

鲤病毒病原的感染性测定

陈中元^{1,2}, 刘 荏¹, 李正秋¹, 王 敏³, 张奇亚^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:为查明养殖鲤(*Cyprinus carpio*)突然大批发病死亡的原因,对鲤病样品进行了细胞攻毒、空斑测定、电镜观察,以及鱼体感染等实验。先以患病鲤的组织匀浆液,经过滤后,分别接种到草鱼鳃条细胞(GCF)、鲤上皮瘤细胞(EPC)等14种培养细胞中。利用倒置显微镜观察显示,在1~2 d内,该病鱼组织匀浆液可使其中9种细胞出现典型的细胞病变。收集出现病变的细胞液(即病毒悬液),进一步进行病毒滴度检测、空斑测定和鱼体感染实验。结果显示,在GCF细胞上的病毒滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL;在FHM、TSB和GCO等细胞中可产生直径1~4 mm的圆形空斑,空斑的大小与宿主细胞种类和接种的病毒浓度有关。通过对感染细胞制备的超薄切片和病毒负染样品进行电镜观察,显示这是一类呈典型子弹头样的弹状病毒颗粒。感染了病毒悬液的鲤和鲤先后在第2天和第3天开始出现病症,间隔1~2 d后发病的鱼开始死亡。至第14天,两种感染鱼的死亡率均达到83.3%。收集人工感染后濒死的鲤和鲤,分别制备组织匀浆液,再感染鱼类培养细胞,24 h内能使其出现与原发病鲤组织匀浆液所引起的类似的细胞病变。因此证实患病鲤是由病毒病原感染所致。[中国水产科学, 2006, 13(4): 617~623]

关键词:鲤;病毒;细胞培养;病毒感染;空斑实验

中图分类号: S943.116.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)04-0617-07

感染实验被广泛应用于鱼类病毒病原的测定、分离、鉴定、体外扩增、理化性质分析等,也用于病毒抗原制备、疫苗生产、基因表达等研究^[1-4]。感染实验具有多种方式,如通过建立在细胞培养技术上的单层细胞感染实验与空斑实验;利用敏感动物,如鱼体回接感染实验等。人类分离和培养的第一株鱼类病毒——传染性胰脏坏死病毒(Infectious Pancreatic Necrosis Virus IPNV)就是利用培养细胞技术来完成的^[5]。通过细胞培养技术分离和检测出的鱼类病毒还有病毒性出血败血症病毒(Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, VHSV)、传染性造血器官坏死病毒(Infectious Haematopoietic Necrosis Virus, IHNV)、鲤春季病毒血症病毒(Spring Viraemia of Carp Virus, SVCV)、白斑狗鱼幼鱼弹状病毒(Pike Fry Rhabdovirus, PFR)、鲤疱疹病毒(Koi Herpes Virus, KHV)、淋巴囊肿虹彩病毒(Lymphocystic Disease Virus)等^[3,6-8]。

鲤(*Cyprinus carpio*)作为中国淡水经济鱼类的

主要品种之一,已在全国各地广泛养殖。但是近年来,鲤的传染性病害有日渐增多的趋势,尤其是一些由病毒引起的流行性疾病难以防治,造成了巨大的经济损失。1998年,英国检疫部门2次从中国进口的锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)中检出鲤春弹状病毒(SVCV),导致有的国家在2年内停止从中国内地进口观赏鱼^[9]。2002年,从广东省患流行病的鲤中分离到鲤疱疹病毒(KHV),可导致鲤的死亡率超过80%^[10]。2004年在江苏省出现一种鲤流行病,导致大量鲤鱼苗死亡。为查明这一地区鲤的流行病原是否为病毒,本研究从多个途径对病鱼样品进行感染实验,对感染结果进行了分析,旨在鉴定病原,并为控制病害奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)病鱼样品是来自发病渔场的濒死幼鱼组织匀浆液,由冰冻保存。

收稿日期:2005-07-26; 修订日期:2005-11-22.

基金项目:淡水生态与生物技术国家重点实验室基金项目(220313).

作者简介:陈中元(1982-),男,在读研究生,从事水生动物病毒学研究.

