

一例日本囊对虾暴发性死亡的病原分析

韩琳^{1,2}, 王秀华^{2*}, 杨冰², 万晓媛²,
武和英², 张庆利², 黄捷²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 农业部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东青岛 266071)

摘要: 为了阐明山东省潍坊市一对虾养殖场发生日本囊对虾暴发性死亡的原因, 采用分子生物学检测方法, 对发病对虾进行了白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、桃拉综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)、黄头病毒(yellow head virus, YHV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IH-HNV)、传染性肌肉坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)、偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)及急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)7种病原的检测, 且对发病对虾进行了常规组织病理学观察。同时采用16S rDNA细菌鉴定方法及浸泡回接感染实验对分离自发病对虾体内的可疑病原菌进行了分子鉴定及毒力测试。结果显示, 发病对虾样品核酸检测呈现WSSV强阳性, IH-HNV和CMNV为弱阳性, 其他4种病原为阴性。组织病理学观察发现, 在对虾的胃、鳃等上皮组织中存在WSSV包涵体, 头部肌肉纤维出现离散。对分离编号为2901、2902、2903的3株优势可疑病原菌鉴定结果显示, 3株菌分别与印度格里蒙菌、交替单胞菌及溶藻弧菌相似, 相似度分别为99%、99%及100%。攻毒结果显示, 3株可疑病原菌的 LC_{50} 分别为 9.8×10^7 、 1.1×10^8 与 2.3×10^8 CFU/mL, 各细菌毒力均较弱, 非导致对虾出现暴发性死亡的病原。研究表明, 导致本次日本囊对虾暴发性死亡的病因与混合感染病原WSSV、IH-HNV、CMNV有关, 其中WSSV感染是造成日本囊对虾暴发性死亡的主因, 研究结果可为解析当前养殖日本囊对虾疾病暴发及其成因提供参考。

关键词: 日本囊对虾; 暴发性死亡; 病毒; 细菌; 病因分析

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

对虾养殖是我国沿海渔业经济的重要支柱产业, 目前国内对虾养殖年产量维持在120万t以上, 其中占养殖产量70%以上的品种为凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[1-2], 近年来由于凡纳滨对虾易感疾病种类增多^[3-5], 养殖难度加大, 而且产品的价格低于其他对虾品种, 因此养殖者在养殖品种选择上逐渐趋于多元化。日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)具有肉质鲜美、耐低

温、耐干能力强及市场价格高等优点, 在我国北方沿海已有多年的养殖历史和较大的养殖规模, 是经济价值较高的对虾品种。

目前北方沿海日本囊对虾养殖模式主要为室外土池粗放养殖, 受疾病高发影响, 放苗密度普遍偏低, 养殖收益欠佳。较早的研究发现, 危害日本囊对虾的主要疾病有白斑综合征(white spot syndrome disease, WSSD)、弧菌性疾病^[6-8]。

收稿日期: 2016-12-01 修回日期: 2017-05-25

资助项目: “九四八”项目(2016-X56); 公益性行业(农业)科研专项(201103034)

通信作者: 王秀华, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

自2010年开始,国内外养殖凡纳滨对虾中出现了多种新发病疾病,如病毒性偷死病(viral covert mortality disease, VCMD)、对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)、虾肝肠胞虫病(hepatopancreatic microsporidiosis, HPM)等^[3-5],给凡纳滨对虾养殖业造成了很大的经济损失。但在日本囊对虾养殖中,对近年来新发病原的感染流行及危害程度尚未有相应的报道。

潍坊北部沿海滩涂是山东省日本囊对虾的主要养殖区之一,2015年7—8月间,该地区某养殖场有面积18 hm²的日本囊对虾发生了暴发性大规模死亡,发病时间短,死亡率高,为了查清日本囊对虾的发病原因,明确是否存在新发病原感染,本实验采用分子生物学检测方法分析了上述日本囊对虾中7种主要对虾病原的感染情况,同时检测了发病对虾体内细菌分离物中急性肝胰腺坏死病致死性副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP_{AHPND})毒力基因*PirA*与*PirB*的携带情况,以阐明本次日本囊对虾暴发性死亡的病因,为养殖日本囊对虾疾病防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 流行病学资料收集

养殖场基本情况 发病的日本囊对虾养殖场为新建对虾养殖场,养殖区共有养殖池90个,每个养殖池有效面积0.2 hm²,有效水深平均1.3 m,池底为粉砂底。每池配备1.5 kW的水车式增氧机4台。养殖水源为近海水,养殖池及养殖用水均采用浓度40 g/m³的漂白粉处理后曝气脱氯,池水温度26.2 °C~27.5 °C,盐度29, pH 7.8~8.2,养殖期间水体溶解氧(DO)均大于5 mg/L。

养殖管理 日本囊对虾苗购于福建厦门某育苗场,虾苗体长0.6 cm,放苗密度100尾/m²,共分2批次投放虾苗,第一批投放45个虾池,时间为6月22—24日,第二批投放剩余45个虾池,于7月6—8日放苗,放苗后养殖前期主要投喂虾片及0号配合饵料,每天5:00及19:00投喂2次。

数据采集 发病期间现场测量养殖水质,观察记录对虾发病症状,测量发病对虾体长,统计发病养殖池,计算虾池累计发病率。随机抽取15个发病7 d后虾池,排塘统计对虾存活率。虾池累积发病率(%)=发病虾池数/虾池总数×100。

