

# 罗湖病毒研究进展

郭建红, 蔡 颖, 吴松浩

(汕头出入境检验检疫局, 广东汕头 515041)

**摘 要:** 2009 年以来, 以色列、厄瓜多尔和埃及等国相继暴发养殖和野生罗非鱼大量死亡事件。直到 2014 年, 才发现其致病病原是新型 RNA 病毒——罗湖病毒。本文介绍了罗湖病毒的几次流行情况及其临床症状, 包括以色列、厄瓜多尔、埃及等国家发生的罗非鱼大量死亡事件, 以及厄瓜多尔养殖罗非鱼死亡事件中的初步病原学研究、罗湖病毒的发现和首次命名、病毒的基因组特征研究、厄瓜多尔死鱼事件的再次研究、埃及罗非鱼检出罗湖病毒阳性等, 并结合该病毒的特点提出了防治建议。

**关键词:** 罗非鱼; 罗湖病毒; 研究进展

中图分类号: Q939.47 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2017) 08-0072-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.08.020

## Research Progress in Tilapia Lake Virus

Guo Jianhong, Cai Ying, Wu Songhao

(Shantou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou, Guangdong 515041)

**Abstract:** Since 2009, episodes of significant mortality of cultured and wild Tilapia were recorded in Israel, Ecuador, Egypt and other countries. Until 2014, it was found that the causative agent was the new RNA virus, Tilapia lake virus (TiLV). Several times of TiLV prevalence and its clinical symptoms were introduced in this paper, including a lot of Tilapia deaths in Israel, Ecuador, Egypt and other countries, preliminary etiological study of dead tilapia in Ecuador, the discovery and first nomenclature of the TiLV, genome characterization of viruses, a re-study of the dead fish incident in Ecuador, Tilapia detected positive for TiLV in Egypt, and so on. The control suggestions were put forward according to the characteristics of the virus.

**Key words:** Tilapia; Tilapia lake virus (TiLV); research progress

罗非鱼是全球重要淡水养殖经济鱼种之一, 可进行高密度养殖, 是动物性蛋白质的重要来源。联合国粮食及农业组织 (FAO) 数据显示, 2012 年全球养殖罗非鱼产量为 456 万吨, 到 2013 年达到 489 万吨, 到 2014 年达到 531 万吨。我国是全球罗非鱼的最大生产国, 2013 年产量 166 万吨; 2014 年产量 155 万吨, 其中出口 41 万吨; 2015 年产量 165 万吨, 其中出口 42 万吨; 2016 年产量保持在 160 多万吨。2013 和 2014 年我国罗非鱼产量分别占据世界总产量的 34% 和 29%。

与其他鱼类比较, 罗非鱼曾经以易养殖和抗病力强著称。然而, 近年来以色列、厄瓜多尔和埃及等国相继暴发的与病毒有关的养殖和野生罗非鱼大量死亡事件, 给这些国家的罗非鱼养殖业造成了

重大损失。经研究发现引起这些死鱼事件的病原均为罗湖病毒 (Tilapia lake virus, TiLV), 是一种新型鱼 RNA 病毒。

### 1 罗湖病毒的流行情况和临床症状

#### 1.1 以色列全国发生罗非鱼大量死亡事件

2009 年夏天, 以色列在全国范围内陆续发生养殖场和野生罗非鱼大量死亡事件。以色列基内雷特湖 (也称为加利利海) 的野生罗非鱼和国内养殖场的养殖罗非鱼突然大量死亡, 死亡率高达 70%。基内雷特湖罗非鱼产量从 2005 年的 316 吨, 下降到 2007 年的 51 吨、2009 年的 8 吨和 2010 年的 45 吨<sup>[1]</sup>。

罗非鱼大量死亡事件发生在天气炎热的 5—10 月期间, 其特点主要有以下三点: 一是病毒扩

散是从一个养殖池到另一个养殖池,波及不同生长期阶段的罗非鱼;二是发病和死亡仅限于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)与奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)杂交产生的罗非鱼品种,与罗非鱼一起养殖的鲤鱼和鲮鱼没有发现与罗非鱼一样的发病症状;三是一次罗非鱼集中死亡之后,同一鱼池不会再有大量鱼死亡的事件发生<sup>[1]</sup>。

