

DOI: 10.11964/jfc.20221213843

石斑鱼养殖病原混合感染研究与分析



黄琳¹, 刘明珠¹, 余庆^{1*}, 韩书煜², 韦冬冬¹, 施金谷²,
韦红玲¹, 李鹏飞^{1*}

1. 广西科学院, 广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心, 广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西壮族
自治区水产技术推广站, 广西南宁 530199

摘要:

【目的】了解养殖石斑鱼常见疾病病原混合感染特性及规律, 以指导石斑鱼的病害防控。

【方法】采用 PCR 方法对从广西地区(北海、钦州、防城港市)石斑鱼养殖场采集的发病石斑鱼展开病毒性病原及细菌性病原的流行病原调查, 并将发病鱼中的病原通过细胞特异性方法分离病毒性病原, 利用平板(LB 和 TCBS)划线分离法分离细菌性病原。然后将分离的病原感染石斑鱼细胞以确定病原的感染性。

【结果】发病的石斑鱼存在虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)、神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)、哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及美人鱼发光杆菌单一感染及混合感染现象, 且细菌性疾病中还存在细菌的种间与种内混合感染。此外, 石斑鱼病毒性疾病和细菌性疾病在夏季和秋季病原的检出率均高于春季与冬季, 其中秋季病原检出率最高。与此同时, 从发病鱼体内分离的病毒性病原与细菌性病原均可感染石斑鱼单一细胞。

【结论】在发病石斑鱼中, 无论是病毒性疾病或是细菌性疾病, 多以二重感染为主, 细菌多重感染也是常见类型, 且混合感染类型较为复杂。结果可为石斑鱼病原混合感染致病机理研究提供方向, 并为石斑鱼养殖的疾病防控提供理论依据。

关键词: 石斑鱼; 养殖病害; 共感染; 病毒感染; 细菌感染

第一作者: 黄琳, 从事水生动物医学与免疫学研究, E-mail: hlin556@163.com



通信作者: 余庆, 从事水生动物医学研究, yu_qing1990@163.com;
李鹏飞, 从事水产高效生态养殖技术研究, E-mail: pfli2014@126.com

资助项目: 国家自然科学基金(U20A20102); 广西自然科学基金(2022GXNSFBA035521); 广西农业科技自筹经费项目(Z2022167); 国家现代农业产业技术体系(nycytxgxcxt-d-2021-08-02)

收稿日期: 2022-12-16
修回日期: 2023-04-23

文章编号:
1000-0615(2025)03-039416-11
中图分类号: S 941
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

混合感染在自然界中普遍存在。混合感染是指两种或多种不同的病原感染宿主, 其中每种病原都具有致病作用, 并与其他病原同时对宿主造成伤害。许多畜牧场大规模的发病由多种致病因素共同作用所致, 其中病原混合感染是常见的致病因素之一。例如, 猪场暴发的“高热病”是临床中一种典型的混合感染案例, 主要以经典及高致病性的猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)混合猪圆环病毒 II 型感染(porcine circovirus type 2 infection, PCV 2)为主, 并继发副猪嗜血杆菌(haemophilus parasuis, Hps)、猪附红细胞体等细菌病原的感染^[1]。临床调查还发现, 鸡慢性呼吸道病、传染性支



气管炎、鸡新城疫及鸡传染性喉气管炎 4 种家禽呼吸道传染病常常一并发生在发病鸡群中^[2], 而发病的鸡群中表现为 A 型疱疹病毒、副黏病毒属新城疫病毒及大肠杆菌的混合感染^[3]。病原的混合感染给临床诊断和治疗造成了困难, 因此研发多病原快速、敏感、高效的检测方法以及探究病原混合感染的致病机理对于防治疾病的混合感染具有重要意义。目前, 病原混合感染已在畜禽领域有较多且较深的研究, 包括病原检测技术及病毒与病毒共感染、病毒与细菌共感染、细菌与细菌共感染的致病机理研究^[4-6], 这些研究为畜禽病原共感染防治策略的实施提供了理论基础。

除了畜禽物种能给人们提供优质蛋白质来源, 水产养殖品种如鱼类、贝类和虾类等也是人们获取蛋白质的有效途径。然而水产养殖品种由于所处的水环境复杂多变, 暴发的疾病中也常常伴有多种病原的混合感染。在养殖鱼类疾病的临床诊断中发现, 发病鱼体中可检测出细菌与细菌的共感染、细菌与病毒的共感染、细菌与寄生虫的共感染、病毒与病毒的共感染^[7-9]。由于生存环境的特殊性, 鱼类病原混合感染的检测与治疗也比畜禽物种更具挑战。因此, 鱼类病原的混合感染近年来也受到越来越多研究者的关注。目前, 已有细菌共感染、病毒共感染、寄生虫共感染、寄生虫和细菌共感染、寄生虫和病毒共感染、细菌和病毒共感染及真菌和细菌共感染的研究报道^[10], 这些研究为水生动物混合感染致病机理的深入探究提供了理论依据。

石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) 肉质细腻鲜美, 富含营养, 并低脂高蛋白, 被认为是一种名贵的海水养殖鱼类, 具有极高的经济价值。然而, 种质资源的退化, 工业化和城市化进程的加快, 加剧了近海石斑鱼养殖环境的恶化趋势, 随之而来的便是日渐严重的石斑鱼养殖病害多发。多种病原的混合感染不仅给石斑鱼的诊断及防治带来很大困扰, 而且也成为石斑鱼发病率及死亡率上升的主要原因之一, 从而阻碍了石斑鱼养殖业的健康发展。虽然目前国内外已有相关水产养殖病原混合感染的研究, 但仍处于起步阶段。为了解石斑鱼养殖病原混合感染情况, 实验以人工养殖石斑鱼病毒性疾病及细菌性疾病为研究目标, 从广西石斑鱼养殖场采集样品,

使用 PCR 方法对石斑鱼虹彩病毒 (SGIV)、神经坏死病毒 (NNV)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 及美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*) 常见疾病感染情况进行检测分析, 并将分离到的病原进行细胞感染实验, 试图初步了解上述病原的流行态势及混合感染情况, 为石斑鱼病原混合感染致病机理的研究及其疫病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 伦理声明

本研究获得广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心实验动物管理和使用伦理委员会批准 (No20210101-F001), 实验过程中操作人员严格遵守广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心伦理规范, 并按照广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心伦理委员会制定的规章制度执行, 涉及鱼类的程序按照《动物研究: 体内实验报告指南》进行。

