

## 我国鲑鳟鱼类养殖常见流行疫病研究概况

李乐, 于晓清, 李翘楚, 于道德, 邹琰, 叶海斌, 吴海一, 刁菁\*

山东省海洋科学研究院, 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东 青岛 266104

**摘要:** 鲑鳟鱼类是典型的冷水性鱼类, 经济价值高, 市场前景广阔, 是世界重要经济鱼类之一。我国鲑鳟鱼类养殖近年来蓬勃发展, 产量及规模不断提高, 养殖模式不断创新, 与此同时, 各地鲑鳟鱼类流行疾病的暴发日趋频繁, 国内疫病防控体系与挪威、智利等主产国仍存在较大差距, 严重制约了产业的健康发展。基于此, 概述了细菌、病毒及其他病原引起的鲑鳟鱼类主要流行性疫病的发病症状、发病条件等方面的研究成果, 系统介绍了相应的诊断技术, 并重点介绍了国内鲑鳟鱼类免疫防控手段, 以期研究人员提供较为系统的鲑鳟鱼类常见流行疫病相关基础知识、常用的检测技术以及免疫防控手段, 为从业者和研究人员对鲑鳟鱼类疫病防控提供参考。

**关键词:** 鲑鳟鱼类; 流行疫病; 诊断; 防治

**DOI:** 10.19586/j.2095-2341.2021.0087

中图分类号: S941.4 文献标识码: A

## Overview of Epidemic Diseases of Salmon and Trout Cultured in China

LI Le, YU Xiaoqing, LI Qiaochu, YU Daode, ZOU Yan, YE Haibin, WU Haiyi, DIAO Jing\*

Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Marine Science Institute of Shandong Province, Shandong Qingdao 266104, China

**Abstract:** Salmon and trout are typical cold water fishes with high economic value and broad market prospect, and they are one of the important economic fishes in the world. In recent years, salmon and trout farming in China has been developing vigorously, with the increasing output and scale, and the continuous innovation of farming mode. At the same time, the outbreak of epidemic diseases of salmon and trout has become increasingly frequent everywhere, and there is still a big gap between the disease prevention and control system in China and those in major producing countries such as Norway and Chile, which seriously restricts the healthy development of the industry. Based on this, the research results on the symptoms and conditions of the main epidemic diseases of salmon and trout caused by bacteria, viruses and other pathogens were summarized, the corresponding diagnostic techniques were systematically introduced, and the domestic immune prevention and control measures of salmon and trout was focused on, in order to provide researchers with systematic basic knowledge, common detection techniques and immune prevention and control measures of common epidemic diseases of salmon and trout, and provide reference for practitioners and researchers to prevent and control salmon and trout diseases.

**Key words:** salmon and trout; epidemic disease; diagnosis; prevention

鲑鳟鱼类是鲑鱼和鳟鱼的统称, 均隶属于鲑科(Salmonidae), 为世界三大主养品种之一, 因生活环境清洁、肉质细嫩且富含二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)等不饱和脂肪酸等优点深受消费者喜爱, 在我国有50多年的养殖历

史。养殖品种包括大西洋鲑、虹鳟、金鳟、银鳟、硬头鳟、七彩鳟、山女鳟等10余种, 养殖区域涵盖了北京、青海、黑龙江、辽宁、吉林、甘肃、山东、新疆等地, 随着近年来对黄海冷水团资源的发掘, 鲑鳟鱼养殖也从陆地走向了海洋<sup>[1-5]</sup>。

收稿日期: 2021-05-17; 接受日期: 2021-06-16

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2018GHY115033); 山东省海洋与渔业科技创新计划项目(2017YY15); 山东省良种工程项目(2019LZGC020)。

联系方式: 李乐 E-mail: waiteforu@163.com; \* 通信作者 刁菁 E-mail: doro530@sina.com

我国鲑鳟鱼人工养殖规模逐年扩大,养殖技术日趋成熟,但养殖品种种质退化、外源疾病输入、养殖环境遭受破坏、防病意识缺乏以及其他人为原因导致近年来病害频发,特别是传染性造血器官坏死病、疔疮病等暴发性疾病,给养殖业带来了巨大危害<sup>[6-9]</sup>。因此,本文对我国养殖鲑鳟鱼主要流行疫病种类、诊断技术以及免疫防控技术的研究现状进行概述,旨在为鲑鳟鱼养殖从业者对疫病的预防和诊断提供参考。

## 1 主要流行疫病

### 1.1 细菌性疾病

**1.1.1 疔疮病** 疔疮病(furunculosis)是鲑鳟养殖过程中常见细菌病之一,可分为急性型、亚急性型、慢性 I 型及慢性 II 型,虹鳟鱼多表现为慢性型或亚急性型<sup>[10]</sup>,通常表现为体色发黑、眼球突出、食欲不振、腹部肿胀、鳍基部充血、皮肤溃疡等。疔疮病的病原为杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*),属气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*)<sup>[11]</sup>,是一种不能运动、兼性厌氧的革兰氏阴性菌。杀鲑气单胞菌具有广泛的地理分布,其宿主范围广泛,主要危害鲑鳟鱼类、鲤鱼、大菱鲆等,可感染各个生长发育阶段的海淡水鱼类<sup>[11-14]</sup>。目前已知的杀鲑气单胞菌分为:杀鲑亚种、无色亚种、杀日本鲑亚种、溶果胶亚种和史氏亚种等,其中杀鲑亚种为典型株。近年来,有学者根据其特异性毒力基因 *vapA* 序列的差异分为 14 个类型,呈现出一定程度的地缘特性<sup>[15-17]</sup>。

