

传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) 在双壳贝类中的感染情况研究*

逢雪梅 魏永伟 范东东 李长红 苗亮 陈炯^①

(宁波大学海洋学院 生物化学与分子生物学实验室 宁波 315211)

摘要 采用国际兽医局推荐的传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)检测方法,首次开展 IHHNV 在双壳贝类(中国蛤蜊、泥蚶、花蛤、缢蛏、文蛤和白蛤)和螺类软体动物(螺蛳、中华圆田螺)中的感染情况。此外,本研究以泥蚶为研究对象,建立了 IHHNV 在双壳贝类中的实验室感染模型,研究了人工感染泥蚶后 IHHNV 在其体内的增殖和致病情况。结果显示:在采集的不同种类贝类样品中均检测到 IHHNV,其中在泥蚶中的阳性率最高(50%),在文蛤中的阳性率最低(15%),表明 IHHNV 在双壳贝类中的分布较为广泛,是 IHHNV 的重要携带物种。在采集的螺类软体动物中均未检测到 IHHNV。系统发育分析表明,来自不同贝类中的 IHHNV 构成了进化树中不同的分支,其中中国蛤蜊、花蛤、白蛤源的 IHHNV 属于 II 型感染株,而泥蚶、缢蛏、文蛤源的 IHHNV 单独成簇,形成了一个全新的分支。实验室感染结果显示, IHHNV 对泥蚶没有明显的致病性,但可在其体内增殖,在感染后第 5 天其体内的病毒载量达到最大(1.8×10^4 copies/g),随着感染时间的增加,其体内病毒含量呈现递减趋势,但在感染后第 30 天体内仍可检测到病毒的存在。本研究结果对对虾养殖尤其是虾贝混养模式中预防和控制 IHHNV 的传播具有重要意义。

关键词 传染性皮下及造血组织坏死病毒;双壳贝类;系统发育分析;感染;增殖

中图分类号 S945.4+1 **doi:** 10.11693/hyh20180200041

传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)是感染对虾的一种重要病原(白丽蓉等, 2012; Chai *et al*, 2016)。自 1980 年首次发现以来, IHHNV 迅速在全世界的养殖对虾和野生对虾中蔓延, 给对虾养殖业造成了巨大的经济损失(Lightner *et al*, 1983; Galván-Alvarez *et al*, 2012; Silva *et al*, 2014; Encinas-García *et al*, 2015)。其中, IHHNV 对细角滨对虾(*Penaeus stylirostris*)的致病性较强, 死亡率高达 90%, 对南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)的致死现象不明显, 但可引起生长缓慢和畸形等病状(Kalagayan *et al*, 1991; Browdy *et al*, 1993; Lightner,

2011)。

双壳贝类作为一种重要的经济水产品, 其独特的摄食方式使其成为很多病原体传播和扩散的中间载体, 如牡蛎(*Ostrea gigas* Thunberg)是诺如病毒(Norovirus, NoV)的重要传播载体(Campos *et al*, 2014)。20 世纪 80 年代上海甲肝病毒(Hepatitis A virus, HAV)的大爆发也是毛蚶(*Scapharca subcrenata*)携带的甲肝病毒引起的(焦永真等, 1990)。我们的最新研究显示在中国沿海地区取样的贻贝(*Mytella* Genus, *Mytilus edulis* Species)中 IHHNV 检测阳性率高达 90%(Wei *et al*, 2017)。为了进一步研究 IHHNV 在贝

* 国家自然科学基金项目, 31402218 号; 宁波市科技创新团队计划, 2015C110018 号; 宁波市自然科学基金项目, 2017A610284 号, 2017A610281 号; 宁波市科技富民项目, 2016C10042 号, 2017C10037 号。逢雪梅, 硕士研究生, E-mail: pang293528@163.com

① 通讯作者: 陈 炯, 研究员, 博士生导师, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2018-02-23, 收修改稿日期: 2018-03-31

类中的携带和感染情况,本研究将检测范围扩展到更多双壳贝类以及螺类软体动物以评估 IHNV 在这些生物中的携带情况。同时,本研究在实验室条件下建立 IHNV 在贝类中的人工感染模型,以研究其对贝类的致病性及其在贝类中携带时间情况。研究结果将为对虾养殖尤其是虾贝混养模式中预防和控制 IHNV 的传播提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

