

肝胰腺细小病毒(HPV) PCR 检测 及流行情况调查*

刘天齐^{1,2} 杨冰² 刘笋² 万晓媛² 王秀华² 黄健²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第1部分:PCR检测法》(SC/T 7203.1-2007)的方法,对2011-2013年期间我国沿海7个省市主要养殖对虾品种不同生长阶段的对虾样品进行该病毒携带情况的筛查。该方法的检测灵敏度为0.07 fg,相当于大约20个病毒拷贝。结果显示,639份样品的HPV阳性检出率为18.47%。其中,在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中均有阳性检出,且仔虾、幼虾、成虾各个阶段均可检出HPV,表明HPV已在我国养殖对虾中存在并流行。本研究结果为对虾养殖生产提供了疫病的科学数据,为我国养殖对虾中该病的流行情况提供了参考依据。

关键词 对虾;肝胰腺细小病毒(HPV);PCR;检测

中图分类号 S94 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0066-05

肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)是引起对虾疾病的重要病原之一,最初于1984年在新加坡野生墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)中被发现(Chong *et al.*, 1984),随后包括澳大利亚、中国、韩国、菲律宾、印度尼西亚、马来西亚、肯尼亚、以色列及南美洲地区均有该病的报道(Bonami, 2008)。HPV感染可引起养殖对虾幼体或仔虾慢性死亡(Lightner *et al.*, 1993; Spann *et al.*, 1997),导致幼虾矮小、生长迟缓(Flegel *et al.*, 1992, 1999; Limuswan, 1999)。

HPV为无囊膜二十面体,直径22-23 nm,核酸为线性单链DNA,属于细小病毒科(Parvoviridae)、浓核病毒亚科(Densovirinae) (Bonami *et al.*, 1995; Roekring *et al.*, 2002)。目前,已有包括印度、泰国、澳大利亚、韩国和中国的5个不同地理株HPV全基因序列的测定(Sukhumsirichart *et al.*, 2006; Safeena

et al., 2010; La Fauce *et al.*, 2007a; Jeeva *et al.*, 2012; 张峥等, 2011)。基因序列比对显示,分离自中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的HPV中国株(GU371276)与韩国株(AY008257)具有较高的相似性(Jeeva *et al.*, 2012)。

分子生物学诊断HPV的方法,包括PCR(Sukhumsirichart *et al.*, 1999; Pantoja *et al.*, 2000; Phromjai *et al.*, 2001)、套式PCR(Manjanaik *et al.*, 2005)、PCR-ELISA(Sukhumsirichart *et al.*, 2002)、LAMP(Nimitphak *et al.*, 2008)和Real-time TaqMan PCR(La Fauce *et al.*, 2007b; Subbiah *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010)等已相继报道,但大多数方法仅针对特定的HPV地理株,并不具备广泛适用性。本研究采用水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第1部分:PCR检测法》(SC/T 7203.1-2007)对我国近年来养殖对虾感染HPV的情况进行筛查,以期为该病毒在国内的流行和分布

*国家自然科学基金(31101935)、中央级公益性科研业务费专项资金(20603022011009)和国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)共同资助。刘天齐, E-mail: st.a@163.com

通讯作者: 杨冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-05-21, 收修改稿日期: 2013-06-06

提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 对虾及病毒样品

待检样品为 2011–2013 年间,在中国沿海主要对虾养殖地区采集的卵、仔虾、幼虾、成虾及亲虾样品。

健康凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)DNA、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) DNA、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV) DNA、肝胰腺细小病毒(HPV) DNA 为本实验室提供。

1.2 引物与试剂

根据水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分: PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)引物序列为正向引物 F1: 5'-GGT-GAT-GTG-GAG-GAG-AGA-3',反向引物 R1 :5'-GTA-ACT-ATC-GCC- GCC-AAC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。

DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司。25 mmol/L MgCl₂、10×PCR 缓冲液、5 U/μl Taq DNA 聚合酶、10 mmol/L dNTP 购自 TaKaRa 公司。

