

文章编号: 1000-0615(2019)12-2567-07

DOI: 10.11964/jfc.20180511284

四川彭州地区养殖虹鳟传染性造血器官坏死病 病毒的分离、鉴定及病理学观察

刘 韬^{1,2}, 魏文燕³, 刘家星³, 杨 马³, 杨 倩¹,
何晟毓¹, 何琦瑶¹, 谢 恒¹, 汪开毓^{2,3*}

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130;

3. 成都市农林科学院, 四川 成都 611130)

摘要: 近期, 四川省成都彭州市某虹鳟养殖场暴发流行疾病, 导致养殖虹鳟死亡率高达90%。现场采样观察发现患病鱼主要症状为背部发黑, 鳃壁、腹膜严重出血, 心包积液, 空肠、空胃和显著肠炎。同时对病鱼进行细菌学与组织病理学检测, 细菌学检查结果为阴性, 病理学观察发现脾脏有典型凝固性坏死, 肝脏组织广泛变性、坏死, 肠道黏膜下层水肿, 肠上皮充血及上皮细胞脱落坏死, 脑膜和心外膜水肿。将病鱼的脾组织研磨过滤除菌后, 腹腔注射60尾健康虹鳟, 注射组均表现为急性死亡(累计死亡率达85%), 试验鱼出现与自然发病鱼相同的症状而对照组无异常。取病鱼的脾脏组织研磨过滤后接种胖头鲤细胞(fathead minnow cell, FHM), 细胞感染3 d后出现典型的细胞病变效应(CPE)。针对编码IHNV糖蛋白(Glycoprotein, G)基因进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测显示, 患病鱼、人工感染病鱼和病变细胞均为IHNV阳性, 扩增序列与IHNV糖蛋白基因同源率为98.2%。对该病毒分离株的G基因进行系统发育分析, 结果显示, 该分离株与亚洲分离株聚为一簇, 属于Jrt基因型。

关键词: 虹鳟; 传染性造血器官坏死病毒; 病理形态学; 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(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是一种由传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)引起的鲑科(Salmonid)鱼类死亡的烈性病毒性传染病^[1]。IHNV属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)粒外弹状病毒属(Novirhabdovirus)成员, 主要感染大西洋鲑(*Salmo salar*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等冷水养殖品种, 呈世界范围流行, 发病迅速, 传染性极强, 死亡率一般高达90%以上^[2]。IHNV是冷水鱼养殖过程中十分重要的病原, 鉴于其对世界范围内鲑科鱼类养殖业造成的严重经济损失和巨大威胁, 世界动物卫生组织(OIE)

已将之纳入《水生动物卫生法典》, 同时《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》将其归入二类动物疫病。

四川地区渔业发展迅猛, 特别是成都地区已形成较为完整的渔业产业链, 尤其在冷水鱼养殖方面在国内产生了较大影响。成都彭州地区也属于四川西南地区冷水鱼养殖集中区域。近年来彭州地区冷水鱼产业发展极为迅速, 然而, 集约化养殖也带来了多种传染性和暴发性疾病。本研究从成都彭州东林寺某养殖场自然感染的发病虹鳟体内分离到一株IHNV, 并对患病鱼进行了病理组织学观察、人工感染试验和

收稿日期: 2018-05-15 修回日期: 2018-07-11

资助项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 成都市农林科学院科研创新项目(2017-Y2500W-16)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

特异性逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测, 进一步了解该病毒的感染机制和发病机理, 并以IHNV的特异性糖蛋白(Glycoprotein, G)基因全序列为基础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amp;方法

1.1 材料

病鱼采集于2017年10月, 来源于四川省彭州市某虹鳟养殖场, 患病鱼体质量为1~1.5 kg。健康虹鳟来源于四川省成都市某虹鳟养殖场, 体质量为1~1.5 kg。胖头鲤细胞(FHM)由珠江水产研究所惠赠; 脑心浸液培养基(BHI)购自北京索莱宝科技有限公司; DNA胶回收试剂盒、PCR-Mix reaction buffer购自生工生物工程(上海)股份有限公司; pMD-19T质粒连接试剂盒、TRIzol试剂盒、PrimeScript™RT试剂盒购自宝生物工程(大连)试剂有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 解剖及细菌学检查和组织病理学观察

