

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201801039

锦鲤疱疹病毒感染鲤鱼的动态病理损伤及病原组织分布*

何汶璐^{1#}, 李根^{1#}, 康慧敏¹, 何嘉乐¹, 杨壮志²,
阳瑞雪¹, 汪开毓¹, 耿毅¹, 欧阳萍^{1**}

(1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 成都市农林科学院 水产研究所, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】研究锦鲤疱疹病毒(CyHV-3)感染鲤鱼的侵染规律与动态病理损伤, 为CyHV-3致病机理的研究奠定实验基础, 同时为有效防控锦鲤疱疹病毒病提供参考。【方法】采用浸泡法对鲤鱼进行人工感染试验, 于不同时间点剖检采样, 进行动态病理学观察和荧光定量PCR检测, 选择具有代表性的外部(鳃)和内部器官(肾脏)进行动态病理学观察。【结果】鳃小片呼吸上皮细胞增生严重并伴有大量炎症细胞浸润, 肾脏主要表现为间质性肾炎, 肾小管上皮细胞变性坏死。试验鱼在感染前期病毒含量最高的是鳃组织, 肠道中未检测到病毒, 随着感染时间的延长, 各组织内的病毒含量逐步增加。病毒感染10 d后, 鳃、肾脏以及脑组织的病毒含量达到最高值, 随后病毒量保持稳定。脾脏、肝脏和肠道中病毒含量的最高值出现在感染第14天。【结论】CyHV-3在鲤鱼体内先入侵鳃组织, 随后到达肾脏、脾脏等全身各组织器官中。

关键词: 锦鲤疱疹病毒; 鲤鱼; 病理损伤; 病原组织分布

中图分类号: S 941.419

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2018)05-0884-07

Dynamic Distribution of Cyprinid Herpesvirus 3 in Infected *Cyprinus carpio* and Its Histopathological Changes

HE Wenlu¹, LI Gen¹, KANG Huimin¹, HE Jiale¹, YANG Zhuangzhi²,
YANG Ruixue¹, WANG Kaiyu¹, GENG Yi¹, OUYANG Ping¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Institute of Fisheries, Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Chengdu 611130, China)

Abstract: [Purpose] To study the infection process and pathological damage of CyHV-3 infected carp, and provide valuable reference for the effective prevention and cure of koi herpesvirus disease.

[Method] Carp (*Cyprinus carpio*) were infected with CyHV-3 and dissected at different time points for detecting the histopathological changes and distribution of virus. And gills and kidney were selected as representative of the external organs and internal organs for dynamic pathological observation. [Result] The gill of test fish respiratory epithelial proliferation and a large number of inflammatory cell infiltration. Besides, kidney tissue was significantly inflammatory cell infiltration, show-

收稿日期: 2018-01-24

修回日期: 2018-05-06

网络出版时间: 2018-10-13

*基金项目: 中国博士后科学基金(2015M582563); 教育部留学回国人员科研启动基金[教外司留(2015)311号]。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。何汶璐(1994—), 女, 四川泸州人, 在读硕士研究生, 主要从事动物病原学与病理学研究。E-mail: hewenlu2013@163.com; 李根(1996—), 男, 湖北宜昌人, 在本科学生, 主要从事动物病原学与病理学研究。E-mail: 15882206736@163.com

**通信作者 Corresponding author: 欧阳萍(1984—), 女, 湖南永州人, 博士, 讲师, 主要从事动物病原学与病理学研究。E-mail: ouyang.ping@live.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201801039](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201801039)

ing interstitial nephritis. Then, the gill tissue on the 2nd day of infection was detected by real-time PCR with the largest viral load, and no virus was detected in the intestine. With the infection time extended, the viral load in organizations gradually increased, and the viral load of gill, kidney and brain tissue reached the highest value on the 10th day of virus infection, then it remained stable. In addition, the highest amount of virus in the spleen, liver and intestine was detected on the 14th day of infection.

[**Conclusion**] The gills are the first internal invasion sites of CyHV-3, then the virus reached the kidney, spleen and other tissues and organs.

