

文章编号: 1000-0615(2018)04-0575-11

DOI: 10.11964/jfc.20170410788

锦鲤疱疹病毒天津株的分离与鉴定

罗璋¹, 郝爽¹, 张振国¹, 孟一耕¹, 史谢尧², 冯守明^{1*}

(1. 天津市水产研究所, 天津 300221;

2. 天津农学院, 天津 300384)

摘要: 为分析近年来天津地区养殖鲤(包括锦鲤)暴发性死亡的病因, 利用病原菌分离、细胞培养、电镜观察、组织病理切片、人工感染实验、PCR和荧光定量PCR检测、基因分型等方法对患病鱼及病原进行了研究。结果显示, 在患病鱼体表未发现大量寄生虫; 在肝、脾、肾等内脏组织中未能分离到细菌; 在鳃组织中发现大量的圆形病毒颗粒; 使用患病鱼组织滤液感染锦鲤鳍条原代细胞, 可观察到典型的细胞病变效应(CPE), 注射患病鱼组织滤液和产生病变的细胞上清液可分别导致健康锦鲤93.3%和86.7%的死亡率; 通过病理组织切片观察, 主要病变组织为鳃、肝脏和肾脏。采用世界动物卫生组织(OIE)推荐的锦鲤疱疹病毒(KHV)检测方法进行PCR检测发现KHV呈阳性, 且KHV在鳃组织含量最高, 肾脏次之, 脑组织中最少。结合TK基因全长序列建立系统进化树和基因型分析, 证实此次分离到的KHV为亚洲型毒株, 属于I⁺II⁻基因型, 将其命名为KHV-TJ1601株。这是我国华北地区首次报道KHV I⁺II⁻基因型的存在, 可为KHV的进化分析和疫苗制备提供基础资料。

关键词: 鲤; 锦鲤疱疹病毒; 分离鉴定; 基因型; 天津

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鲤(*Cyprinus carpio*)是天津地区的主要淡水养殖品种, 2013年养殖产量为10.62万t, 占天津地区淡水养殖产量的三分之一^[1]。此外, 天津也是我国北方主要的锦鲤养殖区和交易中心。2014年以来, 天津地区鲤(包括锦鲤)出现一种暴发性疾病, 该病突发性强, 严重时发病后3 d内死亡率达到90%以上。发病鱼主要症状为眼睛和头部上方凹陷, 鳃丝腐烂, 发病鱼集中在水体表层, 呼吸频率变快, 对外界反应迟钝。该病每年有2个暴发高峰期, 分别在夏初和晚秋, 此时天津地区水温为20~28 °C, 从5 g左右的苗种至1 kg以上的成鱼都能感染该疾病。水温超过30 °C以上时未观察到该病的发生。此外, 该疾病主要发生在高密度鲤养殖池塘, 在主养其他鱼类套养鲤的池塘中尚未观察到此病的发生。该疾

病已成为近年来天津地区养殖鲤的常见病害, 给渔业生产造成重大的经济损失, 而且抗生素的使用对该疾病没有明显控制作用。

2016年9月, 天津某锦鲤养殖场暴发严重疾病, 发病速率快, 3 d内死亡率达85%。病鱼主要症状为眼睛和头部上方凹陷, 鳃丝腐烂, 体表出血。为了探究病因, 本研究利用病原菌分离、细胞培养、PCR检测、电镜观察、攻毒实验等方法对病原进行了分析, 判定该次锦鲤发病是由锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)引起, 这是天津地区首次报道锦鲤疱疹病毒病。基因型分析表明, 引起此次病害的锦鲤疱疹病毒为亚洲型毒株, 属于I⁺II⁻基因型, 将其命名为KHV-TJ1601毒株。本研究首次从我国华北地区分离到锦鲤疱疹病毒I⁺II⁻基因型毒株, 将为锦鲤

收稿日期: 2017-04-13 修回日期: 2017-07-17

资助项目: 天津市自然科学基金(16JCYBJC30000); 天津市科技计划项目(15ZXBFNC00290); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201501030); 天津市水产产业技术体系创新团队项目 (ITTFR2017008)

通信作者: 冯守明, E-mail: smfeng65@163.com

疱疹病毒病的防控技术研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验对象

发病锦鲤采集于天津宝坻区某观赏鱼养殖场, 体质量105.1~146.5 g, 取濒死病鱼运回实验室进行研究。健康锦鲤(50.2±9.3) g购于天津某观赏鱼交易市场。

1.2 主要试剂

脑心浸液培养基(BHI)购自英国Oxoid公司; 营养肉汤琼脂培养基(LB)购自北京陆桥技术股份有限公司; 胎牛血清和M199培养基购自美国Gibico公司; 动物组织DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; DNA分子Marker、pMD18 T载体和2×Taq Master Mix购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 细菌分离和寄生虫观察

参照刘韬等^[2]的方法, 用75%酒精棉球反复擦拭病鱼体表后, 在无菌条件下对病鱼进行解剖, 用接种环分别从患病鱼的肾、肝、脾等组织中取少量样品划线接种于LB平板和BHI平板, 28 °C培育48 h后进行观察; 取患病鱼的鳍条、鳃、黏液等样品在显微镜下进行寄生虫检查。

1.4 超薄切片与电镜观察

参照徐进等^[3]的方法, 选取濒死的患病鱼, 在冰盘上迅速解剖, 取鳃、肝、肾、脾和脑组织, 剪成1~2 mm³小块, 置于装有2.5%戊二醛的离心管中4 °C固定。1%锇酸再次固定2 h后, 用0.1 mol/L的PBS (pH 7.4)漂洗3次, 然后依次用50%~100%的乙醇梯度脱水、环氧丙烷渗透和Epon812包埋, 最后制成60~80 nm超薄切片。切片经醋酸双氧铀和枸橼酸铅联合染色后, 置于透射电镜观察。取正常锦鲤的组织同步制片观察。

