

对虾传染性肌肉坏死病研究进展

Advance in penaeid shrimp infectious myonecrosis

闫冬春¹, Kathy F. J. Tang², Donald V. Lightner²

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA)

中图分类号: S945

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)09-0089-03

对虾传染性肌肉坏死病(infectious myonecrosis, IMN)最初于2002年8月爆发于巴西 Piaui 州的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场,并很快在巴西东北沿岸蔓延开来,目前已传至亚洲。2004年,经美国亚利桑那大学(University of Arizona)水产病害实验室研究,该病为一种新的对虾疾病,根据其症状,暂定名为传染性肌肉坏死病。该病在整个养殖季节可致对虾累计死亡率达70%,2003年给巴西水产养殖业造成2000万美元的经济损失,至2005年末,对虾传染性肌肉坏死病给巴西水产养殖业造成的经济损失达4.4亿美元^[1~3]。2006年,该病被亚太地区水产养殖发展网络中心(Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, NACA)和联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)列入亚太地区水生动物监测季度报告(QAAD)的病害监测名录^[4]。2007年,国际兽疫局(The World Organisation for Animal Health, OIE)将其列入需要报告的水生动物病毒性疫病^[5]。作者主要根据2004~2009年的最新文献,对这一新的对虾疾病的研究现状及研究前景做一综述。

1 临床症状及地理分布

凡纳滨对虾仔虾(postlarvae)、幼虾(juveniles)及接近成体虾(subadult)均可感染传染性肌肉坏死病,感染对虾腹部末端体节及尾扇出现肌肉坏死,呈现肌肉发白及不透明症状,外观呈烤焦状。组织学观察表明,该病主要感染对虾的肌肉组织和淋巴器官,且常伴随着浮肿及血细胞纤维化,在坏死肌纤维及纤维化的血细胞之间常有液体堆集,在淋巴器官及肌肉细胞质中常有深色嗜碱包涵体^[1]。在组织切片中,观察到对虾的鳃有时也能被感染,但真正被感染的可能是鳃中的血细胞。该病发展较慢,不像白斑综合征致对虾爆发性死亡,但因在养殖过程中各

个阶段均可感染,因此在整个养殖季节的累计死亡率可达70%,尤其在接近成体阶段,对虾感染此病将造成更大的经济损失。引发此病的原因可能与对虾的环境及生理胁迫有关,如养殖过程中温度及盐度过高或过低、撒网捕虾、投喂劣质饲料等^[1,2]。

对虾传染性肌肉坏死病最初于2002年8月爆发于巴西 Piaui 州,并很快传至 Ceara, Maranhao, Rio Grande do Norte, Pernambuco 及 Paraiba 等地区,给巴西水产养殖业造成严重的经济损失。2006年6月,印度尼西亚东爪哇(East Java)对虾养殖场凡纳滨对虾出现大量死亡,发病对虾出现传染性肌肉坏死症状。经泰国 Mahidol 大学对虾分子生物学及生物化学研究中心用试剂盒检测,确诊为传染性肌肉坏死病。分析其传播途径,可能是印度尼西亚育苗场用了巴西走私过来的亲虾所致^[6]。至此,确定对虾传染性肌肉坏死病已传入亚洲,这也说明对虾苗种和亲本的跨国、跨区域移动加剧了病原传播的风险。

2 病原特性及分类地位

2004年,经美国亚利桑那大学水产病害实验室研究,该病由一种新病毒引起,暂定名为传染性肌肉坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)^[1]。Poulos 等^[7]采用蔗糖密度梯度离心法从发病凡纳滨对虾中提取了此病毒,并用氯化铯密度梯度离心法对病毒进一步纯化。电镜观察表明,此病毒是一种无

收稿日期:2009-02-02;修回日期:2009-05-10

基金项目:山东省高等学校科技计划项目(2009);山东省高等学校优秀骨干教师国际合作培养项目(2007);Gulf Coast Research Laboratory Consortium Marine Shrimp Farming Program, CSREES, USDA (2002-38808-01345)

作者简介:闫冬春(1971-),女,山东菏泽人,副教授,博士,主要从事水产动物病害研究,电话:0535-6672152, E-mail: yandchdongzh@hotmail.com