中国蛤蜊(*Macra chinensis*)、泥蚶(*Tegillarca granosa*)、花蛤(*Ruditapes philippinarum*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、白蛤(*Macra veneriformis*)、螺蛳(*Margarya melanioides*)和中华圆田螺(*Cipangopaludina cahayensis*)各 20 只,随机采集于浙江宁波商业对虾养殖场。该养殖场的养殖模式为虾贝混养。采集的样品分别用封口袋单独保存,并通过冰袋运送到实验室,于 -80°C 保存备用。

1.2 基因组提取和 PCR 检测

对于双壳贝类,将每个样品的肝胰腺、闭壳肌、鳃、斧足和外套膜等量混合用于基因组 DNA 的提取;对于螺类,取肝胰腺用于基因组 DNA 的提取。参照 Wei 等(2017)的方法,提取基因组 DNA 和扩增 IHNV 部分基因序列,扩增片段大小为 389bp。采用国际兽医局(Office International des Epizooties, OIE)公布的引物 389F: 5'-CGGAACACAACCCGACTTT A-3'和 389R: 5'-GGCCAAGACCAAAATACGAA-3'进行扩增。

1.3 克隆及鉴定

各个样品的基因组 DNA 经 PCR 扩增后,采用琼脂糖凝胶电泳进行检测,将对应的目的条带切下,并按照 Gel Extraction Kit (OMEGA, Doraville, 美国)说明书进行回收,然后将其与 pMD19-T simple (TaKaRa, 大连, 中国)载体连接,连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,过夜培养后,挑取单克隆扩大培养,利用 EZNA Plasmid mini kit (OMEGA, Doraville, 美国)抽提质粒,经 PCR 验证后,将阳性克隆送测序。

1.4 序列测定和分析

采用 DNASTAR 软件去除载体序列,将目的序列经 BLAST 分析后采用 BioEdit 软件对各物种的代表序列进行核苷酸序列多重比对,然后选取 GenBank

中已知核苷酸序列作为参考株采用 MEGA5.0 构建系统进化树。从 Kim 等(2012)和 Wei 等(2017)的报道中,选择虾源 IHNV 参照毒株,分别为 I 型感染株(GQ475529), II 型感染株(AY102034、GQ411199、JN616415 和 AY362547), III 型感染株(JN377975、AF218266 和 KJ862253),非感染株 A 型(EU675312 和 DQ228358)和非感染株 B 型(AY124937)。

1.5 标准曲线制备

将从贻贝中获得的 Zhejiang(Zhoushan)株 IHNV 部分序列(Wei *et al.*, 2017)经 T-A 克隆构建 pMD19-IHNV 重组质粒,用 NanoDrop 2000 测定浓度和质量,并根据拷贝数换算公式: $6.02 \times 10^{23} \times (\text{浓度 ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA 长度} \times 660) = \text{copies}/\mu\text{L}$ 得到 pMD19-IHNV 重组质粒的拷贝数,为 $7.4 \times 10^{10} \text{copies}/\mu\text{L}$,将该重组质粒作为本实验标准品原液,于 -80°C 保存。将该质粒标准品进行梯度稀释,得到 $1.0 \times 10^8 - 1.0 \times 10^3 \text{copies}/\mu\text{L}$ 共 6 个梯度,每个梯度 3 个平行,进行实时荧光定量 PCR。扩增反应体系为 25 μL ,包括灭菌水 9.5 μL 、SYBR Premix Ex Taq(2 $\times$)缓冲液 12.5 μL 、基因组 DNA 模板 1.0 μL 、上下游引物各(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL 。扩增反应在 ABI StepOne 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行,反应条件为: 94°C 180s(预变性, 1 个循环); 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s(扩增段, 共 40 个循环); 94°C 30s, 72°C 30s, 95°C 30s(熔解段, 1 个循环)。根据实时荧光定量的结果,建立质粒标准品拷贝数与循环阈值(Cycle threshold, C_t 值)对应的标准曲线。

1.6 动物感染实验

将分离自南美白对虾的 IHNV Wenzhou 株(KP733862)(本实验室保存)浸泡感染 13 日龄的南美白对虾,于感染后 30d 采集对虾肝胰腺,充分研磨,反复冻融,采用 0.22 μm 滤器除菌后将病毒液于 -80°C 保存备用。