目前,我国对杀鲑气单胞菌的分离鉴定、致病性、生长模型、药敏特性等方面开展了相关研究。刁菁等<sup>[18]</sup>自虹鳟病鱼中分离到一株致病菌,通过生理生化分析及分子生物学手段鉴定为 *A. salmonicida*,并通过回染实验和毒力因子(如气溶素、溶血素、封闭带毒素等)检测,确定此菌株具有较强的致病力。田会芹等<sup>[19]</sup>则对从大西洋鲑患病个体分离的 *A. salmonicida* 开展了环境因子(温度、pH)对其生长的影响研究,确定了其各单因子的适宜范围,并以温度为主要影响因子建立了生长模型。此外,有团队研究了 *A. salmonicida* 感染对大西洋鲑游泳和变色型的影响及其生理机制,对受感染后体内免疫系统以及与能量代谢相关的因子进行了量化分析,揭示了病变后的生理变

化<sup>[20]</sup>。上述研究通过探明 *A. salmonicida* 致病机理、分析其生长特性、研究鱼类感染后的行为变化和生理机制,来为疫苗研制、病害预警系统研发提供理论数据,有助于减少养殖鲑鳟鱼类感染 *A. salmonicida* 的可能性,降低疔疮病的发病率。

**1.1.2 细菌性败血症** 细菌性败血症也称细菌性出血病、细菌性腹水病等,是一种水产养殖过程中常见的病症之一,病鱼外部症状表现为体色发黑、腹部肿胀、尾部和鳍条出现坏死和糜烂,肛门和大部分皮肤出血且会恶化为水肿型溃烂,并伴有内脏器官出血。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为该病主要病原,隶属于气单胞菌科气单胞菌属,是淡水养殖动物与重要的病原菌之一,严重危害鲑鳟鱼类、草鱼、牙鲆、鲫鱼、团头鲂等鱼类的养殖业,可引起细菌性败血症、肠炎,是一种典型的条件性致病菌,当饲养周边条件、水质指标发生剧烈变化时,常与其他病原菌混合感染使病情恶化<sup>[21-25]</sup>。研究表明,*A. hydrophila* 致病性与自身两大类致病因子密切相关:一类是本身具有致病作用,如溶血素、肠毒素等外毒素;另一类则与细菌的吸附、入侵机体有关,如菌毛、表面蛋白 S 层等粘附因子<sup>[26-28]</sup>。

**1.1.3 其他细菌性疾病** 除疔疮病、细菌性败血症两类常见流行疫病外,还有烂鳃病、烂鳍病、红嘴病、肠炎等细菌性疾病,相应的病原种类繁多,多为条件致病菌,包括鳃弧菌、嗜鳃黄杆菌、鲁氏耶尔森菌、迟钝爱德华氏菌、海分枝杆菌、柱状黄杆菌等,大多存在着混合感染的情况,对鲑鳟鱼养殖业造成一定程度的危害<sup>[2,9,27-30]</sup>。

### 1.2 病毒性疾病

世界动物卫生组织(Office International des Épizooties, OIE)必须申报的鱼类疫病中,以鲑鳟鱼类作为宿主的有 5 种:传染性鲑鱼贫血症、鲑鱼甲病毒病、流行性造血器官坏死病、病毒性出血性败血症、传染性造血器官坏死病,均为病毒性疾病,它们对全球鲑鳟鱼类养殖业造成了巨大的经济打击。我国贯彻执行《中华人民共和国动物防疫法》,农业农村部明确规定了《一、二、三类动物疫病病种名录》<sup>[31]</sup>,其中流行性造血器官坏死病、传染性造血器官坏死病、病毒性出血性败血症被归为二类疫病,进行重点防疫。

水温对上述病毒病的发病及死亡率影响较大,在水温 3~18 °C 均可造成鱼类死亡,8~12 °C 为

流行高峰。其中,传染性造血器官坏死病在水温 10 °C 时,死亡率最高;水温低于 10 °C 时,潜伏期延长,病情呈慢性;水温高于 10 °C 时病情较急,显示低死亡率;当水温超过 15 °C 后,一般不出现自然发病。

相较于欧洲、北美等地区,我国目前报道的病毒性疾病种类较少,主要为传染性造血器官坏死病和传染性胰腺坏死病 2 种,目前国内尚未有鲑鳟鱼类暴发其他疾病的报道,但仍有较大的传入风险<sup>[32-34]</sup>。

**1.2.1 传染性造血器官坏死病** 传染性造血器官坏死病为农业部二类动物疫病,也是 OIE 必须申报的疫病,常发生于虹鳟鱼养殖场,急性暴发会导致极高死亡率。该病病原为传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV),是一种单链 RNA 病毒,弹状病毒科,侵染的主要靶器官为肾造血组织<sup>[35-37]</sup>。IHNV 于 20 世纪 80 年代传入我国,农业农村部于 2011 年起对其实施专项监测,中国水产科学研究院黑龙江水产研究所卢彤岩团队于 2012—2017 年在辽宁、北京、山东、甘肃、新疆、河北、云南、青海等省份均分离到相应的病毒<sup>[38]</sup>。

IHNV 的核酸序列约为 11 000 bp,目前 NCBI 录入的已有 6 株完整的 IHNV 毒株基因组被分离鉴定,其中 HLJ-09 (JX64910)、BjLL (MF509592) 及 CH20101008 (KJ421216) 均为国内分离鉴定<sup>[39-40]</sup>。IHNV 蛋白则由 P、G、M、N 和 L 5 种结构蛋白和 1 种非结构蛋白组成,通过对 G 基因进行系统发育分析,将 IHNV 分为 5 个主要的基因型,即 U、M、L、E 和 J 型<sup>[41-42]</sup>,我国以 J 基因型为主,具有显著的地域特性。IHNV 在稚鱼和幼鱼之间水平传播是最主要的传染方式,其主要通过接触被病毒污染的水、食物、带毒鱼排泄的尿、粪便以及渔具等而感染<sup>[43]</sup>。