1.2 试剂盒与引物

Viral DNA/RNA Kit、DEPC 水及 PCR 所用试剂胶回收试剂均购自康为世纪生物科技股份有限公司; LB 和 TSB 培养基购自索莱宝生物科技有限公司; T 载体及连接酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 引物由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成 (表 1)。

1.3 组织样品、细胞及病毒

检测样品来源于广西北海、钦州、防城港市的石斑鱼养殖场, 采集带有病征的石斑鱼肝脏、脾脏、肾脏和脑组织等检测样品共 52 份。

石斑鱼脾脏细胞 (grouper spleen, GS) 从杂交石斑鱼 (*Epinephelus fuscogouttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) 脾脏组织中分离, 用含有 10% FBS 的 L15 培养基在 28 °C 细胞培养箱中培养。SGIV 与 NNV 为本实验室分离的广西毒株^[11-12], 冻存于 -80 °C 冰箱。

1.4 样品 RNA 或 DNA 提取

剪取部分组织样品置于研磨仪中研磨。组织研磨完毕, 将匀浆液反复冻融 3 次后于 4 °C

表 1 检测所需的 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primers for PCR detection

引物名称 primers	引物序列 primer sequences	片段 大小/bp fragment size
SGIV-F1	5'-ATGACTTGTACAACGGGTGCTGG CG	1 395
SGIV-R1	5'-TTACAAGATAGGGAACCCCATG GA-3'	
SGIV-F2	5'-CGAAACAAATAGGCTCGGCG-3'	952
SGIV-R2	5'-AGCGTTGGTCAATCTTCCGT-3'	
NNV-F1	5'-ATGGTACGCAAAGGTGAGAAG-3'	1 017
NNV-R1	5'-TTAGTTTCCGAGTCAACCCTG-3'	
NNV-F2	5'-AGCCGGGACAGGAACAGAC-3'	777
NNV-R2	5'-CCAACAGGCAGCAGGATTT-3'	
16S rRNA-27F	5'-GAGTTTGATCTCGGCTCAG-3'	1 466
16S rRNA-1 492R	5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
SGIV-MCP-qF	5'-GCACGCTTCTCTCACCTTCA-3'	
SGIV-MCP-qR	5'-AACGGCAACGGGAGCACTA-3'	213
NNV-CP-qF	5'-CAACTGACAACGATCACACCTT C-3'	230
NNV-CP-qF	5'-CAATCGAACACTCCAGCGACA-3'	
β -actin-qF	5'-TACGAGCTGCTGACGGACA-3'	244
β -actin-qR	5'-GGCTGTGATCTCCTTCTGCA-3'	

离心机中 12 000 r/min 离心 10 min, 收集匀浆液上清液, 于 -80°C 冰箱冻存备用。

DNA/RNA 的提取参照试剂盒说明书进行如下操作: ①取 1.5 mL 离心管, 加入 20 μL 蛋白酶 K, 向离心管中加入 200 μL 组织匀浆液上清及 200 μL Buffer GL, 涡旋振荡 15 s; ②样品放置 56°C 水浴锅中孵育 15 min, 短暂离心后加入 250 μL 无水乙醇, 涡旋振荡 15 s, 室温放置 5 min; ③样品短暂离心后转移至 RNase-Free Columns 吸附柱中, 12 000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中; ④向吸附柱中加入 500 μL Buffer GW1, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中; ⑤向吸附柱中加入 500 μL Buffer GW2, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中; ⑥向吸附柱中加入 500 μL 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中; ⑦12 000 r/min 离心 3 min, 弃掉收集管中的废液后将吸附柱室温放置数分钟, 彻底晾干, 使无水乙醇完全挥发; ⑧将吸附柱置于一个新的 1.5 mL 无酶离心管, 向吸附柱膜的中间部位悬空加入 20~150 μL Buffer

RE 或灭菌水, 室温放置 2~5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集核酸。提取的核酸用于 PCR 检测。

1.5 病原菌的分离与检测

用平板 (LB 和 TCBS) 划线分离法从病鱼的肝脏、脾脏、肾脏和脑组织中分离细菌, 37°C 条件下培养 24 h 后挑取优势菌落, 将优势菌在 LB 或 TCBS 培养基中纯化培养 2~3 次, 以此获得纯培养菌。同时, 将优势菌株用普通海水营养液体培养基培养 (每 1 000 mL 中, 酵母浸膏 1.0 g, 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 5.0 g, NaCl 30.0 g, 调 pH 至 7.6~7.8), 菌悬液与等体积 =50% 的甘油混合, 保存于 -80°C 的冰箱中备用。

病原菌经 37°C 振荡培养 20 h 后, 以菌液为模板, 利用 16S rRNA 特异性引物按照 *Taq* 酶的使用方法及操作步骤扩增 16S rRNA 基因。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察后进行胶回收, 将回收的产物与 T 载体连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行核酸序列的测定。利用 ClustalX 将测序结果与 GenBank 中获得的同源性最高的细菌 16S rRNA 进行多重比对后, 通过 MEGA4 软件构建系统进化树进行分析。

1.6 病毒感染 GS 细胞

GS 细胞 (3×10^5 /孔) 接种至 24 孔细胞板中于 28°C 细胞培养箱过夜培养, SGIV(MOI=0.5) 或 NNV(MOI=1) 分别加入细胞中感染至 48 h, 利用光学显微镜观察病毒感染细胞的病变效应 (cytopathic effect, CPE), 通过实时荧光定量 PCR (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 检测病毒基因的表达。

1.7 细菌感染 GS 细胞

GS 细胞 (3×10^5 /孔) 接种至 24 孔细胞板中于 28°C 细胞培养箱培养过夜, 哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及美人鱼发光杆菌分别按 1:100 的比例接入 LB 培养基中, 于 37°C 摇床中培养至 OD=0.5, 然后各细菌按照 MOI=5 的感染复数感染 GS 细胞, 通过光学显微镜观察 CPE。

2 结果

2.1 样品采集结果

发病石斑鱼表现为全身发黑、体表发炎溃

疡(图 1), 鳍条缺损, 眼白浑浊变暗、眼球突出, 肝脏、脾脏、肾脏肿大、有白斑。发病的鱼解剖后发现脾脏发黑肿大, 有腹水, 肝脏和肠道形状不正常。

2.2 SGIV 检测结果

使用巢氏 PCR 的方法对采集到的样品进行 SGIV MCP 基因片段的二轮扩增, PCR 产物电泳结果显示(图 2), 检测样品第 2 轮扩增出与预期大小一致的 952 bp 的片段, 所检测的病料中, SGIV 阳性样品 44 份, 阳性率为 84.6%。

