

江苏地区鲫鱼造血器官坏死病风险分析

袁锐, 刘训猛, 陈静, 吴亚锋, 王晶晶, 倪金梯, 方苹* (江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏南京 210036)

摘要 [目的]了解江苏省鲫鱼造血器官坏死病的流行情况。[方法]应用 PCR 方法对 2015—2017 年的养殖鲫鱼成鱼和苗种进行病原鲤疱疹病毒 2 型(CyHV-2)检测, 并进行风险评估。[结果]共检测样品 265 例, 检出阳性样品 32 例, 阳性率为 12.83%, 其中阳性率最高的年份阳性率高达 25.00%。安徽省主要养殖鲫鱼区域均具有较高感染风险, 无论成鱼还是苗种均可感染 CyHV-2, 而病原的遗传同源性高度统一, 提示江苏地区 CyHV-2 未发生明显变异。[结论]该研究可为江苏地区鲫鱼造血器官坏死病风险分析提供基本数据, 并为该病的防控措施提供参考。

关键词 江苏省; 鲫鱼造血器官坏死病; 鲤疱疹病毒 2 型; 遗传同源性; 风险分析

中图分类号 S941 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)08-0104-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Risk Analysis of Haematopoietic Necrosis in *Carassius auratus* in Jiangsu

YUAN Rui, LIU Xun-meng, CHEN Jing et al (Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Nanjing, Jiangsu 210036)

Abstract [Objective] To investigate the prevalence of haematopoietic necrosis of *Carassius auratus* in Jiangsu Province. [Method] PCR method was used to detect CyHV-2 in adult and seedlings of cultured *Carassius auratus* from 2015 to 2017. And the risk assessment was made. [Result] 265 samples were detected, among which 32 positive samples of CyHV-2 were detected. CyHV-2 positive rate was 12.83%, and the positive rate was 25.00% in the year with the highest positive rate. *C. auratus* from main breeding areas of Jiangsu Province had greater risk of infection, both adults and seedlings could be infected with CyHV-2. The genetic homology of the pathogen was highly uniform, suggesting that there was no significant variation of CyHV-2 in Jiangsu Province. [Conclusion] The research could provide basic data for risk analysis of haematopoietic necrosis of *C. auratus* in Jiangsu Province, and provide references for the prevention and control measures of this disease.

Key words Jiangsu Province; Haematopoietic necrosis of *Carassius auratus*; CyHV-2; Genetic homology; Risk analysis

鲫鱼造血器官坏死病是一种由鲤疱疹病毒 2 型(CyHV-2)引起的急性、出血性并伴有高度传染的流行病, 致死率极高^[1-2], 近年来在我国内地鲫鱼主养区大规模暴发流行, 尤其是江苏地区, 发病区域的死亡率在 50% 以上, 严重地区达 90%, 造成严重的经济损失。该病的主要临床症状为鳃出血并伴有体表和鳍基部出血^[3], 发病急、死亡率高, 常于春末或初秋两季暴发, 造成养殖鲫鱼的大量死亡, 目前已蔓延至全球多个国家和地区, 遍布亚洲、北美洲、欧洲、大洋洲等^[1,3-7]。

CyHV-2 自 2012 年在我国江苏北部鲫鱼主养区被发现后一直呈现蔓延趋势, 目前江苏、北京、武汉、广州等地区养殖异育银鲫体内均已检出该病毒^[8-9]。除养殖鲫鱼外, 我国野生鲫鱼调查结果显示湖北洪湖、安徽巢湖等地的野生鲫鱼也不同程度携带鲤疱疹病毒 2 型^[10], 说明该病毒在我国已经广泛存在。目前, 尚缺乏有效控制该病毒的药物和方法, 疫苗的研制被认为是防控该病的最有效方法之一。江苏地区作为我国鲫鱼的重要养殖区域, 对该病进行跟踪监测, 掌握其流行规律, 并对存在的主要风险点进行分析, 对于疾病的防控具有重要的意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器。病毒 DNA 提取试剂盒, 为生工生物工程(上海)股份有限公司产品; DL 2000 DNA Marker, 为宝生

物工程(大连)有限公司产品; Premix Taq™, 为宝生物工程(大连)有限公司产品; DEPC 水, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 高速冷冻离心机 5417R, 为 Eppendor 公司产品; 普通 PCR 仪, 为 Bio-Rad 公司产品; 凝胶成像仪与电泳仪均为 Bio-Rad 公司产品。

