

一起石斑鱼苗病毒性神经坏死病的诊断

陈 晖, 肖 颖, 方成俊, 张东斌, 余晓薇

(东山出入境检验检疫局, 福建东山 363401)

摘要: 2017年6—7月, 福建省东山县某石斑鱼养殖场多批20~60日龄杂交石斑鱼苗发病, 临床表现为游泳行为改变, 致盲、打转, 鱼体发黑, 不食, 继而死亡, 死亡率高达90%以上。多次应用抗生素治疗无效, 寄生虫、细菌学检查为阴性。应用世界动物卫生组织(OIE)推荐的检测引物, 采用RT-PCR检测方法扩增出神经坏死病毒(NNV)特异性的421 bp基因片段, 以此诊断为病毒性神经坏死病(VNN)。

关键词: 杂交石斑鱼苗; 病毒性神经坏死病; 寄生虫学检查; 细菌学检查; RT-PCR

中图分类号: S851.34+7.34 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-944X(2018)01-0104-03

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.01.028

Diagnose on an Outbreak of Viral Nervous Necrosi of Grouper Fry

Chen Hui, Xiao Ying, Fang Chengjun, Zhang Dongbin, Yu Xiaowei

(Dongshan Entry-exit Inspection and Quarantine, Dongshan, Fujian 363401, China)

Abstract: During the period from June to July in 2017, an outbreak of disease was reported, with clinical symptoms of abnormal swimming behavior, blind, skin darkening, anorexia, and died in many batches of 20-60-day-old hybrid groupers in a fish farm of Dongshan County, Fujian Province. The mortality was over 90%. Parasites and bacteriological tests were negative and repeated antibiotic treatment was ineffective. The detection primer for pathogen of VNN which was recommended by OIE was carried out, the specific 421 bp gene fragment of NNV was amplified by RT-PCR detection, which indicated that VNV was pathogens causing mass mortality of Grouper fry.

Key words: Hybrid grouper fry; Viral nervous necrosis; incidence; parasites test; bacteriological test; RT-PCR

病毒性神经坏死病(VNN)又称为病毒性脑病和视网膜病(VER), 是一种流行于多种海水鱼类的传染病。该病病原为神经坏死病毒(NNV), 可导致病鱼中枢神经系统和视网膜引发空泡化病灶, 从而引起鱼类大量死亡。该病的死亡率取决于鱼龄大小。一般20~60日龄鱼苗感染后死亡率最高, 可达90%以上, 60日龄以上较大鱼的感染率和致死率较低^[1]。NNV归属于野田村病毒科乙型野田村病毒属, 病毒基因组由2个分子的单股正链RNA1和RNA2组成, 分别编码复制酶和衣壳蛋白^[2-4]。在对RNA1的T4可变区域进行分子进化研究的基础上, 可将乙型野田村病毒分为4个主要基因型: SJNNV型、TPNNV型(鲷神经坏死病毒型)、BFNNV型(鲈神经坏死病毒型)和

RGNNV型(石斑鱼神经坏死病毒型)^[5]。迄今为止, 已知可感染该病的鱼种类达50余种, 主要为海水鱼类, 其中受影响最大的是石斑鱼、黄带拟鲈和鲈鱼等^[6]。近几年, 我国南部省份养殖的各种石斑鱼常常暴发流行VNN。其致死率非常高, 给石斑鱼养殖业造成很大的经济损失^[7]。

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)是世界动物卫生组织(OIE)推荐的检测方法。采用RT-PCR检测方法扩增出NNV特异性的421 bp基因片段, 是当前检测本病的最好检测方法。该法对样品处理的时间短, 操作步骤清楚明了, 特异性强、准确度高, 是快速检测NNV的首选方法。

1 发病情况

福建省东山县某石斑鱼养殖场是一个新建的,

环境良好、设施完备的石斑鱼亲鱼、苗种繁殖和成鱼养殖的较大型养殖场，养殖有红斑鱼、龙胆石斑鱼、油斑鱼、青斑鱼亲鱼4种鱼类。每年4—10月为繁殖期，5—7月为盛产期。本次发病鱼苗是红斑鱼分别与龙胆石斑鱼、油斑鱼杂交的鱼苗，发病日龄大多在20~60日龄，发病率和致死率都在90%以上。而单纯青斑鱼苗的发病日龄较迟，发病率和死亡率较低。

