

一例异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 暴发性出血病病原分析*

袁雪梅 潘晓艺 郝贵杰 刘 莉 吕孙建 蔺凌云 沈锦玉

(农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要 2016 年 6 月, 江苏某异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)养殖场暴发一种传染性急性出血病, 造成养殖银鲫大量死亡。为分析此次疾病病因及流行规律, 本研究从发病养殖场采集患出血病的异育银鲫, 从细菌、病毒及寄生虫三个方面对病原进行了分析。采用病原菌分离、组织病理学观察、超薄切片电镜观察、病毒核酸分析、回感实验等对病原进行鉴定。结果显示从发病鲫鱼体内分离到病毒一株, 未发现寄生虫及细菌感染。经测序及序列分析, 该病毒为鲤疱疹病毒 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)病毒, 组织病理学观察结果显示患病鱼的鳃和肾脏有明显病变, 电镜下可观察到病鱼脾脏组织有带囊膜的球形病毒, 囊膜直径约为 170—200nm, 病毒衣壳直径约为 110—120nm, 核心直径约为 60nm, 用组织匀浆感染鲫鱼囊胚细胞系(CGB)可稳定地观察到典型的细胞病变, 用患病鱼组织匀浆液人工感染异育银鲫的死亡率达 100%, 荧光定量 PCR 检测到该病毒可感染多器官, 其中以脾脏中病毒含量最高, 其次是脑, 肝脏中最少。本研究可为 CyHV-2 的诊断防控及疫苗研制提供资料。

关键词 异育银鲫; 暴发性出血病; 病毒分离鉴定; 人工感染

中图分类号 S917.1 **doi:** 10.11693/hyhz20190100021

鲤疱疹病毒 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)是第2个分离自鲤科鱼的疱疹病毒, 因此国际上将其命名为鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)。其对金鱼、鲫鱼及其变种具有很高的致病性。1992 年秋和 1993 年春在日本的观赏金鱼中检出 CyHV-2, 这是该病毒首次被发现报道(Jung *et al.*, 1995)。第一次在银鲫体内被检出报道是在 2011 年的匈牙利(Doszpoly *et al.*, 2011), 随后, 关于 CyHV-2 感染异育银鲫的报道逐渐增多(Daněk *et al.*, 2012; Fichi *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016)。Wang 等于 2012 年首次报道了 CyHV-2 感染我国异育银鲫, 该病病程发展迅速, 死亡率高达 90%—100%, 严重威胁我国鲫鱼养殖业(Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013)。本文针对出现在江苏省某养殖场异育

银鲫的暴发性出血病, 通过细菌、病毒、寄生虫等检测方法, 阐明该病样的主要病原, 可为今后异育银鲫病害防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

发病异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)采自江苏盐城某异育银鲫养殖场, 共 40 尾, 体长 20—25cm。健康异育银鲫购自浙江湖州某异育银鲫养殖场, 体长 12cm 左右, 经检测为 CyHV-2 阴性。暂养于本实验室循环养殖系统, 水温控制在 23—25℃。

鲫鱼囊胚细胞系(CGB)由国家水生动物病原库馈赠。M199 培养基胰酶为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州天杭生物科技有限公司。pMD-18T 购于

* 浙江省自然科学基金资助项目, LY16C190001 号; 浙江省重点研发计划, 2019C02058 号; 2019 年浙江省省属科研院所扶持专项, 2019YSZX001 号。袁雪梅, 助理研究员, E-mail: 179506607@qq.com

通信作者: 沈锦玉, 研究员, E-mail: sjinyu@126.com

收稿日期: 2019-01-23, 收修改稿日期: 2019-04-07

TaKaRa 公司, 2.5%戊二醛购自 Sigma 公司, GoTaq[®] Master Mixes 购自 Promage 公司, 质粒 DNA 少量抽提试剂盒购自 axygen 公司, SuperReal PreMix (Probe) 试剂盒购置天根生化科技有限公司, 组织 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 细菌的分离及寄生虫观察

随机选取病鱼10尾, 在无菌条件下取病鱼的肝脏、脾脏、肾脏等病灶组织, 在TSA平板划线分离, 28℃培养24—48h, 观察有无细菌生长。对随机选取的20尾病鱼进行鳍条、鳃、体表黏液、肝、脾、肾等组织器官的肉眼检查和压片显微镜检, 血液制成涂片显微镜检, 观察有无寄生虫。

