

四川地区一株传染性造血器官坏死病毒的 分离鉴定及系统发育分析

余泽辉, 耿毅*, 汪开毓, 周燕, 范玉蕾,
邓梦玲, 陈德芳, 欧阳萍, 黄小丽
(四川农业大学动物医学院, 四川 温江 611130)

摘要: 2014 年 5 月, 四川省都江堰市某虹鳟养殖场暴发一种传染性疾病, 幼鱼和鱼苗死亡率分别高达 40% 和 80%。为探究此次疾病病因和流行规律, 将病料进行解剖及细菌学检查、病理组织观察、人工感染实验、病毒分离、多重 RT-PCR 鉴定和系统发育分析。结果显示, 病鱼主要临床症状表现为腹部膨大, 体表发黑, 肛门拖淡黄色黏液便, 解剖见鳃壁、腹膜出血, 胃胀气膨大和明显肠炎; 细菌学检查为阴性; 组织病理学上, 头肾、肾脏和脾脏造血组织广泛性变性、坏死, 肠黏膜下层嗜酸性颗粒细胞浸润与坏死, 肝细胞变性、坏死形成局灶性的坏死灶, 并在一些肝细胞胞浆内见嗜酸性包涵体。将病鱼的肝脏、脾组织研磨过滤灭菌后, 腹腔注射 20 尾健康虹鳟, 注射组均表现为急性死亡(累积死亡率=75%), 并出现与自然发病鱼相同的症状。取病鱼组织匀浆滤菌液接种到鲤上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC), 盲传 3 代出现典型的细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)。针对 IHNV、IPNV 与 VHSV 的多重 RT-PCR 检测显示自然发病鱼、人工感染病鱼和病变细胞均为 IHNV 阳性, 扩增序列与 IHNV 核蛋白(nucleoprotein, N)基因同源性为 99.9%。对分离株的糖蛋白基因“Mid-G”区域进行系统发育分析, 结果显示该分离株与亚洲分离株聚为一支, 属于 JRt 基因型。本研究首次报道我国西南地区养殖虹鳟中 IHNV 感染引起的疾病。

关键词: 虹鳟; 传染性造血器官坏死病毒; 组织病理学; 分离鉴定; 系统发育分析

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)隶属弹状病毒科(Rhabdoviridae)粒外弹状病毒属(Novirhabdovirus)^[1], 是一种重要的冷水鱼病毒, 对世界鲑鱼养殖业造成了巨大的经济损失^[2]。世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须申报的动物疫病, 我国农业部也将其列为二类动物疫病, 是第 1 类鱼类口岸检疫疫病。20 世纪 50 年代, IHNV 最初在北美太平洋西北部红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)幼鱼中流行。20 世纪 70 年代到 80 年代, IHNV 从美国阿拉斯加州蔓延到内陆爱达荷州, 成为北美太平洋西北部的地方病^[3]。当时由于许多国家需从北美地区进口鱼卵, IHNV 通过受感染的

鱼卵传播到欧洲和亚洲地区^[4-5]。目前, 该病在法国、意大利、德国、英国、日本、韩国、俄罗斯和中国等国家暴发^[6-7], 已形成全球分布。在我国, 牛鲁祺等^[8]1988 年首次报道中国 IHNV 在东北地区暴发流行。其中流行的渔场 60 万尾稚鱼全部死亡, 使该场的苗种生产中断 1 年, 造成严重经济损失。1994 年, 赵志壮等^[9]首次分离到该病毒, 并报道辽宁省本溪市虹鳟(*O. mykiss*)鱼种场稚鱼暴发 IHNV, 死亡率近 100%。根据国内报道 IHNV 流行病学调查, IHNV 的暴发主要集中分布在东北地区, 包括黑龙江、辽宁和吉林^[10], 然而在我国西南地区还未见 IHNV 流行的报道。本研究首次报道 IHNV 在我国西南地区暴发流行。

收稿日期:2014-11-03 修回日期:2015-02-10

资助项目:四川省科技支撑计划(2014NZ0027)