Keywords: cyprinid herpesvirus 3; *Cyprinus carpio*; pathological lesion; pathogen distribution

锦鲤疱疹病毒 (Koi herpesvirus, KHV) 2005 年被重新命名为鲤疱疹病毒Ⅲ型 (cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)^[1], 是能够感染鲤鱼、锦鲤以及鲤鱼变种的一种高致病性、高传染性和高死亡率的病毒^[2]。1998 年, 在以色列和美国最早报道 CyHV-3 引起大面积鲤鱼和锦鲤死亡^[3], 随后在欧洲、亚洲、非洲和澳大利亚报道了锦鲤疱疹病毒病 (Koi herpesvirus disease, KHVD) 的发生, 其中, 澳大利亚暴发该病是将 CyHV-3 用于野生鲤鱼的生物防治而导致的^[4]。2001 年, 中国香港最早报道 CyHV-3 暴发, 后来在广州、武汉、北京、长春等地均有报道^[5]。KHVD 大多发生在春秋季节, 18~28 °C 的水温最适合其传播感染, 发病率和死亡率高达 80%~100%, 给锦鲤和鲤鱼养殖业造成了重大的经济损失^[6]。

KHVD 的有效防控一直都是鲤鱼养殖关注的重点^[7]。CyHV-3 感染鲤鱼的病理损伤有少量报道^[8-9], 组织病理学上表现为全身各组织器官的损伤, 其中鳃和肾的病变最为严重, 鳃小片上皮细胞增生、坏死严重, 肾脏表现为典型的间质性肾炎特征, 因此有研究者认为鳃和肾是 CyHV-3 感染的主要靶器官^[10]。此外, 也有研究报道 CyHV-3 在感染锦鲤后 24 h 在全身快速传播并在多个组织中检测到病毒 DNA 的存在, 其中最高的 DNA 浓度位于鳃、肾脏和脾脏, 肝脏、肠道和脑中也发现高水平的 CyHV-3 DNA^[11]。但是, 国内外对于 CyHV-3 感染鲤鱼的侵染规律、动态病理损伤与病原组织分布的研究还不够清楚, 对 CyHV-3 的控制也未取得明显成效。本研究采用浸泡感染的方式对鲤鱼进行人工感染, 分时间点随机采样, 展开动态病理学与病毒感染组织分布的研究, 以进一步阐明 CyHV-3 致病机理, 为制订 CyHV-3 的有效防控措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物、细胞株与病毒

健康鲤鱼 (体长 25~30 cm) 购自四川成都某鲤鱼养殖场。普通鲤鱼脑细胞系 (common carp brain cells, CCB) 和锦鲤疱疹病毒 (CyHV-3) 均由四川农业大学动物医学院鱼病研究中心保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

pMD19-T-Sph 标准质粒 (本实验室构建并保存)、DMEM 培养液 (Solarbio Dulbecco's Modified Eagle Medium)、鼠抗 CyHV-3 单抗 2F12 WD1000 (本实验室保存)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (Servicebio)、组织 DNA 提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0)、SYBR[®]Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™])、质粒 DNA 小剂量抽提试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0)。

1.2 人工感染试验

1.2.1 病毒滴度的测定

采用间接免疫荧光染色法测定 CyHV-3 病毒滴度。用无血清 DMEM 培养基将 CyHV-3 病毒液从 10⁻¹ 进行 10 倍倍比稀释到 10⁻⁷。取对数生长期 CCB 细胞, 胰酶消化、计数, 铺 24 孔板, 每孔 250 μL (含 4×10⁵ 细胞) 置于 25 °C、5% CO₂ 培养箱培养 5 d。每个病毒梯度设 3 个重复, 每孔滴加 250 μL 待测病毒样品。将培养后的 CCB 细胞放入丙酮—乙醇 (体积比 50:50) 固定液中, 置于 -20 °C 固定 10 min。固定好的细胞用含 10% 胎牛血清的 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入单抗 (2F12 WD1000, 1:1 000 稀释) 于 25 °C 孵育 45 min, 再用含 10% 胎牛血清的 PBS 洗涤 3 次。加入荧光二抗 (FITC 标记山羊抗小鼠 IgG, 1:1 000 稀释) 25 °C 作用 30 min, 用含 10% 胎牛