活体泥蚶购买于浙江宁波另一个商业养殖场,随机挑选 10 只泥蚶进行 IHNV 检测,结果为阴性的批次用于动物感染实验。通过浸泡的方式对泥蚶进行感染,将泥蚶分为实验组和对照组,实验组浸泡在 IHNV 含量为 $7 \times 10^6 \text{copies}$ 的人工海水中(2L),对照组不含 IHNV,2h 后将实验组泥蚶用人工海水洗涤 3 次(除去表面的病毒),然后放到 30L 人工海水养殖箱内,于 2h、12h、24h、2d、3d、5d、7d、14d、21d 和 30d 每组随机选 3 只泥蚶,用人工海水洗涤后取样。取样方法和基因组 DNA 的提取参照 1.2 进行。参照 Dhar 等(2001)建立的实时荧光定量 PCR 方法对

IHHNV 在泥蚶体内的拷贝数进行检测, 进一步分析 IHHNV 在泥蚶体内的增殖情况。

1.7 组织切片观察

于攻毒后第 5 天, 取实验组和对照组泥蚶的肝胰腺, 置于 4% 福尔马林中固定 24h。参考范东东等(2015)的报道, 对肝胰腺进行石蜡包埋, 切片后 H.E 染色, 光学显微镜下观察肝胰腺组织病理变化。

2 结果

2.1 IHHNV 在样品中的检测结果

被检样品中 IHHNV 的检测结果如表 1 所示, 在所有采集的贝类样品中均检测到了 IHHNV, 其中在泥蚶中的阳性率最高(50%), 在文蛤中的阳性率最低(15%), 在两种螺类中均未检测到 IHHNV, 表明 IHHNV 在双壳贝类中的分布较为广泛。

表 1 双壳贝类和螺类中 IHHNV 的检测结果

Tab.1 The test results of IHHNV in bivalve shellfish and snails

名称	阳性个数/总检测数	阳性率
中国蛤蜊	4/20	20%
泥蚶	10/20	50%
花蛤	6/20	30%
缢蛏	4/20	20%
文蛤	3/20	15%
白蛤	8/20	40%
螺蛳	0/20	0
中华圆田螺	0/20	0

2.2 IHHNV 基因组的系统进化树分析

序列分析表明, 从 6 种贝类中扩增得到的基因片段均为 IHHNV 基因组部分序列, 将各序列登陆到 GenBank 数据库中, 登录号分别为中国蛤蜊: KY927928、花蛤: KY927929、白蛤: KY927927、缢蛏: KY927930、文蛤: KY927931 和泥蚶: KY927932。经 MEGA5.0 绘制的进化树如图 1 所示, 来自中国蛤蜊、花蛤和白蛤的 IHHNV 基因型为 II 型感染株(Kim *et al*, 2012; Wei *et al*, 2017), 而来自缢蛏、文蛤和泥蚶的 IHHNV 在整个进化树中单独成簇, 形成了一个新的分支。

2.3 IHHNV 基因荧光定量标准曲线

将质粒模板梯度稀释为 10^8 — 10^3 copies/ μ L DNA 6 个梯度, 绘制重组质粒标准曲线, 通过对其回归曲线分析, 发现其相关性较好, 相关系数 $R^2=0.998$, 系统生成的回归方程为: $y=-3.274x+34.86$ (图 2)。

2.4 IHHNV 在泥蚶中的增殖情况

采用实时荧光定量 PCR 对攻毒后不同时间段的泥蚶进行 IHHNV 检测, 结果显示, 不同感染期内泥蚶体内的病毒含量较攻毒前均有不同程度的增加。通过计算每克泥蚶组织中所含病毒拷贝数发现, 感染最初的 2h 病毒的拷贝数最低, 为 954copies/g, 在感染的第 5 天泥蚶体内 IHHNV 达到最高拷贝数 1.8×10^4 copies/g, 随后泥蚶体内的病毒量开始下降, 在感染后第 30 天, 其体内的病毒含量趋向于感染初期, 为

