隙髓样变性；个别细胞核溶解，内质网扩张。 × 10000; b.鲍的肠基底部，结缔组织的细胞内，有一种带有囊膜的球状病毒（V）。 × 50,000; c.鲍的肠基底部胞浆内有两种病毒颗粒，大病毒（M）有囊膜包被，小病毒颗粒（S）则裸露。 × 20000; d.在鲍的肝细胞中，发现病毒颗粒（M）和细菌（B）。 × 14000

showing abnormal edema in nuclear hymen and denaturation as medulla between nuclei; and very few nuclei dissolution and endoplasmic distension;

b. Spheroid virus occurring with an envelop at the base of the enteron; c. Showing two forms of spheroid virus with (big virus) or without (small virus) an envelop;

d. Showing virus and vibrios in jecur cell

表 3 鲍的感染实验结果

Tab.3 Results of re-infection te

组别	项目	试验鲍数 (只)	感染剂量 (mL/只)	鲍的每天死亡数(只)								死亡率 (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	
1	病毒悬液	5	0.5	0	0	2	3	0	0	0	0	100
2	病毒悬液	5	0.5	0	0	2	1	2	0	0	0	100
3	溶藻弧菌	5	0.5	0	0	0	0	1	1	2	1	100
4	副溶血弧菌	5	0.5	0	0	0	0	1	1	1	1	80
5	混合液	5	各 0.25	0	3	2	0	0	0	0	0	100
6	混合液	5	各 0.25	1	2	1	1	0	0	0	0	100
0	生理盐水	5	0.5	0	0	0	0	0	0	1	0	20

注：本感染实验采用注射法；水温 15~19。

130~150 nm 和 50~70nm 的 2 种球状病毒颗粒 (图 1b)。前者的病毒粒子数量较多,分布于细胞质中,病毒粒子的中央为电子密度很高的核心,核外紧裹着核衣壳,具外囊膜 (图 1c)。数十个病毒粒子聚集在一起,外有双层膜包被,形成“封入体”。后者也为球状,但未见外囊膜,病毒粒子是裸露的。在发生暴发性流行病的病鲍之病变组织中经常可观察到病毒颗粒和细菌并

存的现象 (图 1d)。

2.7 水温与发病率的关系

鲍分别在 15~18,20,24,27 的水温下用病毒悬液感染试验鲍,10d 的试验结果如表 4 所示:在 20 以下实验鲍出现全部死亡,而在 24 以上实验鲍则未发生大量死亡,表明此病的暴发与水温的高低有关。

表 4. 同水温下的感染结果

Tab.4 Results of re-infection test at different temperatures

组别	水温 ()	试验鲍数 (只)	鲍的每天死亡数 (只)										死 亡 率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 试验组	15~18	5	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	100
1 对照组	15~18	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	20
2 试验组	20	5	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	80
2 对照组	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 试验组	24	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 对照组	24	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 试验组	27	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 对照组	27	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	20

注:本感染实验采用注射法。

2.8 感染方式与发病率的关系

采用注射、混养等方式进行感染实验,结果均引起鲍发病,

但死亡率不同(表 5)。注射法感染的发病最快,死亡率最高;浸泡和混养的致病力则相对较弱,但死亡率也达 40%~60%。

表 5. 不同方式的感染结果

Tab.5 Results of re-infection test in different treatments

组别	感染方式	试验鲍数 (只)	鲍的每天死亡数（只）																死亡率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	注射	5	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
2	浸泡	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	40
3	混养	5+1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	60
4	对照 1	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
5	对照 2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:对照 1 注射生理盐水;对照 2 放养 6 只健康鲍,混养组放养 1 只病鲍 (未计入死亡率) 和 5 只试验鲍;试验温度 17~21

3 讨论

根据电镜观察和回归实验的结果,结合流行特点分析,我们认为鲍大量死亡与球状病毒的感染及其造成的病理变化具有明显的相关性,球状病毒感染或弧菌与该种球状病毒并发感染是闽粤地区近年来鲍发生暴发性流行病的主要原因。由于病毒侵入鲍的肠上皮细胞和肝细胞等组织器官,使宿主的细胞器受到严重破坏,影响了细胞的正常代谢;病毒感染还使溶酶体的数量明显增加,活性酶大量释放,造成细胞的溶解、坏死,功能受损,致使鲍的代谢紊乱、营养失调、免疫力下降和有害物质在体内蓄积过多,最终导致了机体的生命代谢停止,鲍发生

大量死亡。这些病理变化和生物现象在本研究中均可明显观察到。

有关病毒对贝类的危害已有不少报道,1976 年 Comps 等研究了欧洲牡蛎的疱疹病毒,邵建忠等^[5]报道了三角帆蚌的病原及组织病理学研究,姜静颖^[6]在海湾扇贝体内发现一种与疱疹病毒相似的病毒粒子。对鲍的病毒病研究并不多见。王江勇^[7]在发生裂壳症的杂色鲍的细胞质中观察到一种 150~220 nm 的球状病毒;李霞^[8]也在皱纹盘鲍体内观察到大小为 90~140nm 的球状病毒,认为它就是造成皱纹盘鲍发生裂壳症的主要原因;尽管其形态与笔者所观察到的病毒有点相似,都是球状病毒,病毒粒子也具外囊膜,并形成“封入体”。但其个体大小不同,侵染部