血清的 PBS 洗涤 3 次, 加入适量含 10% FBS 的 PBS 缓冲液, 荧光显微镜下计数荧光细胞, 以每孔荧光细胞数 30~300 个为最佳。测得病毒滴度以绿色荧光形成单位/mL (PFU/mL) 表示, 每个荧光细胞对应 1 个绿色荧光形成单位, 并按照如下公式计算病毒滴度:

滴度 (PFU/mL)=[(绿色荧光细胞/孔)]/[病毒体积 (mL)×(稀释倍数)]。

1.2.2 人工感染

试验采用浸泡法进行人工感染试验^[12], 将健康鲤鱼在水族箱中饲养 7 d 后, 随机分为 4 组, 每组 20 尾。前面 3 组为试验组, 分别采用高 (400 PFU/mL)、中 (40 PFU/mL)、低 (4 PFU/mL) 滴度感染, 浸泡于培养液稀释的病毒液中, 2 h 后转移至水族箱, 对照组使用 DMEM 培养液, 其余处理相同。试验期间水温控制在 20~25 °C, 每天观察 2 次, 连续观察 4 周。

1.3 动态组织病理学观察

动态病理学观察和组织分布研究都采用 40 PFU/mL 的滴度进行人工感染, 试验周期为 14 d, 每天观察 2 次, 记录鲤鱼的临床症状。分别于感染第 0、2、4、6、8 天, 随机捞取 4 尾鱼观察体表病症, 剖检后观察内部器官的病理变化。在指定时间点采集肾脏与鳃, 用 4% 多聚甲醛固定组织, 采用石蜡切片法, HE 染色, 封固后使用光学显微镜观察拍照。

1.4 荧光定量 PCR 检测病毒的组织分布

1.4.1 样品采集

感染后第 2、4、6、8、10、14 天随机捞取 3 尾鱼解剖采集鳃、肾脏、脑、脾脏、肝脏和肠道, 参照 DNA 提取试剂盒的说明书进行操作, 提取组织 DNA 后-20 °C 保存待用。

1.4.2 荧光定量 PCR 与标准曲线的建立

参照陈俊杰等^[13]构建的 CyHV-3 荧光定量 PCR 方法, 将 pMD19-T-Sph 标准质粒做 10 倍系列稀释, 得到 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^1$ 拷贝/ μ L 共 10 个浓度, 每个浓度 3 个重复, 进行 SYBR 实时荧光定量 PCR 并建立标准曲线。使用 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪 (ABI) 自带的 StepOne Software v2.3 软件进行分析并自动绘出标准曲线 (横坐标为模板质粒拷贝数的对数值, 纵坐标为相应的 C_t 值)。

1.4.3 组织中病毒含量的检测

以 1.4.1 提取的组织 DNA 为模板进行荧光定

量 PCR 反应, 反应体系参照陈俊杰等^[13]。根据 StepOne Software v.2.3 软件建立标准曲线计算每个样品中病毒含量, 随后用 Excel 2010 进行统计并作图。

2 结果与分析

2.1 鲤鱼感染 CyHV-3 的临床死亡观察

浸泡感染第 2 天, 高滴度组 (400 PFU/mL) 的鱼表现冷漠, 食欲下降, 体表黏液增多。中滴度组 (40 PFU/mL) 和低滴度组 (4 PFU/mL) 在感染第 4 天观察到试验鱼出现食欲下降、背鳍关闭, 眼睛凹陷、体表黏液增多等临床症状。高滴度组和中滴度组分别在感染第 7、9 天出现急剧死亡。低滴度组呈现阶段性死亡, 在感染第 7、12、16 和 19 天都有试验鱼死亡现象。感染 26 d 后, 3 组的死亡率分别为 80%、85% 和 80%, 因此, 感染滴度对死亡率无显著影响, 但是发病过程有差异, 高滴度组和中滴度组主要表现为急性死亡, 低滴度组为慢性死亡 (图 1)。