1.2 样品采集及处理

随机取3个具有典型发病特征虾池中的对虾样品(每池5尾),分别用75%乙醇及RNAlater(Invitrogen, 美国)保存对虾鳃、步足、腹部肌肉及肝胰腺等组织。取每池中5尾乙醇保存的虾鳃丝、步足、肌肉及肝胰腺组织适量合并为一个样品,使用TIANamp Marine Animals DNA Kit(TIANGEN, 中国北京)提取基因组DNA, -80 °C保存。同样取保存于RNAlater中对虾样品合并,使用RNAiso Plus(TAKARA, 中国大连)提取基因组RNA, -80 °C保存;另取发病虾样,立即向头胸部注射固定液(Davidson's AFA),之后纵切置于10倍体积的固定液中固定24 h,后于70%的酒精中保存,用于组织病理切片。

1.3 发病日本囊对虾多病原检测

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、桃拉综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)、黄头病毒(yellow head virus, YHV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)及传染性肌肉坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)5种病原检测,采用OIE(office international des Epizooties)水生动物疾病诊断手册(2012版)推荐的检测方法^[9], VP_{AHPND}检测参照Dangtipa等^[10],偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)检测参照Zhang等^[3],各种病原的引物序列见表1。

1.4 组织病理学观察

取70%乙醇保存的病虾组织,经乙醇梯度脱水,二甲苯透明处理后进行透蜡、包埋,连续切片(厚度5 μm),再经苏木精—伊红(H. E)染色,中性树胶封片,在光镜(Nikon Eclipse 80 i, Nikon instruments Inc, 日本)下进行观察拍照。

1.5 可疑病原菌分离与菌株鉴定

采集具有典型发病症状的日本囊对虾,用酒精棉球擦拭消毒其体表,在无菌条件下解剖病虾,分别取肝胰腺、肠道的小块组织于无菌离心管中,参照徐怀恕等^[11]的方法,于2216E平板上划线分离细菌。将分离纯化后的细菌进行编号, -80 °C保存备用。对所分离的细菌采用16S rDNA序列比对法进行鉴定^[12]。扩增产物由上海桑尼生物工程有限公司测序。

表 1 日本囊对虾7种病原检测的引物序列

Tab. 1 Primer sets used in detecting shrimp pathogens

病原 pathogen	检测方法 detection method	引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	产物片段大小/bp size of PCR product
WSSV	套式 PCR	146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447
		146R1	TAATGCGGGTGAATGTCTTACGA	
	nest PCR	146F2	GTAAGTGGCCCTCCATCTCCA	941
		146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTG	
IHNV	常规 PCR	389F	CGGAACACAACCCGACTTTA	389
		389R	GGCCAAGACCAAAATACGAA	
	traditional PCR	309F	TCCAACACTTAGTCAAACCAA	309
		309R	TGTCTGCTACGATGATTATCCA	
CMNV	套式 PCR	CMNV-7F1	AAATACGGCGATGACG	619
		CMNV-7R1	ACGAAGTGCCACAGAC	
	nest PCR	CMNV-7F2	CACAACCGAGTCAAACC	165
		CMNV-7R2	GCGTAAACAGCGAAGG	
YHV	套式 PCR	YHV-GY1	GACATCACTCCAGACAACATCTG	794
		YHV-GY4	GTGAAGTCCATGTGTGTGAGACG	
	nest PCR	YHV-GY2	CATCTGTCCAGAAGGCGTCTATGA	277(YHV-1)
		YHV-Y3	ACGCTCTGTGACAAGCATGAAGTT	
		YHV-G6	GTAGTAGAGACGAGTGACACCTAT	406(YHV-2)
		YHV-GY5	GAGCTGGAATTCAGTGAGAGAACA	
TSV	常规 PCR	9992F	AAGTAGACAGCCGCGCTT	231
	traditional PCR	9195R	TCAATGAGAGCTTGGTCC	
IMNV	套式 PCR	4587F	CGACGCTGCTAACCATACAA	328
		4914R	ACTCGGCTGTTCGATCAAGT	
	nest PCR	4725NF	GGCACATGCTCAGAGACA	139
		4863NR	AGCGCTGAGTCCAGTCTTG	
VP _{AHPND}	套式 PCR	AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	1269
		AP4-R1	ACGATTTGCGCGTCCCAA	
	nest PCR	AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGGG	230
		AP4-R2	GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	

1.6 菌株 *PirA*、*PirB* 基因检测

参照 Han 等^[13]的方法, 对分离纯化的细菌进行细菌毒力基因 *PirA*、*PirB* 检测。对照组为携带 *PirA*、*PirB* 基因的副溶血弧菌。 *PirA* 上游引物 5'-TGACTATTCTCACGATTGGACTG-3', 下游引物 5'-CACGACTAGCGCCATTGTTA-3', 产物大小为 284 bp, *PirB* 上游引物 5'-TGATGAAGTG

ATGGGTGCTC-3', 下游引物 5'-TGTAAGCGCGCTTTAACTCA-3' 产物大小为 392 bp。PCR 体系 (25 μ L): ddH₂O 17.375 μ L、10 \times Buffer 2.50 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 2.00 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.00 μ L、DNA 聚合酶 0.125 μ L、Template 1.00 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最

后 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳后，在紫外成像仪下拍照观察。目的条带用 Gel Extraction Kit (OMEGA, 美国) 切胶回收，克隆到 T5 载体后测序，所得序列在 GenBank 数据库中利用 BLAST 进行同源性比对。

