



華夏英才基金學術文庫

宋振榮 著

by Song Zhenrong

水产动物病理学研究

Research on Pathology of Aquatic Animals



廈門大學出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

國家一級出版社
全國百佳圖書出版單位



華夏英才基金學術文庫

水产动物病理学研究

Research on Pathology of Aquatic Animals

宋振荣 著

by Song Zhenrong



廈門大學出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

水产动物病理学研究/宋振荣著. —厦门:厦门大学出版社,2011.1
ISBN 978-7-5615-3786-2

I. ①水… II. ①宋… III. ①水产动物-病理学 IV. ①S94

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 010764 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门市软件园二期望海路 39 号 邮编:361008)

<http://www.xmupress.com>

xmup@public.xm.fj.cn

厦门集大印刷厂印刷

2011 年 1 月第 1 版 2011 年 1 月第 1 次印刷

开本:889×1194 1/16 印张:7

字数:250 千字

定价:50.00 元

本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换

著者简介：集美大学水产学院教授、硕士生导师；1982年毕业于上海海洋大学（原上海水产学院）；1988.10—1989.10、1992.10—1994.3二次作为国家公派访问学者赴日本长崎大学水产学部开展水产动物病理学研究；1994.4—1997.10自费攻读博士课程，以《海水鱼病毒性神经坏死症的病理学研究》论文获得日本长崎大学博士学位；1997年底归国后，主要从事水产动物种苗、养殖及其病害研究；在水产动物病毒学、病理学研究具有较高的造诣；主持二项福建省科技厅重点科技攻关项目，均已通过专家成果鉴定，均获得国内领先水平；获得一项省科技三等奖、一项省教育厅教学成果一等奖、二项厦门市科技进步三等奖、集美大学教学名师和五次优秀教师；在国内外学术刊物发表多篇研究论文；2004年指导学生参加全国大学生挑战杯比赛获得金奖导师称号；2009年出版《水产动物病理学》编著。

受聘于福建省海洋与渔业厅专家、福建省水产学会病害防治委员会副主任、中国水产学会资深会员、厦门水产学会副理事长、福建省留学生同学会理事、留日分会理事。

兼任集美区政协副主席、中国致公党厦门市委常委会、集美大学总支主委。

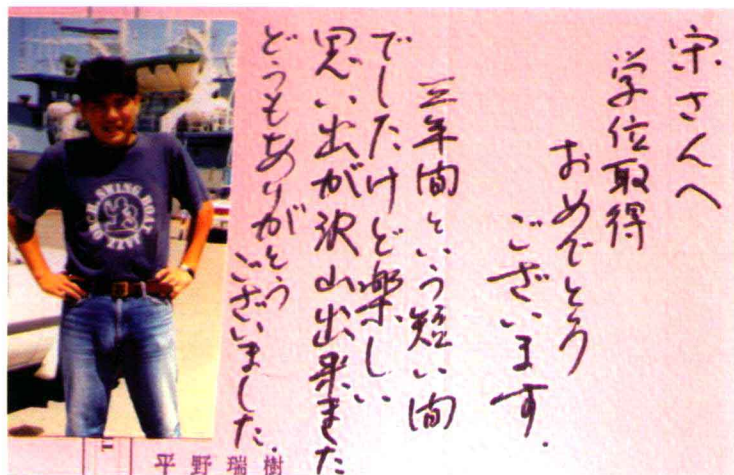


- | | | |
|---|---|--|
| ① | ② | ①为硕士生讲授《电子显微镜技术》课程。 |
| | ③ | ②1996年与长崎大学水产学部病害研究室师生在一起。 |
| ④ | | ③1999年参加中日韩海洋水产资源培育专家研讨会。 |
| | | ④2004年指导集美大学本科生参加全国大学生创业杯比赛，获得金奖导师的殊荣。 |



①	②
③	④
⑤	

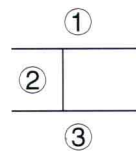
- ①与博士论文导师一吉越一马教授在一起。
- ②拜访日本水产专家副岛康治先生家留影。
- ③为日本水产专家松清惠一先生作学术讲座翻译。
- ④为长崎中国总领事馆总领事与长崎大学槌本、石原教授当翻译。
- ⑤长崎市水产中心进修时与中心主任留影。



- ① 获得博士学位后日本学生制作的留念卡片。
- ② 深入基础进行海区吊养鲍的调查。
- ③ 深入基层为广大沿海渔民排忧解难。
- ④ 带领学生参加水产资源恢复的放流活动。