1.5 病鱼组织滤液感染锦鲤鳍条原代细胞

按照朱霞等^[4]的方法培养原代细胞。将无菌处理的健康锦鲤尾鳍剪碎成大约1 mm³的组织块, 接种于T25细胞培养瓶, 用含20%胎牛血清的M199培养基于25 °C恒温培养箱中培养。长满单层后, 进行感染实验。将患病锦鲤组织过滤液用PBS稀释100倍, 吸取1 mL稀释后的滤液加

入至含单层细胞的T25细胞培养瓶中进行吸附, 期间每隔15~20 min轻微晃动培养瓶1次。吸附1 h后吸弃组织滤液, 加入含5%胎牛血清的M199培养基, 将感染后的细胞放入25 °C培养箱中, 每天观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。向对照细胞中添加1 mL M199培养基作为阴性对照。

1.6 人工感染实验

取患病锦鲤的鳃、肾、肝、脑、脾组织, 用含青霉素(100 µg/mL)和链霉素(100 µI/mL)的灭菌PBS缓冲液以1:10比例冰浴匀浆; 取匀浆液依次3 000、6 000、9 000×g, 4 °C离心10 min, 取上清液用0.22 µm滤膜过滤后备用。健康锦鲤分成3组, 每组30尾, 实验组1每尾腹腔注射0.2 mL组织滤液, 实验组2每尾注射0.2 mL产生病变的细胞上清液, 对照组每尾注射0.2 mL PBS缓冲液, 实验期间控制水温为22~24 °C, 连续2周, 每天观察2次, 并及时取出死鱼。

1.7 病毒检测和序列分析

分别取产生病变的细胞上清液和患病锦鲤的鳃、肾、脾、肝、脑组织混合后匀浆, 使用DNA提取试剂盒提取DNA作为模板, 分别用2对引物对KHV的TK基因和Sph基因进行PCR检测^[5], 引物序列见表1。此外, 对2014~2016年从天津不同区县收集到的出现类似症状10份病鱼样品(包括6个鲤样品和4个锦鲤样品)用同样的方法进行检测。采用套式PCR的方法对鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV)进行检测^[6](表1)。PCR反应体系: DNA模板0.5 µL, 上下游引物各0.2 µL (10 µmol/L), 加双蒸水至20 µL。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环, 最后72 °C延伸10 min。

1.8 荧光定量PCR检测

按照Gilad等^[7]的方法进行KHV的TaqMan Real-time PCR检测, 以鲤的CgGluc基因为内参(表1)。分别提取患病鱼鳃、肝、肾、脑、脾组织的基因组DNA, 并以此为模板, 检测各组织中锦鲤疱疹病毒的相对数量。反应体系: 探针引物0.16 µL (10 µmol/L), 正反引物各0.8 µL (10 µmol/L), 2.5×mix 8 µL, 模板1 µL, 20×probe Enhancer Solution 1 µL, dd H₂O 8.24 µL。反应程序: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min后进行如下循环: 95 °C 15 s; 60 °C 60 s, 共40个循环。数据分析参照王改玲等^[8]

表 1 本实验中所用的引物

Tab. 1 PCR primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'→3') sequence (5'→3')	用途 application
TK-F	GGTTACCTGTACGAG	PCR检测锦鲤疱疹病毒 test KHV by PCR
TK-R	CACCCAGTAGATTATGC	
Sph-F	GACACCACATCTGCAAGGAG	
Sph-R	GACACATGTTACAATGGTCGC	
CDV-F1	GCTGTTGCAACCATTGAG	套式PCR检测鲤浮肿病毒 test CEV by Nested PCR
CDV-R1	TGCAGGTTGCTCCTAATC	
CDV-F2	GCTGCTGCACTTTTAGGAG	
CDV-R2	TGCAAGTTATTCGATGCCA	
KHV-86 f	GACGCCGGAGACCTTGTG	荧光定量PCR检测 quantitative Real-time PCR
KHV-163 r	CGGGTTCTTATTTTGTCTTGT	
KHV-109 p	FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG- BHQ	
CgGluc-162 f	ACTGCGAGTGGAGACACATGAT	
CgGluc-230 r	TCAGGTGTGGAGCGGACAT	
CgGluc-185 p	FAM-AAGCCAGTGTCAAATGCTGCCCACT- BHQ	
oPVP53	CTACTCAGGAGCCATCATCG	用于基因型分析 genotype analysis
oPVP54	AGGACTTGGTAGGTGCCTCC	
oPVP55	GCTCATTTAGCGCTTCTGTG	
oPVP56	CGCTGCCTACCCAATTCGCT	
Q-TK-F	AACCGGGCCAGCTGAACAT	扩增TK基因全长 full length of TK gene
Q-TK-R	TGTGTGTATCCCAATAAACG	

的方法, 将KHV在脑组织中的数量设定为1, 根据KHV在各组织中的相对表达量进行分析。

1.9 基因型分析

按照Dong等^[9]的方法, 扩增TK基因全长。测序后, 利用Clustal X 1.8软件与各基因型序列进行多重比对, 进而利用MEGA 6软件构建系统发育树, 并通过分析系统发育树的聚类关系来确定基因型。在此基础上, 参照Bigarré等^[10]的方法, 以患病鱼鳃组织的基因组DNA为模板, oPVP53~56为引物(表1), PCR扩增KHV的Markers I/II基因位点, 其中oPVP53、oPVP54结合在Marker I位点, oPVP55、oPVP56结合在Marker II位点。反应体系和反应程序参照“病毒检测和序列分析”。PCR产物经1.2%的琼脂糖凝胶回收后, 与pMD18-T载体进行连接, 连接产物转化感受态*E. coli* TOP10细胞后, 涂布含Amp的LB平

板, 挑取阳性克隆进行测序分析。

1.10 组织病理变化观察

为了观察患病鱼的组织器官病理变化, 取患病鱼鳃、肝、肾、脾, 用中性甲醛固定, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, H.E染色, 中性树脂胶封片, 显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 患病鱼症状和病原检查