1.1.2 引物。参照文献[11]中引物序列, 分别合成针对鲤疱疹病毒 2 型聚合酶基因的 1 对特异性引物: Polymerase-F 引物序列为 5'-CCCAGCAACATGTGCGACGG-3'; Polymerase-R 引物序列为 5'-CCGTARTGAGAGTTGGCCGA-3', 扩增长度均为 362 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司产品合成。

1.2 方法

1.2.1 样品采集与处理。2015—2017 年, 在江苏各地鲫鱼养殖区域共采集 265 份鲫鱼样品, 取样品的鳃、肾脏、肝脏、脾脏组织保存于液氮中, 带回实验室。若不能立即进行鲤疱疹病毒 2 型检测, 则需要转移到 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.2 DNA 提取。参照生工生物工程(上海)股份有限公司的病毒核酸提取试剂盒说明书, 提取病毒基因组 DNA。取鱼鳃组织或肝脏、脾脏、肾脏等组织 100 mg, 放入 1.5 mL 离心管中, 用一次性研磨棒充分研磨后加入 300 μL 裂解液和 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 充分混匀, 56 °C 温浴 2 h, 直到组织消化完全(如果未消化完全, 需要再加入蛋白酶 K 继续消化); 加入 200 μL BD 缓冲液, 混匀, 70 °C 温浴 10 min; 加入 300 μL 无水乙醇, 摇动充分混匀; 将以上混合的样品液加入小柱的小管中, 室温静置 2 min, 12 000 r/min 离心 3 min 后, 去离心液; 加入 500 μL PW 溶液, 10 000 r/min 离心 1 min, 去离心液; 加入 500 μL 洗脱液, 10 000 r/min 离心 1 min, 去离心液;

基金项目 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX[17]2027); 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2016322)。

作者简介 袁锐(1986—), 男, 江苏南京人, 工程师, 硕士, 从事水生动物病害研究。* 通信作者, 研究员, 硕士, 从事水生动物病害研究。

收稿日期 2018-09-04

10 000 r/min 离心 2 min, 尽量消除残余乙醇; 将小柱加入新的 1.5 mL 离心管中, 加入 30 μ L 洗脱缓冲液到小柱中央, 60 $^{\circ}$ C 温浴 5 min, 10 000 r/min 离心 1 min 后得到的液体即包含病毒核酸, 置于 -80 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.2.3 PCR 扩增与检测。以提取的病毒 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L) 如下: Premix TaqTM 25 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (浓度为 10 μ mol/L), DNA 模板为 2.5 μ L, 加 ddH₂O 20.5 μ L; PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并使用凝胶成像扫描仪进行记录。

将阳性扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶回收后, 与 pMD18-T 载体连接过夜, 连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 涂布含 Amp 的 LB 平板, 挑去白色菌落, 并进行菌落 PCR 鉴定, 挑选阳性克隆委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.4 阳性序列同源性比较。使用 MEGA7 软件进行阳性序

列同源性比较和分析。

1.2.5 风险评估。根据 2015—2017 年监测结果以及流行病学调查结果, 分析鲫鱼不同养殖阶段、不同养殖模式、不同养殖区域的鲫鱼造血器官坏死病流行风险; 根据阳性病原的同源性分析结果, 分析毒株的变异风险。

2 结果与分析

2.1 监测结果

2.1.1 2015 年监测结果。2015 年在江苏省内共采集鲫鱼样品 70 个, 样品主要分布如下: 盐城市 24 个、扬州市 11 个、淮安市 10 个、泰州市 8 个、南京市 5 个、常州市 4 个、镇江市 4 个、徐州市 4 个。阳性样品检出的电泳结果如图 1 所示, 共检出 CyHV-2 阳性样品 9 个, 阳性率为 12.86%, 其中江宁阳性样品 2 个, 宝应、句容、东台、高港、兴化、高邮、大丰各 1 个。这表明阳性样品主要分布在盐城、扬州、泰州、南京、镇江等江苏省鲫鱼的主要养殖区域。

