

吴玲梅,温智清,杨雪冰,等. 郑州鲤养殖场鲤急性烂鳃病的症状与病原鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):167-172.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.033

# 郑州鲤养殖场鲤急性烂鳃病的症状与病原鉴定

吴玲梅<sup>1,2,3</sup>, 温智清<sup>2,3</sup>, 杨雪冰<sup>4</sup>, 董国栋<sup>5</sup>, 李旭东<sup>4</sup>, 王飞<sup>4</sup>, 郑晓聪<sup>2,3</sup>, 刘荭<sup>2,3</sup>, 贾鹏<sup>2,3</sup>, 毛明光<sup>1</sup>

(1. 大连海洋大学, 辽宁大连 116023; 2. 深圳海关动植物检验检疫技术中心, 广东深圳 518045;

3. 深圳市检验检疫科学研究院, 广东深圳 518045; 4. 河南省水产技术推广总站, 河南郑州 450008;

5. 商丘市大栋渔业有限公司, 河南商丘 476000)

**摘要:**2019 年 6 月, 河南郑州某鲤养殖场发生鲤急性烂鳃病, 累计死亡率约 40%。为研究发病病因和疾病流行规律, 对病鱼解剖, 进行细菌和寄生虫检测、组织病理学检测、PCR 检测和系统进化分析。结果显示, 病鱼体表黏液增多, 眼球凹陷, 头盖骨凹凸不平, 鳃肿胀并伴有溃烂, 肾脏肿大至鳃间隔。体视镜下可见病鱼鳃丝末端钝圆、呈棒状, 鳃丝间充满大量黏液。组织病理学检查可见病鱼鳃丝和鳃小片组织结构严重受损, 鳃丝上皮细胞增生、坏死脱落, 鳃弓远端和近端鳃小片均有明显增生且相互融合。PCR 方法从病鱼中检出鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV), 而 SVCV 和 KHV 检测结果为阴性。另外, 病鱼体表和鳃并未见任何寄生虫, 细菌学检测也未分离到任何与鲤烂鳃病相关的病原菌。遗传进化分析表明, 此次检出的 CEV 毒株属于 II a 基因亚型, 且与中国分离株(AS1/WJ2016)及日本分离株(CyPP3)的同源性最高, 约为 98.8%。初步推断 II a 基因亚型 CEV 可能是引起此次郑州鲤急性烂鳃病的主要病因, 后续养殖中需加强对该病进行防控。

**关键词:**鲤急性烂鳃病; 鲤浮肿病毒; 症状; 病原鉴定

**中图分类号:**S941.42<sup>+</sup>4

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2020)24-0167-06

2018 年我国水产养殖业总产量达 4 991.06

万 t, 约占世界水产养殖总产量的 60%, 是世界上唯一水产品养殖总量超过捕捞总量的渔业国家。鲤鱼作为我国第四大淡水养殖品种, 2018 年总产量达到 296.2 万 t<sup>[1]</sup>, 是我国消费者动物性蛋白的主要来源之一。河南省作为黄河鲤养殖大省, 其 2018 年产量约 23.0 万 t, 居全国第三。然而, 老病新发、外来病和新发疫病等情况成为鲤养殖产业发展的瓶颈, 例如鲤春病毒血症(spring viraemia of carp, SVC)和锦鲤疱疹病毒病(koi herpes virus disease, KHVD)等

收稿日期:2020-03-31

基金项目:深圳市自由探索项目(编号:JCYJ2017081840641071); 海关总署科研项目(编号:2017IK306)。

作者简介:吴玲梅(1994—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子免疫研究。Tel:(0755)25588609; E-mail:lingmw0326@163.com。

通信作者:贾鹏, 博士, 高级兽医师, 主要从事分子病毒学研究。Tel:(0755)25588609; E-mail:ajack2012@hotmail.com。

兽医寄生虫病, 2007, 15(3):51-54.

[9] 王延映. 高效液相色谱法测定饲料中甲硝唑、地美硝唑和异丙硝唑的方法研究[D]. 南京:南京农业大学, 2014.

[10] 罗锋, 李国清. 鸽毛滴虫全虫疫苗免疫效果研究[J]. 养禽与禽病防治, 2017(5):5-7.