1.3 DNA 的提取

亲虾、成虾和幼虾样品取鳃丝,仔虾样品取头胸部或个体,卵取个体,样品重量约 25–50 mg,按照 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA。

1.4 PCR 反应

25 μl 反应体系中包含:1×PCR 缓冲液 200 μmol/L dNTP 4.0 mmol/L MgCl₂,1 μmol/L 正向引物 F1,1 μmol/L 反向引物 R1,0.05 U/μl Taq DNA 聚合酶,样品模板 1 μl,用去离子水补足体积至 25 μl,立即进行 PCR 反应。PCR 扩增反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 1 min,40 个循环;72℃ 延伸 7 min,最后 4℃ 保温。

1.5 PCR 反应特异性和灵敏度

将 HPV DNA(浓度约 67 pg/μl 约 2×10⁷ copies/μl)进行 10⁻¹–10⁻⁷ 梯度稀释,各取 1 μl 作为模板进行扩增。同时设立健康凡纳滨对虾的组织 DNA、WSSV DNA、IHNV DNA 作检测特异性分析。

2 结果

2.1 PCR 反应特异性和灵敏度

以 WSSV DNA、IHNV DNA 及健康虾组织

DNA 为模板的 PCR 反应电泳图谱见图 1A,未见目标条带及其他非特异性条带的出现。PCR 检测灵敏度结果见图 1B,模板 10⁻¹–10⁻⁶ 稀释度可见 628 bp 的目的片段,DNA 原液及 10⁻⁷ 稀释度无扩增片段。最低检测灵敏度为 10⁻⁶ 稀释度,即为 0.07 fg,相当于大约 20 个病毒拷贝。

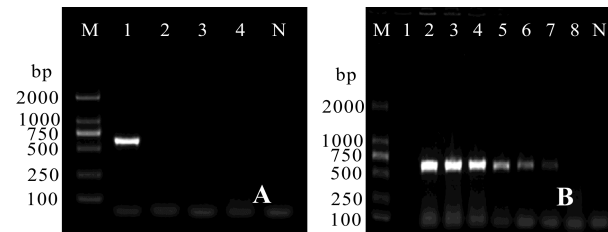


图 1 PCR 反应特异性(A)和灵敏度(B)分析电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR specificity and sensitivity

A: M. DL 2000 DNA Ladder; 1. HPV DNA, 2. WSSV DNA, 3. IHNV DNA, 4. SPF shrimp DNA, N: Blank control. B: M. DL 2000 DNA Ladder; Lane 1-8. Ten-fold serial dilution of HPV DNA template at 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷ respectively, N. Blank control

2.2 样品检测结果

对采集自 7 个省、直辖市的 639 份不同生长阶段的样品携带 HPV 情况进行统计(表 1、表 2),其中 555 份中国对虾、78 份凡纳滨对虾、6 份日本囊对虾(*Mar-supenaes japonicus*)。结果显示,HPV 阳性率为 18.47%。其中,中国对虾共检出 113 份阳性,阳性率为 20.36%,其中,仔虾 5/52,阳性率为 9.62%;幼虾 100/493,阳性率为 20.28%;成虾 8/8,阳性率为 100%。凡纳滨对虾检出两份,均为幼虾,且阳性很弱,总阳性率为 2.56%,幼虾阳性率为 3.64%;日本囊对虾样品数较少,检出 3 份阳性,总阳性率 50%,幼虾阳性率 100%(2/2),成虾为 25%(1/4)。

3 讨论

分子生物学诊断技术在水产养殖疾病中的应用正在迅速发展(Lightner *et al*, 1994),PCR 技术相对经典的组织学方法因具有更高的灵敏度和特异性而被广泛应用。研究者对于 HPV 的 PCR 检测方法相继建立(Sukhumsirichart *et al*, 1999; Pantoja *et al*, 2000; Phromjai *et al*, 2001),其中 Phromjai 等(2001)的 PCR 方法对斑节对虾(*Penaeus monodon*)中 HPV 的检出限为 1 fg, Yan 等(2010)应用 Real-time PCR 技术可从中国对虾中检出低至近 1 个 HPV 病毒拷贝。本研究