对患病濒死虹鳟进行常规解剖学观察; 同时取肾脏、肝脏和脑等组织器官剪开其切面于洁净载玻片上涂片, 风干后进行革兰氏染色, 油镜观察; 无菌条件下, 从病鱼肝脏、脾脏和肾脏等组织器官中穿刺划线于BHI平板, 28 °C恒温培养, 48 h后观察细菌生长状况。

取患病濒死虹鳟的肝脏、肾脏、脾脏、脑、心脏、肠等组织, 10%中性福尔马林溶液固定, 常规石蜡切片, H.E染色, 中性树胶封片, 风干后光学显微镜观察组织病理学变化并照相记录。

1.3 人工感染实验

分别取患病濒死虹鳟的肝脏、肾脏组织, 用无菌生理盐水溶液以1:5(M:V)的比例在冰上匀浆; 4 °C条件3 000、6 000、9 000 r/min梯度离心10 min; 取上清液于0.22 μL滤膜过滤除菌。健康虹鳟分为2组, 每组30尾。试验组每尾注射0.2 mL的组织匀浆液, 对照组每尾注射0.2 mL无菌生理盐水溶液。实验期间水温控制在13~17 °C, 连续观察2周, 并记录死亡率。

1.4 病毒分离培养

无菌条件下, 取患病濒死虹鳟的肾脏组织, 剪碎后按1:10比例匀浆成悬液。反复冻融3次后

4 °C条件下10 000 r/min离心10 min, 取上清液经0.22 μm滤膜过滤; 取组织上清液接种于胖头鲤细胞(fathead minnow cell, FHM), 15 °C吸附4 h后弃病毒液, 加入M199维持营养液(含2%小牛血清和100 IU/mL双抗)于15 °C培养; 每隔24 h更换新细胞维持液继续培养。待约80%以上细胞出现病变后, 收获病毒并于-80 °C保存备用。

1.5 RT-PCR鉴定

参照Jia等^[3]方法合成检测IHNV的引物。上游引物5'-ATGGACGCCATGATCACCCT-3', 下游引物5'-TTAGGACCTGTTTGCCAGGTG-3', 预期扩增片段大小为1 527 bp, 其编码IHNV的糖蛋白。该引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。取自然感染的幼鱼、鱼苗和人工感染病鱼的经液氮研磨的肝脏粉末和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, 30个循环; 72 °C终延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物大小。PCR产物经DNA纯化试剂盒纯化后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在GenBank进行BLAST比对。

1.6 部分糖蛋白基因克隆测序及系统发育分析

IHNV的G基因是一段长度约为1 527 bp的糖蛋白基因序列, 包含IHNV的抗原决定簇^[4], 国外学者也多采用G基因对IHNV毒株进行系统发育分析。利用纯化试剂盒对“RT-PCR鉴定”部分中扩增的G基因全长序列的PCR产物进行DNA纯化后, 按操作说明书连接到pMD19-T载体上, 转化至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, 提取质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

下载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Multiple Sequence Aligment进行多序列比对G基因区域, MEGA 7.0邻近法(NJ法)构建系统发育树, 自举重复数为1 000。

2 结果

2.1 解剖及细菌学检查

解剖后观察发现鱼体全身出血症状明显, 特别是鳔膜严重出血(图1-1), 脑部脑膜出血(图1-2), 空肠、空胃, 明显肠炎和肠道黏膜面大量弥散性出血(图1-3, 5); 剖开肠道可见透明黄色黏液。其他脏器主要表现为免疫器官如脾脏的肿大(图1-4), 以及心包内积液(图1-6)。肾脏、肝脏和脑等组织涂片未检测到细菌, 且未能从发病鱼的肝脏、脾脏和肾脏分离到细菌。

