

DOI:10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.002

## 江苏地区一株鲤浮肿病毒的检测和系统进化分析\*

袁锐<sup>1</sup>, 方苹<sup>1</sup>, 郭闯<sup>1</sup>, 吴亚锋<sup>1</sup>, 陈静<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>2</sup>, 唐嘉苾<sup>1</sup>, 金承玲<sup>3</sup>, 刘肖汉<sup>1</sup>

(1. 江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210036;  
2. 南通市海门区水产技术指导站, 江苏 南通 226100;  
3. 南京市江宁区水产技术推广站, 江苏 南京 211100)

**摘要:**为及时掌握江苏省水生动物重大疫病流行趋势以便采取控制措施,应用国标或行标方法对江苏地区某养殖场的健康鲤鱼样品进行水生动物重大疫病监测,检测了锦鲤疱疹病毒(koi herpes virus, KHV)、鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)和鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV)。结果显示CEV阳性,系江苏省首次检出CEV。基于CEV P4a基因进行系统进化分析,结果显示该病毒与NCBI序列号为KY024583.1的CEV亲缘关系最近。该研究可为江苏省鲤浮肿病毒的流行传播规律探寻、疾病诊断和防控提供重要依据。

**关键词:** 鲤鱼; 鲤浮肿病毒; 系统进化分析; 流行情况

中图分类号: S943

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2024)01-0009-07

**引用格式:** 袁锐, 方苹, 郭闯, 等. 江苏地区一株鲤浮肿病毒的检测和系统进化分析[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(1): 9-15.

## Dentification and Phylogenetic Analysis of a Carp Edema Virus in Jiangsu Province

YUAN Rui<sup>1</sup>, FANG Ping<sup>1</sup>, GUO Chuang<sup>1</sup>, WU Yafeng<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>1</sup>,  
WANG Jingjing<sup>2</sup>, TANG Jiajin<sup>1</sup>, JIN Chengling<sup>3</sup>, LIU Xiaohan<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Nanjing 210036, China;  
2. Fisheries Technical Extension Station of Haimen District, Nantong City, Nantong 226100, China;  
3. Fisheries Technical Extension Station of Jiangning District, Nanjing City, Nanjing 211100, China)

**Abstract:** In order to timely grasp the epidemic trend of major aquatic animal diseases in Jiangsu Province and take control measures, national or industry standard methods were applied to monitor the major aquatic animal diseases in healthy carp samples from a breeding farm in Jiangsu Province. Koi herpes virus (KHV), spring virus of carp virus (SVCV), and carp edema virus (CEV) were detected. The results showed positive CEV, which is the first time CEV has been detected in Jiangsu Province. A phylogenetic analysis was conducted based on the CEV P4a gene, and it was found that the virus was most closely related to CEV with NCBI sequence number KY024583.1. The study can provide important basis for the epidemic and transmission patterns, disease diagnosis, and prevention and control of carp swelling virus in Jiangsu Province.

**Key words:** carp; carp edema virus; phylogenetic analysis; prevalence status

\* 收稿日期: 2023-08-21; 修订日期: 2023-09-23

基金项目: 江苏省科技计划(重点)项目(BE2021369)

作者简介: 袁锐(1986—), 男, 江苏南京人, 高级工程师, 硕士, 研究方向为水生动物病原微生物学, (E-mail) yr8624@163.com。

通信作者: 刘肖汉(1975—), 男, 安徽宣城人, 研究员, 硕士, 研究方向为水生动物病害, (E-mail) 1210619123@qq.com。

## 0 引言

鲤浮肿病(carp edema virus disease, CEVD)又称锦鲤昏睡病(koi sleep disease, KSD),是一种具有高度传染性的鱼类病毒病,其病原是鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV),主要感染鲤鱼和锦鲤<sup>[1-3]</sup>。鲤浮肿病毒可以导致鲤鱼或锦鲤出现一系列临床症状,如烂鳃、体表出血、眼球凹陷、皮下组织水肿导致的身体肿大、口腔及鳍根部溃疡等<sup>[4-6]</sup>。感染 CEV 的病鱼还常常表现出行动迟缓、聚集池塘边缘、昏睡等症状<sup>[7-9]</sup>。值得注意的是,CEV 与另一种病毒 KHV(koi herpes virus)的感染具有极其相似的症状,且两者的感染宿主相同,因此,养殖者可能会将 CEV 感染误认为是 KHV 感染<sup>[10]</sup>。