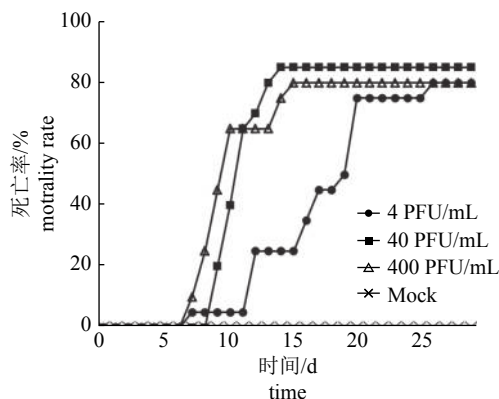


图 1 感染滴度对鲤鱼临床死亡影响

Fig. 1 The death curve of carp infected with CyHV-3

2.2 鲤鱼感染 CyHV-3 的组织病理学变化

鳃的组织病理学变化: 与对照组比较 (图 2a), 感染第 2 天, 鳃小片基部上皮细胞增生、肿胀 (图 2b); 感染第 4 天, 鳃小片肿大, 其基部的上皮细胞持续向外增生 (图 2c); 感染第 6 天, 鳃小片上皮细胞增生与相邻的鳃小片融合, 并且有的鳃小片上皮细胞出现坏死脱落 (图 2d); 感染第 8 天, 增生的上皮细胞将鳃小片间隙填充, 形成层状融合, 并伴有大量炎性细胞浸润 (图 2e)。

肾脏的组织病理学变化: 与对照组比较

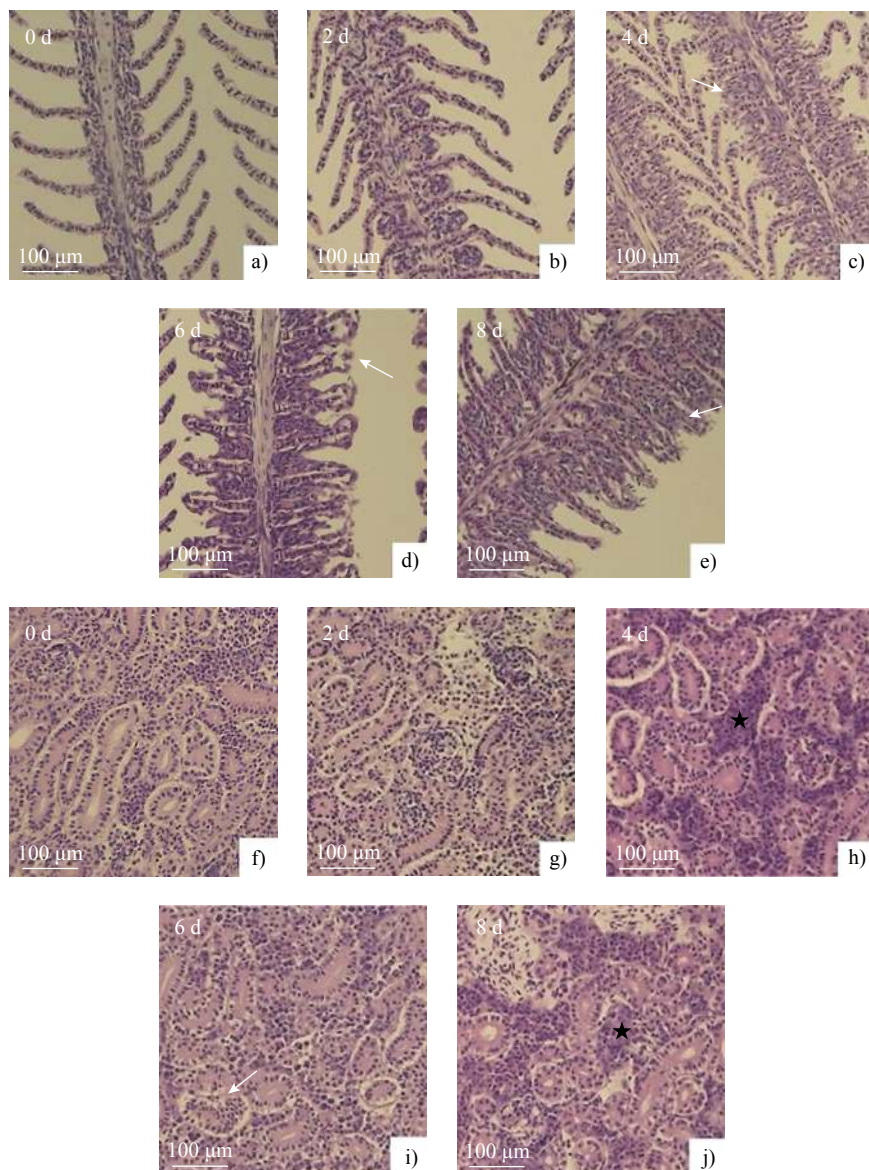
(图 2f), 感染组的肾小管上皮细胞组织结构紊乱, 肾小球肿大 (图 2g); 感染第 4 天肾间质开始淤血、出血, 有大量炎性细胞浸润 (图 2h); 肾小管上皮细胞坏死脱落于管腔中, 肾小管结构严重破坏 (图 2i); 第 8 天肾间质水肿, 血管扩张、充血, 伴有大量炎性细胞浸润, 造血组织和结缔组织