1.3 组织病理变化观察

取病鱼的鳃、肾脏组织, 置于10%的中性福尔马林中固定, 石蜡包埋切片, H.E染色后中性树胶封片, 显微镜下观察并拍照。

1.4 透射电镜样本制备及电镜观察

取病鱼脾脏组织切成小块, 体积不超过1mm×1mm×1mm, 将小组织块迅速投入 2.5%戊二醛中固定, 经磷酸盐缓冲液冲洗后, 1%锇酸固定。酒精系列脱水, 苯二甲酸二丙酯包埋, 制备超薄切片, 在 Tecnai G2 20 Twin 透射电镜下观察和拍片。

1.5 病毒分离培养

收集病鱼肝脏、脾脏、肾脏及脑等组织, 按照1:10的体积比(*V/W*)加入含有双抗的无菌PBS (100μg/mL青霉素, 100μg/mL链霉素), 用玻璃匀浆器碾磨充分后, 置于4℃过夜处理, 4℃、12000r/min离心30min, 取上清, 用M199进行10倍、100倍稀释后, 分别取1mL加入长至单层的CGB细胞中, 24℃孵育1.5h, 弃上清, 再补加5mL细胞维持液(含有2%胎牛血清),

24℃静置培养, 每天观察细胞病变情况。

1.6 病毒人工感染试验

无菌状态下取病鱼的脑、肝脏、脾脏、肾脏等内脏组织, 冰浴上用玻璃匀浆器充分匀浆, 随后按照 1:10 的比例加入含有双抗(100μg/mL 青霉素, 100μL/mL 链霉素)的灭菌 PBS 缓冲液制成匀浆液, 4℃过夜后, 4℃、12000r/min 离心 30min, 取上清对健康异育银鲫进行攻毒, 每尾经腹腔注射 0.5mL, 对照组注射相同剂量的无菌 PBS, 每组 20 尾。实验期间水温控制在 23—26℃。每日观察, 连续 3 周。

1.7 病毒 PCR 鉴定及序列分析

分别提取自然发病鱼、人工感染鱼、健康鱼组织以及感染CGB细胞的DNA, 使用NanoDrop ND 2000 测定DNA的浓度及纯度。CyHV-2的PCR检测方法参照文献(Goodwin *et al*, 2006a; Jeffery *et al*, 2007; Waltzek *et al* 2009; Sahoo *et al*, 2016)的方法进行, 根据世界动物卫生组织(OIE)上推荐引物(TK)用于检测 CyHV-3, 引物信息见表1。反应体系为50μL: DNA 1μL, 上下游引物(10μmol/L)各0.5μL, GoTaq[®] Master Mixes 25μL, 灭菌超纯水23μL。扩增反应热循环参数为: 95℃ 2min, 95℃ 30s, 退火30s(温度参照表1), 72℃ 30s, 30个循环; 72℃延伸10min。取5μL PCR产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳观察结果。选取编号1—3的引物阳性扩增产物送南京金斯瑞公司测序, 测序结果通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析。系统进化树依据DNA聚合酶基因部分氨基酸序列绘制, 将测得的聚合酶基因序列翻译为氨基酸序列, 并与GenBank数据库中其他疱疹病毒代表种的DNA聚合酶基因的氨基酸序列进行比较分析, 多重比对采用ClustalW软件, 用MEGA 7.0构建系统发育树。

表 1 实验中所用引物信息
Tab.1 The details of the primers used in this study

编号	引物名称	序列(5'—3')	退火温度(℃)	扩增片段(bp)
1	CyHVpol-F	CCCAGCAACATGTGCGACGG	55	PCR 检测 CyHV-2
	CyHVpol-R	CCGTARTGAGAGTTGGCGCA		
2	CyHV-2Hel-F	GGACTTGCGAAGAGTTTGATTCTAC	60	
	CyHV-2Hel-R	CCATAGTCACCATCGTCTCATC		
3	CyHV-2 GW-F	TCGGTTGGACTCGGTTTGTG	58	
	CyHV-2 GW-R	CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG		
4	CyHV-3Gray Sph-F	GACACCACATCTGCAAGGAG	55	PCR 检测 CyHV-3
	CyHV-3Gray Sph-R	GACACATGTTACAATGGTCGC		
	CyHV-2-F	TCGGTTGGACTCGGTTTGTG		
5	CyHV-2-R	CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG	58	荧光定量 PCR 检测 CyHV-2
	CyHV-2-Prober	FAM-CCGCTTCCAGTCTGGGCCACTACC-BHQ1		

