

天津地区1例患病鳊的病原学初步鉴定与分析

孙妍^{1,2*}, 董学旺^{1,2}, 陈浩楠^{1,2}, 顾中华³, 魏俊利^{1,2}, 刘群^{1,2#}

¹天津市动物疫病预防控制中心, 天津

²天津市水生动物疫病专业实验室, 天津

³天津市农业发展服务中心, 天津

收稿日期: 2024年11月3日; 录用日期: 2024年12月3日; 发布日期: 2024年12月10日

摘要

本研究采用流行病学调查、分子生物学等方法对天津地区某养殖场采集的患病鳊(*Siniperca chuatsi*)开展了病原学研究工作。水浸片和细菌分离鉴定结果显示: 患病鳊未发现寄生虫和有害细菌的感染; 病原学检测结果显示: 鳊鱼弹状病毒、神经坏死病毒、传染性脾肾坏死病毒检测结果均为阴性, 鳊鱼蛙病毒检测结果为阳性, 目标产物大小为1392 bp (GenBank No.: PQ212952.1); 经NCBI BLAST序列比对和系统发育树分析结果显示: 分离自患病鳊的蛙病毒主要衣壳蛋白(MCP)基因序列与分离自大口黑鲈、孔雀鱼及黑尾海猪鱼的MCP基因序列分为一支, 亲缘关系最近, 相似性达到99%~100%, 初步认为该患病鳊致病原为虹彩病毒科蛙病毒属类的病毒, 值得引起广大养殖者及研究者的高度关注。

关键词

鳊, 病原鉴定, 蛙虹彩病毒, 系统进化树分析

Preliminary Identification and Analysis of the Pathogen of *Siniperca chuatsi* Disease in Tianjin

Yan Sun^{1,2*}, Xuewang Dong^{1,2}, Haonan Chen^{1,2}, Zhonghua Gu³, Junli Wei^{1,2}, Qun Liu^{1,2#}

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Professional Laboratory of Aquaculture Disease, Tianjin

³Tianjin Agricultural Development Service Center, Tianjin

Received: Nov. 3rd, 2024; accepted: Dec. 3rd, 2024; published: Dec. 10th, 2024

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 孙妍, 董学旺, 陈浩楠, 顾中华, 魏俊利, 刘群. 天津地区 1 例患病鳊的病原学初步鉴定与分析[J]. 农业科学, 2024, 14(12): 1293-1300. DOI: 10.12677/hjas.2024.1412163

Abstract

In this study, epidemiological investigation, molecular biology and other methods were used to conduct pathogenic research on diseased mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) collected from a breeding farm in Tianjin area. The results of water immersion and bacterial isolation and identification showed that no parasitic or harmful bacterial infections were found in the diseased mandarin fish; The pathogen detection results showed that the detection of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV), viral nervous necrosis (VNN), and infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) was all negative, while the detection of mandarin fish ranavirus (MRV) was positive. The target product size was 1392 bp (GenBank No.: PQ212952.1); The results of NCBI BLAST sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that the major capsid protein (MCP) gene sequence of MRV isolated from diseased mandarin fish was closely related to the MCP gene sequence isolated from largemouth bass, guppy, and *Halichoeres melanurus*, with a similarity of 99%~100%. It is preliminarily believed that the pathogen of this diseased mandarin fish is a virus belonging to the family *Iridoviridae* and the genus of ranavirus, which deserves high attention from breeders and researchers.

Keywords

Siniperca chuatsi, Pathogen Identification, Mandarin fish Ranavirus, Phylogenetic Tree Analysis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 前言

鳊(*Siniperca chuatsi*), 又称桂花鱼、翘嘴鳊等, 隶属于鲈形目(*Perciformes*)、鲈科(*Serranidae*)、鳊属(*Siniperca*)。因其肉质细嫩、味道鲜美, 少刺, 深受广大消费者的喜爱, 是一种经济价值极高的名贵水产品[1]。鳊鱼在我国南北方的自然分布都十分广泛, 由于过去主要依靠从天然水域中捕捞获得, 且具有吞食活饵的习性被视为凶猛有害鱼类加以清除限制, 致使该物种资源量逐年减少。到 20 世纪 70 年代, 随着市场对高品质水产品需求的增加和饲料鳊等生产问题的解决, 使得鳊鱼在 90 年代的广东[2]、江苏[3]、安徽[4]等地区逐步形成了规模化、专业化养殖格局。