通讯作者:张奇亚. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

(2)健康的1月龄鲫和2月龄鲤均来自水生所关桥养殖场,经2%的食盐水浸泡消毒后,饲养于实验室的鱼缸中备用,养殖水温22~24℃。

1.2 细胞种类

实验用细胞系主要包括草鱼性腺(*Ctenophar-*

godon idellus ovaries, GCO)、草鱼鳍条(*Ctenopharyngodon idellus fins*, GCF)、沟鲇卵巢(*Channel catfish ovary*, CCO)、鲤上皮瘤(*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC)等14种细胞系(表1)。

表1 实验用的14种细胞系

Tab.1 Fourteen cell lines used in the experiment

缩写 Abbreviation	细胞系 Cell line	参考文献 Reference
GCO	草鱼性腺 (<i>Ctenopharyngodon idellus ovaries</i>)	[6]
GCF	草鱼鳍条 (<i>Ctenopharyngodon idellus fins</i>)	[11]
CCO	沟鲇卵巢 (<i>Channel catfish ovary</i>)	[12]
EPC	鲤上皮瘤 (<i>Epithelioma papulosum cyprini</i>)	[13]
FHM	肥头鲢 (<i>Pimephales promelas</i>)	[14]
CLC	鲤淋巴细胞 (<i>Cyprinus carpio leucocyte cell</i>)	[15]
TSB	中华鳖血液 (<i>Trionyx sinensis blood</i>)	尚未发表
GCH	欧鲢心脏 (<i>Carassius auratus gibelio heart</i>)	[6]
BB	棕鲈 (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	[16]
CAB	鲫囊胚 (<i>Carassius auratus blastula</i>)	[17]
CAVB	鲫椎骨间质 (<i>Carassius auratus vertebral column bone</i>)	尚未发表
CIK	草鱼肾 (<i>Ctenopharyngodon idellus kidney</i>)	[18]
GRO	稀有鲫卵巢 (<i>Gobiocypris rarus ovary</i>)	尚未发表
HMO	鲢卵巢 (<i>Hypophthalmichthys molitrix ovary</i>)	尚未发表

1.3 细胞感染实验

细胞培养参照本实验室的常规方法^[19],除CCO和BB的培养使用含10%血清的DMEM培养液之外,其余细胞均用含10%血清的TC199培养液。

病鱼组织匀浆液于-20℃冰冻过夜,化冻后经1000 r/min(Sigma离心机,转头型号为12124 PP)离心5 min,取上清液,加入双抗(100 IU/mL青霉素、100 mg/L链霉素),过滤除菌后备用。

将培养细胞传到24孔板内,待其长成单层后,每个孔分别接种0.1 mL的病鱼组织匀浆液,同时设未接种的正常细胞作对照,置于25℃培养箱中培养,连续7 d每天都在显微镜下观察,记录细胞产生病变及其病变发展的情况,并收集出现病变的细胞培养物(即病毒悬液)备用。

1.4 病毒滴度的测定

在细胞感染实验中,显示GCF细胞为鲤病毒的敏感宿主细胞,因此选择GCF细胞对病毒滴度进行测定。先将GCF细胞传到96孔板上,待其长成单层后,分别接种已作10倍系列稀释至 10^{-7} 的病毒

悬液,置于25℃培养,显微镜下连续观察7 d,记录出现或未出现细胞病变的孔数,按Reed-Muench公式^[4]计算病毒的滴度TCID₅₀。

1.5 空斑实验

分别将FHM、GCO和TSB细胞传到24孔板上,待其长成单层后,将培养基倒掉,取0.1 mL病毒悬液作10倍系列稀释到 10^{-5} ,每个孔接种0.1 mL,轻轻摇匀,感染后置于25℃吸附1 h;将0.75%琼脂(用TC199培养液配置)熔化后,在45℃温浴保存。弃去未吸附的病毒,每个孔取0.5 mL琼脂覆盖,待琼脂凝固后,每个孔加入1 mL TC199培养液(含双抗、Hepes和5% BCS),置于25℃培养;同时设未接种的正常细胞作对照,显微镜下逐日观察病灶的形成和变化。第7天,细胞经甲酯固定、结晶紫染色后照相。

