

浙江省南美白对虾苗种 五种流行病病原检测与分析

郑晓叶¹, 许俊榆², 郑天伦¹, 朱凝瑜¹, 曹飞飞¹

(1. 浙江省水产技术推广总站, 浙江杭州 310023;

2. 浙江科技学院生物与化学工程学院/轻工学院, 浙江杭州 310012)

摘要: 为了解浙江省南美白对虾主产区苗种主要病原的携带情况, 对杭州、宁波、嘉兴和绍兴4个地区的苗种场开展了病原检测。129批次样品的检测结果显示: 有4种病原检出阳性, 阳性检出率分别为南美白对虾白斑综合症病毒(WSSV) 1.55%、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) 20.93%、虾肝肠胞虫(EHP) 31.78%、虾血细胞虹彩病毒(SHIV) 37.21%, 而桃拉综合症病毒(TSV)未有阳性检出。结果表明, SHIV、EHP、IHHNV是浙江省对虾苗种携带的主要病原, 需要重点加以防范。从整体分布看, 宁波市南美白对虾苗种携带的病原种类最多, 且携带率较高, 提示宁波市需要加强防控。从苗种来源看, 来自福建省虾苗的IHHNV携带率最高, 为38.10%; 来自海南省和广东省虾苗中存在WSSV感染, 检出率分别为2.17%和2.27%; 来自广东省虾苗的EHP和SHIV携带率最高, 分别为43.48%和41.30%。由于浙江省南美白对虾苗种主要依靠外地输入, 而这些输出地区的苗种病原感染率较高, 因此浙江省需要加强从这些地区引入苗种的检疫工作。

关键词: 南美白对虾; 虾苗; 对虾白斑综合症病毒; 传染性皮下及造血组织坏死病毒; 虾肝肠胞虫; 虾血细胞虹彩病毒; 桃拉综合症病毒; 浙江省

中图分类号: S851.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)08-0017-06

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.005

Detection and Analysis on Five Kinds of Pathogens in White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) in Zhejiang Province

Zheng Xiaoye¹, Xu Junyu², Zheng Tianlun¹, Zhu Ningyu¹, Cao Feifei¹

(1. Zhejiang Fisheries Technical Extension Station, Hangzhou, Zhejiang 310023, China;

2. College of Biological and Chemical Engineering/College of Light Industry,

Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou, Zhejiang 310023, China)

Abstract: In order to recognize the main pathogens carried by white shrimp (*Penaeus vannamei*) in Zhejiang Province, a total of 129 samples were collected from shrimp seed hatcheries in 4 cities of Hangzhou, Ningbo, Jiaxing and Shaoxin and used for pathogen detection. According to the results, four kinds of pathogens were detected, including white spot syndrome virus (WSSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), enterocytozoon hepatopenaei (EHP) and shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV). The results showed that the positive rate of WSSV was 1.55%, while the rates of IHHNV, EHP and SHIV were 20.93%, 31.78% and 37.21%, respectively. However, Taura syndrome virus (TSV) was not detected from samples in the present research. SHIV, EHP and IHHNV were the main pathogens carried by shrimp seedlings in Zhejiang Province, which needed more attention. In terms of regional distribution, the samples collected from Ningbo City carried the most species of pathogens and the carrying rate was relatively high, indicating prevention and control should be strengthened by Ningbo Authorities. In terms of shrimp seed sources, the highest carrying rate (38.10%) of IHHNV was found in shrimp

基金项目: 浙江省水产新品种选育重大科技专项(2016C02055-5-2); 浙江省水生动物疫病防控项目(SY201710)

通信作者: 郑天伦

larvae from Fujian Province, WSSV infection was observed in shrimp larvae from Hainan Province and Guangdong Province, the detection rates were 2.17% and 2.27%, respectively. And the highest carrying rates of EHP and SHIV were both observed in shrimp larvae from Guangdong Province, which were 43.48% and 41.30%, respectively. Since the white prawn seedlings of Zhejiang Province are mainly imported from other provinces, where the infection rate is relatively high, hence the inspection and quarantine work towards such seedlings should be strengthened by Zhejiang Province.