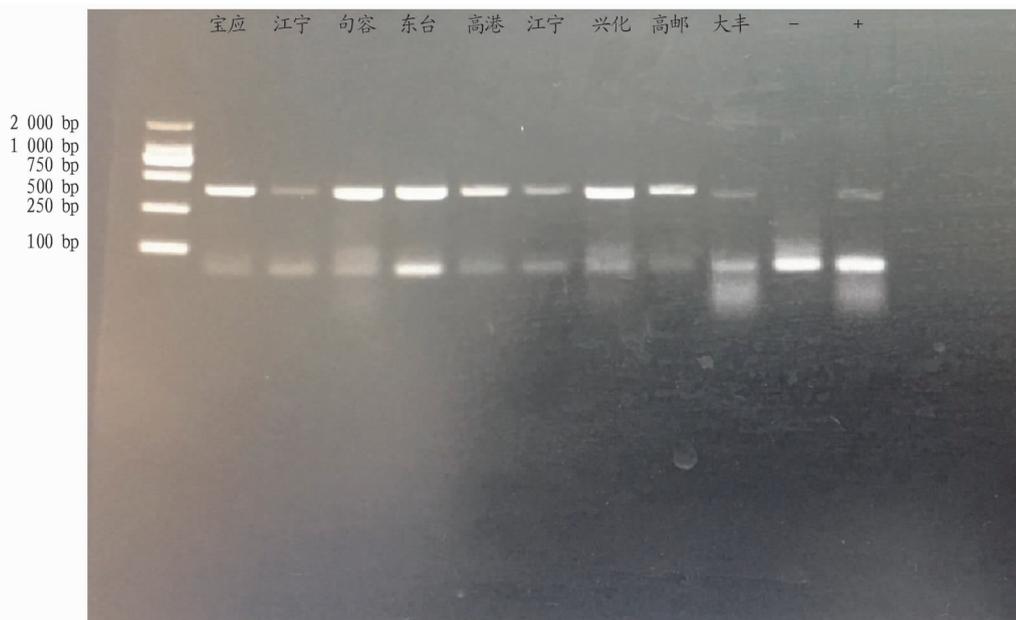


图 1 2015 年 CyHV-2 检测阳性样品 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 The agarose gel electropherogram of PCR amplification products of positive samples of CyHV-2 detection in 2015

2.1.2 2016 年监测结果。2016 年在江苏省内共采集鲫鱼样品 72 个, 样品主要分布如下: 盐城市 24 个、扬州市 14 个、徐州市 12 个、淮安市 10 个、泰州市 8 个、无锡市 3 个、南京市 1 个。阳性样品检出的电泳结果如图 2 所示, 共检出 CyHV-2 阳性样品 18 个, 阳性率达 25.00%, 其中大丰 7 个, 东台 4 个、射阳 4 个、徐州云龙区 1 个、铜山 1 个、兴化 1 个。这表明阳性样品主要集中在盐城这一鲫鱼养殖面积和产量最大的地区, 而徐州、泰州也检出少量阳性样品。

2.1.3 2017 年监测结果。2017 年在江苏省内共采集鲫鱼样品 179 个, 样品主要分布如下: 盐城市 64 个、淮安市 31 个、扬州市 30 个、常州市 10 个、徐州市 8 个、泰州市 8 个、无锡市 7 个、南通市 6 个、连云港 6 个、泰州市 6 个、宿迁市 4 个、南京市 3 个。阳性样品检出的电泳结果如图 3 所示, 共检出 CyHV-2 阳性样品 7 个, 阳性率为 3.91%, 其中大丰 2 个, 东

台 2 个、射阳 2 个、江宁 1 个。结果显示, 盐城地区共检出 6 个阳性样品, 南京也检出 1 个阳性样品。

2.1.4 总体流行情况分析。对江苏省内养殖鲫鱼 CyHV-2 进行了连续 3 年的跟踪监测, 共检测样品 265 个, 检出阳性样品 34 个, 阳性率为 12.83%。其中, 2015 年 CyHV-2 阳性率为 12.86%, 2016 年阳性率达 25.00%, 2017 年阳性率为 3.91% (图 4)。2015—2016 年, 养殖成鱼的 CyHV-2 阳性率呈明显升高的趋势, 可见 CyHV-2 对鲫鱼成鱼健康养殖的危害极大。为了探寻 CyHV-2 在鲫鱼苗种中的携带情况, 2017 年以苗种场的监测为主, 涵盖了包括国家级良种场和省级良种场在内的各类重点苗种场, 从监测结果来看, 苗种的 CyHV-2 阳性率明显低于成鱼。这说明相对于苗种生产, 鲫鱼养殖过程中感染 CyHV-2 的风险更高。