1.6 电镜观察

收集病变细胞,制备超薄切片,进行电镜观察(JEM-1230 Japan)^[20]。

取病毒悬液,经差异离心:先4000 r/min(Sigma离心机,转头型号为12124 PP),离心10 min;然

后 12 000 r/min(Sigma 离心机,转头型号为 12024-H),离心 30 min,负染观察。

1.7 鱼体感染实验及回接感染培养细胞

用于实验的鲤和鲫共分 5 组,每个组 12 尾鱼,其中鲤 3 个组;鲫 2 个组。

(1)鲤的 3 个组分别为实验组 1:直接用稀释 10 倍的病毒悬液浸泡 1.0 h;实验组 2:先用 2.0% 盐水浸泡 10 min,然后用稀释 10 倍的病毒悬液浸泡 1.0 h;实验组 3:为对照组,只用 2.0% 盐水浸泡 1.0 h。

(2)鲫的 2 个组分别为实验组 1:直接用稀释 10 倍的病毒悬液浸泡 1.0 h;实验组 2:为对照组,只用 2.0% 盐水浸泡 1.0 h。

上述各组鱼处理后,置室温(18~25℃)下饲养,逐日观察,记录鱼发病及死亡情况。另外,取感染后濒死的鲤、鲫,分别制备成组织匀浆滤液,接种于已长成单层的 EPC 细胞中;同时设有正常的鲤、鲫组织匀浆液接种的细胞对照,25℃ 下培养,利用倒置显微镜,逐日观察细胞病变情况。

2 结果

2.1 出现病变的细胞种类

在 14 种培养细胞中,有 GCO、GCF、CCO、EPC、FHM、CLC、TSB、GCH 和 BB 这 9 种细胞先后出现了不同程度的病变。

感染细胞开始出现病变的时间并不同,病毒稀释倍数为 10^{-1} 时,GCO 细胞在第 2 天开始出现 CPE;而病毒稀释倍数为 10^{-3} 时,至第 5 天才开始出现病变。但到了第 7 天,接种病毒稀释倍数为 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 的 GCO 细胞均完全病变(+++) (表 2),可见同一种细胞,接种病毒量越大,出现病变的时间就越短。

当接种病毒为同一个稀释倍数(10^{-1})时,GCO、GCF、CCO 在第 2 天就开始出现 CPE,而 GCH 和 BB 至第 3 天才开始出现 CPE。这表明细胞产生病变所需的时间不仅受接种病毒量大小的影响,也与细胞种类有关。

表 2 不同稀释度的病鱼组织匀浆液感染细胞出现病变的比较
Tab.2 Comparison of CPE induced by the different dilutions of the homogenate of the diseased *Cyprinus carpio* times

培养细胞 Cell lines	稀释倍数 Dilution factor			对照 Control
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
GCO	++++	++++	++++	-
GCF	++++	++++	+++	-
CCO	++++	++++	+++	-
EPC	++++	++++	+++	-
FHM	++++	++++	+++	-
CLC	++++	+++	++	-
TSB	++++	+++	++	-
GCH	++	+	±	-
BB	++	+	±	-
CAB	-	-	-	-
CAVB	-	-	-	-
CIK	-	-	-	-
GRO	-	-	-	-
HMO	-	-	-	-

注:每个“+”示有 25% 的单层细胞病变,“±”示单层细胞出现微弱病变,“-”示单层细胞无可察病变。
Note:Each “+” means twenty five percent EPC, “±” means faint EPC, “-” means no visual EPC.

2.2 细胞的显微病变

在不同宿主细胞中出现病变的时间和病变的程度是不同的。如在 GCO、EPC 等细胞中,第 2 天就能观察到病变;而在 BB 细胞中,就要等到第 5 天才出现病变。至第 7 天为止,虽然 GCO、GCF、CCO、

EPC、FHM、CLC、TSB、GCH 和 BB 这 9 种细胞都出现了病变,但当病毒悬液的稀释倍数分别在 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 时,GCO 细胞都完全病变;而 GCH 和 BB 细胞的病变程度依次为 50%、25% 和轻微病变(表 2)。

由于接种病毒后 7 d, 有的宿主细胞已充分病变。故在接种病毒后第 3 天就对病变细胞进行显微照相(图 1)。与正常细胞相比, 这些细胞的显微病变主要表现是: 贴壁细胞出现收缩、变圆或拉长、部分细胞裂解、局部细胞脱落, 因此在原本致密单层排列的细胞中局部出现细小的无细胞区, 即小的空洞。

随着时间的推移, 病变和脱落的细胞越来越多, 空洞也越来越大, 以致细胞全部脱落。图 1 显示, 不同的宿主细胞在同一时间内的病变程度可能不同, 如当多数细胞的单层空洞等明显病变时, FHM 的细胞单层还基本完整, 没有出现空洞。