东山县每年6—7月份的水温一般保持在24~30℃。石斑鱼亲鱼一般在受精卵孵化后约20d，鱼体长1.5~2cm，翅未收缩完全时，开始发病，表现为鱼体游泳行为改变，开始打转，鱼体背部开始发黑，但不影响进食；继续喂养蛭虫类生物饵料3~5d后，部分鱼苗开始死亡，死亡率为50%左右。当时场里采取了紧急应对措施，如将发病鱼苗与健康鱼苗隔离，降低鱼苗养殖密度，对发病鱼池多次使用抗生素（氟苯尼考）药浴，但无明显治疗效果。持续喂养至30~50d，鱼苗翅收缩完成后，部分健康鱼苗也开始发病，表现为持续打转，飘浮水面或沉于池底，肚子胀气，鳃部出血，鳃丝膨胀，不进食，处于半昏迷状态，甚至出现烂肚、烂鳃并发症，最终累记死亡率高达90%。一般孵化后20~60d为鱼发病的危险期，60d后鱼体大于10cm左右时，鱼进入安全期，一般不再发病。发病较严重的是红斑鱼分别与龙胆石斑鱼、油斑鱼杂交的鱼苗。青斑鱼一般发病1周后即可渡过危险期。

2 实验室检查

2.1 寄生虫学检查

采集多条濒死病鱼剖检，取鳃片、眼、肠进行压片，解剖镜下检查，未见虫体和虫卵。

2.2 细菌学检查

将孵化后20d即开始发病的，且未进行抗生素治疗的濒死病鱼，取病变明显的头、眼等组织进行研磨，接种含1%氯化钠的肉汤培养液，30℃培养1d；待肉汤混浊后，划线接种TCBS平板，同样30℃培养1d。TCBS平板上可见少许黄色菌落，经鉴定为溶藻弧菌。按常规办法，再取上述菌落接种于1%氯化钠的肉汤培养液，30℃培养1d，

再对健康石斑鱼苗进行毒力回归试验，未出现上述病症，说明溶藻弧菌不是引起上述病症的病原。

2.3 RT-PCR方法检测

2.3.1 材料 活体采集发病后3个不同时期（20、35、50d）游动异常、食欲减低、体表色素渐变的濒死石斑鱼苗，冻存于-80℃冰箱备用。试验所用的磁珠法通用型RNA提取试剂盒，为赛默飞世尔科技中国有限公司产品；一步法RT-PCR试剂盒，购自宝生物工程（大连）有限公司；所用序列采用OIE《水生动物疾病诊断手册》（第3版）推荐的引物。反向引物：5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3'；正向引物：5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3'。GeneGreen核酸染料，购自天根生化科技（北京）有限公司。

2.3.2 方法

2.3.2.1 组织样品处理 取病鱼脑、眼约50mg，放在1.5mL灭菌离心管中，用灭菌碾磨棒充分研磨捣烂，加1mL裂解液。室温孵育3min，加200μL氯仿，即三氯甲烷（Chloroform），小心盖上盖子，剧烈震荡15s，室温孵育3min，4℃12000r/min，离心15min。取上清400μL至5连管的第1孔内。

2.3.2.2 RNA提取 采用磁珠法提取RNA。在5连管内分别加入试剂（表1）。提取全过程在磁珠提取纯化系统中自动进行。

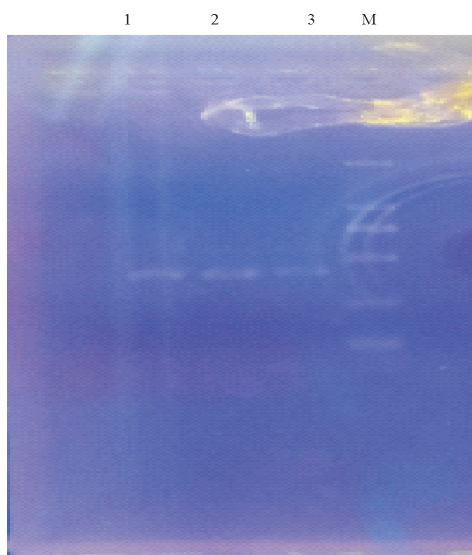
表1 5连管内加入的试剂及剂量

孔号	孔1	孔2	孔3	孔4	孔5
试剂及剂量	裂解样品400μL、乙醇280μL、磁珠20μL	漂洗缓冲液1500μL	漂洗缓冲液2500μL	漂洗缓冲液2550μL	去离子水100μL