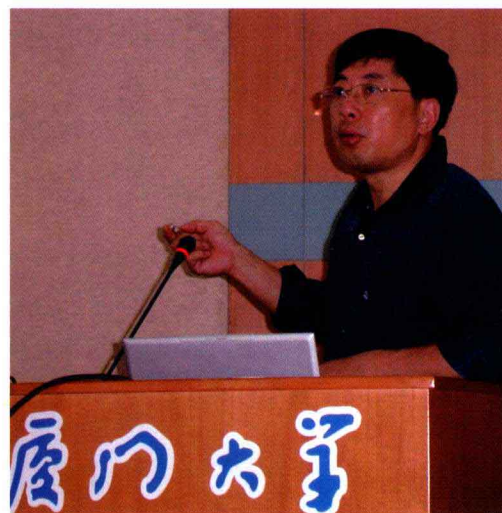


①	
③	②
④	

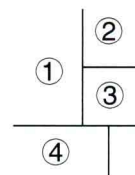


- ①与回国后所主持的首项福建省科技厅课题组的成员一起分享成功的喜悦。
- ②深入基层进行水产病害现场调查。
- ③为水产专家作福建省科技厅项目成果介绍。





- ①2004年指导集美大学本科学子参加全国大学生“挑战杯”比赛获得金奖导师。
- ②赴日讲学时与日本长崎市水产部长交流水产技术。
- ③在厦门大学讲坛上做学术报告。
- ④参加2002年世界水产养殖大会。





- | | | |
|---|---|---|
| | ① | |
| ② | | ③ |
| | | |
| | ④ | |

- ①2010年赴日演讲与长崎副市长和长崎大学水产学部长在一起。
- ②2010年应日本长崎市长邀请，在水产技术研讨会发表《福建省鲍种苗、养殖及其疾病研究》报告。
- ③支持著者成功的后勤部——温馨的家庭。
- ④主持《鲍健康苗种生产及其养殖技术的研究开发》项目获2006年福建省科学技术三等奖。



前 言

我国内陆水域面积,包括湖泊、池塘、水库和江河等,共有1 747万公顷;海岸线总长度3.2万公里;可供海水养殖面积260万公顷。因此我国的水产资源丰富,水产养殖品种繁多,渔业产量已连续多年名列世界前茅,堪称世界水产大国。目前国家提倡渔业捕捞量的“零增长”是保护渔业资源重要措施之一,应运而生的水产养殖业不断发展。目前水产养殖业渔获量已占据我国渔获总量的60%以上。但由于水产种苗生产和养殖过程中发生的疾病造成水产养殖业的经济损失额巨大,近年来每年都达到100多亿元,直接影响了广大水产养殖业者的经济收益和严重地制约了我国水产养殖业的持续发展。其主要原因有:水产养殖疾病多发、养殖技术欠发达、水产品品质有待提高、基础研究不够深入等,尤其是水产种苗生产及其养殖过程的疾病防控技术,已成为目前影响我国水产养殖业可持续发展的瓶颈。因此目前我国仍不能称为世界的水产强国。开展水产经济动物的组织病理学研究,可为水产动物疾病的正确诊断提供可靠的科学依据,从而有利于水产动物疾病的防治。

著者1982年毕业于上海水产大学,至今在集美大学水产学院从事水产高等教育和进行水产动物种苗、养殖及其病害研究。其间二度留学日本,长期深入日本的水产种苗生产中心和网箱养殖现场,参与了日本鱼、虾、蟹、贝类的水产研究。在从师于日本长崎大学吉越一马教授后,开展海水鱼类病毒性神经坏死症的病理学研究,获得博士学位,深刻领会了开展水产动物组织病理学研究,对水产动物疾病的科学诊断和防治技术具有重要的指导意义。

水产动物组织病理学研究是通过对水产动物细胞和组织形态病理变化的观察,了解病原体的侵入、感染和对细胞组织器官的损伤和破坏,分析其发病的机理,为防病治病提供临床诊断的科学依据。著者归国后首次开设了我国水产高校的水产动物病理学本科和研究生课程,十三年来著者经常深入福建省水产基层,解决水产动物养殖的疑难杂症,总结了一定的经验。撰写本书,以期为我国水产动物疾病诊断提供科学参考依据是著者的初衷。

谨此,感谢集美大学统战部、福建省统战部、中央统战部、华夏英才基金管理委员会、集美大学、福建省厦门市集美区统战部和科技局对本专著出版的支持!

著者 宋作康

2010年11月18日

目 录

第一章 主要经济鱼类疾病的组织病理学研究	(1)
第一节 海水鱼类病毒性神经坏死症的组织病理学研究	(1)
第二节 海水鱼类虹彩病毒的组织病理学研究	(29)
第三节 南方水域养殖鲟鱼疾病的组织病理学研究	(34)
第四节 大黄鱼疾病的组织病理学研究	(47)
第五节 其他鱼类疾病的组织病理学研究	(53)
第二章 虾蟹类疾病的组织病理学研究	(60)
第一节 锯缘青蟹肌肉组织坏死的病理研究	(60)
第二节 拟穴青蟹受精卵离体培育技术研究	(63)
第三章 贝类疾病的组织病理学研究	(68)
第一节 鲍主要脏器的组织学观察	(68)
第二节 九孔鲍的病毒性疾病研究	(72)
第三节 九孔鲍畸形担轮幼体形态与组织学研究	(75)
第四节 九孔鲍苗“脱板症”及其防治技术的研究	(79)
第五节 盘鲍裂壳症的初步研究	(82)
第六节 罗源湾海区养殖鲍鱼死亡原因调查	(82)
第四章 病理组织学研究的基本方法	(90)
第一节 材料的采集	(90)
第二节 固定与固定液	(90)
第三节 材料的包埋	(91)
第四节 石蜡(树脂)切片法	(93)
第五节 组织切片染色及观察法	(95)

