

池塘养殖患病泥鳅两种病毒病原的电镜观察初报

刘文枝, 范玉顶, 江南, 赵建青, 周勇, 曾令兵
(中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223)

摘要: 利用电子显微镜技术, 对湖北荆州池塘养殖患病泥鳅的组织进行超薄切片电镜观察。电镜观察结果显示: 在患病泥鳅的脾脏、肾脏、心脏及肠道组织中观察到大量球形和杆状两种形态的病毒颗粒。球形病毒颗粒无囊膜, 直径约 50~75 nm; 杆状病毒颗粒有囊膜, 形态多样, 大小约为(50~100) nm × (300~500) nm; 细胞培养分离病毒结果显示, 球状病毒可在鲫鱼脑组织细胞系(GiCB)中增殖, 可导致细胞出现典型的细胞病变效应(CPE, cytopathic effect), 但没有观察到 GiCB 细胞中杆状病毒的增殖。

关键词: 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*); 病毒病原; 电镜观察; 细胞培养

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2018)03-0068-04

DOI:10.13721/j.cnki.dsyy.2018.03.010

A preliminary observation of two viral pathogens in diseased pond-cultured loach(*Misgurnus anguillicaudatus*) by transmission electronic microscopy

LIU Wen-zhi, FAN Yu-ding, JIANG Nan, ZHAO Jian-qing, ZHOU Yong, ZENG Ling-bing
(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Wuhan 430223, China)

Abstract: A serious disease was occurred in the pond-cultured loach(*Misgurnus anguillicaudatus*) with high mortality in Jinzhou, Hubei, China. To figure the pathogen, the tissues of the diseased loach were sliced and subjected to transmission electron microscopy observation. The results showed that a number of spherical and rod-like viral particles were observed in the spleen, kidney, heart and gut tissue of the diseased loach. The spherical viral particles were non-enveloped, with a diameter of 50-75nm; While the rod-like viral particles were enveloped with a variety of shapes, and were about 50-100nm in diameter and about 300-500nm in length. Furthermore, the filtrates of the infected tissues were inoculated in gibel carp brain cells(GiCB). The results showed that the spherical virus could propagate and caused typical cytopathic effects(CPE) in GiCB cells. By contrast, the rod-like virus could not propagate in these cells.

Key words: loach(*Misgurnus anguillicaudatus*); viral pathogens; electron microscopy observation; cell culture

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)因其食性杂、适应能力与抗病力强、生长速度快以及药用、营养及经济价值高等优点,深受广大养殖者和消费者喜爱,已成为广泛养殖的一种淡水鱼特色养殖品种^[1-2]。近年来,随着市场的需求量不断增加,泥鳅的人工养殖范围和规模也在不断扩大,养殖集约化程度不断提高。在泥鳅高密度、集约化养殖过程中,疾病成为制约其产业发展的突出问题之一。然而,目前有关其病害研究的报道相对较少,仅有的少量文献主要集中于细菌、真菌和寄生虫病^[3-5]。

2016年10月份,湖北省荆州市某泥鳅养殖场发生泥鳅暴发性死亡,发病水温24~26℃,发病率约60%,死亡率高达80%,抗生素药物治疗无效。本试验对患病泥鳅组织样本进行了电镜观察和细胞培养分离病毒初步研究,旨在为深入研究泥鳅疾病的病原学 and 有效地进行疾病防控提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

患病泥鳅采集自湖北省荆州市某泥鳅养殖场,

收稿日期: 2017-10-11; 修订日期: 2018-03-07

资助项目: 湖北省科技支撑计划项目(2015BBA234); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-45-16); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2007HY-2D1005)

第一作者简介: 刘文枝(1990-),女,助理研究员,从事水生动物病害防治研究。E-mail: liuwenzhialisa@yfi.ac.cn

通讯作者: 曾令兵。E-mail: zlb@yfi.ac.cn

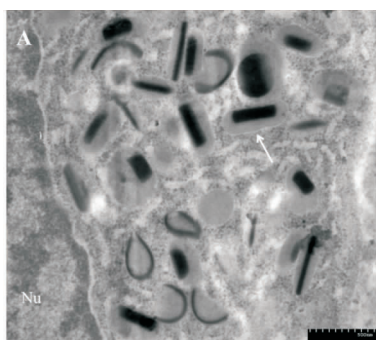
患病泥鳅体长为 10 ~ 15 cm, 体重为 15 ~ 25 g。选取濒死的患病泥鳅置于解剖盘中, 解剖并迅速剪取肝、脾、肾、肠、心、脑等组织器官, 将各组织块放入适量的 2.5% 戊二醛溶液中固定, 用于电镜观察。此外, 采集患病泥鳅的脾脏和肾脏组织。病料剪碎, 按照 1:10 加入 PBS, 匀浆, 冻融 3 次, 4 °C 5 000 r/min 离心 30 min, 收取上清, 过滤除菌, 作为病毒分离培养用样品。

