

金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断

李莉娟 罗杨志 刘学芹 顾泽茂 袁军法

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 针对国内市场上流通的金鱼, 开展 CyHV-2 的流行病学调查, 并比较 CyHV-2 不同分离株的分子特征。结果显示: 无明显临床症状的金鱼带毒率较高(13.89%), 表明我国已有 CyHV-2 的分布。分子生物学研究显示, 我国金鱼和异育银鲫来源的 CyHV-2 编码的解旋酶基因部分序列一致, 表明异育银鲫来源的 CyHV-2 和金鱼来源的 CyHV-2 极可能为同一种病毒。同日本分离株(H. Fukuda)比较, 我国金鱼来源的 CyHV-2 编码的 DNA 聚合酶基因片段序列同该毒株完全一致, 但两者编码的衣壳体间三联蛋白和解旋酶各有 1~2 个氨基酸的差异, 表明我国分布的 CyHV-2 同 H. Fukuda 毒株高度相似, 但存在一定的差异。

关键词 鲤疱疹病毒; 锦鲤疱疹病毒; 流行病学; 金鱼

中图分类号 Q 939.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0092-05

鲤疱疹病毒 II 型(*Cyprinid herpesvirus 2*, CyHV-2), 也称为金鱼造血器官坏死病病毒(goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV), 是一种感染金鱼(*Carassius auratus*)、鲫(*Carassius auratus*)及其变种的高致病性病毒。因该病毒是第 2 个分离自鲤科鱼类的疱疹病毒, 国际病毒系统分类与命名委员会将其命名为鲤疱疹病毒 II 型。其分类地位隶属于疱疹病毒目(*Herpesvirales*)、鱼疱疹病毒科(*Alloherpesviridae*)、鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)。CyHV-2 感染的临床症状主要表现为精神沉郁, 昏睡, 食欲不佳或厌食, 呼吸频率增加, 患病鱼停留在池塘或水箱底部, 解剖后可见鳃苍白, 脾和肾肿胀并呈苍白色, 偶尔能见多处白色病灶, 肝苍白, 肠道空^[1]。同其他疱疹病毒一样, CyHV-2 可形成潜伏感染, 并成为潜在的传播源^[2]。该病毒最初在日本西部养殖的金鱼中暴发, 并造成接近 100% 的死亡率。近年来在澳大利亚、新西兰、英国、匈牙利及我国台湾都检测到该病毒^[2-5]。世界动物卫生组织(OIE)尚未将该病毒病纳入检疫目录, 随着观赏鱼国际贸易的全球化, 该病毒很可能在全球范围内散播。

尽管尚未有 CyHV-2 在我国大陆分布的文献

报道, 但近来国内有关网站上报道, 江苏盐城等地养殖的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)大面积发生暴发性出血病, 俗称“鳃出血”(也有报道称“大红鳃”), 国家大宗淡水鱼类产业技术体系病害防控与质量安全研究室的岗位科学家诊断其病原为 CyHV-2(<http://www.ncffi.cn/index.aspx>), 提示我国已有 CyHV-2 的分布, 但我国分布的 CyHV-2 的生物学、传播源、传播途径等流行病学资料仍缺乏专业文献报道。鉴于 CyHV-2 最初在金鱼中暴发, 金鱼感染 CyHV-2 后可长期携带病毒, 并成为潜在传播源, 调查我国养殖的金鱼是否有 CyHV-2 的分布显得尤为紧迫。笔者针对国内市场上流通的金鱼, 开展了 CyHV-2 的流行病学调查, 并比较 CyHV-2 不同分离株的分子特征, 旨在为该病毒的诊断与防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

待检测金鱼分别来自北京、广州、武汉花鸟市场。每一花鸟市场随机选取多个观赏鱼销售点, 共选择 72 条体长为 2.5~4.0 cm 的金鱼用于检测, 活体经 M122 麻醉后解剖, 分别取脾和肾, 经液氮速冻

