

天津地区养殖鲤鱼(*Cyprinus carpio*)鲤浮肿病毒(CEV)PCR 检测与人工感染试验*

刘 群¹ 韩进刚¹ 王 菁¹ 张 丹² 霍文慧¹ 陈浩楠¹ 耿绪云¹ 孙金生¹

(1. 天津市水生动物疫病预防控制中心 天津 300221; 2. 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津农学院 天津 300384)

摘要 对 2015—2016 年天津地区鲤鱼养殖场采集的发生鲤浮肿病毒(CEV)/锦鲤睡眠病(KSD)的鲤鱼样品,进行套式 PCR 检测和人工浸泡感染试验,并测定养成期鲤鱼感染率。实验观察研究发现,所采集样品均表现为体色发黑,头部上方颅骨软组织周围皱缩,眼球凹陷,鳃粘脏,黏液较多,常滞游于浅水区水面。套式 PCR 检测结果显示全部 10 个样品均出现特异性目的条带,为 CEV 阳性。目的产物测序后经 NCBI BLAST,与已报道的 CEV 相关序列相似性介于 85%—99%;系统发育树分析显示样品编号 JY1856 与 JY1650 位于同一分支,与已知 CEV 病毒株亲缘关系较近,而其余 8 个样品位于同一分支,与已知 CEV 病毒株亲缘关系较远。通过人工浸泡感染健康鲤鱼,半数致死时间为 55d,累计死亡率为 71.1%±3.2%,并从试验感染鱼组织中检测到 CEV 病毒 DNA。养成期鲤鱼 CEV 携带率为 77.5%。以上结果表明,天津地区养殖鲤鱼中存在 CEV 感染,揭示了我国鲤鱼养殖产业可能面临新的疫情,需引起养殖业的高度重视。

关键词 鲤浮肿病毒(CEV)/锦鲤睡眠病(KSD);套式 PCR;系统发育树;人工感染试验

中图分类号 S941; S965.1 doi: 10.11693/hyhz20171100281

鲤浮肿病毒(Carp Edema Virus, CEV)被认为是锦鲤睡眠病(koi sleepy disease, KSD)的致病原(Oyamatsu *et al*, 1997a; Adamek *et al*, 2016),该病原最初发现于 20 世纪 70 年代日本养殖的稚鱼期锦鲤(*Cyprinus carpio*)。此病发生于每年 6 月至 7 月,患病鱼通常在池塘角落、岸边或进水口处漂浮,病鱼身体呈浮肿状,尤其尾柄部呈白色不透明状,眼球凹陷,鳃丝呈棍棒化,有明显黏连现象,发病鱼死亡数量会急剧增多,数日内即可造成大量死亡(Ono *et al*, 1986; Oyamatsu *et al*, 1997b; Amita *et al*, 2002; Miyazaki *et al*, 2005; 畑井喜司雄等, 2007)。病毒学研究证实,CEV 存在于细胞质内,粒子直径约 250—280nm,并且带有外观形似桑葚样的囊膜(Ono *et al*, 1986; Oyamatsu *et al*, 1997b; Miyazaki *et al*, 2005),同时,在粒子内部存在有拟核,基于此,有学者认为其同香鱼痘病毒(ayu poxvirus)、大马哈鱼鳃痘病毒(salmon

gill poxvirus)归属于痘病毒科 Poxviridae (Matras *et al*, 2016)。但查阅国际病毒分类命名委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)最新报告(King *et al*, 2012)发现,该报告现今未收录 CEV 的相关信息。

近年来,诸多国家如奥地利、捷克、德国、法国、荷兰、英国、意大利、波兰、巴西等,已在患病锦鲤或鲤鱼中检出 CEV (Way *et al*, 2013; Haenen *et al*, 2014; Jung-Schroers *et al*, 2015; Lewisch *et al*, 2015a, b; Pretto *et al*, 2015; Vesely *et al*, 2015; Viadanna *et al*, 2015)。在 2015 年第 19 届欧盟鱼类疾病参考实验室(European Union Reference Laboratory for Fish Diseases)年度研讨会上,锦鲤睡眠病(KSD)作为一种新出现的鱼类疾病,被认为应给予更多的关注,同时,亟需在欧盟域内国家开展疫病传播的风险评估(Haenen *et al*, 2015)。2013 年 6 月开始,针对天津地

*天津市水产局青年科技创新项目, J2018-07 号; 天津市教委科研计划项目, 2017KJ186 号。刘 群, 硕士, 工程师, E-mail: rhswdzn@126.com