表 1 2011–2013 不同品种养殖对虾样品 HPV 检测情况
Tab.1 Detection results of HPV in different species of cultured shrimp by PCR during 2011–2013

省份 Province	样品 Samples	检测 数量 Total number	阳性 数量 Positive number
辽宁省 Liaoning	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 幼虾 Juveniles	2	2
河北省 Hebei	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	9	0
	幼虾 Juveniles	16	8
	亲虾 Broodstock	2	0
天津市 Tianjin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 卵 Eggs	1	0
	幼虾 Juveniles	11	0
	亲虾 Broodstock	4	0
山东省 Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 仔虾 Postlarvae	3	0
	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
	成虾 Adults	4	1
	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	42	4
	幼虾 Juveniles	475	90
	成虾 Adults	8	8
江苏省 Jiangsu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 幼虾 Juveniles	10	0
	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
浙江省 Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 仔虾 Postlarvae	10	0
	幼虾 Juveniles	5	0
广东省 Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 幼虾 Juveniles	29	2
	成虾 Adults	5	0

采用的水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分：PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)检测灵敏度为 0.07 fg，相当于 20 个病毒拷贝，比本实验室建立的 Real-time PCR(Liu *et al*, 2013)低一个数量级。该方法对 WSSV DNA、IHHNV DNA 及健康虾组织 DNA 均未出现扩增片段，同时组织病理观察本研究使用的 HPV 感染的中国对虾样品显示出典型的 HPV 包涵体，说明该标准方法对 HPV 具有较高的灵敏度和特异性。实验中，病毒原液组的浓度为 67 pg/μl，约 2×10^7 copies/μl，PCR 检测没有条带，提示 PCR 过程中模板浓度过高会出现假阴性的结果，此现象也为病原筛查及研究工作提供了警示和参考。

HPV 自 30 年前在亚洲被发现以来(Chong *et al*, 1984)，已在全球广泛分布。Manjanaik 等(2005)应用套式 PCR 技术对印度沿海的野生虾携带 HPV 情况进行筛查，检出率为 58%。Claydon 等(2010)应用 PCR

表 2 样品检测结果统计
Tab.2 Statistic of detection results

样品 Samples	检测数量 Total number	阳性数量 Positive number	阳性率 Positive rate (%)
中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	52	5	9.62
幼虾 Juveniles	493	100	20.28
成虾 Adults	8	8	100.00
亲虾 Broodstock	2	0	0.00
合计 Subtotal	555	113	20.36
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 卵 Eggs	1	0	0.00
仔虾 Postlarvae	13	0	0.00
幼虾 Juveniles	55	2	3.64
成虾 Adults	5	0	0.00
亲虾 Broodstock	4	0	0.00
合计 Subtotal	78	2	2.56
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	2	2	100.00
成虾 Adults	4	1	25.00
合计 Subtotal	6	3	50.00
总计 Total	639	118	18.47

技术在文莱野生斑节对虾中调查 HPV，流行率为 3.8%，相比亚洲较低。近年来，越来越多的对虾病毒被证实已在中国大陆存在并流行，已有报道肝胰腺细小病毒(HPV)在中国大陆中国对虾中被发现(孙修勤等 1992；Yan *et al*, 2010)，该病毒宿主范围广泛，主要对虾养殖品种中国对虾、斑节对虾(Flegel, 1997)、日本囊对虾、墨吉对虾(Chong *et al*, 1984)、凡纳滨对虾(Paynter *et al*, 1985)等都是 HPV 的自然宿主。目前，国内外尚未有我国 HPV 带毒及流行情况的数据，本研究首次针对近年来我国沿海 7 个省市主要养殖对虾品种不同生长阶段对虾样品进行该病毒携带情况的筛查，结果显示 639 份样品 HPV 阳性检出率为 18.47%。其中，中国对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾均有阳性检出，且仔虾、幼虾、成虾各个阶段均可检出 HPV，表明 HPV 已在我国养殖对虾中存在并流行。面对近几年来养殖生产中对虾幼体、仔虾慢性死亡、个体参差不齐、生长缓慢的现象，HPV 在病原携带及宿主和传播途径等方面的情况还有待进一步研究、探讨。

