

综述

鲤疱疹病毒 I、II、III 型研究进展

罗丹^{1,2}, 梁利国¹, 谢骏¹, 吴旭东²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 江苏 无锡 214081;

2. 甘肃农业大学动物科技学院, 甘肃 兰州 730070)

Research Progress of Cyprinid Herpesvirus I, II, III

LUO Dan^{1,2}, LIANG Li-guo¹, XIE Jun¹, WU Xu-dong²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries & Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, P. R. China;
2. College of Animal Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, P. R. China)

摘要:近年来,鲤疱疹病毒 I、II、III 型(Cyprinid herpesvirus I、II、III)病毒给我国鲤科鱼的养殖造成了严重的经济损失。CyHV-I 主要危害 1 龄以上的鲤,对鲫、圆腹雅罗鱼、鲤与金鱼杂交种等也有危害。CyHV-II 仅感染金鱼、鲫及其普通变种如异育银鲫、金鱼和鲤的杂交体,对鱼卵、鱼苗、鱼种、亲鱼等各个时期均有危害,而幼鱼较成鱼易受到感染。鲤除了幼鱼不易受 CyHV-III 影响,其他所有龄期均对其敏感。CyHV-III 不仅鲤能感染,其他鲤科鱼、锦鲤和鲫的杂交后代、锦鲤和金鱼的杂交后代均对其易感,金鱼、鲟均可作为 CyHV-III 潜在的携带载体。就 3 种病毒的流行现状、临床症状、引发疾病的病理特征、检测方法等取得的研究进展进行综述。

关键词:鲤科疱疹病毒 I 型; 鲤科疱疹病毒 II 型; 鲤科疱疹病毒 III 型; 病理特征; 临床症状; 检测方法

中图分类号: S941.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2014)03-0094-07

鲤科疱疹病毒 I 型(Cyprinid herpesvirus I, CyHV-I)常引起鲤痘疮病(Fish pox),因此又称为鲤痘疮疱疹病毒(Carp pox herpesvirus)或上皮癌疱疹病毒(Herpesvirus epithelioma)。金鱼造血器官坏死病毒(Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)也称为疱疹病毒性造血器官坏死病毒(Herpesviral haematopoietic necrosis virus, HVHNV),因是第 2 个从鲤科鱼类中分离的疱疹病毒,故命名为鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus II, CyHV-II)。Waltzek(2005)通过将锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV)和 CyHV-I、CyHV-II、沟鲶疱疹病毒(Ic-

talurid herpesvirus 1, IcHV-1)等疱疹病毒的 4 个完整基因、编码螺旋酶、次壳体间三聚体蛋白、DNA 聚合酶以及主要衣壳蛋白基因进行同源性分析比较,发现 KHV 与 CyHV-I、CyHV-II 密切相关,因此正式将 KHV 命名为鲤疱疹病毒 III 型(Cyprinid herpesvirus III, CyHV-III)。

近年来,CyHV-I、CyHV-II、CyHV-III 已给世界范围内的鲤科鱼养殖业造成巨大的经济损失。本文将系统概述这 3 种病毒的流行现状、临床症状、引发疾病的病理特征和检测方法等取得的研究进展,为进一步深入研究这 3 种病毒提供理论参考。

1 国内外流行现状

CyHV-I 引起的鲤痘疮病早在 1563 年就有记载,20 世纪初该病曾流行于欧洲、朝鲜、日本均有发生(吴明传,1997)。我国 1957 年在上海的一口鱼池中发现此病,目前该病已蔓延至我国湖北、河南、河北、四川等大部分地区。CyHV-I 主要危害 1 龄以上的鲤,对鲫、圆腹雅罗鱼、鲤与金鱼杂交种等也

收稿日期:2013-12-29

基金项目:中国水产科学研究院级基本科研业务费(2013A0608;2013A06XK11);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-10)。