组织坏死, 呈现明显的坏死区域 (图 2j)。

2.3 CyHV-3 在感染鲤鱼体内的动态分布

2.3.1 荧光定量 PCR 灵敏度扩增曲线与标准曲线

用 ddH₂O 将构建好的重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 各浓度锦鲤疱疹病毒重组质粒的扩增曲线见图 3。将 10 倍系列稀释的标准质粒作为模



注: a) 第 0 天鳃; b) 第 2 天鳃部呼吸上皮细胞增生; c) 第 4 天鳃部呼吸上皮细胞增生 (↑); d) 第 6 天鳃小片增粗, 上皮细胞增生、水肿脱落 (↑); e) 第 8 天鳃小片上皮细胞形成增生性融合, 炎性细胞浸润 (↑); f) 第 0 天肾脏; g) 第 2 天肾组织结构紊乱, 有坏死现象; h) 第 4 天肾间隙组织有炎性细胞浸润 (★); i) 第 6 天肾小管上皮细胞坏死脱落 (↑); j) 第 8 天肾组织结构模糊, 有濒临坏死的造血组织和结缔组织, 其间夹杂浸润的炎性细胞 (★)。

Note: a) gill on day 0; b) gill respiratory epithelial hyperplasia on day 2; c) gill respiratory epithelial cell hyperplasia on day 4 (↑); d) gill epithelial cell proliferation, edema shedding on day 6 (↑); e) epithelial cells of gill lamellae form proliferative fusion and infiltration of inflammatory cells (↑); f) kidney on day 0; g) kidney tissue disorders, pigmentation and necrosis on day 2; h) kidney interstitial tissue with inflammatory cells on day 4 (★); i) tubular epithelial necrosis on day 6 (↑); j) the fuzzy nephridial structures, near the necrosis of hematopoietic tissue and connective tissue, infiltrating infiltration of inflammatory cells on day 8 (★).

图 2 鲤鱼感染锦鲤疱疹病毒病理组织损伤

Fig. 2 Pathological tissue injury of carp

板, 选取 $10^1\sim10^{10}$ 拷贝数梯度进行荧光定量 PCR 扩增, 得到荧光定量 PCR 灵敏度扩增曲线 (图 3a)。将重组质粒拷贝数的对数作为 X 轴、循环阈值 (C_t) 作为 Y 轴, 构建标准曲线 ($y=-3.539x+40.666$), 其相关系数为 0.993, 扩增效率为 0.917。所示结果表明构建的荧光定量标准曲线有较好的线性关系 (图 3b)。

2.3.2 鲤鱼组织中的病毒含量

以 40 PFU/mL 的滴度浸泡感染鲤鱼 2 d 后, 组织内的病毒拷贝数迅速升高, 病毒含量最大的是鳃, 肠道中没有检测到病毒。随着感染时间的延长, 各组织内的病毒含量逐步增加 (图 4)。感染后 10 d, 鳃、肾脏以及脑组织的病毒含量达到最高值, 随后病毒量保持稳定。