收稿日期: 2012-11-26

基金项目: 教育部博士点新教师基金(20100146120013)、中央高校基本科研业务费专项资金(52902-0900206094、2012ZYT028)和湖北省杰出青年人才基金(2011CDA091)

李莉娟, 博士, 讲师。研究方向: 水生动物病原学。E-mail: lilijuan@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 袁军法, 博士, 讲师。研究方向: 分子病毒学。E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn

后 -80 °C 冻存备用。

Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 Biostar, T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品, pGEMT-Easy 载体为 Promega 公司产品, 胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品, 其他试剂为国产或进口分装。

1.2 DNA 提取与样品筛查

组织 DNA 的提取采用康为世纪通用型柱式基因组提取试剂盒, 取不超过 0.1 g 组织, 按试剂盒说明书进行, 组织 DNA 以 50 μL 的三蒸馏水洗脱, -20 °C 保存。

样品筛查采用文献[4,6]的 2 对引物, 其中引物 1 的扩增循环条件为: 95 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 30 s。共扩增 35 个循环, 预期扩增片段为 187 bp^[4]。引物 2 的循环扩增条件为: 95 °C 30 s, 55 °C 60 s, 72 °C 30 s。共扩增 35 个循环, 预期扩增片段为 362 bp^[6]。与预期大小相符的扩增产物经胶回收后测序验证。

1.3 基因扩增与克隆

NCBI 中已有 CyHV-2 日本分离株(H. Fukuda)编码的衣壳体间三联蛋白基因、解螺旋酶基因的完整序列。为比较不同分离株之间的异同, 分别设计引物扩增上述基因。引物序列分别为 ATGTG-CAACGTGACGGCGAGT、CTGAATTCTGAACGCTGGATCCA、CTGATCATCGACGAGTACGG、CACACGCGTGCACACACRTA。衣壳体间三联蛋白基因的扩增循环条件为: 95 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 90 s, 解旋酶基因的扩增循环条件为: 95 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 90 s。扩增产物经胶回收后直接测序。

1.4 序列分析

以 DNASTar 进行常规的序列拼接与编辑, 序列比对通过 ClustalX1.83 软件进行。

2 结果与分析

2.1 样品筛查结果

按文献[4,6]所述的方法及条件, 分别以 2 对引物检测, 其中 CyHV2F/R 引物扩增未见预期条带。CyHVF/R 引物对扩增时, 部分样品出现预期目的条带, 但同时存在一些非特异性扩增条带。出现预期条带的扩增产物经 PCR 测序验证, 同已有的 CyHV-2 聚合酶序列完全一致, 证实市场上部分金鱼携带 CyHV-2 病毒。

分别选择阳性样品和阴性样品, 优化扩增条件(图 1), 以优化的扩增条件, 筛查采集的所有样品, 结果显示多个地方的金鱼携带 CyHV-2(表 1)。总体而言, 采集金鱼携带 CyHV-2 的阳性率为 13.89%。通过调查观赏鱼经营户, 了解到本次采集金鱼的大致来源, 其中来源于徐州、武汉、广州和北京的金鱼均有一定程度的携带。

表 1 金鱼筛查汇总

Table 1 Detection of CyHV-2 in goldfish in China by PCR		
采样地点 Location	金鱼来源 ¹⁾ Origin of goldfish	检测结果 No. positive/No. tested (Percent/%)
武汉 Wuhan	武汉、徐州、苏州 Wuhan, Xuzhou, Suzhou	6/43(13.95)
广州 Guangzhou	广州 Guangzhou	3/23(13.04)
北京 Beijing	北京 Beijing	1/6(16.67)
合计 Total		10/72(13.89)

1) 通过询问观赏鱼经营户获得鱼来源。Source of goldfish was inquired of ornamental fish dealers.