1.2 电子显微镜切片的制备与观察

将电镜固定液中的组织块在 4 °C 条件下固定 12 h, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min, 随后用体积分数为 1% 的锇酸固定 1.5 h。组织块用磷酸缓冲液冲洗 2 次后置于梯度乙醇中脱水, 再用 Epon812 包埋剂包埋。使用 Leica UC7 超薄切片机进行超薄切片 (Germany), 将切片置于铜网上用体积分数为 2% 的醋酸双氧铀和柠檬酸铅联合染色后, 用透射电子显微镜观察 (Hitachi - 7650, Japan)。

1.3 细胞培养分离病毒

利用鲤鱼上皮瘤细胞 (EPC)、草鱼肾脏细胞 (CIK)、斑点叉尾鲷肾脏细胞 (CCK)、鲫鱼脑组织细胞 (GiCB) 和草鱼性腺细胞 (GCO) 等细胞系, 接种患病泥鳅组织匀浆超微过滤液 (0.22 μm), 经传代培养, 观察细胞病变情况。



2 结果与分析

2.1 临床症状

患病泥鳅腹部朝上漂浮于水面 (图1A), 腹部、体侧及下颌基部有出血点 (图1B); 解剖发现病鱼脾脏充血肿大, 胆囊肿大, 肾脏弥散性坏死。

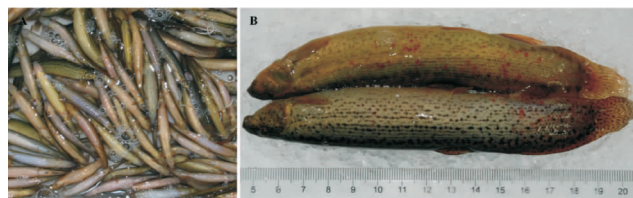


图1 患病泥鳅临床症状

Fig. 1 Clinical signs of diseased loach

2.2 电镜观察

对患病泥鳅的肝、脾、肾、肠、心、脑等组织进行超薄切片并在透射显微镜下观察, 在脾、肾、心等组织内观察到有两种形状的病毒颗粒存在, 患病组织中细胞严重坏死, 细胞核固缩或染色质边缘化。杆状的病毒颗粒外包被有囊膜, 病毒的形态多样, 但主要呈杆状, 直径约 50 ~ 100 nm, 长度约 300 ~ 500 nm (图2)。球形病毒颗粒无囊膜, 直径约 50 ~ 75 nm (图3); 两种病毒粒子分布在宿主细胞的细胞质中。

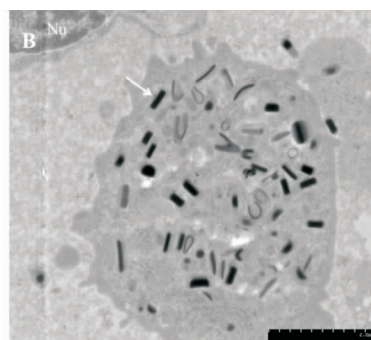


图2 患病泥鳅脾脏和脾脏组织杆状病毒电镜观察

Fig. 2 Rod-like viral particles were revealed by transmission electron microscopy in the spleen and kidney of diseased loach (A: 患病泥鳅脾脏中杆状病毒, 标尺: 200 nm 1.0 μm; B: 患病泥鳅肾脏中杆状病毒, 标尺: 2.0 μm; Nu: 细胞核; 箭头: 病毒颗粒)

2.3 细胞培养分离病毒

患病泥鳅内脏组织匀浆超微过滤液分别接种 EPC、CIK、CCK、GiCB 和 GCO 细胞, 观察细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE)。其中 EPC、CIK、CCK 和 GCO 细胞的病毒原代培养或盲传培养均未观察到细胞病变效应, 超薄切片电镜观察也

未见到病毒粒子存在。而使用患病泥鳅组织匀浆超微过滤液接种 GiCB 细胞, 可观察到细胞收缩成团、折光度增加, 出现典型细胞病变效应; 将病变的细胞培养物盲传 3 代仍可出现稳定的细胞病变现象, 接种细胞 48 h 后细胞单层出现脱落, 呈现出典型 CPE 现象 (图4)。超薄切片电镜观察可见球状

