

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190430001

http://www.yykxjz.cn/

王海波, 史成银, 谢国驹, 刘冉阳, 任宁欣. 真鲷虹彩病毒引起养殖斑石鲷大规模死亡的研究. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 151-158
Wang HB, Shi CY, Xie GS, Liu RY, Ren NX. Red seabream iridovirus causing mass mortality in farmed spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 151-158

真鲷虹彩病毒引起养殖斑石鲷大规模死亡的研究*

王海波^{1,2} 史成银^{1①} 谢国驹¹ 刘冉阳¹ 任宁欣^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 2017年8月,山东省烟台市某养殖场网箱养殖的斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)幼鱼突然发病并大量急性死亡。疾病调查显示,养殖海域水温为26℃~28℃;病鱼为4~5月龄,全长为(16.3±1.6)cm,体重为(156.9±37.0)g;80万尾斑石鲷幼鱼2周内累积死亡率达90%以上,经济损失惨重。临诊检查发现,病鱼体表无明显损伤,但活力差、呼吸急促。剖检可见病鱼脾肿大、质地脆、易碎,肾糜烂,肝有出血点。组织切片观察发现,病鱼脾、肾造血组织中可见许多直径约为20 μm的肿大细胞,肿大细胞内含有大量直径约为145 nm、呈六边形的病毒颗粒。用过滤除菌的病鱼脾组织匀浆液,腹腔注射感染健康斑石鲷,感染组14 d内累积死亡率达95%。人工感染病鱼表现出与自然发病鱼类似的外观症状,且在脾、肾组织切片中也可观察到大量的肿大细胞及相似的病毒粒子。使用特异性PCR引物,从自然发病鱼和人工感染病鱼的肝、脾和肾组织中均检测到鱼类虹彩病毒的高强度感染。克隆、测序得到了1362 bp的病毒主要衣壳蛋白基因(MCP),序列比对显示,该病毒的MCP序列与真鲷虹彩病毒(RSIV) RIE12-1的相应序列完全相同。构建的虹彩病毒系统发育树也显示,该病毒属于虹彩病毒科肿大细胞病毒属RSIV类群,是RSIV的一个分离株。本研究首次证实RSIV可以导致斑石鲷大规模死亡,研究结果为诊断和防治斑石鲷病毒病提供了重要参考。

关键词 斑石鲷;真鲷虹彩病毒;肿大细胞虹彩病毒;系统发育树;诊断

中图分类号 S942.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)04-0151-08

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)属温、热带近海鱼类,广泛分布于中国黄海、东海、南海以及朝鲜半岛、日本列岛和中国台湾等周边海域,具有形态优美、肉质细腻、生长速度快、当年上市等优点。2014年以来,随着大规模人工繁育和养殖获得成功,

斑石鲷已成为我国名贵海水养殖鱼类新品种之一,养殖经济效益很高(高小强等,2018)。由于规模化养殖的时间较短,斑石鲷病害尚不多见。已报道的斑石鲷疾病主要有上皮囊肿病(Egusa *et al*, 1987; 范超等,2017)、黏孢子虫病(Yanagida *et al*, 2008)和卵鞭虫

* 农业国际交流与合作项目和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017HY-ZD0303)共同资助 [This work was supported by Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0303)]. 王海波, E-mail: qqwang1768510759@163.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-04-30, 收修改稿日期: 2019-05-09

病(付泉洁等, 2017)等。有学者曾经从斑石鲷中分离到鱼类神经坏死病毒和虹彩病毒, 但未见由这些病毒导致斑石鲷大规模死亡报道(Skliris *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2010)。

虹彩病毒主要感染无脊椎动物和低等脊椎动物, 属大型二十面体状、细胞质型DNA病毒。虹彩病毒科(Iridoviridae)共分为5个病毒属, 即虹彩病毒属(Iridovirus)、绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*)、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)、蛙病毒属(*Ranavirus*)和肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)(Jancovich *et al.*, 2012)。其中, 隶属于肿大细胞病毒属的真鲷虹彩病毒(Red sea bream iridovirus, RSIV)是鱼类的重要病毒性病原之一, 可导致真鲷(*Pagrus major*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、杂交石斑鱼——褐龙斑(*Epinephelus bruneus* × *E. lanceolatus* ♂)等海水养殖鱼类发病并大量死亡, 造成巨大的经济损失(Inouye *et al.*, 1992; 李华等, 2011; 刘冉阳等, 2019)。真鲷虹彩病毒病一直被世界动物卫生组织列为必须向其通报的鱼类重要疫病, 受到严格监控(OIE, 2018)。