通信作者:耿毅, E-mail:gengyisicau@126.com

IHNV 主要感染鲑科 (Salmonidae) 鱼类, 流行水温 8 ~ 14 °C; 水温高于 15 °C 一般不发病^[11]。最早 IHNV 被认为只会在大麻哈鱼属 (*Oncorhynchus*) 中暴发, 但是在鳟属 (*Salmo*)、红点鲑属 (*Salvelinus*)、茴鱼属 (*Thymallus*) 均暴发该病。其中, IHNV 在养殖大麻哈鱼 (*O. keta*) 和虹鳟中的暴发感染最为频繁^[12]。在这些感染寄主中, IHNV 的敏感寄主通常为稚鱼或鱼卵, 一般认为 1 龄以上幼鱼难以感染。即使成鱼感染也一般不表现临床症状, 而成为病毒的终身携带者^[12]。Bergmann 等^[13]用 IHNV 毒株感染不同体质量虹鳟的实验表明, 虹鳟对 IHNV 毒株的敏感性随体质量和鱼龄的增加而降低。尽管 IHNV 的敏感宿主通常为稚鱼和鱼卵, 但在日本和韩国有 IHNV 感染商品规格大小虹鳟 (体质量大于 300 g) 的报道^[14-15]。近两年, 四川地区虹鳟养殖区 1.5 龄虹鳟幼鱼 (体质量约 500 g) 及鱼苗流行一种以体表发黑, 肛门拖淡黄色黏液便, 鳃膜、腹膜出血临床特征的传染病, 具有发病率和死亡率高的特点, 给虹鳟养殖业造成较为严重的损失。本研究从自然感染发病鱼体内进行组织病理学观察、人工感染实验、病原分离和多重 RT-PCR 检测确定其病原为 IHNV, 并以糖蛋白基因“Mid-G”区域对分离株进行系统发育分析, 结果显示该分离株属于 JRt 基因型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病鱼采集于 2014 年 5 月, 来源于四川省都江堰市某虹鳟养殖场, 幼鱼体质量 0.42 ~ 0.53 kg, 鱼苗体质量 0.02 ~ 0.04 kg。健康虹鳟来源于四川省成都市某虹鳟养殖场, 体质量 0.08 ~ 0.12 kg。鲤上皮瘤细胞 (EPC) 由珠江水产研究所惠赠; 脑心浸液培养基 (BHI) 购自北京欣经科生物技术有限公司; DNA 胶回收试剂盒、PCR-Mix reaction buffer 购自上海生物工程有限公司; pMD-19T 质粒连接试剂盒、TRIzol 试剂盒、PrimeScript™ RT 试剂盒购自大连宝生物试剂有限公司。

1.2 解剖及细菌学检查和组织病理学观察

对病鱼进行常规解剖观察, 同时取肝脏、肾和脑等组织器官于洁净载玻片上涂片, 风干后革兰氏染色, 油镜检查; 无菌条件下, 从病鱼肝脏、脾和肾取样于 BHI 平板上划线接种, 28 °C 恒温培养 48 h 后观察细菌生长状况。

取病鱼的心、肝脏、肾、头肾、脾、脑和肠道等组织器官, 10% 的中性福尔马林固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 中性树胶封片后光学显微镜下观察其主要病变并照相记录。

1.3 人工感染实验

分别取濒死幼鱼和鱼苗的肝脏、肾组织, 用无菌生理盐水溶液以 1:5 (M/V) 的比例在冰上匀浆; 4 °C 下以 3 000、6 000 和 9 000 r/min 依次梯度离心 10 min; 取上清液于 0.22 μm 的滤膜过滤灭菌。将健康虹鳟分成 2 组, 每组 20 尾。实验组每尾注射 0.2 mL 的组织匀浆液, 对照组每尾注射 0.2 mL 无菌生理盐水。实验期间水温控制在 13 ~ 15 °C, 连续观察 2 周记录死亡率。

1.4 病毒分离培养

取病鱼头肾和肾剪碎后按 1:10 比例匀浆成悬液。反复冻融 3 次后, 4 °C 下, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液经孔径 0.22 μm 滤膜过滤; 取组织上清液接种于 EPC, 15 °C 吸附 4 h 后弃病毒液, 然后加含 2% 小牛血清和 100 IU/mL 双抗的 M199 营养维持液于 15 °C 培养; 每隔 24 h 将细胞生长液弃去, 换成营养维持液, 继续培养。待有约 80% 以上细胞出现病变后, 收获病毒于 -80 °C 保存备用。

1.5 多重 RT-PCR 鉴定

传染性造血器官坏死、传染性胰腺坏死 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 和出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) 是 3 种常见的感染水生动物的病毒, 能混合感染虹鳟^[16]。因此参照 Williams 等^[17]的方法合成可检测 3 种病毒的引物 (表 1)。该引物均由上海生物工程有限公司合成。

取自然感染的幼鱼、鱼苗和人工感染病鱼肝脏的液氮研磨粉末和 400 μL 病变细胞液, 参照 TRIzol 试剂盒说明书快速提取 RNA。总 RNA 参照 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书反转录合成 cDNA 后进行 PCR 反应, 反应体系: 12.5 μL Mix-reaction buffer, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 加入 DNA 模板 2 μL (10 ng/μL), 9.5 μL ddH₂O。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的大小。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 送上海生物工程有限公司进行序列测定。将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对。