通讯作者:谢骏,男,研究员。E-mail: xiej@ffrc.cn

吴旭东,男,研究员。E-mail: amy95@126.com

作者简介:罗丹,1987 年生,女,硕士,主要从事水生动物病毒学研究。E-mail: LUODAN1107@163.com

有危害,但对同池混养的青鱼、草鱼、鲢、鳊、赤眼鲮等鱼类没有危害(战文斌,2006)。CyHV-II 首次发病是在日本养殖的金鱼中(Jung et al,1995),目前该病在澳大利亚(Stephens et al,2004)、新西兰均有发生(Waltzek et al,2009),其流行情况分布全球。1995年 CyHV-II 造成我国台湾某金鱼孵化场繁殖的金鱼鱼苗大规模死亡,究其原因可能是从进口的金鱼亲本中传入 CyHV-II (Chang et al,1999)。2011、2012年,CyHV-II 引起我国养殖的异育银鲫(*Carassius gibelio*)出现严重的死亡,这也是我国异育银鲫发生该病的首次报道(Wang et al,2012)。而2013年在江苏、北京、武汉、广州等地养殖的异育银鲫中也均检测出 CyHV-II,证实 CyHV-II 在我国已有较为广泛的分布(李莉娟等,2013)。CyHV-II 的感染谱很小,仅感染金鱼(Jeffrey et al,2007)、鲫及其普通变种如异育银鲫(Andor et al,2011)、金鱼和鲤的杂交体(Hedrick et al,2006),不感染锦鲤等。CyHV-II 对鱼卵、鱼苗、鱼种、亲鱼等各个时期均有危害,而幼鱼较成鱼易受到感染,且更易引起小于1龄的幼鱼暴发性死亡(Groff et al,1998)。另外 Goodwin(2009)证实 CyHV-II 有垂直传播的现象。1997年 CyHV-III 在以色列首次导致养殖动物发病(Waltzek et al,2005),之后在瑞典、英国、德国、美国、南非、马来西亚、新加坡、印度尼西亚等地均有发生(Sunarto et al,2011)。而2012年在日本的河流里也检测出 CyHV-III 的存在(Minamoto et al,2012)。我国暴发该病是在2000年的广东省(Hedrick et al,2000)。鲤除了幼鱼不易受 CyHV-III 影响,其他所有龄期均对其敏感(Lto et al,2007)。不仅鲤能感染 CyHV-III,其他鲤科鱼(Davidovich et al,2007)、锦鲤和鲫的杂交后代、锦鲤和金鱼的杂交后代均对其易感(Bergmann et al,2010)。金鱼(Sandler et al,2008)、鲟(Andrzej et al,2009)均可作为 CyHV-III 潜在的携带载体。当春天水温升高时,在成鱼的繁殖栖息地 CyHV-III 浓度明显增加,此繁殖栖息地成为 CyHV-III 的传播热点(Uchii et al,2011)。Minamoto(2011)相关分析表明,CyHV-III 的复制和数量与轮虫纲有显著的正相关,说明浮游生物在自然环境中影响着病毒的生态环境。

2 临床症状及病理特征

CyHV-I 造成的痘疮病是一种在鲤科鱼中流行的慢性皮肤病。鱼体发病初期出现薄而透明光滑的灰白色小斑状增生物,并覆盖一层很薄的白色黏液;

随着病情的发展,白色斑点逐渐扩大、增厚,数目逐渐增加,互连成片,形成表面平滑、呈乳白色、奶油色至棕色(随病灶处的色素而不同)在血管处则呈粉红色的“石蜡样或玻璃样”的痘疮增生物。这些增生物与鱼的体表结合十分牢固,需用小刀才能刮下。增生物为上皮细胞及结缔组织增生形成的乳头状小突起,不分层。增生的细胞有时也侵入真皮组织。增生物主要成分为胶原纤维,其不转移,既可自然脱落又能在原患部再次出现新的增生物。背部、头部、鳍条及尾柄是痘疮密集区,严重的病鱼全身布满痘疮,且病灶部位常有出血现象。当增生物蔓延扩大到鱼体的大部分时,会影响其生长发育,脊椎受到损害,骨骼软化,食欲减退,但一般不会致死。可通过改变某些环境因子来控制痘疮的产生与消失,如水质改善或温度升高时症状会自然消失,但影响鱼的生长和商品价值。将痘疮悬液用划痕法接种到健康鲤鱼后,可产生与天然发病时相同的症状。在自然条件下,水质变坏时,水中有毒物质刺激鱼体表及鳃组织,分泌大量粘液,最后粘液脱落,被 CyHV-I 感染而发病,病毒也可通过粘膜表面的接触和污染的水体传播(刘可选等,2003)。