2017年8月, 山东省烟台市某养殖场网箱养殖的斑石鲷幼鱼突然发病, 并大量死亡, 2周内累积死亡率超过90%。本研究通过疾病调查和分子生物学分析等方法, 首次证实RSIV可导致斑石鲷大规模死亡, 研究结果为防治斑石鲷病毒病提供了重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用斑石鲷取自山东省烟台市某海水鱼养殖场, 自然发病的斑石鲷和人工感染用健康斑石鲷全长为14~18 cm, 体重为150~200 g。

2216E培养基、弧菌选择性培养基(TCBS)购自北京陆桥生物制品有限公司; 2%多聚甲醛-2.5%戊二醛固定液购自索莱宝科技有限公司; 海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 高保真Ex *Taq* DNA聚合酶、dNTPs、DNA Marker购自TaKaRa公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 流行情况调查及临床症状检查 疾病暴发时, 深入现场调查养殖水温、养殖密度、鱼龄、发病率、死亡率等情况, 观察病鱼的活动状态。取症状典

型的病鱼, 置于解剖盘中, 检查其体表症状, 然后解剖打开腹腔, 观察体腔及各内脏组织器官的病变情况, 并做好记录。

1.2.2 寄生虫和细菌检查 取病鱼的鳃丝、体表黏液、内脏器官和血液进行寄生虫检查。鳃丝、体表黏液采取水浸片法, 脾、肾和肝采用压片法, 血液用涂片法, 制片后分别置于显微镜下观察。使用75%酒精棉球对病鱼体表消毒后, 无菌条件下取病鱼的肝、肾、脾等内脏, 在2216E和TCBS平板上划线接种, 28℃培养48 h, 观察细菌生长情况。

1.2.3 组织病理观察 分别取健康鱼和病鱼的脾、肾组织, 切成小块, 置于Davidson's AFA中固定24 h, 常规石蜡切片、苏木精-伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察、拍照。将肾脏组织切成2 mm×2 mm×2 mm的小块, 在4℃固定于2%多聚甲醛-2.5%戊二醛固定液中, 在0.1 mol/L磷酸缓冲液中漂洗, 再用1%锇酸溶液固定, 经过一系列浓度的乙醇脱水, 样品块经环氧树脂包埋后制备超薄切片, 透射电镜观察、拍照。

1.2.4 人工感染 取病鱼的脾组织约1 g, 加入9 ml 0.9%的生理盐水, 用玻璃匀浆器在碎冰上匀浆, 然后, 转移组织匀浆液到无菌50 ml离心管中。在-40℃和室温下反复冻融3次后, 4℃3000 r/min离心30 min。取上清液, 经0.22 μm滤膜过滤, 收集到新的50 ml离心管中, 加入10%体积的100×双抗, 充分混匀、备用。健康斑石鲷随机分成3组, 每组10尾, 置于26℃~28℃的海水中养殖。其中, 2组作为感染组, 腹腔注射上述制备的病鱼组织匀浆液, 0.2 ml/尾; 另外1组作为对照组, 腹腔注射无菌生理盐水, 0.2 ml/尾。注射后, 每日观察实验鱼的状况、并做好记录, 持续观察14 d以上。取濒死实验鱼的脾、肾等组织, 一部分同1.2.3制作组织切片, 另一部分提取DNA、检测病毒。

1.2.5 样品DNA提取 取脾、肾、肝等样品提取组织DNA, 用微量核酸测定仪(NanoDrop 2000c, Thermo, 美国)测定DNA浓度和纯度, 稀释至100 ng/μl备用。

1.2.6 PCR检测 依照行业标准《真鲷虹彩病毒病检疫技术规范》(SN/T 1675-2014), 使用引物1-F(5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3')和1-R(5'-G-CACCAACACATCTCCTATC-3')进行PCR检测, 目标扩增产物大小为570 bp。

25 μl PCR 反应体系: 1 μl 模板 DNA, 2.5 μl 10 \times Reaction buffer, 2 μl Mg^{2+} (2 mmol/L), 2 μl dNTPs (各 2.5 mmol/L), 1 μl 引物 1-F (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 引物 1-R (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μl *Taq* 酶 (5 U/ μl), 15 μl 超纯水。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 30 个循环; 最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查结果。

1.2.7 斑石鲷虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的扩增及分析 采用引物 MCP-iridoF (5'-GTGCAGGTTTCC AGAAGA-3') 和 MCP-iridoR (5'-CATGGTACGTAACG CATAG-3') 对虹彩病毒主要衣壳蛋白基因 (Major capsid protein gene, MCP) 全长序列进行扩增, 目标扩增产物为 1.6 Kb (史成银, 2004)。