1.7 菌株的毒力评价

分离的可疑病原菌株 2901、2902、2903 分别于 2216E 液体培养基 28 °C 发酵后，4 °C 8000×g 离心，沉淀用 PBS 制成菌悬液，并用清洁海水将各菌株分别稀释成 4.06×10⁸、4.06×10⁷、4.06×10⁶、4.06×10⁵ CFU/mL；1.01×10⁸、1.01×10⁷、1.01×10⁶、1.01×10⁵ CFU/mL；4.68×10⁸、4.68×10⁷、4.68×10⁶、4.68×10⁵ CFU/mL 的浓度梯度菌液浸泡攻毒。每组实验用日本囊对虾 15 尾，实验用容积 10 L 的塑料箱，有效水体 5 L，每个浓度设 3 个平行。

感染实验所需日本囊对虾购于江苏赣榆某养殖场，平均体长 1.5 cm。感染后 24 h，开始正常养殖，每日换水 1/3，实验用水为砂滤海水，饵料为热灭活脱毒成体卤虫，每天投喂 2 次 (7:00、19:00)，日投喂量为对虾体重的 3%，实验期间连续充气。攻毒后随时观察对虾存活情况，移除死虾，记录对虾死亡数量，待各组对虾死亡稳定 5 d 后停止实验。采用软件 SPSS 16.0 统计半致死浓度 (LC₅₀)，对死亡对虾进行解剖和菌株的分离鉴定。

1.8 水质指标测定

使用 YSI556 便携式水质测定仪 (Xylem, 美国)，每日 9:00 测量养殖池水体温度、盐度、溶解氧和 pH。

2 结果

2.1 日本囊对虾暴发性死亡现场情况

自 7 月 17 日开始在第一批投放的虾苗池塘中，有两口池的对虾出现发病症状，养殖期 25 d，发病日本囊对虾体长 2.5~4.2 cm，典型发病症状为对虾空肠空胃，肝胰腺外周轮廓模糊，部分对虾第二触角断缺，个别虾在水面缓慢游动，无方向性，白天于池边及池角的浅水区可观测到对虾趴边，对外界刺激反应不敏感，徒手可以抓到，临近傍晚较多的对虾沿池边缓慢游动，发病池上有水鸟盘旋觅食。揭开发病虾头

胸甲，可见部分虾头胸甲上有白斑，取对虾鳃组织及附肢镜检，未发现纤毛虫感染。类似症状持续 3~4 d 后，池底出现大量死虾。自对虾出现病症开始至 7 d 后排干池塘，发现虾池中无对虾存活。

2.2 对虾发病虾池累积发病率统计

统计出现典型发病症状对虾的养殖池，计算出现对虾发病池塘累积发病率 (图 1)。结果显示，投放的 2 批虾苗分别于 7 月 17 日与 7 月 29 日首次出现虾病，随后发病虾池数逐渐递增，至 8 月 19 日，所有养殖池中对虾均出现发病症状，虾池累积发病率达 100%。虾池发病的速度呈现暴发式，发病时间集中在 7 月 29 日至 8 月 10 日，90 个虾池中有 56 个出现发病症状，2 周内的累积发病率超过 60%。

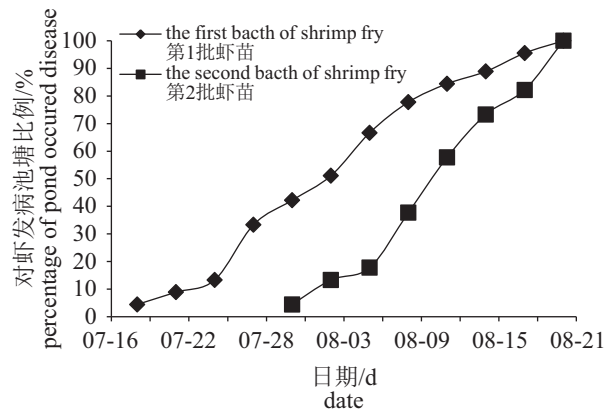


图 1 养殖对虾发病池塘累积发病率统计

Fig. 1 Statistics of cumulative incidence of shrimp pond occurred disease

2.3 对虾主要病原检出情况

对发病日本囊对虾分别进行 WSSV、IHHNV、CMNV、YHV、TSV、IMNV 6 种病毒及细菌 VP_{AHPND} 分子检测。PCR 结果显示所检测的日本囊对虾样品中，应用 WSSV 外引物可检测到 3 份样品中有 2 份出现 WSSV 阳性条带 (图 2-a)，目的片段大小与对照组的大小一致，产物大小 1447 bp 左右。应用 WSSV 内引物进行套式 PCR，3 个样品均得到 WSSV 阳性条带 (图 2-b)，目的片段大小与阳性对照一致，产物大小为 941 bp，表明所采集的样品中均存在 WSSV 感染，且部分样品感染程度较强；应用 IHHNV 引物 1 可检测到 3 份样品中有 2 份出现 IHHNV 弱阳性条带 (图 3-a)，目的片

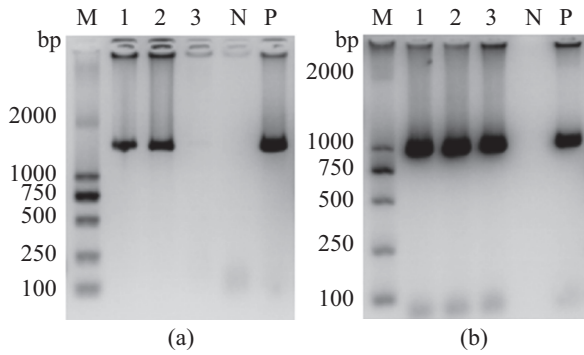


图2 WSSV PCR扩增产物

(a) WSSV引物146F1/R1 PCR产物; (b) WSSV引物146F2/R2 PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3.日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 2 PCR products for detection of WSSV