**1.2.2 传染性胰腺坏死病** 传染性胰腺坏死病主要危害 20 周龄以内的鲑鳟幼鱼,一般为急性流行,短时间致死率可达 90% 以上,分布范围广泛,涉及我国山西、甘肃、山东、辽宁、四川等省份,其中 1989 年发生的传染性胰腺坏死病暴发导致山东省的鲑鳟鱼类养殖损失接近 90%<sup>[44]</sup>。其病原为传染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),隶属于双 RNA 病毒科,可通过垂直传播和水平传播将病毒粒子释放到环境中,染

病后幸存鱼将成为 IPNV 的终身携带者。

IPNV 基因组包含 A 和 B 2 个线性 RNA 分子, B 链编码的 VP1 为 RNA 聚合酶, A 链编码 VP2、VP3、VP4 和 VP5 4 种蛋白,其中,VP2 作为主要外衣壳蛋白,含有主要的抗原表位决定簇,其 217~221 位氨基酸与病毒的毒力密切相关,现阶段大部分 IPNV 的检测、分类、免疫研究均以 VP2 为研究对象<sup>[45-47]</sup>。2013 年 Ji 等<sup>[48]</sup>在云南某养殖场虹鳟中分离出了 IPNV 毒株——ChRtm213,并确定了其全基因组序列,这是我国 IPNV 分离株的第一个基因序列,根据 A 链序列比对分析,其与日本株 AM-98 (AY283780.1) 聚为一簇。同时,刘森等<sup>[49]</sup>根据 VP2 序列进行基因型分型,采用邻位相邻法构建了 IPNV 的系统进化树,聚类分析结果显示,ChRtm213 与参考毒株加拿大 Jasper (ATCC:VR-1325) 聚为一簇,具有较近的亲缘关系 (图 1)。

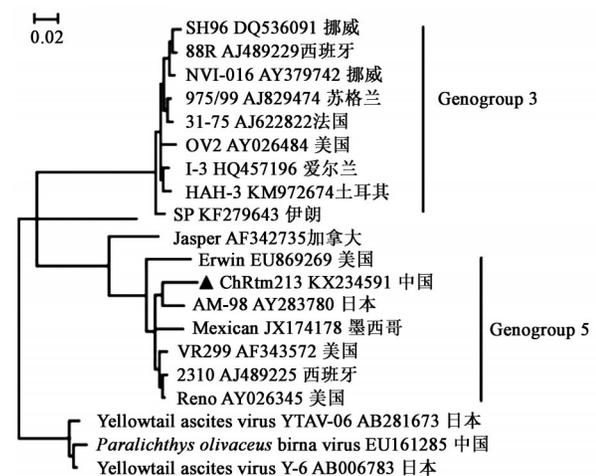


图 1 以 VP2 基因序列构建的 ChRtm213 分离株进化树<sup>[49]</sup>

Fig. 1 Phylogenetic tree of ChRtm213 isolate based on gene sequence of VP2<sup>[49]</sup>

**1.2.3 病毒性出血性败血症** 病毒性出血性败血症为农业部二类动物疫病,也是 OIE 必须申报的疫病,主要流行于欧洲和北美,近年来扩散到日本和韩国,迄今为止我国未见报道<sup>[33]</sup>。该病原为病毒性出血性败血病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV),属于弹状病毒科,为单链负义 RNA 病毒,宿主极为广泛,可感染鲑鳟鱼、牙鲆、狗鱼和大菱鲆等淡水、海水养殖品种,近年来野生鱼类遭受感染而死亡的情况亦有报道<sup>[50-55]</sup>。

### 1.3 其他生物疾病

**1.3.1 鱼虱病** 挪威作为大西洋鲑的主产国,目前已形成成熟的防疫体系,但鱼虱病引起的损失仍困扰着其鲑鱼养殖业。鱼虱病的病原为鱼虱,属于节肢动物门、甲壳纲、桡足亚纲、鱼虱目、鱼虱科、鱼虱属,以寄主的粘液、表皮组织和血液为食,寄生在鲑鱼身上影响肉质,严重时导致鱼死亡,具有11个不同形态的发育阶段,流行季节为5—10月<sup>[56]</sup>。鱼虱很容易产生广泛的抗药性,不易用药物防治,鱼虱雌虫受精后会离开宿主,将卵袋产在附着物上,这时可能是其生命周期最薄弱的环节<sup>[5]</sup>。目前,除生态防治和免疫预防外,通过防虫药物如敌百虫、除虫菊酯等药浴或饲料中预混杀虫药物,也是国外对其防控的主要手段。

**1.3.2 水霉病** 水霉病又叫白毛病、水绵病或肤霉病,一般是由水霉属或绵霉属等的真菌引起,大多生长在鱼体的伤口处和鱼卵上,呈白色棉絮状。

健康鱼体具有较强的抗水霉病能力,水霉病多发生于养殖过程中分池、倒池、清污、运输等环节后,因操作粗暴导致鱼体体表组织破损、鳞片脱落等机械损伤后感染。随着其特效药——孔雀石绿于2002年后全面禁用,水霉病也成为了限制虹鳟、七彩鲑、山女鳟等鲑鳟鱼类养殖增产的重要因素<sup>[57-58]</sup>。

## 2 流行疫病诊断技术

尽管各类疾病均在国内流行多年,但尚无有效治疗的措施。随着病原体耐药性的增强,高效检出病原、切断传播途径尤为重要。目前,针对水生动物疫病诊断,OIE出版了《水生动物诊断手册》,我国颁布了相关的检测标准(表1),通过细菌培养鉴定、组织病理学、免疫学、分子生物学等手段综合判断,对流行疫病病原诊断起到了指导性作用。