表 1 RT-PCR 检测引物
Tab.1 Primers of RT-PCR for detection

病毒 virus	引物序列 primer sequence	片段大小/bp size	目的基因 target gene
IPNV	F:CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	206	主要结构蛋白基因 major structural protein gene
	R:CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG		
IHNV	F:GTTCAACTTCAACGCCAACAGG	371	核衣壳蛋白基因 nucleocapsid gene
	R:TGAAGTACCCACCCGAGCATCC		
VHSV	F:CGGCCAGCTCAACTCAGGTGTCC	625	糖蛋白基因 glycoprotein gene
	R:CCAGGTCGGTCCTGATCCATTCTGTC		

1.6 部分糖蛋白基因克隆测序及系统发育分析
“*Mid-G*”基因 (nt 686 – 988, 参考序列登录号:U50401) 是一段长度为 303 bp 的部分糖蛋白基因序列,包含 IHNV 的抗原决定簇^[18],国外许多学者采用“*Mid-G*”基因对 IHNV 毒株进行系统发育分析^[3,5,19]。因此参照 Kolodziejek 等^[20]的方法合成一对扩增部分糖蛋白基因的引物,上游引物:5'-ACAACCGCAGCCGCTCTGTA-3',下游引物:5'-CAGCGACCGTCATGCACATC-3',预期扩增片段大小为 673 bp,其扩增片段包含“*Mid-G*”基因。该引物由上海生物工程有限公司合成。
RNA 提取、cDNA 合成和 PCR 反应体系同步

试剂盒纯化后,按操作说明书连接到 pMD19-T 载体上,转化 DH5α 感受态细胞中。培养 24 h 后,挑取单个菌落进行菌落 PCR 筛选阳性克隆菌株,提取质粒送上海生物工程有限公司进行序列测定。根据 GenBank 收录的 IHNV 美国株、欧洲株、日本株和韩国株的 G 蛋白基因序列,采用 DNA star 软件的 SeqMan 程序对“*Mid-G*”基因区域进行多序列比对,MEGA 5.0 邻近法构建系统发育树。

2 结果

2.1 解剖及细菌学检查

幼鱼体表发黑,腹部膨大(图 1-a,箭头所指),肛门流出淡黄色黏液便,解剖后可见鳔壁、腹膜严重出血,胃胀气膨大,明显肠炎(图 1-b);剖开胃和肠道可见透明黏液。鱼苗体表发黑,

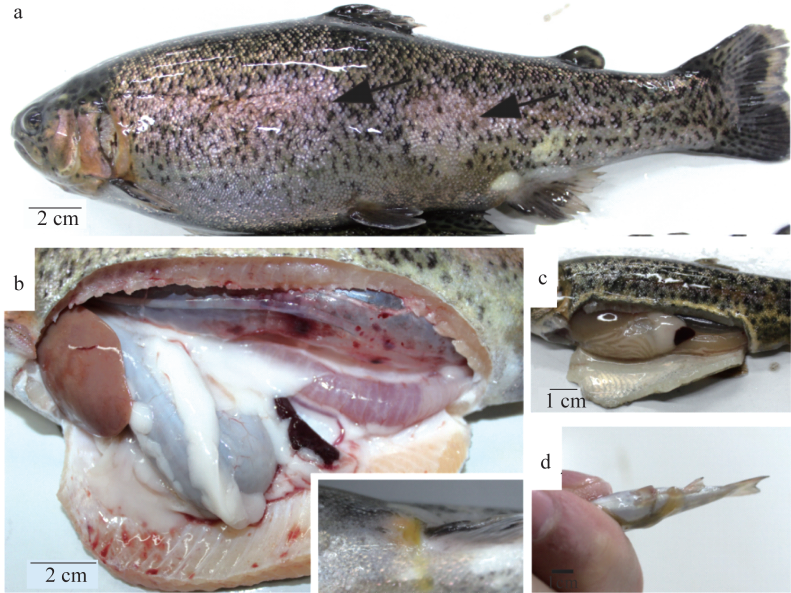


图 1 病鱼临床特征

a. 病鱼体表发黑,腹部膨大; b. 病鱼鳔壁、腹膜严重出血,胃胀气膨大,明显肠炎;肛门流出淡黄色黏液便(插图); c. 病鱼体表发黑,肝脏苍白; d. 肛门流出淡黄色黏液便

Fig. 1 Clinical signs of diseased fish

a. diseased fish showed darkening of the body and swollen abdomen; b. swim bladder and peritoneum generally exhibited petechiae, gastric distention, enteritis; yellow mucoid fluid fecal casts in anal (inset); c. diseased fish showed darkening of the body and pale liver; d. yellow mucoid fluid fecal casts from anus

