

Advances in Research on Chinese Giant Salamander Iridovirus Disease

Hang Su, Hui Jiang

College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan
Email: 894096125@qq.com

Received: May 29th, 2018; accepted: Jun. 13th, 2018; published: Jun. 21st, 2018

Abstract

Chinese giant salamander iridovirus (GSIV) disease is the currently only major prion disease, with high infectivity and high mortality. Researchers used modern scientific research methods and advanced instruments and equipment to conduct multilevel research on GSIV. From the biological characteristics of GSIV, the development of diagnostic methods and identification methods for GSIV disease, and the prevention and control of GSIV disease, the authors summarized the research results of researchers in the study of GSIV during the past ten years results, and a brief analysis based on existing research results. Finally, the prospects for the future research on GSIV disease are prospected.

Keywords

Chinese Giant Salamander, Iridovirus, Research, Progress

大鲵虹彩病毒病研究进展

苏杭, 江辉

湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙
Email: 894096125@qq.com

收稿日期: 2018年5月29日; 录用日期: 2018年6月13日; 发布日期: 2018年6月21日

摘要

大鲵虹彩病毒病是目前唯一的大鲵病毒病, 具有高传染性和致死率高的特点。研究人员利用现代科学研究方法和先进仪器设备对大鲵虹彩病毒进行了多层次的研究。从大鲵虹彩病毒的生物学特性、大鲵虹彩病毒病的诊断及鉴定方法的发展、大鲵虹彩病毒病的防控与治疗等方面总结了近十年来研究人员在

大鲵虹彩病毒研究上得出的研究成果, 并在现有的研究成果的基础上进行简要的分析。最后, 分析了未来大鲵虹彩病毒病的研究前景。

关键词

大鲵, 虹彩病毒, 研究, 进展

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大鲵(*Andrias davidianus*), 又称娃娃鱼, 有尾目(*Caudata*)隐鳃鲵科(*Cryptobranchidae*)大鲵属(*Andrias*), 是我国所特有的两栖动物。20 世纪 90 年代以来, 随着大鲵人工养殖规模和地域范围的不断扩大, 大鲵病害已经给国内的大鲵养殖户造成了不少的损失, 严重制约了中国大鲵养殖业的发展。针对大鲵的病害, 科研人员开展了一系列的大鲵疾病研究, 特别是在细菌性疾病上取得了一定的成果, 然而, 在大鲵病毒性出血病的研究方面没有显著进展。

1.1. 中国大鲵虹彩病毒(*Chinese Giant Salamander Iridovirus, GSIV*)

目前有关大鲵的病毒性疾病仅有中国大鲵虹彩病毒(*Chinese giant salamander iridovirus, GSIV*)一种, 中国大鲵虹彩病毒又被称为中国大鲵病毒(*Chinese giant salamander virus, CGSV*)、中国大鲵虹彩病毒(*Chinese giant salamander iridovirus, GSIV*)和大鲵蛙病毒(*Andrias davidianus ranavirus, ADRV*), 虽然称呼尚未统一, 但都是指导致中国大鲵患病的蛙病毒科的虹彩病毒[1] [2]。大鲵虹彩病毒对幼年大鲵和成年大鲵都具有感染性, 极易爆发养殖大鲵大规模死亡, 因此, 研究人员从大鲵虹彩病毒的病原学入手, 在其检测方法、病症诊断以及免疫防控等方面展开了全方位的研究。

1.2. 研究中国大鲵虹彩病毒的基础

2009 年以来, 包括 Dong [3]、江育林等在内的研究员在河南、甘肃、四川等地都分离到了感染中国大鲵的病毒[4], 但未确定感染中国大鲵的是何种病毒。在能准确分离导致大鲵患病病毒的基础上, 曾令兵团队与的肖汉兵团队合作, 利用实验室先进的仪器设备与鱼类细胞系资源对患病鱼体内分离的病毒感染细胞培养物进行培养, 在患病的幼年大鲵与成年大鲵体内分离得到了病毒。经过测序与比对分析, 初步将此病毒认定为大鲵虹彩病毒[5]。这是世界上第一次从患有典型非细菌性出血病的幼年大鲵与成年大鲵体内分离得到大鲵虹彩病毒, 这为今后研究大鲵虹彩病毒奠定了重要基础, 关于大鲵虹彩病毒各个方面的研究也由此展开。