位、毒力大小和致死率也有明显的差异。

近年来笔者在贝病研究中,从发生大量死亡的皱纹盘鲍、九孔鲍、华贵栉孔扇贝和太平洋牡蛎、僧帽牡蛎等贝类发现的球状病毒颗粒,其形态十分相似,并具有广泛的传染性。

在病鲍体内的肝脏和肠上皮细胞内我们除发现了上述的大小为 130~150 nm 的具囊膜球状病毒外,还在部分病鲍的细胞中同时发现一种直径为 50~70nm,无囊膜的球状病毒,其形态与 Meyers^[9]所描述的一种发现于美国牡蛎幼体的呼肠弧病毒相近似。有关这种小病毒对本次鲍暴发性流行病的影响,以及这两种病毒间的相互关系还有待于进一步的研究。

虽然从病鲍体内分离并同时观察到细菌,而且用通过对其分离纯化而获得的溶藻弧菌和副溶血弧菌进行人工感染实验也导致鲍死亡,但其症状和死亡情况与暴发病的表现有所差异,表明溶藻弧菌和副溶血弧菌并非该流行病的原发感染病原。然而实验也表明这两种弧菌与球状病毒并发感染会促使疾病的暴发和增加死亡率。许多研究已表明:弧菌特别是溶藻弧菌和副溶血弧菌在海水和海洋生物中大量存在,是许多水生生物的条件致病菌。一旦环境变化,致病性弧菌大量繁殖,加上动物体抗逆性下降,即引起养殖动物病害流行^[10]。因此改善环境,减少致病性菌群的数量是防止鲍暴发性流行病的一项不可忽视的措施。

大多数的暴发性流行病多发生于高温季节,而闽粤地区鲍的暴发性流行病几年来均发生于 12 月份至翌年的 4 月份之间,且多在寒潮来临之后,此季节的水温大多低于 23 。

采用注射、浸泡、混养等方法感染鲍均致病,且死亡率较高,表明该病毒具有较强的致病性,表现出发病急、传播快、感染力强等流行特点。该流行病在闽粤几个地区的发生都与海水的流动交换,或者商品鲍、鲍苗的运销活动等情况有密切关系。

我们认为,造成鲍大量发病死亡的原因除了病原的感染外,鲍的种质退化,抗病力弱也是重要的原因。由于目前多数养殖

场往往采用自己养殖的鲍做为亲本培育鲍苗,长期近亲繁殖,周而复始,导致鲍个体小型化,体质变弱,抗病力下降,极其容易受到病毒感染而发病死亡。关于种质的问题有待于深入研究。

参考文献:

- [1] 陈木,卢豪魁,谢开恩,等.皱纹盘鲍人工育苗的初步研究[J].动物学报,1977,23(1):35-46.
- [2] 陈炳能,谢开恩,卢豪魁,等.皱纹盘鲍南移的初步研究[J].动物学报,1977,23(1):30-34.
- [3] 陈世杰,陈木,陈炳能,等.鲍苗的饵料——底栖硅藻培养试验初报[J].动物学报,1977,23(1):48-53.
- [4] 陈木,卢豪魁,陈炳能,等.杂色鲍人工育苗的初步研究[A].中国科学院海洋研究所,海洋科学集刊(11)[C].北京:海洋出版社,1976.186-196.
- [5] 邵健忠,项黎新,李亚南.三角帆蚌的病原及组织病理学研究[J].水产学报,1993,17(17):1-7.
- [6] 姜静颖.海湾扇贝体内发现一种新病毒——疱疹病毒[J].山东农业大学学报,1997,28(增刊):26-28.
- [7] 李霞.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.
- [8] 王江勇.杂色鲍裂壳病球状病毒的初步观察[J].热带海洋,2000,19(4):82-85.
- [9] Meyers T R.A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. J Gen Virol, 1979, 43: 203-212.
- [10] 陈梅.山东近海主要养殖动物的弧菌检测与防治的研究[J].齐鲁渔业,2000,17(6):6-8.

The pathogeny and epidemiology of fulminating epidemic disease of *abalone* in Fujian and Guangdong

CHEN Yue-zhong¹, HUANG Wan-hong², CHEN Mu¹

(1.Fisheries research institute of Fujian, Xiamen 361012, China; 2.Zhangpu Institute of Abalone, Zhangpu 363205, China)

Received: Apr., 11. 2005

Key words: abalone; epidemic disease; spheroid virus; pathogeny

Abstract: Several events of fulminating epidemic disease broke out since 1999, which often caused 100% mortality of abalone *Haliotis diversicolor aquatilis* farmed in Fujian and Guangdong coasts. Two forms of spheroid virus in jecur and enteron cells of the dead were found by SEM. The former was 130~150nm, enclosed by an envelop, and the latter was 50~70nm without the wrap. Re-infection test, epidemic disease survey, and pathologic analysis have shown that the disease often occurred at below 23℃, when abalone were injected, mix-cultured and soaked, during seawater flow, mariculture water exchange, and abalone. (本文编辑:刘珊珊)