本研究样品采集于我国沿海部分对虾养殖地区，其抽样方法与系统的流行病学调查中随机样品的抽样方法不完全相同。在各养殖季节调研期间，针对养殖单位对虾健康状况和生产安排的需要，同时兼顾南北方对虾品种、发育时期、个体大小等因素，进行样品的采集。一般，除送检单位要求外，对于健康群体采

集份数为 5 份以下, 发病群体采集 5-10 份。此外, 应不同的现场情况增加或减少采集份数。若应用套式 PCR 或 Real-time PCR 方法, 本结果的阳性率可能会略有提高。该数据提供了针对病毒的定性检测, 有关组织细胞的感染程度及其分布可应用原位杂交方法评价。本研究对 HPV 的初步调查结果对对虾养殖生产提供了疫病的科学数据, 为我国养殖对虾中该病的流行情况提供了参考依据。同时, 本研究中采用的水产行业标准方法示范并规范了标准的应用, 为健康亲虾、虾苗和 SPF 种群的选育提供了技术保障。

参 考 文 献

- 孙修勤, 王文兴, 周惠民, 等. 中国对虾肝胰腺小病毒病的免疫诊断研究. 鱼类病害研究, 1992, 14(2): 22-26
- 张峥, 黄捷, 高强, 等. 中国对虾肝胰腺细小病毒全基因组的克隆及序列分析. 中国水产科学, 2011, 18(1): 59-65
- Bonami JR, Mari J, Poulos BP, *et al.* Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. J Gen Virol, 1995, 76(4): 813-817
- Bonami JR. Shrimp viruses. In: BWJ Mahy and MHV van Regenmorte. Encyclopedia of Virology, 3rd Ed. Academic Press, Oxford. 2008, 567-576
- Chong Y, Loh H. Hepatopancreas clamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. Singap. Vet J, 1984, 9: 51-56
- Claydon K, Tahir RAH, Said HM, *et al.* Prevalence of shrimp viruses in wild *Penaeus monodon* from Brunei Darussalam. Aquaculture, 2010, 308(3-4): 71-74
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
- Flegel TW, Fegan DF, Kongsom S, *et al.* Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. Diseases of penaeid shrimp. In: Fulks W, Main KL, Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, 1992, 57-112
- Flegel TW, Thamavit V, Pasharawipas T, *et al.* Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 1999, 174(3-4): 197-206
- Jeeva S, Kang SW, Lee YS, *et al.* Complete nucleotide sequence analysis of a Korean strain of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Fenneropenaeus chinensis*. Virus Genes, 2012, 44(1): 89-97
- La Fauce KA, Elliman J, Owens L. Molecular characterization of hepatopancreatic parvovirus (PmergDENV) from Australian *Penaeus merguensis*. Virol, 2007a, 362(2): 397-403
- La Fauce, KA, Layton R, Owens L. TaqMan real-time PCR for detection of hepatopancreatic parvovirus from Australia. J Virol Methods, 2007b, 140(1-2): 10-16
- Lightner DV, Redman RM, Moore DW, *et al.* Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Aquaculture, 1993, 116(1): 15-23
- Lightner DV, Poulos BT, Bruce L, *et al.* Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication, 1994, 1: 59-85
- Limuswan CH. Shrimp culture in Thailand toward year 2000. In: Tonguthai K, Chinabut S, Somsiri T, *et al.* the AAHRI Newsletter, Department of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 1999, 5-6
- Liu TQ, Yang B, Song XL, *et al.* Detection and quantification of hepatopancreatic parvovirus in penaeid shrimp by real-time PCR assay. J Invertebrate Pathol, 2013, 114(3): 309-312
- Manjanaik B, Umeha KR, Karunasagar I. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in wild shrimp from India by nested polymerase chain reaction (PCR). Dis Aquat Organ, 2005, 63(2-3): 255-259
- Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW. Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. J Virol Methods, 2008, 154(1-2): 56-60
- Pantoja CR, Lightner DV. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2000, 39(3): 177-182
- Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, *et al.* Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2001, 46(2): 153-158
- Paynter JL, Lightner DV, Lester RJG. Prawn virus from juvenile *Penaeus esculentus*. In Second Australian National Prawn Seminar, 1985, 61-64
- Roekring S, Nielsen L, Owens L, *et al.* Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. Virus Res, 2002, 87(1): 79-87
- Safeena MP, Tyagi A, Rai P, *et al.* Complete nucleic acid sequence of *Penaeus monodon* densovirus (PmDENV) from India. Virus Res, 2010, 150(1-2): 1-11
- Spann KM, Adlard RD, Hudson DA, *et al.* Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. Dis Aquat Organ, 1997, 31(3): 239-241
- Subbiah J, Kim NI, Jang IK, *et al.* Development of two quantitative real-time PCR diagnostic kits for HPV isolates from Korea. J Microbiol Biotech, 2012, 22(10): 1350-1358
- Sukhumsirichart W, Attasart P, Boonsaeng V, *et al.* Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. Virol,