患病锦鲤分散于水体表层, 厌食、对外界反应迟钝。体表黏液增多, 部分鱼体表充血(图版I-1), 眼睛和头部上方凹陷(图版I-2), 部分鳃丝腐烂, 呈“花鳃”状(图版I-3)。通过对患病鱼进行细菌分离, 除接种肝组织的平板长有1~2个菌落外, 其他平板未见有菌落生长; 此外, 利

用显微镜对患病鱼进行寄生虫检查,除在低倍镜的视野中发现鳃丝存在1~2个指环虫的寄生外,未观察到其他寄生虫。

2.2 电镜观察

通过透射电镜进行观察,在鳃组织中发现大量的球形病毒颗粒(图版II-1),病毒颗粒呈现两种不同的形态,分别为成熟的病毒颗粒(黑色箭头)和正在装备中的未成熟病毒颗粒(白色箭头)(图版II-1)。在肾组织中也发现病毒颗粒(图版II-2中黑色三角形所示),病毒颗粒的直径为110~120 nm(图版II-3)。在人工感染的锦鲤鳍条原代细胞中发现了同样大小的病毒粒子(图版II-4)。此外,在脾、肝和脑组织中未发现病毒粒子。

2.3 人工感染实验

通过人工感染实验,可导致健康锦鲤的死亡。腹腔注射患病鱼组织匀浆滤液3 d后,鱼开始死亡,第5~9天为死亡高峰期,第10天死亡率达到93.3%,在注射产生病变的细胞上清液后,实验鱼的死亡率达到86.7%(图1)。发病鱼呈现鳃丝发白的症状,利用发病鱼鳃组织的基因组DNA为模板进行PCR扩增,能检测到KHV呈阳性。对照组在人工模拟感染后的第2天有1尾鱼死亡,可能是操作不当所致。

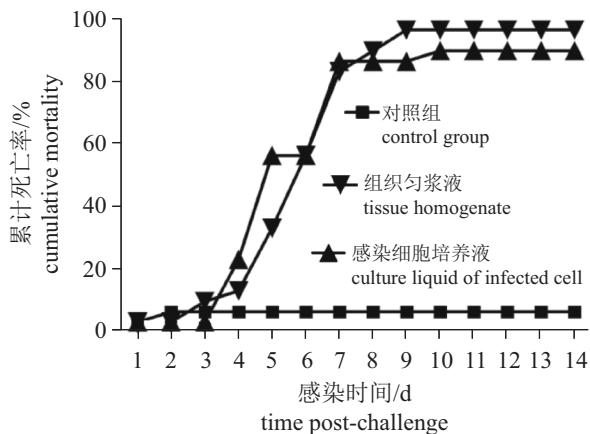


图1 人工感染锦鲤的累计死亡率

Fig. 1 Cumulative mortalities of experimental infected koi

2.4 组织滤液感染锦鲤鳍条原代细胞

组织滤液感染锦鲤鳍条原代细胞后,从第7天开始可以观察到典型的细胞病变效应,细胞开始脱落,细胞层中出现大量空泡,而阴性对

照组没有发现变化(图版III),且利用PCR检测病变细胞,KHV呈阳性(图2)。

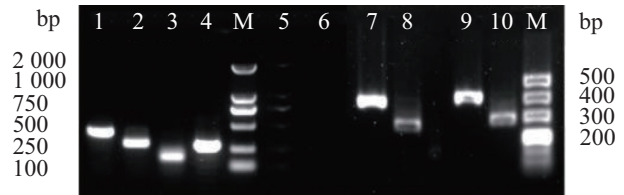


图2 锦鲤疱疹病毒和鲤浮肿病毒的PCR检测和锦鲤疱疹病毒基因型分析

M. DL2 000 DNA Marker; 1、2. 检测患病鱼锦鲤疱疹病毒TK基因和Sph基因片段; 3、4. 扩增锦鲤疱疹病毒Marker I和Marker II片段; 5、6. 检测鲤浮肿病毒; 7、8. 检测人工感染鱼的锦鲤疱疹病毒TK基因和Sph基因片段; 9、10. 检测感染细胞的锦鲤疱疹病毒TK基因和Sph基因片段

Fig. 2 PCR assay of KHV and CEV and genotype identification of KHV

M. DL2 000 DNA Marker; 1. TK gene fragment; 2. Sph gene fragment; 3. Marker I; 4. Marker II; 5 and 6. PCR assay of CEV; 7 and 8. experimentally infected fish; 9 and 10. experimentally infected cell

2.5 KHV的核酸分子检测

分别对KHV的TK和Sph基因片段进行了PCR检测,结果显示能扩增出409和292 bp的特异性核酸片段,但利用PCR的方法未能检测出CEV阳性(图2)。此外,利用相同的方法对2014~2016年从天津地区收集的10个发病鲤的样品进行KHV检测,5个样品检测出阳性,5个样品为阴性(图3)。

利用荧光定量PCR的方法对鳃、肾、脾、肝和脑组织中KHV的数量进行了检测。结果表明,KHV的数量在鳃组织中最,其次为肾

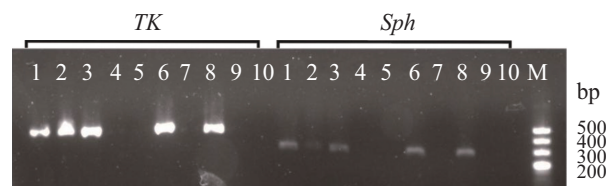


图3 2014~2016年10个收集样本的KHV检测

M. DL2 000 DNA Marker; 1~10分别为10个收集样品,同时扩增TK和Sph基因片段,其中样品1、2、3、6、8检测结果为阳性,样品4、5、7、9、10为阴性

Fig. 3 KHV test of 10 samples collected in 2014-2016

M. DL2 000 DNA Marker; 1-10 show ten samples, TK and Sph genes fragment were tested together. Sample 1, 2, 3, 6, 8 gave positive, and sample 4, 5, 7, 9, 10 gave negative results