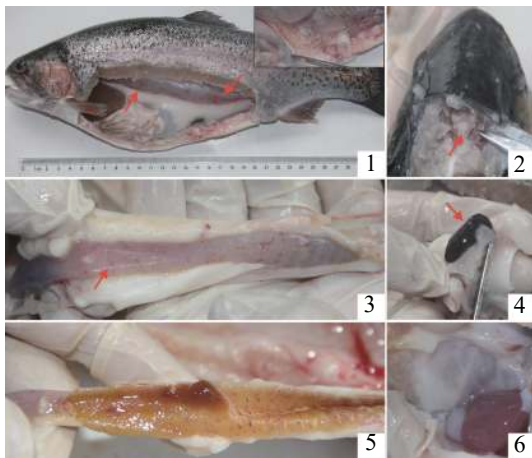


图 1 病鱼解剖特征

1. 病鱼鳔壁严重出血(箭头); 2. 脑膜弥散有出血点(箭头); 3、4. 肠道黏膜弥散有出血点(箭头), 肠炎; 5. 脾脏肿大; 6. 心包积液

Fig. 1 Clinical signs of diseased fish

1. swimming bladder generally exhibited petechiae (arrow); 2. meninges petechiae (arrow); 3, 4. gastric distention (arrow), enteritis; 5. splenomegaly; 6. hydropericardium

2.2 组织病理学观察

组织病理学观察发现, 肠道、脾脏和肝脏等器官的损伤显著。典型病理变化表现为肠道黏膜下层水肿(图版 I -1, 箭头), 肠黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落(图版 I -2, *), 肠道黏膜层充血(图版 I -2, 箭头); 肝脏肝索排列紊乱, 部分区域水肿(图版 I -3), 肝细胞变性萎缩(图版 I -4); 脾脏有典型的凝固型坏死区域(图版 I -5, *), 脾脏出血; 脑部皮质层和髓质层均有水肿(图版 I -6, *), 脑膜浮离水肿(图版 I -6, 箭头); 心外膜水肿(图版 I -7); 肾脏呈大面积含铁血黄素沉积(图版 I -8); 鳃小片排列紊乱(图版 I -9)。

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7天累计死亡率达75%, 连续观察14 d 实验组死亡率达85%, 实验组虹鳟主要表现为急性死亡并与自然发病虹鳟出现相同的临床症状。对照组全部存活且无病理性症状(图2)。

2.4 病毒分离培养

对照FHM组细胞生长致密且无明显空斑出现(图版 II -1); 病鱼组织匀浆滤菌后感染FHM细胞, 细胞感染后3 d开始出现空斑(图版 II -2), 细胞感染后5 d细胞病变更为显著, 且大量细胞脱离细胞板(图版 II -3)。

