

文章编号: 1000-0615(2018)01-0141-08

DOI: 10.11964/jfc.20161210653

四川地区一株锦鲤疱疹病毒的分离鉴定及系统进化分析

陈俊杰¹, 李媛媛¹, 阳瑞雪¹, 汪开毓¹, 耿毅¹,
黄小丽², 陈德芳², 欧阳萍^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 2015年5月, 四川某鲤养殖场暴发一种传染性疾病, 导致鲤大面积死亡, 死亡率高达80%。为研究此次疾病病因和流行规律, 将病料进行解剖、细菌学检查、病理组织观察、PCR鉴定、病毒分离和系统进化分析。结果显示, 发病鱼眼球凹陷, 胸鳍及腹鳍出现出血斑, 病鱼鳃严重坏死, 肾脏肿大。细菌检查为阴性。组织病理学观察, 病变最明显的是鳃和肾脏。病鱼鳃丝血管扩张充血, 鳃小片呼吸上皮细胞肿胀、脱落。鳃丝基部的上皮细胞大量增生, 层次增多。肾小管上皮细胞组织结构紊乱, 细胞肿胀, 管腔变狭小, 有崩裂和坏死现象。提取病鱼的肾脏和鳃组织DNA为模板, 针对世界动物卫生组织(OIE)推荐的检测锦鲤疱疹病毒(KHV)的 Sph 基因进行PCR检测, 出现特异性扩增产物。将病鱼的肾脏和肝脏组织研磨过滤灭菌后, 腹腔注射20尾健康鲤, 实验组表现为急性死亡(累积死亡率为90%), 出现与自然发病鱼相同的症状。将组织匀浆接种到普通鲤脑细胞系(CCB), 盲传3代后可稳定地观察到典型的细胞病变。细胞培养物染色超薄切片电镜观察结果显示, 病毒为有囊膜的球状, 病毒粒子直径为180~200 nm。对分离株的TK基因全长序列进行系统发育分析, 证实该毒株属于KHV亚洲1型毒株。本研究首次报道我国西南地区养殖鲤中KHV感染引起大面积死亡, 为KHV起源进化、分类以及疾病诊断和防控提供重要依据。

关键词: 鲤; 锦鲤疱疹病毒; 鲤疱疹病毒III型(CyHV-3); 病毒分离鉴定; 系统进化分析

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease, KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)感染引起鲤(*Cyprinus carpio*)、锦鲤以及鲤变种鳃坏死和间质性肾炎的一种高传染性、高死亡率的疾病, 致死率高达80%~100%^[1-3]。世界动物卫生组织(OIE)和中国都将KHVD列为必须申报的疾病, 中国农业部将其列为Ⅱ类动物疫病^[4-5]。该病主要发生在春秋季节, 水温为18~28℃易暴发^[6-7]。成鱼和幼鱼对KHV都敏感, 小鱼(1~3月龄, 2.5~6 g)的敏感性高于大鱼(1龄, 约230 g)^[8]。1998年, 在以色列、美国 and 德国最早报道KHV引起大面

积鲤和锦鲤死亡, 随后在欧洲、亚洲、非洲和澳大利亚都有锦鲤疱疹病毒病暴发^[1, 9], 呈世界性流行与分布。2001年, 中国香港最早暴发了KHVD, 后来在广州、武汉、深圳、长春等东部沿海城市和地区有该病暴发的报道^[10], 2011年, KHV在辽宁省(KHV-cj)和广东省(KHV-GZ11)首次成功分离^[11-12]。然而, 在我国西南地区还未见KHVD流行的报道, 本研究首次报道KHV在我国西南地区暴发, 并且实验成功分离得到病毒。

2015年5月, 四川某养殖场鲤发生大面积死亡, 发病鱼体表黏液增多, 全身多处明显出

收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-04-06

资助项目: 中国博士后科学基金(2015M582563); 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2015]311号)

通信作者: 欧阳萍, E-mail: ouyang.ping@live.cn

血, 眼球凹陷, 鳃丝腐烂、出血、严重坏死。剖检后可见肝脏、肾脏肿大, 然而从内脏器官未分离到细菌, 并且通过实验证明不是寄生虫感染。根据临床特征和病理学观察, 初步诊断为KHV感染, 针对OIE推荐的KHVS ϕ h基因设计检测引物进行PCR检测, 出现特异性扩增产物。为进一步验证是KHV导致鲤的大面积死亡, 采集患病鱼组织病料接种CCB细胞, 成功分离出一株KHV并且稳定传代。根据TK基因全长序列建立系统进化树, 证实该病毒属于亚洲1型毒株, 暂命名为KHV-SC株。本研究首次报道KHV在我国西南地区暴发流行。