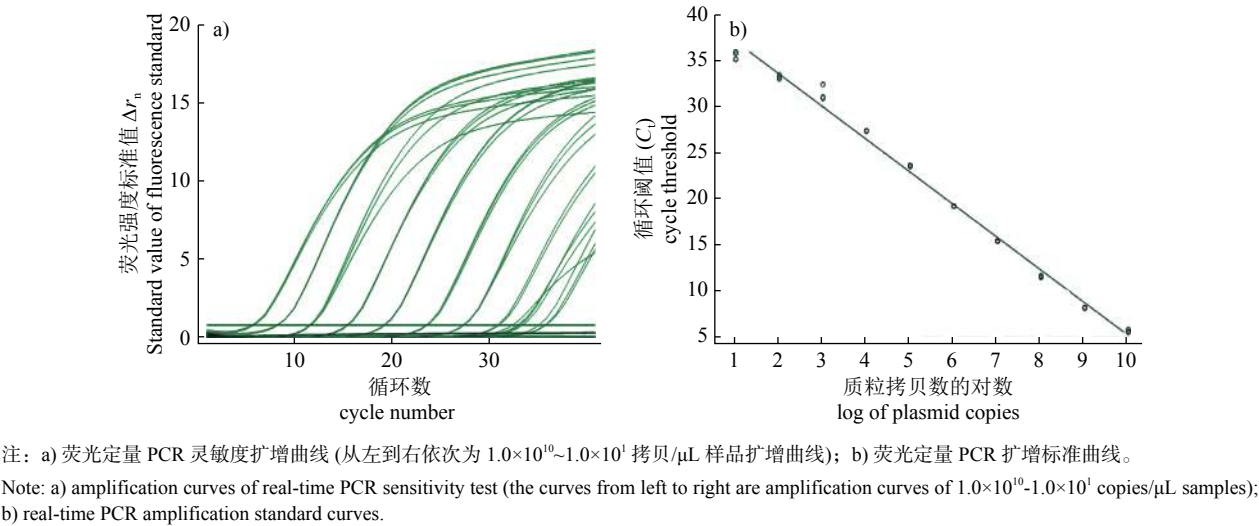


图 3 荧光定量 PCR 灵敏度扩增曲线与标准曲线

Fig. 3 Amplification curves of sensitivity and amplification standard curves of real-time PCR

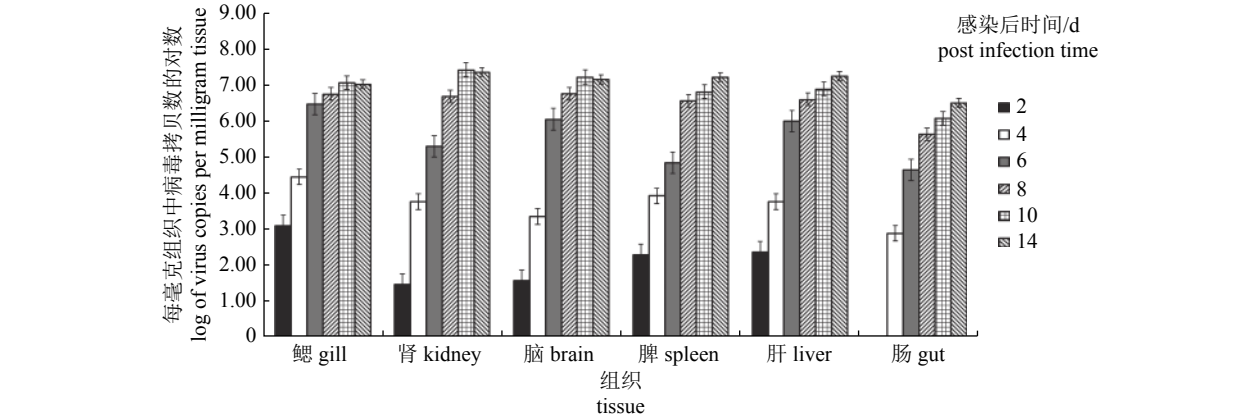


图 4 浸泡感染后不同时间点鲤鱼组织中病毒含量的变化

Fig. 4 Quantity of virus in common carp tissue samples after bath challenge

3 讨论

锦鲤疱疹病毒病 (KHVD) 自暴发以来, 发病率高, 死亡率为 80%~100%, 流行范围广, 呈世界性流行, 威胁着全球多个国家的鲤鱼及锦鲤养殖业的发展^[14]。世界动物卫生组织 (OIE) 和中国都将 KHVD 列为必须申报的疾病, 中国农业部将其列为 II 类动物疫病^[15]。近年来, 国内外许多学

