



四川地区养殖鲫鲤疱疹病毒 II 型的鉴定及病理学研究

周瑶佳¹, 田思璐¹, 许佳雪¹, 李尹麒¹, 杨悦¹, 耿毅¹,
黄小丽², 陈德芳², 汪开毓¹, 欧阳萍^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为探究疾病病因和流行特点, 对患病鲫进行剖检、病理学观察、分子生物学检测及人工感染实验。结果显示, 患病鲫临床表现为离群独游、浮头、全身发黑及体表出血等。剖检发现鳃、肝脏、肾脏等器官出血、肿胀和坏死, 鳃点状出血。组织病理观察显示, 鳃呼吸上皮细胞肿胀、坏死及脱落; 肾脏局灶性坏死; 脾脏组织广泛变性坏死, 造血系统崩解; 肝脏发生空泡变性和坏死。透射电镜观察到脾脏和肾脏中存在 4 种大小不同的病毒颗粒, 分别为 DNA 病毒内核、空衣壳、实心衣壳和有包膜的成熟病毒粒子。未成熟的病毒粒子存在于细胞核, 成熟的病毒粒子存在于细胞质。电镜下可见鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2) 在细胞核内完成核酸复制和核衣壳装配, 囊膜蛋白在出核后获得。细胞核萎缩、核染色质边缘化, 线粒体肿胀、坏死、嵴断裂, 细胞质空泡化。取患病鲫组织匀浆滤菌后接种到鲤上皮瘤细胞系 (epithelioma papulosum cyprinid cell line, EPC) 和胖头鲤肌肉细胞系 (fathead minnow cell line, FHM), 盲传 3 代后未见细胞病变。通过腹腔注射患病鲫组织匀浆进行人工感染实验, 实验组鲫表现出与自然感染鲫相同的临床症状, 对照组鲫正常, 实验组鲫累积死亡率为 80%。用 PCR 方法检测 CyHV-2 的解旋酶基因片段, 扩增出预期大小相符的目的条带。利用邻近法对该病毒的解旋酶基因进行系统发育分析, 结果显示与 CyHV-2(YZ-01) 的同源性为 99%。以上实验结果证实了 CyHV-2 是导致这次疾病暴发的原因。

关键词: 鲫; 鲤疱疹病毒 II 型; 组织病理; 超微病理

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鲤疱疹病毒 II 型 (Cyprinid herpesvirus II, CyHV-2), 属于疱疹病毒科 (Alloherpesviridae)、鲤疱疹病毒属 (Cyprinivirus)^[1], 主要感染金鱼 (*Carassius auratus auratus*)、鲫 (*C. auratus*) 及其变种, 呈世界范围流行, 发病迅速, 死亡率高达 80%。1992 年秋季和 1993 年春季, CyHV-2 感染造成了日本爱知及奈良县养殖的金鱼相继暴发以造血器官坏死为特征的疾病, 死亡率为 100%, 因而将该病命名为金鱼造血器官坏死症^[2]。此后,

CyHV-2 在世界范围内传播流行, 相继在美国、匈牙利、澳大利亚、英国、捷克、中国、意大利、法国和塞尔维亚被报道, 造成了金鱼或鲫的大规模死亡^[3-14]。该病的发病季节为春、秋两季, 适宜水温为 15~25 °C, 在此范围内疾病的发病率和死亡率随水温的上升而增加, 当水温超过 27 °C 时死亡率迅速降低^[2-3, 8]。虽然世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, OIE) 还未将 CyHV-2 纳入检疫目录, 但我国农业

收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2019-10-22

资助项目: 四川省留学回国人员科技活动项目择优资助; 四川省教育厅基础研究项目 (17ZB0345)

通信作者: 欧阳萍, E-mail: ouyang.ping@live.cn

农村部已将其纳入全国疫病监测范围。

自2012年起, CyHV-2的传入给我国东部地区的鲫养殖业造成了极大的经济损失, 每年都有CyHV-2感染发病的报道, 而西南地区鲫大规模暴发鲫疱疹病毒病的报道和研究较少。近年来, 随着四川省渔业持续健康发展, 包括鲫在内的各类经济鱼类养殖规模逐渐扩大。为了避免疾病暴发带来的经济损失, 需要加强对病原的诊断和研究。本实验对四川自贡某养殖场发病鲫进行病原诊断和病理学研究, 通过临床剖检、病理学观察、人工感染和分子生物学检测等手段, 证实此次发病病原为CyHV-2。从临床病理、组织病理到超微病理, 系统地研究了CyHV-2对组织器官造成的病理损伤, 为该病原的致病机制研究提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

送检患病鲫20尾(体长20~25 cm), 来源于四川自贡某鲫养殖场; 健康鲫45尾(体长10~14 cm), 购自四川成都某鲫养殖场; 鲤上皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprinid cell line, EPC)和胖头鲤肌肉细胞系(fathead minnow cell line, FHM)(本实验室保存); M199/DMEM营养液和胎牛血清(FBS)购自HyClone公司; 脑心浸液培养基(BHI)购自北京索莱宝科技有限公司; DNA Marker、pMD-19T质粒连接试剂盒和PCR-Mix reaction buffer购自宝生物工程(大连)有限公司; DH5 α 感受态细胞、组织基因组DNA提取试剂盒及普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 剖检及样本采集

对濒死鲫进行病理剖检, 取鳃、肝脏、脾脏和肾脏等组织于载玻片上涂片, 革兰氏染色后镜检。无菌条件下, 取肝脏、脾脏和肾脏划线接种于BHI平板, 28℃恒温培养48 h后观察有无细菌生长。

取鳃、肝脏、肾脏、脾脏和心肌组织用10%的中性甲醛溶液固定, 对固定后的组织修块, 通过不同浓度的乙醇进行梯度脱水, 然后通过二甲苯对组织进行透明处理。将组织放于熔化的石蜡中, 置于65℃的恒温箱中, 2 h后对组织进行包埋, 蜡块凝固后可进行修整及切片,