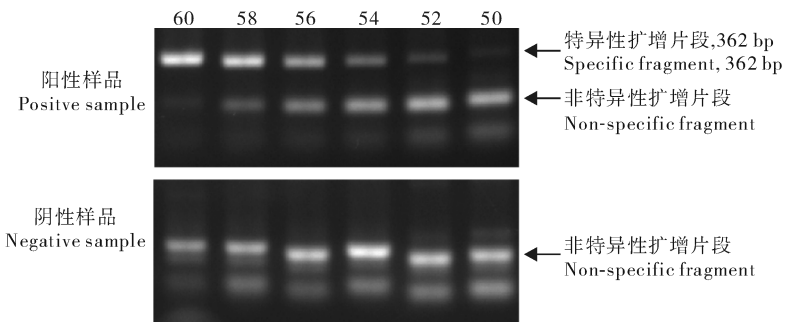


图 1 CyHV-2 检测引物扩增条件的优化

Fig. 1 Optimization of amplification

本文检测的阳性样品,经过逐一测序,获得部分的 DNA 聚合酶基因序列。序列分析显示:武汉、北京和广州等地的金鱼携带的 CyHV-2 的 DNA 聚合酶基因片段序列一致,且同已公布的序列完全一致。

2.2 不同分离株的比较

目前,针对CyHV-2的研究较少,GenBank 收录的 CyHV-2 序列仅有 14 条,尚缺乏不同分离株之间的比较研究。通过分析 GenBank 中有限的 CyHV-2 序列,发现所收录的 CyHV-2 序列来源于以下 4 种:一是来源于日本金鱼的分离株 H. Fukuda,包括衣壳体间三联蛋白基因、DNA 聚合酶基因、解螺旋酶基因、末端酶基因等的部分或完整的基因序列,共 6 条;第 2 种是来源于美国不同地方的患病金鱼,扩增所得的 CyHV-2 DNA 聚合酶基因部分序列,共 3 条,序列同 H. Fukuda 株;第 3 种是来源于我国江苏盐城感染异育银鲫的病毒序列,共 3 条,均为解旋酶部分序列;第 4 种来源于我国云南,为淡水湖泊的环境样品(洱海表层水样),仅有 DNA 聚合酶基因的 50 bp 的序列,序列同 H. Fukuda 株。另外有一条序列来源于匈牙利的鲫。经过比对上述的

这些序列,提示不同来源的 CyHV-2 的 DNA 聚合酶基因以及解旋酶基因几乎完全一致,提示不同来源的 CyHV-2 分离株可能同 H. Fukuda 株高度相似。

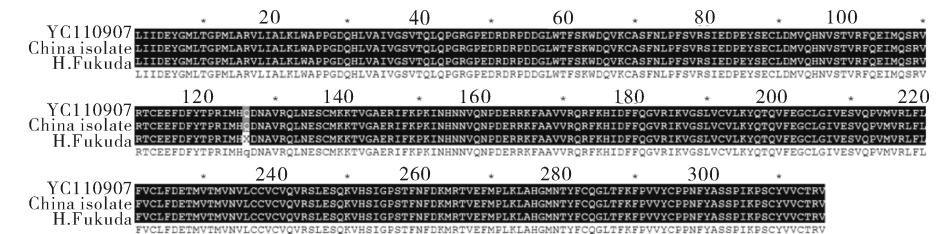
为进一步比较金鱼来源的 CyHV-2 同其他分离株的异同,利用已公布的衣壳体间三联蛋白基因和解旋酶基因序列,设计特异性引物后扩增,分别获得金鱼来源的 CyHV-2 的衣壳体间三联蛋白基因和解旋酶基因序列。序列分析显示,武汉、广州和北京等地的金鱼携带的 CyHV-2 的衣壳体间三联蛋白基因和解旋酶基因序列完全一致。就衣壳体间三联蛋白基因而言,CyHV-2 中国株同 H. Fukuda 分离株的同源性为 99.4%,仅有 2 个氨基酸的不同,详见图 2。而解旋酶不完全基因序列分析显示,我国金鱼以及鲫来源的 CyHV-2 完全一致,但同 H. Fukuda 分离株存在 1 个氨基酸的差异(图 3)。