近几年, 受市场疲软、生产成本提高、大宗淡水鱼价格偏低等因素的影响, 使本市以传统鳊鳊鱼为主的中小型养殖场渔业效益十分低下。因此, 很多养殖户都尝试着探索以鳊鱼养殖为主的渔业模式, 希望借此趟出一条新的发展道路。本市养殖的鳊鱼苗种主要以广东、湖北、江苏等南方省份产的苗种为主, 这就导致养殖过程中存在一些问题, 比如南方鳊鱼不耐寒而导致的越冬成活率低, 另外长途运输造成的鳊鱼苗种损伤, 易发生应激及体表损伤等问题都影响着本市鳊鱼养殖生产活动[1]。而最为困扰养殖者的就是鳊鱼的病害问题, 南方地区鳊鱼苗种病毒病携带率较高, 种类较多, 会伴随着跨省转运将一些病害传入本市并扩散蔓延, 目前已经呈现出南方向北方扩展的流行趋势, 给养殖户造成经济损失已成为事实。目前发现的鳊鱼病毒病常见病原主要有鳊鱼虹彩病毒、鳊鱼蛙病毒、传染性脾肾坏死病毒、弹状病毒、神经坏死病毒等, 感染这些病毒的鳊临床症状相似, 甚至与细菌传染性疫病临床症状也有类似, 及时准确判断患病鳊的致病原成为养殖者的难题。对患病鳊致病原的错误认知, 造成的药物滥用往往导致养殖者更加严重的经济损失, 因此, 确定致病原, 同时控制好疾病的发生蔓延已经成为鳊鱼养殖能否成功的

关键环节。

2023 年 8 月,天津市滨海新区某鳊鱼养殖场发生了鳊鱼大批量死亡的情况,发病速度快,死亡率高,患病鳊鱼出现体表溃烂、漫游溜边等症状。本研究以该池塘患病鳊鱼为研究对象,开展了病原学鉴定和分析工作,旨在初步探索发病致病原,为本市鳊鱼养殖病害防控提供借鉴。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 患病动物

患病鳊采集自天津市滨海新区某养殖场土塘,平均体长约为 20 ± 2.5 cm。

2.1.2. 试剂及仪器设备

主要试剂:海洋动物基因组提取试剂盒(天根); Trizol (Invitrogen); RT-PCR 试剂盒、Premix Ex Taq、无酶水等均购自 TaKara; 营养琼脂、营养肉汤等购自北京陆桥; 引物由英俊公司合成纯化; 测序工作由上海生工完成。

主要仪器:高速冷冻离心机(艾本德); PCR 仪(ABI); 微量移液器(艾本德); 电泳仪(北京六一); 凝胶成像系统(伯乐)。

2.2. 方法

2.2.1. 患病鳊流行病学调查及临床症状观察

2023 年 8 月,天津市滨海新区某鳊鱼养殖场发生了鳊鱼大批量死亡的情况,临床症状主要表现为患病与上浮、漫游溜边,部分鱼体色发黑。捞起病鱼观察体表出现溃烂的典型症状,溃烂部主要分布在腹部和尾鳍,鳃丝色浅缺血,且附有粘稠透明液体。流行病学调查结果显示:该鳊养殖池塘为土池,周边无其他鳊鱼养殖场,苗种采购于外省某鳊鱼苗种场,养殖时间约为 80 天,池塘水温约 28°C ,放养密度约为 700 尾/ m^2 ,发病持续时间 7 天,累计死亡率 50%以上,发病期间摄食量明显降低。使用过消毒剂、抗生素、益生菌及中草药,无缓解,病死鱼持续增多加重。

2.2.2. 寄生虫镜检

根据 SN/T 2503-2010《淡水鱼中寄生虫检疫技术规范》[5]中水浸片显微镜检测方法进行患病鳊鳃丝、鳍条等部位寄生虫的检测,解剖挑取 1~2 条鳃丝和鳍条分别放置于载玻片上,向组织上滴 2~3 滴生理盐水后,迅速将盖玻片置于其上,排出气泡后放置显微镜下观察,并记录结果。