1.8 TaqMan 荧光定量 PCR 方法测定 CyHV-2 拷贝数

CyHV-2 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法参照文章(Goodwin *et al.*, 2006b)进行, 引物及探针信息见表 1。反应体系包括: 标准品或者检测样品的 DNA 1 μ L, 2 $\times$ SuperReal PreMix (Probe) 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L, 探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye*3 0.2 μ L, 补充水至 20 μ L。PCR 反应参数如下: 95 $^{\circ}$ C 2min; 58 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 45s、95 $^{\circ}$ C 30s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min。每个待检样品及标准品稀释度做 3 个重复, 同时设立阴性对照。荧光定量 PCR 反应结束后, 根据标准品与 Ct 值的相关性, 绘制标准曲线, 用于未知样品中病毒拷贝数的换算。

1.9 不同组织中病毒含量的测定

按 1.6 中的方法对健康异育银鲫进行攻毒, 取濒死鱼的肝脏、脾脏、肾脏、脑、鳃、心、肠道等组织, 提取各组织 DNA, 应用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法检测各组织中 CyHV-2 的拷贝数。

2 结果与分析

2.1 临床症状和病原检测

观察患病异育银鲫的主要临床症状为体表出血, 鱼下颌和腹部充血。解剖开来可见鳃丝出血, 肝脾肾肿胀, 并带有白色小结节, 鱼鳔出现点状出血(图 1)。

病鱼的肝脏、脾脏及肾脏接种平板培养未见优势菌落。显微镜下观察发病鱼的鳍条、鳃、内脏及血液未见有寄生虫感染。



图 1 患病异育银鲫解剖症状

Fig.1 The autopsy symptoms of diseased gibel carp

2.2 组织病理学观察

组织病理切片观察患病鱼鳃丝充血肿胀(✓1), 鳃小片充血(✓2), 鳃小片上皮细胞脱落坏死(✓3)。肾脏周围间隙组织内出血(✓4), 肾小管上皮细胞结构紊乱, 细胞内长出新核(✓5), 管腔变狭小, 有凝固性坏死现象(✓6)(图 2)。

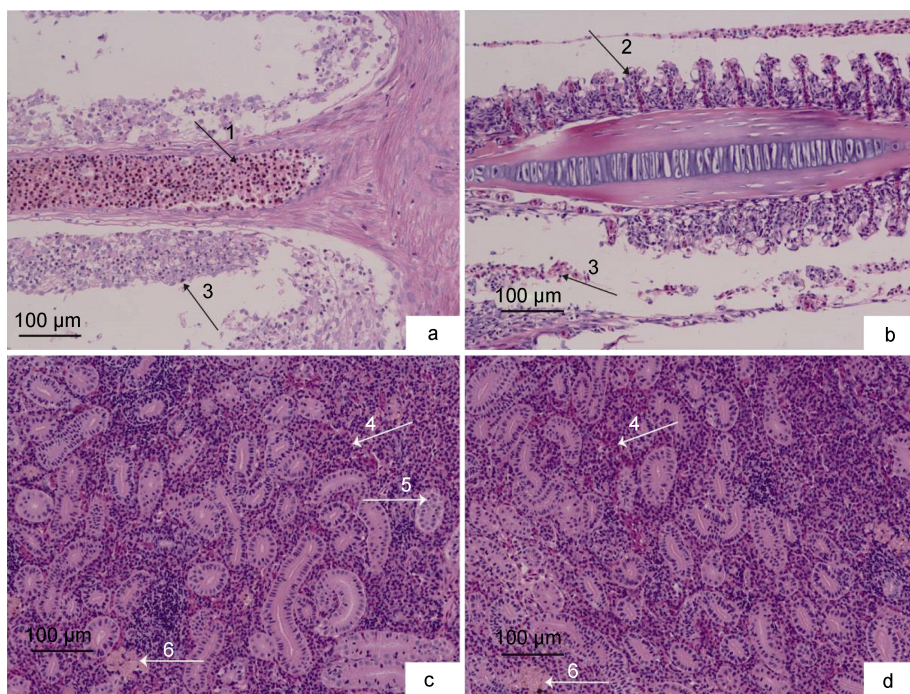


图 2 患病异育银鲫组织病理变化

Fig.2 Histopathological changes of diseased crucian carp

注: a. 患病鱼鳃丝腐烂; b. 鳃丝肿胀; c、d. 肾脏病变

2.3 病毒形态观察

制备患病鱼肾脏组织超薄切片，电镜下可观测大量球形病毒颗粒(图 3)(白色箭头所示)。病毒为近似球形的具囊膜的病毒，囊膜直径 170—200nm，病毒衣壳直径 110—120nm，核心直径约为 60nm。