(a) PCR products of primer 146F1/R1; (b) PCR products of primer 146F2/R2; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M.japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

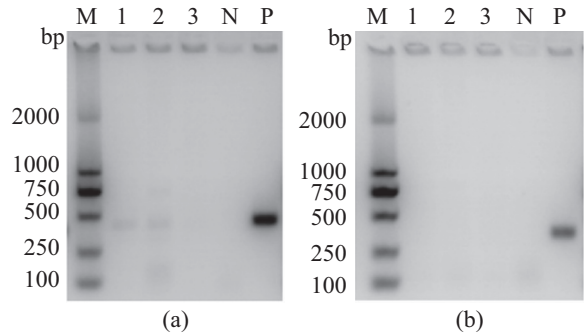


图3 IHHNV PCR扩增产物

(a) 引物389F/R PCR产物; (b) 引物309 F/R PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 3 PCR products for detection of IHHNV

(a) PCR products of primer 389F/R; (b) PCR products of primer 309 F/R; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M.japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

段大小与对照组的大小一致,产物大小389 bp左右。应用IHHNV引物2未得到扩增目标条带(图3-b);应用CMNV外引物在3份样品中未检测到阳性条带(图4-a),但应用内引物扩增时,有2份出现CMNV阳性条带(图4-b),目的片段大小与对照组的大小一致,产物大小389 bp左右,表明存在CMNV轻度感染。

PCR扩增TSV、IMNV、YHV 3种病毒及细菌病AHPND时,均没有得到阳性条带(图5,图6,图7及图8),表明发病对虾受该4种病原感染的可能性不大。

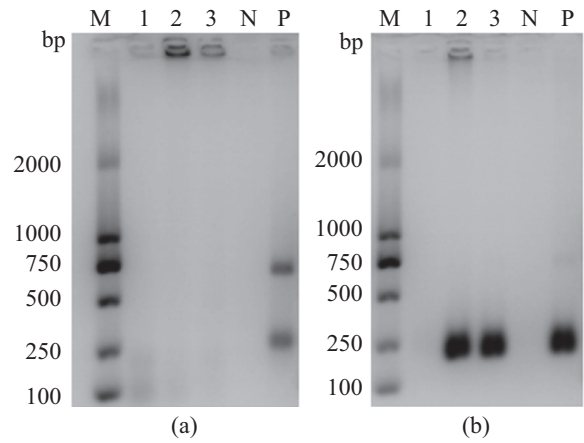


图4 CMNV PCR扩增产物

(a) 引物CMNV-7F1/R1 PCR产物; (b) 引物CMNV-7F2/R2 PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 4 PCR products for detection of CMNV

(a) PCR products of primer CMNV-7F1/R1; (b) PCR products of primer CMNV-7F2/R2; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M.japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

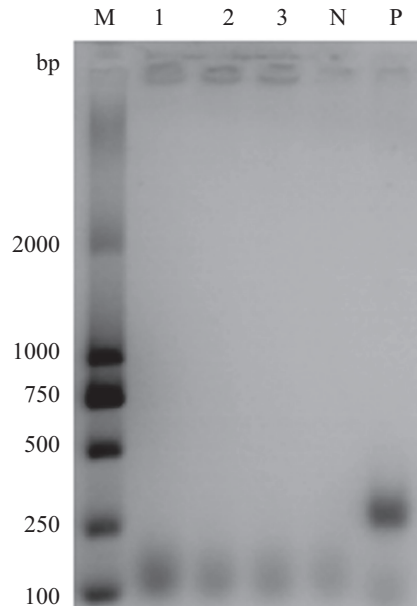


图5 TSV PCR扩增产物

M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 5 PCR products for detection of TSV

M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M.japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

2.4 组织病理观察

光镜观察发病对虾组织病理切片,在对虾胃、头胸部腹侧甲壳下层及鳃丝的上皮组织发现WSSV包涵体(图版-1~3,小箭头示),对虾鳃

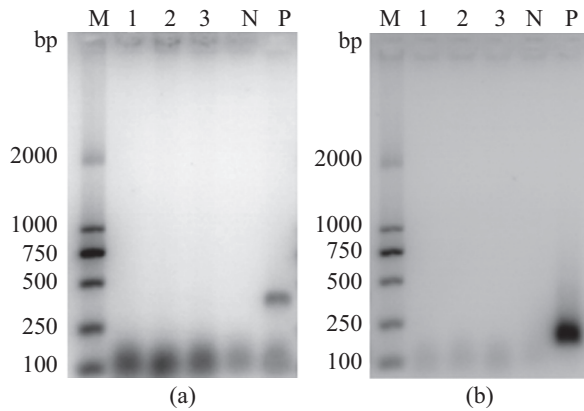


图6 IMNV PCR扩增产物

(a) 引物4587F/4914R PCR产物; (b) 内引物4725NF/4863NR PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 6 PCR products for detection of IMNV

(a) PCR products of primer 4587F/4914R PCR; (b) PCR products of primer 4725NF/4863NR; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M. japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

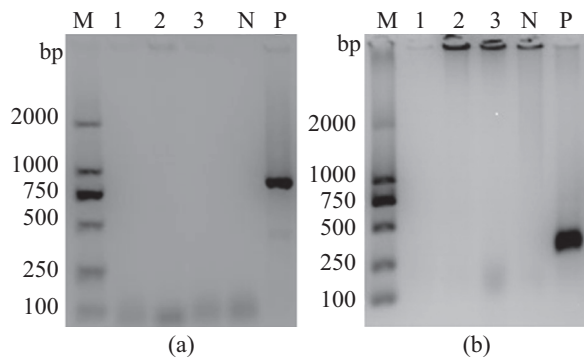


图7 YHV PCR扩增产物

(a) 外引物YHV-GY1/YHV-GY4 PCR产物; (b) 引物YHV-GY2/YHV-Y3及YHV-G6/YHV-GY5 PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 7 PCR products for detection of YHV

