

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

王筱珊, 胡智博, 费荣梅*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 对虾白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)是威胁对虾养殖的重要病毒。为了调查这3种病在江苏境内的流行情况, 根据世界动物卫生组织(OIE)推荐的《水生动物疾病诊断手册》的PCR检测法对2015年5月—2016年5月采集的1436尾对虾样品进行3种疾病的流行病学调查。结果显示WSSV阳性率为17.20%, TSV阳性率为0%, IHHNV阳性率为39.48%。对江苏不同地区分离出的5株IHHNV进行基因序列分析, 数据显示这5个地区的毒株均属于I型感染株, 与韩国株的进化关系较为接近。本研究通过调查以上3种病毒病在江苏境内的流行情况, 并进行序列分析, 发现江苏不同地区的凡纳滨对虾IHHNV感染均为I型, 研究结果对养殖虾的疾病防控有重要参考价值。

关键词: WSSV; TSV; IHHNV; IHHNV编码区序列; 感染与流行

中图分类号: S 945.1

文献标志码: A

随着对虾集约化养殖模式的发展, 对虾养殖业面临的问题越来越多, 其中, 病毒导致的传染性疾病是威胁对虾养殖业发展的重要因素。近年, 我国的对虾养殖依然受到白斑综合征(white spot disease, WSD)、桃拉综合征(Taura syndrome, TS)、传染性皮下及造血组织坏死病(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHN)等病毒性疾病的威胁。这3种病毒性疾病均具有传播速度快、发病率高特点, 给对虾养殖带来严重损失, 被OIE划定为必须通报的甲壳类动物疫病。

WSD是由对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的威胁虾养殖的最严重的病毒病^[1]。由于对虾的集约化养殖和卫生管理等不足, WSSV自1992年在中国福建被发现后迅速传播到世界主要虾养殖国家^[2]。WSSV致死率高, 可以迅速传播, 在3~10 d内可使死亡率

高达100%^[3]。它的宿主范围很广, 包括所有养殖和野生的海洋虾蟹、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、虾蛄、桡足类和淡水虾, 主要影响养殖虾^[4], 病毒可感染所有日龄虾并造成大规模死亡, 主要感染虾外胚层和中胚层来源的组织, 如鳃、淋巴器官、触角腺、造血组织、结缔组织、卵巢和腹神经索等^[5]。WSSV是已知最大的动物病毒, 被分类为线头病毒科(Nimaviridae), 白斑病毒属(*Whispovirus*)^[6]。病毒粒子包被双层囊膜, 基因组为环状、双链DNA, 大小约为300 kb^[7]。分析WSSV的全基因序列, 发现中国株和泰国株之间的遗传差异性很小^[8]。

TS是由对虾桃拉综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)引起的一种对虾急性传染病。该病毒于1992年在厄瓜多尔桃拉河口的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中被首次检测并命名^[9]。TSV为双顺反子病毒科(Distroviridae)的未定属成员^[10], 现归属于急性麻痹病毒属(*Aparavirus*)。病

收稿日期: 2016-08-16 修回日期: 2016-12-11

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项201103034

通信作者: 费荣梅, E-mail: feirongmei@njau.edu.cn

毒粒子无囊膜,基因组是线性正股单链RNA,大小约为9 kb,且基因组RNA具有感染性^[11]。病毒的衣壳由3个主要多肽(VP1、VP2、VP3)和1个次要多肽VP0构成。