2.3 NNV 检测结果

使用巢氏 PCR 的方法对采集到的样品进行 NNV CP 基因片段的二轮扩增, PCR 产物电泳结果显示, 检测样品第 2 轮扩增出与预期大小一致的 777 bp 的片段(图 3), 所检测的病料中, NNV 阳性样品 32 份, 阳性率 61.5%。

2.4 SGIV 与 NNV 感染 GS 细胞

广西地区分离的 SGIV 与 NNV 均能有效感染 GS 细胞。SGIV 的感染可引起 GS 细胞出现

不同程度的脱落、皱缩等病变效应(图 4-a), 而 NNV 的感染可引起 GS 细胞出现空泡的病变效应(图 4-a)。同时, 感染的 GS 细胞检测出 SGIV MCP 基因或 NNV CP 基因转录水平的高表达(图 4-b, c)。

2.5 细菌分离检测结果

将分离的病原菌进行 16S rRNA PCR 扩增后发现, 检测的样品中出现频率较高的病原菌有创伤弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及美人鱼发光杆菌。其中创伤弧菌阳性率为 9.7%, 共分离出 4 株不同的创伤弧菌; 哈维氏弧菌阳性率为 54.83%, 共分离出 4 株不同的哈维氏弧菌; 溶藻弧菌阳性率为 19.3%, 共分离出 2 株不同的溶藻弧菌; 副溶血弧菌阳性率为 29%, 共分离出 4 株不同的副溶血弧菌; 嗜水气单胞菌阳性率为 6.5%, 没有分离到不同的嗜水气单胞菌株; 美人鱼发光杆菌阳性率为 22.6%, 共分离出 6 株不同的美人鱼发光杆菌。其中还有 2 株为无法确定的弧菌属其他种细菌(图 5)。



图 1 发病的珍珠龙胆石斑鱼(棕点石斑鱼♀× 鞍带石斑鱼♂)
Fig. 1 Diseased grouper (*E. fuscoguttatus* ♀× *E. lanceolatus* ♂)

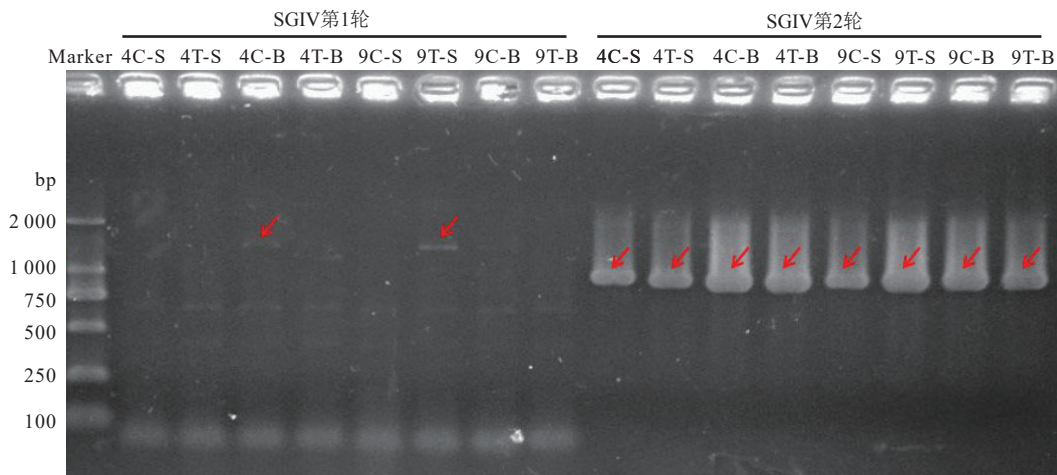


图 2 SGIV MCP 基因 PCR 扩增结果

C. 对照; T. 实验; B. 大鱼; S. 小鱼, 下同。

Fig. 2 SGIV MCP gene amplification

C. control; T. test; B. big fish; S. small fish, the same below.

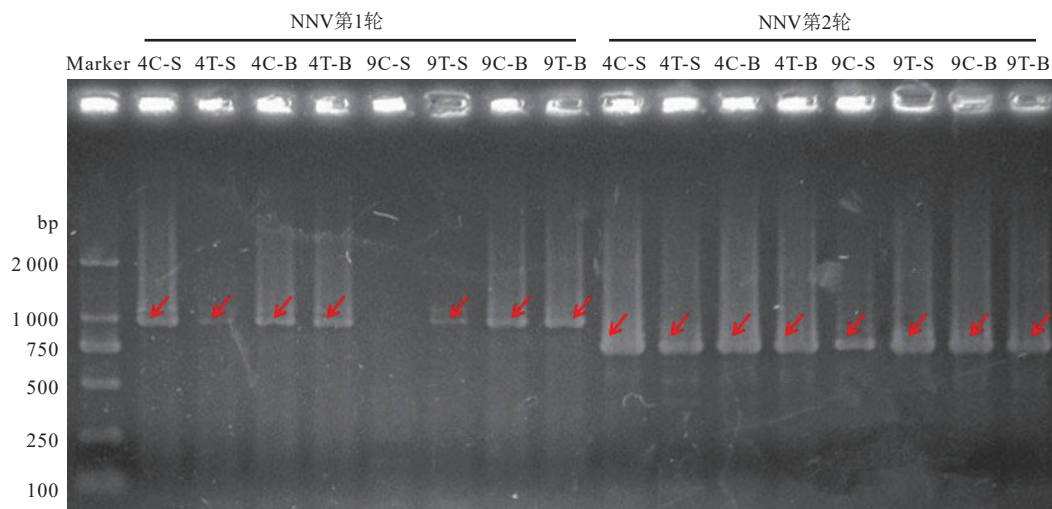
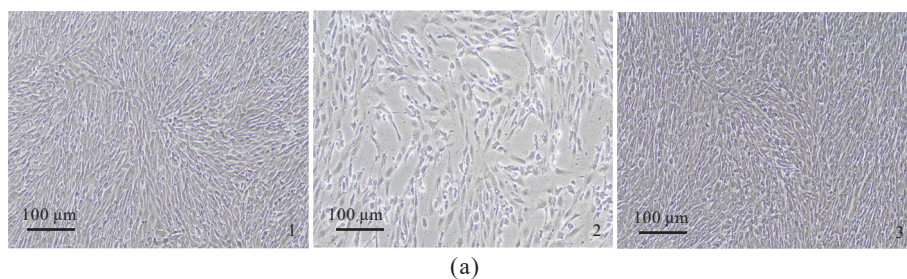