者在从病原诊断、传播途径和疫苗防控等多方面开展了研究, 取得了一定的进展, 然而对 CyHV-3 的基础研究仍不够深入, 特别是对病毒的入侵机制、病毒与宿主之间的关系等研究不足, 导致 KHVD 仍未得到有效控制。本研究采用 3 种滴度通过浸泡法对健康鲤鱼进行人工感染, 结果显示: 在 4、40、400 PFU/mL 这 3 种滴度中, 最终的死亡率分别为 80%、85% 和 80%, 3 种感染滴

度都导致鲤鱼大量死亡,病毒滴度对死亡率没有影响。在试验过程中,高滴度组的试验鱼表现为急性死亡,低滴度组则为慢性死亡。

为研究 CyHV-3 的致病机制和入侵规律,本文开展了该病毒的动态病理学和病原组织分布研究。动态组织病理学的观察选择了鳃和肾脏,分别代表了 CyHV-3 感染受损的外部器官和内部器官,结果显示: CyHV-3 感染第 2 天就造成了明显的鳃损伤,主要表现为呼吸上皮细胞增生浮肿,鳃小片基部的组织细胞大量增生并坏死脱落。而肾脏的明显损伤出现在感染的第 4 天,呈现典型的间质性肾炎的病理特征。上述的观察结果与自然感染 CyHV-3 的鲤鱼表现的病理学特征^[16]相同。鳃和肾脏是 CyHV-3 感染的主要靶器官,其病理学观察可作为诊断 KHVD 的重要依据。CyHV-3 的入侵规律目前还不清楚, HEDRICK 等^[3]认为鳃早于其他组织出现损伤,是病毒入侵的主要途径。然而, GUILLAUME 等^[17]报道称:咽部牙周黏膜是病毒口服感染的主要途径,浸泡感染病毒的入侵的主要途径是皮肤。MINAMOTO 等^[18]研究证明:在暴发过 CyHV-3 的水体中能够检测到 CyHV-3 病毒 DNA,并且病毒在水体中可以保持至少 4 h 的感染力,因此认为水是病毒传播的主要媒介^[19]。

本研究表明:不同时间点组织中的病毒载量显示肠道中的病毒含量最低。CyHV-2 感染鲫鱼的研究证实肠道并不是病毒感染的敏感器官^[20],由此可知, CyHV-3 与其同属的 CyHV-2 在自然条件下都不是经消化道感染入侵,而是通过其他途径。本研究显示:感染前期(即感染后 2、4、6 d)鳃组织中的病毒含量均为最高,且其他组织内病毒含量与鳃相比有明显差距,表明在鱼体内病毒首先侵入的是鳃组织并在其中大量增殖。MIYAZAKI 等^[9]也认为 CyHV-3 的主要靶标是鳃小片的呼吸道上皮细胞,鳃是重要的呼吸器官,是鱼体中血液与外界交换气体的场所,与水体接触面积较大^[21],所以鳃常常成为水体中的病原体攻击的对象。感染后期,肾脏、脾脏中的病毒含量很高。已有研究证实 CyHV-3 在肾组织中的复制较为活跃^[22],甚至有报道称肾脏是 CyHV-3 增殖效率最高的器官^[23]。SUNARTO 等^[24]证实脾脏是主要的靶器官, CyHV-3 在肾脏和脾脏中都能够大量繁殖,与本研究的结果一致。本研究

进行了 CyHV-3 的动态病理学与病毒感染组织分布的研究,初步推断 CyHV-3 首先入侵鳃,然后通过血液循环到达肾脏等内部器官,为后续 CyHV-3 致病机制的深入研究提供了实验基础与参考。

[参考文献]