解剖后可见肝脏苍白(图 1-c),肛门流出淡黄色黏液便(图 1-d)。涂片检查未观察到细菌,也未从发病鱼的肝脏、脾和肾中分离到细菌。

2.2 组织病理学观察

组织病理学观察发现肾、头肾、肠道、脾和肝脏等器官的损伤非常显著。典型病理变化表现为肾小管上皮细胞变性、坏死、脱落,肾间质水肿,造血组织坏死(图版-1);头肾实质大面积变性、坏死(图版-2);肠黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落,黏膜下层聚集大量坏死的嗜酸性粒细胞(图版-3);脾广泛变性、坏死,巨噬细胞浸润(图版-4),肝细胞变性,坏死并形成局灶性的坏死灶,并在肝细胞胞浆内发现包涵体(图版-5,6)。

2.3 人工感染实验

实验组虹鳟注射感染第 3 天开始出现死亡,注射感染第 5 天累积死亡率达 70%,连续观察 2 周,死亡率 75%,主要表现为急性死亡并与自然发病鱼相同的症状。对照组全部存活无异常(图 2)。

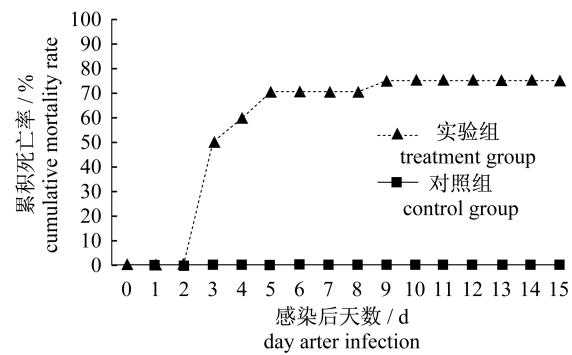


图 2 组织悬液人工感染实验结果

Fig. 2 Results of artificial infection experiment with the tissue suspension

2.4 病毒分离培养

病鱼组织匀浆滤菌并感染 EPC 细胞后,盲传 3 代可以稳定地观察到典型的细胞病变效应(CPE),细胞单层呈破渔网状(图 3-a),而对照组细胞正常(图 3-b)。

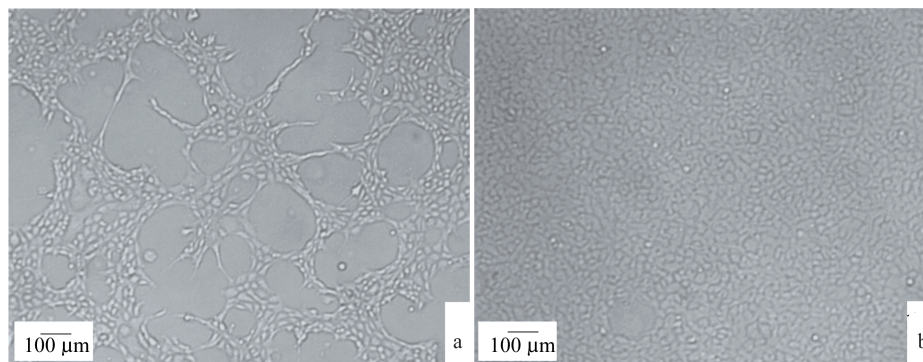


图 3 EPC 细胞病变

Fig. 3 Cytopathic effect of EPCs

2.5 RT-PCR 鉴定

提取自然发病幼鱼、鱼苗肝脏,人工感染病鱼肝脏和病变细胞液的总 RNA,RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 4),位于约 371 bp 处均可见特异性 DNA 扩增条带,与 IHNV 预期大小一致,阴性对照泳道无明显条带。将扩增条带测序结果与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 比对,结果显示:该序列与 GenBank 中 IHNV 的核衣壳蛋白基因有高度同源性,同源性高达 99.9% (参考序列登录号:KJ421216),RT-PCR 鉴定结果显示自然发病幼鱼、鱼苗,人工感染病鱼和病变细胞液均为 IHNV 阳性。

2.6 部分糖蛋白基因克隆测序及“Mid-G”基因系统发育分析

序列测定结果显示克隆目的基因大小为

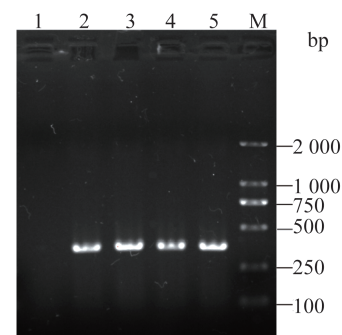


图 4 多重 RT-PCR 检测 IHNV、IPNV 与 VHSV

1. 阴性对照; 2. 自然感染幼鱼; 3. 自然感染鱼苗; 4. 人工感染; 5. 病变细胞液; M. DL2000 分子量标准

Fig. 4 Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of IHNV, IPNV and VHSV