图3 NNV CP基因PCR扩增结果

Fig. 3 NNV CP gene amplification



(a)

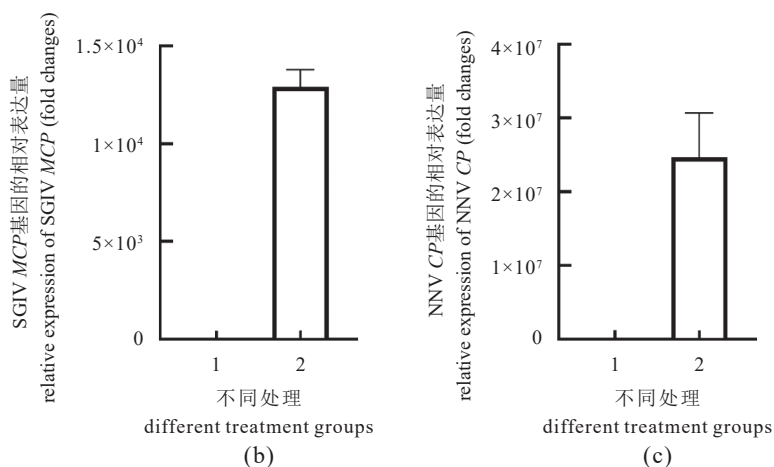


图4 SGIV与NNV感染GS细胞分析

(a) SGIV与NNV分别感染GS细胞后的光学显微镜观察, 图中1~3分别表示对照组、SGIV感染组及NNV感染组; (b) SGIV与感染GS细胞后, qPCR检测SGIV MCP基因的表达, 图中1和2分别表示对照组及SGIV感染组; (c) NNV感染GS细胞后, qPCR检测NNV CP基因的表达, 图中1和2分别表示对照组及NNV感染组。

Fig. 4 The analysis of SGIV and NNV infection in GS cells

(a) observation of GS cells infected with SGIV and NNV under microscopy, where 1~3 is the control group, SGIV infected group, and NNV infected group, respectively; (b) after SGIV infection with GS cells, qPCR was used to detect the expression of SGIV MCP gene. 1 and 2 is the control group and SGIV infection group, respectively; (c) after infecting GS cells with NNV, qPCR was used to detect the expression of NNV CP gene. 1 and 2 is the control group and NNV infected group, respectively.

2.6 细菌感染 GS 细胞

为了验证从发病石斑鱼分离鉴定的细菌能否感染石斑鱼细胞, 将嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和美人鱼发光杆菌分别感染 GS 细胞, 结果发现, 这些细菌都能感染 GS 细胞, 并引起 GS 细胞产生不同的细胞病变效应 (图版)。

2.7 石斑鱼疾病共感染类型

病毒单一感染样品 24 份, 占 46.1%; 2 重感染样品 26 份, 占 50% (表 2)。细菌单一感染 22 份, 占 70.97%; 二重感染 7 份, 占 22.58%;

多重感染 2 份, 占 6.46% (表 3)。

2.8 不同季节石斑鱼的检测结果

不同季节发病石斑鱼病原检测结果表明, 石斑鱼病毒性疾病病原在不同季节的检出率存在差异。春季 (3—5 月, 约 22 °C) NNV 检出率为 13%, 高于 SGIV; 夏季 (6—8 月, 25 °C~30 °C) SGIV 的检出率为 19%, 高于 NNV; 秋季 (9—11 月, 约 22 °C) SGIV 和 NNV 的检出率为全年最高, 分别为 58% 及 40%。冬季 (12 月至次年 2 月, 约 20 °C) 2 种病毒的检出率相对全年较低, 分别为 4% 及 6% (图 6-a)。同时, 石斑鱼细菌性疾病病原在 4 个季节的检出率也