IHHN又称慢性矮小残缺综合征(runt-deformity syndrome, RDS),其病原为传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)。IHHN是养殖对虾的主要病毒病之一,1981年在美国夏威夷地区的细角滨对虾(*L. stylirostris*)中被发现,造成的死亡率达90%以上^[12]。随后该病便迅速向世界各地蔓延^[13]。该病传播速度快,感染率高。IHHNV是已知最小的对虾病毒,它被分类为细小病毒科(Parvoviridae)、浓核病毒亚科(Densovirinae, DNVs)、短浓核病毒属(*Brevdensovirus*)^[14]。病毒粒子没有囊膜包被,DNA为线性单链DNA,大小约为3.9 kb^[15-16]。IHHNV基因型可以分为感染型和非感染型。感染型包括I型和II型^[17],I型主要分布于美国和东亚;II型主要分布于东南亚。非感染型包括III型和IV型^[18],III型又称3A型,主要分布于马达加斯加和澳大利亚;IV型又称3B型,主要分布于坦桑尼亚和莫桑比克。III型和IV型的序列间有密切的相关性,它们都含3个开放阅读框(open reading frame, ORF),有相同的复制启动子、解旋酶结构域等,但它们不是来源于同种病毒^[14]。IHHNV基因组包含3个ORF,分别为ORF1、ORF2和ORF3。ORF1大约覆盖了基因组的50%,编码一个含666个氨基酸的多肽(75.77 ku),被称为非结构蛋白1(nonstructural protein 1, NS-1);ORF2开始于ORF1上游的第56个核苷酸,和ORF1重合,它编码一个含343个氨基酸的多肽(42.11 ku),推测为非结构蛋白2(nonstructural protein 2, NS-2);ORF3与ORF1有59个核苷酸重叠,编码一个含329个氨基酸的多肽(42.11 ku),病毒的衣壳蛋白(capsid protein, CP)^[19]。

当前,对虾的这3种病毒病仍然是全球性疫病防治的难题,由于国内缺少防控的特效药物,因此通过对这3种病毒病的流行病学调查,可以为提出合理的预防保健对策提供依据,并对评价对策效果提供参考。同时,本实验以江苏5个地区采集的IHHNV阳性虾为模板,克隆其编码区序列,利用生物信息学方法分析其编码序列,为IHHN的防控提供具体信息。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验对象 自2015年5月至2016年5月,本实验室在江苏境内对虾养殖场及市场采集凡纳滨对虾、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本沼虾(*M. nipponense*)等虾种。

主要试剂 2×Taq Master Mix; 2000 DNA Marker购自Vazyme公司; pMD19-T Simple Vector、TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自TaKaRa公司; 病毒核酸提取试剂盒(Geneaid); Gel/PCR Extraction Kit胶回收试剂盒(BIOMIGA); 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α化学感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司; 引物合成以及基因测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

主要仪器 生物安全柜(AIRTECH, 苏净安泰, BHC-1300); Bioprep-24生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司); PCR仪(Biometra, 华粤行仪器有限公司, 070-951); 离心机(Eppendorf, centrifuge 5415 R); 核酸电泳仪(Bei Jing Jun Yi-Dong Fang electrophoresis equipment company, ECP3000); 连接仪(Eppendorf, ThermoStat); 二氧化碳培养箱(HIRASAWA WORKS JANPA, WL-6D); 蛋白电泳仪及凝胶成像系统(BIO-RAD, Gel Doc XR+)。

1.2 实验方法

对虾组织核酸的提取 取0.2 g对虾鳃部组织,加入1 mL PBS稀释,用生物样品均质仪匀浆彻底,转移匀浆液至EP管,反复冻融3次,5000×g离心4 min。参照Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid)病毒核酸提取试剂盒说明书提取匀浆液中的病毒全基因。将提出的DNA保存在-20 °C冰箱中,将RNA立即反转录再保存于-20 °C冰箱。

3种病毒粒子的检测 参照OIE的《水生动物疾病诊断手册》规定的检测标准,合成IHHNV、WSSV和TSV的检测引物(表1),PCR反应扩增IHHNV,套式PCR反应扩增WSSV,RT-PCR反应扩增TSV。配置1%琼脂糖凝胶,取PCR产物上样进行凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察并拍照,将阳性样品送至苏州金唯智生物