(a) PCR products of primer YHV-GY1/YHV-GY4; (b) PCR products of primer YHV-GY2/YHV-Y3 and YHV-G6/YHV-GY5; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M. japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

丝及肌肉组织中出现部分细胞核固缩(图版-3, 4, 无尾箭头示), 同时发现部分肌肉纤维离散(图版-4, 空心箭头示)。

2.5 可疑病原菌的分离鉴定及毒力基因 *PirA*、*PirB*扩增

从患病濒死日本囊对虾肝胰腺中分离得到可培养的细菌3株, 将其分别编号为2901、2902

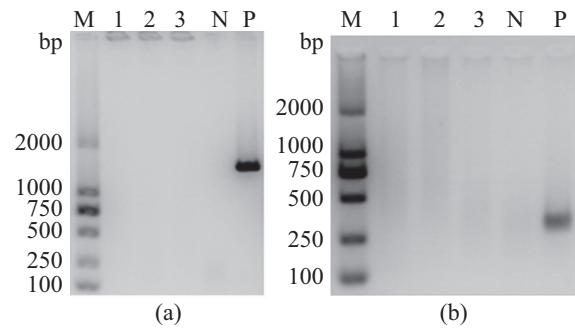


图8 AHPND PCR扩增产物

(a) 引物AP4-F1/R1 PCR产物; (b) 引物AP4-F2/R2 PCR产物; M. DL2000 DNA分子标准; 1~3. 日本囊对虾样品; N. 阴性对照; P. 阳性对照

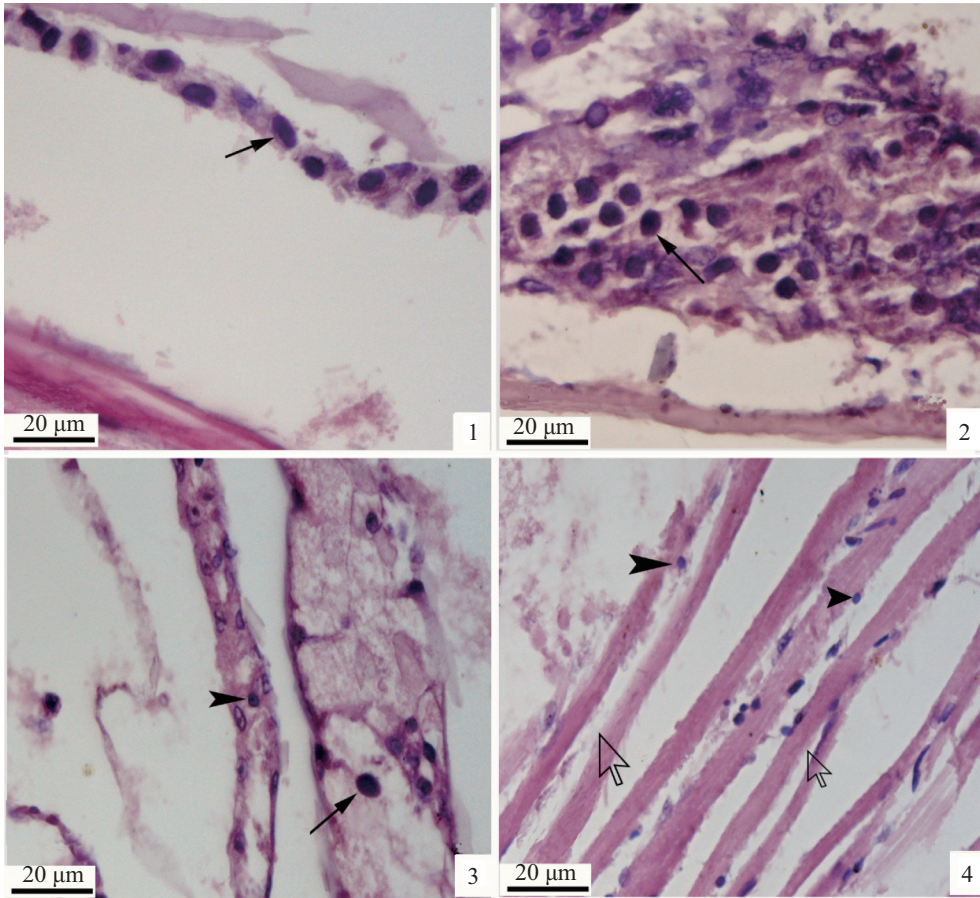
Fig. 8 PCR products for detection of AHPND

(a) PCR products of primer AP4-F1/R1; (b) PCR products of primer AP4-F2/R2; M. DL2000 DNA marker; 1-3. *M. japonicus* samples; N. negative control; P. positive control

及2903, PCR扩增16S rDNA后得到大小分别为1375、1377及1404 bp序列(图9), 经测序后比对, 结果显示3株菌分别与印度格里蒙菌(*Grimontia indica*)、交替单胞菌(*Alteromonas sp.*)及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的亲缘关系最近, 同源性分别为99%、99%、100%。扩增该3株细菌的副溶血弧菌毒力基因 *PirA*、*PirB*, 所分离的3株菌中均未有 *PirA* 扩增出(图10-a), 而在 *PirB* 基因PCR检测中, 发现从2903号菌中扩增到与 *PirB* 基因分子量相近的条带(图10-b), 经克隆测序及BLAST比对, 发现该扩增的序列与副溶血弧菌质粒(*V. parahaemolyticus* strain 3HP plasmid pVA1 (Accession: KP324 996.1) 的最大相似度均为99%, 表明从患病日本囊对虾体内分离的细菌2903中, 可能携带毒力基因 *PirB*。