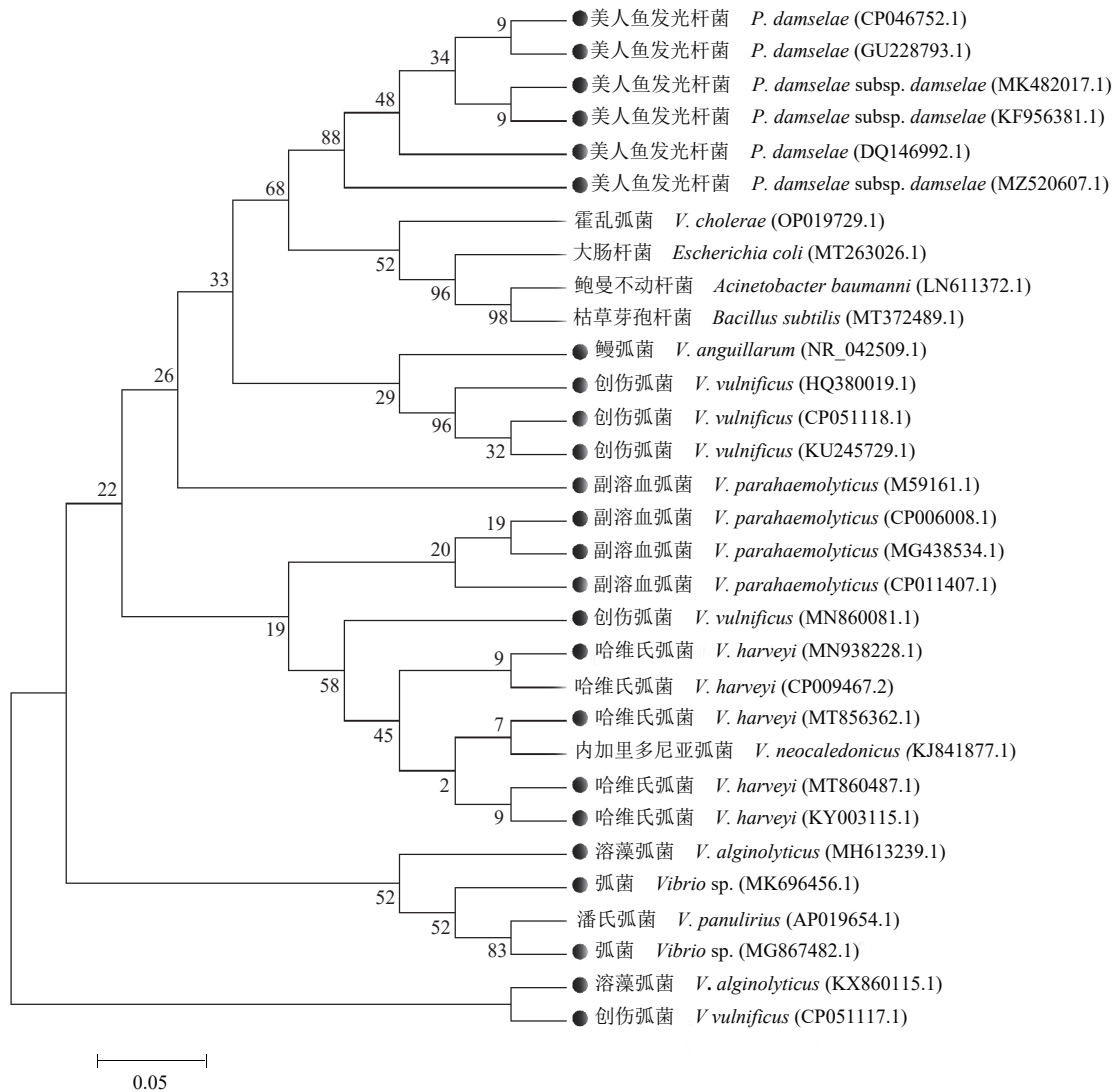
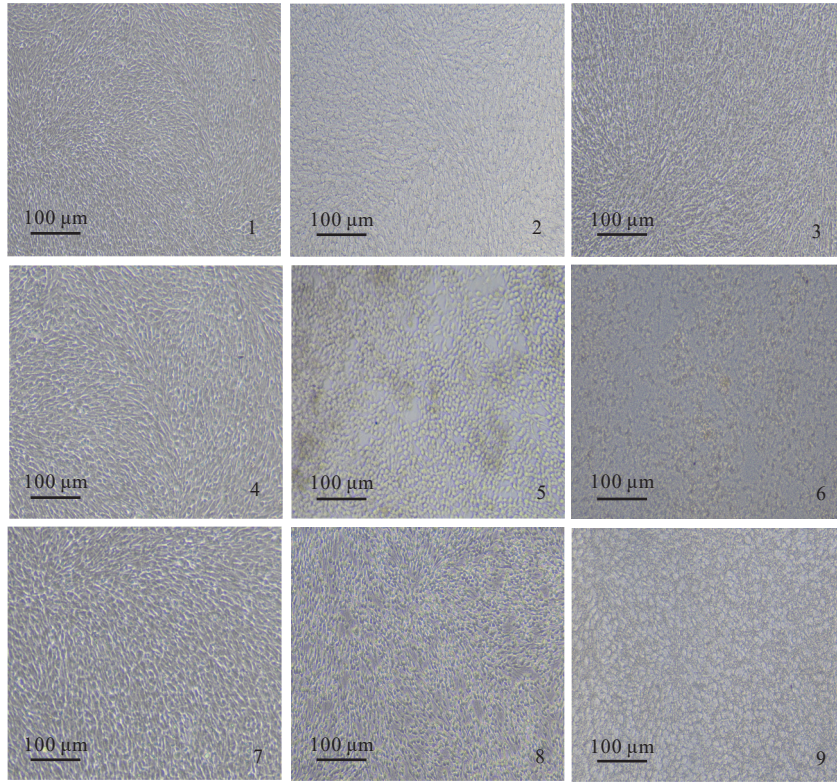


图 5 基于 16S rRNA 序列构建的弧菌与杆菌的系统分支图

黑点标注的为分离到的细菌菌株。

Fig. 5 Systematic branch diagram of *Vibrio* and *Bacillus* based on 16S rRNA sequence

The ones marked with black spot are the isolated bacterial strains.



图版 细菌感染 GS 细胞

1、4、7 为未感染的正常细胞；2 为创伤弧菌感染的细胞；3 为副溶血弧菌感染的细胞；5 为哈维氏弧菌感染的细胞；6 为溶藻弧菌感染的细胞；8 为嗜水气单胞菌感染的细胞；9 为美人鱼发光杆菌感染的细胞。

Plate Bacterial infection in GS cells

1, 4 and 7 are present uninfected normal cells; 2 is cells infected with *V. vulnificus*; 3 is cells infected with *V. parahaemolyticus*; 5 is cells infected with *V. harveyi*; 6 is cells infected with *V. alginolyticus*; 8 is cells infected with *A. hydrophila*; 9 is cells infected with *P. damsela*.

表 2 不同病毒的单一感染及共感染情况

Tab. 2 Single infection and co-infection of different viruses

病毒名称 viral name	阳性样品数目/个 number of positive samples	阳性率/% positive rate
虹彩病毒 SGIV	18	34.6
神经坏死病毒 NNV	6	11.5
虹彩病毒+神经坏死病毒 SGIV+NNV	26	50

有很大不同。秋季是细菌性病原检测率最高的季节，常见的哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及美人鱼发光杆菌在发病的石斑鱼中都被检测到，检测率分别为 32%、6%、9%、15%、6% 及 15%。而哈维氏弧菌在 4 个季节都能在感染石斑鱼中发现。其次在夏季、秋季及冬季都能在发病的石斑鱼中检测出溶藻弧菌。创伤弧菌主要在春季及秋季发病的石斑鱼中检出。副溶血弧菌及美人鱼发光杆菌在夏季及秋季中检测出阳性率(图 6-b)。

3 讨论

自然界中普遍存在混合感染现象，临床检测中经常发现多种病原混合感染病例^[1-3, 5]。然而，大多数研究仅针对单一病原的致病特征及致病机理，很多防控方法及用药治疗策略也是仅局限于单一病原，从而导致这些防治手段在遇到多种病原混合感染时效果微弱甚至无效。实际上，混合感染对机体造成的病征及损伤程度与单一病原感染相比差异较大，甚至更严重。研究发现，混合感染的病原之间相互作用可能会引起原病原的致病机制发生改变^[5]。目前，混合感染的致病机理在畜禽领域已有较多研究，但是在水产领域不论是病原检测方面还是病原致病机理研究，以及防控用药治疗策略都是针对单一病原^[13-18]，而混合感染的研究仍处于起步阶段，为此本研究对广西地区石斑鱼养殖场采集的发病石斑鱼进行病毒性病原及细菌性病原的检测与分析，旨在为石斑鱼病原混合感染

表 3 不同细菌的单一感染及共感染情况
Tab. 3 Single infection and co-infection of different bacteria

