

云南锦鲤养殖场鲤浮肿病毒的鉴定及基因型分析

温智清^{1,2}, 刘莹^{1,2}, 唐绍林³, 王飞⁴, 王津津^{1,2}, 史秀杰^{1,2}, 于力^{1,2}, 郑晓
聪^{1,2}, 何俊强^{1,2}, 兰文升^{1,2}, 贾鹏^{1,2*}, 刘蕊^{1,2}

(1. 深圳出入境检验检疫局 动植物检验检疫技术中心, 深圳 518045; 2. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518001; 3. 广州利洋水产科技股份有限公司, 广州 510510; 4. 河南省水产技术推广站, 郑州 450008)

摘要: 锦鲤睡眠病 (Koi sleepy disease, KSD) 是一种由鲤浮肿病毒 (Carp edema virus, CEV) 引起鲤科鱼类死亡的病毒性传染病, 已经对世界鲤科鱼类养殖业造成危害。2016年, 中国云南某锦鲤养殖场养殖的锦鲤出现以体表出血、眼睛凹陷、沉于池底昏睡为主要临床症状的疾病, 发病水温为 11℃~20℃, 累计死亡率 30%~50%。从该养殖场不同池塘采集两个样品, 使用 nested PCR 和 real-time PCR 方法进行实验室诊断。结果表明, 两个样品 CEV 检测结果均为阳性, 发病锦鲤鳃和肾脏 CEV 病毒载量为 250.02~1332.94 拷贝/250 ng, 鳃中 CEV 病毒载量约为肾脏的 6~7 倍。在排除寄生虫、细菌、SVCV 和 KHV 感染后, 推测 CEV 可能是引起此次云南锦鲤场发生疫情的病原, 但还需回归感染实验做进一步验证。基于 CEV P4a 基因的遗传进化分析结果表明, 此次从云南发病锦鲤检出的两个 CEV 毒株均属于 IIa 基因型, 且与英国 (R083 株) 和日本 CEV 毒株 (CyPP-3) 的遗传进化关系最近。

关键词: 锦鲤睡眠病 (KSD); 鲤浮肿病毒 (CEV); 云南; 基因型

中图分类号: S941.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2017)06

目前, 淡水观赏鱼贸易约占全球观赏鱼贸易总量的 90%, 涉及 4000 余个品种。贸易繁荣的同时, 病原极易通过观赏鱼进出口贸易在不同国家间传播, 对进口国的水产养殖业造成威胁。锦鲤 *Cyprinus carpio koi* 在观赏鱼国际贸易中所占比重较大, 并且对多种病原易感, 包括锦鲤疱疹病毒 (Koi herpesvirus, KHV)^[1]、鲤春病毒血症病毒 (Spring viraemia of carp virus, SVCV)^[2]、蛙病毒 (Ranavirus)^[3] 和鲤浮肿病毒 (Carp edema virus, CEV)^[4]。CEV 是一种大小为 200 nm、有囊膜的 DNA 病毒, 属于痘病毒科 (Poxviridae)^[5]。根据宿主规格和临床症状, 成年锦鲤感染 CEV 后, 昏睡是其特征性临床症状, 常称之为锦鲤睡眠病 (Koi sleepy disease, KSD)。而锦鲤稚鱼感染 CEV 后, 多数出现漫游和身体浮肿, 常称之为鲤浮肿病 (Viral edema of carp, VEC)^[6]。

1974年, KSD 首次报道于日本新潟县, 引起当地鲤 *Cyprinus carpio* 稚鱼大量死亡, 随后该病传播至日本其它地区的锦鲤养殖场, 但仅作为一种地方流行性疾病在日本地区传播^[7]。最近, 德国、法国、英国、荷兰、捷克、奥地利、土耳其等欧洲国家^[8]以及印度^[9]相继暴发 KSD 疫情, 对当地养殖^[8]和野生^[10]的鲤科鱼类造成威胁。2014年, 中国首次报道疑似 KSD 疫情, 现已在中国北京^[11]和杭州^[12]的锦鲤养殖场确诊该病, 引起中国农业部病害防控部门的关注。本研究报道中国云南某锦鲤养殖场发生疑似 KSD 疫情, 通过对此次疫情的病原进行鉴定和分析, 为 CEV 的检测和防控提供参考。

材料与方 法

1 样品及制备

从云南某锦鲤养殖场 2 个池塘分别采集 5~10 尾发病锦鲤, 样品编号为 20170228 和 20170229。2016 年 12 月底, 该养殖场锦鲤出现死亡, 病程持续约 3 个月, 日均死亡 5~10 尾/池, 发病锦鲤重约 200~500 g。临床症状主要表现为病鱼聚集于池底部侧睡、体表出血、鳃丝轻微溃烂、眼睛凹陷 (图 1)。现场采集内脏组织接种于细菌培养板, 送实验室检测。采集病鱼的鳃和肾, 剪碎后固定于 95% 乙醇, 送实验室检测。