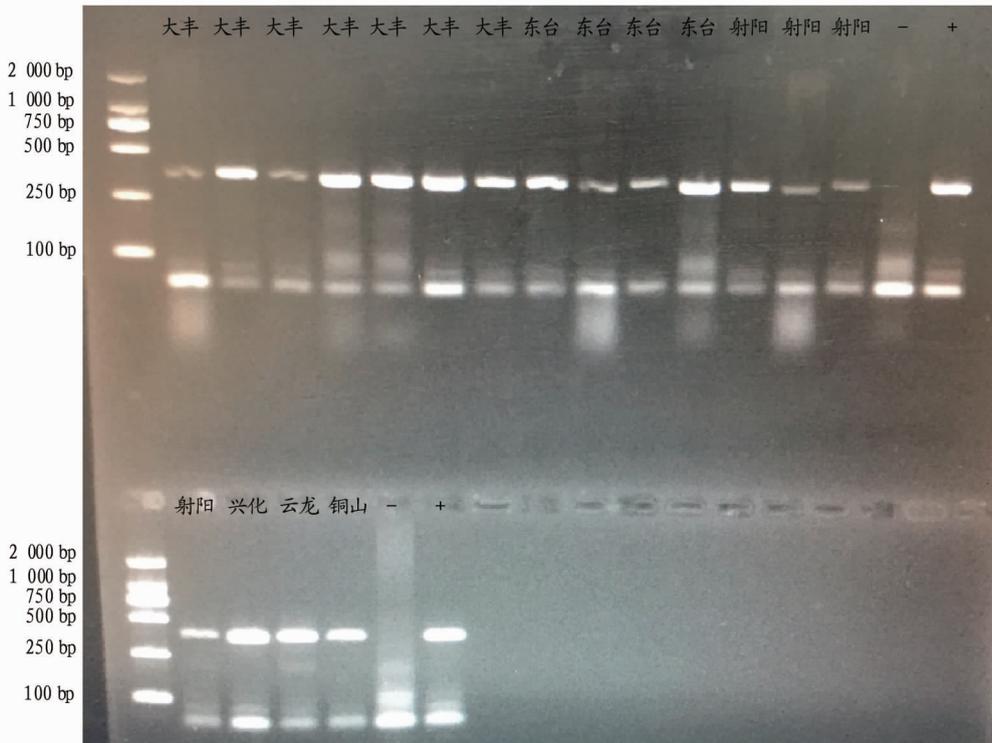


图2 2016年 CyHV-2 检测阳性样品 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 The agarose gel electropherogram of PCR amplification products of positive samples of CyHV-2 detection in 2016