脏, 脑组织中最少。鳃、肾、肝、脾中KHV的数量分别为脑组织中的707.4、24.9、9.8和4.6倍(图4)。

2.6 基因型鉴定

扩增分离株KHV-TJ1601的TK基因全长, 通

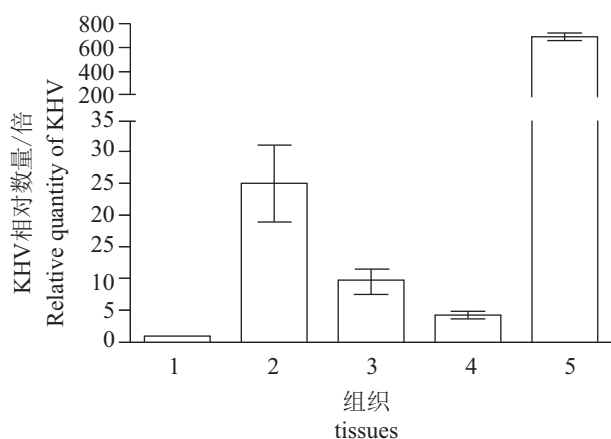


图4 KHV在各组织中的分布

1. 脑; 2. 肾; 3. 肝; 4. 脾; 5. 鳃

Fig. 4 Distribution of KHV in diseased *C. carpio*

1. brain; 2. kidney; 3. liver; 4. spleen; 5. gill

过测序并利用NCBI网站进行在线序列比对, 发现与亚洲型(genotype A1)的相似度最高, 为100%。采用邻接法利用软件MEGA 5.0建立进化树, 发现KHV-TJ1601与亚洲型毒株聚为一支, 而欧洲型毒株聚为另一支(图5), 由此可见分离株KHV-TJ1601属于亚洲型。

针对KHV-TJ1601的Marker I和Marker II基因位点进行PCR扩增, 分别扩增出168和278 bp的核酸片段(图2), 结合测序结果, 通过与各基因型典型毒株的序列比对, 发现分离株KHV-TJ1601的Marker I基因位点序列与I⁺一致, Marker II基因位点序列与II⁻一致, 表明此次分离出的KHV-TJ1601毒株为I⁺II⁻基因型(图6)。

2.7 组织病理观察

病理切片观察显示, 患病鱼鳃丝肿胀, 鳃丝末端部分腐烂(图版IV), 鳃丝和部分鳃小片充血(图版IV-1, 2→所示), 甚至在鳃小片末端形成水肿(图版IV-1▼所示), 部分鳃小片坏死断裂脱落(图版IV-1★所示)。肝细胞脂肪变性, 可见大量大小不一的圆形空泡(图版IV-3→所示)。肾组织中有少量铁血黄素沉积(图版IV-4→所示)。

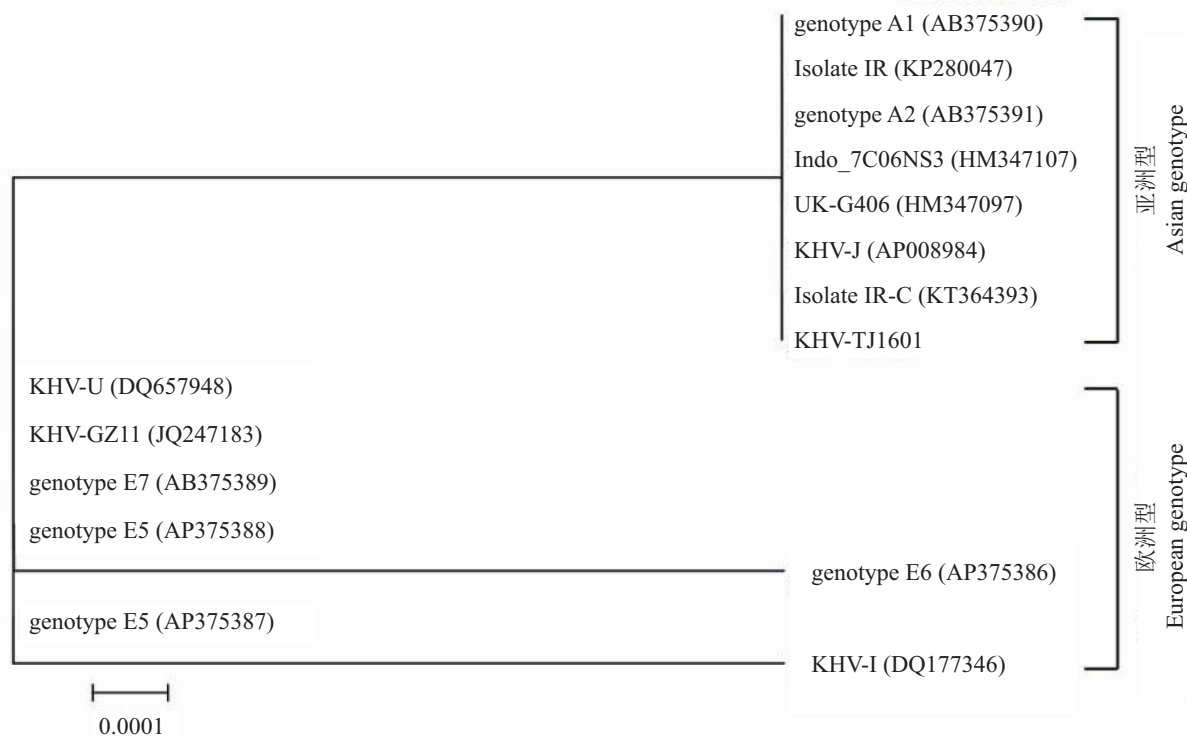


图5 基于TK基因利用邻接法构建进化树

Fig. 5 Constructing the phylogenetic tree based on Neighbor-joining analyses of the TK gene sequences

```

U(I-) CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAA-----CCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
P(I+) CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAA-----CCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
I(I+) CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAAACCTCAACCCCGGCAGCCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
J(I+) CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAAACCTCAACCCCGGCAGCCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
M(I+) CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAAACCTCAACCCCGGCAGCCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
* CTACTCAGGAGCCATCATCGGCAAACCTCAACCCCGGCAGCCTCAACCCCGGCAGCCTCAACTTCACCTTCAGAATCTTCAACGGTATGGATGATAGAG
U(I-) TCG-----CGAG
P(I+) TCGGAGTCGTCCACGATGGTGACACCCGAG
I(I+) TCGGAGTCGTCCACGATGGTGACACCCGAG
J(I+) TCGGAGTCGTCCACGATGGTGACACCCGAG
M(I+) TCGGAGTCGTCCACGATGGTGACACCCGAG
* TCGGAGTCGTCCACGATGGTGACACCCGAG