25 μl PCR 反应体系: 1 μl 模板 DNA, 2.5 μl 10 \times Reaction buffer, 2 μl Mg^{2+} (2 mmol/L), 2 μl dNTPs (各 2.5 mmol/L), 1 μl 引物 MCP-iridoF (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 引物 MCP-iridoR (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μl Ex *Taq* 酶 (5U/ μl), 15 μl 超纯水。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查结果。将阳性扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 用 Blast 比对分析测序结果。从 GenBank 上下载 16 种虹彩病毒分离株的 MCP 基因序列, 连同测序得到的斑石鲷虹彩病毒 MCP 基因序列, 采用 MEGA 7.0 软件进行多序列比对与同源性分析, 构建系统发育树。

2 结果

2.1 现场调查及临床症状检查

2017 年 8 月末, 养殖海域水温为 26 $^{\circ}\text{C}$ ~28 $^{\circ}\text{C}$, 山东省烟台市某养殖场近海网箱养殖的斑石鲷突然发病死亡。起初个别网箱的斑石鲷少量死亡, 但病情进展迅速。第 1 天仅发现死鱼 100 余尾, 第 2 天死鱼便高达 6000 余尾, 1 周内 3 个最早发病网箱中的 30000 尾鱼全部死亡。养殖的 80 万尾幼鱼发病后, 日死亡率为 5%~10%, 2 周内累积死亡率高达 90%~95%, 损失惨重。调查发现, 发病斑石鲷为 4~5 月龄, 全长为 (16.3 \pm 1.6) cm, 体重为 (156.9 \pm 37.0) g, 养殖密度为 10~15 尾/ m^3 水体。病鱼体表无明显损伤, 仅表现为体色发黑, 游动缓慢, 活力明显下降(图 1)。解剖可见, 多数病鱼空胃空肠, 脾、肾严重肿大、易碎; 肝出血, 胆囊充盈。其他组织器官无明显异常。

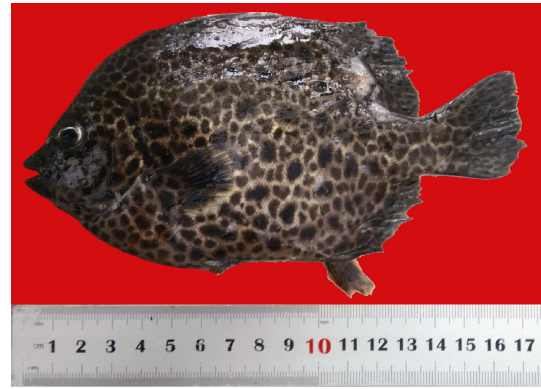


图 1 斑石鲷病鱼

Fig.1 Diseased spotted knifejaw (*O. punctatus*)

2.2 寄生虫检测和细菌分离

经制片和显微观察, 所检斑石鲷病鱼均未观察到寄生虫。将病鱼的肝、肾、脾等内脏病料接种于 2216E 和 TCBS 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 未见细菌生长。

2.3 病理切片观察结果

在石蜡切片中, 可以观察到病鱼脾、肾的造血组织中存在大量嗜碱性的、直径达 20 μm 的肿大细胞, 其细胞核固缩。病鱼肾小管上皮细胞崩解、管腔变大; 肾小球毛细血管内皮细胞肿大(图 2A 和图 2B)。

在病鱼肾组织的超薄切片中, 也观察到许多直径约为 20 μm 的肿大细胞, 其内可见大量的病毒粒子(图 3A)。病毒粒子无囊膜、直径约为 (145 \pm 5) nm, 具有典型的虹彩病毒样结构: 最外层是截面呈六边形的病毒外壳, 最内层为高电子密度的球状核心, 在病毒外壳和核心之间为低电子密度的间隔区(图 3B)。

2.4 人工感染实验结果

养殖水温为 26 $^{\circ}\text{C}$ ~28 $^{\circ}\text{C}$ 时, 用自然发病鱼的脾和肾组织匀浆液腹腔注射感染健康斑石鲷。感染后第 10 天开始死亡, 至 14 d 时, 感染组累积死亡率达 95%, 对照组未发生死亡(图 4)。人工感染病鱼体色变黑、游泳无力, 表现出与自然发病鱼相似的临床症状。人工感染病鱼的脾和肾组织中也可见大量细胞质嗜碱性的肿大细胞, 且其内存在大量典型的类似虹彩病毒的颗粒。人工感染病鱼与自然发病鱼的病理特征相似, 但人工感染病鱼的组织细胞病变更严重。