1 材料与方法

1.1 病料、细胞和实验对象

病鱼采集于2015年5月, 来源于四川成都某鲤养殖场, 体长25~35 cm。健康鲤(体长25~30 cm) 40条, 购自四川成都某鲤养殖场。普通鲤脑细胞系(CCB)由深圳出入境检验检疫局刘荭研究员馈赠。CCB细胞在含10% FBS的MEM培养基, 25 °C 5% CO₂恒温培养箱中培养。

1.2 主要试剂

MEM培养基、胎牛血清购自Sigma公司; 病毒DNA提取试剂盒、小剂量质粒抽提试剂盒、pMD19-T质粒连接试剂盒、组织DNA提取试剂盒和胶回收试剂盒购自TaKaRa公司。

1.3 细菌学检查

对病鱼进行解剖观察, 同时取肝脏、脾脏、肾脏和脑等组织器官于洁净载玻片上涂片, 风干后革兰氏染色, 显微镜观察。无菌条件下, 从病鱼肝脏、脾脏和肾脏取样于BHI平板上划线接种, 28 °C恒温培养24~48 h后观察细菌生长状况。

1.4 组织病理学

取病鱼的鳃、肾脏、肝脏、脾脏、脑和肠道等组织器官, 10%的中性福尔马林固定, 常规石蜡切片, H.E染色, 中性树胶封片后光学显微镜下观察其主要病变并拍照记录。

1.5 人工感染动物实验

取濒死鲤的肝脏、肾脏组织, 用无菌生理盐水以1:5(重量体积比)在冰上匀浆。4 °C下以

3000、6000和9000 r/min依次梯度离心10 min; 取上清液于0.22 μ m的滤膜过滤灭菌。将健康鲤分为2组, 每组20尾。实验组每尾注射0.2 mL的组织匀浆液, 对照组每尾注射0.2 mL无菌生理盐水, 采用腹腔注射方式。实验期间水温控制在20~25 °C, 每天观察2次, 连续观察4周。

1.6 病毒分离培养和电镜观察

收集病鱼的肾脏、肝脏、脾脏等组织共3 g, 加入10倍体积(V/W)含有双抗的细胞培养液(100 μ g/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素), 使用全自动样品快速研磨仪(上海净信科技)研磨成组织匀浆液, 4 °C过夜处理。4 °C, 7000 r/min离心15 min, 取出上清液, 按照以上条件再离心2次。将上清液用MEM培养基进行10倍、100倍梯度稀释, 取1 mL加入到单层细胞的培养瓶中, 置于25 °C培养箱中, 逐日观察细胞病变(CPE), 收集CPE达70%~80%的细胞及上清液, -80 °C保存备用。待接种病毒细胞CPE达到70%~80%时, 刮取细胞, 4000 r/min离心5 min, PBS洗涤细胞沉淀, 加入2.5%戊二醛固定, 按常规方法进行1%锇酸固定、乙醇脱水、环氧树脂包埋, 超薄切片透射电镜观察。

1.7 PCR鉴定

发病鱼、人工感染鱼、健康鱼的组织DNA与感染CCB细胞的DNA提取按照提取试剂盒的说明进行操作。根据OIE推荐的鉴定锦鲤疱疹病毒的 ϕ h基因进行检测。

引物设计与合成 根据GenBank公布的KHV美国株(KHV-U, ID:DQ657948.1)基因序列, 选取保守的 ϕ h基因(ORF54), 应用Primer 5与Oligo软件设计引物, F: 5'-GCCCAAGAGCTGCTGGTA-3'; R: 5'-ACCTGCCTGCAGACAATCAT-3', PCR扩增产物预期为690 bp。引物由成都擎科生物技术有限公司合成。

病毒DNA的提取与PCR鉴定 收集CPE病变达70%~80%的细胞培养物, 按照病毒DNA提取试剂盒使用说明书提取DNA, 并进行PCR扩增。PCR扩增体系(25 μ L): 12.5 μ L 2 $\times$ PCR Master Mix, 上游引物、下游引物各1 μ L, 模板2 μ L, 加ddH₂O至25 μ L; 扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 54 °C复性45 s, 72 °C延伸45 s, 35个循环; 72 °C延伸5 min, 用1%琼脂糖凝胶电