收稿日期: 2017-06-08; 修回日期: 2017-07-19

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目 (项目号: 2015IK243), 题目: SVC 标准应用过程中的异常情况及其原因分析研究; 深圳市国际研究合作项目 (项目号: GJHZ20150316155421411), 题目: 鱼类传染病造血管坏死病原分子进化和 DNA 疫苗的研究

作者简介: 温智清 (1985-), 男, 动物医学学士, 兽医师, 从事水生动物检疫工作。Tel: 0755-25592980, E-mail: spring2000_selina@163.com

* **通讯作者:** 贾鹏 (1983-), 男, 博士, 预防兽医学, 兽医师, 从事水生动物检疫工作。Tel: 0755-82542627, E-mail: ajaack2012@hotmail.com



图1 发病锦鲤临床症状

注:箭头方向所指为主要临床症状.A:鳃丝溃烂;B:体表出血;C:眼睛凹陷

Figure 1 Clinical signs of sick Koi

Notes: Arrows show the significant clinical signs of KSD. A: gill ulceration; B: hemorrhage of the surface; C: enophthalmia

2 引物及探针

本研究使用两种 nested PCR 和两种 real-time PCR 分别对样品进行检测。所用引物和探针序列见

表 1 和表 2, 引物和探针由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 nested PCR 引物
Table 1 Primers used in nested PCR

Primer	Sequence	Products size	Amplified gene	Reference
CEV_F1	5'-GCTGTTGCAACCATTTGAGA-3'	548 bp	unknown	[13]
CEV_R1	5'-TGCAGGTTGCTCCTAATCCT-3'			
CEV_F2	5'-GCTGCT-GCACTTTTAGGAGG-3'	180 bp	Partial 4a gene, P4a	[6]
CEV_R2	5'-TGCAAGT-TATTCGATGCCA-3'			
CEV for B	5'-ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG-3'	528 bp	Partial 4a gene, P4a	[6]
CEV rev J	5'-CTCTTCACTATTGTGACTTTG-3'			
CEV ForB-int	5'-GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG-3'	478 bp	Partial 4a gene, P4a	[6]
CEV RevJ-int	5'-TAGCAAAGTACTACCTCATCC-3'			

3 阳性对照和标准质粒

根据不同检测方法扩增的靶序列, 构建含有 CEV 靶序列的重组质粒作为 PCR 检测过程的阳性对照。以英国

CEFAS Weymouth 实验室建立的 real-time PCR^[6]为基础, 由生工生物工程(上海)有限公司合成 CEV P4a 基因序列并克隆至 pUC57 载体上, 构建成标准质粒 pCEV-CEFAS。

表2 real-time PCR引物和探针

Table 2 Primers and probes used in real-time PCR

Primer	Sequence	Amplified gene	Reference
CEV_qF1	5'-TTTAGGAGGACAAGTAAAGTTACCA-3'	Partial 4a gene, P4a	[14]
CEV_qR1	5'-GCAAGTTATTT GATGCCAACCC-3'		
CEV_probe1	5'-FAM-CCAGCTCCTACAAGGAAAGCAATGA-BHQ-3'		
CEV_qFor1	5'-AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTC-3'	Partial 4a gene, P4a	[6]
CEV_qRev1	5'-GATTCTCAAGGAGTTDCAGTAAA-3'		
CEV_qProbe1	5'-FAM-AGAGTTTGTTTCTTGCCATACAAACT-BHQ-3'		

标准质粒浓度约为 1.20×10^{10} 拷贝/ μL , 并对其进行10倍系列稀释, 用于real-time PCR标准曲线的建立。

4 核酸提取

取组织30 mg研磨成糊状, 加200 μL ATL和20 μL 蛋白酶K裂解组织, 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。使用Dneasy Blood Tissue kit (QIAGEN, 德国) 抽提DNA, 并溶于终体积200 μL , 具体步骤见试剂盒说明书。从DNA提取步骤开始, 每个检测步骤均需设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

5 CEV nested PCR

使用PremixTaq EXTaq™ Version 2.0 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 配制两种nested PCR方法的反应体系。第一步PCR反应体系: Premix PCR Extaq 12.5 μL , 上下游引物(20 μM) 各0.5 μL , DNA模板6 μL (依抽提核酸浓度可适当调整模板量), 加DNase Free ddH₂O至终体积25 μL 。第二步PCR反应体系: 使用第一步PCR产物2.5 μL 作为模板, 其余同第一步PCR反应体系。每个样品做两个重复管。将反应体系置于T3000 PCR仪 (BioRad, 美国) 进行扩增。

Oyamatsu 等^[13]所建立方法的两步PCR反应条件相同, 如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。CEFAS Weymouth 实验室^[6]所建立方法的两步PCR反应条件相同, 如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共34个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