收稿日期: 2017-11-06, 收修改稿日期: 2018-02-22

区鲤鱼大规模暴发性死亡,天津市水生动物疫病预防控制中心开展相应的流行病学调查工作,主要检测细菌、寄生虫、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)和金鱼造血器官坏死病毒(CyHV-II),但结果均为阴性。2015年7月,我中心在发病鲤鱼中首次检出CEV,此前,该病毒在我国养殖锦鲤和鲤鱼均未检出,亦没有相关的报道。本研究旨在分析天津地区养殖鲤鱼携带CEV的情况,并分析其与国际上发现的CEV毒株的进化关系。研究结果揭示我国鲤鱼养殖产业可能面临新的疫情,该疫病的出现会严重制约鲤鱼养殖业的发展,需引起养殖业的高度重视。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

2015年7月、2016年6—7月自天津地区某淡水鱼养殖场采集发病鲤鱼,个体大小20—30cm,发病鱼养殖池塘中混养有其它品种鱼类,包括鲢鱼、鲫鱼、草鱼,养殖水温25—28℃。于实验室采集病鱼新鲜组织样品,保存于-80℃。

1.2 DNA 提取

切取濒死发病鱼鳃组织于研钵,对样品进行组织研磨。挑取少量研磨液于1.5mL RNase-free 离心管,使用血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(DP304, TIANGEN)提取样品DNA,并经超微量核酸测定仪(IMPLEN, German)测定浓度及纯度。

1.3 CEV 套式 PCR

参考CEV套式PCR检测方法(Oyamatsu *et al.*, 1997a)进行样品检测,同时以健康鲤鱼基因组DNA作为阴性对照。

1.3.1 第1步PCR 在PCR管中加入2.5μL 10x *Ex Taq* PCR Buffer (Mg²⁺ free, TaKaRa)、2μL MgCl₂ (25mmol/L)、1.5μL dNTPs (10mmol/L)、引物F1 (20μmol/L)和R1 (20μmol/L)各1μL、0.5μL *Ex Taq* DNA聚合酶(5U/μL)、14.5μL RNase-free H₂O, 2μL 模板,扩增反应程序为:94℃ 2min; 94℃ 30s、58℃ 30s、72℃ 50s, 35个循环; 72℃ 5min, 4℃ 保温。

1.3.2 第2步PCR 在PCR管中加入2.5μL 10x *Ex Taq* PCR Buffer (Mg²⁺ free, TaKaRa)、2μL MgCl₂ (25mmol/L)、1.5μL dNTPs (10mmol/L)、引物F2 (20μmol/L)和R2 (20μmol/L)各1μL、0.5μL *Ex Taq* DNA聚合酶(5U/μL)、14.5μL RNase-free H₂O, 2μL 稀释10倍后的第1步PCR产物作为模板,扩增反应程

序为:94℃ 3min; 94℃ 20s、58℃ 20s、72℃ 20s, 35个循环; 72℃ 5min, 4℃ 保温。对上述两步PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像仪(Bio-RAD)照相。套式PCR检测所用引物序列信息见表1。

表1 CEV 套式 PCR 检测所用引物序列
Tab.1 Nested-PCR primers sequences for the detection of CEV

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增片段大小(bp)
F1	GCT GTT GCA ACC ATT TGA GA	547
R1	TGC AGG TTG CTC CTA ATC CT	
F2	GCT GCT GCA CTT TTA GGA GG	180
R2	TGC AAG TTA TTT CGA TGC CA	

1.4 序列测定及分析

将阳性PCR产物送往生物公司(金唯智,天津)进行序列测定,并利用MEGA6软件对测序所得序列进行分析以及系统发育树的构建。

1.5 人工浸泡感染试验

采用编号JY1650鳃组织样品按1:10比例加入TNEP缓冲液(含0.2mg/mL PMSF异丙醇溶液)研磨后,经差速离心取上清液,以0.22μm滤膜过滤除菌,采用组织液终浓度为10⁻³g/L浸泡1.5h的方式进行人工感染试验。试验对象为鲤鱼(体长14±2cm),试验期间水温(25±1.5)℃,并设置对照组。试验中,每一组设置两个重复,每个重复19尾鱼。

1.6 养成期鲤鱼CEV携带率检测

为跟踪了解养成期鲤鱼携带CEV情况,选取天津市宝坻区战备闸某淡水鱼养殖场作为采样地点。该养殖场曾于2015年7月出现仅有鲤鱼大量死亡,后经实验室方法诊断为CEV阳性。2016年9月随机采集40尾养成期鲤鱼进行CEV携带率检测,方法同1.3。

2 结果与分析

2.1 样品采集及观察

2015—2016年所采集的发病鲤鱼样品主要涉及天津地区4个涉农区(汉沽、宝坻、蓟州、静海)的淡水鱼养殖场,样品体长多集中在20—30cm(表2)。在养殖场发病池塘只有鲤鱼出现死亡情况,混养的其他品种(鲢鱼、鲫鱼、草鱼)未出现死亡。观察鲤鱼发病症状,与健康鲤鱼相比,发病鱼滞游于浅水区水面,体色发黑,头部上方颅骨软组织周围皱缩,眼球凹陷,鳃粘脏,黏液较多。解剖发现,病鱼肝胰脏发白,脾脏肿大,脑球表面颜色呈红色。