第一章 主要经济鱼类疾病的组织病理学研究

第一节 海水鱼类病毒性神经坏死症的组织病理学研究

海水鱼类人工种苗生产中的疾病主要有病毒性、细菌性、真菌性、寄生虫性、营养性以及环境不适引起的疾病,由于仔、稚鱼的组织器官发育不成熟、机体的免疫机能不发达,相对成鱼的抗病能力弱,疾病的发生往往造成大量的死亡。另外,人工种苗生产一般都追求高密度培育,一旦疾病的发生,造成疾病的快速传染,大量死亡也是鲜为人知,尤其是暴发性的病毒性疾病,更是防不胜防,危害性极强。据报道发生在海水鱼类人工种苗生产中的病毒性疾病有:牙鲆种苗的病毒性表皮增生症(Lida et al,1989;Miyazaki et al,1989)、牙鲆种苗的传染性胰脏坏死病毒症(楠田等,1989)、鲷鱼种苗的病毒性腹水症(反町,原1985)、石鲷等海水鱼类的病毒性神经坏死症(viral nervous necrosis,缩写:VNN)(吉越,1990)等病例。

在日本有关VNN的报道最早见于石鲷人工种苗生产中发生大量死亡研究,几乎同时在赤点石斑和长稿鲆发现VNN的发生(吉越,1990);其后有赤点石斑(森等,1991)、长稿鲆(有元,1991)、牙鲆(Nguyen et al,1994)、方斑东方鲀(中井,1994)、云纹石斑(中井,1994)、条斑星鲷(石间等,1994)、七带石斑(Fukuda et al,1996)、鲷(宋振荣,1997)等报道。另外,已在松石鲷、高体鲷、尖吻鲈等种类确认VNN的发生。其他国家有关VNN的报道有:泰国、澳大利亚、印度尼西亚、马来西亚、新加坡和菲律宾报道了尖吻鲈、法国和希腊报道了鲈鱼、挪威报道了牙鲆和星鲷;还有泰国和新加坡的石斑鱼均被确认发生VNN。

二十世纪末,VNN成为在世界沿海国家和日本海水鱼种苗生产中危害性最大的病毒性疾病,本研究也是其时日本长崎大学吉越一马教授(著者的博士学位研究导师)主持的国家级的重要研究课题。

二十一世纪以来,我国也有报道牙鲆(王京、等,2000)、长稿鲆(宋振荣、等,2003)、赤点石斑鱼(林鑫、等,2005)的VNN病例;台湾地区的棕点石斑和赤点石斑、新加坡和泰国的马拉巴石斑和巨石斑都发生VNN的病例。

目前已知4目9科20多种鱼类患有VNN(表1-1)。

有关VNN的病原体的研究,日本的森等研究者(1992)利用发病的长稿鲆仔鱼,探讨了VNN病毒的构造蛋白和核酸性状,结果表明:该病毒有两种蛋白质,其分子量分别为41 kDa和42 kDa,该病毒的核酸是单链RNA型,由分子量为 1.01×10^6 Da(RNA1)和分子量为 0.49×10^6 Da(RNA2)所组成。根据第四届国际病毒命名委员会的章程,该病毒属于诺达病毒科,被命名为:长稿鲆神经坏死病毒(Striped Jack Nervous Necrosis Virus,缩写: SJNNV)。该病毒的直径25~34 nm,不具囊膜,呈二十面体(森、等,1992)。

有关SJNNV与长稿鲆以外的鱼种神经坏死症病毒的关系还研究不够深入,日本的有元研究者(1993),利用SJNNV浸渍感染鲷鱼、高体鲷、真鲷、石鲷、云纹石斑和三线矶鲈等鱼类,均未获得成功。西川(1995)通过研究认为:赤点石斑、牙鲆、云纹石斑和双斑东方鲀的NNV构造蛋白的遗传基因碱基配对具有高度的相似性,其与昆虫的诺达病毒有显著的差异。关于NNV的相似性,其他研究者报道了塔希堤岛的尖吻鲈和法国的鲈鱼的神经坏死病毒属于诺达病毒科(Comps et al,1996)。神经坏死病毒在已知的鱼类细胞培养中尚不能增殖,但将NNV接种到条纹月鳢(*Striped snakehead*)的细胞系中,可以分离出鲈鱼的诺达病毒(Freichs et al,1996);以同样方法,可分离出石斑鱼神经坏死病毒(蒋方军、等,2008)。