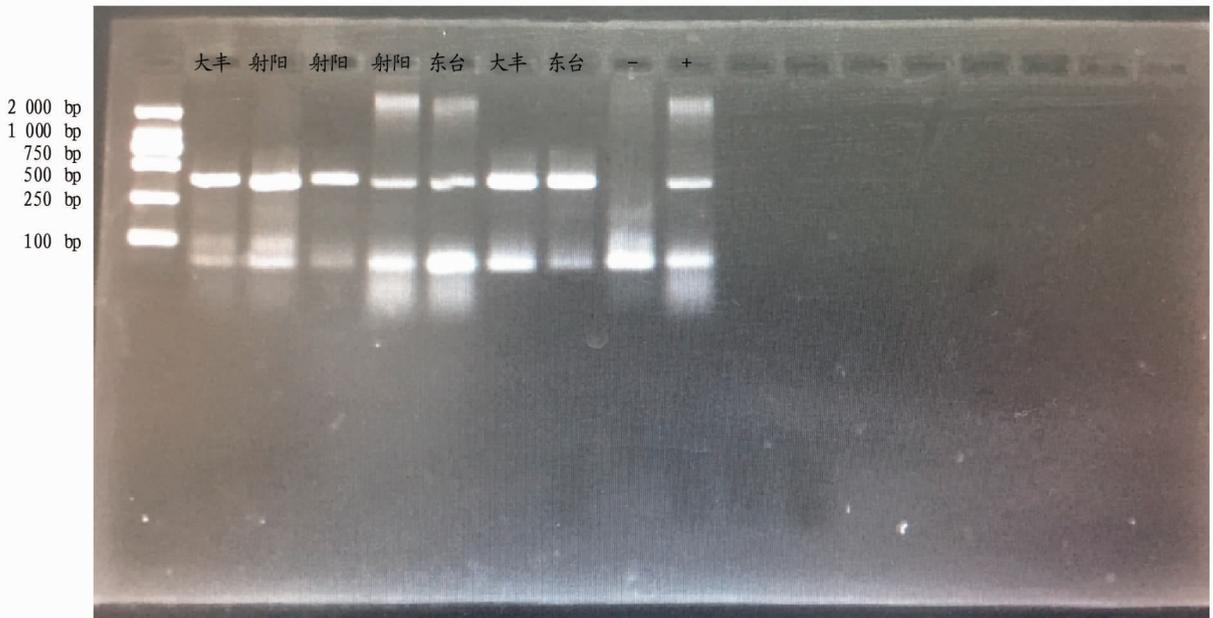


图3 2017年 CyHV-2 检测阳性样品 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.3 The agarose gel electropherogram of PCR amplification products of positive samples of CyHV-2 detection in 2017

2015—2017年 CyHV-2 阳性样品主要分布在盐城、泰州、南京、扬州、徐州、镇江6市(表1),均为江苏省鲫鱼的主要养殖区域。其中,盐城地区 CyHV-2 检出阳性数23个,远远高于江苏省其他鲫鱼养殖区域,盐城地区鲫鱼异育银鲫的养殖规模大,产量高,是江苏省乃至全国最重要的异育银鲫产区之一,因此 CyHV-2 在盐城地区的流行对于江苏省鲫鱼养殖业的危害极大。

2.2 同源性结果分析 应用 MEGA 软件将测得的 34 个阳

性序列与从 GenBank 数据库中下载的 CyHV-2 宝应株(BY-JS1;KC841411.1)进行遗传进化分析比较,结果见图5。从图5可以看出,27个阳性序列与宝应株聚在一起,7个阳性序列(均为2015年检出的阳性样品)未能与宝应株聚在一起,但遗传距离也非常小,表明2015—2017年江苏地区检出的 CyHV-2 与江苏地区的 CyHV-2 代表毒株宝应株有极高的遗传相似性,尚未发生明显的变异。

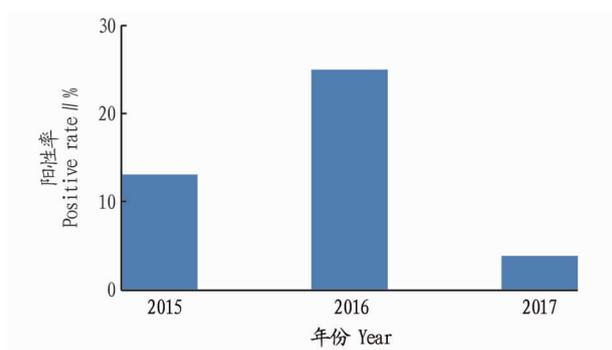


图4 2015—2017年江苏省 CyHV-2 监测阳性率的比较

Fig.4 The positive rate comparison of CyHV-2 in Jiangsu Province from 2015 to 2017

表1 2015—2017年江苏省各地区 CyHV-2 阳性样品数量的分布

Table 1 The positive sample number distribution of CyHV-2

年份 Year	南京 Nanjing	无锡 Wuxi	徐州 Xuzhou	常州 Changzhou	南通 Nantong	连云港 Lianyungang	淮安 Huai'an	盐城 Yancheng	扬州 Yangzhou	镇江 Zhenjiang	泰州 Taizhou	宿迁 Suqian
2015	2	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	0
2016	0	0	2	0	0	0	0	15	0	0	1	0
2017	1	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0

3 风险评估

3.1 流行风险评估 鲫鱼造血器官坏死病主要感染异育银鲫^[4-5,9-12],一旦暴发则死亡率极高,可造成巨大的经济损失。从2015—2016年监测结果来看,成鱼感染率有明显升高的趋势,病原在江苏各鲫鱼主要养殖区已经普遍存在,而2017年鲫鱼苗种亦检测出阳性样品,表明无论是苗种还是成鱼都可以被 CyHV-2 感染。由于该病毒存在潜伏感染^[13],既可以水平传播,又能垂直传播^[14-15],因此无论是苗种带毒还是成鱼带毒,鲫鱼感染流行的风险极高。