表 2 2015—2016 年鲤鱼样品采集信息一览表
Tab.2 Information list for carp sample in the studied regions, Tianjin, during 2015—2016

样品编号	采样日期(年.月.日)	采样地点	发病面积(ha)	体长(cm)
JY600	2015.07.09	汉沽	13.33	20—30
JY601	2015.07.09	汉沽	13.33	20—30
JY1605	2015.07.14	宝坻	1.33	20
JY1641	2015.07.28	宝坻	1.33	25—30
JY1650	2015.07.30	蓟州	0.87	30
JY1856	2016.06.08	宝坻	13.33	20
JY1857	2016.06.08	宝坻	13.33	20
JY1909	2016.07.04	宝坻	1.00	20
JY1965	2016.07.18	宝坻	1.33	20
JY1966	2016.07.18	静海	1.33	20
JY2012	2016.09.25	宝坻	13.33	29—35

2.2 病毒核酸分子检测

采用 CEV 套式检测方法(Oyamatsu *et al*, 1997a) 对 2015 年 7 月、2016 年 6—7 月采集的 10 份发病鱼样品进行检测, 第 1 步 PCR 反应结果表明, 只有源于 2015 年采集的编号为 JY1650 样品可扩增得到 547bp 目的条带(图 1a), 为阳性, 而其余样品均未获得此目的条带(图 1a, 图 1b); 第 2 步 PCR 反应显示, 10 个样品均能扩增出 180bp 目的条带(图 1a, 图 1b), 结果为

阳性。

2.3 DNA 序列比对与分析

对上述 Nested-PCR 第 1 次扩增产物及第 2 次扩增产物进行测序, 将所得序列(图 2)同 GenBank 登录号分别为 KM283182、KX186571 的 CEV DNA 序列进行 BLAST 比对分析(表 3), 结果本研究中样品 JY1650 第 1 步 PCR 产物所得序列(图 2a)与 KM283182、KX186571 对应序列相似性分别为 97%、

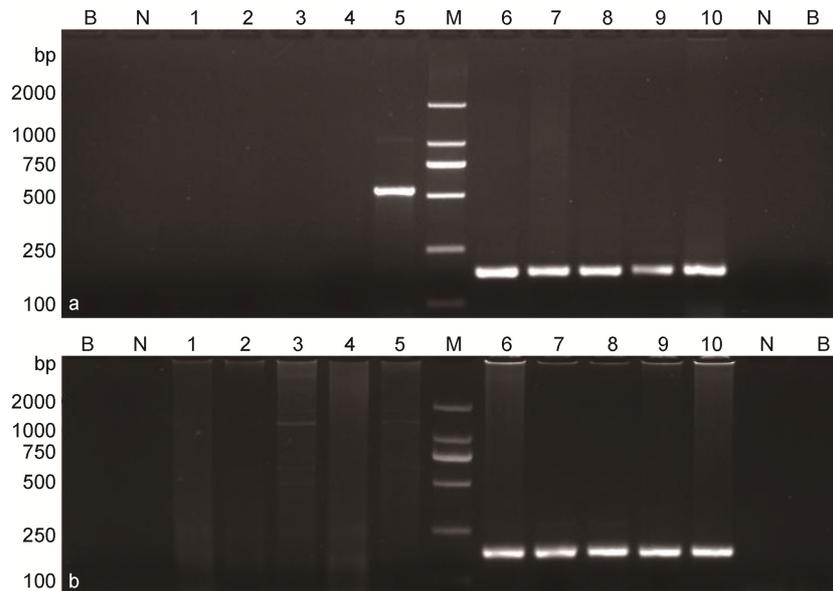


图 1 发病鲤鱼 CEV 套式 PCR 检测结果

Fig.1 Result of detecting CEV from the common carp by nested-PCR

注: M: DL 2000 Marker; N: 阴性对照; B: 空白对照; a: 2015 年发病鲤鱼样品套式 PCR 检测结果; 泳道 1—5: 分别为样品

JY600/JY601/JY1605/JY1641/JY1650 第 1 步 PCR 检测结果, 目的条带 547bp; 泳道 6—10: 分别为样品

JY600/JY601/JY1605/JY1641/JY1650 第 2 步 PCR 检测结果, 目的条带 180bp; b: 2016 年发病鲤鱼样品套式 PCR 检测结果; 泳道 1—5: 分

别为样品 JY1856/JY1857/JY1909/JY1965/JY1966 第 1 步 PCR 检测结果, 目的条带 547bp; 泳道 6—10: 分别为样品

JY1856/JY1857/JY1909/JY1965/JY1966 第 2 步 PCR 检测结果, 目的条带 180bp

99%, 该样品第 2 步 PCR 产物所得序列(图 2b)与以上两登录号对应序列相似性分别为 96%、98%; 样品 JY1856 第 2 步 PCR 产物所得序列(图 2b)与