泳分析PCR产物, 得到约0.7 kb的PCR产物。

1.8 TK基因全序列克隆测序及系统发育分析

TK基因是一段长约997~1007 bp, 编码胸苷激酶的基因序列, 国内外许多学者采用TK基因对KHV毒株进行系统发育分析^[11, 13]。按照文献^[11]介绍的方法合成一对扩增TK基因全序列的引物, 上游引物: 5'-AACGCGGGCCAGCTGAACAT-3', 下游引物: 5'-TGTGTGTATCCCAATAAACG-3', 预期扩增片段大小为997~1007 bp。反应体系同步步骤“病毒DNA的提取与PCR鉴定”; PCR扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s, 共35个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物经DNA纯化试剂盒纯化后, 按操作说明书连接到pMD19-T载体上, 转化DH5 α 感受态细胞中。培养24 h后, 挑取单个菌落进行菌落PCR筛选阳性克隆菌株, 提取质粒送成都擎科生物技术有限公司进行序列测定。将测序结果通过NCBI的Blast查找同源性序列, 以FASTA格式下载并整合。采用MEGA 6.0的clustalw (codons)功能将整理序列排序, 以置信度百分比(bootstrap replications)为1000, 使用邻接法构建系统发育树。

2 结果

2.1 解剖和细菌学检查

发病鱼体表黏液增多, 全身多处明显出血, 眼球凹陷, 鳃丝腐烂、出血、严重坏死(图1)。剖检后可见肝脏、肾脏肿大。涂片检查未观察到细菌, 也未从发病鱼的肝脏、脾脏和肾脏中分离到细菌。



图1 病鱼鳃组织严重坏死

Fig. 1 Severe gill necrosis of sick fish

2.2 组织病理学观察

采集患病鱼的外部器官(鳃)和内部器官(肾脏)制作病理切片观察。与对照组比较(图2-a), 病鱼鳃丝血管扩张充血, 鳃小片呼吸上皮细胞肿胀、脱落。鳃丝基部的上皮细胞大量增生, 层次增多, 填充了1/3至1/2的鳃小片, 并且向远端延伸(图2-b)。在内部器官的观察中, 与对照组(图2-c)比较, 肾小管上皮细胞组织结构紊乱, 细胞肿胀, 呈颗粒变性, 管腔变狭小, 有崩裂和坏死现象; 病变周围间隙组织血管扩张充血, 有大量炎性细胞渗出(图2-d), 与以往的研究结果一致^[1, 14]。

2.3 人工感染实验

实验组鲤注射感染第3天开始出现临床症状, 鱼变得冷漠不爱动, 体表黏液分泌增多, 食欲减退。第6天开始出现死亡, 第14天累积死亡率达90%, 连续观察3周。动物感染主要表现为急性死亡, 出现与自然发病鱼相同的临床表现。对照组全部存活无异常(图3)。

2.4 病毒分离

病鱼组织匀浆滤菌并感染CCB细胞, 盲传3代可以稳定地观察到典型的CPE, 细胞单层呈破渔网状(图4-b), 而对照组CCB细胞生长致密且无空泡出现(图4-a)。将病毒分离株暂命名为KHV-SC。

2.5 电镜观察

在透射电镜下可观察到细胞胞质内有大量成熟和不成熟的病毒粒子, 将单个病毒粒子放大, 其形态如小图所示(图5)。病毒为二十面体对称, 有囊膜, 直径为180~200 nm, 呈现典型的疱疹病毒结构。