因此,从目前有限的序列分析来看,金鱼携带的 CyHV-2 同江苏盐城鲫来源的 CyHV-2 可能为同一病毒,同 H. Fukuda 存在一定的差异,但需要进一步的比较研究。

H. Fukuda 序列来源于 GenBank 已发表序列(EU349286); China isolates 来源于中国金鱼阳性样本。阴影表示不同的氨基酸一致性。下图同。H. Fukuda; Sequence of CyHV-2 from GenBank (EU349286), China isolate; Sequence of CyHV-2 from goldfish in China. Shading is used to highlight regions with different levels of sequence identity. The same as below.

图 2 不同 CyHV-2 分离株的衣壳体间三联蛋白序列比对

Fig. 2 Alignment of protein sequences of intercapsomeric triplex protein encoded by different CyHV-2 isolates



YC110907 来源于中国盐城患病异育银鲫(JQ067603.1), H. Fukuda 序列来源于 GenBank 已发表序列(EU349287.1)。YC110907; Sequence of CyHV-2 from silver prussian carp cultured in China (JQ067603.1). H. Fukuda; Sequence of CyHV-2 from GenBank (EU349287.1).

图 3 不同 CyHV-2 分离株的解旋酶基因蛋白序列比对

Fig. 3 Alignment of protein sequences of helicase encoded by different CyHV-2 isolates

3 讨 论

鲤疱疹病毒包括鲤疱疹病毒 I 型、II 型和 III 型^[7]。其中鲤疱疹病毒 I 型(CyHV-1)危害性较小,一般不导致感染鱼的死亡,仅在体表形成结节。鲤疱疹病毒 III 型(CyHV-3),也称为锦鲤疱疹病毒,因锦鲤的国际贸易已经散播至全球,其危害严重,OIE 将其列为重点疫病目录,我国也将由 KHV 感染导致的 KHVD 列为二类动物疫病,并已开展日常的监测工作。但鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)尚未引起研究者足够的重视。除相关网站的报道外,我国也未有大规模暴发的文献记录,也未见我国有该病毒分布或流行的文献记录,但从本文的调查结果来看,在北京、武汉以及广州已有该病毒的分布。搜索 GenBank 中 CyHV-2 序列,发现有一个序列来源于我国云南大理洱海的表层水,但只有 50 bp 的核酸序列。如能证实 CyHV-2 在大水体环境中也存在,说明 CyHV-2 在我国已有较为广泛的分布,有理由担忧野生鲫种质资源是否受到 CyHV-2 的感染。本次检测的样品均采集于花鸟市场上流通的金鱼,外观检测正常,解剖也未发现明显异常,提示这些样品仅携带病毒,但未发病。目前 CyHV-2 尚未纳入监测范围,也未正式开展水产品疫源地检测制度。无临床症状的带毒金鱼的存在,极有可能成为传播源,随着金鱼的贸易散播 CyHV-2 至各地。

CyHV-2 最初在日本暴发,已扩散至美国、英国、澳大利亚、新西兰、匈牙利以及我国台湾。尽管分布范围较广,但 CyHV-2 的研究滞后,关于该病毒的生物学、流行病学以及防控技术研究甚少。不同国家或地区暴发的 CyHV-2 的毒株信息、毒力等缺乏可比较的文献资料。从已发表的病毒基因序列来看,不同国家或地区分布的 CyHV-2 同日本分离株 H. Fukuda 基本一致,但我国金鱼以及异育银鲫来源的 CyHV-2 编码的解旋酶基因和衣壳体三联蛋白序列同日本分离株 H. Fukuda 均存在 1~2 个氨基酸的不同,提示我国分布的 CyHV-2 可能同日本分离株 H. Fukuda 高度相似,但不相同。但用来比较的序列包括 DNA 聚合酶、解旋酶等都是病毒保守基因,可能并不适合作 CyHV-2 的分型研究,后续需要更多的病毒分子生物学的分析。