细菌名称 bacterial name	阳性样品数目/个 number of positive samples	阳性率/% positive rate
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	8	25.81
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	3	6.45
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	3	9.68
副溶血弧菌 <i>V. parahemolyticus</i>	4	12.90
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	1	3.23
美人鱼发光杆菌 <i>P. damsela</i>	4	12.90
哈维氏弧菌+溶藻弧菌 <i>V. harveyi</i> + <i>V. alginolyticus</i>	2	6.45
副溶血弧菌+哈维氏弧菌 <i>V. parahemolyticus</i> + <i>V. harveyi</i>	3	9.68
哈维氏弧菌+美人鱼发光杆菌 <i>V. harveyi</i> + <i>P. damsela</i>	2	6.45
溶藻弧菌+哈维氏弧菌+ 副溶血弧菌 <i>V. alginolyticus</i> + <i>V. harveyi</i> + <i>V. parahemolyticus</i>	1	3.23
哈维氏弧菌+副溶血弧菌+ 美人鱼发光杆菌+ 嗜水气单胞菌+创伤弧菌 <i>V. harveyi</i> + <i>V. parahemolyticus</i> + <i>P. damsela</i> + <i>A. hydrophila</i> + <i>V. vulnificus</i>	1	3.23

致病机理的探究提供方向, 既为石斑鱼疫病的防控提供理论依据, 也为水产病原的混合感染提供新思路。

本研究对广西地区人工养殖石斑鱼疾病的混合感染情况进行了初步调查与分析。病原检测结果显示石斑鱼病毒性疾病病原单独感染少, 主要以共感染为主, 此验证了病毒混合感染在水生动物中是一种常见的现象^[19]的结论。SGIV 是从患病的石斑鱼中分离出的一种新型的包膜双链大 DNA 蛙病毒, 对鱼苗和成年石斑鱼的致死性高达 90%^[20]。NNV 是一种 RNA 病毒, 被公认为全球海洋水产养殖的主要传染性威胁之一^[21], 可感染 120 多种鱼类, 并在世界各地的水产养殖设施中造成养殖鱼类高死亡率^[22]。SGIV 与 NNV 都被证明有着不同的免疫逃逸机制, 可损害宿主免疫机能, 使宿主免疫力降低^[23-25]。可想而知, SGIV 与 NNV 并发感染, 或引起继发感染, 将会对石斑鱼养殖业的可持续发展造成重大威胁。因此, 深入了解 SGIV 与 NNV 的感染机制可为防治病毒暴发感染策略的实施提供理论基础。此外, 本研究还

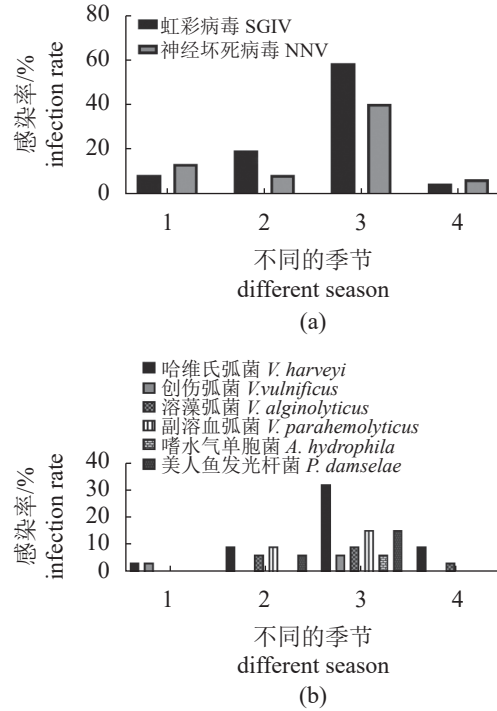


图 6 不同季节发病石斑鱼中的病原检测结果

(a) 不同季节发病石斑鱼中病毒的检测结果; (b) 不同季节发病石斑鱼中细菌的检测检测结果。1-4 分别表示春季、夏季、秋季和冬季。

Fig. 6 Results of pathogen detection in diseased grouper from different seasons

(a) virus detection in diseased grouper from different seasons; (b) bacterial detection in diseased grouper from different seasons. 1-4 are spring, summer, autumn and winter, respectively.

发现广西地区分离的 SGIV 与 NNV 毒株均能感染石斑鱼脾脏细胞。然而两者是否能同时感染单一细胞以及二者是否存在相互作用仍需要进一步研究。

除了病毒共感染, 本研究的检测结果还揭示了发病石斑鱼中存在细菌单一感染及细菌种内与种间的混合感染现象。弧菌病是国内外公认的危害海水鱼类最大的病害之一, 可引起海水鱼类高感染率及死亡率, 主要由哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌、需钠弧菌 (*V. natriegens*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、轮虫弧菌 (*V. rotiferianus*)、杀鲑弧菌 (*V. salmonicida*)、海利斯顿氏菌 (*V. pelagius*)、奥氏弧菌 (*V. ordalii*)、费氏弧菌 (*V. fischeri*) 以及最小弧菌 (*V. mimicus*) 等引起^[26]。本研究结果中, 哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌是主要感染广西地区养殖石斑鱼的细菌性病原, 并且存在同种不同株细菌的混合感染现象。

其中哈维氏弧菌阳性率最高, 表明引起广西地区养殖石斑鱼弧菌病的最主要病原是哈维氏弧菌, 该结果与华南地区海水养殖鱼类的调查结果相似^[26]。华南地区海水养殖鱼类分离的哈维氏弧菌共有 18 株, 且存在一株强毒株^[26], 然而从广西地区养殖石斑鱼中分离的 4 株哈维氏弧菌是否像华南地区海水养殖鱼类分离的哈维氏弧菌那样具有不同的宿主敏感性需要进一步研究。此外, 本研究的结果显示, 嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和美人鱼发光杆菌都能感染石斑鱼单一细胞, 这些细菌是否能够合并感染石斑鱼单一细胞, 或能否与 SGIV 或 NNV 同时感染石斑鱼单一细胞, 其致病机理值得深入研究。