2.5 PCR 检测结果

依照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 (SN/T 1675-2014), 利用合成的真鲷虹彩病毒特异性

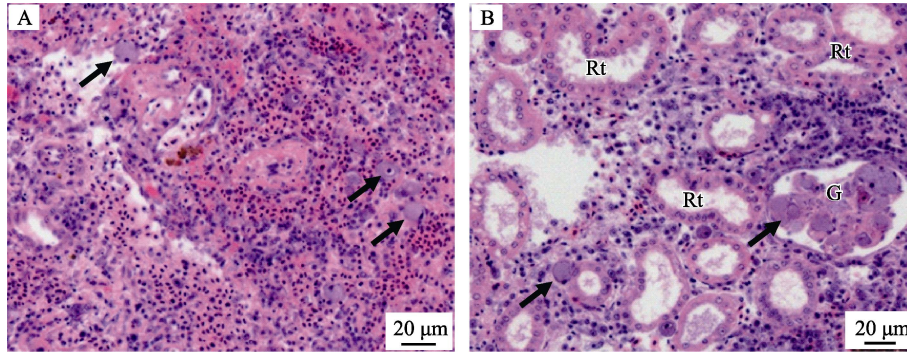


图 2 斑石鲷病鱼的组织病理变化

Fig.2 Histopathological changes in the diseased fish

- A: 脾组织中细胞质嗜碱性的肿大细胞(箭头) ; B: 肾组织中细胞质嗜碱性的肿大细胞(箭头)、肾小管(Rt)和肾小球(G)
- A: Enlarged cells with basophilic cytoplasm (solid arrow) in the spleen tissues;
- B: Enlarged cells with basophilic cytoplasm (solid arrow), renal tubules (Rt) and glomerulus (G) in the kidney tissues

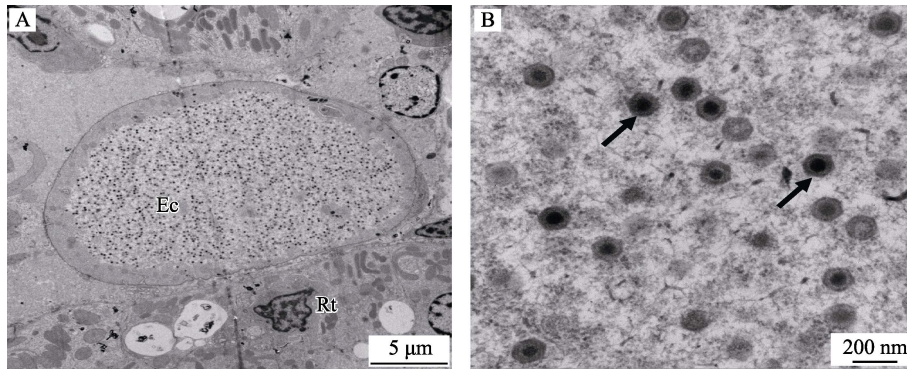


图 3 斑石鲷病鱼肾中的肿大细胞及病毒粒子

Fig.3 Enlarged cell and virions in the kidney tissues of diseased fish

- A: 肾组织中的肿大细胞(Ec)和肾小管(Rt) ; B: 肿大细胞内的病毒粒子(箭头)
- A: Enlarged cell (Ec) and renal tubules (Rt) in the kidney tissues; B: Virions (solid arrow) in the enlarged cell

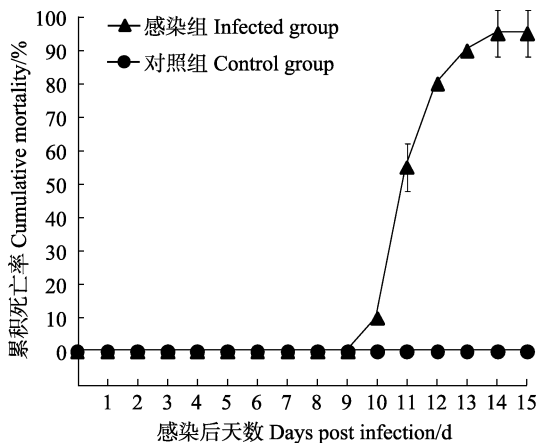


图 4 斑石鲷的人工感染实验

Fig.4 Artificial infection experiment of spotted knifejaw

检测引物, 对所提取的斑石鲷各组织病料 DNA 进行 PCR 检测。4 尾病鱼的肝、脾、肾组织中均能扩增出约 570 bp 的单一一条带, 与目的片段大小相符(图 5)。