我国水产研究者近年来针对人工养殖的石斑鱼开展了VNN的研究,利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测出5种养殖石斑鱼的神经坏死病毒(陈信忠、等,2004)、进行赤点石斑鱼神经坏死病毒分离株的

基因型分析(黄剑南、等,2004)、斜带石斑神经坏死病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析(陈晓艳等,2004)、鱼类神经坏死病毒的分离及其部分衣壳蛋白基因的核苷酸序列分析点(李冬、等,2005)、点带石斑鱼神经坏死病毒基因组分析(龚艳清、等,2007)、鱼类病毒性神经坏死病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性(罗卫、等,2008)等研究和开展了网箱养殖石斑鱼病毒性神经坏死病流行调查(苏亚玲、等,2008)。

VNN 的症状表现为患病鱼活动能力下降、平衡失调、旋转回游、体色变化、眼球发青突出、个体萎缩等,几乎所有的发病鱼种均有相似的症状。VNN 的发病率和死亡率都极高,笔者留学日本长崎大学期间,在长崎市水产育苗中心,目睹和确诊一起由于病毒性神经坏死症引起牙鲆种苗大量死亡现病例,近百万尾的牙鲆鱼苗(大小为 5 cm 左右)在 3 d 内全部死亡。

有关 VNN 的检测手段,有传统的光镜显微和电镜超显微观察的形态学方法;还有利用病毒抗体抗原的特异反应的酶联免疫吸附技术(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫酶技术、免疫荧光技术和通过对病毒核酸片断扩增的聚合酶链反应技术(Polymerase chain reaction, PCR)被广泛运用,以达到了快速、准确地检测出 VNN 的目的。有关 VNN 的检测技术发展迅速,但值得一提的是:不论是 ELISA 或 PCR 等生物技术的检测方法,要注意避免假阳性的问题存在,一般都应进行多样的重复检测。

本节开展了 VNN 的感染途径、病毒的侵入、增殖部位、宿主组织内的传播、自感染到发病和死亡的病变过程等组织病理学研究,指导对 VNN 的正确诊断,以达到有效地防止 VNN 的发生的目的。

表 1-1 VNN 患病鱼种

中文鱼名	英文鱼名	学 名	研究者
鲈形目	Order Perciformes		
鲈科	Family Percichthyidae		
鲈鱼	Japanese sea bass	(<i>Lateolabrax japonicus</i>)	
	sea bass	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)	(Breuil, G., et al. 1991)
石鲷科	Family Oplegnathidae		
石鲷	Japanese parrotfish	(<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	(吉越、等,1990)
松石鲷	spotted parrotfish	(<i>O. punctatus</i>)	
鲷科	Family Serranidae		
赤点石斑	redspotted grouper	(<i>Epinephelus akaara</i>)	(森、等,1991)
黑边石斑	(<i>E. fasciatus</i>)	(chi, S. C., et al., 1997)	
云纹石斑	kelp grouper	(<i>E. moara</i>)	(中井、等,1994)
马拉巴石斑(点带石斑)	brownspotted grouper	(<i>E. malabaricus</i>)	(龚艳清、等,2007)
七带石斑	Convict grouper	(<i>E. septemfasciatus</i>)	(福田、等,1996)
巨石斑	greasy	grouper	(<i>E. tauvina</i>)
斜带石斑	(<i>E. coioides</i>)	(陈晓艳、等,2004)	
鲷科	Family Carangidae		
长稿鲷	striped jack	(<i>Pseudocaranx dentex</i>)	(有元,1991)
高体鲷	purplish amberjack	(<i>Seriola dumerili</i>)	
尖吻鲷科	Family Centropomatidae		
尖吻鲷	barramundi	(<i>Lates calcarifer</i>)	(Glazebrook, J. S., et al., 1990)
鲉形目	Order Scorpaeniformes		
鲉科	Family Platycephalidae		
鲉	bartail flathead	(<i>Platycephalus indicus</i>)	(宋振荣、等,1997)
鲉形目	Order Pleuronectiform		
鲉科	Family Bothidae		
褐牙鲉	Japanese flounder	(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	(西川、等,1994)
鲉科	Family Paralichthyidae		
条斑星鲉	barfin flounder	(<i>Verasoer moseri</i>)	(石间、等,1994)
角木叶鲉	Finespotted flounder	(<i>Pleuronichthys cornutus</i>)	
拟庸鲉	halibut	(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	(Drotmol, S. et al., 1995)
星鲉	Turbot	(<i>Scophthalmus maximus</i>)	(Bloch et al., 1991)
鲉形目	Order Tetraodontiform		
鲉科	Family Triodontidae		
双斑东方鲉	tiger puffer	(<i>Takifugu rubripes</i>)	(中井,1994)