将蜡片贴于干净的载玻片上, 烘干后进行脱蜡、渗水及苏木精—伊红(H.E)染色, 用中性树脂胶封片, 烘干后在光学显微镜下观察其主要病变并照相记录。取适量肾脏和脾脏组织用2.5%戊二醛浸泡固定, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后, 用1%锇酸固定, 不同浓度梯度的乙醇使组织脱水, 环氧树脂包埋后, 制成超薄切片, 染色烘干, 通过透射电镜观察并拍照记录。此外, 采集鳃、脾脏、肾脏和肝脏组织冻存于-80℃, 用于病毒分离培养及组织DNA提取。

1.3 病毒分离培养

取脾脏和肾脏组织, 无菌条件下剪碎后, 用杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)按1:10比例制成组织匀浆, 加入青霉素—链霉素溶液(1 000 IU/mL), 反复冻融3次后于4℃条件下12 000 r/min离心20 min。收集上清病毒悬液, 用0.22 μ m的无菌滤膜过滤后接种到25 cm²的铺满单层细胞的细胞培养瓶中, 25℃下孵育1 h后弃病毒悬液, 加入新鲜的培养液(含有2% FBS, 1%双抗)5 mL, 置于25℃培养箱中培养。

1.4 人工感染实验

取患病鲫鳃和肾脏组织, 用DPBS制备组织匀浆, 加入青霉素—链霉素溶液(1 000 IU/mL), 反复冻融3次后, 4℃下12 000 r/min离心20 min。收集上清液, 用0.22 μ m的无菌过滤器过滤, -20℃保存。将健康鲫暂养7 d后, 随机挑选5尾, 提取组织DNA后进行PCR检测, 结果显示CyHV-2为阴性。随后将剩余40尾健康鲫分为2组, 每组20尾, 实验组每尾腹腔注射0.2 mL的组织匀浆液, 对照组每尾注射0.2 mL的无菌生理盐水, 实验期间水温控制在23~25℃, 每天观察2次, 连续观察1个月, 记录死亡数并绘制累积死亡曲线。

1.5 PCR鉴定

将采集的患病鲫组织(鳃、脾脏和肾脏等)用PBS研磨制成组织匀浆后, 按照血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(天根)说明书进行总DNA的提取, -20℃保存。

CyHV-2特异性引物参照Waltzek等^[15]的方法设计并送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 用于扩增CyHV-2特有的高保守片段解旋酶基因(*Hel*)(表1)。反应体系: 12.5 μ L Mix-

表 1 PCR 检测引物

Tab. 1 Primers of PCR for detection

引物 primers	序列 (5'-3') sequence	片段大小/bp size	目的基因 target gene	序列号 accession no.
CyHV-2-Hel(F)	GGACTTGCGAAGAGTTTGATTCTAC	366	解旋酶基因 helicase gene	AY939867
CyHV2-Hel(R)	CCATAGTCACCATCGTCTCATC			

reaction buffer, 上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 1 μL (10 ng/ μL), 9.5 μL ddH₂O, 阴性对照模板用 ddH₂O 补齐。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定, 将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对。

1.6 Hel 基因克隆测序及系统发育分析

将“PCR 鉴定”部分中的 PCR 产物通过普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化后, 连接到 pMD19-T 载体上, 转化到 DH5 α 感受态细胞中。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温过夜培养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。根据 GenBank 收录的不同 CyHV-2 毒株的 Hel 基因序列, 使用 DNASTAR 生物学软件 Megalign 方法进行序列同源性分析, 并通过 MEGA 6 软件, 使用邻接法构建系统进化树进行遗传进化分析。

2 结果

2.1 患病鲫的临床及组织病理学观察

患病鲫临床表现为浮头、离群独游、体表发黑、食欲不振、体表有出血现象、背鳍及尾鳍末端发白等。解剖可见鳃盖有点状出血, 鳃丝出血、坏死; 肠系膜有出血现象; 肝脏、脾脏和肾脏均有不同程度的出血及肿胀; 鱼鳃点状出血(图版 I)。涂片革兰氏染色镜检未观察到细菌, BHI 平板 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 未分离到细菌。

组织病理学观察显示, 多组织呈现不同程度的坏死, 鳃、脾脏和肾脏病变尤为明显。鳃主要表现为呼吸上皮细胞变性、脱落和坏死(图版 II-1), 相邻的鳃小片出现融合黏连, 大量淋巴细胞浸润, 部分呼吸上皮细胞出现核染色质边缘化(图版 II-2); 脾脏可见严重的弥漫性坏死, 有多