目前的监测结果表明,CyHV-2 只感染养殖鲫鱼,对同池塘养殖的其他鱼类(如草鱼、青鱼、鳊鱼、鲢鱼、鳙鱼等)均不感染,查阅文献也未见其他鱼类感染 CyHV-2 发病的报

道。精养鲫鱼的塘口感染鲫鱼造血器官坏死病的风险极大,近年检出 CyHV-2 阳性的塘口以单养鲫鱼为主,其他混养塘口则较少检出。因此,相对于其他鲫鱼养殖模式,精养鲫鱼的池塘感染、流行鲫鱼造血器官坏死病的风险较高,同时一旦感染发病,其经济损失也十分巨大。

目前江苏鲫鱼养殖规模十分巨大,最主要的养殖区域为盐城的大丰、射阳、东台等地,此外,扬州、徐州、泰州、淮安、南京、无锡、常州等地也有不少鲫鱼养殖区域。2015—2017年的 CyHV-2 监测结果表明,盐城地区的感染、流行情况最为严重,是鲫鱼造血器官坏死病感染风险最大的区域,由于盐城地区鲫鱼养殖塘口高度集约,养殖塘口集中、连片,一旦某一个养殖点感染疾病,其传播、蔓延风险极大,容易造成巨大的经济损失,需要重点防控。

3.2 病原变异风险评估 2015—2017年 CyHV-2 阳性序列的同源性分析结果表明,当前江苏省的 CyHV-2 尚未发现明显变异,各阳性序列与 CyHV-2 宝应株(BY-JS1: KC841411.1)具有极高的同源性,来源比较单一,因此毒株基因变异的风险较小,可以针对毒株尽快进行疫苗的研制。目前已有一些学者开展了相关疫苗研究工作,虽然免疫保护率还不够理想^[16-20],但疫苗作为控制病毒病的最有效手段,未来有望通过灭活疫苗、减毒重组疫苗、基因工程疫苗等来达到防控 CyHV-2 的目的。

4 讨论

鲫鱼是江苏省最重要的养殖经济鱼类,产量超过63万t,是我国鲫鱼养殖第一大省,鲫鱼因其肉质细腻、营养丰富、味道鲜美,深受我国人民喜爱,是人们餐桌上的美味佳肴。然而,随着养殖规模的急剧扩大,各种病害频发,经济损失巨大,尤其是近年来最流行的鲫鱼造血器官坏死病是对鲫鱼养殖危害最大的传染病。该病发病急,死亡率高,幼鱼和

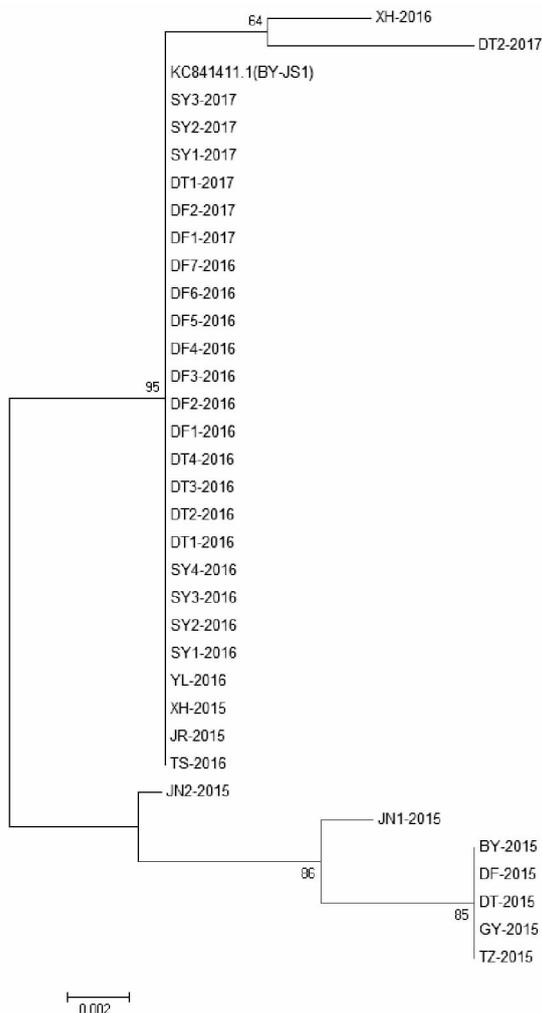


图5 2015—2017年 CyHV-2 阳性序列的遗传进化树分析

Fig.5 Genetic evolution tree analysis of CyHV-2 positive sequences from 2015 to 2017