自 2016 年我国首次报道 CEVD 以来,已经先后在北京、云南、河南、四川<sup>[3,8,10-11]</sup>等地检出 CEV,其对我国锦鲤和鲤鱼养殖业造成严重的威胁。为了更好地预防和控制 CEV 的传播,2018 年,农业农村部下文(农办渔【2018】75 号),正式将 CEVD 列为疫病监测对象。2023 年 5 月,在江苏省水生动物疫病常规监测中,于某养殖鲤鱼中检测到一例 CEV 阳性,但是该鱼并未发病,提示存在 CEV 潜伏感染。本研究通过 PCR 检测、系统进化分析等对 CEV 进行了详细鉴定,为该例鲤浮肿病毒的起源、分类、疾病诊断等提供重要依据,这也是江苏省首次检出 CEV 阳性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

样品采集于江苏省某鲤鱼养殖场,该养殖场为普通家庭农场。采集方法参照《国家水生动物疫病监测计划》(第二版)(鱼类)中鲤浮肿病监测技术规范进行。

### 1.2 主要试剂

病毒 DNA 提取试剂盒、荧光 PCR Mix 预混液等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。DEPC 水、普通 PCR Mix 预混液购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 荧光 PCR 鉴定

鲤鱼样品组织 DNA 提取,按照病毒 DNA 提取试剂盒说明进行操作。荧光 PCR 检测所用引物、探针及检测方法参照我国水产行业标准 SC/T 7229—2019《鲤浮肿病诊断规程》进行。引物和探针(见表 1)由 TaKaRa 公司合成,扩增 CEV P4a 蛋白基因中 76 bp 的片段。反应体系包括:2×预混合液(2×

probe master mix) 10 μL,引物 QF1 和 QR1 各 0.8 μL,探针 0.4 μL, DNA 模板 2.5 μL,加 DEPC 水至 20 μL。反应条件为:95 °C 2 min;95 °C 5 s,56 °C 31 s,共 40 个循环。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

引物	引物序列(5'—3')	扩增长度/bp
QF1	AGTTTGTAKATTGTAGCATTTCC	76
QR1	GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA	
探针	FAM-GAGTTTGTCTTCTGCCATACAAC-TBHQ1	

### 1.4 PCR 检测

除了进行鲤浮肿病毒检测外,还对样品进行锦鲤疱疹病毒(koi herpes virus, KHV)、鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)等鲤鱼易感病毒的检测。

KHV PCR 检测所用引物及检测方法参照 SC/T 7212.1—2011《鲤疱疹病毒检测方法 第 1 部分:锦鲤疱疹病毒》进行,需扩增 TK 和 SPH 两个基因片段。引物(见表 2)由 TaKaRa 公司合成,TK 基因的扩增体系为 50 μL。反应体系包括:25 μL 的 Mix 预混液和 2.5 μL 的 DNA 模板,引物各 0.5 μL(浓度为 100 μmol/L)和 21.5 μL 的 DEPC 水。扩增条件:94 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 1 min,51 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,40 个循环,72 °C 10 min。SPH 基因的扩增体系为 100 μL。反应体系包括:50 μL 的 Mix 预混液,5 μL 的 DNA 模板,引物各 1 μL(浓度为 100 μmol/L)和 43 μL 的 DEPC 水。扩增条件:94 °C 预变性 30 s,94 °C 变性 30 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,72 °C 10 min。

SVCV PCR 检测所用引物及检测方法参照 GB/T 15805.5—2018《鲤春病毒血症诊断规程》进行。先用 F1 和 R2 引物(见表 2)扩增 SVCV G 蛋白的 714 bp 片段。反应体系包括:50 μL 的 Mix 预混液,2 μL 的 DNA 模板,引物各 2 μL 和 44 μL 的 DEPC 水。扩增条件:94 °C 4 min;94 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C,8 min。再将上述 PCR 产物当作模板进行 nested-PCR,用 F1 和 R4 引物(见表 2)扩增出 606 bp 的 DNA 片段。反应体系包括:50 μL 的 Mix 预混液,5 μL 的 DNA 模板,引物各 2.5 μL 和 40 μL 的 DEPC 水。扩增条件:94 °C 4 min;94 °C 1 min,50 °C 1 min,