2.6 分离菌株的毒力测试

用2901、2902、2903号菌株浸泡感染对虾, 结果发现, 3组实验中最高浓度组的对虾, 在浸泡24 h内死亡率均达到100%, 中低浓度组对虾死亡较少, 对虾死亡集中在感染后的3 d内, 4 d后对虾停止死亡(表2)。各组对虾发病症状较为类似, 表现为体色发白, 活动力减弱, 停止摄食或摄食量减少, 肝胰腺颜色变浅等症状。对各组死亡对虾进行解剖, 在各组对虾肠道及肝胰腺中可检出与攻毒感染菌株相应的细菌。实验期间, 空白对照组无对虾死亡。统计显示3株菌的 LC_{50} 分别为 9.8×10^7 、 1.1×10^8 和 2.3×10^8 CFU/mL(表2)。



图版 发病对虾组织切片

1~4分别为对虾胃上皮组织、头胸部腹侧甲壳下上皮组织、鳃丝上皮组织及头胸部肌肉组织病理切片。箭头示病理变化，其中图1~3中小箭头示WSSV包含体，3~4中无尾箭头示细胞核固缩，图4中空箭头示肌纤维离散

Plate Histological examination of diseased shrimp

1-4 are epithelial tissue of stomach, ventral epithelial tissue of cephalothorax, epithelial tissue of gill and muscular tissue of cephalothorax respectively. Arrows indicate the pathological changes: thin black arrows in 1-3 point the inclusion body of WSSV, tail-less arrows in 3-4 point the karyopyknosis, and hollow arrowheads in 4 point the dispersed muscle fibres

3 讨论

日本囊对虾对水质、底质条件要求高制约了该对虾品种的大规模养殖，而病害多发养殖成活率低也是导致日本囊对虾养殖产业发展缓慢的主要因素之一。近年来国内外针对日本囊对虾疾病的研究报道少，产业中的主要疾病病原种类及其流行特征不明确，致使养殖管理中对病害防控尚缺乏有效的措施。本实验针对潍坊地区养殖日本囊对虾暴发性死亡开展了病原分子流行病学排查，研究结果显示患病日本囊对虾中既有常发病病原WSSV及IHHNV感染，也有新发现的病原CMNV感染，同时从发病对虾体内分离到的可疑病原菌中检测到副溶血弧菌毒力基因*PirB*，表明当前日本囊对虾养殖面临多种

疾病风险。根据本实验的病原检测及病理组织观察结果，结合对虾发病特点，推测导致本次日本囊对虾出现暴发性死亡的主要原因为WSSV感染所致，而IHHNV及CMNV弱阳性感染可能会对对虾的发病起到一定的协同致病作用。

WSSV自1993年发现至今，已经给全世界多个国家的对虾养殖造成了危害，该病毒为病毒科白斑病毒属中唯一的一个种，能够广泛感染多种海淡水虾类^[14-17]及其他小型甲壳类动物^[18-19]。不同的WSSV地理株基因型存在差异，造成毒力出现强弱^[20]。尽管国内外对该病的检测^[21-22]及防控技术有较多的研究^[23-26]，但目前仍不能根除该病的发生，WSSV仍然是目前给对虾养殖生产造成重大危害的主要病原之一。

IHHNV最早发现于美国养殖的细角滨对虾

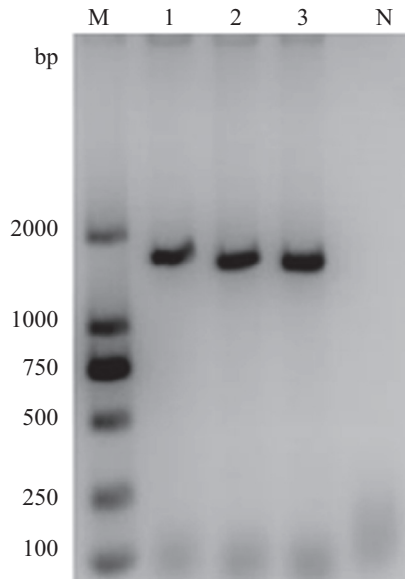


图9 菌株2901、2902、2903的16SrDNA PCR扩增结果
M. DL2000 DNA分子标准; 1~3.菌株2901、2902、2903; N. 阴性对照;

Fig. 9 PCR products of 16 SrDNA gene of bacterial strains 2901, 2902 and 2903

M. DL2000 DNA Marker; 1-3. bacterial strains 2901, 2902 and 2903; N. negative control

(*Litopenaeus stylirostris*)发现^[27], 后证实该病原可感染凡纳滨对虾、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、短沟对虾(*P. semisulcatus*)等多种虾^[28]。IHHNV有

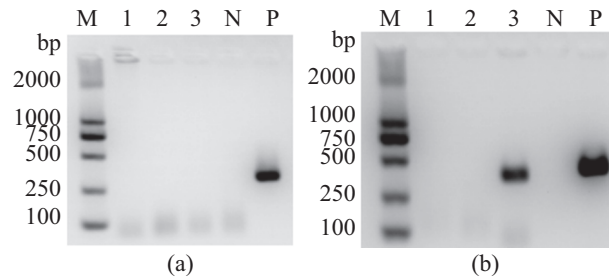


图10 菌株2901、2902、2903 PirA、PirB基因的PCR扩增结果

(a) *PirA*基因PCR扩增结果; (b) *PirB*基因PCR扩增结果; M.DL2000 DNA分子标准; 1~3.分别为菌株2901、2902、2903; N. 阴性对照; P. 阳性对照