表1 我国鲑鳟鱼类部分疾病检验规程

Table 1 The quarantine methods of partial disease of salmon and trout in China

病原	检测标准名称	标准编号
杀鲑气单胞菌	鱼类检疫方法 第6部分:杀鲑气单胞菌	GB/T 15805.6—2008
	杀鲑气单胞菌的检验操作规程	SN/T 2695—2010
嗜水气单胞菌	致病性嗜水气单胞菌检验方法	GB/T 18652—2002
	致病性嗜水气单胞菌检疫技术规范	SN/T 4739—2016
传染性造血器官坏死病毒	传染性造血器官坏死病诊断规程	GB/T 15805.2—2017
	传染性造血器官坏死病检疫技术规范	SN/T 1474—2014
传染性胰脏坏死病毒	鱼类检疫方法 第1部分:传染性胰脏坏死病毒(IPNV)	GB/T 15805.1—2008
	传染性胰脏坏死病检疫技术规范	SN/T 1162—2020
病毒性出血性败血症病毒	病毒性出血性败血症诊断规程	GB/T 15805.3—2018
	病毒性出血性败血症检疫技术规范	SN/T 2850—2011
传染性鲑鱼贫血病病毒	传染性鲑鱼贫血病检疫技术规范	SN/T 2734—2020

### 2.1 组织病理学技术

组织病理学作为基础诊断手段,在初诊中具有不可替代的地位。从业人员观察鱼体体表,对内脏器官、组织进行染色切片,利用显微镜检查,对机体进行解剖学特征分析,综合正常组织与老化、损伤、感染、病变等过程的特征变化,对鱼体疾病进行判断。但需要丰富的一线经验和技术手段,较难有科技产出,且需与其他手段配合。王琦等<sup>[59]</sup>对感染IHNV的发病与未发病虹鳟的组织进行常规石蜡切片,HE染色,并结合对不同规格和不同发病阶段虹鳟的血液细胞学检测。结果表

明,发病虹鳟肝脏、肾脏、肠上皮、心肌等组织都发生了不同程度坏死;同时,发病鱼的血液细胞学各项指标发生了明显变化。这也说明,通过对虹鳟各组织的观察以及血液的检测,能较为便捷、直观地反映其健康状况。中国农业出版社出版的《鲑鳟疾病彩色图谱(第2版)》将鲑鳟鱼类受到感染后的体表、鳃、肝、脾、肾等部位出现的病灶以图谱的形式展现,涵盖了八类疾病,为从业者初诊提供了直观的检索参考<sup>[60]</sup>。

### 2.2 细菌培养鉴定技术

使用取样针从病灶处取样,选取适当的培养

基划线培养,选取菌斑进行分离鉴定。使用细菌生化实验微量鉴定管、全自动生化分析仪等对细菌的形态学特征、培养特性及生化实验结果综合分析,可以在一定程度上将细菌进行鉴定,但仍需通过分子生物学方法对16S rDNA基因片段进行比对来判断<sup>[61]</sup>。郭中钢等<sup>[21]</sup>挑取虹鳟的肝脏、肾脏等病变部位,通过重复划线培养,获得一株嗜水气单胞菌,命名为HSZS-01,为革兰氏阴性菌,采用细菌微量生化鉴定管进行了生理生化分析,按照《常规细菌系统鉴定手册》鉴定到种,并使用药敏纸片进行了药敏分析。该方法操作简便、适用于初检以及基层检测。

### 2.3 细胞培养技术

作为病毒学研究最经典的方法,目前细胞培养技术仍为水生动物病毒诊断的“黄金标准”。将待测样本的靶器官(如肝脏、肾脏、脾脏)进行破碎匀浆并稀释,选用特定的敏感细胞进行分离培养后,通过显微镜观察是否出现细胞病变(cytopathic effect, CPE)进行判断<sup>[62]</sup>。该方法观察方法简单,能够通过培养分离毒株、保存毒株,但操作要求高、诊断时间长且难以鉴定到种,需要与其他检测技术配合使用,不适合大规模检测。胡晓利等<sup>[46]</sup>将病料进行匀浆后,用含有双抗的M199细胞培养液1:10稀释后,4℃孵育过夜,稀释接种于大鳞大麻哈鱼胚胎细胞(*Chinook salmon embryo cells*, CHSE)进行传代培养,分离得到了一株IPNV。赵景壮等<sup>[36]</sup>则利用鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC)分离得到了IHNV毒株Sn1203,同时结合分子生物学手段进行了全基因组序列分析,进一步明晰了该毒株的系统进化地位。

### 2.4 免疫学技术

根据抗原抗体特异性结合的原理,针对保守的抗原决定簇,借助于显色手段或标记技术,达到诊断特定病原的目的。免疫学检测技术包括中和试验、免疫荧光、免疫印迹、酶联免疫吸附、胶体金、原位杂交等。免疫学技术对抗体要求较高,高效价抗血清难以制备,容易出现交叉反应,影响鉴定的可靠性<sup>[63]</sup>。同细胞培养技术相比较,免疫学技术具有灵敏性和特异性高、假阳性率低、部分手段不依赖仪器设备、适用环境广等优点,特异性诊断产品研发之后具有极高的推广应用价值。陈桂花等<sup>[64]</sup>以IPNV ChRtm213分离株的VP3序列为模

板进行了原核表达,以纯化的VP3蛋白为免疫原制备鼠抗血清,并将该血清应用到了中国不同地区的IPNV分离株的免疫荧光检测中,对基因1型和5型均有识别,且对IHNV和VHSV无交叉反应。