囊膜双链 RNA 病毒,直径 40 nm。此病毒长 7 560 bp (GenBank accession no. AY570892),包括 2 个开放阅读框(ORF1,ORF2),其中 ORF1 编码一个 RNA 结合蛋白和一个衣壳蛋白,ORF2 编码一个由 736 个氨基酸组成的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase)^[6~8]。Tang 等^[9]采用冷冻电镜技术及三维构象观察了此病毒的精细结构,发现 IMNV 具有一个等轴衣壳,该衣壳由 120 个亚单位组成。目前该病毒已列入整体病毒科(Totiviridae)。Senapin 等^[6]将印度尼西亚的 IMNV 再次测序(GenBank accession no. EF061744),发现印度尼西亚的 IMNV 核酸序列与巴西的重复率为 99.6%,如此高度的相似率进一步验证了印度尼西亚的 IMNV 来源于巴西。

3 宿主种类

组织学及分子生物学检测方法证实,凡纳滨对虾、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、东南褐虾(*Farfantepenaeus subtilis*)均可感染传染性肌肉坏死病毒^[10,11]。Tang 等^[10]对凡纳滨对虾、细角滨对虾和斑节对虾分别注射了传染性肌肉坏死病毒,结果只有凡纳滨对虾出现死亡,细角滨对虾仅出现外观症状,斑节对虾无外观症状出现,只能通过原位杂交检测到其携带 IMNV,这表明 IMNV 自然感染的凡纳滨对虾是其敏感宿主。为减少传染性肌肉坏死病在凡纳滨对虾养殖中造成的经济损失,巴西一养殖公司改养东南褐虾,结果东南褐虾在体质量 7 g 时也感染传染性肌肉坏死病,至体质量 11 g 时,东南褐虾存活率仅为 23%~26%,这表明 IMNV 也可自然感染东南褐虾^[11]。但 IMNV 不如桃拉病毒(taura syndrome virus, TSV)、黄头病毒(yellow head virus, YHV)、白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)毒性强,凡纳滨对虾在注射 IMNV 后 9~13 d 才出现死亡,TSV、YHV、WSSV 在注射后 1~3 d 内可致对虾死亡^[10,12~14]。这可能与病毒感染的主要靶器官不同有关,TSV、YHV、WSSV 主要感染对虾的消化、呼吸等器官,这些器官对对虾的生存至关重要,而 IMNV 主要靶器官为对虾的肌肉,对虾感染此病毒后不会马上死亡,因此对虾传染性肌肉坏死病相对于其他几种对虾病毒病显得病情发展缓慢。目前关于 IMNV 的宿主研究仅局限于以上几种虾,至于蟹类、浮游动物等环境生物能否感染并传播 IMNV 尚无研究报道,因此 IMNV 的传播途径是目前传染性肌肉坏死病研究中急需解决的问题。

4 检测方法

目前,已建立了几种针对传染性肌肉坏死病毒的组织学及分子生物学检测方法。如 Lightner 等^[1]采用常规组织切片技术发现 IMNV 主要感染对虾的肌肉组织和淋巴器官,且感染组织有深色嗜碱包涵体。Poulos 等^[15]建立了 IMNV 的套式 RT-PCR 检测方法,设计了 2 对引物,外引物扩增片段 328 bp,最低可检测到 100 拷贝的 IMNV,内引物扩增片段 139 bp,经二次扩增后最低可检测到 10 拷贝的 IMNV。Tang 等^[10]建立了 IMNV 的原位杂交方法(In-situ hybridization),在组织切片中经抗体与地高辛标记的 IMNV 探针结合,在对虾的血淋巴和肌肉中观察到明显的蓝紫色。Andrade 等^[3]建立了 IMNV 的 real-time RT-PCR 定量检测方法,最低可检测到 10 拷贝的 IMNV。中国台湾 Farming Intelligene Technology 公司(www.iq2000kit.com)与美国亚利桑那大学水产病害实验室合作,研发出 IMNV RT-PCR 检测试剂盒(IQ2000™ IMNV)。但以上这些检测方法只适合于实验室内操作,不便于大面积推广。Puthawibool 等^[16]报道了快速检测 IMNV 的环介导等温扩增检测方法(loop-mediated isothermal amplification),该方法首先用生物素标记的引物进行 60 min 恒温环形核酸增幅,接着用异硫氰酸荧光素标记的探针进行 5 min 杂交,最后进行约 5 min 的色谱分析,这样,不包括 RNA 提取过程,IMNV 的检测可在 75 min 内完成。该方法所用设备及技术较为简便,有望在生产一线推广使用。