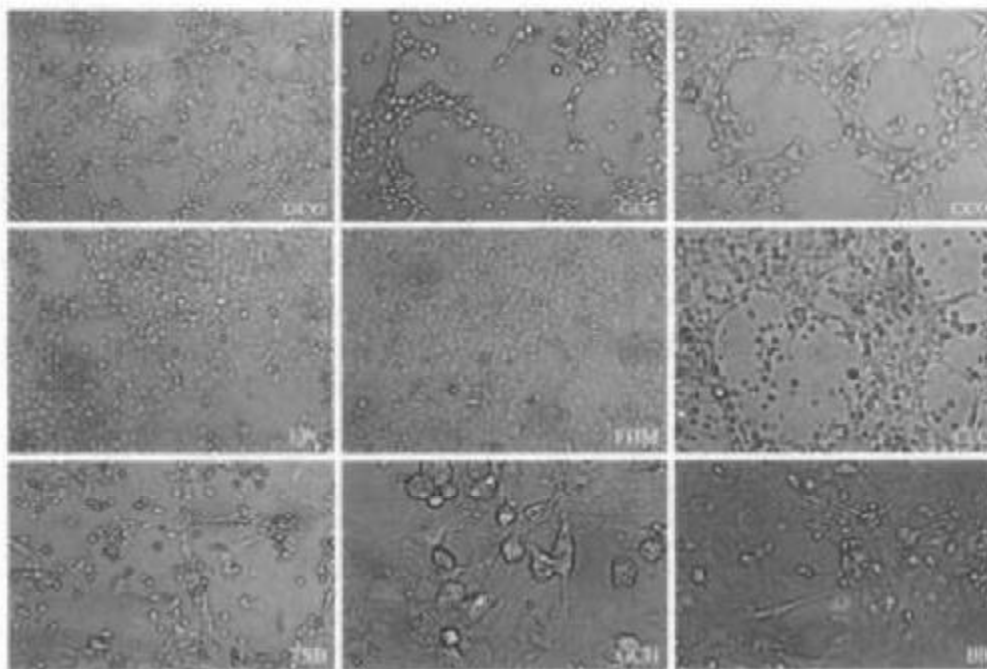


图 1 病毒悬液致细胞病变的显微图片($\times 20$)

Fig.1 Micrograph of CPE induced by the virus suspension ($\times 20$)

2.3 病毒的滴度

根据病毒在已长成致密单层的 GCF 细胞的 96 孔板中产生病变的记录和 Reed-Muench 公式, 测算出病毒的滴度为 $10^{7.3}$ TCID₅₀/mL。

2.4 空斑的形态与大小

将病毒悬液接种到 FHM、GCO 和 TSB 细胞中, 第 2 天开始就能观察到空斑。随着时间的延长, 空斑数目增多, 直径也有所扩大。至第 7 天, 细胞板经固定、染色后照相(图 2), 直接目测可见空斑形状呈圆形, 有大有小, 直径在 1~4 mm。

当接种病毒悬液的稀释倍数为 10^{-3} 时, FHM、GCO、TSB 细胞上的空斑数目有所不同(14~26 个), 虽然空斑直径较小, 有的仅 1 mm, 并有空斑融合; 但当接种病毒悬液的稀释倍数为 10^{-4} 时, 在上述 3 种细胞上分别观察到 5 个、5 个、3 个空斑, 而且

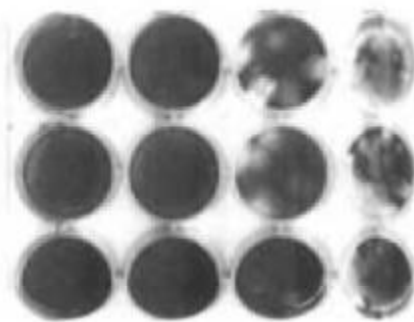


图 2 不同稀释度病毒悬液感染细胞后在细胞板上形成的空斑

Fig.2 Plaque induced by infection of the different dilutions of the virus suspension at cell plates

空斑直径有些已超过 3 nm;当接种病毒悬液的稀释倍数为 10^{-5} 时,在 FHM 细胞上仅观察到 1 个空斑,而 GCO、TSB 细胞没有出现。这表明感染后所形成的空斑数及其大小与宿主细胞种类、接种病毒的浓度有关。