### 2.5 分子生物学技术

分子生物学诊断技术通过细菌培养或病毒分离,进行核酸提取,根据病原的保守片段(如致病菌的16S rDNA、真菌ITS、IHNV的G基因、IPNV的VP2等)设计特异性引物,进行对数扩增,能够迅速准确地进行判断。分子生物学诊断技术包括传统的PCR、real-time PCR、LAMP等手段,也有多重PCR、基因芯片、DNA探针、重组酶聚合酶扩增等新型技术<sup>[65-68]</sup>。与其他诊断方法相比,分子生物学手段具有灵敏度高、特异性强、耗时短、可确认到种、手段丰富等优点,被广泛应用,如普通PCR、恒温扩增适用于高通量、基层诊断,而荧光定量PCR、DNA探针等技术适用于实验室精细化操作。吕晓楠等<sup>[65]</sup>以IHNV G基因为靶位点,建立了逆转录重组酶介导扩增(reverse transcription recombinase-aid amplification, RT-RAA)检测技术,反应条件为恒温37℃,扩增时间为20 min,与传统RT-PCR(约180 min)相比,更具有时效性和普遍适用性,同时在灵敏度、特异性以及准确率上与传统的RT-PCR技术基本一致。

## 3 免疫防控技术

目前国内鱼类疾病的控制,仍有不少从业者依赖于抗生素,但随着抗生素的使用甚至滥用,鱼类养殖面临着耐药性以及质量控制的问题,将来可能会面临着“无药可用”的状态。在挪威,从起初的单价疫苗到现在的多联疫苗,已逐渐形成一个成熟的免疫防控产业化体系,从1987年的每吨大西洋鲑使用接近1 kg的抗生素到目前的几乎不使用抗生素,死亡率控制到5%以下<sup>[69]</sup>。疫苗接种方式有口服、浸泡、注射等多种手段,迄今为止,已报道的疫苗主要有灭活疫苗、减毒活疫苗和重组疫苗等,多联疫苗的研发亦备受主流研究机构的青睐。

### 3.1 灭活疫苗

灭活疫苗作为当前最为成熟的技术手段被广泛应用,通过物理或化学方法将培养的病原进行

消杀灭活而成,在保持抗原免疫原性的基础上,破坏了病原体的致病性,因此安全性得到保障。由于制备方法简便、研发周期短且成本低廉,长期以来都是各类疫苗研发的首选,国内水产疫苗如弧菌、气单胞菌和草鱼呼肠弧病毒等疫苗的免疫保护性非常明显<sup>[70]</sup>。物理灭活方法(如高温法)制备的疫苗免疫保护率相对较低,通常采用化学灭活剂进行灭活。

最传统且最广泛的化学灭活剂为甲醛,具有价格低廉、易获取等优点,其对杀鲑气单胞菌、嗜冷杆菌、嗜冷杆菌等细菌以及IHN、IPNV等病毒进行灭活后均有良好的效果。但甲醛存在着一定的刺激性和致癌风险,灭活时间长且不彻底,筛选更有效的灭活剂成为研究热点<sup>[71]</sup>。 $\beta$ -丙内酯是甲醛的良好替代品,采用 $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\beta$ -丙内酯灭活IHN 24 h后对虹鳟进行注射,相对保护率达90%以上,免疫时效可持续56 d<sup>[71]</sup>。刁菁等<sup>[72]</sup>则使用新型材料—纳米锌作为灭活剂,使用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米锌溶液制作的杀鲑气单胞菌灭活疫苗效果优于甲醛处理组,免疫保护率达86%,同时对EPC细胞的生长及代谢无显著影响,是一种潜在的高效灭活剂。

### 3.2 重组疫苗

利用现代分子生物学及微生物学技术,将特定的抗原基因进行重组、表达,直接将核酸或表达的蛋白注入鱼体内进行免疫,含重组亚单位疫苗、核酸疫苗、基因缺失或突变疫苗及活载体疫苗等<sup>[73]</sup>。与传统的疫苗相比,具有成本低、无致病性、适用范围广、储存方便等优点,显示出广阔的开发和应用前景。

重组亚单位疫苗是指将保守的抗原基因进行体外表达,并将病原蛋白分离纯化制备而成。Diao等<sup>[74]</sup>将杀鲑气单胞菌的外膜蛋白OmpC、溶血素等进行重组表达,免疫保护率达80%以上,特异性抗体水平在6周内呈持续升高趋势。但受限于大肠杆菌、酵母等表达系统的影响,通常情况下重组亚单位疫苗需添加佐剂以增强其免疫原性。

核酸疫苗一般指DNA疫苗,指将表达主要抗原原性的基因链接到不同的载体上构建而成的重组质粒。目前国内多个研发团队针对IHN的G基因、IPNV的VP2等构建了适用于不同情况的DNA疫苗,效果良好,其中,徐黎明等<sup>[75-77]</sup>构建的IHN DNA疫苗(pIHNhG)在黑龙江省已完成中

间试验,提交了环境释放申报材料。但由于进入体内的质粒不可控,它将持续在体内进行表达并释放到环境中,缺乏与风险相关的基础研究,出于安全性考虑,一些国家(如挪威)禁止使用DNA疫苗。

相较于核酸疫苗及亚单位疫苗,基因缺失或突变疫苗及活载体疫苗受限于研发成本及难度,相关研究较少,20世纪90年代由欧洲学者最先报道的基因突变疫苗及活载体疫苗均为杀鲑气单胞菌疫苗。李守湖等<sup>[78]</sup>运用腺病毒作为载体,利用IHN G蛋白完成了重组腺病毒的构建,制备而成的活载体疫苗,通过浸泡的方式进行免疫,免疫保护率达90%以上,免疫持续期达6个月。

