

网箱养殖石斑鱼病毒性神经坏死病流行调查

苏亚玲

(厦门市水产技术推广站, 福建 厦门 361008)

摘要: 厦门海水网箱养殖石斑鱼春、夏季节暴发性疾病经过流行病学调查和病原检测, 确认主要病原为病毒性神经坏死病毒, 病鱼外观表现典型的神经异常症状。应用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术检测 5 种石斑鱼: 赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、青石斑鱼 (*E. awoara*)、云纹石斑鱼 (*E. moara*)、紫石斑鱼 (*E. lanceolatus*)、马拉巴石斑鱼 (*E. malabaricus*)。检测 76 条石斑鱼, 检出率 90%; 病鱼的脑、视网膜、肾脏、肝脏、脾脏等组织均能检出神经坏死病毒 (NNV), 以脑和视网膜检出率最高, 肾脏次之, 肝脏、脾脏检出率较少, 鳃未检出。

关键词: 石斑鱼属 (*Epinephelus*); 神经坏死病毒; 逆转录聚合酶链式反应

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2008) 09-0052-05

石斑鱼属鲈形目(Perciformes), 鲷科(Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*)。其肉质细嫩鲜美, 是名贵海水养殖经济鱼类。2003 年厦门地区海水养殖网箱约 2.5 万个, 70%~80%放养石斑鱼。随着养殖规模的扩大, 石斑鱼的病害呈流行趋势, 每年的夏、秋季节经常发生大规模的死亡, 给从业者带来严重的经济损失, 同时也造成养殖海域生态环境的污染, 制约了渔业生产的发展。为了弄清石斑鱼患病死亡的原因, 2003 年和 2004 年作者在网箱养殖的主要海区, 对养殖石斑鱼进行跟踪调查, 分析发病原因和流行规律, 建立、优化病原检测方法, 提醒、指导生产者采取综合防范措施, 预防、控制病害的流行、蔓延, 减少经济损失, 减轻病害发生对养殖水体的污染, 降低养殖海域的环境压力。本研究为鱼病的预防和治疗提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 调查时间和地点

2003 年 4 月至 2004 年 12 月, 厦门鹄渔屿网箱养殖海区和潘涂港网箱养殖海区。

1.2 调查方法

1.2.1 点面结合

在鹄渔屿和潘涂港 2 个网箱养殖海区, 布设 13 个监测点, 50 个渔排, 4000 多个网箱, 聘请渔排的养殖户协助观察、记录养殖海域水色及水质变

化, 监测常规水质理化因子, 巡视周边渔排病害发生情况, 及时反馈病情。

1.2.2 监测内容

水温、pH 每日测定 2 次 (6~8 时和 14~15 时各 1 次), 海水质量密度根据气候情况进行不定期测定。

1.2.3 现场调查

在病害高发季节, 每周 1~2 次, 深入网箱养殖海区, 现场检测养殖海区水温、盐度、DO、pH 等水质理化因子。调查、了解鱼类病害情况: 患病鱼类、数量、规格、外观症状及季节消长变化等。采集病鱼, 带回实验室解剖, 进行病原学检测。

1.3 调查品种

包括赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、青石斑鱼 (*E. awoara*)、云纹石斑鱼 (*E. moara*)、紫石斑鱼 (*E. lanceolatus*)、马拉巴石斑鱼 (*E. malabaricus*) 共 5 种。

1.4 检测方法

1.4.1 病毒

应用 RT-PCR 检测法^[1]。

1.4.2 细菌

无菌操作取石斑鱼的鳃丝、血液、肝脏、肾脏

收稿日期: 2007-05-22; 修回日期: 2007-12-18

作者简介: 苏亚玲 (1960-), 女, 福建厦门人, 高级工程师, 主要研究方向为水产养殖动物病害学, 电话: 0592-5908816, E-mail: xmsu8998@163.com