CyHV-2 可感染金鱼、鲫及其普通变种,有试验证实 CyHV-2 可感染金鱼和鲤(*Cyprinus carpio*)的杂交体,但不能感染锦鲤^[8]。在已有的报道中,发现 CyHV-2 感染银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的唯一报道来源于匈牙利,说明银鲫对 CyHV-2 易感。而有关资料显示我国养殖的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂)因感染 CyHV-2 暴发严重的出血病,俗称“鳃出血”,造成重大损失。从病毒编码的解旋酶基因部分序列来看,同金鱼携带的 CyHV-2 序列一致。本文作者也在尝试以金鱼来源的 CyHV-2 人工感染异育银鲫,以证实 CyHV-2 同鲫暴发性出血病之间的关联。异育银鲫 CyHV-2 的感染来源于金鱼、母本(方正银鲫)或者其他途径? 急需进一步的流行病学调查。

总之,本研究的结果证实 CyHV-2 在我国已有较为广泛的分布,并可能扩散至其他养殖品种,如异育银鲫,并造成重大损失。该病毒的广泛分布及潜在危害性与目前对该病毒的重视程度严重不对等,应引起足够的重视。

参 考 文 献

- [1] 田飞檐,何俊强,王璐,等. 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, 2012, 29(4): 78-80.
- [2] GOODWIN A E, SADLER J, MERRY G E, et al. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection; case studies from commercial goldfish farms[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(3): 271-278.
- [3] GOODWIN A E, KHOO L, LAPATRA S E, et al. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (*Cyprinid herpesvirus 2*) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2006, 18(1): 11-18.
- [4] GOODWIN A E, MERRY G E, SADLER J. 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 Organism, 2006, 69(2): 137-143.
- [5] JEFFERY K R, BATEMAN K, BAYLEY A, et al. Isolation of a *Cyprinid herpesvirus 2* from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(11): 649-656.
- [6] 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(6): 1659-1667.

- [7] HANSON L, DISHON A, KOTLER M. Herpesviruses that infect fish [J]. *Viruses*, 2011(3):2160-2191.
- [8] HEDRICK R P, WALTZEK T B, MCDOWELL T S. 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*, 2006, 18(1):26-34.

Molecular surveillance of *Cyprinid herpesvirus 2* in goldfish cultured in China

LI Li-juan LUO Yang-zhi LIU Xue-qin GU Ze-mao YUAN Jun-fa
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Originally described from Japan, *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) was present in at least five other countries and probably has a global distribution in goldfish (*Carassius auratus*). Up to now, CyHV-2 has drawn little attention and is rarely reported in China. Recently, silver prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) farmed in Yancheng, Jiangsu Province, was reported by news to be infected by CyHV-2 and caused heavy economic losses. But little was known about the ways of virus transmission, potential reservoirs and sources of infection for this newly emerged virus. Goldfish can be a source of infection by carrying CyHV-2 but showing no clinical symptom. To understand the epidemiology of CyHV-2 in China, healthy goldfish from markets in different districts were tested for CyHV-2 by degenerate polymerase chain reaction of the viral polymerase gene followed by sequencing. Results demonstrated that CyHV-2 has a wide geographic distribution in China. Molecular study indicated that the sequences of DNA polymerase encoded by CyHV-2 isolated from goldfish in China were identical with the published sequence for CyHV-2. The helicase sequences of CyHV-2 from goldfish were also partially identical with those from silver prussian carp cultured in China, suggesting that the virus carried by goldfish and silver prussian carp were the same. Between the isolates from goldfish and H. Fukuda from Japan, there was only one or two residues difference in the amino acid sequence of helicase or intercapsomeric triplex protein, suggesting that the two isolates of CyHV-2 were highly similar, but not the same.

Key words *Cyprinid herpesvirus 2*; *Koi herpesvirus*; epidemiology; goldfish

(责任编辑:边书京)