2. 大鲵虹彩病毒的生物学特性

综合研究大鲵虹彩病毒的生物学特性可为研究大鲵虹彩病毒病的防控技术提供较为充分的科学理论依据。

高正勇等[6]用 56°C 和 65°C 处理大鲵虹彩病毒 30 min 均可使得病毒失去感染活性, 表明大鲵虹彩病毒对热处理较为敏感, 用酸(pH 3)、碱(pH 10)、有机溶剂乙醚和氯仿处理大鲵虹彩病毒导致病毒滴度呈

现极显著的差异($p < 0.01$), 表明大鲵虹彩病毒对 pH 3、pH 10 和有机溶剂敏感。江育林等[7]在电镜下测得病毒直径为 130~150 nm, 通过对大鲵虹彩病毒的理化特性测定, 也证实了该病毒对热、酸、碱和氯仿敏感, 并且得出结论大鲵虹彩病毒有囊膜包裹的 DNA 病毒。孟彦[8]观察了患病大鲵的肝脏、脾脏和肾脏的超微结构, 发现在这些器官内的病毒粒子大多呈现六边形, 直径约 140 nm, 对角线约 180 nm, 呈现出典型的虹彩病毒粒子形状(图 1)。

J. Ma 等[9]研究了大鲵虹彩病毒在鲤鱼上皮瘤细胞感染 1~96 h 的超微结构变化并观察到病毒为二十面体。江育林等[7]通过在不同温度下将大鲵虹彩病毒置于 BF-2 (蓝鳃太阳鱼细胞)、CO (草鱼卵巢细胞)、CHSE (鲑囊胚细胞)、CLC (鲤白血球细胞)、FHM (胖头鲢肌肉细胞)等 11 个细胞系培养, 实验结果表明, 病毒在 10℃~30℃能够在 BF-2、CO、CHSE、FHM 等细胞中较好地生长且当温度维持在 25℃~30℃病毒生长最快。孙建滨、曾令兵等[10]用多种终浓度的 β -丙内酯(β -propiolactone, BPL)灭活细胞用以培养大鲵虹彩病毒, 试验结果显示, 在 4℃下当大鲵虹彩病毒在终浓度为 0.1%的 BPL 中灭活 72 h, 该病毒能被完全灭活, 这是大鲵虹彩病毒疫苗能够用研制的重要的生物学基础。刘丹[11]研究发现, 大鲵虹彩病毒在感染大鲵后能使得主要组织相容性复合体基因的表达显著变化, 主要组织相容性复合体在抗大鲵虹彩病毒的感染中可发挥重要的作用。袁江迪等[12]通过凝胶电泳分析, 比较正常大鲵和感染病毒大鲵的血清和黏液蛋白, 证实了大鲵虹彩病毒感染后大鲵血清和黏液蛋白组分会出现变化。张锐等[13]对大鲵虹彩病毒的核心基因所编码的蛋白 ADRV-96L 展开研究, 发现 ADRV-96L 具有促细胞增殖和生长的腺苷三磷酸酶活性, 这为今后研究虹彩病毒在低等脊椎动物之间的跨种传播提供了新的方向。

3. 大鲵虹彩病毒病的诊断及鉴定方法

3.1. 大鲵虹彩病毒病的诊断

耿毅等[14]对患病大鲵进行解剖观察, 可见患病大鲵脾、肾肿大伴有淤血以及斑点状出血, 肝肿胀且呈灰白色或有点状出血, 肠壁变薄, 肠腔内可见淡黄色积液, 利用光镜观察, 患病大鲵的组织器官有多种炎症反应, 利用电镜观察, 患病大鲵的肝、脾、肾组织细胞发生明显病变, 病变的组织细胞质中可看到有虹彩病毒样颗粒。周洲等[15]对大鲵感染虹彩病毒的病理特征进行了总结, 其主要特征表现为大鲵食欲降低且体表分泌大量粘液, 活动量减少, 待在池底时间增长; 腹部膨大且伴有出血或充血现象, 随着感染时间的加长, 皮肤、肌肉会出现溃烂, 四肢与头部出现肿大并伴有血斑, 感染 5~10 天内大鲵死亡。