1. negative control; 2. the young fish natural infected; 3. the fingerling natural infected; 4. the fish artificial infected; 5. diseased cells; M. DL2000 DNA ladder

673 bp,与预期扩增大小一致;截取“*Mid-G*”基因区域上传到 NCBI-GenBank 获得基因登录号: KM411979。通过软件构建“*Mid-G*”基因区域的系统发育树发现,YZH140529 株与亚洲分离株聚

为一支,属于 JRt 基因型(图 5)。同源性分析表明该我国分离株与日本株和韩国株具有相对最高核酸同源性。

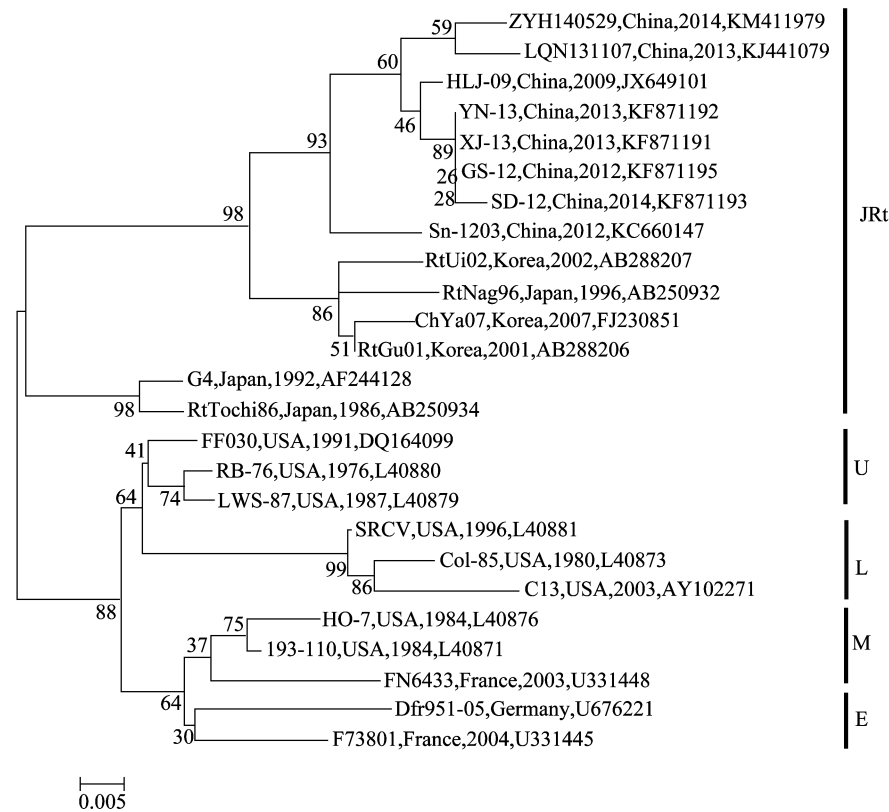


图 5 IHNV“*Mid-G*”基因区域的系统发育树

分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度百分比,标尺长度表明每个位点发生 0.005 次置换

Fig. 5 Phylogenetic tree of nucleic acid sequence within the “*Mid-G*” gene from IHNV

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this brouping occurred after bootstrapping the data(1 000 replicates) , the scale bar shows the number of substitutions per site

3 讨论

IHNV 感染的典型临床症状表现为体色发黑、腹部膨大、肛门外拖有白色不透明粪便,解剖后,胃、肠道内充满牛奶样液体或淡黄色液体,但没有食物。肝脏、脾、肾苍白,肠系膜、脂肪组织、鳃膜、腹膜、脑膜和心包膜均出现大面积充血^[12,21],典型的病理损伤表现为肾脏皮质、头肾和脾脏造血组织的坏死,以及肠壁内嗜酸性颗粒细胞的坏死^[22],Granzow 等^[23]还发现病毒可在胞浆内形成包涵体。本次送检病例的临床症状和组织病理损伤与前人的报道基本一致。进而通过人工感染实验、病毒分离、多重 RT-PCR 检测以及“*Mid-G*”基因系统发育分析证实此次四川地区虹

鳟流行病的病原是 IHNV。此前的报道表明,我国 IHNV 的流行主要集中在北方地区,如黑龙江^[8]、辽宁^[9]、山东和吉林等^[10],本研究首次报道 IHNV 在我国西南地区暴发。四川省是我国西南地区冷水鱼养殖大省,且有独特的冷水鱼养殖自然资源。近几年,雅安、峨眉、彭州、蒲江、大邑、崇州、都江堰和邛崃等地区依托冷水资源优势已成功发展壮大冷水鱼养殖业。IHNV 是严重危害鲑、鳟类的病毒,致死率极高,疫情难以控制。一旦 IHNV 在我国西南地区广泛流行,势必将制约该地区鲑鳟养殖业的发展。许多国家均因鱼卵检疫不严而传入 IHNV^[4-5,8],因此应在国家级和省级原良种场、重点苗种场等进行监测,从源头控制 IHNV 的扩散。