Fig. 10 PCR products of genes *PirA* and *PirB* of bacterial strains 2901, 2902 and 2903

(a) PCR products of gene *PirA*; (b) PCR products of gene *PirB*; M. DL2000 DNA Marker; 1-3. bacterial strains 2901, 2902 and 2903; N. negative control; P. positive control

多个地理株, 根据致病性强弱分为感染型和非感染2个类型, 采用引物389 F/R可检测IHHNV的所有基因型^[29], 而引物309 F/R可以检测感染型IHHNV, 本实验采用了两对引物进行IHHNV检测, 从结果可知检测到的弱阳性感染为引物389 F/R扩增的结果, 属于非感染型, 表明其对日本囊对虾的危害程度较低, 在组织病理观察中也未发现因该病感染导致的病理现象。

表2 日本囊对虾浸泡感染实验菌株后的死亡率

Tab. 2 Mortality rate of *M.japonicus* challenged by experimental bacteria

菌株 strain No.	菌液浓度 bacteria concentration (CFU/mL)	攻毒前对虾数/尾 shrimp number	累计死亡数/尾 cumulative mortality	死亡率% mortality rate	半致死剂量 LC ₅₀ (CFU/mL)
2901	4.06×10 ⁸	15	15	100.0	9.8×10 ⁷
	4.06×10 ⁷	15	8	53.3	
	4.06×10 ⁶	15	4	26.6	
	4.06×10 ⁵	15	4	26.6	
2902	1.01×10 ⁸	15	15	100.0	1.1×10 ⁸
	1.01×10 ⁷	15	3	20.0	
	1.01×10 ⁶	15	1	6.7	
	1.01×10 ⁵	15	0	0.0	
2903	4.68×10 ⁸	15	15	100.0	2.3×10 ⁸
	4.68×10 ⁷	15	5	33.3	
	4.68×10 ⁶	15	4	26.6	
	4.68×10 ⁵	15	3	20.0	
对照组 control	0	15	0	0.0	

CMNV是一种分离自凡纳滨对虾的新的对虾病毒,该病毒属于野田村病毒,不仅能够感染凡纳滨对虾,在发病的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)及日本囊对虾中也有检出^[3],泰国养殖的凡纳滨对虾中也发现了该病毒的感染。感染该病原的凡纳滨对虾表现为肝胰腺萎缩坏死、软壳、生长缓慢、腹部肌肉白浊坏死等症状,但该病毒对日本囊对虾的危害性目前尚未有相关的研究报道。观察本实验发病的日本囊对虾外观症状,发现与感染该病的凡纳滨对虾症状存在差异,但组织病理观察发现,发病对虾头胸甲部肌肉存在肌纤维解离坏死现象,与凡纳滨对虾感染该病毒后的症状相吻合^[3]。

对虾急性肝胰腺坏死病是继对虾白斑综合征疾病后出现的又一危害极大的对虾疾病,染病对虾发病阶段通常在放苗后20~30 d,发病持续7 d左右,死亡率在80%以上。病原为副溶血弧菌,该病原的强致病力与其质粒上编码的*PirA*、*PirB* 2个毒力基因有关,且其强毒力与两个基因共同作用有关,单一的*PirA*或*PirB*基因的致病力较弱^[30],目前在日本囊对虾中尚未有感染该病原的报道。本研究结果表明尽管发病日本囊对虾中未存在AHPND病原感染,但从发病对虾中分离的可疑病原菌株中检测到有一株菌含有*PirB*基因,经感染实验证实所分离的可疑病原菌毒力较低,推测该菌毒力低可能与缺少*PirA*基因的协同作用有关,亦或与该菌的侵染力低有关。但对该菌中*PirB*基因的来源及其与致病力的关系有待后续研究。根据本案例中发病对虾的养殖管理技术,推测所检测出的3种病原的来源与养殖用水及饵料相关性不大,养殖过程中病原引入的风险极低,因为养殖用水均采用漂白粉处理消毒,且养殖过程中所用的饵料为人工配合饵料,而最大的风险来源可能与虾苗携带病原WSSV、IHHNV及CMNV有关,因此为了预防养殖对虾疾病发生,除了加强养殖管理,开展苗期病原检测,筛选优质健康的虾苗也是保障养殖成功的重要环节。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 2012中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 30-32.
- The Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. 2012 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 30-32 (in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 2015中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 31-32.
- The Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. 2015 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 31-32 (in Chinese).
- [3] Zhang Q L, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp[J]. Journal of General Virology, 2014, 95(Pt 12): 2700-2709.
- [4] Joshi J, Srisala J, Truong V H, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 297-302.
- [5] Utari H B, Senapin S, Jaengsanong C, *et al.* A haplosporidian parasite associated with high mortality and slow growth in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultured in Indonesia[J]. Aquaculture, 2012, 366-376: 85-89.
- [6] Stentiford G D, Lightner D V. Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms[J]. Aquaculture, 2011, 319(1-2): 302-306.
- [7] Hudson D A, Hudson N B, Pyecroft S B. Mortalities of *Penaeus japonicus* prawns associated with microsporidian infection[J]. Australian Veterinary Journal, 2011, 79(7): 504-505.
- [8] Liu P C, Lee K K, Yii K C, *et al.* News & Notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*[J]. Current Microbiology, 1996, 33(2): 129-132.
- [9] World Organization for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals[M]. 6th ed Paris, French: World Organization for Animal Health, 2010: 119-214.
- [10] Dangtip S, Sirikharin R, Sanguanrut P, *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture Reports, 2015, 2: 158-162.
- [11] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠, 等. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 1999: 166-190.
- Xu H S, Yang X S, Li Y, *et al.* Diagnosis and control of bacterial diseases in Penaeid shrimp hatcheries[M]. Beijing: Ocean Press, 1999: 166-190 (in Chinese).
- [12] Wang H Y, Yang K, Ji B, *et al.* Isolation and molecular identification of an aerobic denitrifier[J]. International Journal of Environmental Science and Development,