### 3.3 多联疫苗

多联疫苗即经一次免疫可同时抵抗2种或2种以上病原感染,避免重复接种造成的机械损伤,多联疫苗的研发对鲑鳟鱼养殖业的健康可持续发展极为重要。由于鲑鳟鱼类养殖过程中经常发生诸如杀鲑气单胞菌、IHN等不同病原引起的疾病交叉,挪威已经研发出针对弧菌病、疔疮病和肠炎等多种病害的六联、七联疫苗<sup>[79]</sup>。国内的鲑鳟鱼养殖业起步较晚,相关多联疫苗的研发相对滞后,2017年国内研发团队构建了IHN和IPNV的二价核酸疫苗,可以对IHN和IPNV的交叉感染具有显著作用,累积死亡率低于7%<sup>[80]</sup>。

### 3.4 佐剂

高度纯化的疫苗成分通常缺乏病原相关分子模式,不能有效激活先天免疫应答而发生有效的免疫反应,从而造成免疫保护效果不佳,需要配合佐剂使用。理想的佐剂须具备良好的免疫活性、稳定且清晰的化学结构、能够显著提高疫苗的免疫保护率和持久性,同时兼顾价格和副作用。佐剂的分类方法众说纷纭,在鲑鳟鱼疫苗中如弗氏佐剂、Seppic公司的ISA763和IMS1312等含油佐剂应用最广,采用油包水的方式将疫苗包裹在内部用于注射,其他常用佐剂有铝盐佐剂、葡聚糖、脂多糖、皂苷、细胞因子、蜂胶等<sup>[81-84]</sup>。刘帅<sup>[83]</sup>使用蜂胶和弗氏完全2种佐剂混合杀鲑气单胞菌疫苗对虹鳟进行接种,攻毒14 d后免疫保护率分别为90%和85%,均高于纯疫苗接种组,说明佐剂的使用能有效提高疫苗的保护作用,而副作用方面的研究结果表明蜂胶佐剂不会对鱼体造成损害,更适于生产应用。

## 4 展望

目前,我国鲑鳟鱼的养殖规模仍小于挪威、智利等主产国,但随着国民生活水平的不断提高,人民对优质蛋白质的需求不断加大,国内科技力量对于鲑鳟鱼类养殖不断投入,有效地促进了产业的发展。伴随着我国东北、西南、西北、华北以及黄海冷水团等地鲑鳟鱼产业的迅猛发展,国内科技力量的联合攻关,我国水生动物疫病及免疫学研究近年来获得了长足的进步。与此同时,国内对于鲑鳟鱼类疫病的研究和防控体系建设方面仍落后于挪威等国。流行疫病基础理论研究仍有欠缺,部分疫病的致病机理、传播途径以及机体响应机制尚不明确,我国仍存在着病原变异、外源疫病输入等风险,而流行病学调查的重要性则容易被忽略,导致研究水平滞后于疫病暴发情况。

伴随着免疫学和分子生物学的发展,如胶体金技术、恒温扩增技术等广泛开发和推广应用,将突破实验条件限制,能够迅速、准确进行现场判断,结合更加科学的实验室检验,能够让诊断技术更好的为产业服务。

国内鲑鳟鱼适用的预防接种处于“九龙治水”阶段,多为自家疫苗,商品化疫苗仍未实现零的突破,与国外的商品化多联疫苗仍存在不小差距。同时接种手段、注射疫苗后的器官黏连、佐剂配伍以及小规格鱼苗的预防接种方案等难题仍困扰着科研人员,科学预防体系任重道远。因病原的耐药性问题以及药物限用,将来可能会面临着发病后无药可用的状态,科学防控尤为重要,充分利用诊断技术将疫情控制,通过免疫接种预防将成为主流手段,具有无可比拟的优势和发展前景。