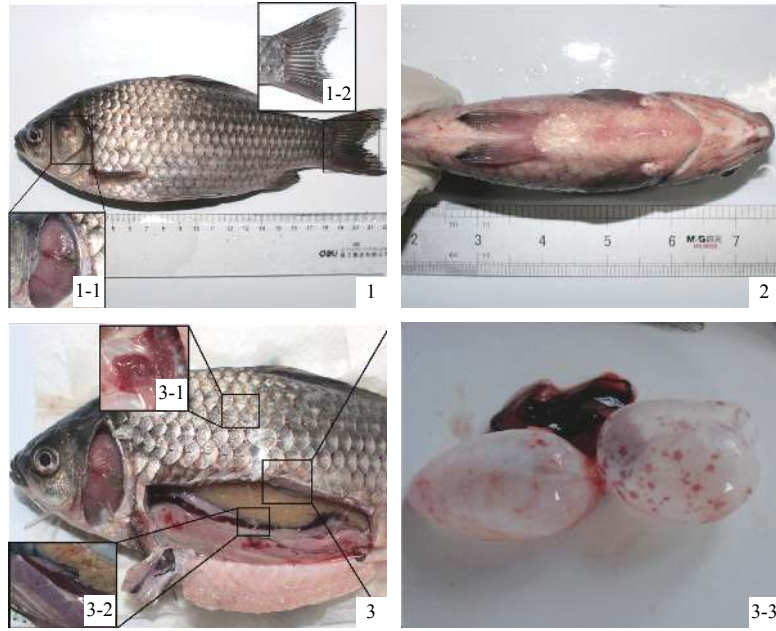
个大小不等的坏死灶(图版 II-3), 血细胞及炎症细胞浸润, 血管壁的纤维细胞坏死, 大量淋巴细胞出现核分裂或染色质边缘化(图版 II-4); 肾脏表现为局灶性坏死病变, 肾小管上皮细胞坏死严重, 细胞核肥大、固缩、碎裂, 空泡化严重(图版 II-5), 大量炎症细胞浸润, 肾小球毛细血管扩张(图版 II-6); 肝脏主要表现为严重的空泡变性, 部分细胞坏死, 组织结构被破坏(图版 II-7); 心肌有轻微的炎症反应, 出现少量的炎症细胞浸润(图版 II-8)。

2.2 超微病理学观察

透射电镜观察到脾脏和肾脏中存在 4 种不同形态的病毒粒子, 分别为 DNA 病毒内核、空衣壳、实心衣壳和有包膜的成熟病毒粒子(图版 III-1)。病毒内核直径为 55~110 nm; 空衣壳病毒直径为 120~170 nm; 实心衣壳病毒直径为 120~170 nm; 有包膜成熟病毒直径为 170~210 nm。CyHV-2 的 3 种未成熟病毒颗粒形态主要存在于细胞核中, 具有囊膜的成熟病毒颗粒则大量分布在细胞质中(图版 III-2, 3), 说明 CyHV-2 是在细胞核中完成复制和组装并在细胞质中获得外膜, 符合疱疹病毒感染过程。当病毒感染细胞后, 透过细胞膜磷脂双分子层, 进入细胞核释放出双链 DNA, 构成病毒内核。通过编码衣壳蛋白在细胞核内形成空衣壳, 此时的病毒 DNA 还未进入衣壳内部, 当病毒 DNA 进入空衣壳后变为实心衣壳。实心核衣壳通过核膜以出芽的方式进行包被形成囊膜, 进入到细胞质中(图 1)。透射电镜下观察发现, 脾脏和肾脏发生了明显的细胞结构病变。脾脏中淋巴细胞的细胞核出现染色质变性、边缘化(图版 III-2); 线粒体出现肿胀、嵴断裂, 严重时局部溶解消失(图版 III-3)。肾脏中细胞核碎裂, 核染色质边缘化, 局部核膜溶解, 可见未成熟的病毒颗粒(图版 IV-1), 部分线粒体肿胀、嵴断裂, 可见成熟的病毒颗粒(图版 IV-2)。

2.3 病毒的分离培养

将病毒悬液接种于 EPC 及 FHM 细胞后, 连

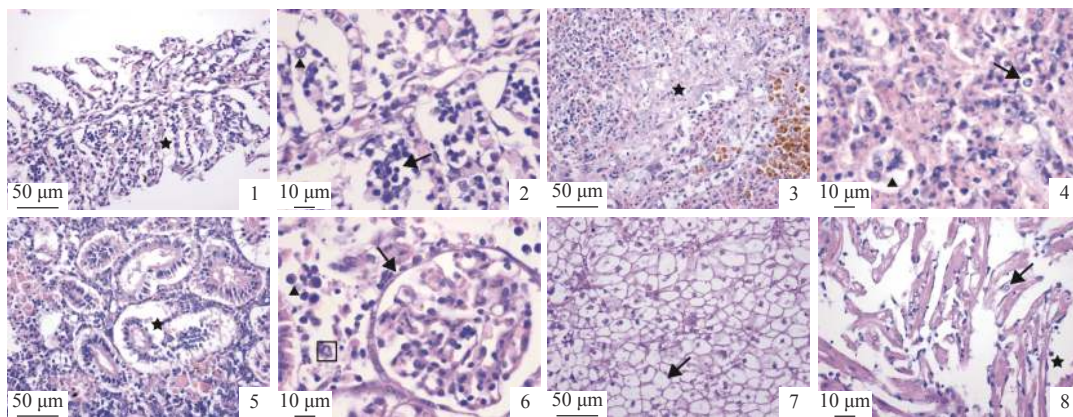


图版 I 患病鲫的临床和剖检病变

1、2. 患病鲫鱼体表有大量出血点和出血斑，其中 1-1. 鳃丝有明显出血和坏死，1-2. 尾鳍出血，末端发白；3. 患病鲫剖检观察，多组织器官出血，3-1. 肾脏肿大，有出血点，3-2. 肝脏和脾脏肿胀，有不同程度的出血，肠道表面出血严重，3-3. 鱼鳔上有大量大小不等的出血点

Plate I Clinical pathological changes in infected *C. auratus*

1,2. blutene chloaide on the surface and belly of infected *C. auratus*, 1-1. gill has obvious haemorrhage and necrosis, 1-2. caudal fin has haemorrhage and albescent; 3. the anatomical observation shows haemorrhage from multiple tissues and organs, 3-1. kidney has swelling and haemorrhage, 3-2. liver and spleen swelling and haemorrhage, severe haemorrhage on the mesenterium, 3-3. there are a lot of blutene chloaide on the swimming bladder