病鱼体色发黑,体表有溃烂,眼睛有明显的病变,发病前期晶状体浑浊,后期晶状体破裂发炎,眼睛内容物浓缩,失去正常视觉功能。罗非鱼大量死亡的原因不明,常规的寄生虫监测、细菌监测、病毒监测和毒素监测均未见异常<sup>[1]</sup>。

### 1.2 厄瓜多尔养殖罗非鱼大量死亡事件

2011年,厄瓜多尔发生罗非鱼大量死亡事件。出现罗非鱼大量死亡的养殖场中,本场培育的Chitralada品系罗非鱼苗大量死亡,而从其他养殖场引进的尼罗罗非鱼大部分没有感染。鱼苗转入育成池4~7 d后开始出现死亡。被感染的鱼池中,Chitralada品系罗非鱼存活率仅为20%,而尼罗罗非鱼的存活率达到80%。病鱼一般表现消瘦,体表发黑,腹部膨胀有积水,鱼鳞突出,眼球突出<sup>[2]</sup>。

### 1.3 埃及养殖罗非鱼大量死亡事件

2012—2016年的夏季,埃及当地水温达到25℃以上,罗非鱼主要产区的中、大规模尼罗罗非鱼每年出现不明原因的大量死亡,称为“夏季死鱼事件”,其中2015年损失产量估计约98 000吨(价值1亿美金)。对埃及罗非鱼主产区的68个养殖场进行调查表明,37%的养殖场(25个)发生了“夏季死鱼事件”,平均死亡率为9.2%(死亡率波动区间为5%~15%)。发病率最高的是放养密度高的养殖场和大型养殖场;其次是小型养殖场、鲮鱼和罗非鱼混养(鲮鱼15%和罗非鱼85%);发病率最低的是单品种养殖的养殖场。38个仅养殖罗非鱼的养殖场中,有3个养殖场发病,而30个混养的养殖场中,有22个养殖场发病。病鱼表现体表浅层出血、发炎、水肿等症状<sup>[3]</sup>。

## 2 罗湖病毒研究进展

### 2.1 厄瓜多尔养殖罗非鱼死亡事件中的初步病原

学研究

Ferguson等<sup>[2]</sup>对厄瓜多尔养殖罗非鱼大量死亡事件进行了调查和研究。在2011年5月(气温27℃)、7月(气温25℃)、11月(气温25℃)和2012年5月(气温27℃),采集Chitralada品系病鱼样品进行病理切片结果显示,肝脏和胃肠道为主要病变器官。肝脏坏死、发炎并出现合胞体;胃腺坏死;肠腔中形成蛋白管型;肝细胞质和部分合胞体细胞中,有明亮嗜曙红细胞或棕色脂蛋白样沉积物。这些沉积物从1~2 mm到5~6 mm不等。超微结构观察显示,合胞体有3~4个细胞核以上,多的有15~20个细胞核。胆管虽然邻近肝细胞坏死部分,但大部分没有病变,一些严重病鱼的肝外胰腺也没有病变。在肝病变的情况下,肝细胞和狄氏腔中出现大量病毒样颗粒,颗粒直径60~70 nm。这些病毒样颗粒单个存在或聚集成小团,附着在粗面内质网表面。其细胞质和细胞核中均未发现大的病毒序列或集合。因此,未发现导致罗非鱼死亡率异常增高的原因,根据现有证据只能推测可能是由病毒引起的。虽然发病机理尚不清楚,但从全身水肿和组织病理切片检查结果来看,存在蛋白丢失性肠病。肝的严重病变可能危及血浆蛋白的合成;胃肠道的病变可能导致肠道养分摄取缩减和蛋白丢失,接下来肠道的细菌定植可能导致吸收内毒素。如果鱼感染了急性系统性疾病,尤其是病毒性疾病,胃肠道的严重病变肯定会导致食欲减退。但由于死鱼太小,无法进行血液化学检测,因此无法确定死鱼是否因出现低蛋白血症而导致死亡。由于这是一种新的鱼病,称之为罗非鱼合胞肝炎病毒(Syncytial hepatitis of tilapia, SHT)。

### 2.2 罗湖病毒的发现和首次命名

2014年,Marina Eyngo等<sup>[1]</sup>研究发现,导致以色列罗非鱼大量死亡的病原体是一种新型RNA病毒,同时建立了病毒分离和RT-PCR鉴定方法,但未进行物种分类。由于最早发现该病毒所致死鱼事件的地点为基内雷特湖(Kinneret Lake),将该病毒命名为罗湖病毒(Tilapia lake virus, TiLV)。将发生病变的病鱼器官匀浆,经0.22 μm