2.6 PCR鉴定

对2条自然发病和2条人工感染发病鱼的组织DNA和病毒细胞培养物的DNA进行PCR检测, 凝胶电泳检测结果显示, 扩增条带约700 bp, 与预期相符(图6)。

2.7 序列分析与进化树构建

将TK全长序列克隆到pMD19-T载体中, 送成都擎科生物技术有限公司进行序列测定。结

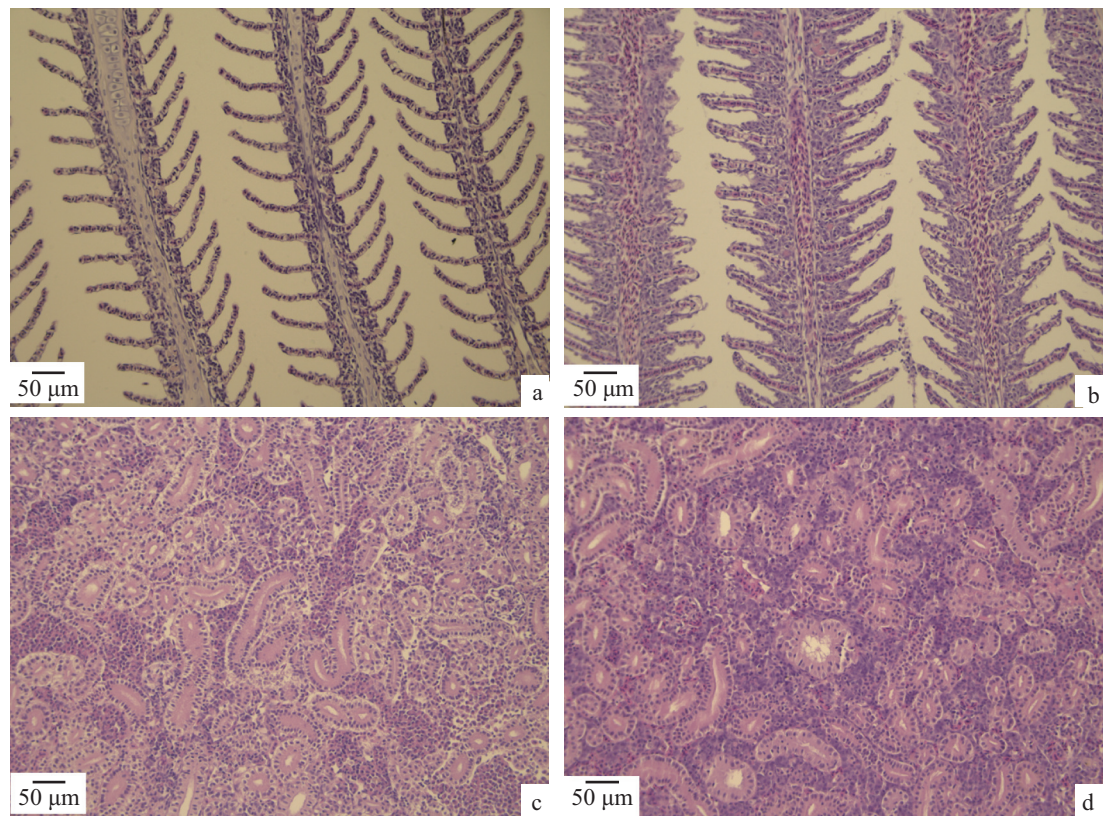


图 2 鳃和肾脏的组织病理学损伤

a. 正常鱼鳃组织; b. 发病鱼鳃组织; c. 正常鱼肾脏; d. 发病鱼肾脏

Fig. 2 Histopathological lesions of gills and kidney

a. healthy gills; b. infected fish's gills; c. healthy kidney; d. infected fish's kidney

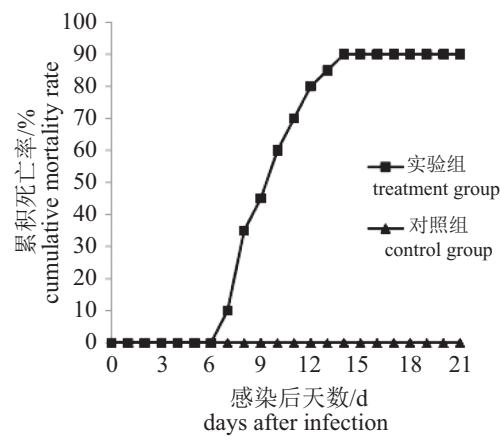


图 3 组织悬液人工感染实验结果

Fig. 3 Results of artificial infection experiment with the tissue suspension

果显示, 分离株TK基因全长997 bp。测序结果与GenBank中登录的KHV序列进行比较, 依据邻接法利用MEGA 6.0建立进化树(图7), 证实本实验所分离的毒株为亚洲1型毒株(图7), 与日本株

(J:AP008984)、印度尼西亚KO5(HM347098)和CO7(HM347099)株同源性均为100%。以色列毒株(I strain)与亚洲1型毒株同源关系较近, 这与以往的研究报道一致^[15-16]。

3 讨论

KHV感染的典型临床症状表现为行动迟缓、食欲不振、体表黏液增多、胸鳍及腹鳍出现出血斑、眼球凹陷, 病鱼鳃局部或全部苍白并伴随不同程度的鳃坏死。解剖后可见脾脏、肾脏暗红并充血肿大, 未从内脏中分离到细菌。典型的病理损伤表现为间质性肾炎、鳃小片上皮细胞肿胀、脱落, 肾小管上皮细胞组织结构紊乱、细胞肿胀、管腔变狭小, 有崩裂和坏死现象。Miwa等^[17]还发现病毒可在肾脏和鳃上皮细胞内形成包涵体。本次病例的临床症状和组织病理损伤与以前的报道基本一致^[18-19]。通过人工感染实验、PCR检测、病毒分离以及TK全