石斑鱼的发病是病原体、鱼体和养殖环境共同作用的结果。水温不适宜或过度拥挤的养殖环境等均可能会增加鱼类对弧菌病的敏感性, 使鱼类受到压力而免疫功能受损。而多雨季节容易引起石斑鱼多种病毒病的暴发。通过分析不同季节发病石斑鱼的病原检测结果发现, 不论是病毒性疾病还是细菌性疾病, 夏季和秋季病原的检出率高于春季与冬季, 其中秋季病原检出率最高。由于夏季的广西各地持续高温, 台风、雷雨频繁, 在石斑鱼养殖中, 因水体施肥较多, 饲料投喂量较大, 水体中粪便和残饵堆积, 水温高, 闷热, 水质很容易变差, 因此给细菌和病毒创造了繁殖和传播的环境。同时, 长期的高投喂量和水质的变化会造成石斑鱼肝胰脏的损伤和病变, 引起石斑鱼免疫力和抗应激能力下降, 多种病原因此乘虚而入, 容易暴发病毒性神经坏死病、虹彩病毒病及弧菌病等。而秋季由于早晚温差日渐加大, 水体昼夜温差较大, 且高温、暴雨、台风间接出现, 由此带来养殖水温日夜温差逐渐增大和养殖水体水质变化频繁, 养殖动物应激源增加, 病毒性神经坏死病、虹彩病毒病、细菌性败血症、刺激隐核虫病等疾病就会接踵而至, 特别在秋季末期, 水温的下降更为多种病毒的传播与繁殖提供了有利条件^[19, 27]。综上, 季节变化等因素会对病原及宿主造成一定影响, 因此根据气候特征及疾病暴发的病原类型采取针对性的防治手段, 对于减少疾病暴发带来的损失具有重要意义。

综上所述, 本研究对广西地区石斑鱼养殖场采集的发病石斑鱼进行了病毒性病原与细菌

性病原共感染的检测与分析。结果显示, 石斑鱼疾病的暴发中存在多种病原混合感染, 无论是病毒性疾病或是细菌性疾病, 多以二重感染为主, 细菌多重感染也是常见类型, 且共感染类型较为复杂。秋季是病原出现频率最高的季节。本研究为石斑鱼病原共感染致病机理的深入探究提供了方向, 并为石斑鱼养殖的疫病防控提供了理论基础。

参考文献 (References):

- [1] 张浩吉. 猪场常见多病原混合感染的综合防治措施 [J]. *兽医导刊*, 2016(3): 20-22.
Zhang H J. Comprehensive prevention and control measures for common multi-pathogen mixed infections in pig farms[J]. *Veterinary Orientation*, 2016(3): 20-22 (in Chinese).
- [2] 程泽华. 家禽呼吸道病原混合感染的诊断及综合防控措施 [J]. *畜禽业*, 2004(2): 67.
Cheng Z H. Diagnosis and comprehensive prevention measures of mixed infection of respiratory pathogens in poultry[J]. *Live-stock and Poultry Industry*, 2004(2): 67 (in Chinese).
- [3] 刘华栋, 李婷婷, 陆冰洋, 等. 鸡多种病原混合感染的研究 [J]. *中国动物保健*, 2017, 19(11): 85-88.
Liu H D, Li T T, Lu B Y, *et al.* Study on mixed infection of multiple pathogens of chicken[J]. *China Animal Health*, 2017, 19(11): 85-88 (in Chinese).
- [4] Hu L, Lin X Y, Yang Z X, *et al.* A multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies in swines[J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2015, 18(4): 715-723.
- [5] 江宁, 尹航, 张岩威, 等. H9N2 亚型禽流感病毒与其他病原混合感染的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(9): 3447-3455.
Jiang N, Yin H, Zhang Y W, *et al.* Research progress on co-infection of H9N2 subtype avian influenza virus with other pathogens[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(9): 3447-3455 (in Chinese).
- [6] Eichelberger K R, Cassat J E. Metabolic adaptations during staphylococcus aureus and *Candida albicans* co-infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 797550.
- [7] 刘荣军, 邓绿洲, 黄小丽, 等. 草鱼一例烂鳃、赤皮、肠炎混合感染疾病的诊治 [J]. *科学养鱼*, 2013(3): 66.
Liu R J, Deng L Z, Huang X L, *et al.* Diagnosis and treatment of a mixed infection disease of grass carp with rotten gill, red

- skin and enteritis[J]. *Scientific Fish Farming*, 2013(3): 66 (in Chinese).
- [8] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(8): 1170-1177.
- Deng G C, Jiang X Y, Ye X, *et al.* Isolation, identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic grass carp[J]. *Microbiology*, 2009, 36(8): 1170-1177 (in Chinese).
- [9] 杨成年, 邱玉林, 陈胜江, 等. 一例草鱼寄生虫病与烂鳃病混合感染的诊治 [J]. *科学养鱼*, 2019(11): 49-50.
- Yang C N, Qiu Y L, Chen S J, *et al.* A case of diagnosis and treatment for mixed infection of parasitic disease and gill-rotten of grass carp[J]. *Scientific Fish Farming*, 2019(11): 49-50 (in Chinese).
- [10] Kotob M H, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, *et al.* The impact of co-infections on fish: a review[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47(1): 98.
- [11] Xiao H H, Liu M Z, Li S Q, *et al.* Isolation and characterization of a ranavirus associated with disease outbreaks in cultured hybrid grouper(♀ tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ giant grouper *E. lanceolatus*) in Guangxi, China[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2019, 31(4): 364-370.
- [12] Li P, Yu Q, Li F, *et al.* First identification of the nervous necrosis virus isolated from cultured golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi, China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(7): 1177-1180.
- [13] Liu M Z, Xiao H H, Wu S T, *et al.* Aptamer-based high-throughput screening model for medicinal plant drugs against SGIV[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(11): 1479-1482.
- [14] Li C, Wang L Q, Liu J X, *et al.* Singapore grouper iridovirus (SGIV) inhibited autophagy for efficient viral replication[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1446.
- [15] Liu M Z, Xiao H H, Zhang Q, *et al.* Antiviral abilities of *Curcuma kwangsiensis* ingredients against grouper iridoviral infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(1): 351-361.
- [16] Liao W Y, Huang L, Han S Y, *et al.* Review of medicinal plants and active pharmaceutical ingredients against aquatic pathogenic viruses[J]. *Viruses*, 2022, 14(6): 1281.
- [17] Wei H L, Liu M Z, Ke K, *et al.* Study on aptamer based high throughput approach identifies natural ingredients against RGNNV[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(11): 1711-1719.
- [18] Huang L, Li M M, Wei H L, *et al.* Research on the indirect antiviral function of medicinal plant ingredient quercetin against grouper iridovirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 124(1): 372-379.
- [19] Sah Putra B, Hick P M, Hall E, *et al.* Prevalence of *Infectious Spleen and Kidney Necrosis* virus (ISKNV), nervous necrosis virus (NNV) and ectoparasites in juvenile *Epinephelus* spp. farmed in Aceh, Indonesia[J]. *Pathogens*, 2020, 9(7): 578.
- [20] Zheng Q, Huang Y H, Wang L Q, *et al.* SGIV induced and exploited cellular de novo fatty acid synthesis for virus entry and replication[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 180.
- [21] Lampert Y, Berzak R, Davidovich N, *et al.* Indigenous versus lessepsian hosts: Nervous necrosis virus (NNV) in eastern mediterranean sea fish[J]. *Viruses*, 2020, 12(4): 430.
- [22] Gye H J, Nishizawa T. Sites responsible for infectivity and antigenicity on nervous necrosis virus (NNV) appear to be distinct[J]. *Scientific Report*, 2021, 11(1): 3608.
- [23] 苏航, 苏建国. 草鱼呼肠孤病毒纤维蛋白 VP56 与草鱼 GRP78 蛋白互作诱导内质网应激 [J]. *水产学报*, 2023, 47(9): 099413.
- Su Hang, Su Jianguo.. grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) GRP78 for inducing endoplasmic reticulum stress[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(9): 099413 (in Chinese) .
- [24] Cheng C A, Luo J M, Chiang M H, *et al.* Nervous necrosis virus coat protein mediates host translation shutoff through nuclear translocation and degradation of polyadenylate binding protein[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(17): e0236420.
- [25] Guo C J, Wu Y Y, Yang L S, *et al.* Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(5): 2621-2631.
- [26] 崔婧, 范雪亭, 刘文竹, 等. 华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定 [J]. *海南大学学报自然科学版*, 2014, 32(3): 244-251.
- Cui J, Fan X T, Liu W Z, *et al.* Isolation and identification of vibriosis pathogens of marine cultured fishes in Southern China[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2014, 32(3): 244-251 (in Chinese).
- [27] Bunlipatanon P, U-Taynapun K. Growth performance and disease resistance against vibrio vulnificus infection of novel hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1711-1723.