2.5 病毒的超微形态

超薄切片的电镜观察结果显示,宿主细胞的基

本结构遭到破坏,出现大量的空泡,病毒颗粒分布在这些空泡中(图 3)。经差异离心、负染后的病毒样品,在电镜下可见典型的弹状病毒颗粒(图 4)。

2.6 感染后鱼发病情况

对浸泡感染后的 5 组鱼的行为及体表变化情况进行了详细观察和记录(表 3)。

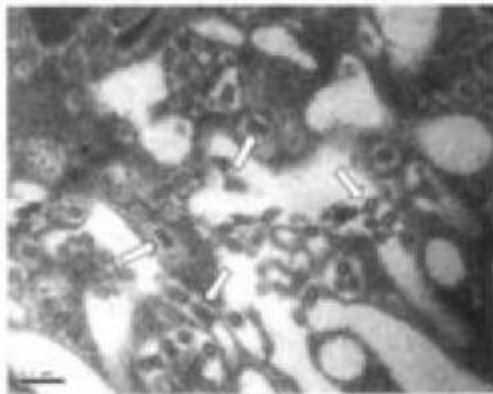


图 3 病变细胞超薄切片的电镜照片(标尺为 0.2 μm)

Fig.3 Electron micrograph of the ultra-thin section infected cells (bar=0.2 μm)

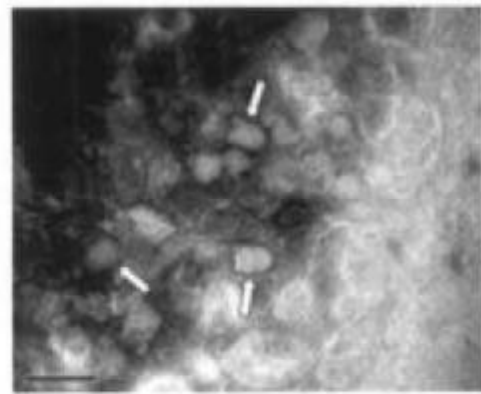


图 4 病毒粒子的负染电镜照片(标尺为 0.2 μm)

Fig.4 Electron micrograph of negatively stained viral particles (bar=0.2 μm)

表 3 人工感染该病毒后鱼类发病和死亡的结果

Tab.3 Data about disease and death of fishes by artificial infection of the virus suspension

项目 Item	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>			鲫 <i>Carassius auratus</i>	
	对照组 Control	实验组 1 Test 1	实验组 2 Test 2	对照组 Control	实验组 Test
感染后开始发病的时间 Days from infection to disease	0	7	2	0	2
感染后开始死亡的时间 Days from infection to death	0	9	3	0	2
感染后第 8 天累计死鱼尾数 Dead nos. within 8 days after infection	0	0	7	1	10
感染后第 14 天累计死鱼尾数 Dead nos. within 14 days after infection	0	3	10	1	10
死亡率/% Mortality	0	25	83.3	8.3	83.3

鲤实验组 1 在直接经病毒悬液感染后,第 7 天开始发病,至第 14 天,死亡率为 25%;而鲤实验组 2 在先通过 2% 的盐水浸泡后,再经病毒悬液感染,于第 2 天就开始发病,出现病症后的鱼在 1~2 d 内死亡,至第 14 天,死亡率为 83.3%。发病时体表症状为肌肉、鳍基部有点状或淤血状出血,腹部略膨大,游动缓慢,鱼体失去平衡,侧向同一个方向游动。鲤对照组全部正常。

鲫实验组在感染病毒悬液后,第 2 天就开始发

病,发病的体表症状与病鲤一致,出现病症后的鱼在 1~2 d 内死亡。至第 14 天,鲫实验组死亡率为 83.3%。另外,虽然鲫对照组第 5 天也有 1 尾死亡,但体表无异常,视为自然死亡。

2.7 回接感染细胞结果

及时收集感染后濒死的鲤、鲫,制备组织匀浆液后,分别回接感染 EPC 细胞,在 24 h 内细胞单层会出现与原发病鲤组织匀浆液所引起的类似细胞病变;而用对照组的鲤、鲫组织匀浆液回接的细胞均未出现病