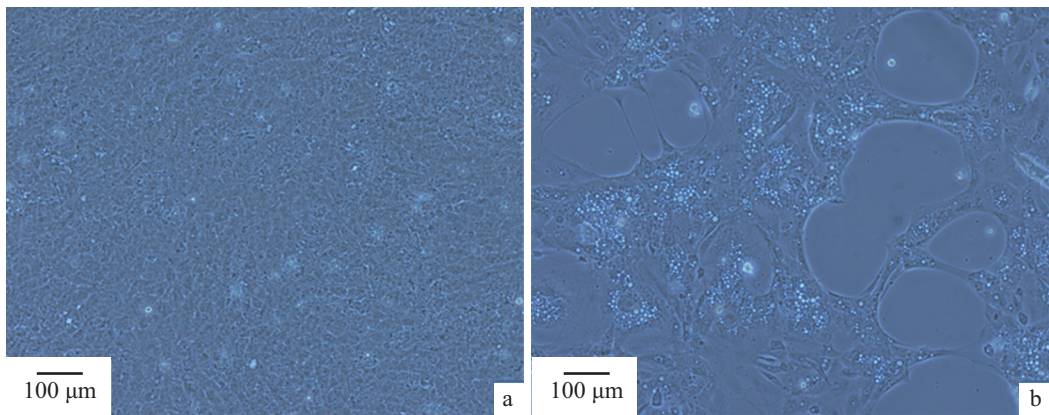


图 4 CCB细胞接种病毒后产生病变

a. 对照; b. 感染的CCB细胞

Fig. 4 Cytopathogenic effects of CCB cells infected by virus

a. control cells; b. CCB cells infected with virus

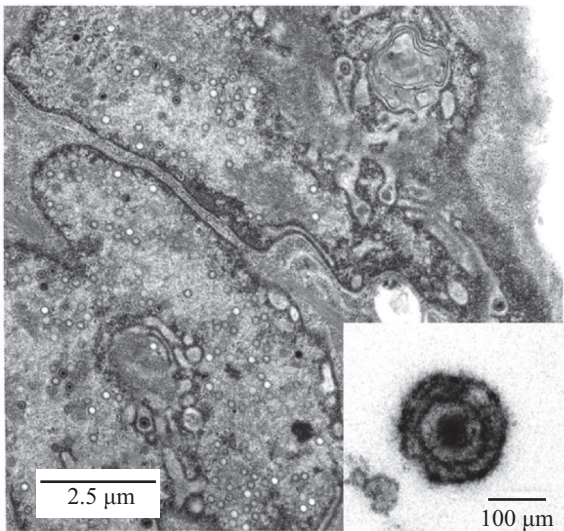


图 5 电镜下的病毒粒子

Fig. 5 The virions under electron microscope

基因系统发育分析, 证实此次造成四川地区养殖鲤大面积死亡的病原为KHV。

目前, 我国KHVD的流行和暴发主要集中在南部沿海和东北地区, 如广东、黑龙江和吉林等, 国内报道并成功分离的KHV病毒株有辽宁株(KHV-cj)、广东分离的广州株(KHV-GZ11和KHV-GZ1301)和黑龙江分离的KHV-hlj株等^[20]。本研究首次报道KHVD在我国西南地区暴发, 并且成功分离得到了KHV-SC株。四川省是淡水鱼养殖大省, 全省水产养殖面积19.61万hm², 水产品总产量达到137 万t, 主要养殖鲤、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲫(*Carassius auratus*)、鳊(*Ar-*

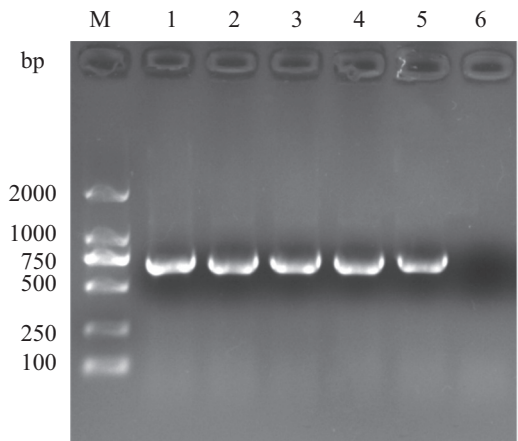


图 6 PCR检测结果

M. DL2000 DNA marker; 1~2. 自然发病鱼; 3~4. 人工感染鱼; 5. KHV感染细胞DNA; 6. 健康鱼

Fig. 6 Detection results of PCR

M. DL2000 DNA marker; 1~2. DNA isolated from naturally infected fish tissue; 3~4. DNA isolated from experimentally infected fish tissue; 5. DNA isolated from infected cell; 6. DNA isolated from healthy fish tissue