Key words: *Penaeus vannamei*; shrimp seedling; white spot syndrome virus of shrimp; infectious subcutaneous and hematopoietic necrosis virus; shrimp liver enterobacteria; shrimp blood cell iridescent virus; Taura syndrome virus; Zhejiang Province

南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 因生长迅速、抗病力强成为全球主要的对虾养殖品种之一^[1]。近年来,我国在南美白对虾海水养殖成功后,又进行了苗种淡化培育,并在越来越多淡水地区养殖成功,由此带来了较大的经济效益^[2]。但随着对虾养殖规模的不断扩大及不同来源苗种的引进,对虾疾病问题日益复杂,病害频发给对虾养殖业带来了严重经济损失。及时、准确地诊断疾病,尽快采取有效应对措施是保证对虾健康和生态养殖的关键^[3];加强检测,筛选出健康优良的虾苗,则是养殖成功的重要手段。

白斑综合征 (White spot disease, WSD), 桃拉综合征 (Tauras syndrome, TS), 传染性皮下及造血器官坏死病 (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHN) 被世界动物卫生组织 (OIE) 划为必须通报的甲壳类动物疫病,其中 WSD (病原为 White spot syndrome virus, WSSV) 被我国列入一类动物疫病名录,TS (病原为 Tauras syndrome virus, TSV) 和 IHHN (病原为 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 被我国列入二类动物疫病名录^[4]。虾肝肠包虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 自 2013 年在我国沿海对虾养殖主产区被发现后,检出率有增高趋势,具有较高的流行风险,是导致南美白对虾生长缓慢的主要病原之一^[5]。对虾血细胞虹彩病毒 (Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV) 是近年来在南美白对虾发病样品中检测到的一种新病原,易造成虾空肠空胃、体色变淡、胰腺组织松散,可使部分感染虾出现软壳和体表发

红^[6-7],因其能够感染克氏原螯虾、澳洲淡水龙虾等,且具有传染性,成为对虾养殖业的新威胁。本研究通过采样检测 IHNV、WSSV、EHP、TSV 和 SHIV 5 种病原,了解浙江省南美白对虾主产区苗种的病原携带情况,从而为浙江省虾病防控、健康养殖提供参考,为制定合理的保健预防对策提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测用虾苗 2017 年 3—7 月,采集杭州、绍兴、宁波、嘉兴 4 个市 62 家淡化苗种场及养殖场,共 129 批次的虾苗样品。同一时间、同一苗种场采集单一来源苗种 ≥ 150 尾作为 1 份样品,称之为 1 批次。

1.1.2 主要试剂 DNA 提取试剂盒 (天根 DP304-03), Qiagen Rneasy MiNi Kit (50) 试剂盒 (QIAGEN, 德国 74014), Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TAKARA 6210A), 2×GoldStar MasterMix (Dye) (康为世纪 CW0682L)。

1.2 方法

1.2.1 样品采集与处理 样品采集按照《水生动物产地检疫采样技术规范》(SC/T 7103-2008)进行。将采集的活虾苗样品,浸泡固定于 3 倍体积的 95% 酒精中,然后置于低温冰盒中,及时送实验室检测。样品大小为 0.5~1 cm,用 50 mL 离心管浸泡保存。如不能立即检测,就将样品暂存于 -80 °C 冰箱中。提取核酸前用液氮研磨组织,将均质后的组织分别用于 DNA 和 RNA 提取。

1.2.2 DNA提取 取30 mg 虾苗组织匀浆置于1.5 mL 离心管中,参照DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取,将提取的DNA保存于-20℃冰箱。

1.2.3 RNA提取与反转录 取30 mg 虾苗组织匀浆置于1.5 mL 无RNA酶的离心管中,参照Rneasy MiNi Kit (50) 试剂盒说明书提取RNA,并将提取的RNA迅速进行反转录。反转录采用Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒。将反应混合液65℃保温5 min后,置于冰上迅速冷却;将反转录反应液缓慢混合均匀后,置于PCR仪上42℃ 1 h, 75℃ 15 min, 4℃终止。将反转录产物保存于-20℃冰箱。