同其他疱疹病毒一样 CyHV-II 可形成潜伏感染并成为潜在的传播源(Goodwin et al,2009),且温度是影响感染金鱼组织内病毒复制的关键因素。发病初期鱼出现昏死,食欲不佳或厌食,游动缓慢,停留在池塘或水箱底部。之后皮肤苍白伴有黏液,鳍上有脓疱出现。鳃丝从健康的红色到腐烂的白色,之后鳃严重坏死,一部分鱼腹部膨胀甚至有病鱼直肠脱出,两侧眼球突出,鳃上有瘀斑性出血(Goodwin et al,2006)、鳍上有水泡状脓疱(Jeffrey et al,2009)、腹水等(Whittington et al,2007)。解剖后可见鳃出血,肝、脾、肾呈苍白色且脾肾肿胀,肠道空(Philbey,2006);头肾和体肾中造血细胞出现明显的核固缩和核裂解性坏死,脾脏内的脾髓和小动脉大面积坏死,有时还伴有出血;胰腺、胸腺、肠道由多病灶发展到弥散性坏死,上皮细胞增生,口咽和表皮细胞变性坏死,心脏出现病灶性坏死,其他组织器官包括肌肉组织、脑组织没有发现病理性变化(Jung et al,1995;Groff et al,1998;Stephens et al,2004;Chang et al,1999)。

CyHV-III 常使鲤发生间质性肾炎(Interstitial nephritis)、鳃坏死(Gill necrosis)(Thomas et al,2006)。鱼体感染 CyHV-III 后,在其脑、眼、脾、鳃、肾、肠和肠内容物都能检测出 CyHV-III (Eide et al,2011)。发

病初期鱼体出现游动缓慢、打转,皮肤和鳃丝颜色变浅,之后出现鳍肿胀,有的出现腹部肿大、鳃丝腐烂出血、眼凹陷,有缺氧和水肿的表现,皮肤上出现苍白色的斑块与水泡,全身多处特别是嘴、腹部、胸鳍明显充血、出血,体表黏液增多增稠、组织坏死、产生直径45~75 μm的异常巨细胞(Giant cell)肿瘤,鳞片有血丝,有些病鱼直肠脱出,有些病鱼的造血器官和组织受损。鳃上皮细胞出现不同程度水肿,次级鳃丝出现融合现象。CyHV-III的潜伏期为14 d,最适生活温度为18~27℃。在限制存活温度下,CyHV-III能处于一种潜伏状态在鱼体内持续存活,当鱼转入到适合其生长的温度时CyHV-III会再次恢复活力(Rakus et al, 2012)。Fournier(2012)发现CyHV-III可以通过皮肤和牙周咽粘膜感染进入鱼体。Stalin(2011)发现清除皮肤黏液或者表皮损伤后会加剧CyHV-III进入鱼体,说明皮肤黏液具有先天免疫功能,可以阻止CyHV-III从表皮进入。鲤感染CyHV-III后肠道上皮组织有紧密连接蛋白的表达,使肠道上皮渗透性改变,从而在肠道上形成对CyHV-III的屏障(Syakuri et al 2013)。

3 检测方法

3.1 电镜观察

电镜观察是最直接的方法。目前CyHV-I的检测方法主要是根据上皮细胞及结缔组织的增生组织做出初步诊断,如果一些上皮细胞核内出现包涵体则可做进一步诊断。此外也可对增生组织进行切片光镜观察或增生物超薄切片电镜观察。江育林(1991)通过电镜观察到细胞质中有大量的直径140~160 nm、近似球形的CyHV-I颗粒。CyHV-I的核心为对称的20面体,呈六角形,有囊膜。核衣壳在细胞核中形成,直径为80~100 nm,该病毒能在鲤科鱼类的皮肤上皮细胞(初代)中生长产生细胞病变,形成合胞体。将感染了CyHV-I并出现痘疮的锦鲤皮肤进行切片、染色后显微观察显示,皮肤增厚,有些含病毒包涵体的细胞着色较深。

Jung(1995)等通过电镜技术首次观察到了患病金鱼脾、肾组织细胞中感染的CyHV-II粒子,Groff(1998)等采用电镜观察濒死金鱼幼鱼的鳃和肾组织的超薄切片,也证实了感染细胞内CyHV-II粒子的存在。Chang(1999)等通过电镜技术也在濒死的金鱼组织细胞内观察到CyHV-II粒子。Wang(2012)等通过电镜发现在肝和脾能观察到最明显的组织病理学变化,包括肾脏的造血干细胞核固缩、