2.5 RT-PCR鉴定

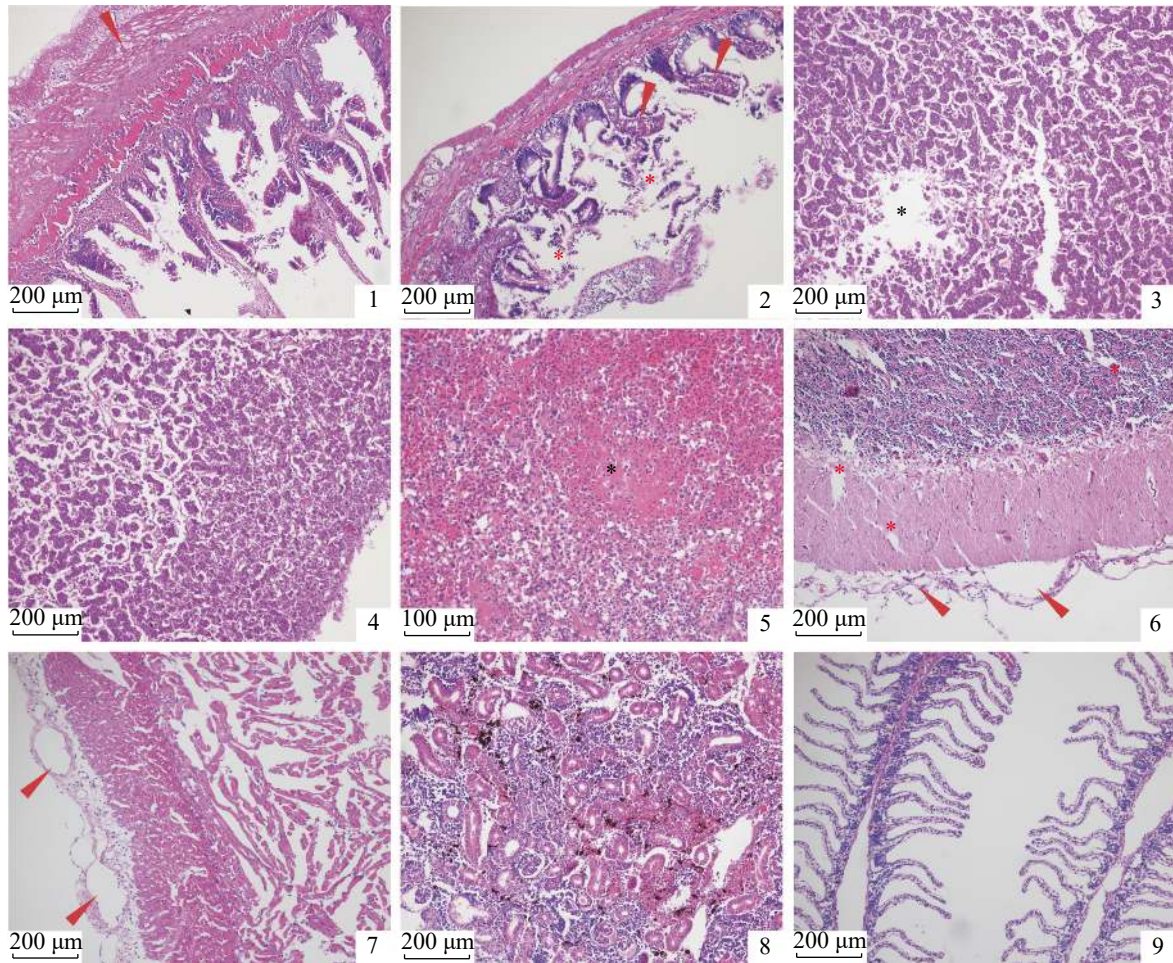
提取自然发病鱼、人工感染病鱼脾脏和病变细胞液的总RNA, RT-PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳(图3), 位于约1 500 bp处均可见特异性DNA扩增条带, 与预期IHN编码G蛋白的基因大小一致, 阴性对照泳道无明显条带。将扩增条带测序结果与GenBank中已知核酸序列进行BLAST比对, 结果显示, 该序列与GenBank中IHN的糖蛋白基因有高度同源性, 同源性高达98.2%。

2.6 部分糖蛋白基因克隆测序及其基因系统发育分析

序列测定结果显示, 克隆目的基因大小为1 527 bp, 与预期大小一致, 将该基因命名为*G-pz*。通过软件构建G基因区域的系统发育树发现, *G-pz*株与亚洲分离株聚为一簇, 均属于JRt基因型(图4)。同源性分析表明该分离株与日本株和韩国株具有相对最高核酸同源性。

3 讨论

IHN是鲑鳟鱼类主要病原, 可以感染虹鳟、黑大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、红大马哈鱼(*O. nerka*)、河鳟(*Salvelinus fontinalis*)、大西洋鲑和其他一些冷水性鱼类^[5]。传染性造血组织坏死病(IHN)往往在水温低于15 °C暴发。根据鱼的种类不同以及不同毒株和环境条件的差异, 一般被感染鱼的累积死亡率可以达90%, 而在急性病例中甚至高达100%^[6]。IHN首次报道流行是上世纪50年代美国华盛顿地区和俄勒冈州地区的部分鲑鳟鱼类孵化场出现^[7]。上世纪70年代, IHN迅速蔓延至太平洋西北地区和美国北部^[8]。此后, 该病逐渐传播至亚洲^[9]和欧洲^[10]。目前, 非



图版 I 病理组织学损伤

1. 肠道肠黏膜下层水肿(箭头); 2. 肠道肠黏膜上皮细胞变性、坏死(箭头)、脱落(*); 3. 肝脏水肿(*), 肝索结构紊乱; 4. 肝细胞变性、坏死; 5. 脾脏凝固性坏死(*); 6. 脑膜水肿(箭头), 皮质层水肿和髓质层水肿(*); 7. 心外膜水肿(箭头); 8. 肾脏含铁血黄素聚集; 9. 鳃小片排列紊乱