表1 5种南美白对虾病原引物

引物名称	引物序列(5' → 3')	目的片段大小 /bp	参考文献
WSSV_F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1 447	[8]
WSSV_R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG		
WSSV_F2	GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA	941	[8]
WSSV_R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT		
IHHNV_389F	CGGAACACAACCCGACTTTA	389	[9]
IHHNV_389R	GGCCAAGACCAAAATACGAA		
TSV_231F	AAGTAGACAGCCGCGCTT	231	[10]
TSV_231R	TCAATGAGAGCTTGGTCC		
SHIV_1F	GGGCGGGAGATGGTGTTAGAT	457	[7]
SHIV_1R	TCGTTTCGGTACGAAGATGTA		
SHIV_2F	CGGGAAACGATTCGTATTGGG	129	[7]
SHIV_2R	TTGCTTGATCGGCATCCTTGA		
EHP-SWP_1F	TTGCAGAGTGTGTTAAGGGTTT	514	[11]
EHP-SWP_1R	CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC		
EHP-SWP_2F	TTGGCGGCACAATTCTCAAACA	148	[11]
EHP-SWP_2R	GCTGTTGTCTCCAAGTATTGA		

1.2.4 PCR检测 以提取的DNA或反转录得到的cDNA为模板,分别进行IHHNV^[8]、WSSV^[9]、TSV^[10]、EHP^[11]和SHIV^[7]的特异性PCR检测,并设置阳性对照、阴性对照和空白对照。PCR反应体系为50 μL: 2×Gold Star Master Mix (Dye) 25 μL、Forward Primer (10 μmol/L) 2 μL、Reverse Primer (10 μmol/L) 2 μL、Template DNA <0.5 μg,加ddH₂O至总体积50 μL。检测5种病原的引物和参考方法见表1。反应结束后,取反应产物5 μL,用1×TAE配置的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并在凝胶成像系统中观察并拍照(图1);比对阳性对照条带位置,判断是否为阳性。若为阳性,则将

PCR产物送测序,与NCBI上的序列进行比对,确定是否真的携带病原。

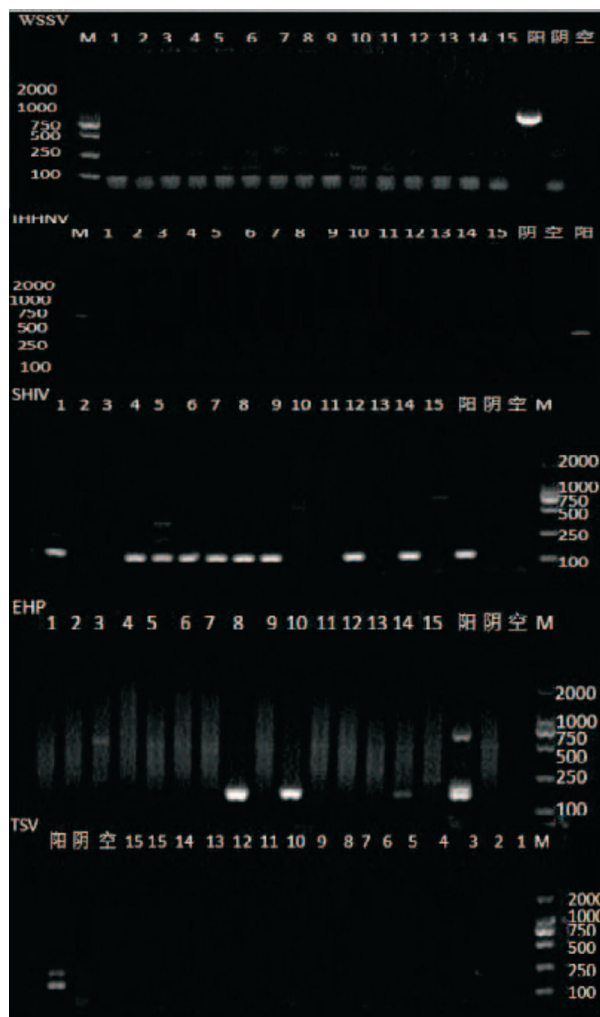


图1 虾苗样品PCR检测结果电泳图

2 结果

2.1 总体检测情况

2017年从浙江省4个市共采样129批次南美白对虾虾苗样品,经检测分析发现:携带SHIV的48批,携带EHP的41批次,批阳性检出率较高,分别为37.21%和31.78%;携带IHHNV的27批次,批阳性检出率为20.93%;携带WSSV的2批次,批阳性检出率为1.55%;未检出TSV。