的病毒粒子存在于细胞质中，病毒颗粒直径约为50~75 nm(图5)。细胞培养分离病毒超薄切片电

镜观察尚未观察到杆状病毒颗粒。

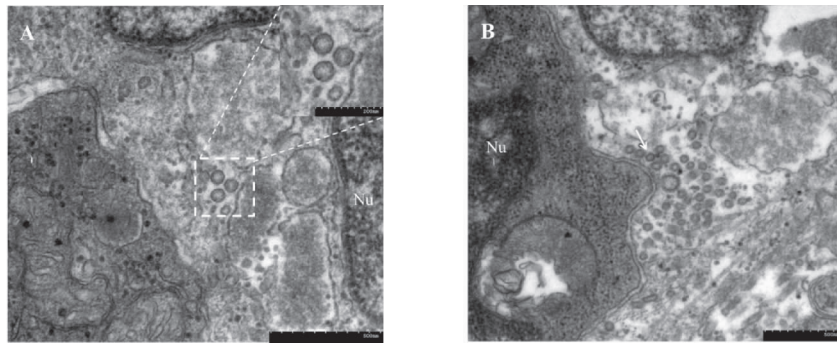


图3 患病泥鳅脾脏和肾脏组织球状病毒电镜观察

Fig. 3 Spherical viral particles were revealed by transmission electron microscopy in the spleen and kidney of diseased loach

(A: 患病泥鳅脾脏中球状病毒, 标尺: 500 nm;

B: 患病泥鳅肾脏中球状病毒, 标尺: 500 nm; Nu: 细胞核; 箭头: 病毒颗粒)

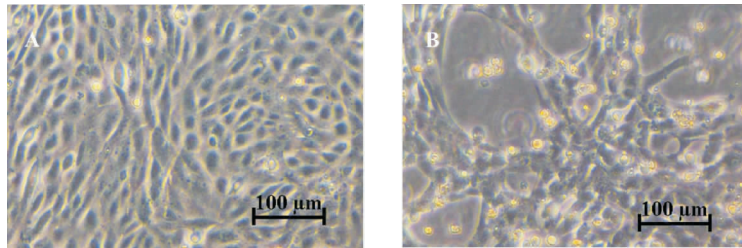


图4 病毒培养物感染 GiCB 细胞后的细胞病变效应

Fig. 4 Cytopathic effects (CPE) of GiCB cells inoculated with the filtrates of the diseased loach tissues.

A: 正常的 GiCB 细胞; B: 病毒培养物感染 GiCB 细胞产生的细胞病变效应。

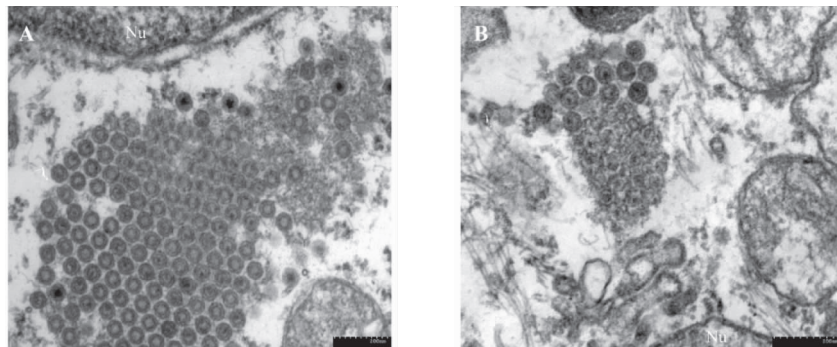


图5 GiCB 细胞中球状病毒颗粒的电镜观察

Fig. 5 Spherical viral particles were revealed by transmission electron microscopy in the GiCB cells

A、B: GiCB 细胞中球状病毒颗粒的电镜观察(标尺: 200 nm)。

3 讨论

目前国内外对泥鳅疾病的研究主要集中在细菌、真菌和寄生虫等病原方面^[6-8]。Zhu 等^[3]从体表患有溃疡的泥鳅体内分离到温和气单胞菌; Qin 等^[4]从患病泥鳅体内分离到希瓦氏菌(*Shewanella* sp.) 和利斯顿菌(*Listonella* sp.)，患病泥鳅的临

床症状主要表现为病鱼嗜睡，食欲不振，体色变黑，全身水肿和腹部的皮肤充血；晏有水等^[5]报道称，在人工养殖泥鳅过程中还会出现水霉病、烂鳃病、赤皮病、赤鳍病和肠炎病以及主要寄生虫病为小瓜虫病和车轮虫病。日本学者 Chowdhury 等^[9]报道了从体表患有溃疡泥鳅的体内分离到柱状黄杆菌，溃疡部位由最初的白色逐渐向黄色过渡。从临

