

# 鲤鱼浮肿病流行情况的初步研究

徐立蒲<sup>1</sup> 王静波<sup>1</sup> 张文<sup>1</sup> 潘勇<sup>1</sup> 曹欢<sup>1</sup> 王妹<sup>1</sup> 王小亮<sup>1</sup> 王澎<sup>1</sup> 那立海<sup>1</sup> 江育林<sup>2\*</sup>

(1.北京市水产技术推广站 北京 100021;2.中国检验检疫科学研究院)

**摘要** 为了明确北京顺义某锦鲤养殖场患病锦鲤的发病死亡原因,根据鲤鱼浮肿病毒基因的保守序列设计引物进行套式 PCR 扩增,产物经电泳后可见 548 bp 片段和 180 bp 片段的 DNA 条带,空白对照无扩增条带;套式 PCR 的产物进行测序,测序结果和 Genbank 公布的鲤鱼浮肿病毒 H504 株序列完全一致。结果显示这是由鲤鱼浮肿病毒引起的鲤鱼浮肿病,并通过进一步分析,提示鲤鱼浮肿病在北京地区已经有所扩散,应引起养殖者以及鱼病工作者的关注。

**关键词** 鲤鱼浮肿病;鲤鱼浮肿病毒;锦鲤疱疹病毒病;锦鲤;鲤  
**中图分类号** Q789

## A Preliminary Study of Carp Edema Virus Disease

XU Lipu<sup>1</sup>, WANG Jingbo<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>1</sup>, PAN Yong<sup>1</sup>, CAO Huan<sup>1</sup>, WANG Shu<sup>1</sup>,  
WANG Xiaoliang<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, NA Lihai<sup>1</sup>, JIANG Yulin<sup>2\*</sup>

(1.Beijing Aquaculture Technology Extension Station, Beijing, 100021;  
2.Chinese Academy of Inspection and Quarantine)

**Abstract:** To find the potential reason causing Koi to die in a fishing farm in Shunyi district, Beijing, the nested PCR was performed with the degenerate primers. After gel electrophoresis, two bands, 548 bp and 180 bp, were obtained in samples from the dead fish and no band was found in samples from the health fish. Then, these bands were sequenced and the sequences were blasted to CEV H504 sequence in NCBI database. The result showed that the CEV causes the Koi to die. And the present results implied that the CEV has spread in Beijing area, and more attention should be paid to reduce the loss of fishing income.

**Key Words:** Koi Sleepy Disease; Carp Edema Virus; Koi Herpes Virus Disease; Koi; Carp

## 1 前言

锦鲤疱疹病毒病 (Koi herpes virus disease, KHVD) 是由锦鲤疱疹病毒 (Koi herpes virus, KHV) 引起、危害鲤和锦鲤的常见和最重要的病毒病之一。KHV 主要感染各规格鲤和锦鲤,临床症状主要是烂鳃、眼凹陷、皮肤损害等<sup>[1]</sup>,感染后死亡率在 90% 以上。近年来,在北京养殖的鲤和锦鲤中出现了一种具有烂鳃、眼凹陷等类似 KHVD 临床特征的疾病,用检测 KHV 的 PCR 方法多次检测,结果均为 KHV 阴性,引起猜测。2016 年 5 月下旬,北京市顺义区某锦鲤养殖场发病,病鱼出现烂鳃、凹眼瞪,但 KHV 检测结果依然为阴性。但用鲤鱼浮肿病毒 (Carp Edema Virus, CEV) 进行 PCR 扩增,并且测

序结果和 Genbank 公布的结果进行比较,结果显示发病锦鲤是由 CEV 感染引起。

鲤鱼浮肿病 (Koi sleepy disease, KSD) 是在国际上流行的外来病,其病原是 CEV,在我国尚未见报道。本研究结果提示 CEV 已经进入我国,并对鲤和锦鲤养殖业造成了威胁。现将研究报告如下,以为开展进一步的监测、防控工作提供基础资料。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 病料来源

北京市顺义区某锦鲤养殖场的患病锦鲤。

#### 2.1.2 试剂

DNA 抽提试剂盒:德国 QIAGEN 公司;引物合

第一作者 E-mail: xulipu001@163.com; \* 通信作者 E-mail: yulinjiangpost@gmail.com

项目基金:北京市农业试验示范项目(20160117);现代农业产业技术体系北京市观赏鱼创新团队(GSY-02-09)

收稿日期:2016-06-13

成及测序:由上海生工生物工程技术服务有限公司提供;PCR 扩增试剂:北京百泰克公司。

### 2.1.3 仪器

台式冷冻离心机:德国艾本德公司, Centrifuge 5418R;梯度 PCR 仪:美国 AB 公司, ABI veriti;电泳仪:北京六一仪器公司, DYY-6C;凝胶成像系统:北京赛智公司, ChampGel-5000;显微镜:奥林帕斯, CX-41。

## 2.2 方法

### 2.2.1 鳃丝显微镜观察

制作病鱼鳃丝水浸片,在 1000 倍显微镜下观察鳃丝。

### 2.2.2 分子生物学检测

取病鱼鳃、肾、肝、脑、脾,混合后研磨匀浆,制成样 1、样 2,4 ℃过夜;用 DNA 抽提试剂盒抽提核酸,做套式 PCR 扩增,引物根据已知 CEV 基因的保守序列设计<sup>[2]</sup>;第一次 PCR 扩增的正向引物 F1:5'-GCTGTTGCAACCATTTGAGA-3',反向引物 R1:5'-TGCAGGTTGCTCCTAATCCT-3',扩增该基因中的 548 片段;第二次扩增的正向引物 F2:5'-GCTGCT-GCACTTTTAGGAGG-3',反向引物 R2:5'-TGCAAGT-TATTTTCGATGCCA-3',再从中扩增 180 片段。反应条件为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 2 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。将嵌套 PCR 后的产物纯化后,送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定,测序结果通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析。

另外还使用扩增 KHV 的 TK 和 SPH 基因的引物对该样品做 PCR 扩增<sup>[3]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 发病鱼池情况

5 月 20 日,该养殖场有 2 个鱼池发病;到 6 月 1 日,鱼死亡情况基本停止。1 号池有鱼 2000 kg,死亡约 1000 kg,10 d 累计死亡率为 50%;2 号池有鱼 5000 kg,死亡约 500 kg,10 d 累计死亡率为 10%。据调查,1 号池在发病前水颜色异常,呈土色;2 号鱼池水色正常。该场在发病前 2 天对 1、2 号池均采用了投放芽孢杆菌、富藻素等产品,并将其他鱼池水加注到这 2 个鱼池,结果 2 日后 2 个鱼池均出现发病死亡情况。发病后,该场还向池中泼洒氟苯尼考以及大黄,结果出现更多鱼死亡。

### 3.2 临床症状

发病水温 23 ℃,患病锦鲤全长 10-15 cm,体重约 100 g,有烂鳃、凹眼症状(图 1),解剖可见各内脏形态基本正常。其临床症状类似 KHV 感染。



图 1 发病锦鲤

### 3.3 鳃丝显微镜观察

在 1000 倍显微镜下可见鳃丝上有大量杆状细菌,类似柱状黄杆菌(图 2)。

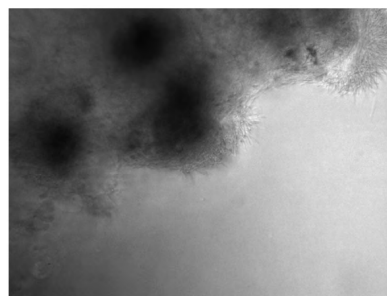
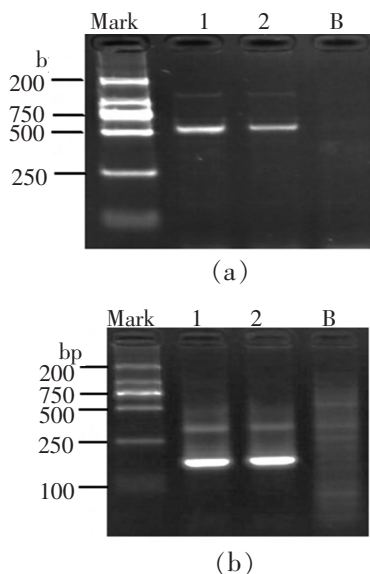


图 2 显微镜下可见细长杆菌(×1000)

### 3.4 病毒的分子生物学特性

病鱼的鳃、肾、肝、脑、脾组织抽提核酸后,根据 CEV 基因的保守序列设计引物进行套式 PCR 扩增,产物经电泳后可见 548 bp 片段和 180 bp 片段的 DNA 条带,空白对照无扩增条带(图 3)。套式 PCR 的产物进行测序,其测序结果在 NCBI 上进行比对,与已报道的 CEV 序列(GeneBank ID:KM283182,分离株:H504)同源性达到 100%(图 4)。



注:1、2 为病鱼组织;B:空白对照

图 3 CEV 经 PCR(a)和套式 PCR(b)后的产物

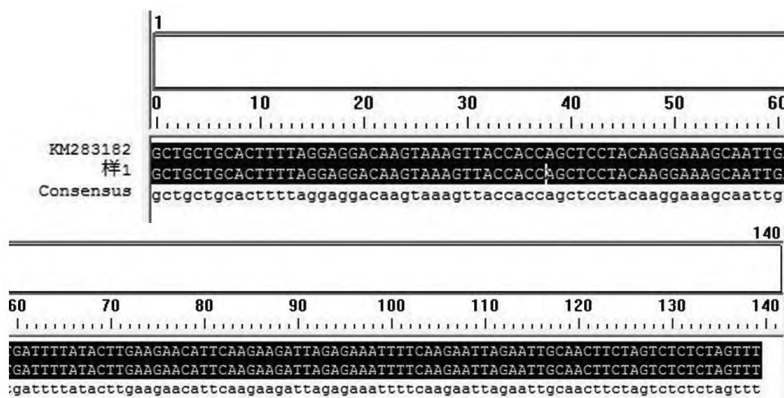


图4 该病毒和 CEV H504 株的部分基因片段的序列比较结果

同时用特异性扩增 KHV 的 TK 和 SPH 基因的引物,对该样品进行 PCR 扩增,没有见到有相应的 DNA 扩增片段。

以上结果表明,此养殖场的患病锦鲤是被 CEV 感染而非 KHV;鳃丝上的细长杆菌推测是继发感染柱状黄杆菌。

#### 4 讨论

KSD 最早发生于日本新潟<sup>[4]</sup>,近年在德国、法国、英国、荷兰、捷克、奥地利、土耳其等国发现养殖鲤和锦鲤因 CEV 感染引起爆发性死亡的情况<sup>[5,6]</sup>,成鱼和幼鱼均会发病,具昏睡、鳃损害、凹眼、皮肤损害等症状,这些临床症状与 KHVD 类似。由于 KSD 仅在外国报道,暂时还未能引起国内同行的足够重视。

KHVD 在国内已经被多次检出,并对渔业生产造成严重危害。过去,每当鲤和锦鲤在水温 20℃–30℃发生大量死亡时,如果出现烂鳃、眼凹陷、皮肤损害等临床症状,通常就初步判断由 KHV 引起,用 PCR 也很容易确诊。然而,近年来在北京以及全国各地养殖的鲤和锦鲤中多次出现一种高死亡率的鱼病,发病鱼也有烂鳃、凹眼等类似 KHVD 的临床特征,但实验室多次用 PCR 检测结果显示为 KHV 阴性。2014 年 7 月和 8 月,北京房山区 2 个养殖场各种规格锦鲤发病死亡,发病鱼呈烂鳃、凹眼,死亡率高达 80%以上,后经检测确定是 CEV 感染引起。而这次在北京顺义的养殖场又一次检测到 CEV,提示该病毒已经在北京地区扩散。

KHVD 和 KSD 这两种病症状很类似,但发病温度略有差别。前者在 20℃–30℃之间<sup>[1]</sup>;而后者发病水温范围较广,据报道在 7℃–28℃都有发病<sup>[2,4–6]</sup>,本次发病水温 23℃。因此当水温在 20℃以上,鲤或锦鲤出现烂鳃、凹眼等症状,并导致高死亡率时,难以再依靠临床特征区分两种病,而需要通过 PCR 检测来确证。此外本次在发病鱼鳃丝上还可大量细长杆菌,推测是柱状黄杆菌,该菌也可引起烂鳃症

状。这给现场单纯依靠临床症状初步诊断 KHVD 或 KSD 带来较大困难,需要进一步研究上述疾病在临床上表现出的不同症状特点。

此次发生 KSD 是在鱼池进行水质调节后,并且死亡率较高的 1 号池水色呈土色,明显水质恶化;死亡率较低的 2 号池水质明显好于 1 号池。推测 KSD 的发生及造成的死亡率与养殖环境有关。

进一步回顾本实验室近年的鱼病监测工作,2014 年 7 月,北京市怀柔区某水库网箱养殖的大规格鲤发病,死亡率 90%,病鱼出现烂鳃、凹眼等症状,未能检测到 KHV;同年 9 月,河北省唐山市曹妃甸 2 个养殖场的鲤大面积死亡,出现烂鳃、凹眼等症状,均未能检测到 KHV。可见在 2 年前就出现过类似 KHVD 的临床症状但检测又是 PCR 阴性的情况,提示 CEV 可能 2 年前就已经进入我国并在各地流行。

#### 5 结论

CEV 可感染锦鲤并导致发病死亡,经分析该病已经在北京地区扩散,并可能已经扩散到我国各鲤和锦鲤养殖区。由于 CEV 和 KHV 感染引起的症状类似,都能够引起养殖鲤和锦鲤的高死亡率,临床上难以区分。因此有必要引起养殖者以及鱼病工作者重视,对 KSD 进行普查和流行病学监测。

#### 参考文献

- [1] 陈爱平,江育林,钱冬,等. 锦鲤疱疹病毒病[J]. 中国水产, 2010,10:58–59.
- [2] 親松剛,的山央人,山本健也,等. PCR 法によるコイ浮腫症ウイルス検出の試み[J]. 水产増殖,1997,45(2):247–251.
- [3] SCT7212.1–2011, 鲤疱疹病毒检测方法 第 1 部分:锦鲤疱疹病毒[S].
- [4] Shin-ichi Ono, Akira NAGAI, Noriaki SUGAI. A Histopathological Study on Juvenile Colorcarp, Cyprinus carpio, Showing Edema[J]. Fish Pathology, 1986, 21(3):167–175.
- [5] Verena Jung-Schroers, Mikolaj Ademek, Felix Teitge, et al. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11:114–117.
- [6] E Lewisch, B Gorgoglione, K Way, et al. Carp Edema virus/Kio sleepy disease: An Emerging Disease in Central–East Europe[J]. Transboundary and Emerging Disease, 2014, 9:1–7.