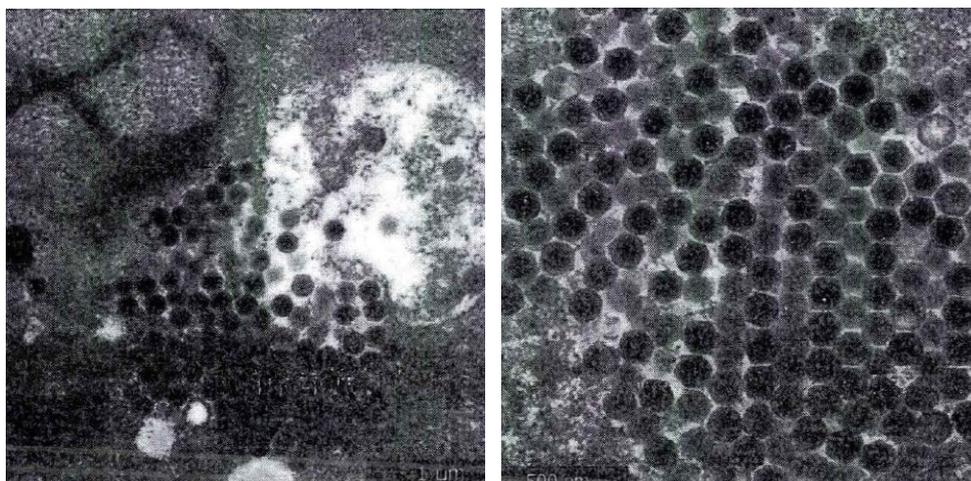


Figure 1. Observation of Chinese giant salamander iridovirus particles by electron

图 1. 电镜下大鲵虹彩病毒观察

贾秋红[16]在陕西省商洛某大鲵养殖场对患病大鲵治疗期间也对大鲵虹彩病毒病的症状进行了总结,其主要症状有:大鲵头部、四肢及尾部有严重的肿胀及溃烂现象;腹部、下颌有大量出血点;对患病大鲵解剖发现其腹腔内有积水,肝脏、脾脏、肾脏肿大现象且脾肾可见白点。刘丹、耿毅等[17]对感染大鲵虹彩病毒的大鲵进行组织动态监测,利用实时荧光定量核酸扩增检测系统检测得到,在感染的过程中大鲵虹彩病毒在大鲵体内的各个组织广泛分布且含量呈上升趋势。目前诊断大鲵是否患有大鲵虹彩病毒主要是通过现场或者临床症状观察、对大鲵进行病理解剖、显微镜观察以及 PCR 技术检测。

3.2. 大鲵虹彩病毒病的鉴定

近年来,各研究员与实验室针对大鲵虹彩病毒建立了多种能有效地检测大鲵虹彩病毒的检测方法,并在这些方法上提出了相应的优化方案。耿毅等[18]将患病大鲵的肝、肾、脾等部位做成超薄切片,进行了电子显微镜的观察,电镜下可见不同时期的病毒颗粒。沈红保等[19]利用普通 PCR 的扩增技术和电泳分析的方法对大鲵虹彩病毒进行简单的检测。实验表明,普通 PCR 可以检测出大鲵虹彩病毒,但耗时间长、检测效果不佳,不能够精确检测大鲵虹彩病毒。为了改进普通 PCR 检测的不足,周勇等[20]以 PCR 扩增技术为基础,运用载体构建重组质粒,以其 10 倍梯度稀释为标准模板进行 Taq Man 实时荧光定量 PCR 扩增,通过制作曲线实现定性检测的目的。Taq Man 实时荧光定量 PCR 检测方法可准确快速地检测到大鲵虹彩病毒,具有较高的特异性,但在技术操作与仪器设备上有比较高的要求。徐敬钧等[21]在实时荧光定量 PCR 检测方法上做出进一步完善,设计了大鲵虹彩病毒的 49L 名为 US22 家族基因的 ORF 区的引物,然后通过 PCR 扩增,此方法在检测上有可重复、可通过血液检测的方式实现活体监测等优点。刘星星等[22]参照 GenBank (DNA 序列数据库)对大鲵虹彩病毒的 MCP 基因序列设计特异性引物,建立巢式 PCR 检测方法。与 Taq Man 实时荧光定量 PCR 测定相比,巢式 PCR 检测法不需要昂贵的仪器设备,如荧光定量 PCR 等,只需普通 PCR 即可完成检测,降低费用的同时也更适用于大批量样品检测,更适用于大鲵虹彩病毒的防控阶段。2014 年,曾令兵、孟彦等人建立了大鲵虹彩病毒 LAMP 检测方法,利用此方法制作出能在一个小时内能准确检测样品中是否存在大鲵虹彩病毒的检测试剂盒[23]。LAMP 检测法的出现使得不具备专业技能的养殖户也能在养殖现场进行快速诊断患病大鲵。王芳等[24]建立了套式 PCR 法用以检测大鲵虹彩病毒并在此基础上进行优化,在临床试验中达到了较好的效果,可以用于大范围的大鲵虹彩病毒检测和隐形感染检测。2016 年,周小愿等人将大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白在大肠杆菌 BL21 中进行融合表达,纯化后制作了多克隆抗体,实验结果表明该多克隆抗体可以用于大鲵虹彩病毒的免疫检测,这使得大鲵虹彩病毒的免疫检测试剂盒的开发成为可能[25]。黄谧等[26]同样成功制成了大鲵虹彩病毒的多克隆抗体,为免疫检测试剂盒的研制进一步打下基础。