istichthys nobilis)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[21]。锦鲤疱疹病毒病(KHVD)具有高传染性、高死亡率, 死亡率达80%~100%, 已在世界范围内流行, 具有潜伏感染的特性^[22], 严重威胁全世界鲤和锦鲤养殖业的安全^[23]。

OIE推荐KHV的检测基因为TK和*Sph*。*Sph*属于保守性很强的聚合酶基因, 有很好的特异性, 能够将与CyHV-3亲缘关系很近的鲤痘疱疹病毒(CyHV-1)、金鱼造血器官坏死病病毒(CyHV-2)和鳊鱼疱疹病毒(AngHV)区别开^[24-25]。TK基因是一

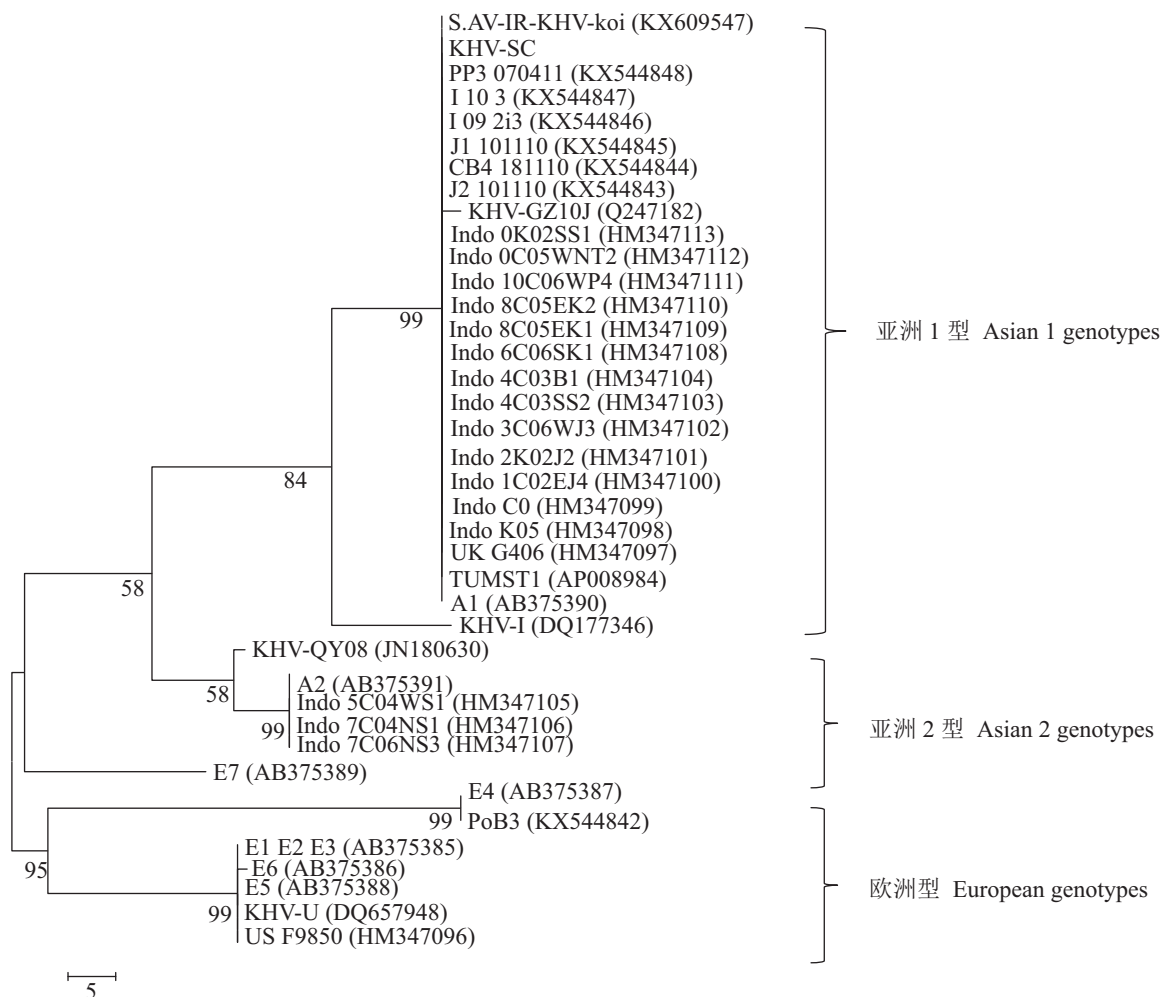


图 7 基于TK基因利用邻接法构建KHV-SC进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of KHV-SC based on TK gene sequences