2.3.2.3 一步RT-PCR法 根据NNV扩增片段大小，设置RT-PCR反应体系：PCR模板5μL，正、反向引物（40μmol）各2μL，Taq酶（5mol/L）1μL、10×Taq酶缓冲液7μL、MgCl₂（25mmol/L）6μL、dNTP 2μL、M-MuLV逆转录酶（20U/μL）1μL、RNA酶抑制剂（20U/μL）0.5μL，加灭菌双蒸水至50μL。程序设定为：首先42℃30min、95℃5min，然后95℃40s、55℃40s、72℃40s循环30次，最后72℃延伸5min，4℃保存。

2.3.2.4 PCR扩增结果判定 用TBE电泳缓冲液

配制 2% 的琼脂糖（加入浓缩的 10000×GeneGreen Nucleic Acid Dye，使其在凝胶中的终浓度为 1×）进行电泳，样品孔中加入 6 μL 样品和 2 μL 样品缓冲液（含 0.25% 溴酚蓝）的混合液，并设立 DNA 标准 Marker 作对照。电泳后在紫外检测仪上观察发现，在琼脂糖电泳的 421 bp 位置均出现明显的亮带（图 1）。发病后 3 个不同时期的杂交石斑鱼苗中均检出 NNV。



M. D2000 DNA Marker; 1. 20 d 杂交石斑鱼苗疫苗扩增条带; 2. 35 d 杂交石斑鱼苗疫苗扩增条带; 3. 50 d 杂交石斑鱼苗疫苗扩增条带

图 1 琼脂糖凝胶电泳图谱

3 结论

应用 OIE 推荐的检测引物，采用 RT-PCR 检测方法，最终证实该鱼场石斑鱼苗流行的是 VNN，又称病毒性脑病和视网膜病。

VNN 主要影响鱼苗和幼鱼，通常疫病症状出现得越早，死亡率越高，鱼苗阶段感染后死亡率经常高达 100%。反之，育苗期间，该病发生的越迟，发病率和致死率越低。而本次流行病学调查发现，发病较严重的是红斑鱼分别与龙胆石斑、油斑鱼杂交的鱼苗。而青斑鱼苗对 NNV 有较强的抵抗力，一般发病 1 周后即可渡过危险期，发病率和致死率较低。

对 VNN，目前无特效治疗药物，只能从预防入手。一是引进培育对 NNV 有较强抗性的鱼种，如青斑鱼作为亲本鱼种；二是鱼卵育苗前，可用聚乙烯吡咯烷酮碘（PVP-1）浸浴；三是在养殖中，一旦发现病鱼要及时捞出并进行隔离养殖；四是夏季高温期，要降低养殖密度，保持水流畅通，投放新鲜饵料。

致谢：

本次实验室检测得到厦门出入境检验检疫局技术中心徐淑菲老师的指导，特此致谢！

参考文献：

- [1] 世界动物卫生组织 (OIE). 水生动物诊断试验手册 [M]. 6 版. 北京: 中国农业出版社, 2016: 465-470.
- [2] SCHNEEMANN A, BALL L A, DELSERT C, et al. Eighth report of the international committee on Taxonomy of viruses[M]//FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Family nodaviridae.in: virus taxonomy. London: Elsevier Academic Press, 2005: 865-872.
- [3] BALL L A. Requirements for the self-directed replication of flock house virus RNA1[J]. Journal of virology, 1995, 69 (2): 720-727.
- [4] NAKAI T, NISHIZAWA T. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus [J]. Journal of general virology, 1999 (80): 3019-3022.
- [5] NISHIZAWA T, FURUHASHI M, NAGAI T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene[J]. Applied and environmental microbiology, 1997 (63): 1633-1636.
- [6] MUNDAY B L, KWANG J, MOO DY N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review[J]. Journal of fish Disease, 2002 (25): 127-142.
- [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.

(责任编辑: 朱迪国)