4. 大鲵虹彩病毒病的防控与治疗

凌空等[27]认为引起大鲵发病的原因主要有水质变差、大鲵机体遭受机械性损伤、大鲵种质资源不好等。而对于大鲵虹彩病毒病来说,其传播速度及致死速度都很快,致死率能高达 90%以上,并且很难在疾病爆发时用药物控制住,因此预防是避免大鲵感染虹彩病毒的关键。周洲[15]等认为预防要注重大鲵苗种健康、选择正规饲料、控制养殖温度与密度、保证水质等。令狐克剑等[28]认为控制该病大面积扩散最佳方法是及时将患病大鲵隔离,并对养殖场、水体及器具进行高锰酸钾消毒。尹文林等[29]研究发现,对患病的大鲵使用板蓝根、吗啉胍等药物可以起到缓解病情的效果,但以上药物均无法治愈大鲵虹彩病毒病。

目前来说治疗病毒病最有效的手段是注射疫苗。贾秋红等[14]在确认大鲵被虹彩病毒感染后,将患病大鲵与健康大鲵进行隔离,使用聚维酮碘和高锰酸钾对水体及相关器具消毒,并对患病大鲵注射大鲵虹

彩病毒灭活疫苗和自制的中西药结合抗病毒药物, 双管齐下, 患病大鲵有所好转, 使得疫情得到有效控制。孙建滨等制成的 β -丙内酯灭活大鲵虹彩病毒疫苗的免疫保护率可达到 83.3% [10]。邓绿洲[30]发现以黄芪多糖为佐剂, 可以从一定程度上提升疫苗保护率。牟维豪等[31]利用实时荧光定量核酸扩增检测和病毒滴度测定, 用 RNA 干扰大鲵虹彩病毒的主要衣壳蛋白及相关酶, 发现 RNA 干扰可抑制病毒主要功能基因的表达并影响病毒复制。

5. 大鲵虹彩病毒病研究展望

在大鲵虹彩病毒出现的十年间, 研究员们剥茧抽丝般的研究对使得人们对大鲵虹彩病毒病的了解日渐明朗, 但未来研究员们仍要就如何准确高效治疗大鲵虹彩病毒病做出努力。首先要加紧研制可以广泛使用的大鲵虹彩病毒的检测试剂盒。其次大鲵虹彩病毒的疫苗研制仍在临床试验阶段, 如何降低疫苗成本、提高疫苗的免疫保护率也需要各大研究机构继续探索。此外, 中药材的研究开发也应该成为未来研究大鲵虹彩病毒病的重点突破方向, 筛选出疗效好的无公害中药材用于大鲵虹彩病毒初期的治疗。今后大鲵虹彩病毒的研究还应整合多方资源, 从根源上减少大鲵的感染问题, 为大鲵养殖业的健康发展创造良好的条件。