表 1 PCR引物设计

Tab. 1 Primers designed for PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequence	预测目的片段大小/bp predicting fragment length	理论退火温度/°C theoretical annealing temperature
IHHNV-389-F	CGGAACACAACCCGACTTTA	389	55
IHHNV-389-R	GGCCAAGACCAAAAATACGAA		
WSSV-146-F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447	55
WSSV-146-R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA		
WSSV-146-F2	GTAAGTCCCTTCCATCTCCA	941	55
WSSV-146-R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT		
TSV-9992-F	AAGTAGACAGCCGCGCTT	231	60
TSV-9195-R	TCAATGAGAGCTTGGTCC		

科技有限公司测序。

对虾3种病毒病的流行病学调查 IHHNV (江苏赣榆株、江苏射阳株、江苏南京株, 江苏大丰株、江苏东台株)基因片段的扩增: 根据IHHNV夏威夷株(GenBank AF218266)基因序列, 依据所要扩增的目的基因片段, 利用Primer 5.0软件设计出引物扩增IHHNV编码区基因片段(表2)。

PCR产物的鉴定回收与纯化 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后, 紫外透射仪中切下目的条带, 按照BIOMIGA胶回收试剂盒说明书操作步骤回收并纯化PCR产物。

PCR产物的连接和连接产物的转化 将PCR产物和pMD19-T Simple Vector按照pMD19-T Simple Vector Kit使用说明书进行连接。再将连接后的产物用热激法进行转化。

阳性克隆的PCR鉴定及测序分析 挑取单菌落置于含有Amp^r的LB液体培养基的EP管中, 37 °C, 180 r/min摇床培养5 h, 菌落PCR鉴定。将

鉴定为阳性克隆的菌液送苏州金唯智生物科技有限公司测序。将测序结果进行拼接, 分别成为IHHNV江苏赣榆株、江苏射阳株、江苏南京株, 江苏大丰株、江苏东台株的基因组序列。采用MEGA 5.0软件对江苏5地分离株和GenBank上公布的I型、II型、III型、IV型IHHNV毒株的编码区核酸进行进化树分析、用MegAlign软件对编码区核酸与氨基酸进行同源性分析(单尾检测)。

2 结果

2.1 对虾采样情况统计

2015年5月至2016年5月共采集1436尾虾样。其中, 感染WSSV的虾有247尾, 阳性率为17.20%; 感染IHHNV的虾有567尾, 阳性率为39.48%; 感染TSV的虾有0尾, 阳性率为0%。来自于江苏南京WSSV感染率为37.50%(129/344)、IHHNV感染率为30.52%(105/344), 江苏大丰WSSV感染率为0%(0/259)、IHHNV感染率为21.24%

表 2 PCR引物设计

Tab. 2 Primers designed for PCR

基因片段 gene fragment	引物(5'→3') primer sequence	预测PCR产物位置/nt the position of predicting PCR product	目的片段大小/bp target fragment length	实验用退火温度/°C experimental annealing temperature
IHHNV-1	F: TACCGTGGTGCTTCATAG R: ATTGTTCCGTTTCCTGTT	522~954	433	53
IHHNV-2	F: TCTCCAAGCCTTCTCACC R: CGAAAGCCGTTCAATACC	749~1606	858	54
IHHNV-3	F: GGGAGTTACCTTGCTGC R: CTGGCTGTTCATCCTGTC	1498~2494	997	55
IHHNV-4	F: TGGGACGAATACCAATCT R: TGGGGTGTCTGTAAATGTGA	2349~3032	684	53
IHHNV-5	F: ATACTGCCTCCACTACATT R: TCTCCATTTGGTCCCTTTGAT	2804~3421	618	53
IHHNV-6	F: TCACCAATCAAAGGACCA R: CTTCGCAGAAACCGTTAA	3396~3901	514	53