```

(a)

```

U(II-) TAA-----ATGAACAGAAAGAAAGCTC
P(II-) TAA-----ATGAACAGAAAGAAAGCTC
I(II-) TAA-----ATGAACAGAAAGAAAGCTC
J(II+) TAAATGAACAGAAAGAAAGCTCAGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAGTACCAGGGCGCCGATCTCGAGGTCGATGAACAGAAAGAAAGCTC
M(II+) TAAATGAACAGAAAGAAAGCTCAGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAGTACCAGGGCGCCGATCTCGAGGTCGATGAA-----C
* TAA-----ATGAACAGAAAGAAAGCTC
U(II-) AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG
P(II-) AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG
I(II-) AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG
J(II+) AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG
M(II+) AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG
* AGAAGTGAGATGGGCCAGAAAGCAGCAGCAAG

```

(b)

图 6 KHV典型分离株Marker I (a)和Marker II (b)位点的多序列比对

U.美国分离株(DQ657948); P.波兰分离株PL2; I.印度尼西亚分离株K05; J.日本分离株AP008984; M.马来西亚分离株A10/09/05; *.来自本实验

Fig. 6 Alignment of the Marker I (a) and Marker II (b) sequences in representative KHV isolates

U.United States (DQ657948); P.Poland PL2; I.Indonesia K05; J.Japan AP008984; M.Malaysia A10/09/05; *. in this study (KHV-TJ1601)

3 讨论

近年来，鲤暴发性疾病导致死亡的情况在天津地区常有发生，但对于其原因的分析却未见报道。为分析引起病害的原因，本研究首先对患病鱼进行了病原菌分离和寄生虫检查，发现除了在鳃部寄生少量的指环虫外，其他组织中均未发现寄生虫；而在肾、肝、脾等组织中也未分离到大量的细菌。因此，推测引起此次鲤发病的病原不是寄生虫和细菌。使用0.22 μm的滤膜将患病鱼组织匀浆液过滤除菌后对健康锦鲤进行注射攻毒能导致较高的死亡率，且通过电镜切片在鳃组织中发现了大量的病毒粒子。据此推测病毒可能是引起此次锦鲤大规模死亡的病原。

根据国内外现有文献的报道，鲤的病毒性病原主要有鲤春病毒 (spring viraemia of carp)、鲤浮肿病毒和鲤疱疹病毒^[4, 11-14]。鲤春病毒病通常在春季暴发，发病水温通常为10~17 °C^[15]，而此次疾病发生池塘的水温为25 °C，且发病鱼的主要症状与鲤春病毒病不符，患病鱼眼球突出是感染鲤春病毒的主要症状之一，而本实验中患

病鱼的主要症状为眼睛凹陷，因此排除了鲤春病毒感染的可能。分别对鲤浮肿病毒和鲤疱疹病毒进行了PCR检测，结果显示鲤浮肿病毒呈阴性。鲤疱疹病毒包括鲤疱疹病毒I型、II型和III型，其中感染鲤疱疹病毒I型的鲤仅在体表形成结节，通常不导致死亡^[16-17]；鲤疱疹病毒II型主要感染鲫(*Carassius auratus*)和金鱼，不能感染鲤和锦鲤，但鲤和锦鲤是鲤疱疹病毒III型的易感对象^[2, 17-18]。鲤疱疹病毒III型又称锦鲤疱疹病毒(KHV)，是一种引起鲤和锦鲤高传染性疾病的病原。2002年，在印度尼西亚和中国台湾地区首次发现了KHV引起鲤和锦鲤大规模死亡的现象^[19-20]；2003年，日本发生了KHV引发的疾病^[21]。近年来，在中国的辽宁、海南、广东等地先后发现了KHV感染鲤和锦鲤的情况，造成了重大经济损失^[4, 14, 22]。本研究中，利用PCR方法从患病锦鲤中检测到KHV呈阳性，利用组织滤液能引起锦鲤鳍条原代细胞发生病变，且利用组织滤液和细胞培养上清液能感染健康锦鲤并分别导致93.3%和86.7%的死亡率，取人工感染的濒死鱼进行PCR检测，确认KHV呈阳性。因此，推断锦鲤疱疹病毒是引起此类疾病的病原。此外，对

2014–2016年从天津地区收集到的10个出现类似症状的患病鱼样品进行PCR检测, 结果5个样品检测到KHV呈阳性, 这也说明KHV已成为天津地区养殖鲤的常见病原。

由于利用细胞系分离KHV比较困难, 因此世界动物卫生组织(OIE)水生动物疾病诊断手册将PCR检测方法作为优先推荐方法^[23]。为进一步分析KHV在患病鱼组织中的分布, 利用荧光定量PCR技术进行了检测, 结果显示, KHV在鳃组织中含最高, 肾次之, 肝和脾中较少, 脑组织中最少, 这与电镜观察的结果一致。通过电镜观察, 发现在鳃组织中存在大量的病毒粒子, 肾组织中病毒颗粒较少, 而在脑、肝和脾组织中未观察到病毒粒子。且利用组织病理切片也发现, 鳃和肾脏都发生病理变化, 以上结果说明鳃和肾脏是KHV的主要靶器官, 这与Gilad等^[7]和Pikarsky等^[24]的研究结果一致。