等组织,按常规方法分离、纯化,用自动微生物检测仪进行鉴定。

1.4.3 寄生虫

水浸片镜检法。

2 结果与分析

2.1 石斑鱼繁殖季节

厦门海区网箱养殖的赤点石斑鱼4月底、5月初就有产卵行为,繁殖期一般在4月下旬~7月初,赤点石斑鱼生物学最小型体长为23~26 cm,体质量为500~600 g,即3龄鱼就可成熟产卵,盛产期为5~6月;青石斑鱼的繁殖期为5月中旬~8月中旬,盛产期为6~7月;青石斑鱼生物学最小型体长为25~30 cm,体质量600~750 g,即2~3龄鱼;产卵时间一般在清晨3~6时和下午2~5时;刚开始,雌鱼和雄鱼紧贴着,鳃对鳃并列缓慢环游,产卵时,雌鱼和雄鱼跳离水面2~3次,产卵后,雄鱼离开,雌鱼留在原处,整个过程1~2 min。

2.2 疾病流行情况

2003年4月下旬鰕渔屿网箱养殖海区发现病情,约1周时间,发病渔排迅速增加,约2周时间,90%的渔排均有病情发生;5月4日潘涂港网箱养殖海区的信息员报告石斑鱼出现病情,至5月10日,潘涂港海域所有渔排的石斑鱼均不同程度发生病情。现场调查发现,从4月26日至5月10日,厦门海区95%以上的渔排出现石斑鱼发病死亡,少的每个渔排每日死鱼数十尾,多的死鱼上百尾,最高死亡率95%,病情持续4个多月,累计死亡率70%左右。病鱼外观:腹部明显膨胀、朝上,厌食、停食,漂浮水面,在水面上旋转或间歇性在水面上打转,反应迟钝,活力低下。剖检病鱼,肝脏呈土黄色,脾脏暗红色,鳔胀气、血管充血、粗大,前肾、中肾坏死、糜烂,脑组织红变,部分病鱼性腺硬化、坏死;后期,体鱼消瘦、头大体小,体色晦黯,部分病鱼的背鳍、尾鳍轻微充血,下颌部位红肿,1~2周后衰竭死亡。发病期间海区水温18~26℃,盐度25~31,pH值7.8~8.2,阴天、闷热天气、溶解氧低于4 mg/L时,病鱼、死鱼数量明显增加。至6月中旬,病情有所缓解,死亡数明显减少。海区网箱养殖的石斑鱼均有发病,病情最严重的是赤点石斑鱼,其次是青石斑鱼和云纹石斑鱼,生殖期和2龄以上的成鱼发病率、死亡率比较高,从外地购买放养1~2个月的鱼苗病死率95%~100%。

2.3 病原检测结果

2.3.1 病毒检测结果

将采自4个渔排的6个样品,做NNV和RSIV的检测,6个样品的NNV结果均呈阳性,RSIV均未检出。NNV的琼脂糖凝胶电泳结果见图1。6个样品在421 bp附近均出现明显亮带,显示NNV阳性^[1]。

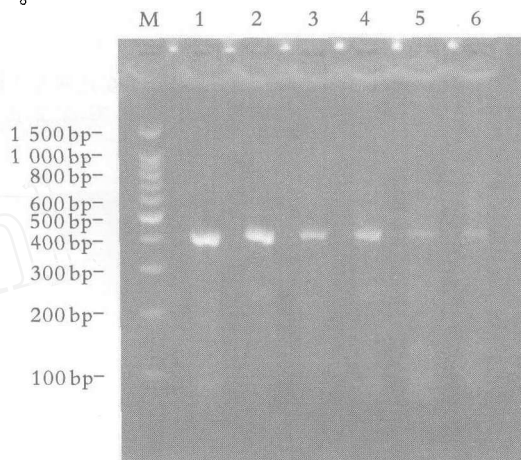


图1 神经坏死病毒检测琼脂糖电泳图谱

Fig.1 NNV Measure agar candy electric swimming atlas

M.100bp DNA 标记; 1~6.采自4个渔排的样品

M.100bp DNA maker: 1~6. Adopt 4 sample that fishing rank

4~5月NNV的检出率95%以上,6~8月检出率80%以上,4月26日至8月29日,共检测9个批次76条石斑鱼,平均感染率为90%^[1];5种石斑鱼的检出率基本相同(图2)。病鱼的脑、视网膜、肾脏、肝脏、脾脏等组织均能检出NNV,以脑和视网膜检出率最高,肾脏次之,肝脏、脾脏检出率较少,鳃未检出(图3)。