Plate I Histopathological lesions

1. the epithelial cell of submucosal edema (arrow); 2. intestinal epithelium showed degeneration, necrosis (*) and detachment (arrow); 3. the liver edema (*), the hepatic cord was disorganized; 4. the hepatocyte showed necrosis; 5. marked coagulative necrosis showed in the spleen (*); 6. meningeal edema (arrow), cortical edema and medullary edema (*); 7. epicardium edema (arrow); 8. hemosiderin pigmentation in the kidney; 9. gill filament arranged disorderly

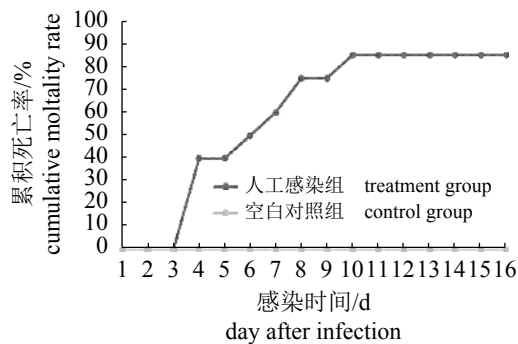
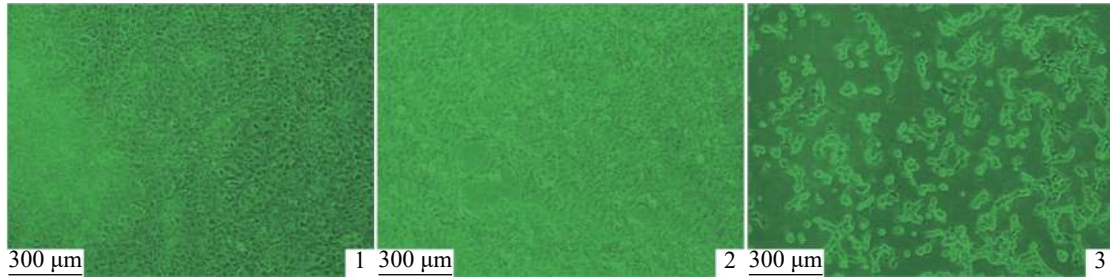


图 2 组织悬液人工感染试验结果

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

洲和南半球地区尚未有关于IHN的报道^[1]。中国首次报道虹鳟感染IHNV是在1985年^[2]。中国上世纪80年代之前鲑鳟养殖业尚未起步,而1983年后我国从美国、俄罗斯和日本引入了多个鲑鳟品种^[3]。研究显示,可能是这一时期引入鲑鳟的鱼苗中携带了IHNV,从此IHN逐渐在国内蔓延,并成为影响中国鲑鳟产业的重要病毒性疾病^[2]。但是,关于IHNV的在我国的流行报道主要集中于东北地区,而西部地区的报道较少^[3]。近年来,冷水鱼产业逐渐成为四川省及其周边地区渔业发展的重心,特别是四川西南地区,拥有较好的冷水鱼养殖自然条件。目前,彭州、



图版 II FHM细胞的细胞病变

Plate II Cytopathic effect of FHM cells

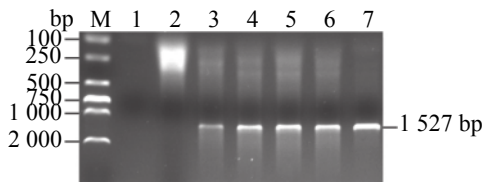


图 3 RT-PCR检测IHNV病毒

1. 阴性对照; 2. 健康鱼; 3. 人工感染虹鳟; 4. 病变细胞; 5-7. 自然感染虹鳟不同个体; M: DL2000分子量标准

Fig. 3 Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three viruses

1. negative control; 2. the health fish; 3. the fish artificially infected; 4. diseased cells; 5-7. the fish naturally infected; M. DL2000 DNA ladder

大邑、崇州、雅安、峨眉、蒲江、都江堰和邛崃等县市依托独特的资源优势使得冷水鱼产业得到了较好发展^[13]。与之相伴的是IHN同样在四

川西南地区流行。2014年, 本研究中心报道了四川省都江堰市某虹鳟养殖场幼鱼和鱼苗暴发IHN的病例^[12]。而本实验进一步报道了四川省彭州市某虹鳟养殖场成鱼发病的病例。本次病例的临床症状和组织病理损伤与多数虹鳟IHNV感染的报道基本一致。通过回归感染实验、病毒的细胞分离、糖蛋白基因的RT-PCR检测及其系统发育分析证实, 此次彭州市虹鳟成鱼暴发性流行病的病原是IHNV。