变。该结果进一步证实,使大批鲤发病死亡的病原是病毒,而该病毒病原对鲤、鲫都具有明显的感染性。

3 讨论

众多实验已表明,细胞培养技术作为检测和鉴定鱼类病毒的常规方法之一,特别适应于某些毒力高、裂解性强的病毒,在对 VHSV 感染鲢鱼进行早期检测,其结果甚至显示,病毒的细胞培养较免疫组化检测更敏感^[21]。本实验室具有多年从事鱼类病毒研究的经验,而且新建和保存了一批培养细胞,利用这一有利条件和成熟的鱼类病毒实验技术,对鲤的病原进行感染所接种的 14 种培养细胞中有 9 种出现病变,且在 GCF 细胞中的滴度达到 $10^{7.3}$ TCID₅₀/mL₀。一方面表明病鲤的组织匀浆液确实存在病毒;另一方面还显示该病毒有明显的毒力,值得关注。

病鱼组织匀浆液经过滤器过滤,就能将寄生虫和细菌去除,避免了它们对感染实验的干扰。在细胞感染实验中,虽然源于鲤科鱼类的 GCO、GCF、CCO、EPC、FHM 和 CLC 细胞均产生了典型的病变,而同样源于鲤科鱼类的 CAB、CAVB、CIK 和 HMO 细胞却无病变产生,这表明不同细胞对病毒的敏感性是不同的,不仅与鱼的种属有关,还可能与细胞的组织来源或生长状况也有关。感染病毒后,即使细胞出现病变,病变的时间和程度也会因细胞不同而有差异。如感染后第 3 天, FHM 细胞的单层依然基本完好,但至第 7 天,细胞就完全病变了(表 2)。这可能是由于传代细胞密度较大、或病毒侵入 FHM 细胞所需时间较长等缘故。

空斑测定显示,在接种了相同浓度病毒的细胞上所形成的空斑数却不同,这可能是细胞对病毒的敏感性和特异性有关。但在条件完全一致的同一细胞孔中,空斑直径的大小却不同,这提示导致鲤发病的病毒病原可能存在不同的种类。已有报道指出,鲤存在不同病毒病原共感染的现象^[22]。共感染在哺乳类和人类病毒病中是一种普遍现象,是否在鱼类病毒病中也普遍存在,还有待进一步研究。

鱼体感染显示鲫和鲤都对鲤病毒敏感,这可能与鲫和鲤同属鲤科鱼类有关,这预示着本研究所测定的鲤病毒也可能是鲤科鱼其他成员的潜在病原,因此需尽快对这种病毒病原进行分离鉴定。另外,原始病样是来自鲤而不是鲫,但为何分别直接浸泡病毒悬液的鲫和鲤实验组,出现病症的时间不同,而且鲫要先于鲤发病呢? 分析认为这可能与鲤的鱼龄

大于鲫的鱼龄有关,但还有待进一步的实验来验证。

参考文献:

- [1] 张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况[J]. 水生生物学, 2002, 26(1): 89-100.
- [2] Zhang Q Y, Li Z H Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* [J]. Dis Aquat Org, 2000, 42: 1-9.
- [3] 杨先乐. 鱼类组织培养的问题与展望[J]. 水产学报, 1999, 23(增刊): 75-79.
- [4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 204-240; 329-330.
- [5] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells in vitro[J]. Science, 1962, 135: 1065-1066.
- [6] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, et al. Infection and propagation of lymphocystis virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines[J]. Dis Aquat Org, 2003, 57(1-2): 27-34.
- [7] Ahne W. Important viral disease in European fish culture[J]. Symp Biol Hung, 1984, 23: 3.
- [8] Rolland J B, Bouchard D, Coll J, et al. Combined use of the ASK and SHK-1 cell lines to enhance the detection of infectious salmon anemia virus[J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17(2): 151-157.
- [9] Liu H, Gao L, Shi X, et al. Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in P. R. China[J]. Bol Eur Ass Fish Pathol, 2004, 24(4): 194-204.
- [10] 刘 胜, 史秀杰, 高隆美, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 nested-PCR 鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 414-418.
- [11] Lu Y A, Lannan C N, Rohovec J S, et al. Fish cell lines: establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26(3): 275-279.
- [12] Bowser P R, Plumb J A. Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish[J]. Vitro, 1980, 16(5): 365-368.
- [13] Fijan N, Salinarovic D, Benotti M, et al. Some properties of the *Epitheloma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Ann Virol (Paris), 1983, 134E: 207-220.
- [14] Gravell M, Malsberger R G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Ann NY Acad Sci, 1965, 126: 555-565.
- [15] Faissal M, Ahne W. A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp *Cyprinus carpio*[J]. Dev Comp Immunol, 1990, 14 (2): 255-260.
- [16] Bowser P R, Plumb J A. Channel catfish virus: comparative replication and sensitivity of cell lines from channel catfish ovary and the brown bullhead[J]. J Wild Dis, 1980, 16(3): 451-454.
- [17] 陈敏蓉, 陈宏模, 易咏兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 121-129.
- [18] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立