IHNV 的基因分型与地理起源的相关性高于时间因素和宿主因素^[3]。目前 IHNV 按照地理区域主要分为 U (upper), M (middle), L (lower), E (Europe) 和 JRt (Japanese rainbow trout) 5 大基因型^[3,5,14-15]。U、M、L 是最先报道的 3 个基因型毒株,主要来自北美的 3 个地理区域^[3],E 基因型毒株主要来自欧洲^[5]。在亚洲地区,日本 1971—1982 年收集的 5 个病毒株均属于 U 基因型,然而 1980—1996 年采集的日本株形成 1 个新的基因型 JRt^[15]。本研究通过“Mid-G”系统发育分析表明,此次分离株和其他中国分离株均为 JRt 基因型;同源性分析表明我国分离株与日本株和韩国株具有相对最高核酸同源性,与中国 IHNV-Sn 株系统进化树分析结果一致^[24],进一步佐证 IHNV 是由日本引入中国境内。此外,据文献记载,20 世纪 80 年代辽宁、黑龙江虹鳟渔场分别从日本引进虹鳟发眼卵后出现 IHN 症^[8],而此时日本许多地区正流行 JRt 基因型 IHNV^[15]。因此结合历史参考文献和本研究系统发育分析结果表明中国 IHNV 是由日本引入中国东北地区,然后往我国西南地区蔓延。

IHNV 主要感染鲑科鱼类,在这些感染寄主中,IHNV 的敏感寄主通常为稚鱼或鱼卵,大龄鱼感染一般不表现临床症状,而成为病毒的终身携带者^[12]。而此次流行地区幼鱼、鱼苗均发病,并表现出较高死亡率。IHNV 属于 RNA 病毒,而 RNA 病毒具有很高的基因突变率^[25]。JRt 基因型毒株每个密码子每年的突变频率约为 1.5×10^{-3} ,其突变频率高于 M、L、U 基因型^[15]。IHNV 基因组的单个基因位点突变可能会导致病毒的毒力和组织嗜性改变^[26]。JRt 基因型毒株的异常密码子突变是否导致毒株致病性增强还有待进一步研究。另外,日本是最早报道 JRt 基因型毒株在商品规格鱼(体质量大于 300 g)流行的国家^[15],本研究发现从四川分离的该株 IHNV 也属于 JRt 基因型,且其在感染范围上也与日本的毒株相似,同时,我国其他地区的 IHNV 分离株在遗传分析上也属于 JRt 基因型,因此,可以进一步推测我国的 IHNV 很可能是由日本引入。

参考文献:

- [1] Fauquet C M, Mayo M, Maniloff J, *et al.* Virus taxonomy: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2005.
- [2] St-hilaire S, Ribble C S, Stephen C, *et al.* Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada [J]. Aquaculture, 2002, 212(1-4): 49-67.
- [3] Kurath G, Garver K A, Troyer R M, *et al.* Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America [J]. Journal of General Virology, 2003, 84(4): 803-814.
- [4] Kimura T, Yoshimizu M. Viral diseases of fish in Japan [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1991, 1: 67-82.
- [5] Enzmann P J, Kurath G, Fichtner D, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European isolates from North American genogroup M [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2005, 66(3): 187-195.
- [6] Niu L Q, Zhao Z Z. The epidemiological IHN and IPN of rainbow trout in Northeast China [J]. Journal of Fisheries of China, 1988, 12(4): 327-332. [牛鲁祺, 赵志壮. 东北地区虹鳟 IHN 和 IPN 流行病学的初步研究. 水产学报, 1988, 12(4): 327-332.]
- [7] Enzmann P J, Castric J, Bovo G, *et al.* Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: Implications for control [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 89(1): 9-15.
- [8] Niu L Q, Zhao Z Z. A preliminary investigation on the diseases of rainbow trout in northeastern China [J]. Chinese Salmons Fishery, 1988, 1(1): 56-66. [牛鲁祺, 赵志壮. 东北地区虹鳟鱼病流行情况初步调查报告. 鲑鳟渔业, 1988, 1(1): 56-66.]
- [9] Zhao Z Z, Niu L Q. Isolation and preliminary study of a rhabdovirus from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Benxi, China [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1994, 18(4): 348-353. [赵志壮, 牛鲁祺. 中国本溪虹鳟一株弹状病毒的分离及初步研究. 水生生物学报, 1994, 18(4): 348-353.]
- [10] Jia P, Zheng X C, Shi X J, *et al.* Determination of the complete genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Ch20101008 and viral molecular evolution in China [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2014, (27): 418-431.
- [11] Lapatra S E. Factors affecting pathogenicity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) for salmonid fish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10(2): 121-131.