(55/259), 江苏射阳WSSV感染率为5.01%(17/339)、IHHNV感染率为48.38%(164/339), 江苏东台WSSV感染率为10.25%(33/322)、IHHNV感染率为56.83%(183/322), 江苏启东WSSV感染率为28.85%(30/104)、IHHNV感染率为76.92%(80/104), 江苏赣榆WSSV感染率为55.74%(34/61)、IHHNV感染率为0%(0/61)(图1), 从不同地区采集的虾, TSV的感染率均为0%。凡纳滨对虾WSSV感染率为15.73%(154/979)、IHHNV感染率为49.54%(485/979), 罗氏沼虾WSSV感染率为31.61%(49/155)、IHHNV感染率为41.94%(65/155), 日本沼虾WSSV感染率为28.89%(13/45)、IHHNV感染率为0%(0/45), 脊尾白对虾WSSV感染率为10.80%(27/250)、IHHNV感染率为14.80%(37/250)(图2), 检测不同虾种, 发现采集的各种虾TSV的感染率均为0%。

2.2 病毒基因序列扩增结果

使用PCR方法检测IHHNV, PCR扩增产物大小约为400 bp, 符合预期大小(图3); 使用套式PCR方法检测WSSV, PCR扩增产物大小约为950 bp, 符合预期大小(图4); 用PCR方法扩增IHHNV的编码区序列, 6个PCR扩增片段大小约为450、900、1000、700、600、500 bp, 符合预期大小(图5)。