6 CEV real-time PCR

使用Premix ExTaq™ (Probe qPCR) 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 进行real-time PCR反应。参考试剂盒推荐的PCR反应条件, 对两种real-time PCR方法原反应体系和条件^[6,14]略作调整。两种real-time PCR方法反应体系, 如下: Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 \times) 12.5 μL , 上下游引物(20 μM) 各0.5 μL , 探针(10 μM) 0.5 μL , ROX Reference II 0.25 μL , DNA模板2.5 μL (依抽提核酸浓度可适当调整模板量), 加DNase Free

ddH₂O至终体积25 μL 。每个样品做两个重复管。将反应体系置于ABI 7500 实时荧光PCR仪 (ABI, 美国) 进行扩增。调整后两种real-time PCR方法反应条件相同, 均为95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共40个循环。

7 发病锦鲤鳃和肾脏CEV载量分析

用 1.20×10^1 ~ 1.20×10^8 拷贝/ μL 稀释度标准质粒制备标准曲线。使用CEFAS Weymouth 实验室建立的real-time PCR方法^[6]定量检测鳃和肾脏中CEV载量, 每个样品做3个重复孔, 操作同材料与方法6。

8 KHV和SVC检测

根据OIE《水生动物疾病诊断手册》^[15] (OIE, 2016) 的规定, 进行KHV和SVC检测。

9 寄生虫和细菌检测

通过显微镜观察体表、鳃和其他内脏组织中是否有寄生虫。用75%酒精对鱼体消毒后, 无菌解剖病鱼, 取内脏直接接种于BHIA、TSA和哥伦比亚血平板, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养2 d。若平板有菌落生长, 对其纯化后进行鉴定。

10 电泳和测序分析

使用QIAxcel全自动凝胶电泳仪 (QIAGEN, 德国) 对nested PCR产物进行电泳分析。nested PCR扩增产物送北京六合华大基因检测有限公司进行测序。使用DNASTAR生物学软件megalign方法进行序列同源性分析, 使用MEGA 5.05生物学软件neighbor Joining方法进行遗传进化分析。

结 果

1 CEV nested PCR检测结果

分别使用两种nested PCR方法检测20170228和20170229样品。结果表明, Oyamatsu 等^[13]建立的nested PCR方法未能从两个样品中检出CEV, PCR结果为阴性。相比之下, CEFAS Weymouth 实验室建立