滤膜过滤后,分别与8种不同的细胞系进行共孵育,未发现任何已知的病原体,但发现该病毒能引起罗非鱼原代脑细胞或E-11细胞系的细胞病变效应(CPE),分别在共孵育后10~12 d、5~7 d后出现明显的CPE现象。前者表现为细胞由细长变肿胀、变圆,有颗粒形成,后者表现为胞浆空泡、蚀斑形成。在本研究所有不同来源的25个病鱼样品中,均观察到了相同的CPE现象。产生CPE的培养物上清液与正常的健康细胞共孵育,也能出现同样的CPE现象。电子显微镜显示,病毒有包膜,直径为55~75 nm。病理学检查发现,病鱼出现失去活力、视觉变化和皮肤腐蚀等典型症状,死亡率超过80%。内脏(肾和脑)出现充血的组织变化,伴随胶质灶和大脑皮质层淋巴细胞血管周围聚集。眼部发炎,包括眼内炎和晶体白内障化。肝脾细胞的直接损伤似乎不明显,肝实质偶有出现随机分布的细胞肿胀、澄清,胞质内出现黄色至棕色的颗粒状色素;脾增生,椭圆体周围出现增生的淋巴细胞,但肝脾中黑色素巨噬细胞中心(MMCs)数量增多、体积变大,表明病鱼处于严重感染后期的慢性感染阶段。给健康罗非鱼腹腔注射出现CPE的细胞培养物的上清液,会导致出现类似自然染病的症状。这些出现症状的病鱼中,又能再次分离到TiLV,也能再次感染健康鱼,符合科赫法则,证明了本研究分离的TiLV确为死鱼事件的病原体。健康鱼腹腔注射,10 d内的死亡率为75%~85%。当病鱼与健康鱼混养时,健康鱼也出现同样的疫病,死亡率与腹腔注射的类似,但死亡率动力学略有延迟,证明疾病可以通过水源性传播。感染疾病后幸存的鱼,对TiLV具有免疫力,表明产生了保护性的免疫应答。通过cDNA筛选文库法确定了TiLV(克隆7450)特异性序列(GenBank索引号KJ605629),长1 326 bp,其中包含1个编码420个氨基酸的开放读码框,在GenBank的核酸序列和蛋白质序列数据库中均未发现同源性序列,建立了RT-PCR诊断测试方法。

### 2.3 TiLV的基因组特征研究

2016年,Eran Bacharach等<sup>[4]</sup>采用无偏倚高

通量测序、Northern杂交、质谱分析、原位杂交、感染性研究等方法发现,导致以色列罗非鱼大量死亡的TiLV是正粘病毒样病毒,为RNA单股负链病毒,由10个独特的基因片段组成,各片段大小分别为1.641 kb、1.471 kb、1.371 kb、1.250 kb、1.099 kb、1.044 kb、0.777 kb、0.657 kb、0.548 kb和0.465 kb。最大的第1片段包含1个开放阅读框,与C型流感病毒PB1有弱同源性。其他9个片段在GenBank中未发现与任何核酸、蛋白同源序列。10个片段中,在5'和3'末端均发现有长度为13个核苷酸的保守序列,与流感病毒、ISA病毒、瑟高特病毒等正粘病毒的基因结构特征一致,其中有10个核苷酸为100%保守,另外3个核苷酸在5、9片段上完全一致,而且5'和3'末端的序列呈现互补的特点。质谱分析显示,片段2~10中均含有开放读码框(ORFs),编码多肽,而片段1中则未检测到多肽编码序列,片段5、6均含有信号肽间隙位点。高通量测序和序列分析显示,厄瓜多尔死鱼事件中检出的TiLV PCR阳性样品与以色列样品中获得的核酸序列有97.20%~99.00%相同,相应编码区对应的氨基酸序列有98.7%~100%相同。原位杂交显示,TiLV在发病罗非鱼的肝和中央神经系统的病变部位复制和转录。从以色列和厄瓜多尔死鱼事件中病鱼的肝、脑病灶中均发现病毒核酸,同时观察到由病鱼组织分离到的TiLV在培养细胞中繁殖后,接种到健康鱼体内后,可产生相同症状的疾病,提示TiLV为以色列和厄瓜多尔死鱼事件的病因。地理上分散的2个地方均出现由TiLV导致的大规模死鱼事件,说明该病毒已经对罗非鱼养殖业造成了全球性威胁。