2.3 江苏不同地区IHHNV编码区序列分析

将本研究克隆的江苏5个地区的IHHNV基因

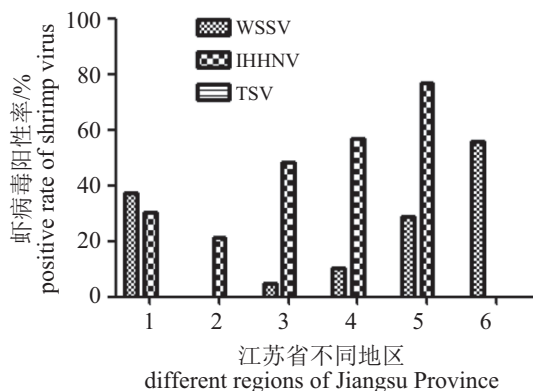


图1 不同地区虾病毒阳性率

1. 江苏南京; 2. 江苏大丰; 3. 江苏射阳; 4. 江苏东台; 5. 江苏启东; 6. 江苏赣榆

Fig. 1 The positive rate of three shrimp viruses from different regions

1. Nanjing; 2. Dafeng; 3. Sheyang; 4. Dongtai; 5. Qidong; 6. Ganyu

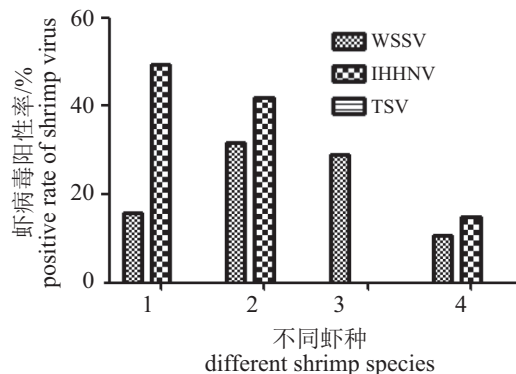


图2 不同虾种病毒阳性率

1. 凡纳滨对虾; 2. 罗氏沼虾; 3. 日本沼虾; 4. 脊尾白对虾

Fig. 2 The positive rate of three shrimp viruses from different shrimps

1. *L. vannamei*; 2. *M. rosenbergii*; 3. *M. nipponense*; 4. *E. carinicauda*

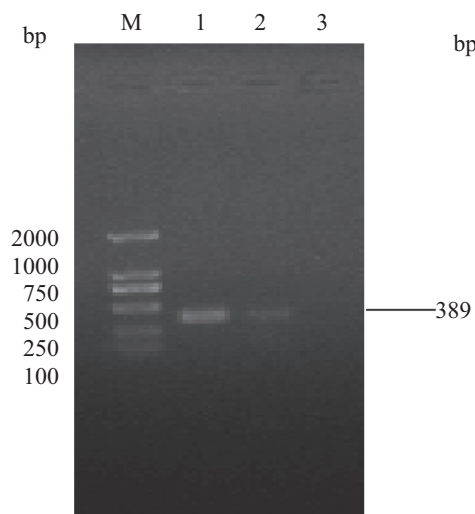


图3 IHHNV保守区PCR检测

M. DNA Marker DL2000; 1. 样品; 2. IHHNV阳性对照; 3. IHHNV阴性对照

Fig. 3 Identification of conserved region of IHHNV

M. DNA Marker DL2000; 1. sample; 2. positive control; 3. negative control

组片段进行测序并分别命名为Dafeng.Jiangsu株、Dongtai.Jiangsu株、Ganyu.Jiangsu株、Nanjing.Jiangsu株、Sheyang.Jiangsu株。选取这5株的编码区序列与GenBank中不同国家和地区的12株IHHNV毒株的编码区序列进行对比。采用MEGA5.0软件构建进化树。Dongtai.Jiangsu株、Nanjing.Jiangsu株、Ganyu.Jiangsu株、Sheyang.Jiangsu株、Dafeng.Jiangsu株聚为一支(图6), 在进化关系上较近, 属于IHHNV基因I型, 与分离自韩国的毒株JN377975亲缘关系较近。

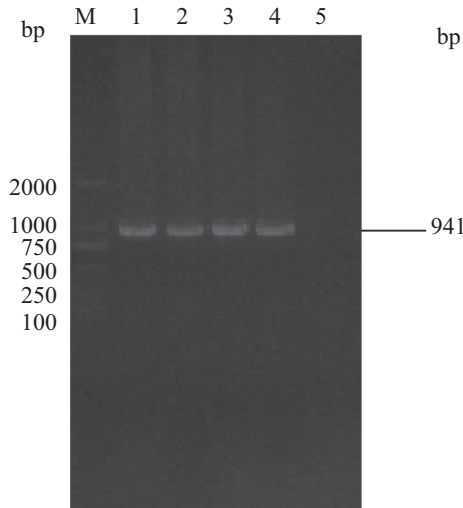


图4 WSSV保守区PCR检测

M. DNA Marker DL2000; 1~3. 样品; 4. WSSV阳性对照; 5. WSSV阴性对照

Fig. 4 Identification of conserved region of WSSV

M. DNA Marker DL2000; 1-3. sample; 4. positive control; 5. negative control

应用MegAlign进行核酸序列同源性分析显示, 新分离株与 I 型感染株的核苷酸同源性为99.0%~99.7%, 与 II 型感染株的核苷酸同源性为95.0%~96.9%, 与非感染型毒株 III 型和 IV 型 IHHNV 的同源性较低, 分别为91.6%~92.0%、86.7%~87.2% (表3)。

应用MegAlign将5个样品的保守序列中的

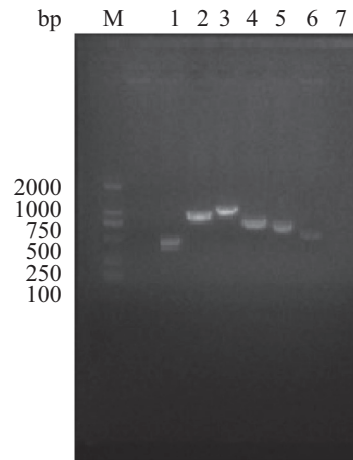


图5 IHHNV基因组片段PCR扩增产物

M. 2000 bp; Marker 1~6. IHHNV-1、IHHNV-2、IHHNV-3、IHHNV-4、IHHNV-5、IHHNV-6; 7. 阴性对照

Fig. 5 The PCR product of gene fragment of IHHNV

M. 2000 bp; Marker 1-6. IHHNV-1, IHHNV-2, IHHNV-3, IHHNV-4, IHHNV-5, IHHNV-6; 7. negative control

3个ORF编码的氨基酸多肽分别与最早发现的夏威夷株、与这5个样品进化关系最近的韩国株的3个ORF编码的氨基酸多肽进行同源性比较, IHHNV的ORF1编码非结构蛋白1即NS-1; ORF2编码非结构蛋白2即NS-2; ORF3编码核衣壳蛋白即CP(表4)。在同源性比较中, 5个地区的毒株与夏威夷株相比, NS-1同源性为86.8%~100.0%; NS-2同源性为98.9%~99.7%; CP同源性