- [1] 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. DOI: [10.1099/vir.0.80982-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80982-0).
- [2] 段宏安,周毅,徐晔,等.锦鲤疱疹病毒病简述[J].中国动物检疫, 2015(6): 48. DOI: [10.3969/j.issn.1005-944X.2015.06.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-944X.2015.06.014).
- [3] HEDRICK R P, GILAD O, YUN S C, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12(1): 44. DOI: [10.1577/1548-8667\(2000\)012\(0044:ahawmm\)2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012(0044:ahawmm)2.0.co;2).
- [4] MCCOLL K A, COOKE B D, SUNARTO A. Viral biocontrol of invasive vertebrates: lessons from the past applied to cyprinid herpesvirus-3 and carp (*Cyprinus carpio*) control in Australia[J]. Biological Control, 2014, 72(1): 109. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2014.02.014](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.014).
- [5] DONG C F, WENG S P, LI W, et al. Characterization of a new cell line from caudal fin of koi, *Cyprinus carpio* koi, and first isolation of cyprinid herpesvirus 3 in China[J]. Virus Research, 2011, 161(2): 140. DOI: [10.1016/j.virusres.2011.07.016](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.07.016).
- [6] 朱霞,王好,李新伟,等.锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J].中国兽医科学, 2011(1): 106. DOI: [10.16656/j.issn.1673-4696.2011.01.020](https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2011.01.020).
- [7] 王庆,郑树城,李莹莹,等.锦鲤疱疹病毒病的传入风险评估[J].中国动物检疫, 2016, 33(10): 42. DOI: [10.3969/j.issn.1005-944X.2016.10.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-944X.2016.10.011).
- [8] PIKARSKY E, RONEN A, ABRAMOWITZ J, et al. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus[J]. Journal of Virology, 2004, 78(17): 9544. DOI: [10.1128/JVI.78.17.9544-9551.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9544-9551.2004).
- [9] MIYAZAKI T, KUZUYA Y, YASUMOTO S, et al. Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio* and the morphology and morphogenesis of KHV[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 80(1): 1. DOI: [10.3354/dao01929](https://doi.org/10.3354/dao01929).
- [10] ILOUZE M, DAVIDOVICH M, DIAMANT A, et al. The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review[J]. Ecological Research, 2011, 26(5): 885. DOI: [10.1007/s11284-010-0694-2](https://doi.org/10.1007/s11284-010-0694-2).
- [11] GILAD O, YUN S, ZAGMUTT-VERGARA F J, et al. Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed

- by real-time TaqMan PCR[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(3): 179. DOI: [10.3354/dao060179](#).
- [12] YUASA K. Koi herpesvirus disease[J]. *Fish Pathology*, 2016, 51(3): 99. DOI: [10.3147/jsfp.51.99](#).
- [13] 陈俊杰, 李媛媛, 阳瑞雪, 等. 锦鲤疱疹病毒潜伏感染实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2017, 43(3): 312. DOI: [10.13331/j.cnki.jhau.2017.03.016](#).
- [14] MICHEL B, FOURNIER G, LIEFFRIG F, et al. Cyprinid herpesvirus 3[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(12): 1838. DOI: [10.3201/eid1612.100593](#).
- [15] 李玉平, 毛洪顺, 唐绍林, 等. 锦鲤疱疹病毒病的诊断与防控[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2016(10): 32. DOI: [10.3969/J.ISSN.1671-6027.2016.10.024](#).
- [16] GOTESMAN M, KATTLUN J, BERGMANN S M, et al. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(2): 163. DOI: [10.3354/dao02614](#).
- [17] GUILLAUME F, MAXIME B, VICTOR S R, et al. Feeding *Cyprinus carpio* with infectious materials mediates cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 6. DOI: [10.1186/1297-9716-43-6](#).
- [18] MINAMOTO T, HONJO M N, YAMANAKA H, et al. Nationwide cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan[J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93(1): 508. DOI: [10.1016/j.rvsc.2011.06.004](#).
- [19] RAKUS K, OUYANG P, BOUTIER M, et al. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 85. DOI: [10.1186/1297-9716-44-85](#).
- [20] 姚卓凤. 鲫感染鲤疱疹病毒 II 的组织病理学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 32.
- [21] 方进, 邓院生, 王俊, 等. 急性病毒性鲫出血病的病理变化[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 336. DOI: [10.3724/SP.J.1118.2016.15332](#).
- [22] 周永灿, 袁军法, 任武泽, 等. 锦鲤疱疹病毒的检测与人工感染试验[J]. *武汉大学学报 (理学版)*, 2005(s2): 252.
- [23] GILAD O, YUN S, ANDREE K B, et al. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 48(2): 101. DOI: [10.3354/dao048101](#).
- [24] SUNARTO A, MCCOLL K A. Expression of immune-related genes of common carp during cyprinid herpesvirus 3 infection[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(2): 127. DOI: [10.3354/dao02824](#).

责任编辑: 何馨成