Study and analysis of pathogen co-infection in grouper culture

HUANG Lin¹, LIU Mingzhu¹, YU Qing^{1*}, HAN Shuyu², WEI Dongdong¹,
SHI Jingu², WEI Hongling¹, LI Pengfei^{1*}

1. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Biotechnology and Modern Ecological Aquaculture,
Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and
Efficient Healthy Breeding Industrial Technology (GERCFT), Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;
2. Guangxi Fisheries Technology Extension Station, Nanning 530199, China

Abstract: Co-infection is a common phenomenon in nature, and large-scale morbidity in livestock farms is caused by multiple pathogenic factors, with pathogen co-infection being a major contributor. Co-infection complicates clinical diagnosis and treatment. However, most studies focus solely on the pathogenic characteristics and mechanisms of single pathogens, and many prevention and control methods and drug treatment strategies are also limited to a single pathogens. Consequently, these methods are often ineffective against co-infections involving multiple pathogens. In fact, co-infection can cause more severe symptoms and damage to the host compared to single-pathogen infections. Moreover, interactions between co-infected pathogens can be synergistic, antagonistic, or non-interfering, and they may alter the pathogenic mechanisms of the original single pathogens. Therefore, developing rapid, sensitive, and efficient detection methods for multiple pathogens and exploring the pathogenesis of co-infection are of great significance for the prevention and treatment of co-infection. Pathogen co-infection has been extensively studied in livestock and poultry, including the detection technology and pathogenic mechanisms of virus-virus, virus-bacteria, and bacteria-bacteria co-infections. However, co-infection in aquaculture remains underexplored, with few studies reported. Grouper is a highly valued marine fish, known for its delicate and nutritious meat and significant economic importance. With the expansion of aquaculture and increasing industrialization and urbanization, the deterioration of the offshore grouper aquaculture environment has intensified, leading to more severe disease outbreaks in grouper populations. To understand the characteristics and patterns of common pathogen infections in cultured grouper, this study used PCR to investigate viral and bacterial pathogens in diseased grouper collected from farms in Guangxi (Beihai, Qinzhou, Fangchenggang City) for the first time. Pathogens were isolated using cell-specific isolation methods for viral pathogens and plate (LB and TCBS) streak separation for bacterial pathogens. The infectivity of the isolated pathogens was then confirmed using grouper cell lines. Results showed that Singapore grouper iridovirus (SGIV), nervous necrosis virus (NNV), *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *A. eromonas hydrophila* and *Photobacterium damselaesingle* were detected grouper singly or in combination. *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* were the primary bacterial pathogens infecting cultured grouper in Guangxi, and interspecies and intraspecies co-infections observed. The detection frequency of *V. harveyi* was the highest, indicating that it is the main causative agent of *Vibrio* disease in cultured grouper in Guangxi. Detection rates of viral and bacterial pathogens varied significantly by season. The detection rate of NNV was 13% in spring (March to May), higher than that of SGIV. In summer (June to August), SGIV had a detection rate of 19%, higher than that of NNV. The highest detection rates for SGIV and NNV were observed in autumn (September to November) at 58% and 40%, respectively, while the lowest rates were in winter (December to February) at 4% and 6%, respectively. Autumn also had the highest detection rate for bacterial pathogens, with *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* and *P. mermaid* detected at rates of 32%, 6%, 9%, 15%, 6%, and 15%, respectively. *V. harveyi* was detected in diseased grouper across all seasons, while *V. alginolyticus* had high detection rate in summer, autumn and winter; *V. vulnificus* was mainly detected in spring and autumn; and *V. parahaemolyticus* and *P. mermaid* were detected in summer and autumn. In summary, diseases in cultured grouper in Guangxi are characterized by co-infections involving multiple pathogens, with complex and diverse co-infection patterns. Our findings provided a direction for exploring the pathogenic mechanisms of grouper pathogen co-infection, offering a theoretical basis for epidemic prevention and control, and shedding new light on aquatic pathogen co-infection research.

Key words: grouper; diseases of culture; co-infection; viruses infection; bacteria infection

Corresponding authors: YU Qing. E-mail: yu_qing1990@163.com;

LI Pengfei. E-mail: pfli2014@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U20A20102); Natural Science Foundation Project of Guangxi (2022GXNSFBA035521); Agricultural Science and Technology Project of Guangxi (Z2022167); Guangxi Innovation Team Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (nycytxgxcxt-2021-08-02)