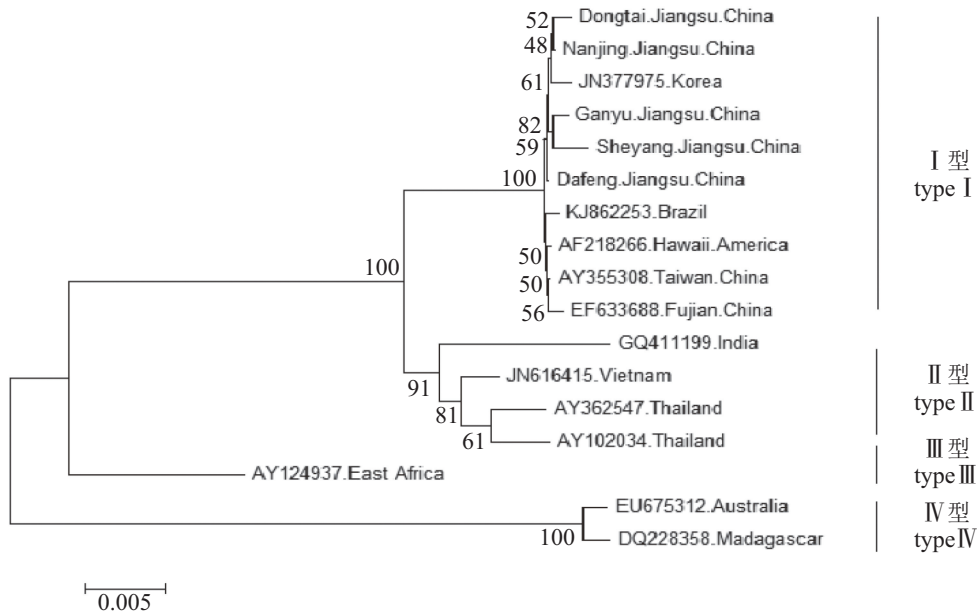


图6 基于IHHNV编码区基因序列的系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of coding sequence of IHHNV gene using the Neighbor-Joining method

表 3 IHHNV新分离株与参考株的编码区基因核苷酸序列同源性比较

Tab. 3 Homology comparisons showing % identical nucleotides in coding region sequences between representative IHHNV strains and new isolates

IHHNV分型 IHHNV type	DT	GY	NJ	SY	I 型 type I	II 型 type II	III型 type III	IV型 type IV	%
大丰株 Dafeng	99.4	99.6	99.7	99.2	99.5~99.7	95.5~96.9	92.0	87.1~87.2	
东台株 Dongtai		99.2	99.5	99.0	99.1~99.3	95.1~96.6	91.7	86.8~87.0	
赣榆株 Ganyu			99.6	99.3	99.3~99.5	95.3~96.8	91.9	87.0~87.1	
南京株 Nanjing				99.4	99.5~99.7	95.5~96.9	92.0	87.0~87.1	
射阳株 Sheyang					99.0~99.2	95.0~96.4	91.6	86.7~86.8	
I 型					99.3~99.7	95.4~97.0	91.8~92.0	87.1~87.4	
II 型						96.5~99.0	91.7~92.2	86.8~87.4	
III型							90.3~90.4	90.3~90.4	
IV型								99.1	

IHHNV分型参考图: I型: AY355308、EF633688、AF218266、KJ862253、JN377975; II型: AY362547、AY102034、GQ411199、JN616415; III型: AY124937; IV型: EU675312、DQ228358