### 2.4 厄瓜多尔死鱼事件的再次研究

2016年,del-Pozo等在前期的“罗非鱼合胞肝炎”相关病毒报道描述其临床表现、组织病理学和超微结构变化的基础上,采用透射电镜、RT-PCR技术对该病毒开展进一步研究。透射电镜发现,该病毒特征与以前报道的TiLV相似,而且具有一些与正粘病毒类似的特征:胞内外均有60~100 nm带3层衣壳的圆形病毒子,组成多达7



个电子致密的聚合体;有体现内吞作用的折叠状、绒毛状的病毒子。但合胞形成以及出现的胞质内游离病毒子等特征,却是流感病毒和ISA(传染性鲑鱼贫血病)病毒等正粘病毒所不具备。另外,其病毒子出现在肝细胞,不出现在内皮细胞的嗜组织特性,与流感病毒和ISA病毒不同。因此,推断该病毒应该是新型的正粘病毒,但仍需要进行基因组测序,以明确其分类学地位。RT-PCR结果显示,此病毒与此前报道的TiLV有部分基因同源性(190 nt),另有其他相关研究也证明了其同源性。虽然,SHT相关病毒与TiLV的嗜组织特性、病鱼外观表现、组织病理学特征、发病进程等方面表现出差异,但由于2种病毒的基因同源性已经证实,因此它们之间的关系还需进一步深入研究。另外,病毒分离、传播、复制、致病机理等是下一步需要研究的问题。

### 2.5 埃及罗非鱼检出TiLV阳性

许多专家对被成为“夏季死鱼事件”的疾病进行了研究,试图找出病原体,但都没有结论。曾有研究表明,埃及养殖罗非鱼大量死亡可能与维罗纳气单胞菌温和型变种有关,但未证实为主要原因。

2017年,Mohamed Fathi等<sup>[3]</sup>发现,对7个发生“夏季死鱼事件”的埃及养殖场采集的样品,采用RT-PCR方法进行TiLV检测,其中3个样品阳性,这是在埃及第1次检测到TiLV。TiLV序列分析显示,其与以色列发现的TiLV基因序列存在93%的同源性。组织病理学研究显示,PCR阳性病鱼出现多病灶的神经胶质细胞增生、脑炎和轻度的脑部血管周围淋巴细胞套状聚集、轻度脑膜炎、轻度血管周围多病灶慢性肝炎、肾脏多病灶间质出血、表皮中度断裂、表面出血、炎症和水肿。该项研究未从样品中分离出病毒。Mohamed Fathi等认为,仍需要在流行病学和实验感染等方面进一步研究,以证实TiLV是否是“夏季死鱼事件”的主要病因。

### 3 总结和展望

经过多年的不懈研究,科学家们确定以色列、厄瓜多尔和埃及等国相继暴发的养殖和野生罗非鱼大量死亡事件,其病原均为一种新型的单链RNA

病毒,并以其最早发现地基内雷特湖(Kinneret Lake)来命名,称为罗湖病毒(TiLV)。以色列和埃及两国相邻,但另一个地理上相隔甚远的南美国家厄瓜多尔也发生了由同种病毒引起死鱼事件,说明该病毒已经对全球性罗非鱼养殖业造成了威胁。为了减少损失,考虑到不同种的罗非鱼对TiLV的易感性不同,可以在养殖品种方面进行选择,避免养殖易感品种。另外,养殖场要加强生物防治措施,要实施到位,还要加强鱼苗检疫监测,加强鱼场管理和消毒。部分罗非鱼在感染TiLV后能存活下来,说明存在针对病原的免疫应答,应尽快研制出TiLV疫苗。

### 参考文献:

- [1] EYNGOR M, ZAMOSTIANO R, TSOFACK J E K, et al. Identification of a novel RNA virus lethal to Tilapia[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52 (12): 4137-4146.
- [2] FERGUSON H W, KABUUSU R, BELTRAN S, et al. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*: a case report[J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 37 (6): 583-589.
- [3] FATHI M, DICKSON C, DICKSON M, et al. Identification of Tilapia lake virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome[J]. Aquaculture, 2017, 473: 430-432.
- [4] BACHARACH E, MISHRA N, BRIESE T, et al. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of Tilapia[J]. Mbio, 2016, 7 (2): e00431.

(责任编辑:杜宪)