72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C, 8 min。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增长度/bp
KHV-TK-F	GGGTTACCTGTACGAG	409
KHV-TK-R	CACCCAGTAGATTATGC	
KHV-SPH-F	GACACCACATCTGCAAGGAG	292
KHV-SPH-R	GACACATGTTACAATGGTCGC	
SVCV-F1	TCTTGGAGCCAAATAGCT-CARRTC	714
SVCV-R2	AGATGGTATGGACCCAATA-CATHCANCA Y	
SVCV-F1	TCTTGGAGCCAAATAGCT-CARRTC	606
SVCV-R4	CTGGGGTTTCCNCCT-CAAAGYTG Y	

### 1.5 CEV P4a 基因克隆测序及系统进化分析

当前用于 CEV 系统发育分析的基因主要是 P4a 蛋白基因<sup>[12-13]</sup>, 扩增该基因主要是通过巢式 PCR 反应。先用 BF 和 BR 引物(见表 3)扩增 CEV P4a 蛋白基因的 528 bp 片段, 再用 IF 和 IR 引物从上述片段中扩增 478 bp 片段。两步反应体系和条件相同。反应体系包括: 25  $\mu$ L 的 Mix 预混液, 5  $\mu$ L 的 DNA 模板, 引物各 2  $\mu$ L 和 16  $\mu$ L 的 DEPC 水。扩增条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 45 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C, 10 min。

将 PCR 产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 应用软件 MEGA 7.0 对该序列进行系统进化分析。为方便分析, 将本文中鉴定的 CEV 命名为 JS-CEV。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增长度/bp
BF	ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG	528
BR	CTCTTCACTATTGTGACTTTG	
IF	GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG	478
IR	TAGCAAAGTACTACCTCATCC	

## 2 结果

### 2.1 临床观察

采集的样品为鲤鱼, 体长约 6.5 cm。根据先体表后体内的原则, 分别对鳃丝、吻部、眼球、鳃丝、体表、鳍条、肛门、内脏等部位进行临床检查。结果表

明: 该样品体表及内脏较为健康, 无明显异常, 体表正常(见图 1), 有光泽, 鳃丝鲜红(见图 2), 各部位无出血及其他异常。



图 1 体表健康

Fig. 1 Healthy surface

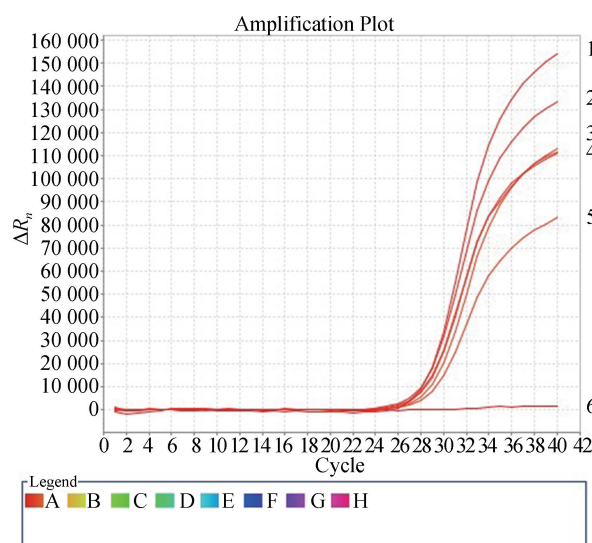


图 2 鳃部正常

Fig. 2 Normal gill

### 2.2 荧光 PCR 鉴定结果

采集鲤鱼样品的鳃丝、肾、肝、脾等部位研磨, 之后按照病毒 DNA 提取试剂盒的说明进行组织 DNA 提取, 随后进行荧光 PCR 检测, 结果如图 3 所示。5 个重复样品均出现了典型的扩增曲线, 且  $C_t$  值均小于 35,  $C_t$  平均值为  $27.5 \pm 0.45$ , 表明该鲤鱼样品鲤浮肿病毒核酸(CEV)检测结果为阳性。