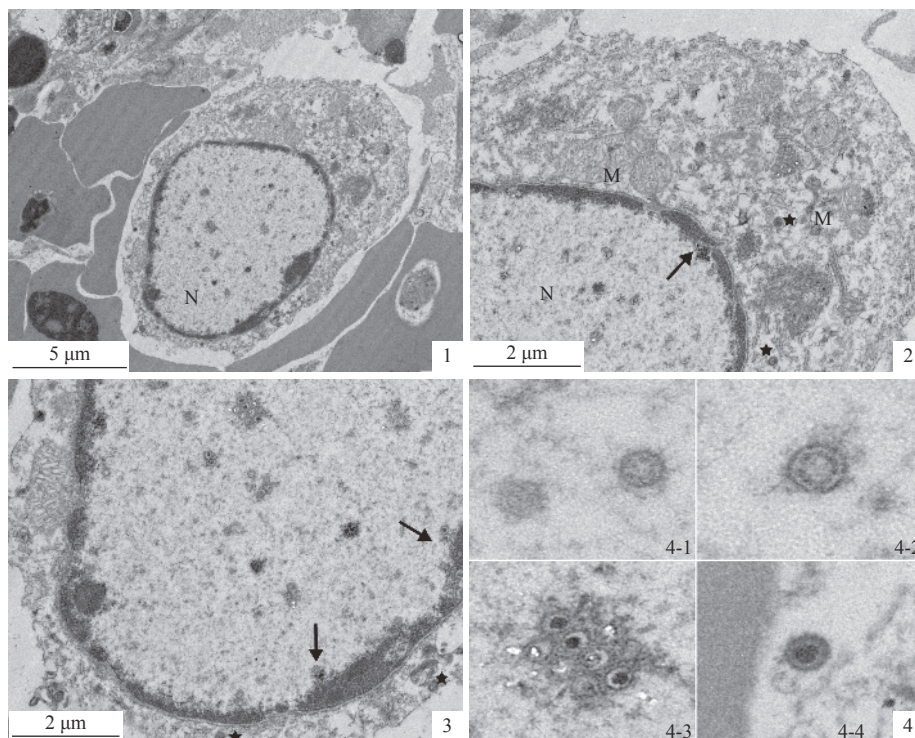


图版 II 患病鲫的组织病理观察 (H.E 染色)

1、2. 鳃小片呼吸上皮细胞肿胀、脱落，出现核染色质边缘化(▲)，大量淋巴细胞浸润(→)，相邻的鳃小片发生融合黏连(★)；3、4. 脾脏坏死严重，有很多大小不等的坏死灶(★)，一些细胞出现核染色质边缘化(→)，血管壁的纤维细胞坏死(▲)；5、6. 肾脏表现为局灶性坏死，肾小管上皮细胞坏死严重(★)，肾小球毛细血管扩张(→)，大量炎症细胞浸润(▲)，细胞核染色质出现边缘化(□)；7. 肝脏出现严重的空泡变性，细胞结构被破坏(→)；8. 心肌有轻微的炎症，少量淋巴细胞浸润(★)，细胞核染色质边缘化(→)

Plate II Histopathology of CyHV-2 infected *C. auratus* (H.E stain)

1, 2. Branchial epithelial cells show swelling and sloughing, marginal chromatin (▲), a large number of lymphocytes infiltration (→), synechia of multiple adjacent gill lamellae (★); 3, 4. severe necrosis of spleen, there are lots of focus of necrosis (★), splenocytes had marginal chromatin (→), fibroblast necrosis of spleen ellipsoid (▲); 5, 6. kidney shows focal necrosis, renal tubular epithelial cell necrosis (★), dilatation of glomerulus capillaries (→), inflammatory corpuscle infiltration (▲), marginal chromatin (□); 7. liver is characterized by severe vacuolar degeneration (→); 8. myocardium had inflammatory cell infiltration (★) and marginal chromatin (→)



图版 III 患病鲫脾脏组织超薄切片电镜观察

1. 细胞核出现变性, 可见核染色质边缘化, 核内有大量不同时期的病毒粒子; 2、3. 线粒体肿胀, 嵴坏死断裂, 病毒穿过核膜 (→), 成为成熟病毒颗粒 (★); 4. 四个不同时期的病毒粒子; N. 细胞核, M. 线粒体, 下同

Plate III Electron micrograph of CyHV-2 in the spleen from infected *C. auratus*

1. denaturation of the nucleus, marginalization of nuclear chromatin, a large number of virus particles of different periods in the nucleus; 2, 3. mitochondrial swelling, rupture and necrosis of mitochondrial crista, viruses pass through nuclear membranes (→) and become mature viral particles (★); 4. four viral particles in different periods; N. nucleus, M. mitochondria, the same below