2.3.2 细菌分离鉴定结果

取病鱼的鳃、肝脏、肾脏、血液接种分离病原菌,多数未检出致病菌,少数病鱼检出溶藻弧菌和希瓦氏菌,基本可以排除细菌致病的可能性^[2]。

2.3.3 寄生虫检查结果

部分病鱼腹腔内有微孢子虫孢囊,孢囊表面黑色,圆形或椭圆型,质软,大小不一,大的直径为6~8 mm;有的孢囊银灰色、蓝绿色,呈多角型,质硬。孢囊多数在肠系膜,有的在肝脏、卵巢、鱼鳔等内脏器官,少数游离于腹腔。感染数量为数个至数十个不等,有的高达70多个。切开孢囊,内有大量孢子。孢子呈梨形或长椭圆形,大小6 μm × 4 μm^[2]。微孢子虫孢囊在厦门海水网箱的多种养殖

经济鱼类如花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)、高体鲷 (*Seriola dumerili*)、黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 等的腹腔中, 一年四季均有发现, 调查和解剖发现, 体内寄生大量微孢子虫孢囊的鱼体, 外观腹部隆起, 内脏器官受孢囊挤压, 鱼体消瘦, 体色晦黯, 但不会引起突发大量死亡。解剖检查时在石斑鱼体表、口腔、鳃丝检出少数本尼登虫、车轮虫和鱼虱, 感染密度不高, 低倍镜下每个视野 0~3 个虫体, 不足以引起石斑鱼的大量发病死亡。