2.2.3. 细菌学分离鉴定

在无菌环境下用接种针分别挑取具有典型症状患病鳊的鳃丝、鳍条、腹水、肝脏、脾脏、肾脏、肠道等组织接种划线于营养琼脂平板,置于 28°C 培养 48 小时后,观察细菌生长情况,将具有生长优势的菌落分别划线,分离纯化 3 次后,挑取单菌落置于 1 ml 灭菌后的营养肉汤中进行过夜培养。待菌液生长至对数期,采用水煮法提取菌液基因组[6],并使用 16S rDNA 通用引物对分离出的菌株 DNA 进行 PCR 扩增,上游引物序列为 27F: 5'AGAGTTTGTATCTGCTGG 3',下游引物序列为 1492R: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'。扩增的 PCR 产物送上海生工测序,测序结果通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站进行在线比对。

2.2.4. 病毒检测

将患病鳊的鳃丝、肝脏、脾脏和肾脏等组织解剖混合研磨成组织匀浆液,分别采用海洋动物基因组

提取试剂盒和 Trizol 方法[7]提取匀浆组织的 DNA 和 RNA, 将提取好的 RNA 采用 RT-PCR 的方法反转录成 cDNA, 作为下列 RNA 病毒 PCR 扩增的模版, 提取的 DNA 直接作为下列 DNA 病毒 PCR 扩增的模版。分别进行鳊鱼弹状病毒(*Siniperca chuatsi rhabdovirus*, SCRv) [8]、神经坏死病毒(viral nervous necrosis, VNN) [9]、传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) [10]和鳊鱼蛙病毒(mandarin fish ranavirus, MRV) [11]共 4 种鳊鱼常见病毒病的检测后进行琼脂糖凝胶电泳, 若在目标条带位置出现条带, 将其进行割胶纯化后送往上海生工进行基因测序。

2.2.5. 阳性病原基因序列的比对及系统进化分析

将测序结果通过 NCBI 数据库中的 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性分析, 分别下载相关基因序列, 通过 Clustal x 软件进行多重比对, 采用 MEGA 7 软件中邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树(Bootstrap 设置为 1000 次重复), 以确定致病原。

3. 结果与分析

3.1. 患病鳊鱼的临床症状

患病鳊鱼体色发黑, 体表出现溃烂(图 1(A)), 鳃丝色浅缺血, 分泌的大量透明黏液充满鳃腔(图 1(B)), 解剖后有黄绿色腹水流出, 肠道严重水肿(图 1(C)), 肝脏贫血呈苍黄色(图 1(D))。



Figure 1. Clinical symptoms of diseased mandarin fish collected from farms ((A): surface ulceration; (B): gill filaments filled with transparent mucus; (C): ascites and edematous intestines; (D): the liver appears pale yellow)

图 1. 养殖场采集患病鳊鱼临床症状((A): 体表溃烂; (B): 鳃丝充满透明黏液; (C): 腹水及水肿肠道; (D): 肝脏呈苍黄色)

3.2. 寄生虫观察

经制片和显微观察，患病鳊鳃丝、鳍条等部位均未观察到寄生虫，判断无寄生虫病感染。

3.3. 细菌分离鉴定

患病鳊鳃丝、鳍条、腹水、肝脏、脾脏、肾脏、肠道等组织接种于营养琼脂平板 28℃培养 48 h 后，有少量细菌生长，无优势菌株。经纯化后，逐一挑取单菌落进行 16SrDNA PCR 扩增，扩增产物经测序和 BLAST 比对分析，结果显示，分离菌为乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)等益生菌类菌株，综合判断无细菌性致病原感染。

3.4. 病毒检测结果

琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示，所检测的 4 种鳊常见病毒性疫病中只有鳊鱼蛙病毒(MRV)在目标位置出现了条带，其大小为 1392 bp，其他 3 种病原均未出现扩增条带，判断为阴性。将目标条带割胶纯化后的测序结果(GenBank No.: PQ212952.1)进行比对后显示，与 NCBI 数据库中与分离自大口黑鲈的虹彩病毒(LMBV-FS2021)主要衣壳蛋白基因(MCP) (GenBank No: ON418985.1)序列相似性度为 100%，同时也与分离自大口黑鲈的蛙病毒(M2016)株全基因组中第 96436 位至 97827 位之间的核酸序列相似度为 100%，因此推测该患病鳊感染病原为病毒性疫病，且致病原初步鉴定为虹彩病毒科蛙病毒属类的病毒。