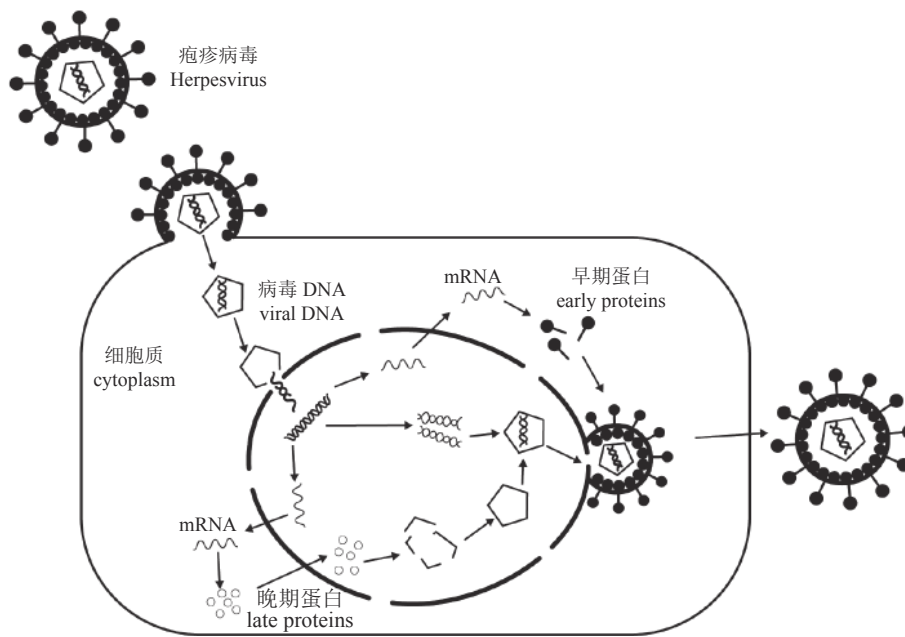
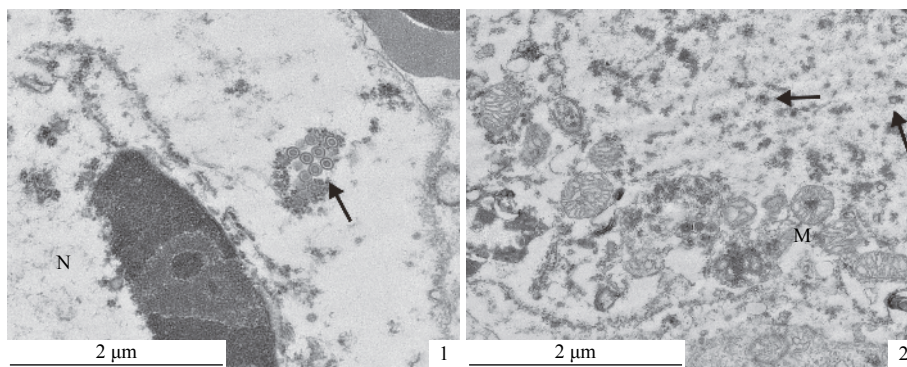


图 1 疱疹病毒复制和组装过程模式图

Fig. 1 Schematic diagram of Herpesvirus replication and assembly process



图版 IV 患病鲫肾脏组织超薄切片电镜观察

1. 细胞核碎裂, 核染色质边缘化, 有大量病毒颗粒 (→), 2. 线粒体肿胀, 嵴坏死断裂, 细胞质中观察到成熟病毒颗粒 (→)

Plate IV Electron micrograph of CyHV-2 in the kidney from infected *C. auratus*

1. nuclear fragmentation; nuclear chromatin marginalization; there are a large number of immature virus particles in the cells (→), 2. mitochondria swelling, mitochondrial cristae has rupture and necrosis, mature virus particles observed in the cytoplasm (→)

续传代 3 次, 无明显病变, 表明 FHM 和 EPC 细胞系对 CyHV-2 感染不敏感。

2.4 人工感染实验

人工感染实验结果显示, 组织匀浆攻毒的实验组鲫在第 2 天开始出现临床症状, 第 4 天出现死亡, 第 8 天大量死亡, 连续观察 1 个月后, 累计死亡率为 80%。对照组的鲫表现正常, 无死亡 (图 2)。

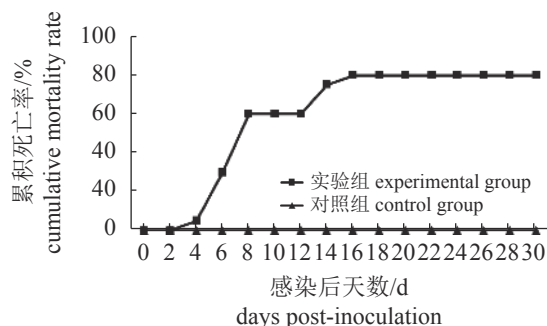


图 2 人工感染实验结果

Fig. 2 Results of artificial infection experiment

2.5 PCR 鉴定

提取自然感染鲫及人工感染后濒死鲫的鳃、肝脏、脾脏及肾脏制成组织匀浆后, 提取总 DNA, 利用特异性引物进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 可见大小为 366 bp 的特异性条带, 与预期的目的条带大小一致 (图 3)。将扩增的目的片段送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序后通过 NCBI 数据库进行 Blast 对比, 结果显示, 该病毒序列与 GenBank 中 CyHV-2 (YZ-01 株) 的 *Hel* 基因同源性为 99%。

2.6 *Hel* 基因克隆测序及基因系统发育分析

将克隆得到的目的序列送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序后, 将序列上传至 NCBI-GenBank, 登录号为 MK913427。在 NCBI 数据库中下载 CyHV-2 不同株的 *Hel* 基因片段序列, 以及 CyHV-1 和 CyHV-3 的相关序列, 利用邻接法构建系统进化树。系统进化分析结果显示, 目的序列 (ZYJ-11) 与不同株的 CyHV-2 聚为一支 (图 4)。

3 讨论

本次送检的发病鲫临床症状与先前报道的鲫疱疹病毒病相似, 主要表现为鱼体发黑、食欲减退、尾鳍末端发白, 体表和鳃丝有不同程度的出血。剖检后可见肝脏、脾脏有出血和肿胀, 特征性病变为鳃点状出血, 有的患病鲫腹腔有腹水。组织病理主要表现为鳃丝呼吸上皮细胞变性、坏死, 相邻的鳃小片出现黏连融合; 肾脏有局灶性坏死病变, 肾小管上皮细胞坏死严重, 肾小球毛细血管扩张充血; 脾脏可见严重的弥漫性坏死。PCR 检测 CyHV-2 的 *Hel* 基因片段, 扩增出符合预期大小的条带; 通过对扩增出的 *Hel* 基因序列进行系统发育分析显示, 其与 CyHV-2 基因同源性高。腹腔注射患病鲫的组织匀浆感染健康鲫, 出现相同的临床症状并造成 80% 的累积死亡率。通过以上实验结果可以确定此次疾病暴发的病原为 CyHV-2。

CyHV-2 作为金鱼造血器官坏死症的病原, 自从 1992 年在日本首次被报道后便开始在世界

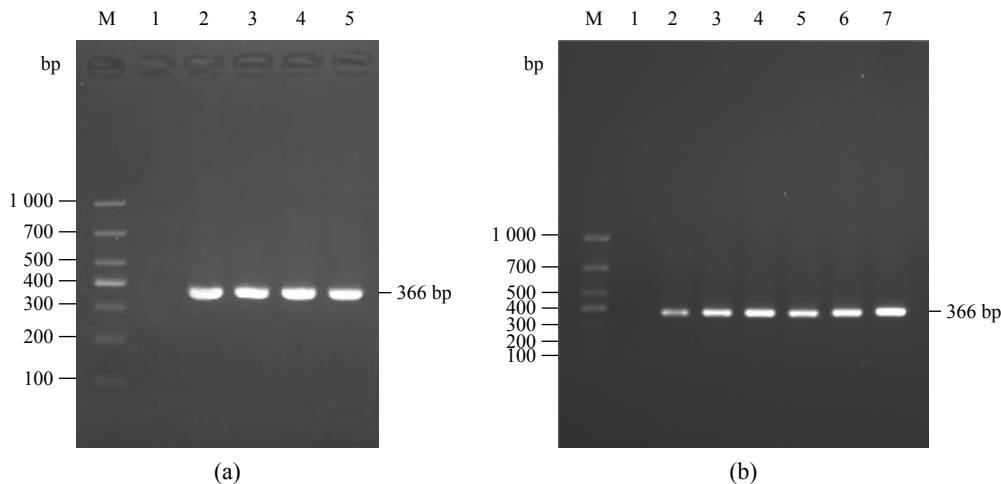


图 3 患病鲫 CyHV-2 PCR 扩增

(a) 患病鲫鱼样品 PCR 检测, M. DNA Marker 1000, 1. 阴性对照, 2. 阳性对照, 3~5 送检患病鲫鱼样本; (b) 人工感染实验抽检样本 PCR 扩增, M. DNA Marker 1000, 1. 阴性对照, 2~3. 存活鲫鱼样本, 4~7. 濒死或死亡鲫鱼样本

Fig. 3 Detection of CyHV-2 by PCR

(a) PCR detection of diseased *C. auratus*, M. DNA Marker 1000, 1. negative control, 2. positive control, 3-5. infected *C. auratus* for inspection; (b) PCR amplification of samples taken by artificial infection, M. DNA Marker 1000, 1. negative control, 2-3. surviving *C. auratus*, 4-7. moribund or died *C. auratus*

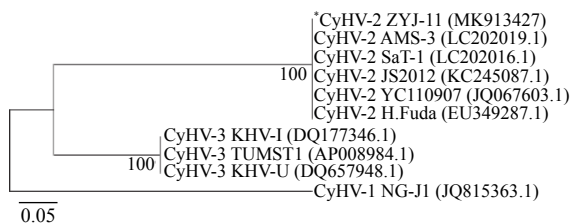


图 4 基于 CyHV-2 DNA 解旋酶基因部分序列同源性的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of isolation CyHV-2 with other *Cyprinivirus* strains based on *Hel* gene partial sequence homologues

范围内流行传播^[3-11]。2009 年江苏省养殖的鲫大规模暴发重度出血性疾病, 并于 2011—2012 年在省内各地流行。Xu 等^[10] 确诊这一疾病是由 CyHV-2 感染引起。Wang 等^[16] 在 2012 年报道了 CyHV-2 感染异育银鲫 (*C. auratus gibelio*) 的病例, 这次的疾病暴发给中国东部地区池塘养殖的异育银鲫造成了严重损失, 部分池塘的死亡率高达 100%。随后在北京、武汉、广州、江西、江苏等多地养殖金鱼或鲫体内陆续检测到 CyHV-2^[17-20]。而西南地区关于鲫感染 CyHV-2 发病并造成大规模死亡的报道较少, 本实验室曾于 2016 年四川成都某养殖场饲养彩鲫中检测到 CyHV-2 的感染^[21]。而此次研究确诊了 2018 年 10 月四川自贡地区养殖鲫大规模死亡的病原为 CyHV-2,

表明随着西南片区鲫养殖业的发展及贸易往来, 使得 CyHV-2 已经逐渐从疾病高发的东部传入西南地区。为有效控制疾病的传播, 应更加重视对 CyHV-2 的监测及防治。

组织病理观察显示, 鳃、肾脏和脾脏是病变严重的器官, 其余组织器官主要表现为多灶性及不同程度的炎症反应。Ding 等^[22] 通过荧光原位杂交的方法直接检测组织中的病原体, 观察到最大荧光强度出现在鳃、肾脏坏死灶, 脾脏和肝脏观察结果与本研究组织病理学观察结果相似。鳃组织中病毒分布集中在坏死部位且含量较高, 推测病毒能通过鳃丝进入鱼体并在鳃中复制, 从而导致呼吸上皮细胞脱落和坏死, 如果想要进一步了解鳃损伤的致病机制, 仍需研究宿主与病毒在鳃中的相互作用。鳃丝上较高的病毒载量也可能说明 CyHV-2 能通过鳃丝释放到水中进行传播, 这种方式能很好地解释鲫疱疹病毒病传播速率快的特性。但是 Costes 等^[23] 研究表明, 与 CyHV-2 相同病毒属的鲤疱疹病毒 3 型 (CyHV-3) 可以通过皮肤进入鲤 (*Cyprinus carpio*) 体内, 而 Ito 等^[24] 也通过浸泡含 CyHV-2 的病毒悬液成功感染了健康金鱼, 因此对于 CyHV-2 的传播途径还需进一步验证。Goodwin 等^[4] 通过实时荧光定量 PCR 检测到脾脏和肾脏的病毒拷贝量高, Ito 等^[24] 和姚卓凤^[25] 通过 PCR 检测到

人工感染 28 d 后, 死亡鱼体组织中均能检测到 CyHV-2, 但存活鱼只能在肾脏中检测到 CyHV-2。结合本研究的组织病理观察及电镜观察发现, 肾脏是病变最严重的组织且含有大量的病毒颗粒, 推测肾脏是 CyHV-2 复制的主要器官, 在临床中用于检测 CyHV-2 感染更加可靠。此外, 电镜观察发现 CyHV-2 病毒粒子主要存在于细胞核或细胞质中, 并未直接感染线粒体, 但线粒体却有不同程度的损伤, 可能是病毒粒子对细胞核造成了损伤, 加上组织器官大量出血从而导致细胞处于缺血缺氧的状态, 导致了线粒体的损伤。

Jung 等^[2]将患病鱼的脾脏、肾脏组织匀浆过滤后接种到 FHM、EPC、罗非鱼卵巢细胞系 (tilapia ovary cell line, TO-2)、虹鳟生殖腺细胞系 (rainbow trout gonad cell line, RTG-2)、鲑胚胎细胞 (chinook salmon embryo cell, CHSE-214) 和鳗肾细胞 (eel kidney cell, EK-1) 上, 只有 EPC 和 FHM 出现了明显的细胞病变效应, 但未成功传代到第 4 次。王璐^[18]、徐进等^[20]将患病鲫组织匀浆接种到锦鲤鳍条细胞系 (koi-fin cell line, KF), 观察到明显的细胞病变效应, 但也有用 EPC、FHM 和 KF 细胞系分离病毒未引起 CPE 的报道^[6, 16, 26-28]。本研究中使用 EPC 及 FHM 对病毒进行分离, 在盲传 3 代后未出现细胞病变效应, 这与之前的研究结果相同。进一步证实了 EPC 及 FHM 细胞系不适用于 CyHV-2 的体外培养。为了建立更适合分离 CyHV-2 的细胞系, 李霞等^[29]和 Ito 等^[30]成功分离了金鱼的鳍细胞系 (goldfish-fin cell line, GFF), 并进行了传代培养, 接种病毒滤液后出现 CPE 并能稳定传代。此外, SRTF (standard ryukin takafumi)、RyuF-2 (ryukin goldfish-fin)、GiCB (gibel carp-brain)、GiCF (*C. auratus* gibelio-caudal fin) 等对 CyHV-2 敏感的细胞系也陆续被建立且具有稳定传代, 病毒浓度高等特点^[28, 31-32]。

CyHV-2 感染引起的死亡率高、危害大、传染性强, 已经成为我国鲫养殖业的主要威胁。本研究首次报道了四川省人工养殖鲫感染 CyHV-2, 并对患病鲫的组织病理及细胞超微病理进行了研究。此外, 观察到处于不同时期的 CyHV-2 病毒颗粒及病毒包被核膜的过程, 探讨了疱疹病毒复制组装的过程, 为 CyHV-2 致病机制的研究提供了重要依据。虽然目前对于 CyHV-2 各方面的研究已经逐渐深入, 在病毒潜伏感染特点、

开发快速有效的检测方法以及建立对其敏感的细胞系等方面都取得了一定的成果^[20, 24, 33-36], 但如何有效治疗鱼类病毒性疾病仍是水产养殖中一个亟待解决的难题。因此, 目前只能通过完善养殖过程中的预防措施, 提高对疾病的防范意识来降低病毒性疾病的暴发。

参考文献 (References):

- [1] Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish[J]. *Viruses*, 2011, 3(11): 2160-2191.
- [2] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211-220.
- [3] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10(4): 375-378.
- [4] Goodwin A E, Merry G E, Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (Cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 69(2-3): 137-143.
- [5] Stephens F J, Raidal S R, Jones B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2004, 82(3): 167-169.
- [6] Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(11): 649-656.
- [7] Andor D, Benkó M, György C, et al. Introduction of the family alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary[J]. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, 133(3): 174-181.
- [8] Goodwin A E, Sadler J, Merry G E, et al. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(3): 271-278.
- [9] Wu T, Ding Z F, Ren M, et al. The histo-and ultra-pathological studies on a fatal disease of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in mainland China associated with cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)[J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 8-13.
- [10] Xu L J, Podok P, Xie J, et al. Comparative analysis of

- differential gene expression in kidney tissues of moribund and surviving crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(8): 1961-1974.
- [11] Daněk T, Kalous L, Veselý T, *et al.* Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 102(2): 87-95.
- [12] Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, *et al.* Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(10): 823-830.
- [13] Boitard P M, Baud M, Labrut S, *et al.* First detection of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish (*Carassius auratus*) in France[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(6): 673-680.
- [14] Radosavljevic V, Adamek M, Milicevic V, *et al.* Occurrence of two novel viral pathogens (CEV and CyHV-2) affecting Serbian cyprinid aquaculture and ichthyofauna[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(5): 851-854.
- [15] Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E, *et al.* Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21(1): 60-67.
- [16] Wang L, He J, Liang L, *et al.* Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China[J]. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 2013, 32(5): 164-173.
- [17] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 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] 王璐. 江苏地区鲫出血病病原的分离、鉴定及检测方法研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
Wang L. The research on isolation and identification of the pathogeny from the hemorrhage disease of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in Jiangsu China and it's detection method[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [19] 田飞焱, 欧阳敏, 谢世红, 等. 江西省鲫鱼造血器官坏死病病毒(CyHV-2)感染流行病学研究[J]. *江西水产科技*, 2018(1): 33-37.
Tian F Y, Ouyang M, Xie S H, *et al.* Epidemiological study on Hematopoietic organ necrosis virus (CyHV-2) infection in *Carassius auratus* in Jiangxi Province[J]. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 2018(1): 33-37(in Chinese).
- [20] 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).
- [21] Zhao R X, Geng Y, Yu Z H, *et al.* New detection of Cyprinid herpesvirus 2 associated with mass mortality in colour crucian carp (*Carassius auratus*), in China[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(6): 1705-1709.
- [22] Ding Z F, Xia S Y, Zhao Z M, *et al.* Histopathological characterization and fluorescence *in situ* hybridization of Cyprinid herpesvirus 2 in cultured Prussian carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 206: 76-83.
- [23] Costes B, Raj V S, Michel B, *et al.* The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(7): 2819-2830.
- [24] Ito T, Maeno Y. Effects of experimentally induced infections of goldfish *Carassius auratus* with Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) at various water temperatures[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 110(3): 193-200.
- [25] 姚卓凤. 鲫感染鲤疱疹病毒 II 的组织病理学研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
Yao Z F. Study on histopathology in crucian carinfected with CYHV-2[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [26] Goodwin A E, Khoo L, LaPatra S E, *et al.* Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 11-18.
- [27] Lovy J, Friend S E. Cyprinid herpesvirus-2 causing mass mortality in goldfish: applying electron microscopy to histological samples for diagnostic virology[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 108(1): 1-9.

- [28] Shibata T, Nanjo A, Saito M, *et al.* *In vitro* characteristics of cyprinid herpesvirus 2: effect of kidney extract supplementation on growth[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 115(3): 223-232.
- [29] 李霞, 福田颖穗. 金鱼疱疹病毒敏感细胞的体外培养[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(1): 12-18.
Li X, Fukuda H. *In vitro* culture of goldfish cell sensitive to goldfish herpesvirus[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2003, 12(1): 12-18(in Chinese).
- [30] Ito T, Kurita J, Ozaki A, *et al.* Growth of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(3): 193-202.
- [31] Ma J, Jiang N, LaPatra S E, *et al.* Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(3-4): 315-325.
- [32] Lu J F, Xu D, Lu L Q. A novel cell line established from caudal fin tissue of *Carassius auratus gibelio* is susceptible to cyprinid herpesvirus 2 infection with the induction of apoptosis[J]. *Virus Research*, 2018, 258: 19-27.
- [33] 赵欣, 贾鹏, 刘莹, 等. 鲤疱疹病毒2型微滴式数字PCR检测方法的建立及比较分析[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 126-133.
Zhao X, Jia P, Liu Y, *et al.* Development and evaluation of droplet digital PCR assay for the detection of *cyhv-2* and comparative analysis[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 126-133(in Chinese).
- [34] 郝中香, 林华, 余容, 等. 鲤疱疹病毒2型微滴式数字PCR快速检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(2): 167-173.
Hao Z X, Lin H, She R, *et al.* Establishment of droplet digital PCR assay for the rapid detection of Cyprinid herpesvirus 2[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(2): 167-173(in Chinese).
- [35] 孔善云, 姜有声, 许丹, 等. 一种基于II型鲤疱疹病毒衣壳蛋白72的免疫学检测方法[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 328-335.
Kong S Y, Jiang Y S, Xu D, *et al.* An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 328-335(in Chinese).
- [36] Wei C, Iida H, Chuah Q Y, *et al.* Persistence of cyprinid herpesvirus 2 in asymptomatic goldfish *Carassius auratus* (L.) that survived an experimental infection[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(6): 913-921.

Identification and pathological study of Cyprinid herpesvirus II in Sichuan

ZHOU Yaojia¹, TIAN Silu¹, XU Jiayue¹, LI Yinqi¹, YANG Yue¹, GENG Yi¹,
HUANG Xiaoli², CHEN Defang², WANG Kaiyu¹, OUYANG Ping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In October 2018, crucian carp (*Carassius auratus*) in a farm located in Zigong, Sichuan Province, developed a communicable disease with a mortality rate of 80%. In order to explore the cause of this disease, sick fish were subjected to necropsy, pathological observation, molecular biological examination and artificial infection test. The clinical manifestations of diseased fish included leaving the shoal of fish to swim alone; staying on the water surface; bodies blackened and body surface had haemorrhages. The necropsy showed haemorrhage, swelling and necrosis of organs such as gills, liver and kidney; swimming bladder had a lot of blutene chloaide. Histopathological changes showed that the respiratory epithelial cells of gill were swollen, necrosis and sloughing. The kidneys showed focal necrosis. The spleen tissue was extensively degenerated and necrotic, and the hematopoietic system collapsed. Vacuolar degeneration and necrosis occurred in the liver. Transmission electron microscopy showed that there were four different sizes of virus particles in the spleen and kidney, which were virus DNA core, empty viral capsid, solid capsid and enveloped mature virions. It can be seen that immature virions are present in the nucleus, and mature virions are present in the cytoplasm. Cyprinid herpesvirus II (CyHV-2) completed nucleic acid replication and nucleocapsid assembly in the nucleus, and the envelope protein was obtained after transmembrane membrane. After filtering the diseased fish tissue homogenate, it was inoculated into EPC and FHM cell lines, and there was no cytopathic effect after 3 generations of blind transmission. The helicase gene fragment of CyHV-2 was amplified by PCR, and a positive band appeared. The artificial infection test was carried out by intraperitoneal injection of tissue homogenate. The test group showed the same clinical symptoms as the natural infection fish and the control group was normal. The cumulative mortality rate of the test group was 80%. Phylogenetic analysis of helicase gene by the neighbor-joining method revealed that the homology with CyHV-2 (YZ-01) was 99%. The results demonstrated that CyHV-2 contributed to this disease outbreak.

Key words: *Carassius auratus*; Cyprinid herpesvirus II(CyHV-2); histopathology; ultrastructural pathology

Corresponding author: OUYANG Ping. E-mail: ouyang.ping@live.cn

Funding projects: Sichuan Province's Returnees to Study Science and Technology Activities Projects Selected Funding; Sichuan Provincial Department of Education Basic Research Project (17ZB0345)