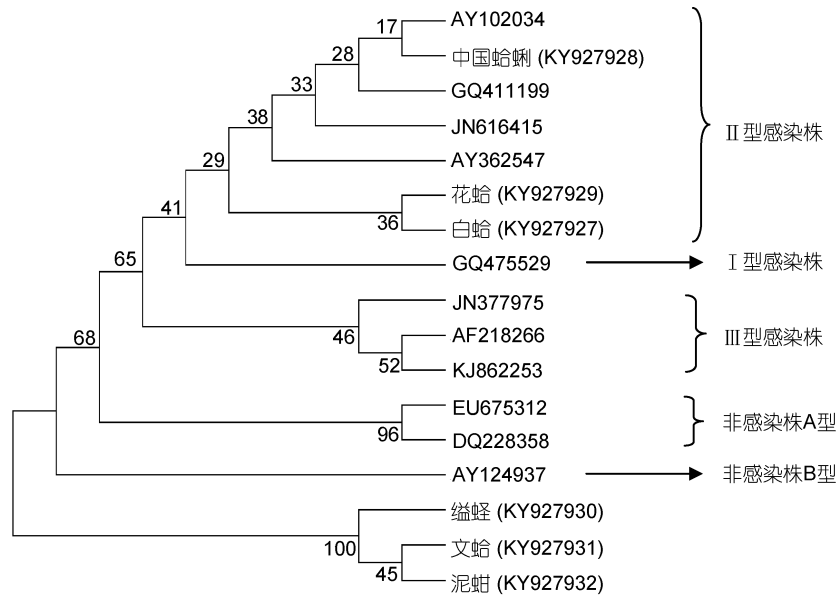


图 1 采用邻接法构建基于 IHHNV 部分基因序列的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of partial nucleotide sequences of IHHNV using the neighbor-joining method

注: 分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度

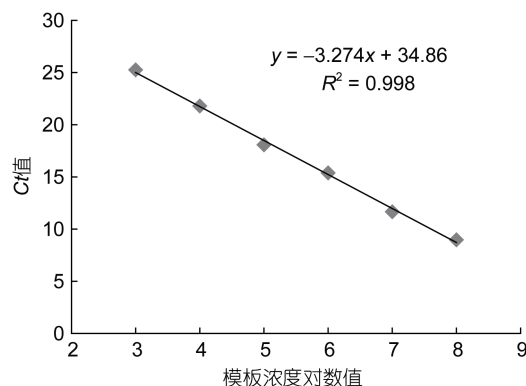


图2 IHHNV 实时荧光定量 PCR 标准曲线构建
Fig.2 Generation of IHHNV real time quantitative PCR standard curve

1400 copies/g, 表明 IHHNV 能够在双壳贝类中进行增殖, 并可在贝中存在较长时间(图 3)。

2.5 组织病理分析

分别取 IHHNV 感染的泥蚶和对照组泥蚶的肝胰

腺制备组织切片, 结果显示, 与对照组相比, IHHNV 感染的泥蚶肝胰腺组织没有显著的病理学变化(图 4)。

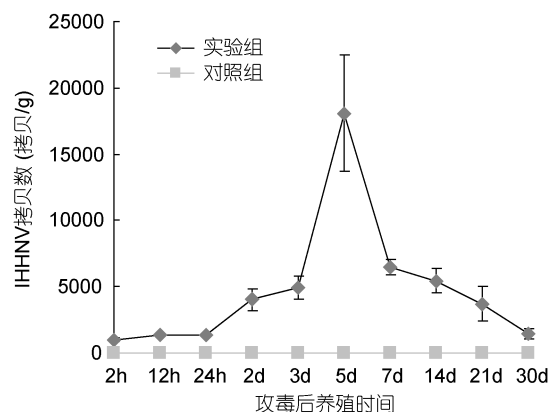


图3 IHHNV 感染的泥蚶体内 IHHNV 拷贝数变化
Fig.3 Changes of IHHNV copies in *T. granosa* after IHHNV infection

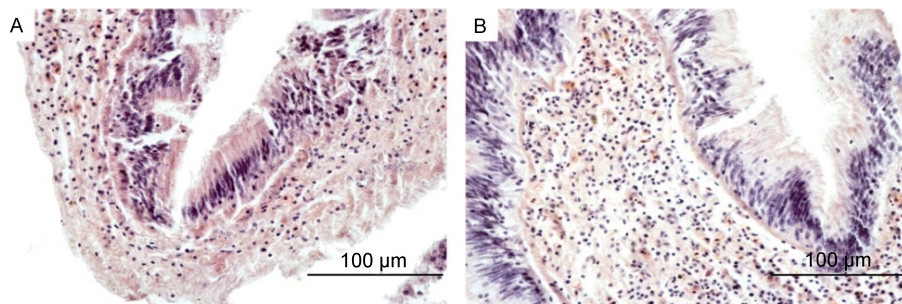


图4 泥蚶的肝胰腺组织切片(×400)
Fig.4 Histopathological sections of hepatopancreas from *T. granosa*
注: A. IHHNV 未感染泥蚶肝胰腺; B. IHHNV 感染泥蚶肝胰腺