[11] 罗锋. 鸽毛滴虫的检测与黏附蛋白基因工程疫苗的研究[D]. 广州:华南农业大学, 2008.

[12] 赵德, 乔翠, 张强, 等. 表位疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2012, 33(1):102-106.

[13] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2015:35, 107, 120.

[14] 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 等. 自身抗原 SS-B/La 序列结构分析及抗原性预测[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(9):471-473.

[15] 杭柏林, 李杰, 张慧辉, 等. 鸡抗菌肽 NK-lysin 的生物信息

学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(1 上):29-31, 36, 291-292.

[16] Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics[J]. Immunity, 2010, 33(4):530-541.

[17] 姚翠梅, 韩文愈, 雷连成, 等. CD4<sup>+</sup>T 细胞表位预测及其应用[C]//中国畜牧兽医学会生物制品学分会、中国微生物学会兽医微生物学专业委员会 2010 年学术年会暨第三届中国兽药大会论文集. 2010:72-74.

[18] 柳玉芳, 龚浪, 林莹, 等. 猪流行性腹泻病毒表位疫苗的研发[J]. 病毒学报, 2019, 35(4):633-638.

[19] Cubillos C, de la Torre B G, Bárcena J, et al. Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site[J]. Virology Journal, 2012, 9:66.

老病以及鲤急性烂鳃病等新发疫病<sup>[2]</sup>。鲤急性烂鳃病作为一种新发疫病,自 2003 年在河南地区出现以来,逐渐在河南鲤养殖体系广泛流行,养殖池塘发病率约 60%,单个池塘累计死亡率为 50% ~ 80%<sup>[3-4]</sup>,对当地鲤养殖业造成巨大经济损失。2013 年洛阳市因该病造成约 1 000 t 鲤死亡,损失上千万元<sup>[3]</sup>。然而,对于这种新发疫病,无论鲤养殖从业者还是鱼病研究人员均未能提出有效防控措施,究其原因是该病的病原尚不明确。2019 年 6 月,郑州某鲤养殖场暴发鲤急性烂鳃病,本研究采集样品后对其进行初步分析,以探究其发病原因。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 6 月,河南省郑州市某鲤养殖场暴发鲤急性烂鳃病,发病鲤体质量 400 ~ 500 g,累计死亡率约 40%,发病水温 23 ℃。随机采集 10 尾濒死鲤,低温保存带至实验室作进一步分析。

1.2 细菌和寄生虫检测

肉眼检查病鱼体表、鳃、肝脏、肠道等组织是否有寄生虫。同时对鳃丝制备组织压片,在光学显微镜下进行寄生虫观察。

无菌条件下,用无菌环从病鱼肾脏和肝脏挑取样品,划线接种于 BHIA 平板,28 ℃ 恒温培养 24 ~ 48 h,观察细菌生长情况。

1.3 鳃丝病理观察

取部分病鱼鳃置于含有生理盐水的平皿中,轻

轻漂洗 1 次,将其转移至新的生理盐水中,置于体视镜(Leica,德国)下进行形态观察。同时,采集健康鲤的鳃作为对照。

1.4 组织病理学检测

采集病鱼的鳃组织样本,切成约 5 mm × 5 mm 组织块,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中。固定组织经水洗、乙醇梯度脱水、甲苯透明、石蜡浸泡后包埋呈石蜡组织块。在常温下,采用 Leica 组织切片机进行连续切片(厚度 5 μm),载玻片贴附 37 ℃ 过夜后 HE 染色。切片经二甲苯脱蜡 - 乙醇梯度复水 - 水洗 - 苏木素染色 - 分化蓝化 - 伊红复染 - 乙醇梯度脱水 - 二甲苯透明 - 树脂胶包埋 - 胶包 70 ℃ 烤片 48 h。HE 染色结果为细胞核呈蓝色,细胞质呈红色,脂滴和水泡不着色。染色结果经光学显微镜(Zeiss,美国)观察并拍照记录。