一、病毒的感染部位

由于神经坏死病毒主要攻击患病鱼类中枢神经组织的脑、脊髓,由此而被称为病毒性神经坏死症(吉越,1990)。其他类似的 encephalopathy (Bloch et al., 1992)、viral induced vacuolating encephalopathy and vetionopathy (Munday et al., 1992)、encephalitis (Comps et al., 1994)等疾病的主要症状同样表现为脑、脊髓以及视网膜的神经细胞、神经胶质细胞发生病理变化和死亡。

1. 材料与方法

(1) 供试鱼

本研究的供试鱼采自日本栽培渔业协会五岛事业场生产的长稿鲆仔鱼、日本栽培渔业协会南伊豆事业场生产的鲈鱼稚鱼、长崎县水产试验场岛原分场生产的鲷、鬼鲈仔鱼、长崎县渔业公社生产的石鲷和松石鲷仔鱼、长崎市水产中心生产的石鲷仔、稚鱼和松石鲷仔、稚鱼、熊本县栽培渔业协会生产的松石鲷仔鱼、爱媛县水产试验场生产的赤点石斑仔、稚鱼、长崎县和佐贺县地方生产鱼苗场生产的牙鲆稚鱼。供试鱼中还有英国大学 H. Rodger 博士提供的地中海产的发病鲈鱼稚鱼(表 1-2)。

表 1-2 本研究供试鱼及其 VNN 感染情况

鱼种	日龄	采集时间	生产机构	结果	备注
长稿鲆	1~6	1994.3	日裁协*五岛事业场	+	感染实验
长稿鲆	1~6	1995.2	同上	+	感染实验
长稿鲆	20	1994.6	长崎县渔业公社	+	自然发病
长稿鲆	1~2	1995.6	同上	+	自然发病
长稿鲆	亲鱼	1995.8	同上	-	产卵后期
长稿鲆	1~18	1995.6	佐世保市水产中心	+	自然发病
长稿鲆	1~21	1996.6	同上	+	自然发病
长稿鲆	35	1994.6	长崎市水产中心	+	自然发病
长稿鲆	48	1994.7	同上	+	自然发病
长稿鲆	13~19	1995.8	同上	+	自然发病
松石鲷	16	1994.6	熊本县栽培渔业协会	+	自然发病
松石鲷	48	1994.7	长崎市水产中心	+	自然发病
松石鲷	40	1995.7	长崎市水产中心	+	自然发病
鲈鱼	90	1995.3	日裁协南伊豆事业场	+	自然发病
鲈鱼	133	1995.5	同上	+	自然发病
鲈鱼	不详	1995	地中海(马耳他岛)	+	自然发病
赤点石斑	19~25	1994.8	爱媛县水产试验场	+	自然发病
赤点石斑	亲鱼	1994.8	同上	-	产卵后期
牙鲆	55	1995.2	佐贺县民间业者	+	自然发病
牙鲆	60	1995.12	长崎县民间业者	+	自然发病
鲷	40	1995.8	长崎县水产试验场	-	未检出
鲷	亲鱼	1996.6	同上	-	产卵后期
鲷	14	1996.7	同上	+	自然发病
鬼鲈	7	1995.8	同上	-	未检出

注:1)日裁协=日本栽培渔业协会;2)+:检出具病毒抗原细胞;-:未检出具病毒抗原细胞。

(2) 免疫组织化学检测

1) 病毒的提纯

材料取自保存于 -80°C 日裁协五岛事业场生产的 VNN 患病仔鱼, 根据森等研究者 (1992) 的方法进行 SJNNV 的提纯。具体步骤如下:

-80°C 冰柜保存的 VNN 患病仔鱼 (80g) $\rightarrow$ 添加 2 倍量的缓冲液 (1 mM EDTA, 2 mM 巯基乙醇, 0.1 M Tris-HCl, pH7.2) $\rightarrow$ 搅匀 (室温, 5 min) $\rightarrow$ 添加氯仿至 25% 浓度 $\rightarrow$ 搅匀 (室温, 3 min) $\rightarrow$ 离心 ($8\,000 \times g$, 4°C , 15 min) $\rightarrow$ 收集上清液 $\rightarrow$ 高速离心 ($100\,000 \times g$, 4°C , 2.5 h) $\rightarrow$ 加入 TE 缓冲液 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH7.2) 将沉淀物搅成悬液后静置过夜 $\rightarrow$ 离心 ($8\,000 \times g$, 4°C , 15 min) 三次, 除去不溶物 (沉淀物) $\rightarrow$ 配置 10% ~ 40% (W/V) 蔗糖密度匀配离心 ($8\,000 \times g$, 4°C , 2 h) $\rightarrow$ 收集病毒带 $\rightarrow$ 添加 5 倍量的 TE 缓冲液 $\rightarrow$ 高速离心 ($100\,000 \times g$, 4°C , 2.5 h) $\rightarrow$ 加入少量的 TE 缓冲液使沉淀物悬浊 $\rightarrow$ 配置 30% ~ 40% (W/V) 氯化铯密度匀配离心 ($210\,000 \times g$, 16°C , 16 h) $\rightarrow$ 收集病毒带 $\rightarrow$ 添加 5 倍量的 TE 缓冲液 $\rightarrow$ 高速离心 ($100\,000 \times g$, 4°C , 2.5 h) $\rightarrow$ 加入少量的 TE 缓冲液使沉淀物悬浊 $\rightarrow$ 纯化病毒悬液 $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ 冰柜保存。