床症状上看, 患病泥鳅大多数表现出活力下降、摄食减弱、烂鳃、溃疡、水肿、充血和发炎等症状。本研究中患病泥鳅体表有明显出血点, 尤其是腹部朝上漂浮于水面症状突出, 但体表溃疡症状不明显, 腹腔内无腹水, 脾、肾、胆囊等器官出现严重病变。本研究中笔者也开展了细菌分离鉴定研究, 但未分离到以上所报道的细菌病原, 也未观察到真菌或寄生虫病原。

泥鳅病毒性疾病的报道很少。1993年, 台湾学者 Chou 等^[10] 在患病的泥鳅体内分离到双 RNA 病毒, 经鉴定该病原与水生动物的传染性胰腺坏死病毒(IPNV) 相近。2016年, Pospichal 等^[11] 的研究结果显示, 锦鲤疱疹病毒(KHV) 不仅能够感染鲤科鱼类, 而且能够感染石鳅。石鳅可作为携带体可以携带该病毒, 但是缺乏病毒超微结构电镜观察结果。国内有关泥鳅病毒病的研究尚属空白。本研究在患病泥鳅的脾脏、肾脏、心脏及肠组织中首次观察到了球形和杆状两种形态的病毒颗粒, 根据病毒形态、大小及存在形式等特征, 推测球形病毒颗粒与鱼类呼肠孤病毒相似, 杆状的病毒颗粒与感染节肢动物杆状病毒类型中核型多角体病毒相似, 但这两种病毒的分类地位亟待深入研究。本研究通过细胞培养技术试图分离培养从患病泥鳅体内观察到的两种形态病毒病原, 结果发现, 球形病毒可引起鲫脑组织细胞(GiCB) 病变, 且可连续传代培养, 但未分离到杆状病毒, 暗示实验中所使用的细胞系对于杆状病毒不敏感, 迫切需要建立与筛选该形态病毒的敏感细胞系。由于患病泥鳅存在两种形态病毒颗粒共感染的现象, 因此只有将混合感染的两种病原分离培养与纯化后, 才能研究其致病力, 从而鉴别主要致病病原。此外, 根据本研究的初步结果, 建议泥鳅养殖生产中对于病毒性疾病应以预防为

主, 控制养殖密度和池塘底泥环境, 并及时采取有效的消毒措施杀灭病原体, 投喂可能增强机体免疫力的免疫促进剂和天然抗病毒植物药物, 以降低养殖泥鳅病毒性疾病的发生率。

参考文献:

- [1] 李楠, 江森, 姜智飞, 等. 泥鳅的养殖技术研究进展[J]. 河北渔业, 2016, (3): 58-60.
- [2] 闫增辉, 雷帅. 泥鳅习性及其人工繁殖[J]. 农村科学实验, 2011, (12): 56-57.
- [3] Zhu M, Wang X R, Li J, et al. Identification and virulence properties of *Aeromonas veronii* sobria isolates causing an ulcerative syndrome of loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. J Fish Dis, 2016, 39(6): 777-781.
- [4] Qin L, Zhu M, Xu J. First report of *Shewanella* sp. and *Listonella* sp. infection in freshwater cultured loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Aquacult Res, 2014, 45(4): 1-7.
- [5] 晏有水, 曹烈, 叶本祥, 等. 台湾泥鳅池塘养殖病害防治措施[J]. 渔业致富指南, 2016, 20: 49-51.
- [6] 雷燕. 体表红点症泥鳅分离出迟缓爱德华氏菌一例[J]. 水产前言, 2016, (6): 83
- [7] 顾英娜. 泥鳅寄生虫病及真菌性疾病的综合防治方法[J]. 农民致富之友, 2015, (5): 101
- [8] 李义, 何沅滨, 陈亚军, 等. 泥鳅病害种类调查与新疾病防治技术[J]. 科学养鱼, 2014, (7): 61-63
- [9] Chowdhury M B R, Wakabayashi H. A study on *Flexibacter columnaris* infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Bleeker, Günther) [J]. J Fish Dis, 1991, 14(3): 389-394.
- [10] Chou H Y, Lo C F, Tung M C, et al. The general characteristics of a bivirus isolated from cultured loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Taiwan. [J]. Fish Pathol, 1993, 28(1): 1-7.
- [11] Pospichal A, Piackova V, Pokorova D, et al. Susceptibility of stone loach (*Barbatula barbatula*) and hybrids between sterlet (*Acipenser ruthenus*) and beluga (*Huso huso*) to cyprinid herpesvirus 3. [J]. Vet Med, 2016, 61(5): 249-255.