IHNV感染往往表现为严重的全身性败血症和多组织器官出血以及免疫器官的病变^[14]。一般临床症状可观察到背部发黑、肛门外有黄色透明物质, 空肠、空胃, 肠炎, 脾脏、肾脏肿大, 系膜、脂肪组织、鳃膜、腹膜、脑膜、心

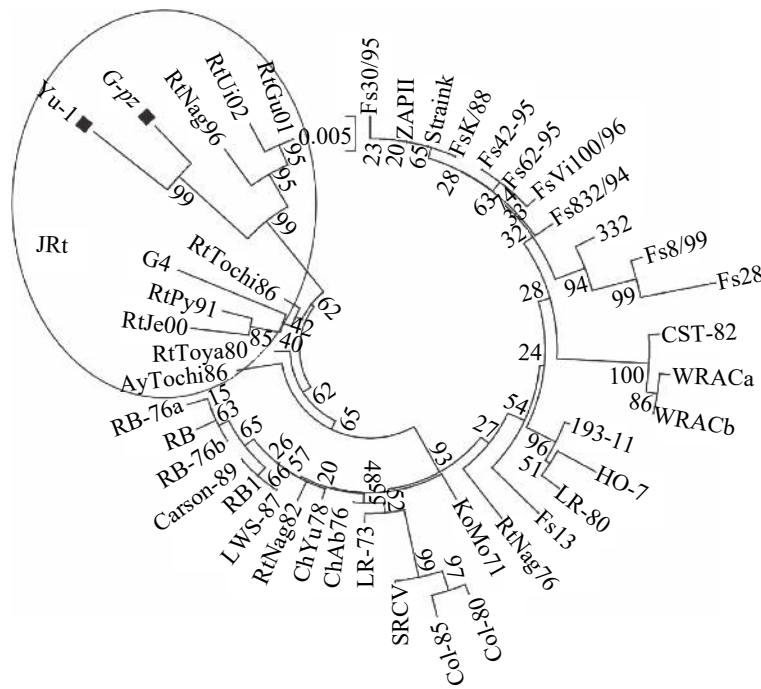


图 4 IHNV G基因区域的系统发育树, 邻接法

Fig. 4 Phylogenetic tree of nucleic acid sequence within the G gene from IHNV, Neighbor-Joining method

包膜均大面积出血^[14]。IHN的典型病理损伤主要集中在肾脏和脾脏^[14]。2014年,本研究中心发现都江堰市虹鳟苗发病主要以肾脏和头肾坏死为主^[12]。而本次彭州虹鳟成鱼感染IHN后则主要以脾脏凝固性坏死为主要特征。由此可见,脾脏和肾脏以及头肾是IHNV感染的主要靶器官,这与之前报道的IHNV的病毒感染特征相符。作为鱼类主要免疫器官的脾脏和肾脏,其损伤可能是该病毒强烈致病性和暴发性流行的基础。

IHNV是一个线性不分节段的单链RNA病毒,是弹状病毒科、弹状病毒属家族成员。IHNV基因组大约由11 129~11 137个核苷酸组成,形成6个开放阅读框(ORFs),分别编码其核衣壳蛋白(nucleoprotein, N)、磷蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(matrix protein, M)、糖蛋白,非结构蛋白(non-virion, NV)和RNA依赖性聚合酶(large protein, L)^[15]。国际上一般采用扩增N基因的全部或部分序列作为诊断IHNV的分子检测手段^[16]。2014年,本研究中心针对都江堰市虹鳟苗仍然采用了IHNV的N基因的部分序列作为主要的目的检测基因^[12]。而本实验中则采用了更加特异性的G基因的全序列作为诊断IHNV的分子手段,并根据糖蛋白基因构建了不同株IHNV的系统进化树。以上表明,我们能完整扩增到糖蛋白基因(1 527 bp)的完整序列,同时糖蛋白基因系统进化分析显示,彭州株IHNV与我们之前分离的都江堰株(Yu-1)聚为一簇,并共同归属于亚洲分离株。