2) 病毒特异抗体的制备

将上述纯化的 SJNNV 悬液 1 mg 和 Freund 完全的佐剂一起注射到实验兔的背部皮下, 2 周后同样方法再将 1.5 mg 病毒悬液注射同一实验兔, 再 2 周后将 1.5 mg 病毒悬液注射到同一实验兔的耳部静脉, 12 d 后进行试验兔颈部动脉血液的收集, 将血液进行离心收集上清液 (血清) 作为酶联抗体反应的第一抗体。

3) 间接酶联抗体法与免疫电镜法

采用间接酶联抗体反应方法进行 VNN 抗原的检测。小于 8 mm 的供试鱼直接地用 0.2% 苦味酸和 4% 多聚甲醛 (0.1 M 二甲胂酸缓冲液, pH7.2) 混合固定液 (使用前混合) 固定一夜, 大于 8 mm 的供试鱼由眼后部处横切 (含眼) 或剔除供试鱼头盖骨后, 头部进行固定。固定后, 用含 5% 蔗糖的同一缓冲液进行材料的清洗, 在含 5% 蔗糖缓冲液中冷藏 (4°C 左右)。小型材料可直接用同一缓冲液洗净后进行脱水和石蜡包埋, 大型材料, 尤其是含骨骼的材料必须进行脱钙, 将材料在 5% EDYTA 浸渍 24 h 以上再进行脱水和石蜡包埋。具体步骤如下:

石蜡切片 $\rightarrow$ 脱蜡 (二甲苯, 10 min, 2 次) $\rightarrow$ 乙醇复水 (100% 2 次, 95、90、80、70% / 10 min) $\rightarrow$ 水洗 $\rightarrow$ 内因性过氧化酶阻断 (0.3% 过氧化氢的甲醇混合液, 20 min 处理后水洗, 0.5% 过碘酸处理 10 min) $\rightarrow$ 水洗 $\rightarrow$ 浸渍于 TBS 缓冲液 (500 mM NaCl 加 20 mM Tris-HCl 缓冲液, pH7.5, 室温, 30 min) $\rightarrow$ 3% 动物明胶包被 (用 TBS 缓冲液, 50°C 溶解 EIA Grade Gelatin) $\rightarrow$ TTBS (TBS 缓冲液加 0.05% Tween20) 洗净 (5 min, 2 次) $\rightarrow$ 第一抗体反应 (抗 SJNNV 的兔子血清, 稀释 2 000 倍, 室温, 1 h) $\rightarrow$ TTBS 洗净 (5 min, 3 次) $\rightarrow$ 第二抗体反应 (GAR-HRP: 市购的辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体稀释 3 000 倍, 室温, 1 h) $\rightarrow$ TTBS 洗净 (5 min, 3 次) $\rightarrow$ DAB 染色 (20 mg 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐 + 0.1 ml 5% H_2O_2 + 100 ml 50 mM Tris-HCL 缓冲液, pH7.6) $\rightarrow$ 水洗 $\rightarrow$ 细胞核染色 (0.1 M 巴比妥缓冲液配制 1% 甲基绿, pH4.0) $\rightarrow$ 水洗 $\rightarrow$ 脱水 $\rightarrow$ 透明 $\rightarrow$ 树脂封片 $\rightarrow$ 光镜显微观察。

4) 免疫电镜法

将部分供试鱼进行冷冻切片, 经抗体抗原反应后, 其树脂包埋超薄切片用电子显微镜观察。具体步骤如下:

经甲醛固定后保存在 5% 蔗糖的二甲胂酸的材料 $\rightarrow$ 组织冷冻包埋剂 (Tissus-Tek O. C. T. Compound USA) 包埋 (用塑料纸做出容器, 将材料置于容器中, 加入包埋剂置于 -80°C 乙醇速冻后在 -80°C 冰柜保存) $\rightarrow$ 在 -20°C 条件下进行冷冻切片 $\rightarrow$ 将切片置于载玻片 $\rightarrow$ 干燥 $\rightarrow$ 进行抗体抗原反应 (方法如上述) $\rightarrow$ DAB 染色水洗后 $\rightarrow$ 光镜观察, 确定抗原 $\rightarrow$ 2% 四氧化钨后固定, 缓冲液如上 $\rightarrow$ 乙醇系列脱水 $\rightarrow$ 倒立式 Spurr 树脂包埋、加热固化 $\rightarrow$ 在酒精灯上微加热 $\rightarrow$ 剥离载玻片上包埋切片的胶囊 $\rightarrow$ 修块, 确定观察部位 $\rightarrow$ 超薄树脂切片 $\rightarrow$ 电子显微镜观察。