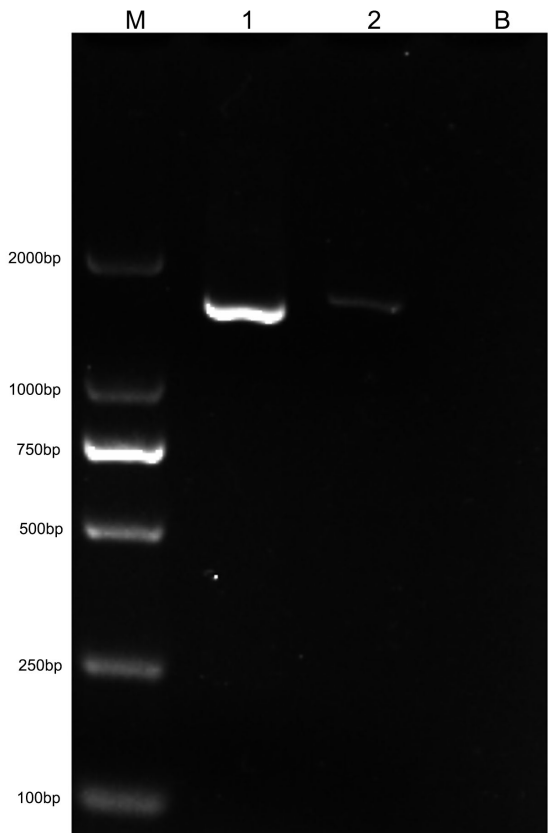


Figure 2. Detection results of ranavirus in diseased mandarin fish (M: Marker; 1: Pathogen detection results in liver tissue of diseased mandarin fish; 2: Pathogen detection results in kidney tissue of diseased mandarin fish; B: Blank)

图 2. 患病鳊蛙虹彩病毒检测结果(M: Marker; 1: 患病鳊肝脏组织病原检测结果; 2: 患病鳊肾脏组织病原检测结果; B: 空白对照)

3.5. 系统进化树分析

系统进化树分析结果显示(图 3): 扩增得到的患病鳊蛙病毒 MCP 基因序列(PQ212952.1)与分离自大口黑鲈蛙病毒的 MCP 基因序列(ON418985.1)和分离自孔雀鱼蛙病毒的 MCP 基因序列(FR677325.1)聚为一支, 与分离自黑尾海猪鱼蛙病毒的 MCP 基因序列(ON595973.1)聚为一大类; 与分离自美洲牛蛙蛙病毒的 MCP 基因序列(AB474588.1)和青蛙蛙病毒的 MCP 基因序列(MH016573.1)形成不同分支; 与分离自牙鲆的传染性脾肾坏死病毒 MCP 基因序列(AY633991.1)形成不同的两类。

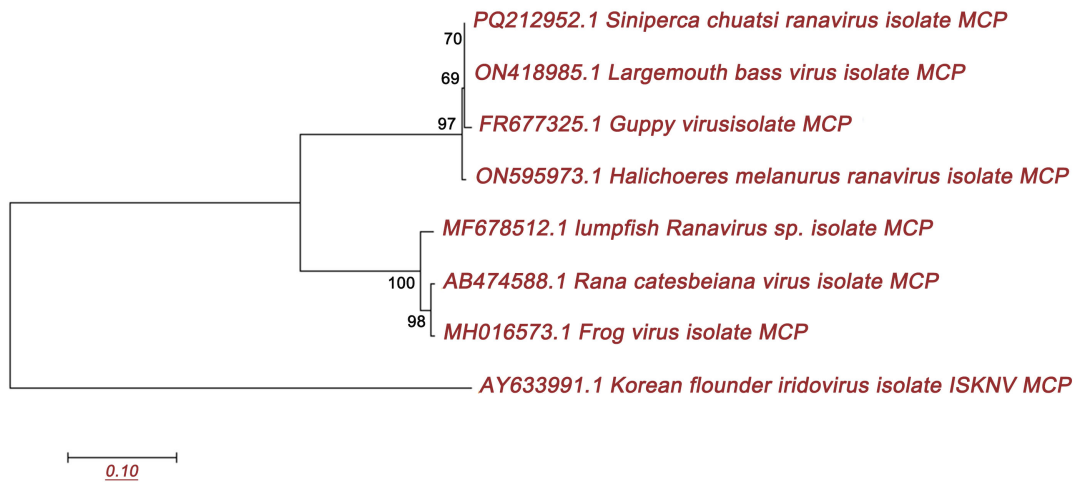


Figure 3. Phylogenetic tree of amplification product sequence of ranavirus in diseased mandarin fish
图 3. 患病鳊蛙虹彩病毒扩增产物序列的系统发育树