上述结果表明, 感染斑石鲷的病毒为真鲷虹彩病毒, 检测结果为强阳性。

2.6 病毒主要衣壳蛋白基因(MCP)的扩增与分析

使用鱼类虹彩病毒特异性引物 MCP-iridoF/MCP-iridoR, 从 4 尾病鱼的肝、脾、肾组织中均扩增得到约 1.6 Kb 的单一一条带, 与目的片段大小相符(图 6)。测序结果显示, 各扩增产物的长度均为 1581 bp, 且序列完全相同。经 Blast 分析, 该序列包含了肿大细胞虹彩病毒 1362 bp 的 MCP 基因开放阅读框(ORF)的全长序列, 及其上游 57 bp 和下游 162 bp 的序列。

将测定的 1362 bp 病毒 MCP 基因 ORF 序列与 GenBank 数据库中 16 种(株)虹彩病毒的相应序列进行比对, 结果发现, 感染斑石鲷的虹彩病毒与虹彩病毒科肿大细胞病毒属的 9 种(株)病毒序列相似度高, 超过 94%; 而与虹彩病毒科其他 4 个病毒属(蛙

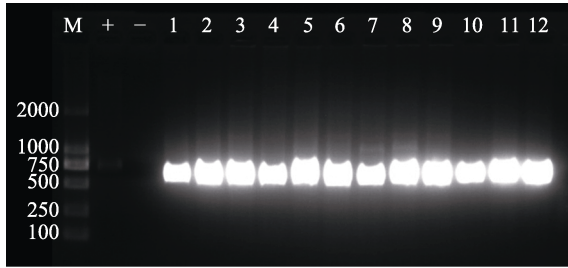


图5 使用真鲷虹彩病毒特异性引物检测斑石鲷病鱼
Fig.5 PCR result of diseased spotted knifejaw using RSIV-specific primers

M: DL2000 DNA Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照;
1~3: 1号病鱼肝、脾、肾; 4~6: 2号病鱼肝、脾、肾;
7~9: 3号病鱼肝、脾、肾; 10~12: 4号病鱼肝、脾、肾
M: DL2000 DNA marker; +: Positive control; -: Negative control;
1~3: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #1; 4~6: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #2; 7~9: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #3; 10~12: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #4

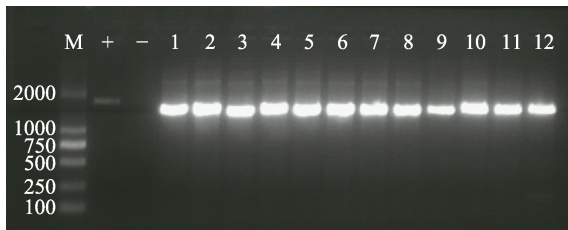


图6 病毒主要衣壳蛋白基因(MCP)的扩增
Fig.6 Amplification of viral major capsid protein gene (MCP)

M: DL2000 DNA Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照;
1~3: 1号病鱼肝、脾、肾; 4~6: 2号病鱼肝、脾、肾;
7~9: 3号病鱼肝、脾、肾; 10~12: 4号病鱼肝、脾、肾
M: DL2000 DNA marker; +: Positive control; -: Negative control;
1~3: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #1; 4~6: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #2; 7~9: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #3; 10~12: Sample from liver, spleen and kidney of diseased fish #4

病毒属、淋巴囊肿病毒属、绿虹彩病毒属和虹彩病毒属)的6种(株)病毒的相似度高, 低于55%。因此, 可以将感染斑石鲷的虹彩病毒鉴定为肿大细胞病毒属虹彩病毒。进一步分析发现, 在肿大细胞病毒属内, 引起此次斑石鲷大规模死亡的病毒与感染真鲷的RSIV RIE12-1、感染条石鲷的RBIV-C1、感染斜带石斑鱼的OSGIV的MCP基因ORF序列100%相同, 与分离自湛江的斑石鲷虹彩病毒的SKIV-ZJ07仅有1个核苷酸不同, 相似度为99.93%。因此, 将引起此次斑石鲷大规模死亡的虹彩病毒鉴定为真鲷虹彩病毒RSIV。依据MCP基因ORF序列的多序列比对结果, 采用

Mega 7软件构建了虹彩病毒科17种(株)病毒的系统发育树。结果显示, 引起此次斑石鲷大规模死亡的虹彩病毒与肿大细胞病毒属各病毒聚在一起, 是RSIV的一个分离株(图7)。