- 2013, 4(5): 525-528.
- [13] Han J E, Tang K F J, Tran L H, *et al.* *Photothabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33-40.
- [14] Chang P S, Chen H C, Wang Y C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization[J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1-4): 233-242.
- [15] Pradeep B, Rai P, Mohan S A, *et al.* Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of White spot syndrome virus[J]. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 161-174.
- [16] Maeda M, Itami T, Mizuki E, *et al.* Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): An alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus[J]. *Acta Virologica*, 2000, 44(6): 371-374.
- [17] Edgerton B F. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor albidus* to white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 59(3): 187-193.
- [18] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(2): 65-69.
- He J G, Zhou H M, Yao B, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WABV) host range and transmission route[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, 38(2): 65-69(in Chinese).
- [19] 雷质文, 黄捷, 史成银, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)的宿主调查[J]. *海洋与湖沼*, 2002, 33(3): 250-258.
- Lei Z W, Huang J, Shi C Y, *et al.* Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Oecologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(3): 250-258(in Chinese).
- [20] 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.
- [21] Nunan L M, Lightner D V. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1): 318-321.
- [22] Mekata T, Sudhakaran R, Kono T, *et al.* Real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification as a simple method for detecting white spot syndrome virus[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(1): 25-32.
- [23] Genio J E J, Traifalgar R F M, Corre V L J. Dietary administration of crude lipopolysaccharide from *Vibrio harveyi* enhanced resistance of tiger shrimp, *Penaeus monodon* post larvae against white spot syndrome virus infection[J]. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society*, 2014, 7(5): 342-350.
- [24] Ahanger S, Sandaka S, Ananad D, *et al.* Protection of shrimp *Penaeus monodon* from WSSV infection using antisense constructs[J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(1): 63-73.
- [25] Tendencia E A, Bosma R H, Primavera J H, *et al.* Effect of different mangrove-to-pond area ratios on influent water quality and WSSV occurrence in *Penaeus monodon* semi-intensive farms using the greenwater culture technique[J]. *Aquaculture*, 2012, 362-363: 72-79.
- [26] Peraza-Gómez V, Luna-González A, Campa-Córdova Á I, *et al.* Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(13): 1481-1489.
- [27] 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.
- [28] 杨冰, 宋晓玲, 黄捷, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的流行病学与检测技术研究进展[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 519-524.
- Yang B, Song X L, Huang J, *et al.* Epidemiology and diagnosis of disease by infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-a review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(4): 519-524(in Chinese).
- [29] Tang K F, Lightner D V. Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 49(2): 93-97.
- [30] Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, *et al.* Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126987.

Analysis of pathogen in an outbreak death of *Marsupenaeus japonicus*

HAN Lin^{1,2}, WANG Xiuhua^{2*}, YANG Bing², WAN Xiaoyuan²,
WU Heying², ZHANG Qingli², HUANG Jie²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Process,
Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology;

Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture;

Key Laboratory of Maricultural Epidemiology and Biosecurity of Qingdao,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to clarify the cause of sudden death that occurred in a shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) farm in Weifang from July to August 2015, seven main shrimp pathogens including White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), Yellow head virus (YHV), Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), Infectious myonecrosis virus (IMNV), Covert mortality nodavirus (CMNV) and *Vibrio alginolyticus* that causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) were detected by Polymerase chain reaction (PCR) method. Meanwhile, histopathology of the diseased shrimp was observed. Furthermore, bacterial strains, isolated from the moribund shrimp and identified by the 16 SrDNA gene, were used for the evaluating of virulence by immersion challenge. The results showed that all the three shrimp samples gave strong positive PCR results (an amplicon of 941 bp) with primers WSSV 146 F2/R2, and two of three sample show weak positive results (an amplicon of 389 bp) with primers IHHNV 389 F/R and two of three sample show strong positive results (an amplicon of 167 bp) with primers CMNV-7 F2/R2. However the results of PCR amplification for the other four pathogens (TSV, YHV, IMNV and AHPND) show negative. Histopathology results show that there were inclusion body of WSSV in the epithelial tissue of stomach and gill, and the muscle fibres dispersed. Three dominant strains of bacterial microorganisms 2901, 2902, 2903 were isolated and 16 S rDNA sequencing indicated that they had higher similarity with *Grimontia indica* (99%), *Alteromonas* sp. (99%) and *Vibrio alginolyticus* (100%) respectively. Challenge test show that LC₅₀ of bacteria 2901, 2902, 2903 were 9.8×10^7 CFU/mL, 1.1×10^8 CFU/mL and 2.3×10^8 CFU/mL, which means the bacterial microorganisms had lower virulence and may not be the main pathogen of shrimp. Comprehensive analysis suggested that sudden death of *M. japonicus* might be caused by coinfection of WSSV, IHHNV and CMNV, in which WSSV infection might play a key role. The results of this study could provide strong support for clarifying the cause of outbreak death in shrimp *M. japonicus*.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; sudden death; virus; bacteria; etiology analysis

Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

Funding projects: 948 Program (2016-X56); Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201103034)