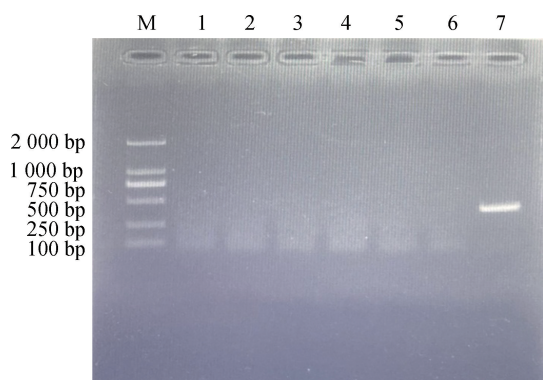
1~5 号一样品; 6—阴性对照。

图 3 CEV 荧光检测

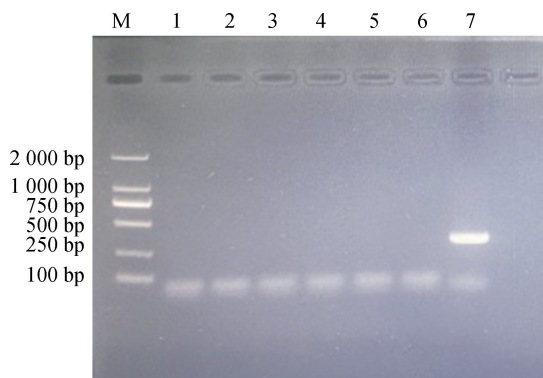
Fig. 3 CEV fluorescence detection

### 2.3 PCR 检测

对鲤鱼样品进行其他易感病毒 KHV 和 SVCV 的检测,结果如图 4 和图 5 显示。从图中可以看出,5 个重复样品均未能扩增出特异性条带,阳性对照和阴性对照结果正常,表明该鲤鱼样品未携带 KHV 和 SVCV。为了对该样品携带的 CEV 进行系统进化分析,应用巢式 PCR 方法对样品进行 P4a 基因的检测,先用 BF 和 BR 引物扩增 CEV P4a 蛋白基因的 528 bp 片段,结果如图 6 所示。5 个重复样品经第一步 PCR 反应均扩增出了预期大小的特异性条带;以第一步反应的 PCR 产物为模板(稀释了 1 000 倍),用 IF 和 IR 引物从上述片段中扩增 CEV P4a 蛋白基因的 478 bp 片段,5 个重复样品均扩增出预期大小的特异性条带。经巢式 PCR 鉴定,样品中携带有 CEV,所获得的 CEV P4a 蛋白 478 bp 基因片段可用于系统进化分析。



a KHV TK 基因



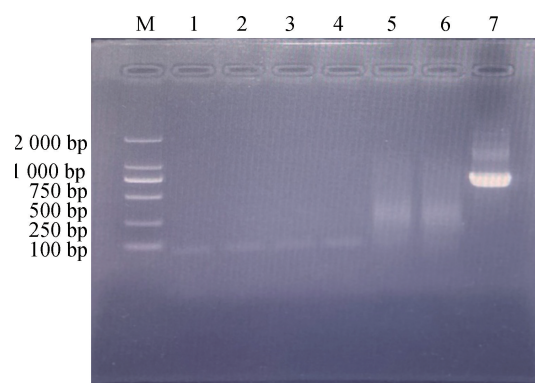
b KHV SPH 基因

M—DL2000 marker; 1—阴性对照;

2~6—样品; 7—阳性对照。

图 4 KHV TK 基因和 SPH 基因检测

Fig. 4 Detection of KHV TK and SPH gene

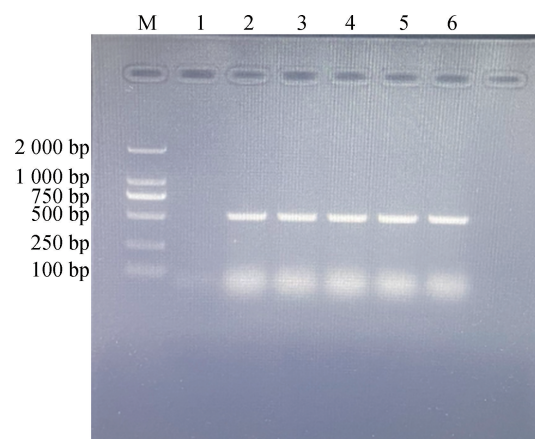


M—DL2000 marker; 1—阴性对照;