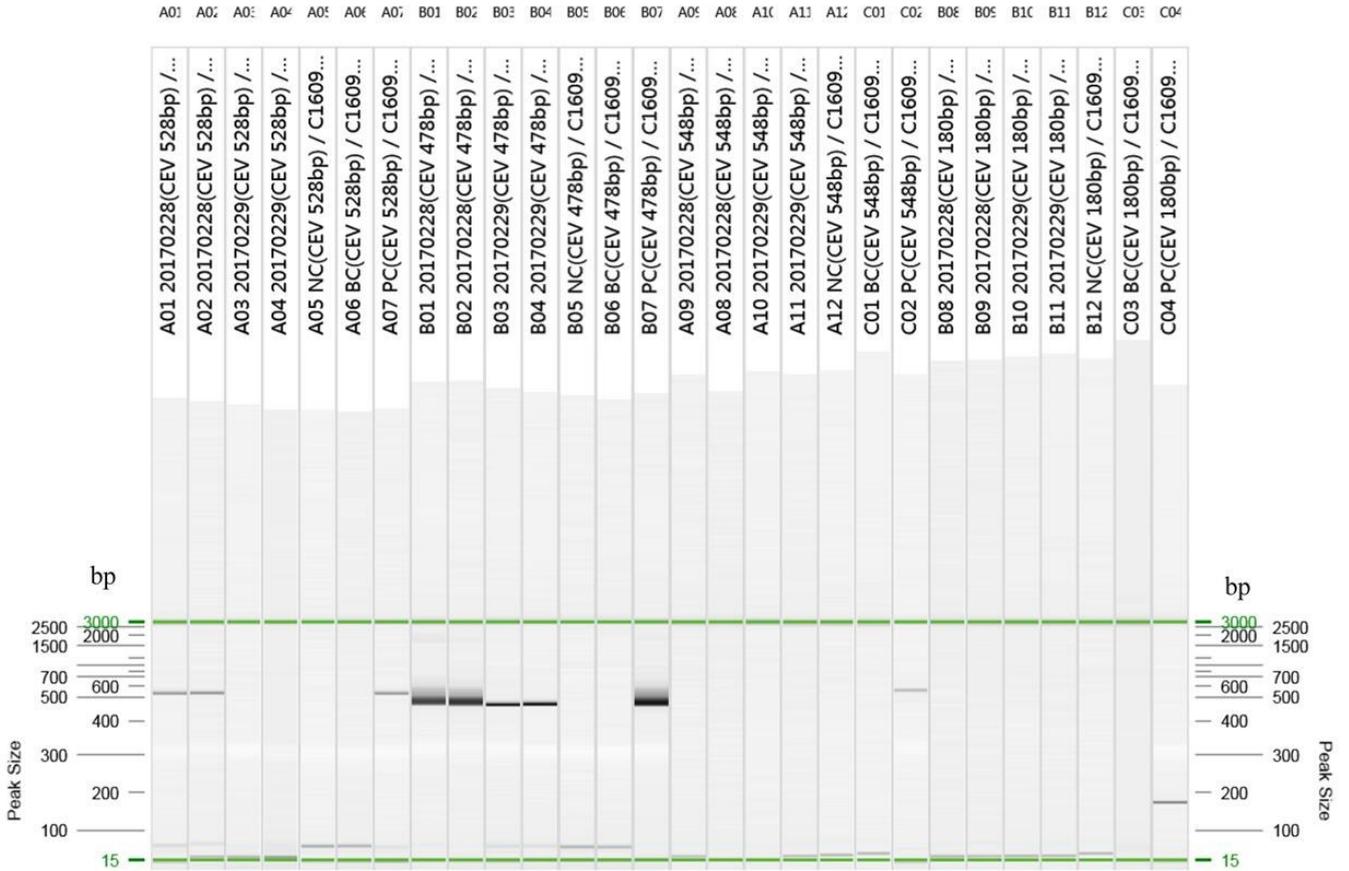


图2 两种nested PCR方法检测样品(20170228和20170229)电泳图

注: A07 PC和B07 PC: CEFAS Weymouth Lab’s nested PCR方法阳性对照; C02 PC和C04 PC: Oyamatsu’s nested PCR方法阳性对照; NC: 阴性对照; BC: 空白对照

Figure 2 Electrophoresis result of samples 20170228 and 20170229, detected by nested PCR of Oyamatsu and CEFAS Weymouth Laboratory.

Notes: A07 PC and B07 PC: Nested PCR positive control of CEFAS Weymouth laboratory; C02 PC and C04 PC: Nested PCR positive control of Oyamatsu laboratory; NC: Negative control; BC: Blank control

的 nested PCR 方法^[6]第一步 PCR 反应仅从 20170228 样品扩增出大小为 528 bp 的特异性条带, 第二步 PCR 从两个样品均扩增出 478 bp 的特异性条带(图 2), 空白对照、阴性对照和阳性对照成立。结果表明 20170228 和 20170229 样品 CEV nested PCR 检测结果为阳性。

2 CEV real-time PCR 检测结果

使用两种 real-time PCR 方法对 20170228 和 20170229 样品进行 CEV 鉴定。结果表明, 两种 real-time PCR 方法均能从两个样品中检出 CEV。Adamek 等^[14]建立的 real-time PCR 方法检测 20170228 和 20170229 样品的平均 Ct 值分别为 33.12 (32.22 和 34.01) 和 33.63 (33.54 和 33.71); CEFAS Weymouth 实验室建立的 real-time PCR 方法^[6]检测 20170228 和 20170229 样品的平均 Ct 值分别为 32.93 (32.65 和

33.20) 和 33.78 (33.36 和 34.20), 空白对照、阴性对照和阳性对照成立(图 3)。

3 发病锦鲤鳃和肾脏 CEV 载量分析结果

使用 $1.20 \times 10^1 \sim 1.20 \times 10^8$ 拷贝/ μL 稀释度标准质粒, 建立 CEFAS Weymouth 实验室 real-time PCR 方法^[6]的标准曲线, 结果为 $y = 3.35x + 36.90$ ($R^2 = 0.982$)。

样品 20170228 鳃和肾脏 CEV 载量分别为 1332.94 拷贝/250 ng 和 250.02 拷贝/250 ng; 样品 20170229 鳃和肾脏 CEV 载量分别为 931.90 拷贝/250 ng 和 132.61 拷贝/250 ng(表 3)。

4 KHV 和 SVC 检测结果

使用 OIE《水生动物疾病诊断手册》(2016 版)对 20170228 和 20170229 样品进行 KHV 和 SVC 检测。结果表明, 两个样品 KHV 和 SVC 的检测结果均为阴性(结果未出示)。