- 2006, 346(2): 266–277
- Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, *et al.* Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol Cell Probe*, 2002, 16(6): 409–413
- Sukhumsirichart W, Wongteerasupaya C, Boonsaeng V, *et al.* Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aquat Organ*, 1999, 38(1): 1–10
- Yan DC, Tang KF, Lightner DV. A real-time PCR for the detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *J Fish Dis*, 2010, 33(6): 507–511

(编辑 冯小花)

PCR Detection and Studies on the Prevalence of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV)

LIU Tianqi^{1,2}, YANG Bing², LIU Sun², WAN Xiaoyuan², WANG Xiuhua², HUANG Jie²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is one of major pathogens responsible for shrimp diseases in the world. In recent years HPV disease has been found in coastal shrimp farming areas in China, however data about its prevalence has been unavailable. In this study, we examined shrimp samples at different developmental stages including egg, postlarvae, juvenile, adult and broodstock that were collected from the rearing ponds of seven coastal provinces in China (2011–2013). We detected the HPV in the samples using PCR according to the aquaculture industry standard “Diagnostic protocols for hepatopancreatic parvovirus disease of penaeid shrimp —Part 1: PCR method” (SC/T 7203.1-2007). Our data showed that the primers were specific for HPV, and they had no cross-reaction with other pathogens such as infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), white spot syndrome virus (WSSV), and specific pathogen free (SPF) shrimp DNA. Under the PCR conditions, the primers could detect as little as 0.07 fg purified HPV DNA which contained only 20 copies of HPV. This detection limit was 10-fold lower than that of real-time PCR that was established in our laboratory. Histopathological sectioning of HPV-infected *Fenneropenaeus chinensis* verified the existence of HPV inclusion bodies in the infected tissues. Under the optimized PCR conditions, a single product with the expected size (628 bp) was detected. The positive rates were 18.47% (118 out of 639) for penaeid shrimp, 20.36% for *F. chinensis*, 2.56% for *Litopenaeus vannamei*, and 50% for *Marsupenaeus japonicus*. The positive rates were 9.62% (5 out of 52), 20.28% (100 out of 493) and 100% (8 out of 8) for *F. chinensis* postlarvae, juvenile, and adult respectively. Furthermore, HPV was detected in penaeid shrimp samples at different developmental stages including postlarvae, juveniles and adults. Our study demonstrated that HPV has been prevalent in the farmed penaeid shrimp in China, and provided data about the shrimp disease and its epidemic situation in aquaculture industry. Future studies on the disease will help us understand its geographic distribution and host species, and help evaluate its prevalence.

Key words Penaeid shrimp; Hepatopancreatic parvovirus (HPV); PCR; Detection