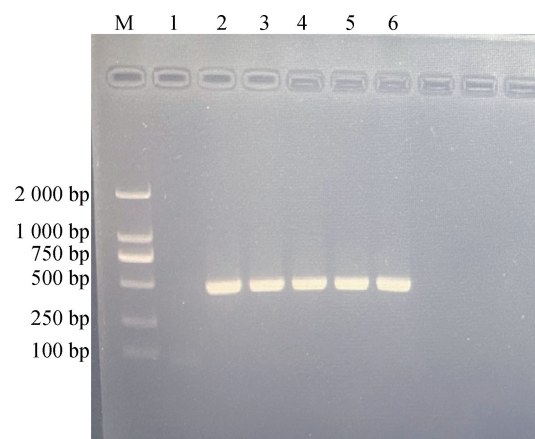
2~6—样品; 7—阳性对照。

图 5 SVCV 检测

Fig. 5 Detection of SVCV



a 528 bp 片段



b 478 bp 片段

M—DL2000 marker; 1—阴性对照;

2~6—样品的 5 个重复。

图 6 CEV P4a 基因巢式 PCR 检测

Fig. 6 Nested-PCR detection results of CEV P4a

## 2.4 系统进化分析

对 CEV P4a 基因巢式 PCR 扩增产物进行测序分析,结果显示,其与 CEV 同源性达 99%。查阅 NCBI(美国国家生物技术信息中心)网站得知,上传 CEV P4a 基因核心区域核苷酸序列的国家主要有波兰、英国、印度、中国、伊朗、捷克、意大利等。对上述国家具有代表性的 CEV P4a 基因核心区域核苷酸序列和本实验测序得到的相关序列进行多重比对和系统发育树分析。

系统发育树分析结果如图 7 所示。世界各国的

CEV 普遍呈现出区域同源性更强的特点,即来自同一个国家的 CEV 基本聚在一起,表明其同源性要更强。例如波兰、意大利、捷克、伊朗、中国等检出的 CEV 就几乎全部聚集在一起,显示出极高的同源性,在一定程度上表明了 CEV 就近传播的规律。此次从江苏省某鲤鱼养殖场鉴定出的 CEV 毒株与我国分离的 NCBI 序列号为 KY 024583.1 的 CEV 株同源性最高,而且,与我国其他 CEV 株的同源性也明显高于其他国家分离鉴定的 CEV 株。以上结果表明,JS-CEV 可能来源于我国 CEV 的传播。