核碎裂、肾小管上皮细胞偶尔能观察到坏死的斑点,脾细胞核内包涵体坏死等。感染了CyHV-II的金鱼细胞核肿胀,电镜检查发现细胞核染色质边集和核内包涵体,细胞核内有成熟的和形成中的病毒粒子,且成熟的病毒粒子散布于细胞浆中(Jeffrey et al, 2007)。CyHV-III的初步诊断一般是使用电镜观察鳃等组织的病理变化情况。CyHV-III主要分布于肝细胞(林雪玲,等;2006),是一种具有成熟的病毒颗粒的球状病毒,有囊膜,直径170~230 nm,核衣壳为对称的10面体,直径100~110 nm,衣壳包含基因组和皮层(Michel, 2010)。CyHV-III核表面具有螺旋样结构,核内有一个不对称的电子密集区,被认为是病毒DNA基因组构成的核蛋白(吕大成, 2011)。

3.2 细胞培养分离技术

细胞培养分离技术是最准确的诊断方法,是世界动物卫生组织(OIE)推荐的鱼类病毒检测的首选方法。

1984年Sano等分离培养CyHV-I成功。CyHV-I能在胖头鲤细胞(Athead minnow cells, FHM)、MCT、鲤上皮瘤细胞(Epithelioma papillosum cyprinid, EPC)细胞株上生长。在15~20℃条件下将CyHV-I分离株接种到健康鲤细胞中,约5 d后开始出现细胞病变(CPE),局部空泡化,核固缩并慢慢脱落。

CyHV-II通过细胞培养繁殖几代后就失去其活性,所以很难在鱼类病毒分离常用的细胞系中进行增殖。Jung(1995)等将6种鱼细胞分别接种到出现典型症状的金鱼的脾、肾组织中,匀浆上清液进行CyHV-II的分离,发现鲤上皮瘤细胞(Epithelioma papillosum cyprinid, EPC)、胖头鲤细胞(Athead minnow cells, FHM)和罗非鱼卵巢细胞(Tilapia ovary, TO-2)能分离出CyHV-II,但CyHV-II在以上3种细胞中的增殖均不能超过4代。Jeffrey(2007)将患病金鱼的鳃组织匀浆上清液接种到单层的锦鲤鳍细胞(koi fin 1, KF-1)在20℃条件下培养10 d后,发现KF-1出现典型的CPE,但随着增殖代数的增加,细胞病变范围逐渐减小,第3代病毒接种后则完全无CPE出现。李霞(2003)建立了一种金鱼鳍细胞系(Goldfish fin, GFF)能进行CyHV-II的连续传代,但随后Gilad(2004)等发现在其他实验室用GFF细胞系增殖CyHV-II是比较困难的。Ito(2013)从金鱼鳍细胞建立了GFF细胞系和standard Ryukin Takafumi(SRTF)细胞系可以用来持续繁殖CyHV-

II,且发现肾脏是病毒的主要复制点。

CyHV-III非常特殊,常用的鱼类细胞系都难以分离到(Calle et al, 1999)。CyHV-III只能在源自原始宿主的细胞中生长,即只能在锦鲤鳍细胞系(koi fin 1, KF-1)中生长,病毒接种这种细胞后可观察到CPE,但其灵敏度很低。2011年我国第一次用锦鲤尾鳍细胞系分离出CyHV-III(Dong et al 2011)。