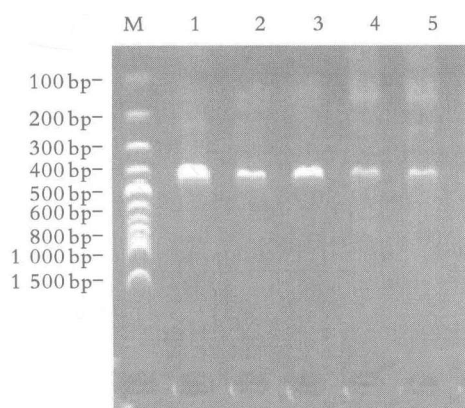


图2 各种石斑鱼神经坏死病毒检测电泳图谱

Fig.2 The electric swimming atlas measured by various *Epinephelus* spp. NNV

M. 100bp DNA 标记; 1. 紫石斑鱼; 2. 马拉巴石斑鱼; 3. 青石斑鱼; 4. 赤点石斑鱼; 5. 云纹石斑鱼

M. 100bp DNA maker; 1. *Epinephelus lanceolatus*; 2. *E. malabaricus*; 3. *E. awoara*; 4. *E. akaara*; 5. *E. moara*

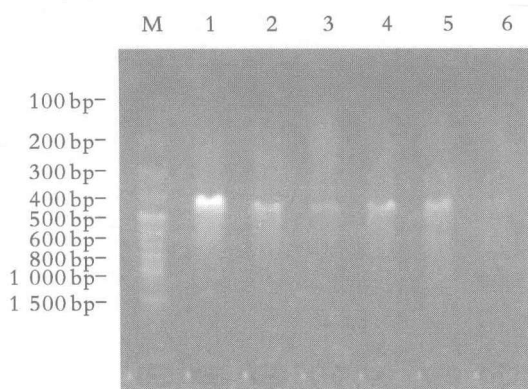


图3 青石斑鱼不同组织神经坏死病毒检测电泳图谱

Fig.3 The electric swimming atlas measured by various *E. awoara* NNV

M. 100bp DNA 标记; 1. 视网膜; 2. 脾; 3. 肾; 4. 脑; 5. 肝; 6. 鳃

M. 100bp DNA maker; 1. retina; 2. spleen; 3. kidney; 4. brain; 5. liver; 6. gill

3 讨论

研究资料显示, 病毒性神经坏死病毒存在于野生和人工养殖的多种海水鱼体内, 流行地区很广, 是除美洲和非洲外几乎世界所有地区的海水鱼类的严重疾病, 至少在 11 个科 22 种鱼中流行^[3]。近年来大陆及中国台湾等地海水网箱养殖石斑鱼的疾病流行情况显示, 病毒性神经坏死病, 在许多海域时有发生, 是养殖石斑鱼危害比较严重的流行病; Chi 等^[4]报道, 神经坏死病毒似乎没有严格的鱼类宿主特异性, 已经对台湾淡水养殖的鲢 (*Parasilurus asotus*) 造成了危害, 表明此病毒不仅危害海洋鱼类, 也有向淡水养殖鱼类蔓延的趋势。厦门海区的网箱养殖始于 20 世纪 80 年代, 苗种来自包括台湾地区在内的全国各地, 病原来自海区的海水或通过购买苗种带来。

3.1 应激是疾病发生的诱因

疾病的发生是综合因素的反应, 病原是主要因素, 环境是诱导因素, 4~8 月是厦门地区雨水充沛的季节, 也是海区赤潮多发的季节, 降水和赤潮引起的环境因子变化, 是应激反应的应激原, 是疾病发生的诱因。

3.2 低氧综合应激

2003 年 4 月中旬至 6 月, 厦门地区下了 7 次雨量比较大, 时间比较长的大、暴雨, 网箱养殖海区在雨后的小潮期间发生了 3 次赤潮, 赤潮生物是硅藻, 每次 5~7 d, 在赤潮发生期间, pH、DO 昼夜起伏大, 夜间由于光合作用停止, 水中氧气的补给中断, 而鱼类和海洋生物包括赤潮生物在内的呼吸对氧的消耗没有停止, DO 下降, 随之而产生的大量 CO₂, 使海水 pH 下降, 环境胁迫, 应激强烈, 呼吸频率加速, 耗氧增加, 产生的 CO₂ 也增加, 处于低氧环境条件下的石斑鱼, 生长、生理功能受阻, 组织、器官受损或坏死, 敏感性增强, 抗病力下降。

3.3 亚硝酸盐应激

赤潮消退期间, 赤潮生物死亡分解大量消耗氧气释放 CO₂, 海水 pH 下降、DO 下降、NO₂⁻ 上升, 亚硝酸盐促使血液中的血红蛋白转化为高铁血红蛋白, 高铁血红蛋白不能与氧气结合, 致使血液输送氧气的能力下降, 导致石斑鱼产生应激。

3.4 水体发黏 呼吸受阻

赤潮发生和消亡期间, 水体粘性增加, 有机碎屑、悬浮物黏附鳃丝, 阻塞呼吸通道, 影响、损害正常生理功能。

3.5 鱼苗对环境因子的耐受力低下

5月初从外地引进的数百万尾青石斑鱼苗因携带神经坏死病毒,又经长途运输,鱼苗体能消耗大,体质弱,对养殖环境的耐受度下降,导致大量死亡。

3.6 繁殖期石斑鱼对环境的耐受度降低

同一个渔排,处于性腺发育期、繁殖期和2龄以上的成鱼发病率高于未成熟的同一种石斑鱼,根据现场采样调查和解剖病鱼统计,136条病、死鱼,67%处于性腺发育成熟期,生殖期的石斑鱼对环境因子的耐受度比较低,病死率比较高,这一现象与海洋生物在生殖期敏感性增强^[5]相吻合。4月中旬至6月是赤点石斑鱼和青石斑鱼成熟产卵季节,处于生理期的石斑鱼,对营养的需求增加,代谢旺盛,消耗大,自身的免疫力、抗病力、对环境的耐受力下降,养殖海区因受雨水和赤潮影响,水质不稳定,pH、DO昼夜变化大,环境胁迫,石斑鱼正常生理功能受到扰乱和损害,产生应激反应,诱导神经坏死病暴发。