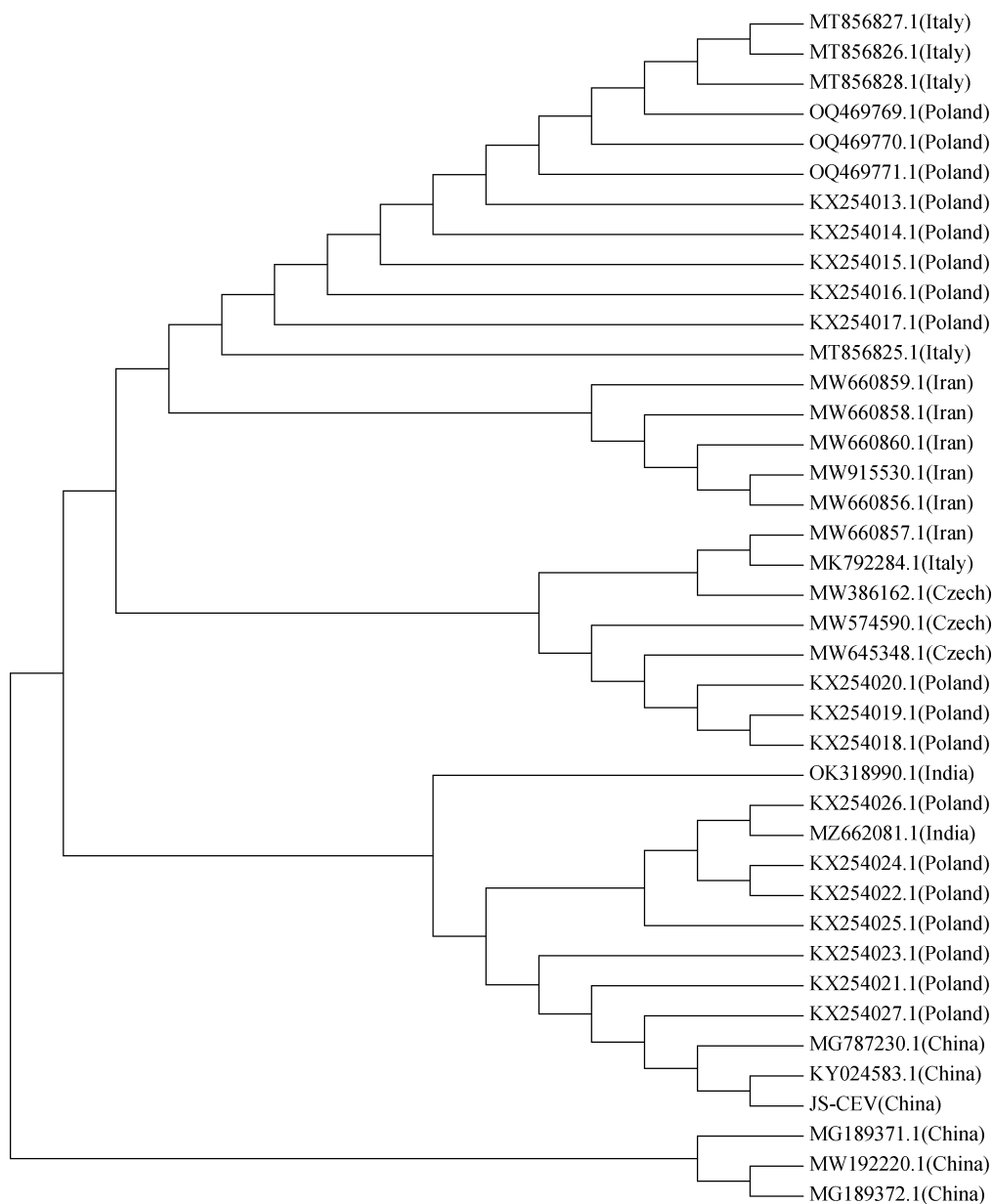


图 7 基于 CEV P4a 基因核心序列构建的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree construction based on CEV P4a gene sequence

### 3 讨论

鲤浮肿病是一种严重危害鲤鱼和锦鲤养殖业的鱼类病毒性疾病,自1974年日本首次报道以来,先后在美国、英国、捷克、法国、意大利、波兰等欧美国家以及印度等亚洲国家流行<sup>[14-20]</sup>。我国自2016年首次报道CEVD以来,全国已有15个省份检测出CEV,我国的CEV感染范围已经较广,尤其是北京、辽宁、河南等省市发病较为严重,个别地区鲤鱼和锦鲤养殖CEVD发病率达到15%,死亡率达到30%<sup>[1]</sup>,给国内鲤鱼养殖业造成了重大经济损失,仅河南省每年因CEVD导致的经济损失就高达5000万元<sup>[21]</sup>。

目前,国内报道并成功鉴定CEV毒株的地区有浙江、云南、河南、四川等地。以上地区CEV毒株的鉴定均分离自患病锦鲤或鲤鱼,本研究中鉴定的JS-CEV系国内首次从健康鲤鱼体内分离鉴定,呈现出典型的潜伏感染特征。江苏作为全国淡水养殖大省,截至2019年,淡水养殖产量为317.9万t,其中鲤鱼养殖产量为14.1万t,约占全国鲤鱼养殖产量的4.9%;观赏鱼85840万尾,约占全国观赏鱼养殖产量的21.9%<sup>[22]</sup>。锦鲤作为一种经济价值较高的观赏鱼类,深受消费者喜爱,具有较为广阔的市场前景。然而,继检出锦鲤疱疹病毒(koi herpes virus, KHV)后,又在江苏省养殖鲤鱼体内检测到CEV,两种病毒均能感染鲤鱼和锦鲤,且具有较高的死亡率及潜伏感染特性,严重威胁着江苏省锦鲤和鲤鱼养殖业的绿色高质量发展。