建立CyHV-I、CyHV-II、CyHV-III敏感细胞系十分必要,为更有效的诊断和控制这3种疾病的流行提供技术支撑。

3.3 分子生物学诊断方法

目前CyHV-I的分子生物学诊断方法还研究较少。CyHV-II的解螺旋酶基因、DNA聚合酶基因、末端酶基因、衣壳体间三联蛋白基因等部分或完整的核苷酸序列已有报道,但其完整的基因组序列及基因图谱还有待于进一步研究和完善。目前聚合酶链式反应(PCR)是较为精确的检测CyHV-II感染的方法,且能检测到组织中极微量的病毒DNA,也是目前该病检测方法中发展较迅速的一种。Waltzek(2009)等基于CyHV-II的解旋酶基因设计引物建立的常规PCR方法具有较高的特异性,对CyHV-I、CyHV-III和IcHV-1的基因组DNA无扩增,且敏感性较高,针对该引物扩增出的目的条带构建的质粒灵敏度达到78拷贝/ μg ,基因组DNA达到84拷贝/ μg 。该方法能有效的检测不同地区的CyHV-II分离株。而后Goodwin(2006)等建立了实时定量PCR,该方法特异性强,灵敏度高,不仅能从表现出临床症状的鱼中检出CyHV-II,还能对看似健康的还未发病的鱼做检测诊断,能提早检测出处于潜伏期的病鱼,以便能及时预防并采取相应措施,将该病的损失尽量降低。周勇(2013)等也建立荧光定量PCR方法,该方法重复性好,可进行稳定、可靠的检测,为定量检测鲫体内的CyHV-II病毒提供了一种新的检测手段。

El-Matbouli(2007)建立的巢式PCR比普通PCR更灵敏。Bercovier(2005)用克隆编码CyHV-III胸苷激酶的基因(hypothetical thymidine kinase gene, TK)作为高度敏感PCR诊断的基础,能检测到30拷贝/ μg 。Gilad(2004)使用TaqMan real-time PCR评估锦鲤感染CyHV-III 1 d后多个组织都有病毒的存在,病毒DNA浓度最大的是在鳃、肾、脾,另外在黏液、肝、肠道、脑中也发现有很高浓度的病毒DNA。Kamimura(2007)研究发现猝灭探针能成功的检测CyHV-III基因组,扩增序列可以通过分析溶解曲线

评估。Eide(2011)在白细胞中通过实时定量PCR和PCR-Southern杂交检测到CyHV-III。Yuasa(2012)根据CyHV-III末端酶基因设计了特殊的mRNA反转录PCR引物,建立了一种特殊的反转录PCR(mRNA-specific RT-PCR),能检测鱼体及接种CyHV-III的细胞系中CyHV-III的复制阶段。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)因操作简单,结果可通过目视直接读取,且具有敏感性高、特异性好可以减少交叉污染的风险等优点,使得LAMP优于传统的PCR和实时PCR,适合临床感染的检测,为鲤疱疹病毒的诊断提供了一种较快速的方法。使用LAMP检测CyHV-II、CyHV-III的研究相对较多,对CyHV-I的检测研究还没有报道。Soliman(2005)等建立LAMP方法对CyHV-III进行检测,结果显示此方法比PCR更敏感。He(2013)建立LAMP来检测CyHV-II,检测灵敏度达到 1.09×10^{-4} g/L,比传统的PCR和实时PCR灵敏度更高。Soliman(2009)将免疫捕获结合LAMP(DB-LAMP/PCR),建立了一种简单、快速、灵敏的技术,适用于CyHV-III的诊断。Soliman(2010)将LAMP结合核酸横向流试纸(nucleic acid lateral flow strip)诊断CyHV-III,简化了CyHV-III的诊断和筛选,核酸侧流分析可通过目视直接读取实验结果。Cheng(2011)针对末端酶基因(EU349285.1)设计引物,首次通过LAMP在我国台湾发病的锦鲤养殖场检测到CyHV-III,检出极限为 1.09×10^{-4} g/L。

3.4 免疫

目前对CyHV-I、CyHV-II免疫相关的研究还较少,对CyHV-III的免疫相关研究较多。当鱼接种抗CyHV-III的抗体后其浓度与最新接种的抗体的浓度成正比。然而,这些具有免疫功能的鱼甚至检测不到任何抗体,这可能是由于接种高亲和性抗体后对CyHV-III的快速响应。研究发现在体外抗体能中和病毒的致病作用,这也表明在体内抗体也能中和病毒的致病作用(Perelberg et al 2008)。当鱼暴露在CyHV-III下10%~25%的鱼能产生高浓度的抗病毒抗体,这种免疫反应在数月后仍能被检测到(Hilaire et al, 2009)。CyHV-III在限制生存温度下处于一种潜伏状态持续存活,当水温恢复到适合生存的条件下恢复活力,说明血清中的抗体本身没有保护作用。Yasumoto(2006)发现CyHV-III脂质体口服疫苗能使鲤抵抗CyHV-III的感染。Rakus(2012)研究发现了大量的免疫相关基因参与抗