3 讨论

近年来, 肿大细胞虹彩病毒病已成为鱼类最主要的病毒病之一。该属病毒可感染多种海水养殖鱼类, 如真鲷、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、条石鲷、褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)、眼斑拟石首鱼(*Sciaenop socellatus*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、褐龙斑等(Inouye *et al*, 1992; Chen *et al*, 2003; 史成银, 2004; 李华等, 2011; 雷燕等, 2014; 席云清等, 2018; Senapin *et al*, 2019; 刘冉阳等, 2019), 也可感染罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*)、斑鲈(*Siniperca scherzeri*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等淡水鱼类(Subramaniam *et al*, 2016; 吴淑勤等, 1997; Kim *et al*, 2018; Bermúdez *et al*, 2018), 危害巨大。本研究通过疾病流行情况调查、临床症状观察、病原检测、组织病理观察、人工感染实验、分子生物学诊断和系统发育分析, 确定2017年夏季引起养殖斑石鲷暴发性死亡的疾病为肿大细胞虹彩病毒病, 其病原为真鲷虹彩病毒。虽已有从斑石鲷中分离到肿大细胞虹彩病毒的报道(Dong *et al*, 2010), 但本研究首次证实RSIV可以导致斑石鲷大规模发病死亡。

不同种类的鱼感染肿大细胞虹彩病毒病后, 临床症状存在一定的差异。比如, 大黄鱼感染该病后体色发白, 鳃丝极度贫血、发白且溃烂(Chen *et al*, 2003)。眼斑拟石首鱼感染该病后的主要症状为体色变为银黑色, 鳍基出血, 鳃丝贫血并有出血点(席云清等, 2018)。尖吻鲈感染该病后, 出现脱鳞、鳍腐烂、腹部损伤、皮肤发红出血等症状(Senapin *et al*, 2019)。翘嘴鲈感染肿大细胞虹彩病毒后, 鳃、肝苍白, 内脏局部充血(吴淑勤等, 1997)。本研究发现, 斑石鲷感染该病后, 体色变暗、游动无力, 但体表并没有明显的出血或者溃烂等症状, 与大菱鲆感染该病后的症状相似(史成银, 2004)。因此, 仅从外观症状上很难诊断斑石鲷虹彩病毒病, 必须借助于病原检测技术才能对斑石鲷虹彩病毒病进行准确诊断。

组织病理学研究表明, 鱼类肿大细胞虹彩病毒病最重要的特征是脾和肾等靶器官中存在肿大细胞, 肿大细胞内含有大量的虹彩病毒粒子(Inouye *et al*, 1992; 史成银, 2004)。本研究在斑石鲷病鱼的脾和肾组织中