目前, KHV常用的分型方法主要有两种。第一种是基于Sph I-5片段、9/5片段和TK基因, 将KHV分为亚洲基因型和欧洲基因型, 其中亚洲基因型和欧洲基因型分别有2个和7个变异体; 第二种是基于Marker I/II分型系统, 根据不同毒株在Marker I和Marker II基因位点存在核酸片段插入或缺失突变的情况, 可以将KHV区分为5个基因型: I⁺⁺II⁺、I⁻II⁻、I⁺II⁻、I⁺⁺II⁻、I⁺⁺II^Δ^[10, 25-26], 国内关于I⁺II⁻和I⁺⁺II^Δ基因型的报道较多^[26-27]。通过对TK基因进行序列比对和聚类分析, 发现本次分离的KHV-TJ1601毒株与亚洲型genotype A1存在100%的相似度, 且通过构建系统发育树发现, 其与亚洲型聚为一支, 因此可以确定KHV-TJ1601毒株属于亚洲型。利用Marker I/II分型系统, PCR扩增结合序列分析表明, 本实验中分离到的KHV-TJ1601分离株为I⁺⁺II⁻基因型。尽管有报道称KHV I⁺⁺II⁻型从2002年开始已经在印度尼西亚广泛传播, 且往往出现与I⁺⁺II⁻基因型混合感染的现象^[25], 但国内却鲜有报道。最近, Liu等^[28]分别在我国广东和河南的鲤和锦鲤中检测到KHV I⁺⁺II⁻型。本实验首次在华北地区发现了I⁺⁺II⁻基因型的KHV毒株, 该毒株与Liu等^[28]分离的同基因型毒株在进化上有什么联系还有待于进一步研究。

为有效对KHV进行防控, 以色列已经研制出KHV疫苗, 并成功上市, 但根据文献报道,

以色列分离出的KHV毒株为欧洲型和I⁻II⁻基因型^[10, 23], 该基因型的疫苗是否适合于天津地区亚洲型还需进一步研究。本研究结果能为锦鲤疱疹病毒的分离、鉴定和基因型分析提供参考, 也为今后疫苗的研制及锦鲤疱疹病毒病防控奠定基础。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 2013中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. 2013 China Fisheries Yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2013(in Chinese).
- [2] 刘韬, 汪开毓, 陈俊杰, 等. 江苏盐城地区异育银鲫大红鳃疾病病原学研究及病理学观察[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 928-934.
Liu T, Wang K Y, Chen J J, *et al.* Etiology investigation and histopathological study on "red-gill" of silver Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) in Yancheng city[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(5): 928-934(in Chinese).
- [3] 徐进, 曾令兵, 杨德国, 等. 鲤疱疹病毒2型武汉株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1303-1309.
Xu J, Zeng L B, Yang D G, *et al.* Isolation and characterization of Cyprinid herpesvirus 2 WH strain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1303-1309(in Chinese).
- [4] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(5): 340-343.
Zhu X, Li X W, Wang H, *et al.* Isolation and identification of kio herpesvirus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011, 33(5): 340-343(in Chinese).
- [5] 中华人民共和国农业部. SC/T 7212.1-2011鲤疱疹病毒检测方法第1部分: 锦鲤疱疹病毒[S]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. SC/T 7212.1-2011 Detection methods of cyprinid herpesvirus (CyHV)-Part 1: Koi herpesvirus[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2011(in Chinese).
- [6] Oyamatsu T, Matoyama H, Yamamoto K Y, *et al.* A trial for the detection of carp edema virus by using polymerase chain reaction[J]. Aquaculture Science, 1997, 45(2): 247-251.
- [7] Gilad O, Yun S S, Zagmutt-Vergara F J, *et al.* Concen-

- trations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(3): 179-187.
- [8] 王改玲, 骆彦萍, 孙宝剑, 等. 鳊免疫球蛋白D重链基因的克隆与表达分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 11-20.
Wang G L, Luo Y P, Sun B J, *et al.* Cloning and expression of immunoglobulin D heavy chain in mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 11-20(in Chinese).
- [9] Dong C F, Li X Z, Weng S P, *et al.* Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 239-244.
- [10] Bigarré L, Baud M, Cabon J, *et al.* Differentiation between cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 158(1-2): 51-57.
- [11] Hoffmann B, Schütze H, Mettenleiter T C. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus[J]. *Virus Research*, 2002, 84(1-2): 89-100.
- [12] Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J, *et al.* Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 245-251.
- [13] Rahmati-Holasoo H, Zargar A, Ahmadvand S, *et al.* First detection of koi herpesvirus from koi, *Cyprinus carpio* L. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(10): 1153-1163.
- [14] 马杰, 周勇, 范玉顶, 等. 鲤疱疹病毒II型的理化及生物学特性和超微形态发生[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 475-483.
Ma J, Zhou Y, Fan Y D, *et al.* The physical-chemical and biological characteristics of Cyprinid herpesvirus 2 and its ultrastructural morphogenesis *in vitro*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 475-483(in Chinese).
- [15] 付峰, 刘荭, 黄健, 等. 鲤春病毒血症病毒(SVCV)的研究进展[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 328-334.
Fu F, Liu H, Huang J, *et al.* Study progress of spring viremia of carp virus[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 328-334(in Chinese).
- [16] Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish[J]. *Viruses*, 2011, 3(11): 2160-2191.
- [17] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鲤疱疹病毒II型的分子诊断[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(1): 92-96.
Li L J, Luo Y Z, Liu X Q, *et al.* Molecular surveillance of *Cyprinid herpesvirus 2* in goldfish cultured in China[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(1): 92-96(in Chinese).
- [18] Hedrick R P, Waltzek T B, McDowell T S. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish × common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 26-34.
- [19] Tu C, Weng M C, Shiau J R, *et al.* Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan[J]. *Fish Pathology*, 2004, 39(2): 109-110.
- [20] Sunarto A, Rukyani A, Itami T. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Bull Fish Res Agency*, 2005(S2): 15-21.
- [21] Sano M, Ito T, Kurita J, *et al.* First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan[J]. *Fish Pathology*, 2004, 39(3): 165-167.
- [22] 周永灿, 袁军法, 任武泽, 等. 锦鲤疱疹病毒的检测与人工感染试验[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2005, 51(S2): 249-252.
Zhou Y C, Yuan J F, Ren W Z, *et al.* Detection and experimental infection of koi herpesvirus[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2005, 51(S2): 249-252(in Chinese).
- [23] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型研究进展[J]. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108-120.
Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, *et al.* Research advances in cyprinid herpesvirus 3[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(1): 108-120(in Chinese).
- [24] Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, *et al.* Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(17): 9544-9551.
- [25] Sunarto A, McColl K A, Crane M S J, *et al.* Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage[J]. *Journal of Fish Disease*, 2011, 34(2): 87-101.
- [26] Chen J, Chee D, Wang Y, *et al.* Identification of a novel cyprinid herpesvirus 3 genotype detected in koi from the East Asian and South-East Asian Regions[J]. *Journal of*