1.5 PCR 检测

采集病鱼的鳃、脑、肾脏和脾脏混合并匀浆,取约 30 mg 用于核酸抽提。使用 TaKaRa MiniBEST viral RNA/DNA Extraction Kit (TaKaRa, 大连)提取总核酸(DNA 和 RNA),操作步骤详见试剂盒说明书。总核酸用于检测 CEV、KHV 和 SVCV,PCR 引物和扩增靶基因见表 1。CEV 套式 PCR 体系和反应条件参见温智清等的研究方法<sup>[5]</sup>。KHV 和 SVCV 检测参考《水生动物疾病诊断手册》“2.3.7”章<sup>[6]</sup>和“2.3.9”章<sup>[7]</sup>。PCR 检测样品设置 2 个复孔,并设立阴性对照和阳性对照。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	产物长度(bp)	目标基因
KHV - F1	GGGTTACCTGTACGAG	409	TK <sup>[6]</sup>
KHV - R1	CACCCAGTAGATTATGC		
CEV for B	ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG	528	P4a <sup>[8]</sup>
CEV revJ	CTCTTCACTATTGTGACTTTG		
CEV for B - int	GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG	478	
CEV RevJ - int	TAGCAAAGTACTACCTCATCC		
SVCV F1	GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC	714	G <sup>[7]</sup>
SVCV R2	AGATGCTATGGACCCCAATACATHACNCAY		
SVCV F1	GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC		
SVCV R4	CTGGGGTTTCNCCTCAAAGYTGy		

1.6 电泳和测序分析

使用 QIAxcel 全自动凝胶电泳仪(QIAgen,德国)对 PCR 产物进行电泳分析。PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。使用 clustal

W 生物学软件 megalign 方法对共计 31 条 CEV 序列进行比对,使用 MEGA X 生物学软件 maximum likelihood method 中的 Tamura 3 - parameter 模型进行遗传进化分析,序列之间比对 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床症状