也发现了大量的细胞质嗜碱性的肿大细胞,这些肿大细胞内存在大量直径约为145 nm的虹彩病毒粒子。而且,与自然发病鱼相比,人工感染斑石鲷的脾和肾组

织中存在更多的肿大细胞,组织病变也更严重。疾病调查和人工感染实验都显示,斑石鲷是真鲷虹彩病毒的易感宿主,病鱼的组织病理变化广泛且严重。

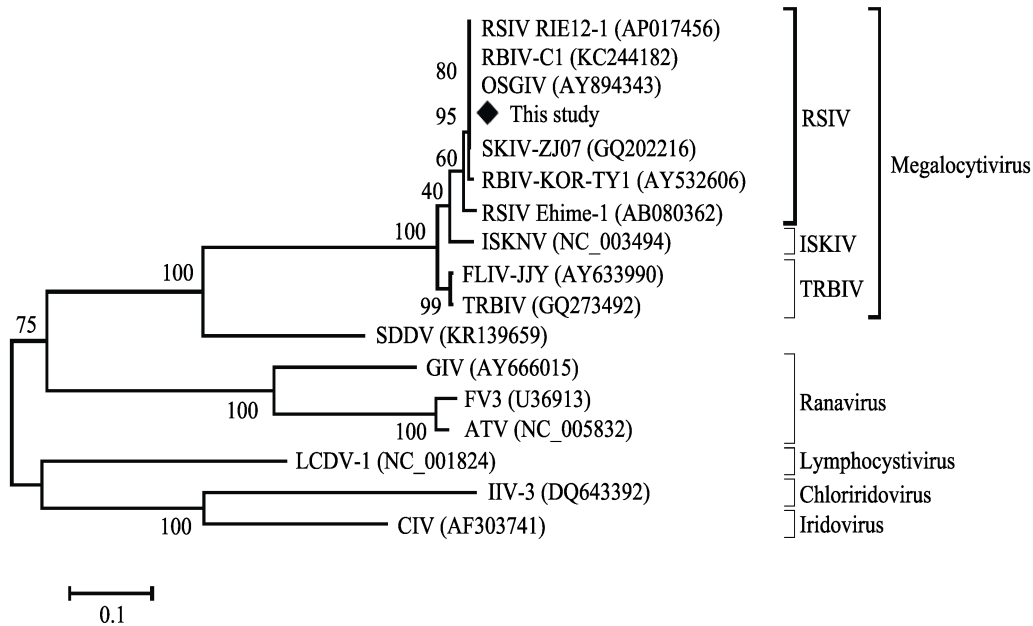


图7 依据MCP基因ORF序列构建的17种(株)虹彩病毒系统发育树

Fig.7 The phylogenetic tree of 17 iridovirus isolates (stains) based on the ORF sequence of MCP gene

本研究通过病毒MCP基因ORF序列的测定和虹彩病毒系统发育分析,将导致此次斑石鲷暴发性死亡的病毒鉴定为真鲷虹彩病毒。值得注意的是,该养殖场的褐龙斑此前曾暴发过真鲷虹彩病毒病(刘冉阳等,2019)。经序列比对发现,感染斑石鲷和褐龙斑的虹彩病毒MCP基因序列100%相同,表明它们是同一种病毒。因此,该养殖场不同品种的养殖鱼类之间很可能存在病原交叉感染。因此,在生产中各养殖车间要严格执行消毒和隔离制度,通过检测、检疫防止病原侵入,采取生物安保措施防范虹彩病毒病的发生和蔓延。

斑石鲷虹彩病毒病一旦暴发就难以控制,幼鱼2周内累积死亡率高达90%以上,危害严重。在斑石鲷的规模化养殖过程中必须对该病高度重视,采取有效措施控制疾病的发生和蔓延。

参 考 文 献

- Bermúdez R, Losada AP, de Azevedo AM, *et al.* First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(8): 1283–1294
- Chen XH, Lin KB, Wang XW. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(10): 615–619
- Dong CF, Weng SP, Luo YW, *et al.* A new marine megalocytophagovirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarinfish, *Siniperca chuatsi*. *Virus Research*, 2010, 147(1): 98–106
- Egusa S, Miyazaki T, Shiomitsu T, *et al.* Epitheliocystis-like disease occurred among hatchery-reared fly of *Oplegnathus punctatus* [in Japanese]. *Fish Pathology*, 1987, 22(1): 33–34
- Fan C, Shi CY, Liu JC. First report and microscopic examination of epitheliocystis in cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) in China. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 177–180 [范超, 史成银, 刘江春. 中国养殖斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)上皮囊肿病的发现及显微观察. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 177–180]
- Fu QJ, Fan C, Xie GS, *et al.* Molecular identification and phylogenetic analysis of a pathogenic dinoflagellate isolated from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(13): 135–140 [付泉洁, 范超, 谢国骊, 等. 斑石鲷卵鞭虫病病原的分子鉴定与系统发育分析. *安徽农业科学*, 2017, 45(13): 135–140]
- Gao XQ, Hong L, Huang B, *et al.* Development of the breeding and rearing technology for *Oplegnathus punctatus*. *Open Journal of Fisheries Research*, 2018, 5(2): 112–122 [高小强, 洪磊, 黄滨, 等. 斑石鲷种苗繁育与养殖技术研究进展. *水产研究*, 2018, 5(2): 112–122]

- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, *et al.* Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1992, 27(1): 19–27
- Jancovich JK, Chinchar VG, Hyatt A, *et al.* Family Iridoviridae. In: King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, *et al.*, eds. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Academic Press, 2012, 193–210
- Kim KI, Hwang SD, Cho MY, *et al.* A natural infection by the red sea bream iridovirus-type *Megalocyttivirus* in the golden mandarin fish *Siniperca scherzeri*. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(11): 1229–1233
- Lei Y, Qi RR, Tang SL, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in spinefoot *Siganus fuscescens*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(3): 236–240 [雷燕, 戚瑞荣, 唐绍林, 等. 褐篮子鱼虹彩病毒病的诊断. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(3): 236–240]
- Li H, Sun ZP, Li Q, *et al.* Characterization of an iridovirus detected in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel). *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(2): 158–164 [李华, 孙志鹏, 李强, 等. 条石鲷检出的虹彩病毒特性研究. *病毒学报*, 2011, 27(2): 158–164]
- Liu RY, Shi CY, Xie GS, *et al.* Histopathology of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) naturally infected with red sea bream iridovirus (RSIV). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 1–11 [刘冉阳, 史成银, 谢国驷, 等. 真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼“褐龙斑”的组织病理分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 103–112]
- OIE. *Aquatic animal health code*, 21st Edition. Paris: OIE, 2018, 249–253
- Senapin S, Dong HT, Meemetta W, *et al.* Mortality from scale drop disease in farmed *Lates calcarifer* in Southeast Asia. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(1): 119–127
- Shi CY. Studies on virial reddish body syndrome of farmed turbot *Scophthalmus maximus* in China. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2004 [史成银. 我国养殖大菱鲆病毒性红体病的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2004]
- Skliris GP, Krondiris JV, Sideris DC, *et al.* Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research*, 2001, 75(1): 59–67
- Subramaniam K, Gotesman M, Smith CE, *et al.* Megalocyttivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 253–258
- Wu SQ, Li XH, Pan HJ, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak-infective disease of *Siniperca chuatsi*. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(Suppl): 56–60 [吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究. *水产学报*, 1997, 21(Suppl): 56–60]
- Xi YQ, Qi RR, Tian JX, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in *Sciaenop socellatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(5): 929–934 [席云清, 戚瑞荣, 田佳鑫, 等. 眼斑拟石首鱼虹彩病毒病的诊断. *水生生物学报*, 2018, 42(5): 929–934]
- Yanagida T, Palenzuela O, Hirae T, *et al.* Myxosporean emaciation disease of cultured red sea bream *Pagrus major* and spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathology*, 2008, 43(1): 45–48

(编辑 马瑾艳)

Red Seabream Iridovirus Causing Mass Mortality in Farmed Spotted Knifejaw, *Oplegnathus punctatus*

WANG Haibo^{1,2}, SHI Chengyin^{1①}, XIE Guosi¹, LIU Ranyang¹, REN Ningxin^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) is a new species of mariculture fish with high economic value in China. In August 2017, an outbreak of unknown etiology occurred in spotted knifejaw juveniles cultured in the offshore cages of a marine fish farm. Investigation showed that the water temperature was 26°C~28°C and that the infected fish were mainly juveniles at the age of 4~5 months. The total length of the diseased fish was (16.3±1.6) cm and their body weight was (156.9±37.0) g. The cumulative mortality of 800000 juveniles was more than 90% within 2 weeks of disease onset. Clinical examination showed that the diseased juveniles had no obvious apparent lesions but had poor vitality and rapid breathing. Necropsy findings included a swollen and brittle spleen, kidney erosion, and hemorrhagic spots in the liver. No parasites were detected, and no pathogenic bacteria were isolated from the liver, spleen, and kidney of the diseased fish. Histopathological sections showed a large number of enlarged cells (about 20 μm in diameter) in the spleen and kidney tissues of diseased fish. In addition, a large number of hexagonal virus particles with a diameter of about 145 nm were observed in the electron microscope sections of the spleen and the body kidney. The spleen homogenate of naturally infected fish was filtered and injected intraperitoneally into healthy fish at a water temperature of 26°C. The fish in the infected group began to die after 10 days post infection (dpi), and the cumulative mortality reached 95% within 14 dpi. Artificially infected fish showed symptoms similar to those in naturally infected fish, and a large number of enlarged cells and similar virus particles could be observed in the spleen and kidney tissue sections. Severe iridovirus infection was detected in the spleen and kidney tissues of naturally and artificially infected fish using specific PCR primers. The major capsid protein gene (*MCP*) of the iridovirus, at 1362 bp in length was cloned and sequenced, and the phylogenetic tree of the family Iridoviridae was constructed. The results showed that the virus belonged to the red sea bream iridovirus (RSIV) of genus *Megalocytivirus* in the family Iridoviridae. Based on the results of epidemiological investigation, clinical symptom observation, etiological detection, histopathological observation, artificial infection experiments, molecular biology diagnosis, and viral phylogenetic analysis, it was confirmed that the disease causing the mass death of spotted knifejaw was *Megalocytivirus* disease, and that the pathogen was a strain of RSIV. This study demonstrates for the first time that RSIV can cause large-scale death in the spotted knifejaw. Furthermore, the research results provide an important reference to diagnose and control viral diseases in the spotted knifejaw.

Key words *Oplegnathus punctatus*; Red sea bream iridovirus (RSIV); *Megalocytivirus*; Phylogenetic tree; Diagnosis

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn