

河南沿黄滩区鲤浮肿病和锦鲤疱疹病毒病初步调查研究

徐立蒲¹ 张 文¹ 王 姝¹ 李旭东² 李 清³ 王立新³ 潘 勇¹ 江育林¹

(1. 北京市水产技术推广站, 北京 100176; 2. 河南省水产技术推广站, 河南 郑州 450008; 3. 全国水产技术推广总站, 北京 100125)

鲤浮肿病(CEVD)是一种高致病性病毒病, 能导致养殖鲤和锦鲤大量死亡。由于它和锦鲤疱疹病毒病(KHVD)在临床症状上非常相似, 都是以烂鳃和眼凹为特征, 在几年前人们都把它们误认为是KHVD而没有注意到CEVD的存在。近一年被确认后, 人们开始进行回顾性调查, 才发现以前在北京、天津和河北等地发生的所谓KHV流行而送样到实验室检查又是KHV阴性的一些“奇怪”病例, 其实是由鲤浮肿病毒(CEV)感染引起的。

据中国渔业年鉴, 我国2015年养殖鲤产量有335多万吨, 其中河南的产量27.8万吨, 产量名列第三位, 约占全国鲤产量的8%, 河南沿黄滩区(郑州、洛阳、开封等地)是河南省主要的鲤养殖产区。近几年来该区域的养殖鲤(包括锦鲤)流行一种“急性烂鳃病”, 发病率高、发病急、死亡率高。鲤养殖户为控制该病, 大量施用杀虫、抗菌药物, 反而造成更高死亡率, 给当地鲤养殖产业造成严重危害。该病一度被认为是由锦鲤疱疹病毒(KHV)感染引起, 但多次送样到不同实验室检测, 结果均为KHV阴性。自从确认我国已经存在CEV后, 我们开始高度怀疑这种“急性烂鳃病”是由CEV引起的。为此, 全国水产技术推广总站牵头组织在河南沿黄滩区对养殖鲤开展了锦鲤疱疹病毒病和鲤浮肿病流行病学调查, 现将初步调查研究结果报告如下。

一、材料与方法

1. 送样检测

在2017年5月, 由河南省水产技术推广站采集河南沿黄滩区9个市的23家鲤或锦鲤养殖场的样品。其中鲤14份, 锦鲤7份, 草金鱼和金鱼2份。每份样品150尾活鱼, 送北京市水产技术推广站检测锦鲤疱疹病毒和鲤浮肿病毒。采样时水温24~27℃。

2. 现场调查

2017年6月, 由全国水产技术推广总站、河南省水产技术推广站、北京市水产技术推广站组成联合调查组, 到郑州、开封、洛阳、焦作的10家鲤或锦鲤养殖场现场调查并抽样检测锦鲤疱疹病毒和鲤浮肿病毒。

3. 样品处理和核酸抽提

取样品鱼的鳃、肾、肝、脾、脑组织, 混匀后研磨, 加含10%血清的199细胞培养液, -80℃保存待测。检测前用DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒(QIAGEN, 德国)抽提核酸。

4. nest-PCR检测鲤浮肿病毒(CEV)

采用Oyamatsu等建立的nest-PCR方法, 引物设计依据痘病毒编码外膜蛋白质的4a保守基因。第一次PCR扩增的正向引物F1: 5'-GCTGTTGCAAC-CATTTGAGA-3', 反向引物R1: 5'-TGCAGGTT-GTCTCTAATCCT-3', 扩增的基因片段为548 bp; 第二次扩增的正向引物F2: 5'-GCTGCTGCACTTTTAG-GAGG-3', 反向引物R2: 5'-TGCAAGTTATTTTCGAT-GCCA-3', 再从中扩增180 bp片段。

反应条件为: 先94℃5分钟; 然后94℃变性2分钟, 60℃退火1分钟, 72℃延伸1分钟, 共35个循环; 最后72℃延伸10分钟, 4℃保存。

PCR扩增产物采用1.5%琼脂糖电泳, 100微升/升Goldview I型染色剂染色。电压150伏, 电泳30分钟, 标准分子量作对照, 结果用凝胶成像系统观察。

在阳性和阴性对照正常的情况下, 能扩增出548 bp或180 bp的DNA带的, 判定为CEV阳性。

5. Realtime PCR检测鲤浮肿病毒(CEV)

使用CEFAS建立的实时荧光PCR方法进行了样品检测, 引物qF1: 5'-AGTTTGTAKATTGTAG-CATTCC-3', qR1: 5'-GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAA-3', 荧光探针probe1: 5'-[FAM]+AGAGTTT-GTTTCTTGCCATACAACT+[BHQ]-3'。采用Quanti-

基金项目: 2017年度农业部水生动物重大疫情监测与防治项目、鲤鱼浮肿病诊断和防控技术研究应用项目。

Nova Probe PCR Kit 试剂盒, 20 微升反应体系为 $2 \times$ Probe PCR Master Mix 10 微升, 0.4 微米上游、下游引物和 0.2 微米的探针均为 0.1 微升, QN ROX 参考染料 0.1 微升, 模板 5 微升, DEPC 水补至 20 微升。

反应条件为 50°C 2 分钟, 95°C 预变性 10 分钟, 95°C 变性 15 秒, 55°C 退火 1 分钟, 共 50 个循环。

CT 值小于等于 35, 且出现扩增曲线, 判定为 CEV 阳性; 大于 35 小于等于 38, 有扩增曲线的判为可疑; 大于 38 判为 CEV 阴性。

nest-PCR 或 Realtime PCR, 其中一种检测方法为阳性的, 即可判定为 CEV 阳性。

6. 锦鲤疱疹病毒检测方法

按照 SC/T 7212.1-2011 鲤疱疹病毒检测方法第一部分: 锦鲤疱疹病毒。扩增 TK 基因, 409bp; 同时扩增 Sph 基因, 292bp。

二、结果

1. 送样样品检测结果

在送检的 23 份样品中, 鲤 14 份、锦鲤 7 份、金鱼 2 份。共检测到 CEV 阳性 13 份, 其中鲤 8 份、锦鲤 4 份、金鱼 1 份。CEV 阳性率 57%。这 23 份样品里有 4 份出现烂鳃等临床症状, 检测显示 CEV 阳性。所有 23 份样品 KHV 均为阴性。

2. 现场调查及检测结果

在现场调查的 10 家渔场中, 有 4 家养殖的鲤(或锦鲤)正在发病死亡, 1 家刚过发病高峰, 均有烂鳃症状。经检测, 无临床症状的样品是 CEV 阴性, 而有临床症状的 5 家有 4 家为 CEV 阳性。所有 10 份样品都是 KHV 阴性。

3. 现场调查中 5 家发病场发病死亡情况调查

1#场: 有 9 亩池塘 2 个, 养殖鲤鱼, 规格 3~4 厘米, 投放 20 万尾, 5 月份死亡约 5 万尾, 到 6 月份现场调查时已经基本停止死亡, 据养殖户反映死亡鱼有烂鳃症状。死亡率 25%。检测 CEV 为阳性, KHV 阴性。

2#场: 鱼池 1 个, 6 亩, 养鲤、鲫、草鱼等, 土池塘, 主养成鱼。鲤规格 10~30 厘米都有发病, 其他品种无发病情况。调查时, 发病已经到第 4 日。病鱼浮于水面, 昏睡、烂鳃。死亡 300~350 千克。检测 CEV 为阳性, KHV 阴性。

4#场: 鱼池 1 个, 8 亩, 养殖锦鲤, 规格 25 厘米。存塘原有 5000 千克, 现场调查时发病刚到第

4 日, 已经死亡 1000 千克。死亡率在 20% 以上。检测 CEV 为阳性, KHV 阴性。

5#场: 鱼池 1 个, 19 亩, 主养鲤, 每亩放 2000 尾, 调查时正是发病第 6 日, 死亡率已经达到 10%。仅鲤发病, 发病鱼有烂鳃症状。检测 CEV 为阳性, KHV 阴性。

7#场: 鱼池 2 个, 其中 1 个鱼池发病, 10 亩池投放 2.3 万尾鲤。鱼全长达到 20~30 厘米。已经发病到第 8 日。仅鲤死亡, 已经死亡 250 多千克。烂鳃、鳃丝肿胀, 检测 CEV 和 KHV 均阴性。

经调查, 这 4 家 CEV 阳性且发病的渔场在发病前有的使用过二氧化氯或杀虫药; 有的在发病前天气突变、降温; 有的采用过调水药物调水等。看来, 都发生过能导致鱼体产生应激反应的情况。

三、讨论

1. 河南沿黄滩区养殖鲤暴发的“急性烂鳃病”为 CEV 感染引起

锦鲤疱疹病毒病 (KHVD) 是国家二类动物疫病, 由于在国内已经广泛流行, 对渔业生产有严重危害。过去每当锦鲤和鲤在水温 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 发生大量死亡时, 如果出现烂鳃、眼凹陷、皮肤损害等典型临床症状, 通常就初步判断是由 KHV 引起, 再用 PCR 也很容易确诊。而鲤浮肿病 (CEVD) 最早发生于日本新潟的锦鲤中, 成鱼和幼鱼都会生病。发病的鱼昏睡、鳃损害、凹眼、皮肤损害等, 其临床症状与 KHVD 非常类似。近年来在一些欧洲国家不时有养殖锦鲤和鲤因感染 CEV 引起大量死亡报道, 徐立蒲等在 2016 年首次确认 CEV 已在我国发生。

近几年来河南沿黄滩区养殖鲤(包括锦鲤)暴发一种“急性烂鳃病”, 病鱼也有烂鳃和凹眼等类似 KHVD 的临床特征。当地鲤养殖户为控制该病, 大量施用杀虫、抗菌药物, 反而造成更高死亡率。“急性烂鳃病”开始被认为是锦鲤疱疹病毒感染引起, 但多个实验室多次用 PCR 检测结果显示为 KHV 阴性。本次在河南进行的调查中, 共检测样品 33 份, 其中送样检测 23 份, 现场抽样 10 份。结果有 17 份样品为 CEV 阳性, 未发现一份 KHV 感染。因此我们认为, 近年来河南沿黄滩区养殖鲤(包括锦鲤)暴发的“急性烂鳃病”主要病因应为 CEV 感染引起。

现场调查中, 有临床症状的 5 家有 1 家 CEV 和 KHV 检测结果都是阴性。有可能是由其他病原感染

鱼类链球菌病的研究进展

近年来,水产养殖业正面临着严重的病害问题,尤其是以细菌性疾病流行最广、危害最大、损失最重。其中,以链球菌感染最为流行,在全球各大洲的主要鱼类养殖国家均有发生,危及各种海、淡水鱼类,已成为一种世界性疾病,其危害日益凸显;据统计,全球每年渔业因海豚链球菌病所造成的经济损失至少超过1.5亿美元。链球菌病不仅阻碍了渔业的可持续健康发展,而且直接影响食品安全和人类健康。现从病原学、流行病学、临床病症与病理学、致病机理、检测手段、药物防治等方面对鱼类链球菌病进行系统阐述,以期为该病害有效处理以及渔业的可持续发展提供有价值的参考。

引起,或者是检测方法本身待完善(已经有国外文献报道)而漏检,需要进一步确认。

在2017年的送样中,还从1份金鱼样品里检出CEV。由于在金鱼样本中检测到CEV尚属首次,我们将进一步进行调查研究。

2. CEV感染率和死亡率较高,应引起足够重视

2017年5月河南的23份送样中,4份有临床症状的样品全部是CEV阳性;6月的10份现场采样中,5份有临床症状的样品有4份是CEV阳性,没有一份KHV阳性。显示河南沿黄滩区发病的养殖鲤(包括锦鲤)绝大部分是由CEV感染引起的。

值得注意的是,二次采样中CEV感染阳性的比例高达50%左右,如此高的感染率提示养殖鲤存在高的CEVD发病风险。

据本次现场调查了解,发病的4个场养殖鲤和锦鲤因CEV感染死亡率均在10%以上。而据养殖户介绍,往年的养殖鲤和锦鲤因“急性烂鳃”(应是CEV)发病死亡情况较2017年还要严重。一般发病时间有两个高峰,分别是5、6月和9月。看来,CEV已经成为制约当地鲤和锦鲤养殖业健康发展的主要因素,应引起足够重视。

3. 引种检疫和避免应激是预防CEVD的重要技术措施

经现场调查了解,发病渔场均采用地下水源,病原随水流传播的可能性不大。值得注意的

一、病原学

链球菌(*Streptococcus*)是链球菌属的革兰氏阳性菌,可引起人畜共患;鱼类感染致病原主要包括海豚链球菌和无乳链球菌。

1. 海豚链球菌 海豚链球菌(*S. iniae*)隶属于芽孢杆菌纲、乳杆菌目、链球菌科、链球菌属。海豚链球菌为革兰氏阳性球菌,在显微视野下为圆形或近圆形,链状或呈双排列。

2. 无乳链球菌 无乳链球菌(*S. agalactiae*)为芽孢杆菌纲、乳杆菌目、链球菌科、链球菌属,亦称为B群链球菌。无乳链球菌是一种兼性厌氧的革兰氏阳性双球菌,在显微视野下呈球形或卵圆形,链状或成对排列,直径为0.6~1.0微

是,经检测CEV阳性的养殖场,其供苗来源的苗种场CEV检测也为阳性。故由苗种场带毒扩散有可能是河南沿黄滩区养殖鲤“急性烂鳃病”(即CEV感染)流行蔓延的一个主要因素。做好对苗种的监控与疫病净化工作可作为预防CEVD的重要技术措施和手段。

经现场调查,几个发生CEVD的养殖场发病前存在水温突变、水质突变、鱼药使用等情况,这几种情况会使养殖鱼产生应激,而鱼感染病毒后体质下降、遭遇应激后易发病。有的渔场在发病后滥用各种鱼药,反而造成更大死亡;有的发病后用药少反而死亡率较低。国际上的研究也表明,应激是养殖鲤发病的主要诱因之一。因此,在发病前后避免滥用药等能导致鱼体产生应激反应的情况,是防控CEVD和降低损失的有效措施。

四、结论

初步调查结果表明,河南沿黄滩区(郑州、洛阳、开封等地)养殖鲤(包括锦鲤)近几年暴发的“急性烂鳃病”主要病因是鲤浮肿病毒(CEV)感染引起,且对养殖生产造成重大危害。另有监测研究表明,在北京、天津、河北、广东等地区养殖鲤和锦鲤中存在CEV的流行,鉴于CEV的流行范围大、危害严重,建议在更大范围内对CEV进行普查、流行病学监测以及防控技术研究。