- [12] Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases [M]. Ithaca: Cornell University Press, 1988.
- [13] Bergmann S M, Fichtner D, Skall H F, *et al.* Age- and weight-dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 55(3): 205 – 210.
- [14] Kim W S, Oh M J, Nishizawa T, *et al.* Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene [J]. Archives of Virology, 2007, 152 (11): 2119 – 2124.
- [15] Nishizawa T, Kinoshita S, Kim W S, *et al.* Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 71(3): 267 – 272.
- [16] Alonso M, Saint Jean S R, Perez Prieto S. Virulence of Infectious hematopoietic necrosis virus and Infectious pancreatic necrosis virus coinfection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and nucleotide sequence analysis of the IHNV glycoprotein gene [J]. Archives of Virology, 2003, 148 (8): 1507 – 1521.
- [17] Williams K, Blake S, Sweeney A, *et al.* Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(12): 4139 – 4141.
- [18] Huang C, Chien M S, Landolt M, *et al.* Mapping the neutralizing epitopes on the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus[J]. Journal of General Virology, 1996, 77 (12): 3033 – 3040.
- [19] Troyer R M, Lapatra S E, Kurath G. Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture[J]. Journal of General Virology, 2000, 81(12): 2823 – 2832.
- [20] Kolodziejek J, Schachner O, Drrwald R, *et al.* “Mid-G” region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(1): 22 – 30.
- [21] Bootland L, Leong J A C. Infectious haematopoietic necrosis virus [J]. Fish Diseases and Disorders, 2011, 3(2): 66 – 109.
- [22] Roberts R J. Fish Pathology [M]. London: John Wiley & Sons, 2012.
- [23] Granzow H, Weiland F, Fichtner D, *et al.* Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture[J]. Journal of Fish Diseases, 1997, 20(1): 1 – 10.
- [24] Xu L M, Liu H B, Yin J S, *et al.* The genotype of infectious haematopoietic necrosis virus isolate IHNV-Sn1203 and the bioinformatics analysis of its glycoprotein[J]. China Fisheries Science, 2014, 21 (1): 180 – 188. [徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒-Sn1203 株的基因型及糖蛋白的生物信息学分析. 中国水产科学, 2014, 21(1): 180 – 188.]
- [25] Luring A S, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11 (5): 327 – 336.
- [26] Kim C H, Winton J R, Leong J C. Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism [J]. Journal of Virology, 1994, 68(12): 8447 – 8453.

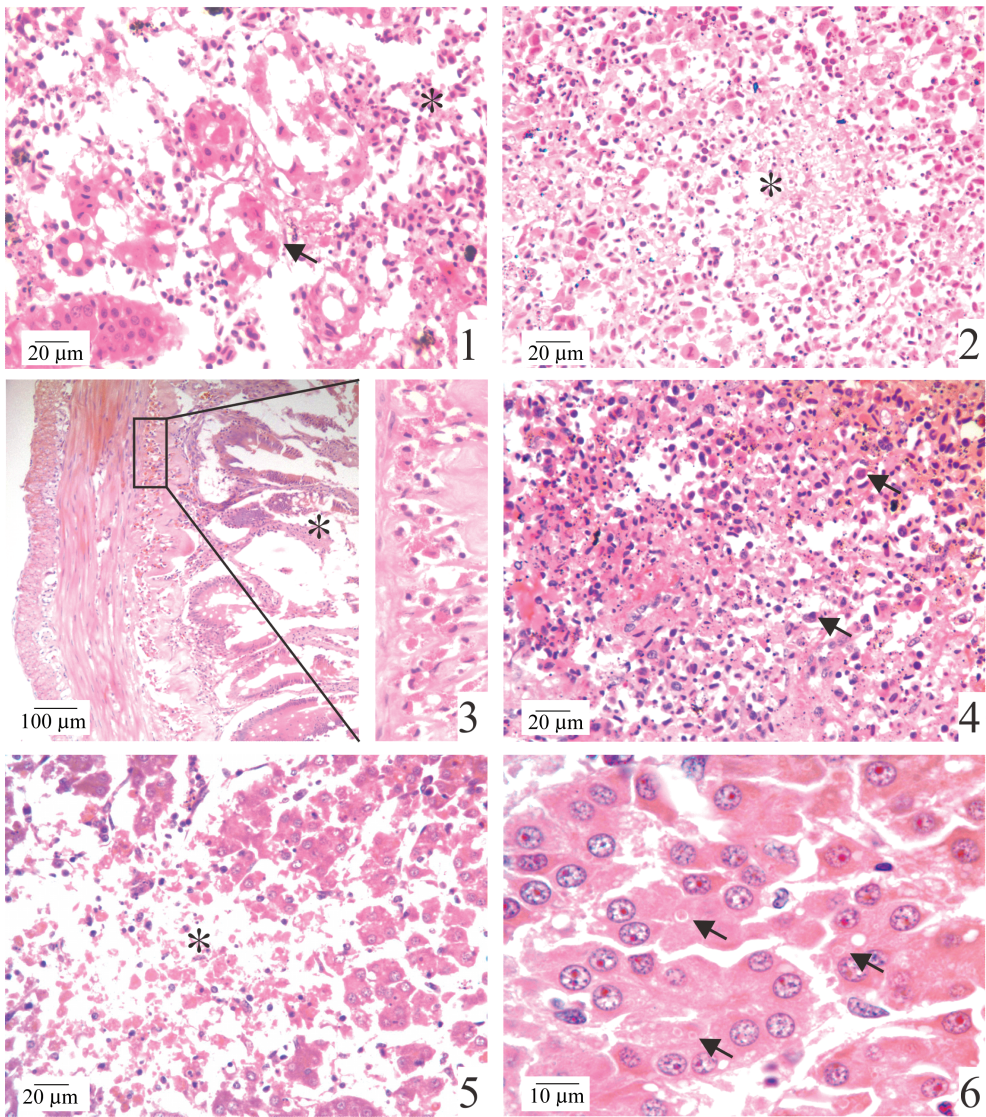
Isolation and identification of an infectious hematopoietic necrosis virus isolate and phylogenetic analyses from Sichuan Province