- 及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10 (1): 11-17.
- [19] 张奇亚. 特种水产动物病毒病的研究[D]. 中国科学院海洋学博士学位论文, 1997. 83-84.
- [20] 张奇亚, 李正秋. 鲤腺病毒状病毒包涵体在培养细胞中的形成[J]. 中国兽医学报, 2001, 21 (1): 38-41.
- [21] Everson Q, Meier W, Wahl T, et al. Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally infected minnow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Dis Aquat Org*, 1994, 20: 101-109.
- [22] 张奇亚, 陶建军, 黄晓红, 等. 鲤腺病毒状病毒体外感染模型[J]. 水生生物学报, 2005, 29 (5): 473-478.

Detection of viral pathogen from diseased common carp (*Cyprinus carpio*) by infectious tests

CHEN Zhong-yuan^{1,2}, LIU Hong¹, LI Zheng-qiu¹, WANG Min³, ZHANG Qi-ya^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The viral pathogens are the most important epidemic disease affecting fish, which cause significant morbidity and mortality in fish. It has substantial impact on the production of fish and can not be prevented effectively. In order to determinate which pathogen caused the mass mortality cultured common carp (*Cyprinus carpio*), a series of experiments about cell lines challenged with virus supernatants from diseased fish homogenate, plaque assays, observed with electron microscope and artificial infection in fish were done. Diseased fish samples were collected, homogenized, filtered, then inoculated onto monolayer cultures of 14 cell lines including *Ctenopharyngodon idellus* ovaries (GCO), *Ctenopharyngodon idellus* fins (GCF), *Channel catfish* ovary (CCO), *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC), *Pimephales promelas* (FHM), *Cyprinus carpio* leucocyte cell (CLC), *Trionyx sinensis* blood (TSB), *Carassius auratus gibelio* heart (GCH), *Ameiurus nebulosus* (BB), *Carassius auratus* blastula (CAB), *Carassius auratus* vertebral column bone (CAVB), *Ctenopharyngodon idellus* kidney (CIK), *Gobiocypris rarus* ovary (GRO) and *Hypophthalmichthys molitrix* ovary (HMO). The results show that observation of the cytopathogenic effect (CPE) appeared in 9 of these cell lines, GCO, GCF, CCO, EPC, FHM, CLC, TSB, GCH and BB. The CPE involved cell rounding, detachment from the monolayer, and subsequent destruction of monolayer. Virus titers of about 10^{7-3} TCID₅₀/mL were obtained by infecting the GCF cells. Viral plaques were formed after virus supernatants attachment to three cell lines FHM, TSB, and GCO, and the plaques of 1 to 4 mm in diameter is probably dependent on host cell lines and viral diluents. Electron microscopy observation revealed that the viral particles of ultrathin sections and negatively stained had a typical bullet-shape morphology. Initial symptoms appear in crucian carp (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) in 2 and 3 days post-infection (p.i.) respectively. The diseased fish died in 1 to 2 days after the symptoms appearing. The late mortality rate of infected fish was 83.3% until the 14 days p.i. The dying fish were homogenized, filtered, then inoculated onto fish cell lines, the CPE were observed obviously in 24 hours p.i. and similar to those induced by the original homogenate of the diseased common carp. It is supported that the diseased fish were infected by the viral pathogen. Also the viral pathogen has strong infectivity to the crucian carp (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). The detection of viral pathogen from diseased common carp (*Cyprinus carpio*) by infectious tests in our researches is a base to the isolation and identification of the viral pathogen, also to the diagnosis and prophylaxis of it. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13 (4): 617-623]

Key words: *Cyprinus carpio*; virus; cell culture; viral infection; plaque assays

Corresponding author: ZHANG Qi-ya. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn