2015—2017年天津市虾肝肠胞虫流行情况调查

许　杰，霍文慧，邓　威，刘　群，孙　悦，杨　凯，薛淑霞，李　娜
（天津市水生动物疫病预防控制中心，天津　300221）

摘　要：为了解天津市对虾肝肠胞虫（EHP）流行情况，2015—2017年从汉沽区、大港区、塘沽区、宁河区、静海区、津南区和西青区等7个对虾养殖主产区，采集养殖对虾及饵料生物等样品，应用PCR法进行EHP检测。检测结果显示：在2015—2017年分别检测的79、105、140批次样品中，EHP阳性率分别为56.96%、69.52%、29.28%；在凡纳滨对虾的仔虾、幼虾、中成虾养殖阶段均可检出EHP，但幼虾、中成虾的阳性率高于仔虾；鱿鱼、沙蚕和桡足类等对虾饵料生物携带有EHP。结果表明，天津市EHP流行率呈显著下降趋势，说明严格控制亲虾品质及引进无病毒感染种苗、加强检疫监测等措施，可以有效控制EHP流行。

关键词：虾肝肠胞虫；对虾；流行；天津
中图分类号：S945.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1005-944X（2018）08-0013-04
DOI：10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.004

Investigation on Prevalence Status of *Enterocytozoon Hepatopenaei* in Tianjin from 2015 to 2017

Xu Jie，Huo Wenhui，Deng Wei，Liu Qun，Sun Yue，Yang Kai，Xue Shuxia，Li Na
（Tianjin Aquatic Animal Disease Prevention and Control Center，Tianjin　300221，China）

Abstract：In order to recognize the prevalence status of *Enterocytozoon hepatopenaei*（EHP）in Tianjin City，during 2015 to 2017，the prawns and their bait organism samples were collected from the main prawn cultivating areas in Hangu，Dagang，Tanggu，Ninghe，Jinghai，Jinnan and Xiqing district，then PCR method was used for conducting EHP detection. According to the results，from 2015 to 2017，there were 79，105 and 140 batches of prawns were detected，and the EHP positive rates of these 3 batches of prawns were 56.96%，69.52% and 29.28%，respectively. EHP could be detected at the larva，juvenile and adult stage of the whole growth phase of prawns，but the EHP positive rates in juvenile and adult prawns were higher than that in larvae of prawns. EHP was also found in the bait organisms，such as squids，silkworms and copepods. As a conclusion，the prevalence of EHP in Tianjin City showed a significant downward trend，indicating EHP can be effectively controlled by strictly controlling the quality of parent prawns，introducing prawn seedlings without virus infection and strengthening inspection，quarantine and surveillance.

Key words：EHP；penaeus；prevalence；Tianjin

自2013年以来，我国广东、浙江、江苏、海南、山东、天津、辽宁等沿海对虾养殖主产区先后发现有虾肝肠胞虫（*Enterocytozoon hepatopenaei*，EHP）流行。EHP可导致对虾生长极其缓慢或停滞，养殖成功率低，经济损失巨大。EHP于2009年在泰国养殖的生长缓慢斑节对虾（*Penaeus-monodon*）中被首次分离而命名[1]，是一种传染性强的细胞内寄生的微孢子虫，近年来在泰国、印度、越南、马来西亚、印度尼西亚和中国等主要对虾养殖国家中流行，可感染凡纳滨对虾（*Penaeus vannamei*）、斑节对虾等重要养殖虾类，是对全球对虾养殖生产影响较严重的疾病之一[2]。

EHP隶属于微孢子虫目（*Microsporidia*）微孢子虫科（*Nosematidae*）肠胞虫属（*Enterocytozoon*），成熟孢子呈椭圆形，大小为0.7 μm×1.1 μm，有1个细胞核、5~6圈的极丝、1个后液泡、1个附着在极丝上的固着盘，胞壁由原生质膜、低电子密度孢

基金项目：天津市科技计划项目（15ZXBFNC00280）

子内壁（10 nm）和高电子密度孢子外壁（2 nm）组成，是一种个体较小的微孢子虫。EHP 从早期孢子的孢原质到成熟孢子，均在宿主细胞的细胞质中生长发育[1]，主要分布在对虾肝胰腺小管上皮细胞[3]和肠上皮细胞[4]。

对虾感染 EHP 后临床症状不明显，摄食正常，不会出现大批死亡。在肝胰腺组织病理切片中可观察到从早期的孢原质到成熟孢子不同生长阶段的 EHP[2]；肝胰腺组织病变严重，肝胰腺腔体变小或消失，部分肝胰腺上皮细胞出现局灶性坏死或脱落[5]。感染 EHP 病虾的血淋巴中反映肝胰腺功能的生物化学参数值均比健康虾高很多[6]。对虾消瘦，重量降低，大小不均，重量离散，可对养殖产量造成直接影响[7]。Kathy 等[8]研究发现，印度尼西亚患白便综合征（White feces syndrome，WFS）的凡纳滨对虾甲壳松弛，肠壁发炎，后肠呈白色，在对虾白色粪便中检测出密集的 EHP 孢子和相对数量较少的杆状细菌。据泰国学者报道，养殖凡纳滨对虾感染 EHP 时，虽表现为 WFS，但 WFS 与 EHP 之间没有直接的因果关系[9]。Biju 等[2]在印度发现斑节对虾和凡纳滨对虾 EHP 发病率高，并伴有细菌感染。另有试验表明，EHP 是导致凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死（AHPND）和败血性肝胰腺坏死（SHPN）的一个风险因素[10]。

针对近年 EHP 在我国沿海对虾养殖主产区的流行蔓延，2015—2017 年连续 3 年对天津市养殖对虾 EHP 流行情况进行调查，分析病原在种苗生产与对虾养殖中的流行特点及趋势，为养殖对虾病害防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 采样

2015—2017 年根据不同养殖季节，从天津市汉沽区、大港区、塘沽区、宁河区、静海区、津南区和西青区等对虾养殖主产区，采集凡纳滨对虾、斑节对虾、罗氏沼虾、澳洲小龙虾、南非金刚虾，以及部分饵料生物（贝肉、卤虫、鱿鱼、沙蚕、商品化冷冻丰年虫、商品化冷冻桡足类）等样品。具体采样方法依据《水生动物产地检疫采样技术规范》（SC/T7103-2008）的相关规定。

1.2 实验室检测

采用全国水产技术推广总站推荐的病原 EHP 套式 PCR 检测方法，进行样品处理、DNA 提取、PCR 扩增、PCR 产物电泳、结果判定。检测 EHP 所用引物见表 1。阳性样品 PCR 产物送金唯智生物科技（北京）有限公司测序，测序结果在 NCBI Genbank 中进行 BLAST 比对、验证。

表 1 检测 EHP 所用引物

检测 EHP 所用引物	PCR 扩增目的片段 /bp
F1：5′TTGCAGAGTGTTGTTAAGGGTTT3′ R1：5′CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC3′	514
F2：5′TTGGCGGCACAATTCTCAAACA3′ R2：5′GCTGTTTGTCTCCAACTGTATTTGA3′	148

2 结果与分析

2.1 总体检测情况

2015—2017 年，从天津市养殖对虾主产区共采集对虾及有关样品 324 批次，进行 EHP PCR 检测和测序验证。结果显示，EHP 阳性率在 2017 年出现大幅下降，3 年的阳性率分别为 56.96%、69.52%、29.28%（表 2）。

表 2 2015—2017 年天津市养殖对虾 EHP 检测结果

年份	总样品批次	阳性批次	阳性率 /%
2015	79	45	56.96
2016	105	73	69.52
2017	140	41	29.28

2.2 各分类样品检测情况

2015—2017 年在天津市养殖凡纳滨对虾中均检测出 EHP 阳性，2016 年阳性率高达 70.19%，2017 年降为 29.32%；而斑节对虾、罗氏沼虾、澳洲小龙虾、南非金刚虾中，均未检出 EHP。养殖凡纳滨对虾的仔虾、幼虾、中成虾中均检出 EHP，其中仔虾阶段最低，幼虾阶段最高。对虾饵料生物中，检测发现鱿鱼、沙蚕和商品化冷冻桡足类等携带有 EHP，而贝肉、卤虫和商品化冷冻丰年虫中未检出 EHP。2015—2017 年的具体检测结果见表 3。

3 讨论

本研究于 2015—2017 年从天津市对虾主产区采集 324 批次样品进行 EHP 检测，发现 2015—

表 3 2015—2017 年天津市养殖对虾有关样品的 EHP 检测结果

年	样品名称	样品批次	规格	各阶段样品批次	各阶段阳性批次	阳性率 /%	阳性总批次	总阳性率 /%
2015	凡纳滨对虾	75	仔虾	36	11	30.55	43	57.33
			幼虾	7	7	100		
			中成虾	14	10	71.43		
			亲虾	19	15	78.95		
	饵料生物	4	贝肉	1	0	0	2	50.00
			卤虫	1	0	0		
			鱿鱼	1	1	100		
			沙蚕	1	1	100		
2016	凡纳滨对虾	104	仔虾	25	12	48.00	73	70.19
			幼虾	41	32	78.05		
			中成虾	36	27	75.00		
			亲虾	3	2	66.67		
	南非金刚虾	1	仔虾	1	0	0	0	0
2017	凡纳滨对虾	133	仔虾	64	13	20.31	39	29.32
			幼虾	30	13	43.33		
			中成虾	31	10	32.26		
			亲虾	8	3	37.5		
	斑节对虾	1	仔虾	1	0	0	0	0
	罗氏沼虾	1	仔虾	1	0	0	0	0
	澳洲小龙虾	1	仔虾	1	0	0	0	0
	饵料生物	4	桡足类	3	2	66.67	2	50.00
			丰年虫	1	0	0		

注：仔虾体长小于 3.0 cm，幼虾体长 3.0~7.0 cm，中成虾体长 7.0 cm 以上

2016 年的阳性率较高，而 2017 年显著下降。这是因为从 2016 年开始，天津市按照农业部要求，加强了 EHP 病原监测，及时发布疫情预警，并采取了相应的预防控制措施。

针对国内沿海地区凡纳滨对虾生长缓慢的现象，我国开展了 EHP 调查研究。黄倢 [11] 认为仔虾或幼虾阶段生长缓慢主要是因为感染了传染性皮下和造血组织坏死病毒（Infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus，IHHNV），而养成期生长停滞则可能是感染了 EHP。王雅博等 [12]2015 年 8 月在辽宁省 26 个养殖场进行研究，发现 EHP 和 IHHNV 两种病原混合感染比例较高，仅在小虾样本中检测到 EHP，感染率达 100%，而在大虾样品中未检出。陈禄芝等 [13] 检测了 87 份粤西地区的凡纳滨对虾样品，发现成虾和种虾样品的 EHP 检出率较高，分别为 93.75% 和 66.67%，虾苗检出率较低，为 24.24%。本研究发现，幼虾、中成虾养殖阶段 EHP 阳性率偏高，仔虾阶段 EHP 检出率偏低，与上述研究观点相近。

幼虾、中成虾养殖阶段 EHP 阳性率比仔虾虾苗养殖阶段高的原因可能是：（1）对虾感染 EHP 与养殖环境紧密相关，高温季节的患病概率高于低温季节。夏季正值对虾养殖中成期，由于多高温阴雨天气，养殖水体低溶氧、高水温、高氨氮等因素，导致养殖对虾病害抵抗力减弱，应激加重，从而导致发病率增加。（2）我国在养殖日本囊对虾（*Marsupenaeus japonicus*）、罗氏沼虾（*Macrobrachium rosenbergii*）中检出了 EHP[14]。随着对虾亲虾及苗种的大量引进，其携带的病原对我国现有对虾品种及其饵料环境生物造成潜在威胁，养殖对虾极易通过野生生物、鲜活或冷冻饵料感染 EHP，导致幼虾、中成虾养殖阶段 EHP 感染率上升。（3）近年来，由于采用集约化高密度养殖模式，养殖对虾出现多种病害并发趋势，对虾感染疾病后，免疫力下降，导致感染率上升。有研究显示，感染白斑综合征病毒（White sport syndrome virus，WSSV）后的中国对虾仔虾对微孢子虫的敏感性增加，对虾微孢子虫感染率达 90% 以上 [15]。

由于 EHP 孢子壁较厚，可达到 10 nm 左右，一般药物难进入虫体内，使得传统杀虫药物对 EHP 较难奏效，而具有确切治疗作用的治疗药物尚未见报道，所以针对 EHP 感染，只能以预防为主。EHP 可垂直传播，即通过亲虾受精卵或种苗垂直传播给子代，也可水平传播给其他个体。因此，培育无特定病原（SPF）虾苗或抗特定病毒病原（SPR）虾苗或种虾，重视亲虾的疫病检疫，引进不带 EHP 的健康亲虾进行繁育，以及跟踪监测、隔离标苗棚等一系列控制措施，可有效降低对虾 EHP 感染率。对虾可经口摄食寄生 EHP 的鲜活饵料、病虾、死虾或环境中的孢子体而感染 EHP[9]。陈禄芝 [13] 在未经处理的海水样品中检测到 EHP，而在经砂滤、臭氧消毒、精密过滤、紫外消毒等一系列处理过的水体中未检测出 EHP，因此消毒处理水体可以预防 EHP 传播。叶健等 [16] 检测商品化卤虫卵、商品化卤虫幼体、冰冻成体卤虫，发现冰冻成体卤虫携带 EHP，阳性率为 50%，并且卤虫