(3) 组织病理检测

利用石蜡包埋切片, 通过 H. E 染色进行细胞组织的光镜显微观察。

电子显微镜观察用的材料采用 2% 多聚甲醛与 2.5% 戊二醛混合固定液(0.1 M 二甲胂酸缓冲液, pH7.3)固定后,2% 四氧化锇(同一缓冲液)后固定,乙醇系列脱水,树脂包埋固化后,利用超薄切片机进行树脂切片。0.5 μm 的树脂粗切片可以 0.5% 甲苯胺蓝染色后进行光镜观察,确定超薄切片的部位。超薄树脂切片经柠檬酸铅和醋酸铀二重染色后进行透射电子显微镜观察。免疫电镜观察的树脂切片,不经柠檬酸铅和醋酸铀二重染色直接进行透射电子显微镜观察。

2. 结果

利用抗 SJNNV 血清,除了鬼鮋外,8 种供试鱼的仔、稚鱼均可检测出 NNV 抗原的存在。地中海产的患病鲈鱼的脑、视网膜的病毒感染细胞在酶标抗体发应中呈阳性。患病鱼主要症状表现在神经组织 NNV 抗原的检出,病毒的增殖部位根据鱼种和器官组织有所差异,分别介绍以下:

(1) 中枢神经

在光镜下供试的 7 鱼种的脑、脊髓均可检出 NNV 抗原,其坏死的神经组织呈空泡状(图 1-1、2、3);电镜下可确认病毒增殖现象。根据病毒感染细胞的类型,神经芽细胞(图 1-4A)、神经细胞(图 1-4B)、神经胶质芽细胞(图 1-4C)、神经胶质细胞(图 1-4D)均具有病毒的感受性,但脑膜细胞尚未检出抗原的存在。病毒的抗原或粒子不仅在神经细胞质可被检出,神经突起内也可被检出(图 1-5)。

有关病毒感染引起的神经组织病理变化,根据个体不同,有感染初期出现脊髓明显病变而脑组织未检出的个体、脑组织明显病变而脊髓未检出的个体和脊髓、脑组织同时出现明显病变的个体。感染后期重症的患病鱼的脑、脊髓可检出大量抗原和因神经细胞坏死后呈现的空泡状(图 1-16)。

(2) 末梢神经

供试的 7 鱼种的脑、脊髓以及与其相连接的神经节均可检出 NNV 抗原,尤其是眼后部的神经节常被检出,即使是病毒感染初期,脑、脊髓尚未被检出抗原(图 1-6A)。腹部神经节也可检出抗原(图 1-6B),因此,VNN 患病鱼的神经系统中不论是脑、脊髓、神经节,以及神经纤维均有病毒存在。VNN 患病鱼免疫电镜观察,可见 DAB 染色部位(抗原存在部位)电子密度比较高(图 1-7C)。

(3) 视网膜

供试的 7 鱼种的视网膜在病毒感染初期(轻症)个体不能检出 NNV 抗原,只在重症的个体才能在视网膜细胞中检出。病毒感染细胞和坏死后的空泡现象在视网膜的内、外颗粒细胞层屡被检出,杆状细胞和锥体细胞也可检出病毒感染细胞。凡是视网膜被检查病毒抗原的个体,其脑、脊髓均已是病毒严重感染、细胞大量坏死的个体。外颗粒层细胞比内颗粒层细胞较早被检出,且组织病变也比较严重(图 1-2C、图 1-17)。电镜观察可确认 NNV 粒子在视网膜的存在。

(4) 上皮组织

1) 皮肤

石鲷、松石鲷、鲷的自然发病个体(仔鱼)和人为感染的长稿鲈孵化鱼,在皮肤的基底细胞均可检出;表皮细胞有 2-3 层,最外层细胞尚未检出 NNV 抗原(图 1-6、图 1-7)。电子显微镜观察也可确认病毒粒子的存在(图 1-8A)。病毒感染皮肤基底细胞出现的部位根据个体有差异,无明显的固定部位;即使是重症个体,皮肤也未出现大面积的感染和坏死现象。

人为感染的长稿鲈孵化鱼在病毒浸渍 60 h 后的个体,都可在皮肤的味蕾或游离感觉丘检出病毒抗原;通过电子显微镜观察,可见存在于皮肤味蕾的支持细胞(电子密度高)可见病毒增殖现象,而电子密度低的感觉细胞则未能检出病毒(图 1-8B)。

2) 咽头上皮

在石鲷和长稿鲈孵化鱼的咽头上皮均检出病毒抗原(图 1-9A、B)。咽头上皮有 2 层细胞,基底细胞表现出病毒的感受性,而最外层细胞未检出病毒抗原。咽头上皮细胞的病毒抗原检查率很低,几乎都是出现在重症的个体,且出现较大面积的感染现象。

(5) 内皮组织

1) 心内膜

石鲷、松石鲷、长稿鲈和鲷的患病鱼的心内膜均可检出病毒抗原(图9C、D、E),心内膜的病毒感染细胞检出率不高,几乎均出现在重症的个体。

2) 血管内皮细胞

在长稿鲈患病鱼心脏附近动脉内皮细胞可检出病毒抗原(图9-F);在脑部的静脉内皮细胞也可检出病毒粒子,该病毒粒子出现在具有界限膜包裹的空胞中。空胞内具有电子密度高的物质,其形态性状不一,看不出具有病毒粒子的内皮细胞的病理变化。

(6) 其他组织

供试的7鱼种患病个体的肝脏、胰脏、脾脏、肾脏、肠道、鳃和肌肉等组织均未出现明显的病理变化和未检出病毒抗原细胞。

3. 讨论

根据以前的报道,NNV在鱼类的脑、脊髓增殖。本研究结果也证明了NNV在中枢神经和视网膜增殖的特征,但本研究进一步在患病鱼的末梢神经、上皮组织、内皮组织均检出NNV抗原和病毒粒子;进一步的明确神经组织中的神经芽细胞、神经细胞、神经胶质芽细胞和神经胶质细胞均具有NNV的感受性,在神经细胞轴突和纤维也检出病毒。

Bloth et al. (1991)认为与VNN类似的enccephalomyelitis病例的星鲈(Turbot)患病鱼在脑组织的髓膜细胞检出病毒粒子,认为构成神经组织的神经细胞、神经胶质细胞及其芽细胞是否对病毒具有感受性是一值得研究课题。除了Bloth以外的研究者均未报道神经髓膜细胞病毒增殖现象。在欧洲产的鲈鱼VNN患病鱼的脑血管内皮检出病毒抗原(A Le Breton, 1997),本研究在长稿鲈的血管内皮观察到病毒粒子存在于具有空胞结构膜内,未出现内皮细胞病理变化现象,由此,笔者认为血管内皮细胞吞噬血液中的病毒粒子的可能性很高。

本研究中的石鲷、松石鲷长稿鲈和鲷的心内膜细胞虽均检出病毒抗原,但被检出个体均为重症个体、检出率极低、电子显微镜未观察到病毒等原因,还不能确定是心内皮细胞感染NNV,还是吞噬血液中的病毒粒子,由于心内皮细胞与血管内皮细胞功能是同类型的,所以推断心内皮细胞吞噬血液中的病毒粒子的可能性比较高。如果是病毒的感染,也是属于二次感染,可以认定心内膜细胞对NNV的感受性很低。

Nguyen et al. (1996)在长稿鲈急性患病鱼皮肤检出NNV抗原电镜观察到病毒粒子,但对亚急性和人工感染鱼的皮肤未检出病毒和上皮细胞是否为全身感染均未得出结论,推断仅在感染初期上皮细胞具有NNV感受性。本研究结果表明表皮的基底细胞对NNV具有感受性,不仅是感染初期,上皮细胞均对NNV具有感受性,这一点在对石鲷自然发病鱼的研究中得到了证明。同时还揭示了咽头上皮细胞也具有NNV感受性。因此,推断上皮细胞对NNV具有感受性。Nguyen et al. (1996)认为皮肤检出大量的具有NNV抗原细胞是过度形成,但本研究中不论是自然发病和人为感染的重症个体的皮肤均未检出大量的病毒感染细胞。而石鲷和鲷的重症个体的咽头上皮出现大量病毒感染细胞,可认为病毒扩散的二次感染。本研究认为感染初期皮肤表皮基底细胞出现病毒抗原现象,体现了病毒侵入鱼体的重要部位,有关研究结果在下一节阐述。除了全身感染病毒的重症个体,上皮细胞的病毒检出率很低,说明相对神经细胞,上皮细胞对NNV的感受性很低,只是在有限的个别部位成为病毒侵入的门户。

Glazebrook et al. (1990)报道尖吻鲈患病鱼的鳃细胞上皮肥大和直肠上皮细胞空胞现象,Munday et al. (1992)对尖吻鲈直肠上皮细胞空胞现象研究认为是脂肪滴贮存现象,属于正常状态。除了Glazebrook et al. (1990)外的研究者均未报道其他脏器有明显的病理变化。

本研究结论:VNN的病毒增殖靶组织细胞是神经组织细胞。