条长为997~1007 bp, 编码胸苷激酶的基因, 保守性强, 突变点稳定, 通过该基因可以对世界范围内的KHV毒株进行分型, 国内外很多学者都采用了TK基因对KHV毒株进行系统发育树分析^[11, 13, 26]。Kurita等^[13]通过基因组学对世界范围内大量的KHV毒株进行分析, 证明来自亚洲和欧洲的隔离群有着明显的基因差异, 可通过对TK基因全长序列的测定将KHV毒株区分为欧洲型和亚洲型, 亚洲型分为亚洲1型和亚洲2型, 欧洲型分为E1~E7共7个毒株型^[26]。本研究获得TK基因全长序列为997 bp, 经MEGA 6.0构建进化树, 表明KHV-SC属于亚洲1型毒株。本课题组首次从西南地区分离得到一株KHV, 并且对其致病性进行了研究, 为KHV起源进化、分类以及疾病诊断和防控提供理论依据。

参考文献:

- [1] Boutier M, Ronsmans M, Rakus K, *et al.* Cyprinid herpesvirus 3: an archetype of fish alloherpesviruses[J]. *Advances in Virus Research*, 2015, 93: 161-256.
- [2] Brogden G, Adamek M, Proepsting M J, *et al.* Cholesterol-rich lipid rafts play an important role in the *Cyprinid herpesvirus 3* replication cycle[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(3-4): 204-212.
- [3] The PLOS Pathogens Staff. Correction: rational development of an attenuated recombinant cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and *in vivo* bioluminescent imaging[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004861.
- [4] Ma Y P, Liu Z X, Hao L, *et al.* Analysing codon usage bias of cyprinid herpesvirus 3 and adaptation of this virus to the hosts[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(7): 1-10.

- 665-673.
- [5] Sunarto A, McColl K A, Crane M S J, *et al.* Characteristics of cyprinid herpesvirus 3 in different phases of infection: implications for disease transmission and control[J]. *Virus Research*, 2014, 188: 45-53.
- [6] Weber III E P S, Malm K V, Yun S C, *et al.* Efficacy and safety of a modified-live cyprinid herpesvirus 3 vaccine in koi (*Cyprinus carpio koi*) for prevention of koi herpesvirus disease[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2014, 75(10): 899-904.
- [7] McColl K A, Cooke B D, Sunarto A. Viral biocontrol of invasive vertebrates: lessons from the past applied to cyprinid herpesvirus-3 and carp (*Cyprinus carpio*) control in Australia[J]. *Biological Control*, 2014, 72: 109-117.
- [8] Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, *et al.* Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2003, 55(1): 5-12.
- [9] Rakus K, Ouyang P, Boutier M, *et al.* Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research[J]. *Veterinary Science*, 2013, 44: 85.
- [10] Dong C F, Weng S P, Li W, *et al.* 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*, 2011, 161(2): 140-149.
- [11] 李莹莹, 王庆, 曾伟伟, 等. 锦鲤疱疹病毒GZ1301株的分离与鉴定[J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1159-1166.
- Li Y Y, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Isolation and identification of koi herpesvirus (GZ1301) from diseased koi (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1159-1166(in Chinese).
- [12] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 340-343.
- Zhu X, Li X W, Wang H, *et al.* Isolation and identification of koi herpesvirus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(5): 340-343(in Chinese).
- [13] Kurita J, Yuasa K, Ito T, *et al.* Molecular epidemiology of koi herpesvirus[J]. *Fish Pathology*, 2009, 44(2): 59-66.
- [14] 张涛, 宋文华, 富丽静, 等. 锦鲤疱疹病毒病鲤组织病理观察[J]. *水产学杂志*, 2015, 28(4): 24-27.
- Zhang T, Song W H, Fu L J, *et al.* Histopathological observation of tissues in common carp *Cyprinus carpio* with koi herpes virus disease[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2015, 28(4): 24-27(in Chinese).
- [15] Li W, Lee X, Weng S P, *et al.* Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 175(2-4): 185-194.
- [16] Bigarré L, Baud M, Cabon J, *et al.* Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 158(1-2): 51-57.
- [17] Miwa S, Kiryu I, Yuasa K, *et al.* Pathogenesis of acute and chronic diseases caused by cyprinid herpesvirus-3[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(8): 695-712.
- [18] Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 65(3): 197-207.
- [19] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型研究进展[J]. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108-120.
- Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, *et al.* Research advances in cyprinid herpesvirus 3[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(1): 108-120(in Chinese).
- [20] 薛淑群. 锦鲤疱疹病毒(KHV-hIj)株的分离与表达载体构建[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- Xue S Q. Virus isolation and Vector construction of koi herpesvirus (KHV-hIj)[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2012 (in Chinese).
- [21] 中国水产网. 四川省2015年水产市场总结及今年行情预测[EB/OL]. (2016-01-04). <http://www.zgsc123.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=207&id=92716>.
- China Fisheries network. Sichuan aquaculture market in 2015 and market forecast this year[EB/OL]. (2016-01-04). <http://www.zgsc123.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=207&id=92716> (in Chinese).
- [22] Reed A N, Izume S, Dolan B P, *et al.* Identification of B cells as a major site for cyprinid herpesvirus 3 latency[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(16): 9297-9309.
- [23] Reed A N, Putman T, Sullivan C, *et al.* Application of a nanoflare probe specific to a latency associated transcript for isolation of KHV latently infected cells[J]. *Virus Research*, 2015, 208: 129-135.
- [24] Yoshino M, Watari H, Kojima T, *et al.* Rapid, sensitive