### 参 考 文 献

- [1] 韩立民,郭永超,董双林. 开发黄海冷水团建立国家离岸养殖试验区的研究[J]. 太平洋学报, 2016, 24(5):79-85.
- [2] 刘家星,杨马,魏文燕,等. 四川地区养殖鲑鳟鱼主要流行病害[J]. 科学养鱼, 2020(3):46-47.
- [3] 张邦林,王建连. 甘肃省鲑鳟鱼产业现状及优化升级对策[J]. 甘肃农业科技, 2016(10):70-73.
- [4] 王建波. 我国鲑鳟鱼养殖产业SWOT分析及对策建议[J]. 中国水产, 2016(2):37-42.
- [5] 董双林. 黄海冷水团大型鲑科鱼类养殖研究进展与展望[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(3):1-6.
- [6] 农业农村部渔业渔政管理局. 2017我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [7] 农业农村部渔业渔政管理局. 2019我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [8] 农业农村部渔业渔政管理局. 2020我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [9] 赵鹏. 虹鳟鱼常见细菌性疾病的防治技术[J]. 黑龙江水产, 2015(6):24-26.
- [10] GARRITY G M. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. 9th ed. New York: Springer, 1994.
- [11] 杨霞,潘吉脉,张飘,等. 鲤源杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(1):24-29.
- [12] 王家祯,耿昕颖,董文龙,等. 3株杀鲑气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(2):78-80.
- [13] GULLA S, LUND V, KRISTOFFERSEN A B, et al. vap A (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes[J]. J. Fish Dis., 2016, 39(3):329-342.
- [14] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clin. Microbiol. Rev., 2010, 23(1):35-73.
- [15] 丁雷,岳永生,宋憬愚. 虹鳟皮肤溃烂病的病原菌研究[J]. 淡水渔业, 2002(3):28-30.
- [16] 汪建国. 鱼病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013:314-315.
- [17] 李绍戊,王荻,连浩森,等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和致病性研究[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1):234-240.
- [18] 刁菁,李乐,王晓璐,等. 虹鳟致病性杀鲑气单胞菌的分离鉴定及其毒力因子的检测[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(4):435-443.
- [19] 田会芹,李贤,傅松哲,等. 温度及pH对杀鲑气单胞菌生长的影响研究[J]. 海洋科学, 2015, 39(7):7-12.
- [20] 衣萌萌. 大西洋鲑感染杀鲑气单胞菌的行为响应及其生理机制研究[D]. 山东青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 博士学位论文, 2015.
- [21] 郭中钢,王恒,李良玉. 虹鳟源嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)分离及16S rRNA基因鉴定[J]. 水产科技情报, 2020, 47(1):33-36, 40.
- [22] 杨斌. 三倍体虹鳟烂鳃病的病原分离与鉴定[J]. 内陆水产, 2005(9):22-23.
- [23] 张文丽,张玉芬,张秀军. 鲤鱼嗜水气单胞菌的检测与分析[J]. 湖北农业科学, 2011(3):564-565.
- [24] 蒋自立,李春涛. 黄颡鱼嗜水气单胞菌对草鱼幼鱼肝、肾和脾的影响[J]. 安徽农业科学, 2012(10):5946-5949.
- [25] 王超杰,王至诚,康兴宇,等. 一株分离自团头鲂的嗜水气单胞菌病原学及其与ST251型菌株的全基因组比较[J]. 中国水产科学, 2021, 28(4):503-516.
- [26] 王艺. 致病性气单胞菌病原学和分子流行病学特征研究[D]. 辽宁大连: 大连海洋大学, 硕士学位论文, 2019.
- [27] 郭志文. 水产动物气单胞菌疾病研究进展浅析[J]. 渔业致富指南, 2018(10):55-56.
- [28] 汪文忠. 虹鳟鱼细菌性疾病防治技术[J]. 农村科学实验, 2016(7):27-28.
- [29] 李雪峰,王利,王海娟,等. 丁鲑鱼鳃弧菌16S rDNA基因及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9):235-239.
- [30] 张泉,王荻,卢彤岩,等. 虹鳟肠炎红嘴病理模型的构建

- [J]. 水产学报, 2018, 42(2):282-290.
- [31] 中华人民共和国农业部公告 第 1125 号[J]. 中华人民共和国农业部公报, 2009(1):46-47.
- [32] 张丽文, 丁钰洁, 张秀梅, 等. 传染性鲑鱼贫血症研究进展[J]. 江西水产科技, 2021(1):45-46.
- [33] 孙涛, 张利峰, 邓明俊, 等. 病毒性出血性败血症的传入风险分析[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(11):31-36.
- [34] 任彤, 高帅, 宋傲臣, 等. 鲑甲病毒的传入风险评估[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(12):12-16.
- [35] 徐立蒲, 王小亮, 杨丽文, 等. 传染性造血器官坏死病诊断及防控的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(3):209-215.
- [36] 赵景壮, 徐黎明, 任广明, 等. 传染性造血器官坏死病毒 Sn1203 株全基因组序列及系统进化分析[J]. 水产学杂志, 2020, 33(2):1-9.
- [37] 徐黎明, 刘森, 曾令兵, 等. 一株传染性造血器官坏死病毒的致病性研究[J]. 水产学报, 2014, 38(9):1584-1591.
- [38] XU L, ZHAO J, LIU M, *et al.* Phylogeography and evolution of infectious hematopoietic necrosis virus in China[J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2019, 131:19-28.
- [39] WANG C, ZHAO L L, LI Y J, *et al.* Analysis of the genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus HLJ-09 in China[J]. *Virus Genes*, 2016, 52:29-37.
- [40] Jia P, Zheng X C, Shi X J, *et al.* Determination of the complete genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) Ch20101008 and viral molecular evolution in China[J]. *Infect. Genet. Evol.*, 2014, 27:418-431.
- [41] ENZMANN P J, KURATH G, FICHTNER D, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American Genogroup M[J]. *Dis. Aquat. Organ.*, 2005, 66(3):187-195.
- [42] KURATH G, GARVER K A, TROYER R M, *et al.* Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America[J]. *J. Gen. Virol.*, 2003, 84(4):803-814.
- [43] 王艳雪. 传染性造血器官坏死病毒 G 基因截短原核表达及其免疫原性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 硕士学位论文, 2019.
- [44] 童裳亮, HETRICK F M. 虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 传染性胰腺坏死病的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, 20(2): 119-122.
- [45] CUESTA A, CHAVES-POZO E, DE LAS HERAS A I, *et al.* An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines[J]. *Vaccine*, 2010, 28(19):3291-3300.
- [46] 胡晓利, 李伟, 肇慧君, 等. 虹鳟鱼传染性胰腺坏死病病毒的分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(3):27-30.
- [47] 贺文斌, 徐黎明, 赵景壮, 等. 传染性胰腺坏死病毒 VP2 蛋白酵母表面展示系统的建立[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(5):662-667.
- [48] JI F, ZHAO J Z, LIU M, *et al.* Complete genomic sequence of an infectious pancreatic necrosis virus isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in China[J]. *Virus Genes*, 2017, 53(2):215-225.
- [49] 刘森, 徐黎明, 赵景壮, 等. 虹鳟传染性胰腺坏死病毒的分离鉴定及聚类分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 56-61.
- [50] STUDER J, JANIES D A. Global spread and evolution of viral haemorrhagic septicaemia virus[J]. *J. Fish Dis.*, 2011, 34(10): 741-747.
- [51] KIM R, FAISAL M. Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (*Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales*) [J]. *J. Adv. Res.*, 2011, 2(1):9-23.
- [52] FAISAL M, SHAVALIER M, KIM R K, *et al.* Spread of the emerging viral hemorrhagic septicemia virus strain, genotype IVb, in Michigan, USA[J]. *Viruses*, 2012, 4(5):734-760.
- [53] DUESUND H, NYLUND S, WATANABE K, *et al.* Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway[J/OL]. *Virol. J.*, 2010, 7:19[2021-06-18]. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-19>.
- [54] 朱若林, 沈娇娇, 蒋书东, 等. 鱼类病毒性出血性败血症病毒基质蛋白的原核表达及其亚细胞定位[J]. 中国水产科学, 2019, 26(1):214-220.
- [55] 沈娇娇. 鱼类出血性败血症病毒基质蛋白原核表达、多克隆抗体制备及应用[D]. 合肥: 安徽农业大学, 硕士学位论文, 2018.
- [56] 唐嘉嘉, 李诗钰, 李安兴. 鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6):200-210.
- [57] 甄珍, 王荻, 刘红柏, 等. 山女鳟水霉病原的分离鉴定及其生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(2):333-338.
- [58] 任昕. 七彩鲑受精卵感染水霉的预防与治疗[J]. 河北渔业, 2017(9):42-43.
- [59] 王琦, 张亚亚, 谈龙飞, 等. 虹鳟感染 IHN 的组织学和血液细胞学规律研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2019, 38(6):16-20.
- [60] 汪开毓, 刘蕊, 卢彤岩, 等. 鲑鳟疾病彩色图谱: 第 2 版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [61] 徐立蒲, 王静波, 曹欢, 等. 北京地区鲑鳟鱼常见病毒性和细菌性疾病的诊断及控制技术[J]. 中国水产, 2015(1): 72-73.
- [62] 曹欢, 景宏丽, 王姝, 等. IHN 单克隆抗体的制备及其初步应用[J]. 水生生物学报, 2015, 39(2):426-430.
- [63] 王树云, 高志强, 张旻, 等. 传染性造血器官坏死病毒参考蛋白的研制[J]. 水产学报, 2016, 40(3):388-395.
- [64] 陈桂花, 贺文斌, 徐黎明, 等. 传染性胰腺坏死病毒 VP3 抗血清的制备及应用[J/OL]. 大连海洋大学学报: 1-8[2021-06-15]. <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-246>.
- [65] 吕晓楠, 徐立蒲, 张文, 等. 传染性造血器官坏死病毒 RT-RAA 快速检测方法的建立[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(3): 22-26.
- [66] 刘帅, 王荻, 卢彤岩, 等. 实时荧光定量 PCR 扩增特异性 vapA 基因检测杀鲑气单胞菌[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1928-1935.
- [67] 韩妹伊, 何亚鹏, 时晓, 等. 传染性造血器官坏死病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(7): 76-81.
- [68] 张宇雷, 倪琦, 刘晃, 等. 挪威大西洋鲑鱼工业化养殖现状及对中国的启示[J]. 农业工程学报, 2020, 36(8):310-315.
- [69] 陈桂花, 卢彤岩, 赵景壮, 等. 传染性造血器官坏死病疫苗的研究进展[J]. 水产学杂志, 2021, 34(2):1-7.
- [70] 王璐瑶. 鳊传染性脾肾坏死病毒 & 弹状病毒二联灭活疫苗制备关键技术及其免疫应答机制研究[D]. 辽宁大连: 大连海洋大学, 硕士学位论文, 2019.