KM283182、KX186571 对应序列相似性分别为 95%、96%; 其余样品第 2 步 PCR 所得产物序列(图 2b)与以上两登录号对应序列相似性分别都为 86%、85%。

表 3 发病鲤鱼 CEV PCR 产物测序序列与 KM283182、KX186571 序列的比对
Tab.3 Alignment of the sequences of PCR products of CEV and those of KM283182 and KX186571

来源	长度(bp)	比对对象	总分	查询覆盖率(%)	最大一致性(%)	相似性(%)
JY1650	507	KM283182	843	100	97	97
		KX186571	909	100	99	99
JY1650	140	KM283182	231	100	96	96
		KX186571	243	100	98	98
JY1856	140	KM283182	220	100	95	95
		KX186571	231	100	96	96
JY600	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY601	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1605	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1641	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1857	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1909	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1965	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85
JY1966	140	KM283182	154	100	86	86
		KX186571	143	100	85	85

2.4 系统发育树构建与分析

由第 1 步 PCR 产物序列构建系统发育树, 结果表明, JY1650 和 KX186571 病毒株聚为一支, 并且与 KM283182 病毒株位于一条主分支上。最终体现为 JY1650 与 GenBank No.KX186571 病毒株的亲缘关系较近, 而与 GenBank No.KM283182 病毒株的亲缘关系相对较远(图 3a)。

由第 2 步 PCR 产物序列构建系统发育树, 结果表明, JY1856、KM283182 病毒株首先从 JY1650、KX186571 病毒株的亲缘关系中分离出来, 位于一条分支上。在这条分支中, JY1856 与 KM283182 病毒株亲缘关系较近, 与 KX186571 病毒株关系较远; JY1650 与 KX186571 病毒株亲缘关系较近, 与 KM283182 病毒株关系较远。最终这一分支与 JY600、JY601、JY1605、JY1641、JY1857、JY1909、JY1965、JY1966 等 8 株病毒株一起位于一条主分支(图 3b)。

2.5 人工浸泡感染试验结果

实验过程中, 浸泡实验组部分死亡鱼体色发黑, 头部上方颅骨软组织周围皱缩, 眼球凹陷(图 4), 其表现症状与原始样品外观症状基本一致。经过 77d 试验, 试验对象不再死亡, 计算累计死亡率。结果, 浸泡实验组累计死亡率为 71.1%±3.2%, 对照组为 13.3%; 浸泡实验组半数致死时间(median lethal time, LT_{50})为 55d(图 5)。同时, 对试验所用鲤鱼进行 CEV 套式 PCR 检测方法(Oyamatsu *et al*, 1997a), 结果浸泡实验组 CEV 阳性检出率为 68.4%, 对照组未检出。

2.6 养成期鲤鱼 CEV 携带率检测结果

于 2016 年 9 月随机采集的养成期鲤鱼编号为 JY2012, 其平均体长为 32±3cm, 观察其外观未发现眼球凹陷、头部上方颅骨软组织周围皱缩等自然感染鲤浮肿病毒的发病鱼显著特征。