5 研究展望

凡纳滨对虾是传染性肌肉坏死病毒的敏感宿主,而目前凡纳滨对虾是中国的主要对虾养殖品种,已在中国沿海 12 个省份,内陆 10 个省份推广养殖,平均年产量为 100 万 t,产值达 300 亿元,成为中国水产养殖业单个品种最大的产业,占养殖对虾总量的 80%以上。目前已证实传染性肌肉坏死病毒已传入亚洲,由于中国的凡纳滨对虾养殖中苗种和亲本的大规模跨国、跨区域移动现象十分普遍,因此,该病传入中国并扩散的风险较大。朱泽闻等^[17]发表了题为“南美白对虾养殖应警惕传染性肌肉坏死病毒”的文章,可见此病毒已引起有关专家的关注,但中国大陆尚未开展传染性肌肉坏死病的实验研究。Andrade 等^[18]报道,中国台湾 Farming Intelligene Technology 公司已从中国海南凡纳滨对虾中检测到 IMNV,可见,IMNV 极有可能已传入中国并正在扩散,开展对虾传染性肌肉坏死病的研究及预警刻不

容缓。对中国大陆主要凡纳滨对虾养殖场进行传染性肌肉坏死病调查、开发简便易行的检测试剂盒、了解其主要传播途径等工作对预防传染性肌肉坏死病将具有积极的意义。

参考文献:

- [1] Lightner D V, Pantoja C R, Poulos B T, *et al.* Infectious myonecrosis virus (IMNV): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei* [A]. World Aquaculture Society. Aquaculture 2004 book of Abstracts [C]. Hawaii: Wageningen Academic Publishers, 353.
- [2] Lightner D V, Pantoja C R, Poulos B T, *et al.* Infectious myonecrosis : new disease in Pacific white shrimp [J]. **Global Aquaculture Advocate**, 2004, 7: 85.
- [3] Andrade T P D, Srisuvan T, Tang K F J, *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV) [J]. **Aquaculture**, 2007, 264: 9-15.
- [4] NACA/FAO (Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and Food and Agriculture Organization of the United Nations). Quarterly Aquatic Animal Disease Report (Asia and Pacific Region) 2006/2, April-June 2006 [R]. Bangkok: Craftsman Press, 2006. 43-44.
- [5] OIE (Office International des Epizooties/ World Animal Health Organization). Aquatic Animal Health Code, 10th ed [R]. Paris: World Organization for Animal Health, 2007. 238.
- [6] Senapin S, Phewsaiya K, Briggs M, *et al.* Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method [J]. **Aquaculture**, 2007, 266: 32-38.
- [7] Poulos B T, Tang K F J, Pantoja C R, *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp [J]. **Journal of General Virology**, 2006, 87: 987-996.
- [8] Nibert M L. “2A-like” and “shifty heptamer” motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus [J]. **Journal of General Virology**, 2007, 88: 1 315-1 318.
- [9] Tang J, Ochoa W F, Sinkovits R S, *et al.* Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008, 105 (45): 17 526-17 531.
- [10] Tang K F J, Pantoja C R, Poulos B T, *et al.* In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV) [J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2005, 63: 261-265.
- [11] Gouveia R P, Freitas M D L, Galli L. Southern brown shrimp found susceptible to IMNV [J]. **Global Aquaculture Advocate**, 2007, 10(1): 86.
- [12] Lu Y, Tapay L M, Brock J A, *et al.* Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone) [J]. **Journal of Fish Diseases**, 1994, 17: 649-656.
- [13] Overstreet R M, Lightner D V, Hasson K W, *et al.* Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the gulf of Mexico and the southeastern United States [J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1997, 69: 165-176.
- [14] 黄健,蔡生力,宋晓玲,等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究 [J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 51-58.
- [15] Poulos B T, Lightner D V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2006, 73: 69-72.
- [16] Puthawibool T, Senapin S, Kiatpathomchai W, *et al.* Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. **Journal of Virology Methods**, 2009, 156: 27-31.
- [17] 朱泽闻,赵文武. 南美白对虾养殖应警惕传染性肌肉坏死病毒 [J]. 科学养鱼, 2007(6): 57.
- [18] Andrade T P D, Redman R M, Lightner D V. Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization [J]. **Aquaculture**, 2008, 278: 179-183.

(本文编辑:张培新)