3 讨论

IHHNV 是危害对虾养殖的重要病害, 严重制约对虾养殖业的发展。以往研究表明, IHHNV 可感染多种对虾, 所以大部分研究都集中在 IHHNV 在对虾中的感染和流行情况(Rai *et al.*, 2012; Vega-Heredia *et al.*, 2012)。我们的最新研究发现, IHHNV 在自然界中广泛存在于贻贝当中(Wei *et al.*, 2017), 这一现象给 IHHNV 的防控带来了新的挑战和困难。如今, 随着养殖业的发展和养殖规模的扩大, 虾贝混养模式已经被广泛的应用在生产实践中(陈萍等, 2016)。因此, 就养殖场自身的环境而言, 除了对虾本身之外, 养殖区内贝类生物中 IHHNV 的感染情况调查也显得尤为重要。本研究检测了 IHHNV 在双壳贝类及螺类中的携带情况, 结果显示 IHHNV 在中国蛤蜊、泥蚶、花蛤、缢蛏、文蛤和白蛤中均存在, 并且在泥蚶的检出

率高达 50%, 而在作为重要的底栖养殖生物螺类中并没有检测到 IHHNV, 揭示双壳贝类很可能是 IHHNV 感染的一个潜在来源。作者分析, 这可能与贝类的摄食方式有关, 双壳贝类独特的滤食活动使得病毒粒子在体内易于富集(Lees, 2000), 而螺类多半生活在水体较肥沃、水草较多的静水环境中并通过齿舌捕获食物从而使得病毒粒子不易被富集。值得注意的是, 在系统进化树中, 来自泥蚶、缢蛏和文蛤的 IHHNV 在整个进化树中形成一个全新的分支, 说明这三种贝类中的 IHHNV 与以往发现的任何毒株都有很大不同。这三种来源的 IHHNV 毒株对对虾致病性如何有待深入研究。

在人工感染实验中, IHHNV 在泥蚶体内的含量从感染初期到养殖后期呈现先上升后下降的趋势, 这可能是由于感染初期 IHHNV 在贝类中大量增殖,

达到一定拷贝数后启动自我清除机制并将体内病毒释放到体外,从而使体内的病毒含量趋于稳定。IHHNV 感染对虾后主要侵染对虾的肝胰腺,造成肝胰腺发生组织病理变化,如嗜酸性核内包涵体以及细胞核肥大等特征(Rai *et al*, 2012)。本研究中,泥蚶感染 IHHNV 后,没有出现明显的致病症状,肝胰腺组织切片也未观察到明显的病理变化,说明 IHHNV 对泥蚶可能没有致病性。然而,双壳贝类作为病毒的重要中间载体(Campos *et al*, 2014; Gao *et al*, 2015),在虾贝混养体系中是否作为对虾之间 IHHNV 传染的媒介还有待进一步研究。

4 结论

本研究表明双壳贝类是携带 IHHNV 的重要载体,并且 IHHNV 在贝类生物中可能已经发生变异。人工感染实验表明,虾源 IHHNV 可在贝类中增殖并存在较长时间,但对贝类没有明显的致病性。该研究结果对对虾养殖尤其是虾贝混养模式中预防和控制 IHHNV 的传播具有重要意义。