发病鱼主要的临床症状为在水面聚集慢游,鳃

肿胀并溃烂(图 1-A),唇与鼻之间凹陷、头骨凹凸不平(图 1-B),眼睛凹陷(图 1-C),肾脏肿大至鳔间隔(图 1-D)。



A—鳃丝溃烂; B—头骨凹凸不平; C—眼睛凹陷; D—肾脏肿大至鳔间隔

图1 鲤急性烂鳃病感染鲤的临床症状

### 2.2 细菌和寄生虫检测

将挑去的肝脏和肾脏组织样品置于 BHIA 培养基上培养 48 h,未见优势菌落生长。病鱼体表和鳃丝压片观察未见寄生虫。

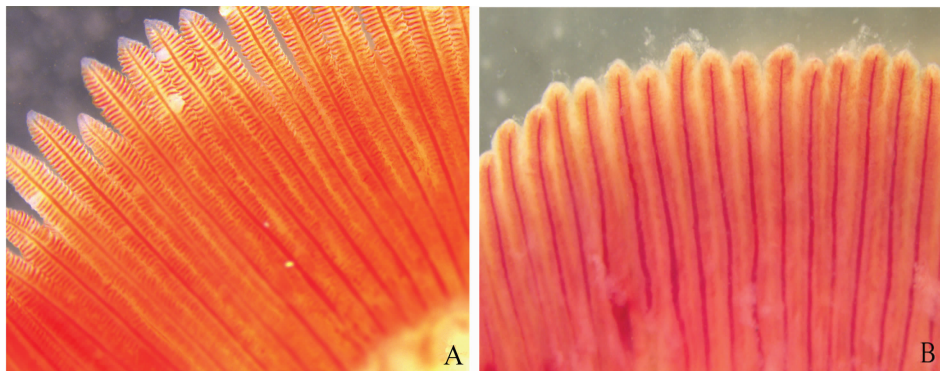
### 2.3 鳃丝病变

正常鲤鳃丝末端呈尖状,形态清晰,且无白色黏液(图 2-A)。体视镜下,可见病鱼鳃丝末端钝圆,呈棒槌状,形态不清,鳃丝周围附有白色絮状黏

液(图 2-B)。

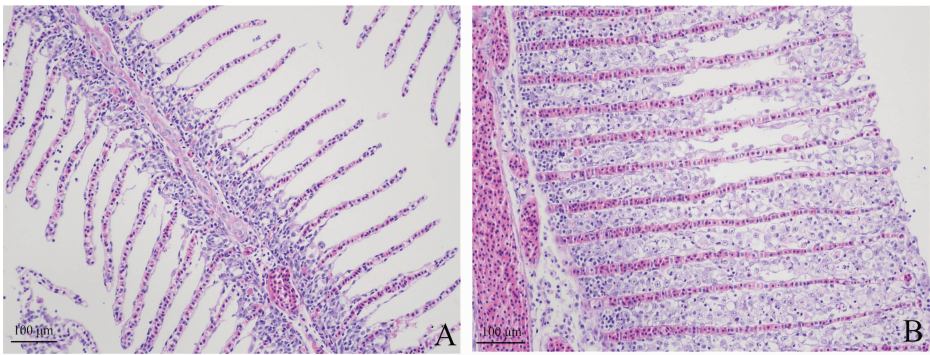
### 2.4 组织病理变化

组织病理学结果表明,健康鲤鳃丝组织结构正常,鳃小片呼吸上皮细胞偶见空泡变性,鳃丝和鳃小片毛细血管丰富,偶见上皮细胞脱落(图 3-A)。患病鱼鳃丝、鳃小片组织结构严重受损,鳃丝上皮细胞增生、坏死脱落,鳃弓远端和近端鳃小片均有明显增生,相互融合(图 3-B)。



A—健康鲤鳃丝; B—患病鲤鳃丝

图2 体视镜下鳃丝病变



A—健康鲤鳃丝；B—患病鲤鳃丝

图3 鳃组织病理观察

2.5 PCR 检测

PCR 检测结果表明,KHV 和 SVCV 未见特异性扩增,检测结果均为阴性;CEV 套氏 PCR 第一步

PCR 和第二步 PCR 分别扩增出 528 bp 和 478 bp 大小的目的条带,表明 CEV PCR 检测结果呈阳性(图 4)。

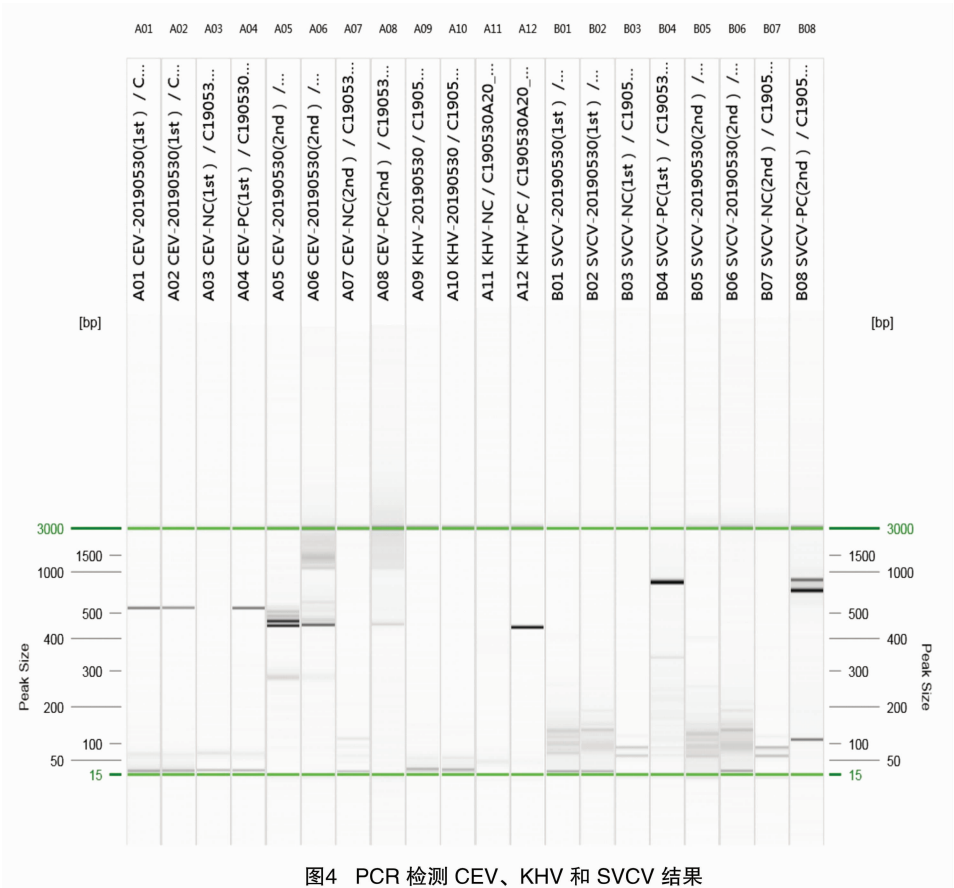


图4 PCR 检测 CEV、KHV 和 SVCV 结果

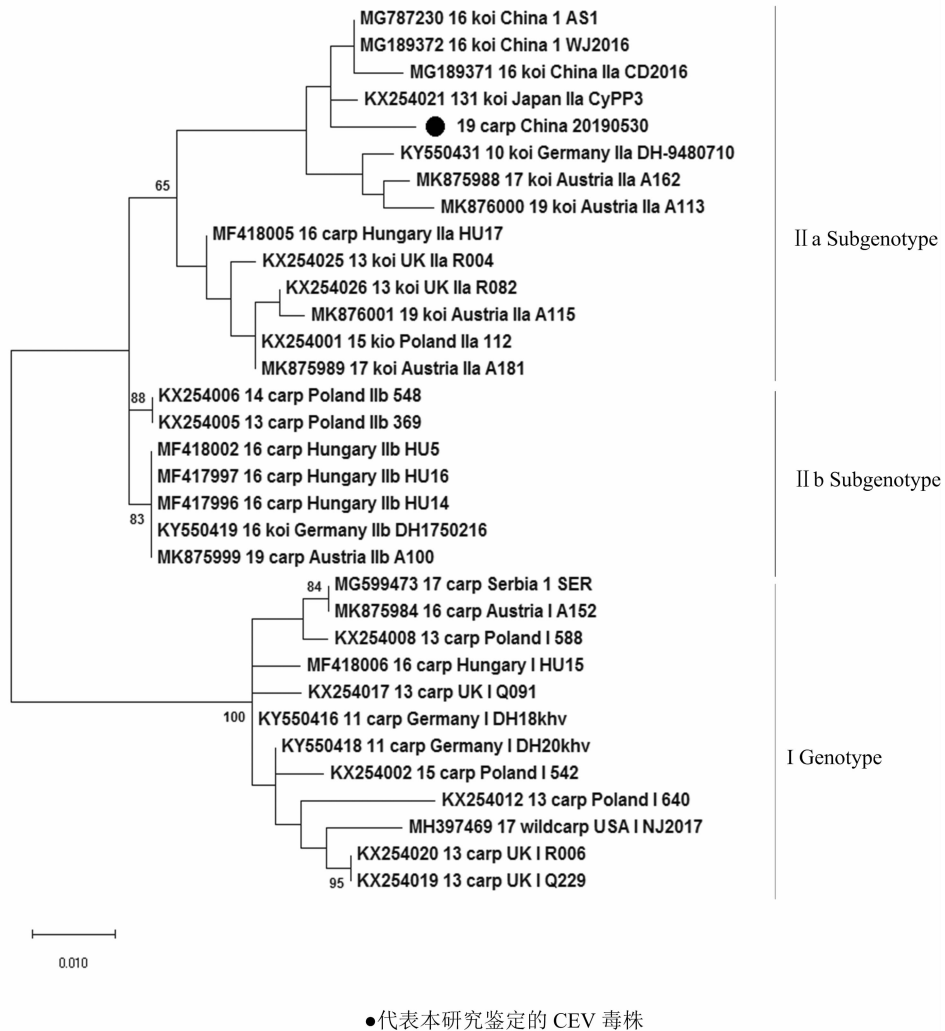
2.7 CEV 序列分析

对 CEV 第一步 PCR 产物进行测序,并以 CEV *P4a* 的 357 bp 基因片段进行遗传进化分析。结果表明,此次河南郑州检测到的 CEV 20190530 株属于 II a 基因亚型(图 5),并且和中国分离株(AS1 和 WJ2016)和日本分离株(CyPP3)同源性最高,约为 98.8%。