Reference points of IHHNV type: I type: AY355308、EF633688、AF218266、KJ862253、JN377975; II type: AY362547、AY102034、GQ411199、JN616415; III type: AY124937; IV type: EU675312、DQ228358

表 4 样品ORF编码的氨基酸同源性比较

Tab. 4 Homology comparisons showing % identical amino acids in ORF sequences between representative IHHNV strains and new isolates

样品编号 sample number	AF218266. Hawaii			JN377975. Korea			%
	NS-1	NS-2	CP	NS-1	NS-2	CP	
大丰株 Dafeng	99.8	99.2	99.4	99.2	99.7	98.5	
东台株 Dongtai	99.4	98.9	98.5	98.8	99.4	98.2	
赣榆株 Ganyu	99.7	99.2	97.0	99.1	99.7	96.0	
南京株 Nanjing	100.0	99.7	99.1	99.4	99.7	98.8	
射阳株 Sheyang	86.8	99.4	98.5	86.2	99.4	98.2	

为97.0%~99.4%。与韩国株相比, NS-1同源性为86.2%~99.4%; NS-2同源性为99.4%~99.7%; CP同源性为96.0%~98.8%。

3 讨论

随着虾养殖模式的转变, 病毒病仍然严重威胁着虾集约化养殖。它们具有传播速度快、发病率高、致死率高等特点, 给虾养殖造成了严重的经济损失。近年来, 本实验室多次在我国对虾养殖场中检测到了WSSV和IHHNV, 本研究对2015年5月至2016年5月采自江苏省对虾养殖场的虾进行3种病毒病的流行病学调查, 共采集虾1436尾, 其中, 感染WSSV的比率为17.20%;

感染IHHNV的比率为39.48%; 感染TSV的比率为0%。TSV检测的阴性结果与Yu等^[20]、林开等^[21]、施慧等^[22]的调查结果一致, 表明从2009年开始很多地区都未检测到TSV。这表明TS在很多地区可能得到了很好地控制, 这在另一方面也提示病毒病可以通过有效的防控措施使感染率维持在一个较低水平。TSV阴性也有可能是TSV本身已不适应环境; 或者TSV是RNA病毒, 容易发生变异, 变异后的病毒用当前通用的OIE规定的检测引物无法检测出。究竟是什么原因使近几年的TSV检出率为0%, 现在还没有定论。

与一些发达的虾养殖国家相比, 我国的虾养殖产业还存在着一些问题。如苗种的质量问题, 有相当一部分并不是真正的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)虾; 养殖密度过大, 许多养殖户为了追求经济效益超密度养殖; 药物乱用、滥用情况严重; 养殖环境的恶化^[23]。在此情况下, 虾病已从较易控制的细菌病、寄生虫病逐渐发展到难以控制的病毒病。加之虾病毒病的疫苗、特效药还在研制阶段, 因此加强检测和防控成为当下虾健康养殖的有效手段。本研究通过对江苏境内养殖虾3种病毒病的流行情况进行调查, 为江苏省虾病毒病的防控、虾的健康养殖提供参考, 并有一定实践意义。

对本实验分离的5个毒株进行系统进化树分析, 这5个毒株均属于I型, 并且和韩国株的进

化关系最近, 推测江苏2015年流行的IHHNV可能来源于韩国。分析原因, 第一: 以凡纳滨对虾为例, 其自然分布区主要位于东太平洋沿岸, 我国沿海地区没有自然种群的分布, 所以我国无法提供人工繁殖所需要的高质量自然种虾, 需要从海外进口亲虾, 此做法有可能引入病毒, 也有可能在引入虾苗时引入病毒。第二: 一些甲壳类动物洄游繁殖感染了IHHNV韩国株, 在高密度的养殖环境中加之恶劣的养殖条件, 带毒的甲壳动物通过水平传播方式将IHHNV传给了养殖虾, 造成江苏地区流行的IHHNV与韩国株进化关系最近。

参考文献:

- [1] Walker P J, Gudkovs N, Padiyar P A. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) farms in Andhra Pradesh, India. I. High prevalence of WSSV infection and low incidence of disease outbreaks in BMP ponds[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(3-4): 277-282.
- [2] Walker P J, Winton J R. Emerging viral diseases of fish and shrimp[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(6): 51.
- [3] Lightner D V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp[M]. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1996.
- [4] Chakraborty A, Otta S K, Joseph B, *et al.* Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India[J]. *Current Science*, 2002, 82(11): 1392-1397.
- [5] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 21(1): 69-77.
- [6] van Hulten M C W, Vlaskovits J M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus[J]. *Virus Genes*, 2001, 22(2): 201-207.
- [7] Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. *White spot syndrome virus*: genotypes, epidemiology and evolutionary studies[J]. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 175-183.
- [8] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [9] Brock J A. Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 415-418.
- [10] Mayo M A. Changes to virus taxonomy 2004[J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(1): 189-198.
- [11] Bonami J R, Hasson K W, Mari J, *et al.* Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent[J]. *The Journal of General Virology*, 1997, 78(Pt 2): 313-319.
- [12] 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(Pt 11): 2657-2664.
- [13] Sudhakaran R, Parameswaran V, Hameed A S S. *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in C6/36 mosquito cell line[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 146(1-2): 112-118.
- [14] Tang K F J, Lightner D V. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia[J]. *Virus Research*, 2006, 118(1-2): 185-191.
- [15] Coelho M G L, Silva A C G, Nova C M V V, *et al.* Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN)[J]. *Aquaculture*, 2009, 294(1-2): 1-4.
- [16] Shike H, Dhar A K, Burns J C, *et al.* Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses[J]. *Virology*, 2000, 277(1): 167-177.
- [17] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1983, 42(1): 62-70.
- [18] Krabetsve K, Cullen B R, Owens L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 61(1-2): 153-158.
- [19] Nunan L M, Poulos B T, Lightner D V. Use of poly-

- merase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(4): 319-328.
- [20] 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.
- [21] 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.
- Lin K, Hou C L, Xie R H, *et al.* Prevalence of three viruses in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in Zhejiang Province[J]. *Fisheries Science*, 2013, 32(3): 161-164(in Chinese).
- [22] 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.
- Shi H, Xie J J, Xu W X, *et al.* Prevalence of three shrimp viruses in postlarvae of *Penaeus vannamei* from Zhejiang Province[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2012, 23(2): 25-30(in Chinese).
- [23] 宋盛宪. 对虾养殖现状、发展趋势与对策[J]. *水产科技*, 2006(2): 1-7.
- Song S X. The current status, developing tendency and countermeasure of shrimp culture[J]. *Fisheries Science & Technology*, 2006(2): 1-7(in Chinese).

Prevalence of three viruses in Pacific white leg shrimp in Jiangsu Province and the analysis of coding sequence of five strains of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus

WANG Xiaoshan, HU Zhibo, FEI Rongmei*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) are the three major pathogenic viruses responsible for the epidemic diseases threatening Pacific white leg shrimp farming industry. We use the PCR detection methods recommended by World Organisation for Animal Health to investigate the epidemiology of these three kinds of diseases in Jiangsu province. 1436 Pacific white leg shrimp samples were detected in the year from 2015 to 2016. Results showed the positive rate of WSSV infection was 17.20%, 0% in TSV infection and 39.48% in IHHNV infection where shrimp samples were collected from Nanjing, Dongtai, Dafeng, Ganyu, and Sheyang. And all five IHHNV strains detected belong to the infection type after gene sequence analysis, which were close to the Korean strain. Our investigation aims to clarify the epidemic situation of WSSV, TSV and IHHNV in Jiangsu province, identify IHHNV strain type via sequence analysis. The result has a high reference value for diseases prevention and treatment of shrimp farming industry.

Key words: WSSV; TSV; IHHNV; the coding sequence of IHHNV; infection and epidemiological investigation

Corresponding author: FEI Rongmei. E-mail: feirongmei@njau.edu.cn

Funding projects: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201103034)