对养成期鲤鱼进行 CEV 套式 PCR 检测, 其中,

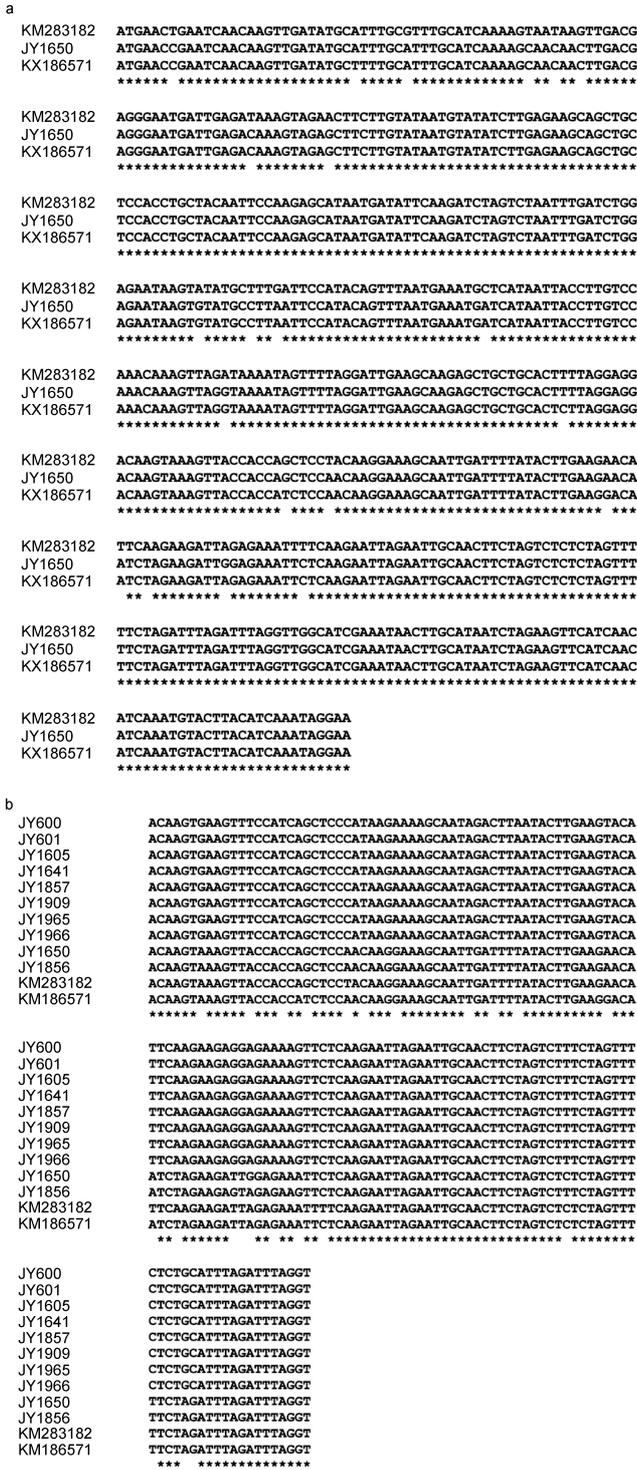


图2 MEGA6 软件多序列比对结果

Fig.2 Result of multiple sequence alignment according to MEGA6

注: a: 第 1 步 PCR 产物序列与 CEV 相关序列(KM283182、KX186571)比对结果; b: 10 个样品第 2 步 PCR 产物序列与 CEV 相关序列(KM283182、KX186571)比对结果

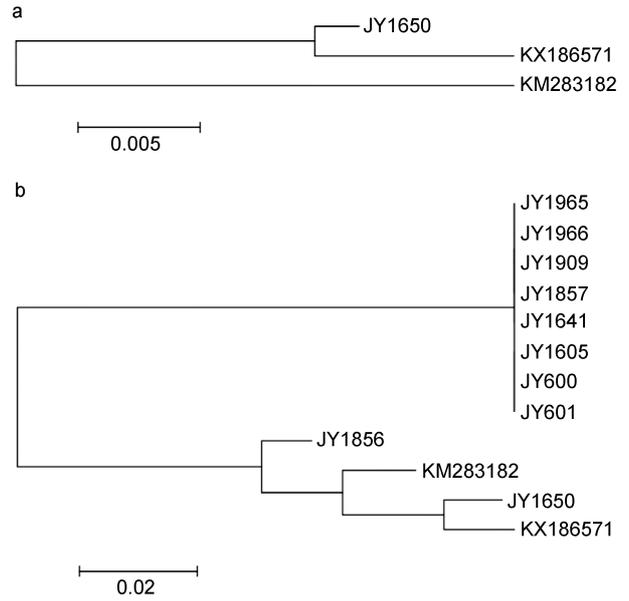


图3 基于 CEV 套式 PCR 产物序列同源性的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of CEV strains based on the sequences of the nested-PCR products