2.2 不同采样地区检测情况

分别从杭州市、绍兴市、嘉兴市和宁波市采集50、20、16和43批次虾苗样品。除TSV未检出外,其余4种病原均有检出(图2): WSSV

仅在宁波市苗种场样品中检出，批阳性检出率为 4.65%；IHHNV 在宁波市的批阳性检出率最高，为 48.84%；EHP 和 SHIV 在各地均有检测出，其中宁波市的 EHP 和 SHIV 批阳性检出率均最高，分别为 37.21% 和 55.81%。

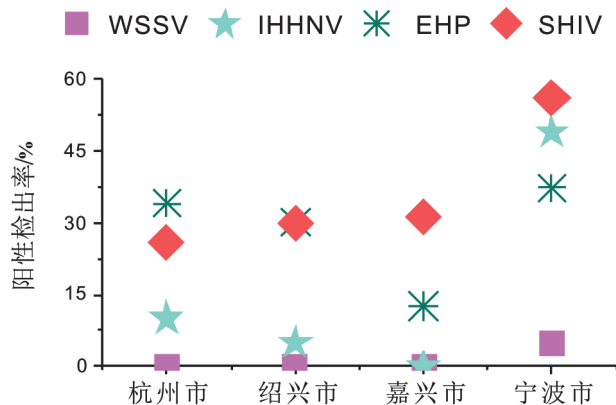


图 2 不同采样地区批病原阳性检出率

2.3 不同苗种类型检测情况

可追溯到苗种类型的虾苗共 103 批次，其中一代苗 76 批次、二代苗 12 批次、普通苗 15 批次。不同类型苗种病原携带情况如图 3 所示：一代苗样品中，检出 3 种病原，EHP 的批阳性检出率最高，为 35.53%；二代苗样品中，除 TSV 未检出外，其他 4 种病原均有检出，SHIV 的批阳性检出率最高，为 66.67%；普通苗中，检出 3 种病原，且批阳性检出率普遍较高，其中 IHHNV 最高，为 86.67%。

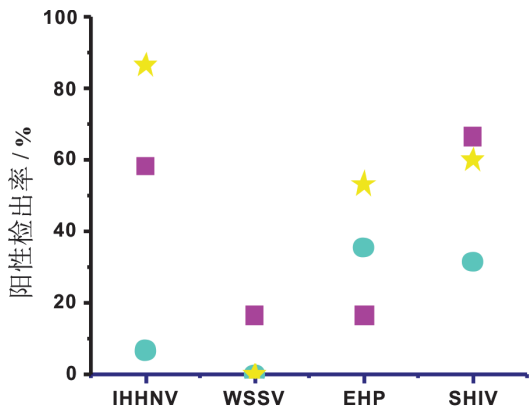


图 3 不同类型南美白对虾苗种批病原阳性检出率

2.4 不同来源虾苗检测情况

采集的虾苗样品主要来自广东、海南和福建等地，分别为 46、44 和 21 批次。不同来源虾苗的阳性检出情况如图 4 所示：WSSV 在来自广东省和海南省的虾苗中有检出，但批阳性检出率较低；IHHNV 在来自福建省和广东省的虾苗中检出率较高，分别为 38.10% 和 32.61%；EHP 和 SHIV 检出率普遍较高，其中广东省虾苗中 EHP 和 SHIV 阳性检出率最高，分别为 43.48% 和 41.30%。