成鱼均可感染,危害极大,且流行温度范围较广。目前,国内外可以对该病进行快速、准确诊断,世界各国学者从临床诊断、流行病学、基因组学、防控手段等方面对该病展开了一定程度的研究,但关于防控方面的研究还不够深入,防控手段较为欠缺,CyHV-2 仍未能得到有效控制。因此,对该病的发生、传播、宿主流行情况以及病原的同源性进行及时的风险分析,找出关键的风险点,对今后的防控措施研究奠定一个基础是十分必要的。

该研究结果表明,CyHV-2 既能感染鲫鱼成鱼,也能感染苗种,而苗种携带病毒使得后期养殖过程中的疾病感染风险巨大,因此开展苗种检疫,及时从源头防止病毒的传播对于防控该病是十分重要的手段;由于目前江苏地区该病毒的毒株来源较为单一,尚未发生明显的变异,因此针对该病毒进行疫苗研制,将是控制该病的最有效手段。

参考文献

- [1] DOSZPOLY A, BENKO M, CSABA G, 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.
- [2] XU J, ZENG L B, ZHANG H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius gibelio* in China [J]. *Veterinary microbiology*, 2013, 166(1/2): 138-144.
- [3] FICHI G, CARDETI G, COCUMELLI C, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius auratus* (L.), in Italy [J]. *Journal of fish diseases*, 2013, 36(10): 823-830.
- [4] WU T, DING Z F, REN M, et al. The histo- and ultra-pathological studies on a fatal disease of Prussian carp (*Carassius auratus*) in mainland China associated with cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) [J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 8-13.
- [5] DAN EK T, KALOUS L, VESEL T, et al. Massive mortality of Prussian carp *Carassius auratus* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2) [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2012, 102(2): 87-95.
- [6] 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*, 2015, 39(6): 673-680.
- [7] 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, 44(16): 5161-5167.
- [8] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鲤疱疹病毒II型的分子诊断 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(1): 92-96.
- [9] 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.
- [10] 罗杨志, 李莉娟, 顾泽茂, 等. 鲤疱疹病毒II型的分子特征及流行病学研究 [C] // 中国水产学会鱼病专业委员会学术研讨会论文摘要汇编. 海口: 海南大学海洋学院, 2013.
- [11] 吴霆, 丁正峰, 朱春艳, 等. 异育银鲫出血病流行病学调查和研究 [J]. *水产科学*, 2014, 33(5): 283-287.
- [12] 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.
- [13] WANG L, HE J G, LIANG L G, et al. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 2012, 32(5): 165-173.
- [14] GOODWIN A E, SADLER J, MERRY G E, et al. Herpesviral hematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: Case studies from commercial goldfish farms [J]. *Journal of fish diseases*, 2009, 32(3): 271-278.
- [15] CHANG P H, SHU H L, CHIANG H C, et al. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan [J]. *Fish pathology*, 1999, 34(4): 209-210.
- [16] ITO T, OTOTAKE M. Vaccination against cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) infection in goldfish *Carassius auratus* [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 2013, 33(5): 158-164.
- [17] ITO T, MAENO Y. Effect of booster shot and investigation of vaccination efficacy period against herpesviral hematopoietic necrosis (HVHN) in goldfish *Carassius auratus* [J]. *Veterinary microbiology*, 2015, 175(1): 139-144.
- [18] ZHOU Y, JIANG N, MA J, et al. Protective immunity in gibel carp, *Carassius gibelio* of the truncated proteins of cyprinid herpesvirus 2 expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2015, 47(2): 1024-1031.
- [19] ZHANG L L, MA J, FAN Y D, et al. Immune response and protection in gibel carp, *Carassius gibelio*, after vaccination with β -propiolactone inactivated cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2016, 49(1): 344-350.
- [20] 廖红, 林华, 郝中香, 等. 鲤疱疹病毒2型 ORF5 截短基因的克隆表达及免疫原性研究 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(11): 1394-1400.