3 讨论

根据病原和导致临床症状的不同,通常将鲤急性烂鳃病分为寄生虫性烂鳃、细菌性败血症性烂鳃和肾炎型急性烂鳃 3 种<sup>[3]</sup>。寄生虫性烂鳃常见于黏孢子虫<sup>[9]</sup>、指环虫、车轮虫<sup>[10]</sup>和三代虫<sup>[11]</sup>等引起的烂鳃病,肉眼可见病鱼体表、内脏或鳃上的寄生



图5 基于 CEV *P4a* 357 bp 基因片段构建的系统进化树

虫,鳃上附有白点状的黏孢子虫包囊,显微镜下可见包囊中有大量孢子<sup>[12]</sup>。细菌性败血症性烂鳃主要是由柱状屈挠杆菌<sup>[11]</sup>和柱状黄杆菌<sup>[13]</sup>等引起,可分为慢性烂鳃和急性烂鳃,普通鲤、草鱼和鲢等鲤科鱼类均易发生。肾炎型急性烂鳃可能由 KHV<sup>[14-15]</sup>等病毒性病原引起,常见于普通鲤和锦鲤感染后发病。河南地区流行的鲤急性烂鳃病也同样分为寄生虫性烂鳃、细菌性败血症性烂鳃和肾炎型急性烂鳃,这 3 种烂鳃病在河南地区发病占比分别为 1%~2%、60%~70%和 30%~40%<sup>[3]</sup>。多家科研单位从河南鲤急性烂鳃病病鱼中鉴定出 KHV、柱状黄杆菌、维隆气单胞菌、霍乱弧菌、嗜水气单胞菌、腐败瓦希菌群等<sup>[3]</sup>。因此,在发生鲤急性烂鳃病时,应该通过临床症状和实验室检测结果加以区分,做到有针对性地治疗。

CEV 感染主要发生于 15~25℃,表现为普通

鲤体表浮肿或锦鲤嗜睡,鳃溃烂坏死,眼睛凹陷<sup>[16]</sup>。此次郑州某鲤养殖场暴发鲤急性烂鳃病时水温约为 23℃,病鱼出现以唇与鼻之间凹陷、头骨凹凸不平、眼睛凹陷、肾脏肿大至鳃间隔的主要临床症状,发病水温和部分临床症状与鲤浮肿病毒感染相似。体视镜下可见病鱼鳃丝末端钝圆,呈棒槌状,形态不清,鳃丝周围附有白色黏液,患病鱼鳃丝和鳃小片组织结构严重受损,鳃丝上皮细胞增生、坏死脱落,鳃弓远端和近端鳃小片均有明显增生且相互融合,这和 CEV 的组织病理特征相吻合。Way 等报道,被 CEV 感染的病鱼鳃上皮细胞肿大并大量增生,鳃小片相互融合<sup>[16-17]</sup>。PCR 方法从郑州发病鲤仅检出 CEV,且基因序列与 CEV 中国分离株 (AS1/WJ2016)及日本分离株 (CyPP3) 同源性约为 98.8%,而细菌和寄生虫检测均为阴性,且养殖户表述在鲤急性烂鳃病发生期间,使用抗生素无效反而

加重其死亡,排除了致病性细菌和寄生虫感染的可能。另外,徐立蒲等从河南 5 个出现有烂鳃症状的鲤养殖场中检出 CEV,而 KHV 均为阴性<sup>[18]</sup>。因此,初步推断此次河南郑州某鲤养殖场发生的鲤急性烂鳃病为肾炎型急性烂鳃病,其病原为 CEV。但该结论还有待于通过柯赫氏法则做进一步验证,并且由于鲤感染 KHV 后,其临床症状和 CEV 感染的临床症状十分相似<sup>[5,17]</sup>,所以临床上可对 CEV 和 KHV 同时进行检测,以尽快确定病因。