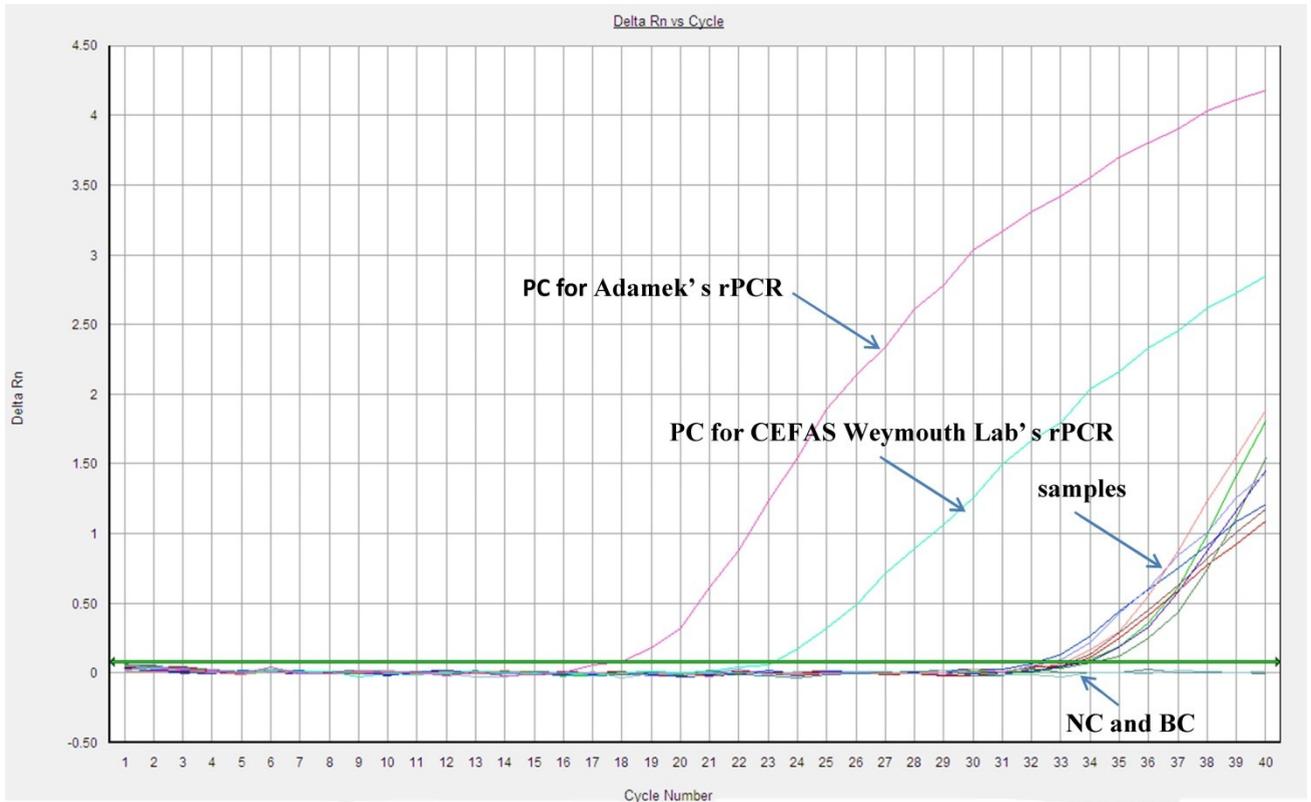


图3 两种 real-time PCR 检测样品(20170228和20170229)扩增曲线

注:NC:阴性对照;BC:空白对照;PC:阳性对照

Figure 3 Amplification curve of samples 20170228 and 20170229 using real-time PCR

Notes:NC: Negative control; BC: Black control; PC: Positive control

表3 发病锦鲤鳃和肾脏CEV载量

Table 3 CEV load was quantified by real-time PCR in gills and kidneys

Sample	Tissue	Cq values	Detected targets (in 1 μ l rxn) ^a	Normalized detected targets (copies/ng) ^b	Normalized detected targets (copies/250 ng)	mean detected targets (copies/250 ng)
20170228	Gill	30.15	103.50	6.90	1724.94	1332.94
		31.54	39.81	2.65	663.51	
		30.25	96.62	6.44	1610.36	
	Kidney	33.15	13.16	0.88	219.41	250.02
		32.81	16.63	1.11	277.17	
20170229	Gill	32.94	15.21	1.01	253.48	931.90
		31.25	48.59	3.24	809.87	
		30.89	62.23	4.15	1037.24	
	Kidney	31.02	56.91	3.79	948.58	132.61
		33.22	12.55	0.84	209.10	
		34.20	6.40	0.43	106.62	
		34.58	4.93	0.33	82.11	

注:^a PCR体系CEV DNA浓度(copies/ μ L)= $10^{[(36.90-Cq)/3.35]}$; ^b 病毒载量计算公式:copies/ng={[(PCR体系病毒浓度copies/ μ l \times PCR反应终体积25 μ l)/PCR体系加入的模板量2.5 μ l] \times 抽提DNA终体积200 μ l]/抽提核酸用组织量30 mg/1000}。

Notes: ^a The concentration (copies/ μ l) of CEV DNA in PCR reaction= $10^{[(36.90-Cq)/3.35]}$; ^b The number of CEV: copies/ng={[(CEV titer in PCR reaction copies/ μ l \times PCR volume 25 μ l)/the volume of DNA sample 2.5 μ l] \times the final volume of DNA extracted from tissues 200 μ l]/the weight of tissues for DNA extraction 30 mg/1000}.

5 寄生虫和细菌检测结果

25℃培养 2 d 后, BHIA 和哥伦比亚血平板均有菌落生长, 纯化后经生化反应鉴定为维罗纳气单胞菌温和生物变种 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*。显微镜下未见寄生虫。

6 序列分析

对 nested PCR 扩增产物 (P4a 基因) 进行测序并分析, 结果表明 20170228 和 20170229 与英国 (R083 株) 和日本 CEV 毒株 (CyPP-3) 的同源性最高, 分别

为 99.0% 和 98.3%。20170228 和 20170229 株间 P4a 基因序列同源性为 98.8%。基于 P4a 基因序列, 将 20170228 和 20170229 序列和全球 31 个 CEV 序列进行比较分析, 结果表明现有 CEV 毒株分为 I 和 II 两个基因型。其中, 基因型 II 可分为 IIa 和 IIb 亚基因型。本研究报道的 20170228 和 20170229 云南株属于 IIa 基因型, 且与英国株 (R083) 和日本株 (CyPP-3) 的遗传进化关系最近 (图 4)。