- Fish Disease, 2015, 38(10): 915-923. 185-194.
- [27] Li W, Lee X Z, Weng S P, *et al.* Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(2-4): 185-194.
- [28] Liu Z C, Ke H, Ma Y P, *et al.* First report of occurrences of two cyprinid herpesvirus 3 variants I⁺ II⁻ and I⁺⁺ II⁺, in China[J]. Fish Pathology, 2016, 51(4): 169-175.

Isolation and characterization of a strain of koi herpesvirus from diseased koi in Tianjin

LUO Zhang¹, HAO Shuang¹, ZHANG Zhenguo¹, MENG Yigeng¹,
SHI Xieyao², FENG Shouming^{1*}

(1. Tianjin Fishery Research Institute, Tianjin 300221, China;

2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: To investigate the cause of sudden death of the koi (*Cyprinus carpio*), the moribund koi that showed typical symptoms including sunken eyes and head, rotted gill and haemorrhages on the skin were examined. No bacteria were isolated from spleen, liver and kidney of diseased fish by bacteriological examination, but a large number of viral nucleocapsid were found in gill tissue by electron microscopy observation. After filtration treatment, the gills, brain, liver, spleen, and kidney tissue suspension was inoculated to carp fin cells, Cytopathic effects (CPE) were presented 7 days post co-cultivation. In artificial infection test, the death rate of fish by infecting tissue homogenate and culture liquid of infected cell reached 93.3% and 86.7% respectively. Histopathological analysis showed that the target organs included the gill, liver and kidney. Positive results were obtained from diseased koi according to a PCR diagnosis of koi herpesvirus (KHV) proposed by Office International des Epizooties (OIE), and high concentration of KHV was detected in gill and kidney tissue by fluorescence quantitative PCR. Based on neighbor-joining analyses of the TK gene sequences, phylogenetic tree was constructed and the result indicated that the KHV isolated in our study was Asian genotype isolate. Furthermore, according to the sequence alignment of Marker I and Marker II regions of KHV, the KHV detected in this study belongs to I⁺⁺II⁻ genotype, and was named KHV-TJ1601. The present study demonstrated that the I⁺⁺II⁻ genotype KHV was isolated from the naturally infected fish in North China for the first time, and provided important material for virus genesis, evolution, classification, and vaccine preparation.

Key words: *Cyprinus carpio*; KHV; isolation and identification; genotype; Tianjin

Corresponding author: FENG Shouming. E-mail: smfeng65@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Tianjin (16 JCYBJC30000); Science and Technology Program of Tianjin (15 ZXBFC00290); Project for Achievement Transformation and Promotion of Agricultural Science and Technology of Tianjin (201501030); Project for Tianjin Fisheries Innovative Team (ITTFR2017008)