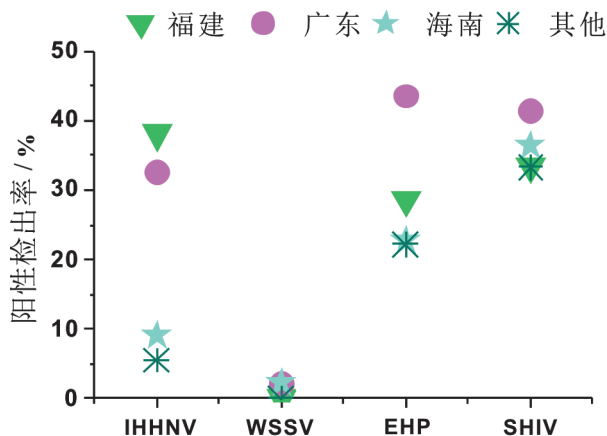


图 4 不同来源苗种的批病原阳性检出率

3 讨论

随着集约化养殖模式的发展，南美白对虾面临的病毒病威胁越来越严重。多数病毒病具有传播速度快、发病率高、致死率高等特点，给虾养殖造成了严重经济损失^[12]。本研究检测了南美白对虾苗种中 IHHNV、WSSV、EHP、TSV 和 SHIV 5 种病原的携带情况，在所有 129 批次虾苗样品中未检出 TSV，这与王筱珊^[12]、Yu 等^[13]、林开等^[14]、施慧等^[15]的调查结果基本一致。他们从 2009 年开始在全国很多地区进行检测，都未检测到 TSV。《中国水生动物卫生状况报告》^[16-17]显示，2015 年的 TSV 检出率为 0.3% (1/379)，2016 年未有阳性样品检出，表明 TSV 在很多地区已得到了很好地控制，也提示病毒病可以通过有效防控，使感染率维持在一个较低水平。

调查结果显示，129 批次样品虾苗中，WSSV 的批阳性检出率为 1.15%，且只在宁波市被检出，

说明浙江省通过加大对该病的防控力度,取得了较好效果。自2012年WSSV感染高峰期过后^[18],WSSV对对虾的危害程度有所减弱,但由于传播迅速、致死率高,其依然是危害南美白对虾健康的重要病原。IHHNV是导致对虾生长缓慢的主要病原之一,并且能够垂直传播。IHHNV 1981年首次在美国夏威夷地区的细角滨对虾中被发现,当时造成的死亡率高达90%以上^[19]。此次调查发现,IHHNV的批阳性检出率为20.93%,且随采样地区的不同,变化也很大,如宁波市的IHHNV阳性检出率高达48.84%,而嘉兴市的未检出。此外,随苗种类型和来源的不同,IHHNV感染率波动也很大,普通苗阳性检出率最高达86.67%,来自福建省、广东省的苗种阳性检出率也超过了30%。查阅往年IHHNV传播情况可知,该检测结果与2010—2012年的IHHNV感染率^[20]相近。2015年江苏省IHHNV感染率达到了39.48%^[12];2016年的国家水生动物疫病监测情况显示,全国8省(直辖市)检出IHHNV阳性样品,平均样品阳性检出率为22.2%,而2015年有6省(直辖市)检出IHHNV阳性样品,平均阳性检出率为21.6%^[16-17]。由此可知,IHHNV的传播性较强,需加大对IHHNV的预防力度。

南美白对虾感染EHP后生长缓慢或停滞^[21-22],从而影响南美白对虾的产量。此次调查中的EHP阳性检出率高达31.78%,且不同种类、来源、采样地区的阳性率变化不大。自2009年开始,EHP在东南亚地区多数国家的养殖对虾中被发现^[23],虽然其不会造成对虾的大量死亡,但会导致感染对虾生长缓慢或生长停滞,如果大规模扩散,必定造成对虾养殖业的巨大经济损失^[24-25],因此仍需得到重视。自2013年以来,我国沿海对虾养殖主产区先后发现EHP流行,且检出率较高。2015年辽宁省检出率高达34.6%^[26],粤西地区检出率为41.38%^[24];黄海水产研究所OIE参考实验室在我国沿海多省份进行的对虾流行病调查显示,2015年EHP阳性率为35.6%,2016年为30.9%,EHP阳性样品主要是南美白对虾^[16-17],与本次调查结果基本一致。

虾血细胞虹彩病毒(SHIV)是2014年在我国浙江省一批严重发病死亡的对虾样品中分离鉴定出的新虹彩病毒,可感染南美白对虾、罗氏沼虾,导致的死亡率高,是对虾养殖业的新威胁^[6]。此次调查采用灵敏度较高的套式PCR检测^[7],在129批次样品中发现SHIV阳性检出率高达37.21%,且在不同采样地区、苗种类型和来源下,SHIV检出率均较高,尤其在宁波市,SHIV批阳性检出率高达55.81%,因而需要尽快制定防控措施,加以防范。