4. 讨论

本研究中患病鳊的主要症状为体表溃烂, 肝脏无血色, 呈苍黄色, 死亡速度快。镜下未观察到寄生虫, 且肝、脾、肾等重要组织器官细菌分离鉴定结果也未显示出优势致病菌, 排除了寄生虫病和细菌病的可能。另外通过鳊几种常见病毒性疫病的检测发现, 除了鳊鱼蛙病毒以外, 其他病原均未检出, 且测序结果与感染其他鱼类的蛙病毒属同源性达到 100%。初步推测, 此次天津滨海新区养殖场鳊鱼发病的致病原可能是由蛙病毒属类病毒性病原所致, 但仍需其他实验进一步证实。

20 世纪 60 年代, 蛙病毒首次从豹蛙(*Rana pipiens*)分离得到[12], 能够感染鱼类、两栖类和爬行类, 有着“冷血动物杀手”之称, 能够引发很高的发病率和死亡率, 严重危害着水生动物的安全。目前, 蛙病毒成员已经从至少 175 种爬行和两栖动物中分离出来, 近几年该种病原对水产鱼类的危害也在日趋严重。范玉蕾等从体表出血, 体色变浅, 死亡率较高的似鲇高原鳊(*Triplophysa siluroides*)体内分离得到一株蛙病毒(FYL140220) [13], 罗晓雯等从 1 例体表出血, 肝脏发白的患病大口黑鲈体内分离出一株蛙病毒[14], Teng 等从患病石斑鱼体内分离鉴定出一株蛙病毒, 并进行了全基因组测序分析工作[15]。鳊鱼在养殖过程中的传染性脾肾坏死病毒因为其危害较大, 被业内人士广泛熟知, 但是鳊鱼蛙病毒病公开报道的资料还比较少, 特别是临床症状和检测方法对养殖者开展养殖过程中疫病的防控工作具有重要意义。

通过本研究流行病学调查得到的患病鳊临床症状特点与其他物种感染蛙病毒后表现出的症状比较发现, 均具有体表溃烂、损伤、出血和溃疡的表现[16], 各内脏组织的观察发现, 患病鳊的肝脏几乎完全变为白色, 严重缺血, 但是肾脏通过肉眼观察未出现明显病理变化, 这与大鲵[17]和大鳄龟[18]的患病临床表现不一致, 但与似鲇高原鳊和大口黑鲈的症状相类似, 究其出现这种差异的原因可能是物种亲缘关系

远近有关,还可能是由于病毒致病力差异造成的,这仍需要进一步的病理切片等相关实验进行深入研究。本研究中采用大口黑鲈源蛙虹彩病毒衣壳蛋白部分序列扩增引物对患病鳊组织核酸进行的 PCR 检测,扩增结果经测序显示与大口黑鲈分离株(LMBV-FS2021)主要衣壳蛋白基因序列相似性 100%,遗传进化分析结果也说明该患病鳊感染的蛙病毒与分离自大口黑鲈的蛙病毒亲缘性最近,又由于大口黑鲈和鳊鱼本身同属于鲈形目,分类地位相近,对虹彩病毒科的病原均易感,因此对于此次患病鳊病毒来源推测有可能来源于大口黑鲈。

鳊鱼体表溃烂问题一直是养殖者十分困惑的疾病,死亡率很高,原因不明确。多数养殖者遇到这种情况通常会当作细菌病进行处理,大量使用一些抗生素和消毒剂,往往适得其反,更加速了鳊鱼的死亡率和患病率。通过此次患病鳊流调结果也提示我们,鳊鱼也可能感染蛙病毒,其临床症状初期表现与细菌病比较相似,所以仍需要进行病毒类疫病的 PCR 检测才能够对所患疾病进行初步判断,合理用药。该病原在本市发现还比较少,但对本市大口黑鲈及鳊鱼的养殖已经造成威胁,应引起广大养殖者及研究者的高度关注。

5. 结论

本文采用流行病学调查、寄生虫观察、细菌分离以及 PCR 方法对天津市滨海新区某鳊鱼养殖场的患病鳊进行了病原学鉴定与分析,通过扩增序列的比对和进化树分析初步认为此次患病鳊的致病原为蛙虹彩病毒属的一种,该序列与大口黑鲈源蛙病毒相似度最高,达到 100%,推测该病原可能来自于大口黑鲈。提示该病原对本市大口黑鲈及鳊鱼的养殖已经造成威胁,应引起广大养殖者及研究者的高度关注。

基金项目

天津市农业发展服务中心种业青年科技创新项目(zxkj202421)。

参考文献

- [1] 马春瑜,刘长军,何登伟. 北方地区鳊鱼养殖增效关键技术实施[J]. 黑龙江水产, 2021, 40(6): 39-41.
- [2] 曹阳,曹浩宇,杜文迪,等. 广东省鳊鱼养殖业发展现状及对策[J]. 广东农业科学, 2024, 51(1): 136-143.
- [3] 叶金明,周学金,丛宁,等. 扬州市鳊鱼养殖产业的现状及发展对策[J]. 水产养殖, 2015(11): 7-10.
- [4] 江孝八,包华驹. 贵池鳊鱼产业发展存在的问题及对策[J]. 现代农业科技, 2021(14): 216-217.
- [5] 国家认证认可监督管理委员会. SN/T2503-2010 淡水鱼中寄生虫检疫技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] 闻子钰,梁昊,顾一心,等. 细菌核酸提取方法对荧光定量 PCR 检测差异分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 621-624.
- [7] Meng, L. and Feldman, L. (2010) A Rapid Trizol-Based Two-Step Method for DNA-Free RNA Extraction from Arabidopsis Siliques and Dry Seeds. *Biotechnology Journal*, 5, 183-186. <https://doi.org/10.1002/biot.200900211>
- [8] Ye, C., Liu, S., Li, N., Zuo, S., Niu, Y., Lin, Q., et al. (2022) Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*) P53 Regulates Glutaminolysis Induced by Virus via the p53/miR145-5p/c-Myc Pathway in Chinese Perch Brain Cells. *Microbiology Spectrum*, 10, e02727-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02727-21>
- [9] 全国水产标准化技术委员会. SC/T 7216-2022 鱼类病毒性神经坏死病诊断方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [10] 全国水产标准化技术委员会. SC/T 7211-2011 传染性脾肾坏死病毒检测方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [11] Zhang, W., Duan, C., Zhang, H., Weng, S., He, J. and Dong, C. (2020) Widespread Outbreaks of the Emerging Mandarinfish Ranavirus (MRV) both in Natural and ISKNV-FKC Vaccinated Mandarinfish *Siniperca chuatsi* in Guangdong, South China, 2017. *Aquaculture*, 520, Article ID: 734989. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734989>
- [12] Granoff, A., Came, P.E. and Breeze, D.C. (1966) Viruses and Renal Carcinoma of *Rana pipiens*. I. The Isolation and Properties of Virus from Normal and Tumor Tissue. *Virology*, 29, 133-148. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90203-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90203-0)
- [13] 范玉蕾,耿毅,周燕,等. 一株似鲇高原鳊源蛙病毒的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 556-562.

-
- [14] 罗晓雯, 沈锦玉, 阳涛, 等. 一株湖北源大口黑鲈蛙病毒的分离鉴定[J]. 中国水产科学, 2022, 29(3): 494-502.
- [15] Teng, Y., Hou, Z., Gong, J., Liu, H., Xie, X., Zhang, L., *et al.* (2008) Whole-Genome Transcriptional Profiles of a Novel Marine Fish Iridovirus, Singapore Grouper Iridovirus (SGIV) in Virus-Infected Grouper Spleen Cell Cultures and in Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, **377**, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.011>
- [16] Stöhr, A.C., Blahak, S., Heckers, K.O., Wiechert, J., Behncke, H., Mathes, K., *et al.* (2013) Ranavirus Infections Associated with Skin Lesions in Lizards. *Veterinary Research*, **44**, Article No. 84. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-84>
- [17] Geng, Y., Wang, K.Y., Zhou, Z.Y., Li, C.W., Wang, J., He, M., *et al.* (2011) First Report of a Ranavirus Associated with Morbidity and Mortality in Farmed Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, **145**, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.11.012>
- [18] 余泽辉, 耿毅, 汪开毓, 等. 大鳄龟感染蛙病毒的 PCR 检测及组织病理分析[J]. 动物学杂志, 2015, 50(1): 68-74.