的 EHP 携带量在一个相对较高水平。本研究也发现鱿鱼、沙蚕和商品化冷冻桡足类等对虾饵料生物携带有 EHP，检出率为 50%，这增加了通过投喂生物饵料直接或间接导致养殖对虾感染 EHP 的风险。

总之，采用 PCR、LAMP 及定量 PCR 等分子生物学方法，对病原体进行严格检验检疫 [17]，加强凡纳滨对虾幼体期和养殖过程中 EHP 的实时监测，及时采取预防控制措施，可以防止养殖过程中 EHP 的侵入，减少经济损失。

4 小结

本次调查发现：2015—2017 年天津市养殖对虾中存在不同程度的 EHP 流行，3 年的阳性率分别为 56.96%、69.52%、29.28%，呈显著下降趋势，这与天津市严格控制亲虾品质及引进健康种苗，以及加强 EHP 检疫监测有关；凡纳滨对虾幼虾、中成虾的 EHP 阳性率高于仔虾，这与养殖环境、饵料污染和养殖密度大有关。

参考文献：

[1] TOURTIP S，WONGTRIPOP S，STENTIFORD G D，et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov.（*Microsporida*：*Enterocytozoonidae*），a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*（*Decapoda*：*Penaeidae*）：Fine structure and phylogenetic relationships[J]. Journal invertebrate pathology，2009，102（1）：21-29.

[2] BIJU N，SATHIYARAJ G，RAJ M，et al. High prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimps *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* sampled from slow growth ponds in India[J]. Diseases of aquatic organisms，2016，120（3）：22-30.

[3] 骆云慧，石坚，方磊，等 . 虾肝肠胞虫 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医科学，2016，46（7）：847-852

[4] 雷燕，肖洋，张会军，等 . 凡纳滨对虾肠道上皮细胞微孢子虫 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 广东海洋大学学报，2016，36（4）：50-54.

[5] 施慧，许文军，谢建军，等 . 舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析 [J]. 中国水产科学，2017，24（2）：387-394.

[6] SANTHOSHKUMAR S，SIVAKUMAR S，VIMAL S，et al. Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei*（EHP）in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp，Litopenaeus vannamei（Boone，1931），in India[J]. Journal of fish diseases，2017，40（4）：529-539.

[7] 刘雅梅，邱亮，程东远，等 . 检出虾肝肠胞虫（*Enterocytozoon hepatopenaei*）的凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）群体的体长和体重关系 [J]. 渔业科学进展，2017，38（4）：96-103.

[8] KATHY F J，JEE E H，LUIS F A，et al. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*（EHP）in feces of Penaeus vannamei exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp[J]. Journal of Invertebrate pathology，2016，140（10）：1-7.

[9] AMORNRAT T，JIRAPORN S，SAISUNEE C，et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp Penaeus（*Litopenaeus*）*vannamei*[J]. BMC veterinary research，2013，9（1）：1-10.

[10] LUIS F A，JEE E H，KATHY F J. *Enterocytozoon hepatopenaei*（EHP）is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease（AHPND）and septic hepatopancreatic necrosis（SHPN）in the Pacific white shrimp Penaeus vannamei[J]. Aquaculture，2017，471（3）：37-42.

[11] 黄倢 . 北方区病害防控岗位科学家研究报告 [R]. 青岛：国家虾产业技术体系研发中心，2013：170-191.

[12] 王博雅，王力，刘美如，等 . 凡纳滨对虾 3 种主要病毒和虾肝肠胞虫在辽宁地区的流行情况分析 [J]. 大连海洋大学学报，2017，32（2）：150-154.

[13] 陈禄芝 . 粤西地区凡纳滨对虾虾肝肠胞虫、传染性皮下和造血组织坏死病毒感染情况的初步调查 [J]. 渔业研究，2016，38（4）：273-280.

[14] 刘珍，张庆利，万晓媛，等 . 虾肝肠胞虫（*Enterocytozoon hepatopenaei*）实时荧光定量PCR检测方法的建立及对虾样品的检测[J]. 渔业科学进展，2016，37（2）：119-126.

[15] 李凤超 . 商品对虾中病原体的检出及其致病力的研究 [D]. 石家庄：河北大学，2000.

[16] 叶健，施礼科，王力，等 . 警惕卤虫可携带虾肝肠胞虫 [J]. 科学养鱼，2017，11：62.

[17] SUEBSING R，PROMBUN P，SRISALA J，et al. Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp[J]. Journal of applied microbiology，2013，114（5）：1254-1263.

（责任编辑：朱迪国）