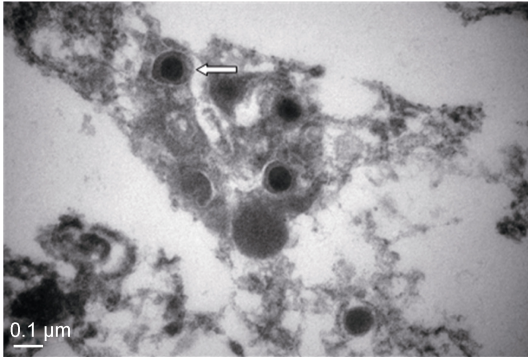


图 3 患病鱼脾脏组织中的病毒颗粒(标尺=100nm)
Fig.3 The virus in spleen tissues of diseased fish (bar=100nm)

2.4 病毒分离培养

患病鱼组织浆接种 CGB 细胞系，盲传 2 代即能产生明显的 CPE。感染 3d 后细胞出现收缩，6d 后胞间连丝清晰可见，部分细胞脱落，细胞单层开始破裂，第 8 天后可见细胞出现大面积脱落，漂浮，对照组细

胞培养至 20 天，未出现明显 CPE(图 4)。当接种病毒的细胞 CPE 达到 80%—90%时，收集细胞冻于-80℃，用于继续传代，当传至第 5 代时，CPE 消失。将分离的病毒株暂命名为 CyHV-2-JS 株。

2.5 病毒人工感染

人工感染 3 天后，异育银鲫开始发病，发病症状与自然发病鱼相同，呈现典型出血症状。第 4 天异育银鲫开始死亡，第 10 天累计死亡率达到 100%，对照组鱼未见死亡。

2.6 病毒 PCR 鉴定及序列分析

采用引物 CyHV pol-F/CyHV pol-R, CyHV-2Hel-F/CyHV-2Hel-R, CyHV-2 GW-F/CyHV-2 GW-R 对 DNA 模板进行了 PCR 检测，结果显示发病鱼、人工感染鱼及病毒细胞培养物均能扩增出 362、93 和 366bp 的特异性条带，结果为 CyHV-2 阳性，健康鱼均为阴性(图 5)。PCR 产物测序后经 BLAST 比对分析显示，其与 CyHV-2 其他毒株的相应基因序列同源性达到 100%。引物 CyHV-3Gray Sph-F/CyHV-3Gray Sph-R 扩增样本结果为阴性，说明病鱼样本不携带 CyHV-3。依据 DNA 聚合酶基因部分绘制系统进化树(图 6)，结果显示 CyHV-2-JS 株与其他 CyHV-2 病毒株属同一分支。

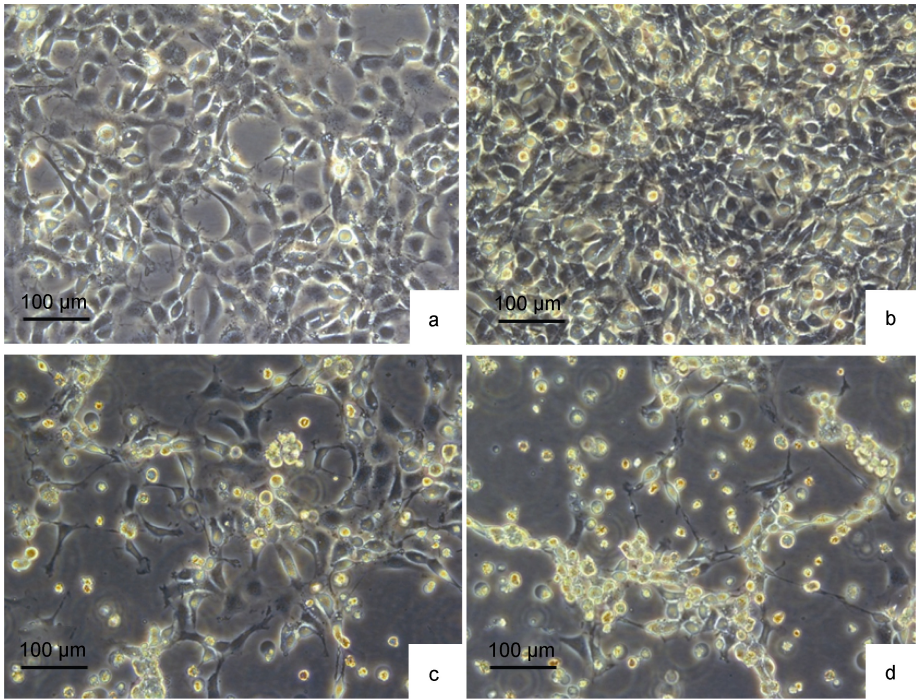


图 4 患病异育银鲫组织匀浆液接种 CGB 细胞单层引起的细胞病变效应
Fig.4 Cytopathic effect of CGB cell monolayer inoculated with diseased fish tissue homogenate filtrate
注: a. CGB 正常细胞单层; b. 接种病毒 3d 的细胞单层; c. 接种病毒 6d 的细胞单层; d. 接种病毒 8d 的细胞单层

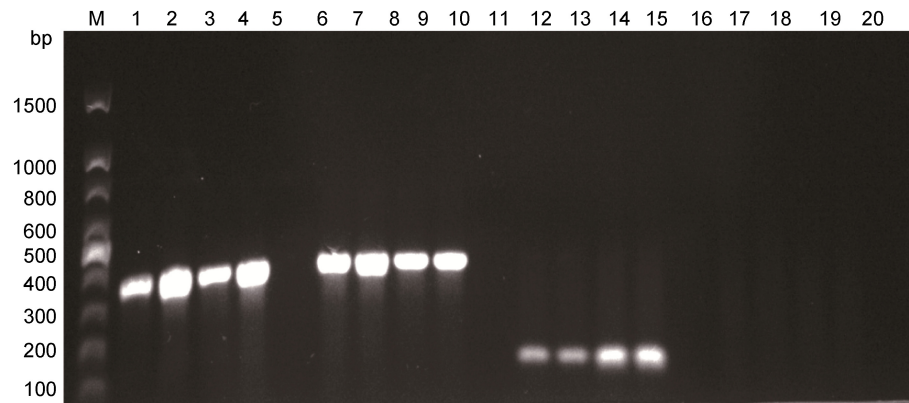


图 5 PCR 检测结果

Fig.5 Results of the PCR detection

注: M. DNA marker DL100; 1—2. 引物 CyHVpol-F/R 的扩增自然发病鱼结果; 3. 引物 CyHVpol-F/R 的扩增人工感染鱼结果; 4. 引物 CyHVpol-F/R 的扩增病毒细胞培养物结果; 5. 引物 CyHVpol-F/R 的扩增健康鱼结果; 6—7. 引物 CyHV-2Hel-F/R 扩增自然发病鱼结果; 8. 引物 CyHV-2Hel-F/R 扩增人工感染鱼结果; 9. 引物 CyHV-2Hel-F/R 扩增病毒细胞培养物结果; 10. 引物 CyHV-2Hel-F/R 扩增健康鱼结果; 11—12. 引物 CyHV-2 GW-F/R 的扩增自然发病鱼结果; 13. 引物 CyHV-2 GW-F/R 的扩增人工感染鱼结果; 14. 引物 CyHV-2 GW-F/R 的扩增细胞培养物结果; 15. 引物 CyHV-2 GW-F/R 的扩增健康鱼结果; 16—17. 引物 CyHV-3Gray Sph-F/R 的扩增自然发病鱼结果; 18. 引物 CyHV-3Gray Sph-F/R 的扩增人工感染鱼结果; 19. 引物 CyHV-3Gray Sph-F/R 的扩增细胞培养物结果; 20. 引物 CyHV-3Gray Sph-F/R 的扩增健康鱼结果

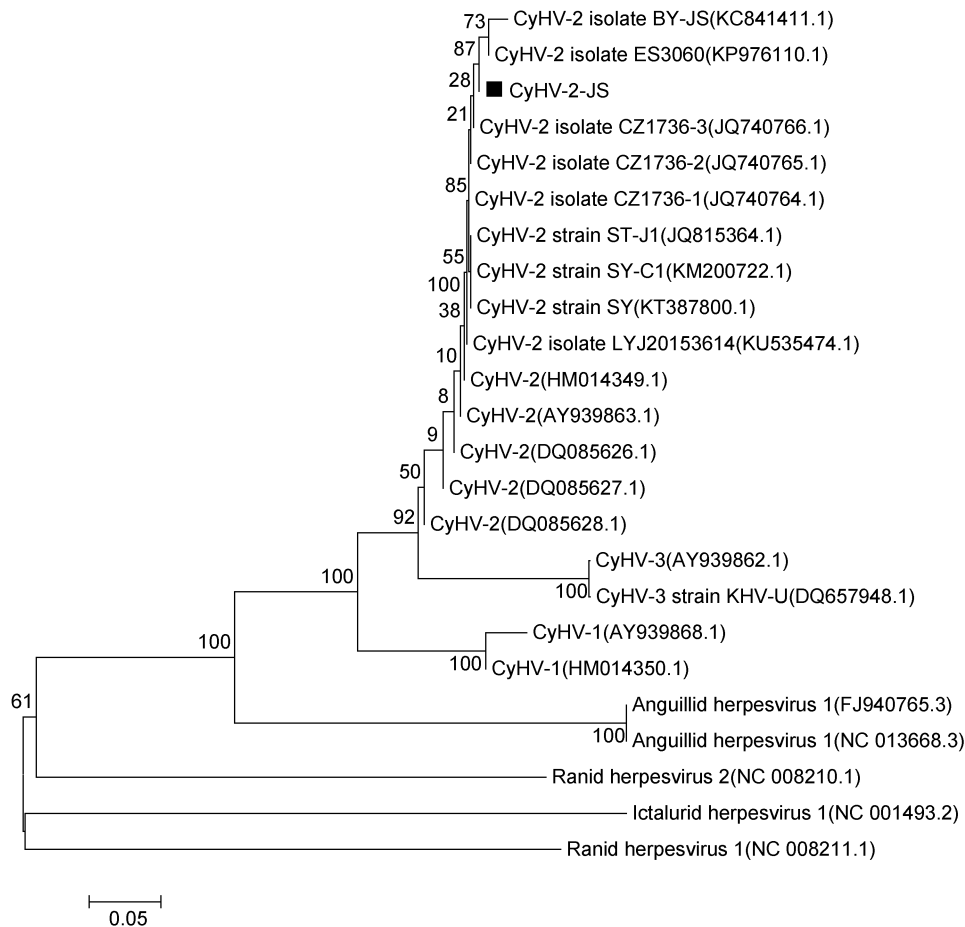


图 6 基于 CyHV-2 DNA 聚合酶基因部分序列同源性的系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic tree of CyHV-2 JS strain with other Cyprinivirus strains based on DNA polymerase gene partial sequence homologues

2.7 不同组织中病毒含量的测定

用 CyHV-2 病毒感染异育银鲫, 取濒死鱼的肝脏、脾脏、肾脏、脑、鳃、心、肠道等组织, 进行 Real-time PCR 检测各组织中 CyHV-2 的含量。如图 7 所示, 脾脏中病毒的含量最高, 为 $2 \times 10^{7.00}$ 个拷贝数, 其次是脑, 拷贝数为 $2 \times 10^{6.49}$ 。

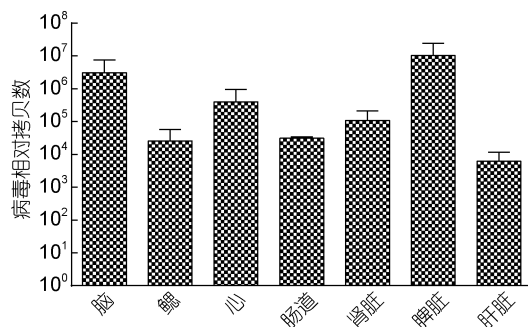


图 7 患病异育银鲫各组织中 CyHV-2 相对拷贝数
Fig.7 The relative copies of CyHV-2 in different tissues of diseased crucian carp

3 讨论

异育银鲫因其食性杂、抗逆性好、肉质鲜美、营养价值高等特点, 深受广大养殖者与消费者喜爱。据 2018 年渔业年鉴统计(农业农村部渔业渔政管理局等, 2018), 2017 年我国养殖鲫鱼产量达 281 多万吨, 其中江苏省养殖鲫鱼产量超过 62 万吨, 为我国鲫鱼的主要养殖地区。然而, 自 2009 年以来, 在江苏省鲫鱼主养区域连年发生养殖鲫鱼暴发性死亡的出血性疾病, 造成重大经济损失。本次病例发生于江苏盐城一鲫鱼养殖厂, 在疾病暴发过程呈现出许多症状特点与之前国内外报道的金鱼、鲫鱼感染 CyHV-2 相似, 如体表呈典型性出血症状, 剖检见脾和肾肿大充血, 鱼鳃点状出血, 电镜下观察到患病鱼脾脏组织超薄切片存有病毒颗粒, 其大小、形状方面的特征与已报道的 CyHV-2 分离株一致(Goodwin *et al.*, 2006a; Jeffery *et al.*, 2007; Waltzek *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; 徐进等, 2013; Xu *et al.*, 2013; 李茂等, 2015; Sahoo *et al.*, 2016), 组织病理切片观察到患病鱼鳃小片上皮脱落坏死, 与 Fichi 等(2013)、姚卓凤(2015)的研究结果相似, 肾脏组织内出血及凝固性坏死现象与已有报道描述一致(Fichi *et al.*, 2013; Lovy *et al.*, 2014), PCR 扩增分离病毒的 DNA 聚合酶基因, 产物测序结果经 Blast 同源性分析, 发现其与其他 CyHV-2 分离株同源性为 100%, 表明该基因在遗传上具有保守性。该病毒人工感染鲫

鱼, 死亡率达到 100%, 说明其具有高致病性。学者们最初发现在患病金鱼的脾脏、体肾细胞中存有该病毒(Jung *et al.*, 1995; Groff *et al.*, 1998), 而后有报道在患病异育银鲫的体肾、脾脏、头肾、肝胰脏、肠道、鳃均检测到 CyHV-2 核酸(Xu *et al.*, 2013), 林秀秀等(2016)用透射电镜观察到在患病异育银鲫的肾脏、脾脏、鳃中含有病毒粒子。本实验采用荧光定量 PCR 方法检测患病鱼各个组织中病毒含量, 结果显示脾脏组织中病毒含量最高, 为 $2 \times 10^{7.00}$ 个拷贝数, 其次是脑, 拷贝数为 $2 \times 10^{6.49}$, 这一结果说明这两个组织适合该病毒增殖, 可考虑用于该病毒易感细胞系的建立。

气单胞菌的一些成员单独(王利等, 2013; 耿昕颖等, 2016)或与 CyHV-2 混合感染(Fichi *et al.*, 2013; 蒋新益, 2016; Sahoo *et al.*, 2016)可引起银鲫发病。患病鱼鳍基部、腹部、下颌骨等部位出血, 呈现出与 CyHV-2 单独感染相似的体表症状, 给疾病的临床诊断带来困难。为确保病原分析的正确性, 本研究从寄生虫、细菌及病毒三个方面对病原进行排查, 显微镜下观察患病鳃、鳍及体表均无寄生虫, 取病鱼组织病灶接种 TSA 平板, 无优势菌落形成, 说明引起本次疾病的病原应为病毒而非寄生虫或细菌。根据已有报道, 在国内引起异育银鲫发病的病毒有两种, 一种为疱疹样病毒, 可引发异育银鲫上皮瘤病, 该病主要症状表现为在病鱼鳞片、鳍及鳃盖的表面出现上皮瘤, 死亡率低, 是一种低温季节发生的疾病(Lu *et al.*, 2009), 另一种病毒即为引起异育银鲫患出血性疾病暴发性死亡的 CyHV-2, 对照本病例患病银鲫高死亡率及体表不同程度出血等特征, 可排除病原为疱疹样病毒的可能, 而进一步的 PCR 检测证实引发该病的病原为 CyHV-2。

CyHV-2 作为疱疹病毒的成员, 具有潜伏感染这一重要特征(李祥敏等, 2001), 温度是影响该病毒复制的关键因素, 本研究在对异育银鲫进行 CyHV-2 人工感染时, 发现水温在 22—24℃ 时, 被感染鱼死亡率最高, 达到 100%, 超出这一温度范围, 死亡率下降。Wang 等(2012)发现当水温低于 15℃、高于 26℃ 时, CyHV-2 潜伏感染于鱼体内, 被感染鱼与正常鱼无明显差别, 当水温 15—26℃ 之间时, 被感染鱼表现出临床正常, 且死亡率随着水温升高而急剧攀升。本实验室自 2015 年起参加农业部水产动物疫病监测项目, 负责浙江地区 CyHV-2 的监测, 在项目实施过程中也发现浙江地区养殖鲫鱼存在携带 CyHV-2 但不发病的

情况。这些情况说明病毒监测及早期诊断的重要性,并提示我们探索温度对CyHV-2复制的调控机制可为疾病防控提供一个突破口。

4 结论

本文对江苏省某养殖场异育银鲫暴发性出血病进行病原分析,证明引起该病暴发的原因为鲤疱疹病毒型病毒,本研究结果可为鲫造血器官坏死症的诊断提供参考,也为今后疫苗的研制及鲤疱疹病毒型病毒病防控奠定基础。

参 考 文 献

- 王 利, 魏 勇, 2013. 鲫鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及耐药表型检测. 黑龙江畜牧兽医, (2): 101—103
- 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会, 2018. 2018 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社
- 李 茂, 肖 丹, 刘天强等, 2015. 鲤科疱疹病毒 II 型射阳株的分离与鉴定. 淡水渔业, 45(3): 93—96
- 李祥敏, 金梅林, 陈焕春, 2001. 疱疹病毒潜伏感染与细胞凋亡关系的研究进展. 动物医学进展, 22(4): 32—35
- 林秀秀, 叶元土, 吴 萍等, 2016. 异育银鲫造血器官坏死症病体内鲤疱疹病毒型的电镜观察与超微病理学特征. 水产学杂志, 29(1): 17—23
- 姚卓凤, 2015. 鲫感染鲤疱疹病毒的组织病理学研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 26—31
- 耿昕颖, 王家祯, 董文龙等, 2016. 异育银鲫嗜水气单胞菌的分离鉴定与病理组织学观察. 中国兽医杂志, 52(4): 109—112
- 徐 进, 曾令兵, 杨德国等, 2013. 鲤疱疹病毒 2 型武汉株的分离与鉴定. 中国水产科学, 20(6): 1303—1309
- 蒋新益, 2016. 射阳地区异育银鲫大红鳃病与鲫造血器官坏死病病原研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 25—30
- Daněk T, Kalous T, Veselý T *et al*, 2012. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). Diseases of Aquatic Organisms, 102(2): 87—95
- Doszpöly A, Benko M, Csaba G *et al*, 2011. Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. Magyar Allatorvosok Lapja, 133(3): 174—181
- Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C *et al*, 2013. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.) in Italy. Journal of Fish Diseases, 36(10): 823—830
- Goodwin A E, Khoo L, Lapatra S E *et al*, 2006a. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish. Journal of Aquatic Animal Health, 18(1): 11—18
- Goodwin A E, Merry G E, Sadler J, 2006b. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (Cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method. Diseases of Aquatic Organisms, 69(2): 137—143
- Groff J M, Lapatra S E, Munn R J *et al*, 1998. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 10(4): 375—378
- Ito T, Maeno Y, 2014. Susceptibility of Japanese Cyprininae fish species to Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). Veterinary Microbiology, 169(3—4): 128—134
- Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, *et al*, 2007. Isolation of a Cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. Journal of Fish Diseases, 30(11): 649—656
- Jung S J, Miyazaki T, 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Diseases, 18(3): 211—220
- Lovy J, Friend S E, 2014. Cyprinid herpesvirus-2 causing mass mortality in goldfish: applying electron microscopy to histological samples for diagnostic virology. Diseases of Aquatic Organisms, 108(1): 1—9
- Lu H D, Zhu G L, Fan L P *et al*, 2009. Etiology and pathology of epidermal papillomas in allogynogenetic crucian carp *Carassius auratus gibelio* (♀) × *Cyprinus carpio* var. *singonensis* (♂). Diseases of Aquatic Organisms, 83(1): 77—84
- Luo Y, Lin L, Liu Y *et al*, 2013. Haematopoietic necrosis of cultured Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch), associated with Cyprinid herpesvirus 2. Journal of Fish Diseases, 36(12): 1035—1039
- Sahoo P K, Swaminathan T R, Abraham T J, *et al*, 2016. Detection of goldfish haematopoietic necrosis herpes virus (Cyprinid herpesvirus-2) with multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish: First evidence of any viral disease outbreak in ornamental freshwater aquaculture farms in India. Acta Tropica, 161: 8—17
- Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E *et al*, 2009. Development of a polymerase chain reaction assay to detect Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. Aquatic Animal Health, 21(1): 60—67
- Wang H, Xu L J, Lu L Q, 2016. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis. Journal of Fish Diseases, 39(2): 155—162
- Wang L, He J G, Liang L *et al*, 2012. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 32(5): 164—173
- Xu J, Zeng L B, Zhang H *et al*, 2013. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. Veterinary Microbiology, 166(1—2): 138—144

ANALYSIS OF PATHOGEN IN AN EXPLOSIVE HEMORRHAGE DISEASE OF *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

YUAN Xue-Mei, PAN Xiao-Yi, HAO Gui-Jie, LIU Li, LÜ Sun-Jian, LIN Ling-Yun, SHEN Jin-Yu
(Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract In June 2016, local farmers suffered from substantial losses of *Carassius auratus gibelio*, or gibel carp in yield due to an outbreak of an acute hemorrhagic disease in Jiangsu Province, China. To understand the prevalence and etiological factor of this disease, ill fish were collected and the pathogens including bacteria, virus, and parasite were diagnosed simultaneously. A comprehensive analysis in histopathology, pathogen isolation, quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and transmission electron microscope (TEM) observation was conducted to identify the accurate pathogen. A strain of cyprinid herpesvirus (CyHV-2) was successfully isolated from an ill gibel carp in which serious lesion was observed in gill and kidney; however, no bacterium nor parasite was identified. In the TEM images, a spherical virion was clearly observed in spleen in nucleus diameter of 60nm, envelope diameter of 170—200nm, and capsid diameter of 110—120nm. In addition, *C. auratus* embryo cell line (CGB) was infected by virus and obvious cytopathic effect was observed. Artificial infection demonstrated that the virus injection led to 100% mortality rate; and the highest virus concentration was found in spleen. This research offers useful information beneficial to the development of vaccine and diagnostic products.

Key words *Carassius auratus gibelio*; acute septicemia; virus isolation and identification; artificial infection