国内外有关鱼类神经坏死病已有较多的研究,已对IPNV、VHSV、IHN、SVC、GCHD和CCVD等6种鱼类病毒疫苗进行研究和利用,几乎全部朝基因重组疫苗发展,取得了一些研究进展^[6]。Breton等^[7]研究表明,在欧洲鲈中存在无症状的携带者,它们所携带的神经坏死病毒能传播给其他鱼类;Castric^[8]等通过调查研究发现,网箱养殖金鲷(*Aurata aurata*)携带有神经坏死病毒,却没有明显的发病症状,但是其所携带的神经坏死病毒能传播给附近的海鲈,导致其发病。国内这方面的研究起步较晚,2001年Lim等^[9]首次报道了石斑鱼病毒性神经坏死病,并对该病的组织病理学进行了研究^[10]。

养殖鱼类病毒性疾病目前尚无有效的治疗方法,应以防为主,防控结合,海区网箱养殖,要根据养殖海域环境容量合理布局,保证水流畅通,有效利用海水的自然交换,对污染物进行稀释和扩散,维护海水的自净能力;加强种苗检疫,严把苗种质量关,严禁从疫区进苗,不进携带病原的鱼苗;强化养殖管理,科学养殖,规范养殖,放养密度适当,切勿过密,投喂优质饵料,投饵量适中,尽量减少、避免残饵沉积对海区的污染;发现病、死鱼,

及时捞离水面,消毒、掩埋处理,防止病原传播、扩散;减少应激原,改善、稳定养殖生态环境,增强养殖鱼类自身的免疫力,加强生产过程中的病害监视、监测、发现疫情及时采取隔离、防控措施。

致谢:余秀霞、黄丽莎参加本调查,陈信忠、龚艳清对病原的实验室检测提供帮助和支持,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 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种石斑鱼的神经坏死病毒[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 202-207
- [2] 陈信忠,苏亚玲,龚艳清,等. 闽南地区养殖石斑鱼病毒性神经坏死病初步研究[J]. 福建水产, 2003, 3:11-14.
- [3] 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会组织编写. 国家质量监督检验检疫总局译. 水生动物疾病诊断手册(第三版,2000) [M]. 中国农业出版社, 2001.10:80-83.
- [4] Chi S C, Shieh J R, Lin S J. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan[J]. *Dis Aquat Org*, 2003,55:221-228.
- [5] 黄宗国主编. 海洋生物学辞典[M]. 海洋出版社, 2002. 66.
- [6] 吴金炉,曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗[J]. 海洋科学, 1999,4:37-42.
- [7] Breton A, Grisez L, Sweetman J, et al. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Journal of Fish Diseases* 1997,20:145-151.
- [8] Castric J, Thiery R, Jeffroy J, et al. Sea bream *Sparus aurata* an asymptomatic contagious fish host for nodavirus [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2001,47:33-38.
- [9] Lim R, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China [J]. *Fish Pathology*, 2001,36:186-188.
- [10] 黄剑南,翁少萍,等. 赤点石斑鱼神经坏死症的组织病理和电镜观察[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 519-523.

Epidemiologic investigation of viral nervous necrosis in cage-cultured rockfishes in Xiamen

SU Ya-ling

(Xiamen Aquaculture Technical Service Station, Xiamen 361008, China)

Received: may,22,2007

Key words: *Epinephelus spp*; nervous necrosis virus; reverse transcription polymerase chain reaction

Abstract: A serious epidemic disease usually breaks out in spring and summer in cage-cultured rockfishes in Xiamen, Fujian province, China, and infected fishes appear abnormal in the nervous system. After epidemiologic investigation and pathogenic assay, the nervous necrosis virus (NNV) was identified to be the main pathogen. Seventy-six rockfishes, belonging to five kinds: *Epinephelus akaara*, *E. awoara*, *E. moara*, *E. lanceolatus* and *E. malabaricus*, were examined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, and NNV was detected in 90% of the rockfishes examined. In infected rockfishes, NNV could be detected in brain and retina most frequently, followed by kidney, less in liver and spleen, but could not be detected in branchia.

(本文编辑:梁德海)