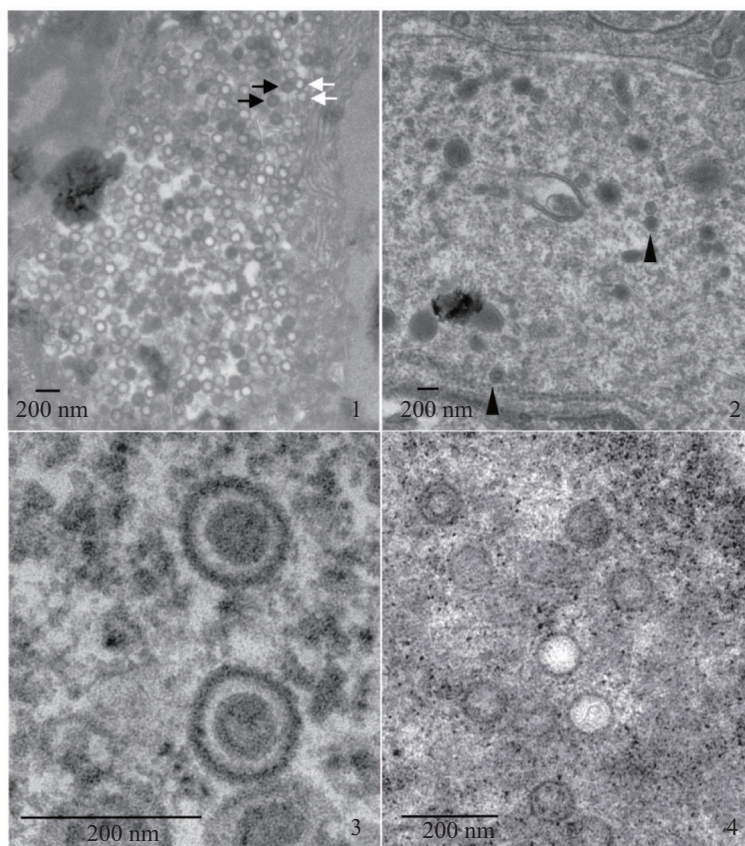


图版 I 患病锦鲤典型症状

1. 体表充血; 2. 眼睛凹陷; 3. 鳃丝腐烂

Plate I Typical symptom in diseased *C. carpio*

1. surface hyperemia; 2. sunken eyes; 3. rotten gill

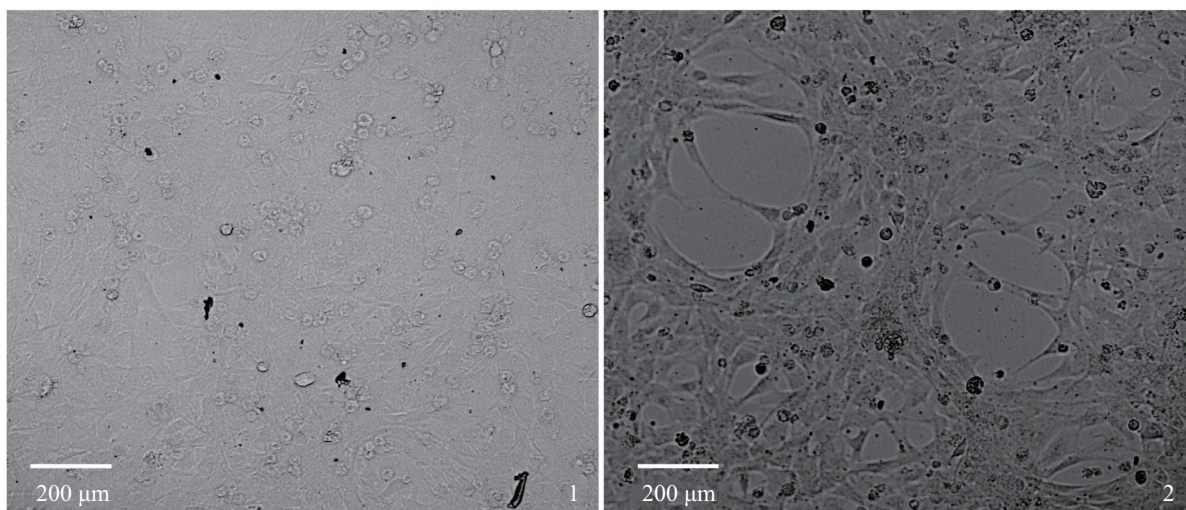


图版 II 患病锦鲤鳃和肾组织超薄切片电镜观察

1. 鳃细胞中的病毒粒子; 2, 3. 肾脏细胞中的病毒粒子; 4. 细胞中的病毒粒子

Plate II Transimission electron micrograph of gill and kidney cells from a diseased *C. carpio*

1. virus particles in gill cell; 2, 3. virus particles in kidney cell; 4. virus particles in fin cells

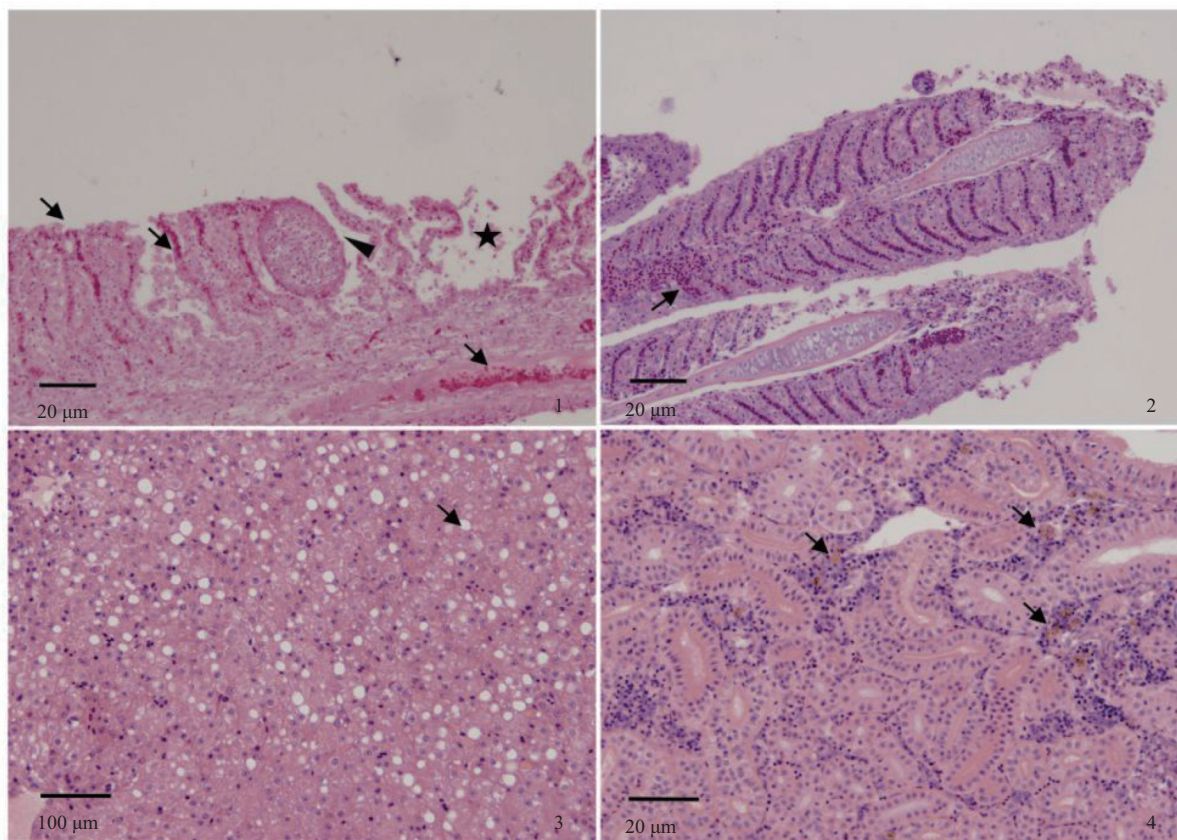


图版 III 患病锦鲤组织匀浆液过滤后接种锦鲤鳍条原代细胞后引起的细胞病变效应

1. 对照; 2. 感染细胞

Plate III Cytopathic effect of Koi-Fin cell monolayer inoculated with diseased *C. carpio* tissue homogenate filtrate

1. control; 2. infected cell



图版 IV 患病锦鲤组织病理变化

1. 鳃丝腐烂; 2. 鳃丝肿胀; 3. 肝细胞坏死; 4. 肾脏病变

Plate IV Histopathological changes of diseased *C. carpio*

1. rotten gills; 2. swollen gills; 3. hepatocyte necrosis; 4. lesion in kidney