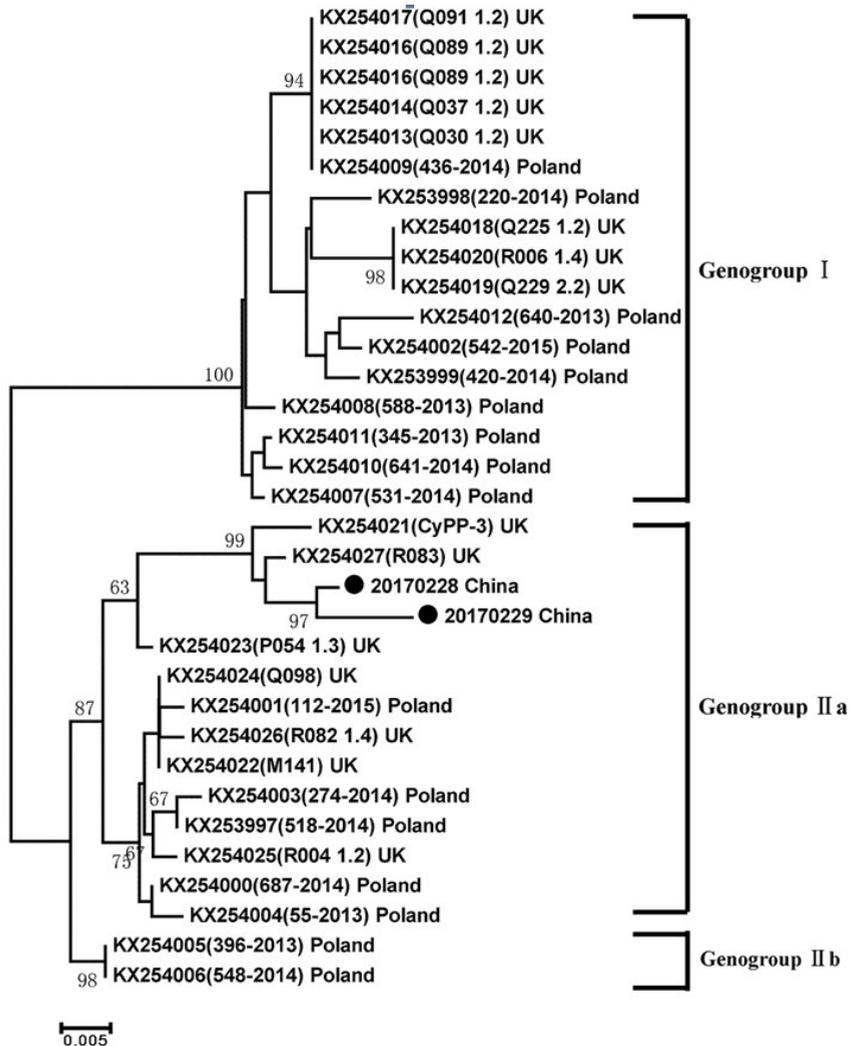


图 4 20170228 和 20170229 的遗传进化树

注: ●: CEV 云南株

Figure 4 The phylogenetic tree for CEV 20170228 and 20170229 isolates

Notes: ●: CEV Yunnan isolates in our study

讨论

KSD 作为一种对鲤科鱼类危害严重的疾病, 正在全球蔓延。目前, 中国的鲤科鱼类产业也受到该

病的威胁。2014 年, 中国北京房山区某锦鲤养殖场首次发生疑似 KSD 疫情, 死亡率约 80%^[11]。随后, 在中国杭州^[12]和北京顺义区^[11]锦鲤养殖场均确诊 KSD。此次云南出现疑似 KSD 疫情, 在分析发病锦鲤鳃和肾脏中病毒载量, 发现鳃和肾脏 CEV 病毒载量为

250.02~1332.94 拷贝/250 ng, 鳃中 CEV 载量约为肾脏的 6~7 倍。该结果与国外的研究相符, Adamek 等^[14]报道发病锦鲤组织中 CEV 载量为 1~2,046,000 拷贝/250 ng, 平均载量为 129,982 拷贝/250 ng。因此, 本研究在排除致病性细菌、寄生虫、SVCV 和 KHV 感染的前提下, 基于临床症状、流行病学、PCR 检测和病毒载量测定结果, 推断 CEV 可能是引起此次云南锦鲤发病的病原, 但是还需要通过回归感染实验做进一步验证。