CyHV-III的免疫应答,同时也表明了对CyHV-III的免疫应答在很大程度上是由宿主的遗传因素控制。CyHV-III对巨噬细胞活性和淋巴细胞的增殖反应的强烈抑制性是由温度决定的(Andrzej et al, 2012)。Rakus(2009) 通过 PCR-RF-SSCP 分析发现 MH 类 IIB(Cyca-DAB1-like) 基因可以抵抗 CyHV-III,且可作为鲤养殖时抵抗 CyHV-III 潜在的遗传标记。A-verred(2011) 使用数量可变的串联重复序列作为分子标记能有效的估计 CyHV-III 的遗传多样性,适合进一步分析分子流行病学单核苷酸多态性。Kong-chum(2010) 实验发现 SNP(Single Nucleotide Polymorphisms) 标记能对一个完整的家系进行评估,并且能用于连锁分析。Dong(2011) 发现 CyHV-III (I/U) -ORF136 同系物可能是一个新的分子标记。

除了上述方法外还有 ELISA、原位杂交技术等。ELISA 方法检测 CyHV-III 的背景值高,与 CCV 和 CHV 之间具有较高的交叉免疫反应。另外,鱼类的血清抗体水平较低不易检出,因此,ELISA 的应用受到了一定的限制(刘宗晓等 2006)。

4 展望

CyHV-I、CyHV-II、CyHV-III 是近年来在鲤科鱼类中快速流行的病毒,已经造成了大范围的经济损失。CyHV-I 目前的检测方法主要是根据体表症状、病理组织学检查及光镜观察或电镜观察,虽然早在 1984 年就已分离培养成功,但已报道的大都集中在对病毒的发现、症状特征描述等方面,目前仍没有该病的流行病学研究进展及其他相关诊断技术的深入报道。对 CyHV-II 的研究也相对较少,该病的分子生物学诊断方法包括普通 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR 等方法; CyHV-II 的敏感细胞系的建立目前仍有困难,亟需建立能进行 CyHV-II 的连续传代培养的细胞系,提高细胞分离技术的敏感性和可靠性等。CyHV-III 首次发现较其他 2 种晚,但是该病毒的诊断及流行病学、病毒特征、传染途径等都已深入的研究;未来对 CyHV-III 的研究包括有效疫苗的研制,建立高效、快速、敏感的检测方法等。

参考文献

江育林,李燕,李正秋. 1991. 鲤痘疮病病原的电镜观察初报[J]. 水生生物学报,15(2): 193-195.
李霞,福田颖穗. 2003. 金鱼疱疹病毒敏感细胞的体外培养[J]. 上海水产大学学报,12(1): 12-18.
李莉娟,罗杨志,刘学芹,等. 2013. 金鱼疱疹病毒 II 型

的分子诊断[J]. 华中农业大学学报,32(1): 92-96.
林雪玲,乌日琴. 2006. 锦鲤爆发性出血病病原电镜观察和 PCR 检查研究[J]. 黑龙江畜牧兽医(5): 60-61.
刘可选,贺建民,牛保伟. 2003. 鲤痘疮病的防治方法[J]. 河南水产(3): 28.
刘宗晓,刘荭,江育林. 2006. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. 检验检疫科学(4): 77-80.
吕大成. 2011. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. 吉林农业,(17): 76-77.
田飞焱,何俊强,王璐,等. 2012. 金鱼疱疹病毒性造血器官坏死病研究进展[J]. 中国动物检疫,29(4): 78-80.
吴明传. 1997. 鲤痘疮病在我县的发现及建议[J]. 江西水产科技(3): 26-27.
战文斌. 2006. 水产动物病害学[M]. 北京: 中国农业出版社: 144-145.
Andor D, Maria B, Gyoergy C, et al. 2011. Introduction of the family alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary[J]. Magyar Al-latorvosok Lapja, 13(3): 174-181.
Andrzej K, Jacek SADOWSKI, Heike SCHÜT ZE, et al. 2009. Koi herpesvirus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones[J]. Acta ichthyologica et piscatorial, 39(2): 119-126.
Andrzej K, Siwicki, Krzysztof Kazuń, et al. 2012. Impact of cyprinid herpesvirus-3, which causes interstitial nephritis and gill necrosis, on the activity of carp (Cyprinus carpio L) macrophages and lymphocytes[J]. Archives of Polish Fisheries, 20: 123-128.
Avarre J C, Madeira J P, Santika A, et al. 2011. Investigation of Cyprinid herpesvirus-3 genetic diversity by a multi-locus variable number of tandem repeats analysis[J]. Journal of Virological Methods, 173: 320-327.
Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, et al. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis[J]. BMC Microbiology, 1471-2180.
Bergmann S M, Sadowski J, Kielbinski M, et al. 2010. Susceptibility of koi crucian carp and koi goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD) [J]. Journal of Fish Diseases (33): 267-272.
Chang P H, Lee S H, Chiang H C, et al. 1999. Epizootic of herpeslike virus infection in goldfish, Carassius auratus in Taiwan[J]. Fish Pathology, 34(4): 209-210.
Cheng L, Chen C Y, Tsai M A, et al. 2011. Koi herpesvirus epizootic in cultured carp and koi, Cyprinus carpio L, in Taiwan[J]. Journal of Fish Diseases, 34: 547-554.