注: a: 基于第 1 次 PCR 扩增产物序列构建的系统发育树; b: 基于第 2 次 PCR 扩增产物序列构建的系统发育树



图4 人工浸泡感染试验死亡鱼观状

Fig.4 Apparent symptoms of the dead fish in immersion test

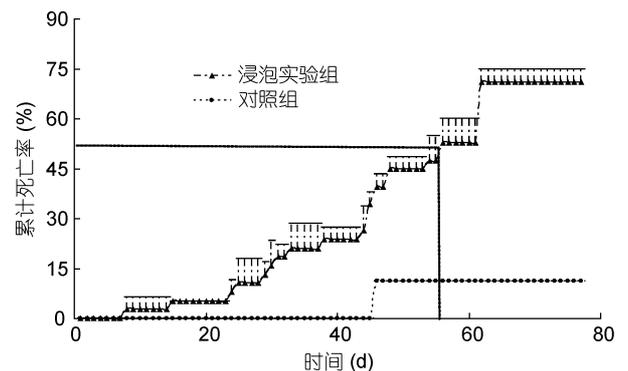


图5 样品 JY1650 人工感染试验累计死亡率与感染时间关系

Fig.5 Artificial infection of sample JY1650 with virus extraction

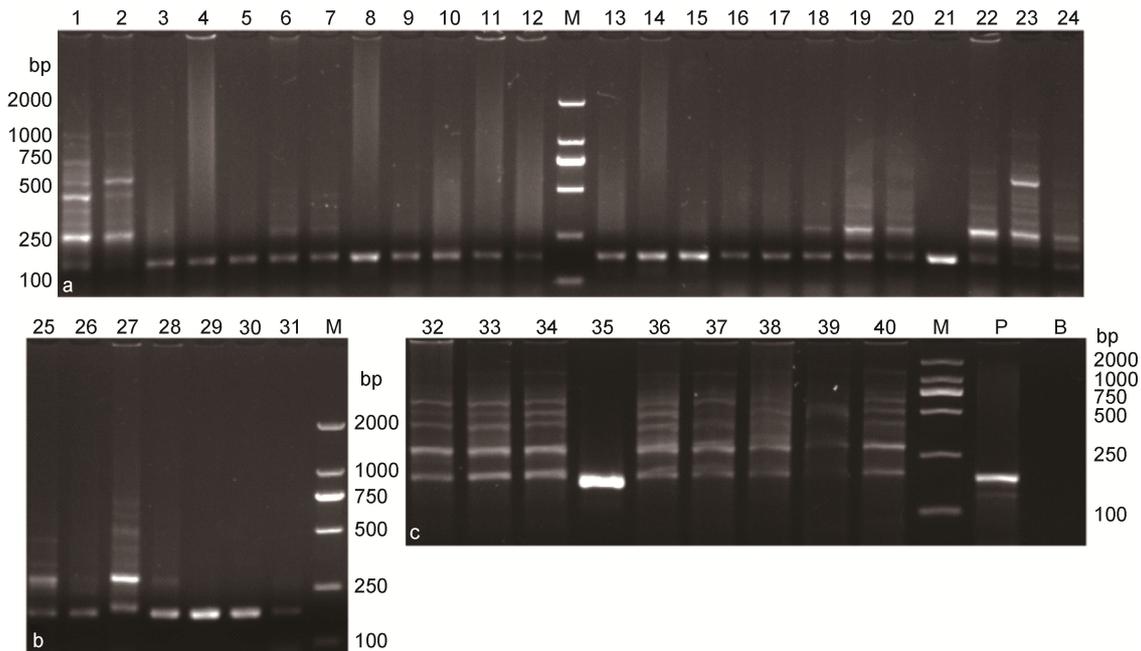


图 6 养成期鲤鱼 CEV 套式 PCR 第 2 步检测结果

Fig.6 Result of detecting CEV from the adult common carp by the second of nested-PCR

注: M: DL 2000 Marker; P: 阳性对照; B: 空白对照; 泳道 1—40: 分别为 40 尾随机采集鲤鱼样品 CEV 套式 PCR 第 2 步检测结果, 目的条带 180bp

套式 PCR 第 1 步检测结果均为阴性, 套式 PCR 第 2 步检测结果(图 6)表明, 40 尾养成期鲤鱼中有 31 尾为 CEV 阳性。经计算, 此次随机采集的某鲤鱼养殖场养成期鲤鱼 CEV 携带率为 77.5%。

3 讨论

CEV 于 20 世纪 70 年代首次在日本养殖的锦鲤中检测到, 此后的研究表明, CEV 同样可以在发病的鲤鱼中被检测到(Hesami *et al*, 2015)。CEV 存在于细胞质内, 粒子直径约 250—280nm, 外形具有似桑葚样的囊膜(Ono *et al*, 1986; Oyamatsu *et al*, 1997b; Miyazaki *et al*, 2005), 现有研究将其归于痘病毒科 Poxviridae (Ono *et al*, 1986; Matras *et al*, 2016)。

尽管 CEV 的相关报道相对较少, 但国外研究对 CEV 的流行状况、临床症状、致病机理、传播机制等方面都有所涉及, 有一定的研究基础。针对 CEV 的检测, 目前主要依靠 PCR 的方法进行。在其研究早期, 首先采用的是基于一段 1272bp 长度序列的套式 PCR (Ono *et al*, 1986; Oyamatsu *et al*, 1997b)。此后随着研究深入, 研究出了可检测源于特定组织样品的套式 PCR 检测方法(Way *et al*, 2013; Haenen *et al*, 2016), 以及能够对该病毒进行定量的 PCR 检测方法(Adamek *et al*, 2016), 但仍是基于上面提及的该病毒

部分序列进行。这同时也说明了目前针对该病毒的研究还不够深入和细化, 开展更系统和层次化的研究已迫在眉睫。

本研究中采集的疑似患有锦鲤睡眠病(KSD)的鲤鱼样品, 观察其外观症状发现, 眼球凹陷, 颅骨上方凹凸不平等同国外学者研究相吻合(Ono *et al*, 1986; Oyamatsu *et al*, 1997b; 畑井喜司雄等, 2007), 但国外研究中提及的病鱼身体呈浮肿状, 尤其尾柄部呈白色不透明状的现象在本研究中表现不明显, 猜测产生这一差异的原因可能是不同病毒株的差异或病毒感染程度不同导致。与 KSD 相比, 由锦鲤疱疹病毒(*koi herpesvirus*, KHV)引发的锦鲤疱疹病毒病(*koi herpesvirus disease*, KHVD)具有相似的临床症状, 主要表现为行动迟缓, 鱼眼凹陷, 皮肤和鳃苍白、颜色不规则, 伴有中度至严重的鳃坏死, 体表多黏液(刘宗晓等, 2006; OIE, 2017)。但在本研究的流行病学调查中并未检出 KHV 阳性样品, 故在生产实践中, 仅凭临床症状来区分 KSD 与 KHVD 无法获得准确的诊断结果, 仍需通过进一步的实验研究手段进行确诊。

通过对 CEV 阳性样品测序序列的进化分析证实, 2015—2016 年所采集的 10 份样品中, 样品编号 JY1856 和 JY1650 分别与来自德国的 KM283182 病毒株以及来自中国的 KX186571 病毒株亲缘关系较近,

其它样品同这两株病毒株存在微进化关系。至此,可以判定此 10 株样品与 CEV 同源性较大,但是由于已知的 CEV 参考序列极少,还无法得到更多的同源性比较结果,以致于这些样品归属于 CEV 何种病毒株,以及该病毒在我国鲤鱼养殖中的流行情况,仍有待进一步研究。

本研究以暴发流行病的养殖鲤鱼组织液作为攻毒原液,通过人工浸泡感染方式回接给健康的鲤鱼,导致健康的鲤鱼部分出现与自然发病鱼相似的病症而死亡,同时,较高的检出率(68.4%)表明鲤鱼可能是 CEV 中国株的敏感宿主,说明 CEV 是一种引起鲤鱼暴发性流行病的病原体,能够对鲤鱼造成较高的死亡率(71.1%±3.2%)。针对同一养殖区域的养成期鲤鱼随机采集样品,CEV 携带率达到 77.5%,但未出现显著的发病症状。综合分析人工浸泡感染试验与养成期鲤鱼 CEV 携带率检测结果,CEV 可在幼鱼和成鱼中被检出,说明其对鲤鱼的幼鱼期和成鱼期具有感染性。

此外,本文通过浸泡感染方式可导致 71.1%±3.2% 的试验用鱼死亡,获得该病毒半数死亡时间(LT₅₀)为 55d。国外相关研究表明,该病毒可导致 0.05—0.12g 试验用鱼呈现 72% 累计死亡率(Oyamatsu *et al*, 1997b),其 LT₅₀ 为 15d 左右;可导致 20—30g 试验用鲤鱼呈现 76% 累计死亡率(Miyazaki *et al*, 2005),其 LT₅₀ 为 8d 左右。通过比较中外感染试验可以发现,累计死亡率没有明显的差异,但本文人工浸泡感染试验 LT₅₀ 相对较长,分析产生这种差异的原因,可能与此次试验所用攻毒原液中病毒载量及该 CEV 中国株致病力有关。

有关对 KSD 的防控方面,有研究指出,使用 0.5% 盐水进行浸浴能够抑制病原体粘附宿主,有助于降低该疫病发生时鱼体的死亡率(Seno *et al*, 2003)。但是,使用此种方式,鱼体仍然是具有传染性的,并不能从根本上杀死病毒。其它的防控措施还包括,避免水温处于 15—25°C 时起捕鱼;对出现可疑临床症状的鱼进行隔离和检测;尽快从池塘中捞取死鱼降低疾病传播;养殖过程中避免密度过高;新鱼入池后,需在 15—25°C 水温中隔离检疫至少 30d 等(Hesami *et al*, 2015)。针对天津地区 KSD 的防控工作,仍需在实践中不断检验获得。

本文采用分子生物学检测方法,从天津地区养殖鲤鱼中检测到 CEV 阳性样品,这是天津地区养殖的鲤鱼样品中首次检出 CEV,同时,进一步证实了

CEV 在我国养殖鲤鱼中存在。因此,我国渔业相关组织及研究机构亟需开展针对 CEV 的流行病学调查,以便评估该疫病在我国鲤鱼养殖产业中扩散和传播的风险,并及时采取有针对性及有效的防控措施防止该疫病的大规模传播和暴发,从而尽可能降低该疫病对我国鲤鱼养殖产业造成影响和损失。

参 考 文 献

- 刘宗晓,刘 荭,江育林,2006. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展. 检验检疫科学, 16(4): 77—80
- 畑井喜司雄,小川和夫编著,任晓明译,2007. 新鱼病图谱. 北京: 中国农业大学出版社
- Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J *et al*, 2016. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD). *Dis Aquat Organ*, 119(3): 245—251
- Amita K, Oe M, Matoyama H *et al*, 2002. A survey of Koi herpesvirus and carp edema virus in colorcarp cultured in Niigata Prefecture, Japan. *Fish Pathol*, 37(4): 197—198
- Haenen O, Way K, Stone D *et al*, 2014. 'Koi sleepy disease' found for the first time in koi carps in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk*, 139(4): 26—29
- Haenen O, Way K, Vendramin N *et al*, 2015. Update on the CEV situation in the EU. In: Report of 19th Annual Meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases, 27—28 May 2015. Organised by the European Union Reference Laboratory for Fish Diseases National Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark
- Haenen O, Way K, Gorgoglione T *et al*, 2016. Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 36(1): 11—23
- Hesami S, Viadanna P, Steckler N *et al*, 2015. Carp Edema Virus Disease (CEVD) / Koi Sleepy Disease (KSD). University of Florida EDIS Publication FA189. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA189>
- Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F *et al*, 2015. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC Vet Res*, 11: 114
- King A M Q, Adams M J, Carstens E B *et al*, 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press
- Lewisch E, Gorgoglione B, Way K *et al*, 2015a. Carp edema virus/koi sleepy disease: An emerging disease in central-east Europe. *Transbound Emerg Dis*, 62(1): 6—12
- Lewisch E, Vienna V, 2015b. First incidence of koi sleepy disease in Austria. University of Veterinary Medicine—Vienna. <http://www.vetmeduni.ac.at/en/infoservice/presseinformation/press-releases-2015/first-incidence-of-koi-sleepy-disease-carp-edema-virus-in-austria/>
- Matras M, Borzym E, Stone D *et al*, 2016. Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J Fish Dis*, 40(3): 319—325

- Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H, 2005. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan. *Dis Aquat Organ*, 65(3): 197—207
- OIE, 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organisation for Animal Health <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
- Ono S I, Nagai A, Sugai N, 1986. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. *Fish Pathol*, 21(3): 167—175
- Oyamatsu T, Matoyama H, Yamamoto K Y *et al*, 1997a. A trial for the detection of Carp Edema Virus by using Polymerase Chain Reaction. *Suisanzoshoku*, 45(2): 247—251
- Oyamatsu T, Hata N, Yamada K *et al*, 1997b. An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish Pathol*, 32(2): 81—88
- Pretto T, Abbadi M, Panzarin V *et al*, 2015. Carp edema virus (CEV): first detection in Italy. In: 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Las Palmas, Gran Canaria, Spain: European Association of Fish Pathologists
- Seno R, Hata N, Oyamatsu T *et al*, 2003. Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, *Cyprinus carpio*, infected with Carp Edema Virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host. *Suisanzoshoku*, 51(1): 123—124
- Vesely T, Pokorova D, Reschova S *et al*, 2015. Detection of carp edema virus in common carp (*Cyprinus carpio*) and koi in the Czech Republic. In: 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Las Palmas, Gran Canaria, Spain: European Association of Fish Pathologists.
- Viadanna P, Pilarski F, Hesami S *et al*, 2015. First report of Carp Edema Virus (CEV) in South American koi. In: 40th Eastern Fish Health Workshop. Charleston, NC
- Way K, Stone D, 2013. Emergence of Carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *CEFAS Finfish News*, 15: 32—35

PCR DETECTION AND ARTIFICIAL INFECTION TEST OF CARP EDEMA VIRUS (CEV) IN COMMON CARP *CYPRINUS CARPIO* IN CULTURED IN TIANJIN DISTRICT

LIU Qun¹, HAN Jin-Gang¹, WANG Jing¹, ZHANG Dan², HUO Wen-Hui¹,
CHEN Hao-Nan¹, GENG Xu-Yun¹, SUN Jin-Sheng¹

(1. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin 300221, China; 2. Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture, Department of Fisheries Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract Ten carp samples suffering carp edema virus / koi sleepy disease (CEV/KSD) were collected from the carp farms in Tianjin district during 2015 and 2016. The samples were investigated by nested PCR, the artificial infection test was carried out in JY1650 collected in 2015, and the infection rate of carp in culture period was determined. All of the samples had the similar symptoms, including the skin of black body, the irregularly skull above the head, sunken eyes, the edge of gills with dirty, over-production mucus on the gills, and frequently stagnant in shallow water. All of the ten samples were detected as CEV positives by nested PCR. The sequences of the nested-PCR products showed 85% to 99% similarity with the reported CEV, after sequencing and BLAST on NCBI. The phylogenetic analysis of the target sequence showed that the samples of JY1650 and JY1856 formed a dependent branch on the phylogenetic tree with the other of 8 samples. So it had a closer relationship to CEV than those. Healthy koi was experimentally infected by immersion test using the homogenate of CEV infected gill, about 71.1%±3.2% of the infected animals was dead, median lethal time (LT₅₀) was 55d, and viral DNA could be detected from these experimentally infected koi tissues. The infection rate of carp in culture period was 77.5%. The results indicate that the breeding carp in Tianjin district was infected with CEV. The carp aquaculture industry is facing a new epidemic situation, which should pay more attention.

Key words CEV (carp edema virus)/KSD (koi sleepy disease); nested-PCR; phylogenetic tree; immersion test