临床症状难以区分 KSD 和 KHVD, 实验室诊断是必要判定依据。KHV 和 CEV 感染鲤科鱼类后, 部分临床症状相似, 均会出现体表出血、体表粘液增多和溃疡、眼睛凹陷、鳃溃烂和贫血等症状, 且两种疾病发病水温略有重叠。第一、昏睡是 KSD 的特征性临床症状。此次云南锦鲤发病, 病程约 2 个月, 每天死亡 5~10 尾, 累计死亡率 30%~50%。疫情涉及 2 个池塘, 均为土池, 发病时池塘溶氧、酸碱度和氨氮等水质指标正常。但发病特点略有不同, 1 号池塘养殖水面约 8 亩, 水深 1.3 米, 锦鲤大小为 0.8~2 kg, 养殖总量约 3 吨。发病后, 病鱼聚集于池塘边, 基本不进食。2 号池塘养殖水面 2 亩, 锦鲤大小为 0.2~0.5 kg, 养殖总量约为 1000kg, 锦鲤发病后进食正常, 但鱼体消瘦, 大部分锦鲤沉在池底昏睡, 不久出现死亡, 尤其是拉网捕捞会导致病鱼死亡加重。第二、KHVD 的发病温度约为 20℃~30℃, 而 KSD 发病水温范围较广, 7℃~27℃ 均有发病。日本报道其发病水温为 15℃~25℃^[14], 中国北京报道为 27℃^[16], 英国报道一列野生鲤 KSD 发病水温为 6℃~9℃^[10], 欧洲锦鲤和鲤发病水温为 7℃~15℃^[8]。此次报道的 KSD 疫情发生于云南冬季, 发病水温 11℃~20℃, 当水温升高时死亡有所缓解。在分析流行病学信息后, 首先怀疑此次云南锦鲤养殖场疫情为 KSD, 但也不能排除 SVC 和 KHV 感染的可能性。因此, 发病水温难以作为 KSD 和 KHVD 鉴别诊断的依据, 最终判定需要依据实验室检测结果。

普通 PCR 和 real-time PCR 为目前实验室诊断 KSD 的主要方法。本研究使用两种 real-time PCR 方法对云南发病锦鲤进行 CEV 检测, 两种方法检测结果均为 CEV 阳性。为了进一步对结果进行确诊, 使用两种 nested PCR 方法对样品做进一步鉴定。1974 年, Oyamatsu 等^[13]首次报道日本发生 KSD 疫情, 并且建立了检测该病的 nested PCR 方法。2016 年之前, 该方法在检测 KSD 过程中发挥重要作用, 徐立蒲^[11]

和 Zhang 等^[12]使用 Oyamatsu 等^[13]建立的方法, 分别从北京和杭州发病锦鲤中鉴定出 CEV。然而, 本研究在使用该方法对云南锦鲤样品进行检测过程中, 两步 PCR 检测结果均为阴性。在调整 PCR 退火温度后, 仍未能扩增出目的片段。随后, 本研究使用 CEFAS Weymouth 实验室建立的 nested PCR 方法^[6], 成功从样品中鉴定出 CEV。因此, 建议使用 CEFAS Weymouth 实验室建立的 nested PCR 方法^[6]进行 CEV 检测。相似的, 已有文献报道 Oyamatsu 等^[13]建立的 nested PCR 方法在从普通鲤中检测 CEV 时存在漏检现象^[8,14], 推测不同 CEV 毒株基因组出现碱基缺失或突变可能是导致 Oyamatsu 等建立方法出现漏检的原因之一。

CEV 阳性样品基因序列的分析, 有助于对诊断结果最终确认以及病原基因型分析。本研究检出的 2 株 CEV 与其它 CEV 毒株的同源性高于 91.3%。与英国 (R083 株) 和日本 CEV 毒株 (CyPP-3) 的同源性最高, 分别为 99.0% 和 98.3%, 遗传进化关系也最近, 推断中国在从日本或英国引进鱼类导致 CEV 传入, 这应该引起出入境检验检疫机构重视。目前, 基于 CEV P4a 基因的遗传进化分析表明, 可将 CEV 分为 I 和 II 基因型。其中, CEV II 基因型可分为 IIa 和 IIb 两个基因亚型。2015 年, 从杭州检出的 CEV 也属于 IIa 基因型^[12], 且本次从云南检出的 CEV 也属于 IIa 基因型。研究表明 CEV 基因型和宿主种类有明显关系, I 和 IIb 基因型仅分离于鲤 (common carp), IIa 基因型 CEV 主要分离于鲤和锦鲤^[6]。由于目前中国报道的 CEV 均检出于锦鲤, 且属于 IIa 基因型。因此, 在进行 CEV 防控过程中, 要防止 IIa 基因型 CEV 由锦鲤养殖业传入食用鲤养殖体系。

目前, 对 KSD 没有有效的治疗措施, 以预防为主。第一、在引进苗种时, 要进行隔离检疫。第二、保持良好的养殖环境, 及时清理死鱼。第三、对水源进行严格管理, 养殖废水要进行无害化处理。第四、提高养殖场管理水平, 避免外来水生动物或其他污染物进入养殖场。第五、定期对养殖场进行疫病监测。第六、当发生 KSD 后, 使用 0.5% (质量体积比) 盐水浸泡病鱼^[5]或升高水升温至 25℃ 以上, 可缓解死亡。

参考文献:

- [1] Dong C, Li X, Weng S, Xie S, He J. Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China[J]. Vet Mi-