参考文献:

- [1] Peñaranda M M D, Purcell M K, Kurath G. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics[J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90(9): 2172-2182.
- [2] Kurath G, Garver K A, Lapatra S E, *et al.* Resistance and protective immunity in redfish lake sockeye salmon exposed to m type infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2010, 22(2): 129-139.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Peng J, Breyta R B, Qing L, *et al.* Insight into infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in Chinese rainbow trout aquaculture from virus isolated from 7 provinces in 2010—2014[J]. *Aquaculture*, 2018, 496: 239-246.
- [6] Ammayappan A, LaPatra S E, Vakharia V N. Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220-90[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1): 10.
- [7] Guo M, Shi W, Wang Y, *et al.* Recombinant infectious hematopoietic necrosis virus expressing infectious pancreatic necrosis virus VP2 protein induces immunity against both pathogens[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 187-194.
- [8] 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.
- [9] Kimura T, Yoshimizu M. Viral diseases of fish in Japan[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, 1: 67-82.
- [10] 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.
- [11] Ahmadvand S, Soltani M, Mardani K, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis[J]. *Virus Research*, 2017, 229: 17-23.
- [12] 牛鲁祺, 赵志壮. 东北地区虹鳟IHN和IPN流行病学的初步研究[J]. *水产学报*, 1988, 12(4): 327-332.
- [13] 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.
- [13] 余泽辉, 耿毅, 汪开毓, 等. 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[J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 745-753.
- Yu Z H, Geng Y, Wang K Y, *et al.* Isolation and identification of an infectious hematopoietic necrosis virus

- isolate and phylogenetic analyses from Sichuan Province[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 745-753.
- [14] Purcell M K, Laing K J, Winton J R. Immunity to fish rhabdoviruses[J]. *Viruses*, 2012, 4(1): 140-166.
- [15] Alonso M, Chiou P P, Leong J A. Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 815-823.
- [16] Johansson T, Einer-Jensen K, Batts W, *et al.* Genetic and serological typing of European infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 86(3): 213-221.

Isolation, identification and of an infectious hematopoietic necrosis virus isolated from *Oncorhynchus mykiss* at Penzhou city, Sichuan province

LIU Tao^{1,2}, WEI Wenyan³, LIU Jiaying³, YANG Ma³, YANG Qian¹,
HE Shengyu¹, HE Qiyao¹, XIE Heng¹, WANG Kaiyu^{2,3*}

(1. *Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;*

2. *Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;*

3. *Institute of Fisheries of Chengdu Agriculture and Forestry Academy, Chengdu 611130, China)*

Abstract: An outbreak of an infectious disease occurred amongst farmed *Oncorhynchus mykiss* at Penzhou city, Sichuan Province, in October 2017 with heavy mortality of 90%. Major symptoms of the diseased fish included darkening of the body, yellow mucoid fluid fecal casts on anal. Internally, the symptoms were hemorrhage in the swim bladder and peritoneum, gastric distention, enteritis and hydropericardium. Bacteriologic test was negative. Histopathologically, the spleen showed typical coagulative necrosis with marked degeneration and necrosis in the haematopoietic tissue. Hepatocytes showed degeneration and necrosis and edema in some areas. After filtration treatment, the tissue suspension was injected intraperitoneally into 60 *O. mykiss*. The *O. mykiss* displayed similar clinical symptoms as fish that were naturally infected. The *O. mykiss* died acutely in the trial group (cumulative mortality rate of 85%), while there was no abnormal fish in the control group. After filtration treatment, the spleen tissue suspension was inoculated to the Fathead minnow cells (FHM). The typical cytopathic effects were observed after three blind passages in FHM. RT-PCR assay of tissue filtrates from the fish naturally infected, the fish artificially infected and diseased cells were IHNV-positive. The amplification products shared 98.2% identity to that of IHNV nucleoprotein gene at nucleotide level. Phylogenetic analysis based on the *G* gene showed that the viral isolate was classified into Asian isolates, and belonged to the JRt genotype.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; infectious hematopoietic necrosis virus; pathology; isolation and identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848); Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Science Research Innovation Project (2017-Y2500W-16)