参 考 文 献

- 白丽蓉, 赵志英, 2012. 对虾传染性皮下与造血组织坏死病毒(IHHNV)的研究进展. 中国农学通报, 28(14): 114—119
- 陈 萍, 王芳芳, 翁歆之, 2016. 海水围塘虾蟹贝生态混养模式研究. 中国水产, (11): 109—112
- 范东东, 魏永伟, 苗 亮等, 2015. 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)的流行病学调查. 海洋与湖沼, 46(5): 1153—1159
- 焦永真, 韩剑秋, 王宪明等, 1990. 1988 年上海甲型肝炎暴发流行中从毛蚶分离到甲型肝炎病毒. 病毒学报, 6(4): 312—315
- Browdy C L, Holloway Jr J D, King C O *et al*, 1993. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. Journal of Crustacean Biology, 13(1): 87—94
- Campos C J A, Lees D N, 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. Applied and Environmental Microbiology, 80(12): 3552—3561
- Chai C, Liu Y C, Xia X M *et al*, 2016. Prevalence and genomic analysis of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp farmed in Shanghai, China. Archives of Virology, 161(11): 3189—3201
- Dhar A K, Roux M M, Klimpel K R, 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using Real-Time quantitative PCR and SYBR green chemistry. Journal of Clinical Microbiology, 39(8): 2835—2845
- Encinas-García T, Mendoza-Cano F, Enríquez-Espinoza T *et al*, 2015. An improved validated SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for the detection of the *Penaeus stylirostris* densovirus in penaeid shrimp. Journal of Virological Methods, 212: 53—58
- Galván-Alvarez D, Mendoza-Cano F, Hernández-López J *et al*, 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). Journal of Invertebrate Pathology, 111(1): 60—67
- Gao S Y, Li D D, Zha E H *et al*, 2015. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(2): 2026—2036
- Kalagayan H, Godin D, Kanna R *et al*, 1991. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. Journal of the World Aquaculture Society, 22(4): 235—243
- Kim J H, Kim H K, Nguyen V G *et al*, 2012. Genomic sequence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) KLV-2010-01 originating from the first Korean outbreak in cultured *Litopenaeus vannamei*. Archives of Virology, 157(2): 369—373
- Lees D, 2000. Viruses and bivalve shellfish. International Journal of Food Microbiology, 59(1—2): 81—116
- Lightner D V, 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. Journal of Invertebrate Pathology, 106(1): 110—130
- Lightner D V, Redman R M, Bell T A *et al*, 1983. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. Journal of the World Aquaculture Society, 14(1—4): 212—225
- Rai P, Safeena M P, Krabetsve K *et al*, 2012. Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Indian Journal of Virology, 23(2): 203—214
- Silva D C D, Nunes A R D, Teixeira D I A *et al*, 2014. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: sequencing, comparative analysis and PCR detection. Virus Research, 189: 136—146
- Vega-Heredia S, Mendoza-Cano F, Sánchez-Paz A, 2012. The infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus: a brief review of what we do and do not know. Transboundary and Emerging Diseases, 59(2): 95—105
- Wei Y W, Fan D D, Chen J, 2017. The mussel *Mytilus edulis* L. as an important reservoir of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). Aquaculture Research, 48(3): 1346—1350

APPLICATION OF THE INFECTIOUS HYPODERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHHNV) TO BIVALVE SHELLFISH

PANG Xue-Mei, WEI Yong-Wei, FAN Dong-Dong, LI Chang-Hong,
MIAO Liang, CHEN Jiong

(Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Detection to the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in bivalve shellfish (*Macra chinensis*, *Tegillarca granosa*, *Ruditapes philippinarum*, *Sinonovacula constricta*, *Meretrix meretrix* and *Macra veneriformis*) and snails (*Margarya melanioides* and *Cipangopaludina cahayensis*) were first attempted using the method that recommended by the OIE (Office International des Epizooties). We regarded *T. granosa* as the research object to establish the IHHNV infection model in bivalve shellfish and studied the replication and pathogenicity of IHHNV in bivalve shellfish after infection. Results demonstrated that IHHNV could be detected in all kinds of the collected shellfish samples with the highest positive rate (50%) in *T. granosa* and the lowest (15%) in *M. meretrix*, indicating that IHHNV widely distributed in bivalve shellfish, and bivalve shellfish is an important carrier of IHHNV. However, no IHHNV was detected in the collected snails. Phylogenetic tree analysis indicated that IHHNV from different shellfish species belong to different branches. Among them, IHHNV from *M. chinensis*, *R. philippinarum* and *M. veneriformis* belonged to type II, while IHHNV from *T. granosa*, *S. constricta* and *M. meretrix* formed a completely new branch. The result of infection showed that IHHNV could replicate in *T. granosa* with no obvious pathogenicity. The maximum viral load in *T. granosa* (1.8×10^4 copies/g) reached the peak value 5 days post infection. The viral load showed a decreasing trend with the increase of infection time, but the virus could be also detected until 30 days post infection. Therefore, the results of this study are of great significance for the prevention and control of IHHNV transmission in shrimp farming, especially in shrimp and shellfish co-culture farming.

Key words IHHNV; bivalve shellfish; phylogenetic analysis; infection; replication