- Davidovich M , Dishon A , Ilouze M , et al. 2007. Susceptibility of cyprinid cultured cells to Cyprinid herpesvirus 3 [J] . Archives of Virology , 152: 1541 – 1546.
- Dong C F , Weng X P , Li W , et al. 2011. Characterization of a new cell line from caudal fin of koi , *Cyprinus carpio* koi , and first isolation of cyprinid herpesvirus 3 in China [J] . Virus Research , (161) : 140 – 149.
- Eide K , Miller-Morgan T , Heidel J , et al. 2011. Results of total DNA easurement in Koi by tissue Koi Herpesvirus real-time PCR [J] . Journal of Virological Methods , 172 : 81 – 84.
- El-Matbouli M , Rucker U , Soliman H. 2007. Detection of Cyprinid herpesvirus-3(CyHV-III) DNA in infected fish tissues by nested polymerase chain reaction [J]. Diseases of aquatic organisms , 78: 23 – 28.
- Fournier G , Boutier M , Raj V S , et al. 2012. Feeding *Cyprinus carpio* with infectious materials mediates Cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa [J] . Veterinary Research , 43: 6.
- Gilad O , Yun S , Francisco J , et al. 2004. Concentrations 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 , 60(3) : 179 – 187.
- Goodwin A E , Khoo L , LaPatra S E , et al. 2006. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish [J]. Journal of aquat animal health , 18(1) : 11 – 18.
- Goodwin A E , Merry G E , Sadler J. 2006. 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 , 69: 137 – 143.
- Goodwin A E , Sadler J , Merry G E , et al. 2009. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-II) infection: case studies from commercial goldfish farms [J]. Journal of Fish Diseases , 32(3) : 271 – 278.
- Groff J M , LaPatra S E , Munn R J , et al. 1998. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology [J]. Journal of veterinary diagnost investigation , 10(4) : 375 – 378.
- He J Q , Shi X J , Yu L. 2013. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Cyprinid herpesvirus 2 [J] . Journal of Virological Methods , 194: 206 – 210.
- Hedrick R P , Gilad O , Yun S , et al. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi , a strain of commort carp [J]. Journal of Aquatic Animal Health , 12(1) : 44 – 57.
- Hedrick R P , Waltzek T B , McDowell T S. 2006. 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 , 18(1) : 26 – 34.
- Hilaire S S , Beevers N , Joiner C , et al. 2009. Antibody response of two populations of common carp , *Cyprinus carpio* L , exposed to koi herpesvirus [J]. Journal of Fish Diseases , 32: 311 – 320.
- Ito T , Kurita J , Ozaki A. 2013. Growth of cyprinid herpesvirus 2(CyHV-II) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus* [J] . Diseases of aquatic organisms , 105: 193 – 202.
- Jeffrey K R , Bateman K , Bayley A , et al. 2007. Isolation of a Cyprinid herpesvirus 2 from goldfish , *Carassius auratus* (L) , in the UK [J] . Journal of Fish Diseases , 30(11) : 649 – 656.
- Jun Kurita , Kei Yuasa , Takafumi , et al. 2009. Molecular epidemiology of Koi Herpesvirus [J]. Fish Pathology , 44(2) : 59 – 66.
- Jung S J , Miyazaki T. 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldsh , *Carassius auratus* (L) [J] . Journal of Fish Diseases , 18(3) : 211 – 220.
- Kamimura S , Hagi T , Kurata S , et al. 2007. Evaluation of Quenching Probe (QProbe)-PCR Assay for Quantification of the Koi Herpes Virus (KHV) [J]. Microbes Environ , 22(3) : 223 – 231.
- Kongchum P , Palti Y , Hallerman E M , et al. 2010. SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish & Shell fish Immunology , 29: 356 – 361.
- Lto T , Sano M , Kurita J , et al. 2007. Carp Larvae are not Susceptible to Koi Herpesvirus [J]. Fish Pathology , 42(2) : 107 – 109.
- Michel B , Leroy B , Stalin R V , et al. 2010. The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions [J] . Journal of General Virology , 91: 452 – 462.
- Minamoto T , Honjo M N , Yamanaka H , et al. 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton [J]. Research in Veterinary Science , 90: 530 – 532.
- Minamoto T , Honjo M N , Yamanaka H , et al. 2012. Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan [J]. Research in Veterinary Science , 93: 508 – 514.
- Perelberg A , Ilouze M , Kotler M , et al. 2008. Antibody re-