YU Zehui, GENG Yi^{*}, WANG Kaiyu, ZHOU Yan, FAN Yulei,
DENG Mengling, CHEN Defang, OUYANG Ping, HUANG Xiaoli
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

Abstract: In May 2014, a severe infectious disease occurred among the farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Dujiangyan, Sichuan Province, associated with 40% and 80% mortality in juvenile fish and fingerlings, respectively. Bacteriologic test, histological examination, pathogenicity tests, virus isolation, multiple RT-PCR assay and phylogenetic analysis were performed to explore its causes and the epidemic law. Principal symptoms included darkening of the body, distension of abdomen, yellow mucoid fluid fecal casts from anus. Internally, hemorrhage occurred in the swim bladder and peritoneum, gastric distention and enteritis were observed. Bacteriologic test was negative. Histopathologically, anterior kidney, kidney and spleen showed degeneration and necrosis in the haematopoietic tissue. Necrosis of the eosinophilic granular cells (EGCs) in the intestinal wall was also observed. Hepatocytes also showed degeneration and necrosis with some intracytoplasmic inclusions emerged in the hepatocyte. After filtration treatment, the spleen and kidney homogenate was injected intraperitoneally into 20 healthy trouts, and the injected trouts displayed similar clinical symptoms as the fish that was naturally infected. Trouts died acutely in the trial group with a cumulative mortality rate 75%. The filtrated homogenate was also inoculated into the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells, and the typical cytopathic effect was formed after three blind passages. Multiple RT-PCR reaction of tissue homogenates from the fish naturally infected, the fish artificially infected and the infected cells were performed, and the results showed all IHNV-positive. The sequenced amplification products shared 99.9% identity with that of IHNV nucleoprotein gene (GenBank access number: KJ421216). Phylogenetic analysis based on the “mid-G” sequences showed that the isolate was classified into Asian isolates, belonging to the genogroup JRt. This is the first report of IHNV infection in cultured rainbow trout associated with mass mortality in Southwestern China.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); IHNV; histopathology; isolation and identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: GENG Yi, E-mail: gengyisicau@126.com



图版 组织病理学损伤

1. 肾小管上皮细胞变性、坏死、脱落(箭头处),肾间质水肿,造血组织坏死(*); 2. 头肾实质大面积变性、坏死(*); 3. 肠黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落(*),嗜酸性粒细胞坏死(插图); 4. 脾广泛变性、坏死,巨噬细胞浸润(箭头处); 5. 肝细胞变性、坏死,形成局灶性的坏死灶(*); 6. 肝细胞胞浆内出现嗜酸性包涵体(箭头处)

Plate Histopathological lesions

1. the epithelial cell of renal tubule showed degeneration, necrosis and detachment(arrow), the kidney showed edema and necrosis in the hematopoietic tissue(*); 2. marked degeneration and necrosis showed in the head-kidney(*); 3. epithelia mucosa of the gastrointestinal tract underwent degeneration and necrosis(*), necrosis of eosinophilic granular cells(inset); 4. spleen showed severe degeneration and necrosis including macrophagus infiltration (arrow); 5. hepatocytes showed degeneration and necrosis, focal necrosis (arrow); 6. intracytoplasmic inclusions emerged in the hepatocyte(arrow)