- crobiol, 2013, 162(1): 239–244.
- [2] Emmenegger E J, Sanders G E, Conway C M, Binkowski F P, Winton J R, Kurath G. Experimental infection of six North American fish species with the North Carolina strain of spring Viremia of Carp Virus[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 273–282.
- [3] George M R, John K R, Mansoor M M, Saravanakumar R, Sundar P, Pradeep V. Isolation and characterization of a ranavirus from koi, *Cyprinus carpio* L., experiencing mass mortalities in India[J]. *J Fish Dis*, 2016, 38(4): 389–403.
- [4] Oyamatsu T, Hata N, Yamada K, Sano T, Fukuda H. An etiological study on mass mortality of cultured colour carp juveniles showing edema[J]. *Fish Pathol*, 1997, 32: 81–88.
- [5] Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio* koi in Japan[J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 65(3): 197–207.
- [6] Matras M, Borzym E, Stone D, Way K, Stachnik M, Maj-Paluch J, Reichert M. Carp edema virus in Polish aquaculture—evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.)[J]. *J Fish Dis*, 2016, 40(3): 319–325.
- [7] Shin-Ichi Ono, Sugai N A. A Histopathological study on Juvenile colorcarp, *cyprinus carpio*, showing edema[J]. *Fish Pathol*, 1986, 21(3): 167–175.
- [8] Lewisch E, Gorgoglione B, Way K, El-Matbouli M. Carp edema virus/Koi sleepy disease: an emerging disease in Central–East Europe[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2014, 62(1): 6–12.
- [9] Swaminathan T R, Kumar R, Dharmaratnam A, Basheer V S, Sood N, Pradhan P K, Jena J K. Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, *Cyprinus carpio* koi, in India[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(12): 3392–3399.
- [10] Way K, Stone D. Emergence of Carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK[J]. *CEFAS Finfish News*, 2013, 15: 32–34.
- [11] 徐立蒲, 王静波, 张文, 潘勇, 曹欢, 王姝, 王小亮, 王澎, 那立海, 江育林. 鲤鱼浮肿病流行情况的初步研究[J]. *检验检疫学刊*, 2016, 26(5): 14–16.
- [12] Zhang X, Ni Y, Ye J, Xu H, Hou Y, Luo W, Shen W. Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China[J]. *Aquac Res*, 2017, 474(1): 34–39.
- [13] Oyamatsu T, Matoyama H, Yamamoto K, Fukuda H. A trial for detection of carp edema virus by using polymerase chain reaction[J]. *Aqua Sci*, 1997, 45: 247–251.
- [14] Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J, Teitge F, Bergmann S M, Runge M, Steinhagen D. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD)[J]. *Dis Aquat Organ*, 2016, 119(3): 245–251.
- [15] OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animal[M]. The World Organisation for Animal Health, 2016: 321–323.
- [16] 徐立蒲, 王小亮, 张文, 潘勇, 景宏丽, 王静波, 王姝, 曹欢, 王澎, 那立海, 江育林. 养殖锦鲤鲤鱼浮肿病的检测与鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(2): 613–618.

Identification and Genogroup Analyses of the Carp Edema Virus in Cultured Ornamental Koi Carp, *Cyprinus Carpio Koi*, in Yunnan, China

WEN Zhiqing^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, TANG Shaolin³, WANG Fei⁴, WANG Jinjin^{1,2}, SHI Xiujie^{1,2}, YU Li^{1,2}, ZHENG Xiaocong^{1,2}, HE Junqiang^{1,2}, LAN Wensheng^{1,2}, JIA Peng^{1,2*}, LIU Hong^{1,2}

(1.Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China; 2.Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine Sciences, Shenzhen 518045, China; 4.Henan Fishery Technical Extension Centre, Zhenzhou 450008, China)

Abstract: Outbreaks of koi sleepy disease caused by the carp edema virus (CEV) has seriously affected populations of farmed common carp and koi in many countries. A disease outbreak was reported in adult koi, *Cyprinus carpio koi*, from an ornamental fish farm in Yunan Province, China, during December 2016. The clinical signs of lethargy, skin hemorrhage, enophthalmos and gill necrosis were observed in that outbreak. The water temperature was 15°C~22°C and the cumulative mortality was 30%~50%. The CEV was identified by nested polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. The CEV load in the gills and kidneys was 250.02~1,332.94 copies/250 ng, and the CEV load of gills was 6~7 times more than that in the kidney. Hence, we conjectured that CEV have induced the outbreak of disease based on the results of parasite, bacteria, SVCV and KHV diagnosis. Based on the P4a gene, phylogenetic analysis suggested that the CEV isolated from Yunnan Province belonged to II genogroup, and showed the closest relationship with CEV isolated from United Kingdom and Japan.

Key words: Koi sleepy disease(KSD); Carp edema virus(CEV); Yunan; Genogroup

Funding: The present work was supported by Scientific and Technical Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (No. 2015IK243) and Shenzhen Scientific Research Project (GJHZ20150316155421411).

* Corresponding author; JIA Peng, E-mail: ajack2012@hotmail.com