- sponse and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with Cyprinid herpes virus 3 (CyHV-III) [J]. *Vaccine*, 26: 3750 – 3756.
- Philbey A W. 2006. Herpesvirus haematopoietic necrosis in a goldfish(*Carassius auratus*) in the UK [J]. *Veterinary Research*, 158(23): 800 – 801.
- Raj V S , Fournier G , Rakus K , et al. 2011. Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells [J]. *Veterinary Research*, 42: 92.
- Rakus K L , Imazarow I , Adamek M , et al. 2012. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 37: 65 – 76.
- Rakus K L , Imazarow I , Adamek M , et al. 2012. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 37: 65 – 76.
- Rakus K L , Wiegertjes G F , Adamek M , et al. 2009. Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism [J]. *Fish & Shell fish Immunology*, 26: 737 – 743.
- Sadler J , Marecaux E , Goodwin A E. 2008. Detection of koi herpes virus (CyHV-III) in goldfish , *Carassius auratus* (L) , exposed to infected koi [J]. *Journal of Fish Diseases*, 31: 71 – 72.
- Soliman H , El-Matbouli M. 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Virology Journal*, 2: 83.
- Soliman H , El-Matbouli M. 2009. Immunocapture and direct binding loop mediated isothermal amplification simplify molecular diagnosis of Cyprinid herpesvirus-3 [J]. *Journal of Virological Methods*, 162: 91 – 95.
- Soliman H , El-Matbouli M. 2010. Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of Cyprinid herpes virus-3 [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 24: 38 – 43.
- Stephens F J , Raidal S R , Jones B. 2004. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus [J]. *Australian Veterinary Journal*, 82(3): 167 – 169.
- Sunarto A , McColl K A , et al. 2011. Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage [J]. *Journal of Fish Diseases*, (34): 87 – 101.
- Syakuri H , Adamek M , Brogde G , et al. 2013. Intestinal barrier of carp (*Cyprinus carpio* L) during a Cyprinid herpesvirus 3-infection: Molecular identification and regulation of the mRNA expression of claudin encoding genes [J]. *Fish & Shell fish Immunology*, 34: 305 – 314.
- Uchii K , Telschow A , Minamoto T , et al. 2011. Transmission dynamics of an emerging infectious disease in wildlife through host reproductive cycles [J]. *The ISME Journal*, 5: 244 – 251.
- Waltzek T B , Kelley G O , Stone D M , et al. 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-III) in the family Herpesviridae [J]. *Journal of General Virology*, 86: 1659 – 1667.
- Waltzek T B , Kurobe T , Goodwin A E , et al. 2009. Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Cyprinid Herpesvirus 2 in Goldfish [J]. *Journal of Aquat Animal Health*, 21(1): 60 – 67.
- Wang L , He J , Liang L G , et al. 2012. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-II) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China [J]. *Fish Pathology*, 32(5): 164 – 173.
- Whittington R J , Chong RS. 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 81(1/3): 92 – 116.
- Yasumoto S , Kuzuya Y , Yasuda M , et al. 2006. Oral immunization of common Carp with a Liposome Vaccine Fusing Koi Herpesvirus Antigen [J]. *Fish Pathology*, 41(4): 141 – 145.
- Yuasa K , Kurita J , Kawana M , et al. 2012. Development of mRNA-specific RT-PCR for the detection of koi herpesvirus (KHV) replication stage [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 100: 11 – 18.

(责任编辑 张俊友)