参考文献

- [1] 王海, 陈诚, 刘峻嵘. 大鲵病毒性疾病的研究进展[J]. 农技服务, 2014, 31(8): 175-176.
- [2] 科研人员首次分离到大鲵出血病病原——大鲵虹彩病毒[J]. 水产养殖, 2011(3): 54.
- [3] Dong, W.Z., et al. (2012) Iridovirus Infection in Chinese Giant Salamanders, China. *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 2388-2389. <https://doi.org/10.3201/eid1712.101758>
- [4] 樊汶樵, 孙志芳, 杨帆, 姜玉松, 李晓英, 孙翰昌, 徐敬明. 中国大鲵主要传染病病原研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(6): 73-75.
- [5] 王威克. 长江所成功分离大鲵虹彩病毒[N]. 中国渔业报, 2011(004): 1.
- [6] 高正勇, 曾令兵, 肖汉兵, 张辉, 孟彦, 肖艺, 徐进. 大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(5): 18-26.
- [7] 江育林, 张旻, 景宏丽, 高隆英. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 274-282.
- [8] 孟彦. 大鲵虹彩病毒病原的分离、鉴定、基因组测序及大鲵群体遗传多样性分析[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [9] Ma, J., Zeng, L., Zhou, Y., Jiang, N., Zhang, H., Fan, Y., Meng, Y. and Xu, J. (2013) Ultrastructural Morphogenesis of an Amphibian Iridovirus Isolated from Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, **150**, 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.007>
- [10] 孙建滨, 曾令兵, 张辉, 孟彦, 徐进, 周勇, 王芳, 李瑞伟, 刘秋凤. 大鲵虹彩病毒 β -丙内酯灭活方法的研究[J]. 淡水渔业, 2013, 43(3): 66-71.
- [11] 刘丹. 大鲵蛙病毒感染大鲵的组织嗜性、病理损伤及对 MHC 类基因表达量影响的研究[D]: [硕士学位论文]. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [12] 袁江迪, 陈中元, 张奇亚. 正常和蛙病毒感染后大鲵血清和黏液蛋白图谱比较分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 594-600.
- [13] 张锐, 张奇亚. 大鲵蛙病毒编码 96L 蛋白(ADRV-96L)的腺苷三磷酸酶活性和促进细胞生长作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1090-1099.
- [14] 耿毅, 汪开毓, 李成伟, 周赵英, 黄小丽, 时玉菲, 王均, 黄锦炉. 养殖大鲵蛙病毒自然感染的病理形态学观察[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1640-1644.
- [15] 周洲, 蒋晓红, 王金乐, 刘霆. 大鲵感染蛙病毒的病理特征及预防措施[J]. 科学养鱼, 2012(10): 60.
- [16] 贾秋红. 大鲵感染虹彩病毒的诊断和治疗[J]. 河北渔业, 2014(12): 41-78.

- [17] 刘丹, 耿毅, 汪开毓, 余泽辉, 陈德芳, 欧阳萍, 黄小丽, 牟维豪, 李亚军. 大鲵蛙病毒感染大鲵的动态病理损伤及病原的组织分布[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 146-155.
- [18] 耿毅, 汪开毓, 李成伟, 王均, 廖雨婷, 黄锦炉, 周赵英. 蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(8): 817-821.
- [19] 沈红保, 张建军, 张军燕, 李引娣, 陈媛媛. 大鲵虹彩病毒的 PCR 检测及初步应用[J]. 河北渔业, 2012(8): 17-19.
- [20] 周勇, 曾令兵, 孟彦, 周群兰, 张辉, 高正勇, 肖艺, 孙建滨. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 772-778.
- [21] 徐敬钧, 耿毅, 余泽辉, 汪开毓, 陈德芳, 欧阳萍, 牟维豪, 黄小丽. 大鲵蛙病毒 US22 家族基因的 TaqMan MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2016(6): 749-755.
- [22] 刘星星, 耿毅, 周赵英, 汪开毓, 黄小丽, 陈德芳, 周燕. 大鲵蛙病毒巢氏 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2014(3): 772-778.
- [23] 徐承旭. “一种大鲵虹彩病毒 LAMP 检测试剂盒及检测方法”获国家发明专利授权[J]. 水产科技情报, 2014, 41(4): 218-219.
- [24] 王芳, 康超, 李永霞, 余波, 周思旋. 大鲵虹彩病毒套式 PCR 诊断方法的建立及应用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 291-293.
- [25] 周小愿, 张星朗, 贾秋红, 韩亚慧, 高宏伟. 大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白主要抗原表位区的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(10): 1407-1411.
- [26] 黄谧, 冯勇. 大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(21): 4146-4150.
- [27] 凌空, 曹朕娇, 丁诗华, 孙翰昌. 大鲵病害防治研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(12): 55-58.
- [28] 令狐克剑, 图雅, 邹勇, 李登群. 大鲵的人工养殖及疫病防治技术[J]. 贵州畜牧兽医, 2017(6): 61-63.
- [29] 尹文林, 左梦丽, 潘晓艺, 姚嘉赉, 沈锦玉. 大鲵病害的研究进展[J]. 农业灾害研究, 2015(7): 24-63.
- [30] 邓绿洲. 大鲵蛙病毒(CGSRV)灭活疫苗的研制与免疫效应研究[D]: [硕士学位论文]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [31] 牟维豪, 周燕, 耿毅, 汪开毓, 余泽辉, 李亚军, 黄小丽, 欧阳萍, 陈德芳. RNA 干扰对大鲵蛙病毒主要功能基因表达及其增殖的影响[J]. 南方水产科学, 2017, 13(4): 80-86.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2373-1443, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: ojfr@hanspub.org