- [71] TANG L, KANG H, DUAN K, *et al.*. Effects of three types of inactivation agents on the antibody response and immune protection of inactivated IHNV vaccine in rainbow trout[J]. *Viral Immunol.*, 2016, 29(7):430-435.
- [72] 刁菁, 李乐, 王晓璐, 等. 纳米锌对杀鲑气单胞菌的灭活效果及其细胞毒性[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(3):146-154.
- [73] 田园园, 叶星. 鱼用基因工程疫苗研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2012, 14(5):145-152.
- [74] DIAO J, LI L, FAN Y, *et al.*. Recombinant outer membrane protein C of *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, a potential vaccine candidate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J/OL]. *Microb. Pathog.*, 2020, 145:104211. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104211>.
- [75] 徐黎明, 卢彤岩, 赵景壮, 等. 一种中国虹鳟传染性造血器官坏死病核酸疫苗及其应用:CN105861450B[P]. 2019-08-02.
- [76] 李渊, 徐黎明, 赵景壮, 等. 传染性造血器官坏死病核酸疫苗的构建及其在虹鳟接种部位的消长规律[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6):1280-1287.
- [77] 李渊, 赵景壮, 刘森, 等. 传染性造血器官坏死病核酸疫苗的构建及其抗性基因对环境细菌抗性的影响[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(1):220-227.
- [78] 李守湖, 范玉锋, 高欣, 等. 传染性造血器官坏死症重组腺病毒载体的构建[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(5):37-42.
- [79] 巩华, 黄志斌. 弧菌病疫苗研究开发及其使用效果影响因素[J]. *广东饲料*, 2012, 21(1):44-47.
- [80] XU L, ZHAO J, LIU M, *et al.*. Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 5700[2021-06-18]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06143-w>.
- [81] 刘帅, 卢彤岩, 李绍戊. 冷水性鱼类疫苗研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(1):74-79.
- [82] 徐晓丽, 徐林通, 郑艳坤, 等. 佐剂在水产疫苗中的研究进展[J]. *饲料工业*, 2021, 42(8):59-64.
- [83] 刘帅. 两种佐剂对虹鳟杀鲑气单胞菌灭活疫苗免疫效果的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 硕士学位论文, 2017.
- [84] 孙祥. 基于非油乳佐剂的大菱鲂鳃弧菌和杀鲑气单胞菌灭活疫苗开发[D]. 上海: 华东理工大学, 硕士学位论文, 2020.