- and simple detection method for *koi herpesvirus* using loop-mediated isothermal amplification[J]. Microbiology and Immunology, 2009, 53(7): 375-383.
- [25] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, *et al.* Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [26] Sunarto A, McColl K A, Crane M S J, *et al.* Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(2): 87-101.

Isolation and identification of a koi herpesvirus and phylogenetic analysis from Sichuan Province

CHEN Junjie¹, LI Yuanyuan¹, YANG Ruixue¹, WANG Kaiyu¹, GENG Yi¹,
HUANG Xiaoli², CHEN Defang², OUYANG Ping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In May 2015, an unknown disease caused severe economic losses in a common carp (*Cyprinus carpio*) culture pond in Sichuan Province. The mortality rate was 80%. Necropsy, bacteriologic test, histological examination, pathogenicity tests, virus isolation, PC assay and phylogenetic analysis were performed to explore its causes. Principal symptoms included sunken eyes, hemorrhage at the base of the pectoral and pelvic fins, severe gill necrosis and swollen kidney. Bacteriologic test was negative. Histopathologically, the most important changes were observed in the gills and kidneys. The respiratory epithelial cells of gill lamellae was swelling and/ or dropping and congestion of the blood vessels in the gill filaments. The base of branchial epithelium also exhibit hyperplasia, hypertrophy and cellular layer increased. The obvious disorder in structure, swelling, and disintegration and necrosis were found in epithelial cells of renal tubulus. Positive results were obtained from all detected samples according to a standard PCR diagnosis of koi herpesvirus (KHV/ CyHV-3) *Sph* gene proposed by Office International des Epizooties (OIE) by using gills and kidney tissue DNA isolated from diseased *C. carpio*. After filtration treatment the kidney and liver homogenate was injected intraperitoneally into 20 healthy common carp and the injected carp showed similar clinical symptoms as the fish that was naturally infected. *C. carpio* died acutely in the trial group with a cumulative mortality rate 90%. Tissue suspension was inoculated to the common carp brain (CCB) monolayer cells and a typical cytopathic effect (CPE) was observed in CCB cells after three blind passages. Icosahedral viral particles were observed in cells under the electron microscope. The virus particles were spherical in shape measuring 180-200 nm in diameter. Based on Neighbor-Joining analyses of the *TK* gene sequences, phylogenetic tree was constructed and the result showed that the isolate belongs to Asian 1 genotype. This is the first report of KHV infection in cultured common carp associated with high mortality in Southwestern China. The result present in this study is important for virus evolution, classification, viral diagnosis and disease control.

Key words: *Cyprinus carpio*; koi herpesvirus (KHV); cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3); virus isolation and identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: OUYANG Ping. E-mail: ouyang.ping@live.cn

Funding projects: China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2015M582563); the Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry ([2015]311)