自 1970 年代日本新潟首次报道 CEV 以来,该病毒可能已通过锦鲤国际贸易传播至世界其他国家<sup>[16]</sup>。2015 年,我国首次在杭州某锦鲤养殖场鉴定出 CEV<sup>[19]</sup>,随后在云南<sup>[5]</sup>等多地均有确诊。此次从河南郑州患肾炎型急性烂鳃病病鱼中检出 CEV,分析其 *P4a* 基因片段(357 bp)发现,与中国分离株(AS1 和 WJ2016)和日本分离株(CyPP3)同源性最高,均为 98.8%,属于 II a 基因亚型,推测 CEV 有可能通过锦鲤贸易从日本传入我国,进而从锦鲤养殖体系传入普通鲤养殖体系。目前,基于 CEV *P4a* 基因的遗传进化分析,可将 CEV 主要分为 I 和 II 基因型;其中,CEV II 基因型可分为 II a 和 II b 这 2 个基因亚型<sup>[8]</sup>,并且随着研究的逐步深入,可能会发现更多新的 CEV 基因型<sup>[20]</sup>。但这些新的基因型也需要更多的研究结果证实其科学性。

目前,对因 CEV 感染引起的急性烂鳃病尚无有效的治疗措施,滥用药物、大换水、拉网捕捞等刺激性措施均会加重病鱼死亡,所以应以预防为主。日常应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;定期对养殖场进行疫病监测;保持良好的养殖环境,及时清理死鱼;对水源进行严格管理,养殖废水要进行无害化处理;同时在引进苗种时,一定要做好隔离检疫。

#### 参考文献:

- [1] 张显良. 2018 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:农业农村部渔业渔政管理局,2019:120-199.
- [2] 2019 中国水生动物卫生状况报告[M]. 北京:农业农村部渔业渔政管理局,2019:184-185.
- [3] 王先科,梁红茹,贾滔,等. 河南沿黄渔区鲤急性烂鳃病调研[J]. 养殖与饲料,2016(2):55-57,58.
- [4] 弓龙飞. 黄河鲤“急性死亡”病原调查[J]. 渔业致富指南,2019(1):51-53.
- [5] 温智清,刘莹,唐绍林,等. 云南锦鲤养殖场鲤浮肿病毒的鉴定及基因型分析[J]. 病毒学报,2017,33(6):905-913.
- [6] OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animal [M]. Pair, France:World Organisation for Animal Health,2019:328-344.
- [7] OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animal [M]. Pair, France:World Organization for Animal Health,2019:361-377.
- [8] Matras M, Borzym E, Stone D, et al. Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases,2017,40(3):319-325.
- [9] 南微微,刘桐令. 鲤鱼烂鳃、黏孢子虫、脂肪肝并发病治疗实例[J]. 科学养鱼,2005(7):59.
- [10] 肖国华. 网箱养鲤烂鳃病的防治[J]. 科学养鱼,1992(3):18-19.
- [11] 富丽静,李文宽,王伟昆,等. 网箱养鲤烂鳃病防治技术[J]. 淡水渔业,2000,30(7):27.
- [12] 李长华,蒋吉生,边佩华,等. 沈阳市于洪区鱼场黏孢子虫、烂鳃并发病的发生、防治初探[J]. 水产科学,1996,15(5):35-36.
- [13] 谢海侠. 柱状杆菌毒力相关因子的研究[D]. 武汉:中国科学院研究生院(水生生物研究所),2005:1-2.
- [14] Hutoran M, Ronen A, Perelberg A, et al. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species[J]. Journal of Virology,2005,79(4):1983-1991.
- [15] Waltzek T B, Kelley G O, Stone D M, et al. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae[J]. Journal of General Virology,2005,86(Pt 6):1659-1667.
- [16] Way K, Haenen O, Stone D, et al. Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio* [J]. Diseases of Aquatic Organisms,2017,126(2):155-166.
- [17] Jung - Schroers V, Adamek M, Teitge F, et al. Another potential carp killer?: carp edema virus disease in Germany [J]. BMC Veterinary Research,2015,11(1):114.
- [18] 徐立蒲,张文,王姝,等. 河南沿黄滩区鲤浮肿病和锦鲤疱疹病毒病初步调查研究[J]. 科学养鱼,2017(9):59-61.
- [19] Zhang X, Ni Y, Ye J, et al. Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China [J]. Aquaculture,2017,474(33):34-39.
- [20] Soliman H, Lewisch E, El - Matbouli M. Identification of new genogroups in Austrian carp edema virus isolates [J]. Diseases of Aquatic Organisms,2019,136(2):193-197.