4 结论

对浙江省4个地区129批次对虾苗种样品的检测结果表明,SHIV、EHP、IHHNV的批阳性检出率较高,是浙江省对虾苗种携带的主要病原,需要重点加以防范。从苗种类型看,一代苗携带的病原种类最少,且携带率较低。从苗种来源看,来自福建省、广东省、海南省的虾苗均有病原检出,其中来自福建省虾苗的IHHNV携带率最高,来自广东省虾苗的EHP和SHIV携带率最高。由于浙江省的南美白对虾苗种主要依靠外地输入,因此必须加强引入苗种的检疫工作,尤其是来自福建省和广东省的虾苗。

参考文献:

- [1] 王美雪,郭冉,夏辉,等.七种不同结构糖源对凡纳滨对虾三大营养物质代谢的影响[J].水产学报,2016,40(4):626-633
- [2] 侯路红.对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)病毒样颗粒的研究[D].厦门:厦门大学,2009.
- [3] 夏小明.对虾WSSV和IHHNV病毒重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法的研究[D].上海:上海海洋大学,2015.
- [4] 农业部渔业渔政管理局.全国水产技术推广总站.水生动物防疫工作实用手册[M].北京:中国农业出版社,2015
- [5] 许杰,邓威,李军,等.虾肝肠胞虫(EHP)流行病学与检测技术研究进展[J].中国动物检疫,2018,35(2):64-68
- [6] QIU L, CHEN M M, WANG R Y, et al. Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus*

- vannamei* [J]. Archives of virology, 2018, 163 (3) : 781-785.
- [7] QIU L, CHEN M M, WANG R Y, et al. Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Scientific reports, 2017 (7) : 11834.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局国家标准化委员会. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 检测 PCR 法: GB/T 25878-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局国家标准化委员会. 白斑综合征 (WSD) 诊断规程: GB/T 28630.2-2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [11] 农业部. 对虾桃拉综合症病毒诊断规程: SC/T7204.3-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] JAROENLAK P, SANGUANRUT P, WILLIAMS B, et al. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms[J]. PLoS one, 2016, 11 (11) : e0166320.
- [12] 王筱珊, 胡智博, 费荣梅. 江苏地区对虾 3 种病毒病的流行病学调查及 5 株 IHHNV 的编码区基因序列分析 [J]. 水产学报, 2017, 41 (10) : 1623-1630.
- [13] YU X W, WANG J P, ZHANG W, et al. Prevalence of three shrimp viruses in Zhejiang Province in 2008[J]. Virologica sinica, 2011, 26 (1) : 67-71.
- [14] 林开, 侯崇林, 谢荣辉, 等. 三种对虾病毒在浙江省凡纳滨对虾中的流行性调查研究 [J]. 水产科学, 2013, 32 (3) : 161-164.
- [15] 施慧, 谢建军, 许文军, 等. 浙江地区凡纳滨对虾苗 3 种对虾病毒携带情况研究 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2012, 23 (2) : 25-30.
- [16] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2015 年中国水生动物卫生状况报告 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [17] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2016 年中国水生动物卫生状况报告 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [18] 张会军, 王娟, 雷燕. 2015 年南美白对虾病毒检测报告 [J]. 当代水产, 2016, 41 (2) : 86-87.
- [19] BONAMI J R, TRUMPER B, MARI J, et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps[J]. The Journal of general virology, 1990, 71(11) : 2657-2664.
- [20] 童桂香, 韦信贤, 吴伟军, 等. 广西凡纳滨对虾 IHHNV 感染情况的调查与分析 [J]. 南方农业学报, 2013, 44 (12) : 2089-2093.
- [21] 叶键, 许婷, 施礼科, 等. 虾肝肠胞虫的研究进展 [J]. 科学养鱼, 2018 (1) : 59-61.
- [22] SANTHOSHKUUMAR 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.
- [23] FLEGEL T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia[J]. Journal of invertebrate pathology, 2012, 110 (2) : 166-173.
- [24] 陈禄芝, 余霞艳, 胡一丞, 等. 粤西地区凡纳滨对虾肝肠胞虫、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 (4) : 273-280
- [25] 李色东, 陈禄芝, 余霞艳. 粤西白对虾 EHP 和 IHHNV 流行性初步调查 [J]. 海洋与渔业·水产前沿, 2016, 38 (7) : 35-37.
- [26] 王博雅, 王力, 刘美如, 等. 凡纳滨对虾 3 种主要病毒和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.

(责任编辑: 朱迪国)