当前,CEV已经是一种分布范围较广的水生动物病毒,在我国鲤鱼和锦鲤主要产地几乎都有分布,且原良种场、苗种场也有检出,表明CEV的扩散风险较高。一些地区在养殖鲤鱼、锦鲤过程中,将未经处理含CEV的尾水排放到自然河道中,病原进入水体,极易造成下游养殖鱼感染。此外,锦鲤作为经济价值较高的观赏鱼养殖品种,各地为保种、繁育,跨省交易频繁,也在一定程度上加大了CEV的传播风险。本研究获得的JS-CEV株,经MEGA 7.0构建系统发育树,结果表明,其与我国浙江分离鉴定的NCBI序列号为KY024583.1的CEV亲缘关系最近,而浙江和江苏又是邻近省份,一定程度上反映了该CEV的传播规律。当然,我国还有一些鉴定的CEV毒株基

因序列信息并未上传至NCBI,因此,系统发育树所反映的信息并不能说明全部问题。本研究首次从江苏省内养殖健康鲤鱼体内分离鉴定出一株CEV,可为CEV的流行传播规律探寻、疾病诊断和防控提供重要依据。

#### 参考文献:

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 2020 我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 北京:中国农业出版社,2020.
- [2] 康慧敏,何嘉乐,刘晨恺,等. 四川地区养殖锦鲤浮肿病毒检测与系统进化分析[J]. 浙江农业学报,2019,31(4):539-544.
- [3] 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.
- [4] LEWISCH E, GORGOGLIONE B, WAY K, et al. Carp edema virus/koi sleepy disease: an emerging disease in Central East Europe[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2015, 62(1): 6-12.
- [5] RADOSAVLJEVIC V, ADAMEK M, MILICEVIC V, et al. Occurrence of two novel viral pathogens (CEV and CyHV-2) affecting Serbian cyprinid aquaculture and ichthyofauna[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(5): 851-854.
- [6] 吕晓楠,徐立蒲,王姝,等. 鲤浮肿病研究进展[J]. 中国动物检疫,2018,35(5):75-80.
- [7] OYAMATSU T, HATA N, YAMADA K, et al. An etiological study on mass mortality of cultured color-carp juveniles showing edemas [J]. Fish Pathology, 1997(2): 81-88.
- [8] 徐立蒲,王小亮,张文,等. 养殖锦鲤鲤鱼浮肿病的检测与鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(2):613-618.
- [9] 翟立文,刘文枝,许晨,等. 鲤浮肿病病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 中国水产科学,2019,26(5):1004-1013.
- [10] 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.
- [11] 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):1-9.
- [12] WAY K, STONE D. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK [J]. Finfish News, 2013, 15: 32-34.
- [13] MATRAS M, BORZYM E, STONE D, et al. Carp edema virus in Polish aquaculture-evidence of signifi-

- cant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 40(3): 319-325.
- [14] ADAMEK M, JUNG-SCHROERS V, HELLMANN J, et al. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 245-251.
- [15] 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*, 2016, 40(3): 319-325.
- [16] SUZUKI S, FUKUDA H. Effect of NaCl solution bath and experimental infection on mass mortality of juvenile colorcarp [J]. *Report of Saitama Prefectural Fisheries Experimental Station*, 1987, 46: 49-55.
- [17] 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.
- [18] SENO R, HATA N, OYAMATSU T, et al. Curative effects 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 [J]. *Aquaculture Science*, 2003, 51(1): 123-124.
- [19] BIGARRÉ L, BAUD M, PALLANDRE L, et al. Maladie du sommeil de la carpe: état des lieux des connaissances et situation épidémiologique en France [J]. *Bull Epidemiol Sante Anim Aliment*, 2016, 76: 12-13.
- [20] PRETTO T, ABBADI M, PANZARIN V, et al. Carp edema virus (CEV): first detection in Italy [C]//European Association of Fish Pathologists. EAFP 17th International Conference on Disease of Fish and Shellfish. Las Palmas de Gran Canaria: European Association of Fish Pathologists, 2015: 343.
- [21] 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): 55-58.
- [22] 农业部渔业渔政管理局. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [23] 刘训猛, 陈静, 袁锐, 等. 江苏地区养殖中华绒螯蟹白斑综合征病毒 (WSSV) 流行病学调查 [J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 29(1): 51-55.

(责任编辑: 褚金红 实习编辑: 易圣杰)