

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420003

http://www.yykxjz.cn/

李小平, 万晓媛, 张庆利, 黄捷, 董宣, 王秀华, 邱亮, 宋增磊, 程东远. 2016~2017年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 65-73
Li XP, Wan XY, Zhang QL, Huang J, Dong X, Wang XH, Qiu L, Song ZL, Cheng DY. Molecular epidemiological survey of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustaceans in China in 2016~2017. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 65-73

2016~2017年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查*

李小平^{1,2} 万晓媛¹ 张庆利^{1,2①} 黄捷^{1,2}
董宣¹ 王秀华¹ 邱亮^{1,2} 宋增磊^{1,2} 程东远¹

(1. 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试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村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 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 偷死野田村病毒(CMNV)引起的病毒性偷死病(VCMD)使中国对虾养殖业遭受了严重的经济损失,为查明CMNV及其变异株的分子流行病学特征,本研究采用逆转录套式PCR(RT-nPCR)、逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)和TaqMan实时荧光定量PCR(TaqMan RT-qPCR)3种方法,对2016~2017年中国沿海省市CMNV及一种新型野田村病毒——行动障碍野田村病毒(MDNV)的流行、分布和变异情况进行了分析。结果显示,养殖凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾等种类中均可检测到CMNV阳性;在河北、山东、浙江、福建、广东和海南等省市采集的患病对虾中均存在CMNV。基于RT-nPCR、RT-LAMP和TaqMan RT-qPCR的检测结果显示,2016和2017年样品中CMNV的阳性检出率依次为11.8%和7.8%,6.7%和3.9%,17.7%和12.4%;基于上述3种方法检测结果计算得出,2016和2017年样品中CMNV的阳性检出率分别为26.8%和16.3%;基于RT-LAMP的分析显示,2016年样品中MDNV的阳性检出率为9.4%。本研究表明,中国沿海省市养殖虾类中VCMD的流行和危害仍不容忽视,RNA依赖的RNA聚合酶基因不断变异导致前期基于该基因开发的CMNV检测方法可靠性下降,检出假阴性风险升高;同时,发病对虾中出现了新的野田村病毒株系且具有较高的流行率,其传播危害风险值得高度关注。

关键词 偷死野田村病毒;分子流行病学调查;逆转录套式PCR;逆转录环介导等温扩增;TaqMan实时荧光定量RT-PCR;行动障碍野田村病毒

中图分类号 S945.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)02-0065-09

2002~2003年,中国海南、广西等地池塘高密度养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)出现“偷死”现象,并使当地对虾养殖业受到影响(章秋虎,2004;宋盛宪等,2006;徐志进等,2009)。由于发病对虾主要

* 国家自然科学基金面上项目(31672695)、国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022015003;20603022018008)共同资助[This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672695), National Research and Development Program of China (2017YFC1404503), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022015003;20603022018008)].

李小平, E-mail: 278567196@qq.com

① 通讯作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-05-02

在池底深水区陆续死亡,不容易被养殖者观察到,因此,被称为“偷死病”(Covert mortality disease, CMD)或“死底症”(邢华, 2004; 顾水江, 2012; Zhang *et al.*, 2014)。患病个体表现出肝胰腺颜色变浅、萎缩,空肠空胃,生长缓慢等症状,很多时候还可见病虾腹节肌肉不透明或局部发白。患病对虾在水温较高(28℃以上)时死亡率升高,累计死亡率可达80% (Zhang *et al.*, 2014、2017b)。

研究发现,一种新病毒——偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)是导致养殖对虾发生偷死病的病毒性病原(Zhang *et al.*, 2014)。为了强调该疫病的病原学特征, CMD 又被称为病毒性偷死病(Viral covert mortality disease, VCMD)(Zhang *et al.*, 2017b)。CMNV 可侵染多种甲壳类的肝胰腺和肌肉组织,在肝胰腺小管和淋巴器官上皮细胞,以及肌肉细胞内形成嗜酸性的包涵体,导致肝胰腺小管萎缩及肌肉纤维凝固状坏死(Zhang *et al.*, 2014、2017b)。Liu 等(2018)通过人工感染脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)开展了 CMNV 垂直传播途径研究,结果证实,CMNV 能通过染病亲体的雌性或雄性生殖细胞传递至子代,实现从亲代到子代的垂直传播。Liu 等(2018)研究发现,CMNV 可感染虾类养殖池塘中的多种共生生物。

2013~2015年,在中国沿海地区11省市开展的CMNV 流行病学调查显示,采集自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西和海南的发病虾类样品中均有CMNV 阳性检出,其中,采自广东和海南的样品中的CMNV 检出率最高,达52.6%和50.8%,采自辽宁、天津的样品中CMNV 检出率最低,为10%和9.9%;CMNV 的检出率基本呈现华南高于华东和华北的趋势(Zhang *et al.*, 2017b)。凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等中国主要养殖虾类中均可检测到CMNV 阳性,其中,日本囊对虾中CMNV 检出率为60%,罗氏沼虾和中国明对虾检出率较低,分别为24%和22%(Zhang *et al.*, 2017b)。

2015年作者实验室在来自厄瓜多尔和越南等地的发病养殖对虾样品中检出CMNV 阳性,2017年在采集自马来西亚的对虾样品中检测到CMNV 阳性。2016年,泰国2个实验室分别报道了当地发病凡纳滨对虾中存在CMNV 高感染率的案例,利用RT-nPCR 和荧光定量方法分析发现,CMNV 的阳性检出率分别为30.4%和37.7% (Thitamadee *et al.*, 2016; Pooljun *et al.*, 2016)。上述研究中,CMNV 的高流行

率和广泛分布特征,揭示了CMNV 具有在全球主要对虾养殖国家传播流行的较高风险。

在开展VCMD 流行病学调查中发现,一些发病对虾中不存在CMNV 原始株(河北株)的感染,但存在一种疑似CMNV 变异株系的新型野田村病毒的感染,这种新型野田村病毒RNA 依赖的RNA 聚合酶基因(*RdRp*)序列与CMNV 原始株相比存在较大程度的变异,其与CMNV 原始株*RdRp* 基因片段的相似性仅为78%,患病对虾表现出游泳性能下降、沉底的特点。由于这些样品中病原与CMNV 原始分离株在核酸水平上差异明显,为了将其与CMNV 原始株系区分开来,暂将其命名为“行动障碍野田村病毒(Movement disorder nodavirus, MDNV)”。

为更深入地了解2016~2017年间CMNV 及新型野田村病毒——MDNV 在中国主要虾类养殖地区的流行情况,本研究采用逆转录套式PCR (RT-nPCR) (Zhang *et al.*, 2014)、逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)(Zhang *et al.*, 2017a)和TaqMan 实时荧光定量RT-PCR(TaqMan RT-qPCR) 3种方法对2016~2017年采集自中国沿海省市虾类样品中CMNV 和MDNV 的流行情况进行了系统分析,以期阐明最近2年CMNV 和MDNV 在沿海各省市主要虾类养殖种类中的流行和分布情况,了解新发野田村病毒对养殖虾类的危害风险。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

2016年从河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等地共采集254份虾类样品,包括凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾、脊尾白虾、罗氏沼虾和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)。2017年从河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建和广东等地共采集387份虾类样品,种类包括凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾、脊尾白虾和罗氏沼虾。2016~2017年所采集样品的信息见表1和表2。所采集虾类样品的肝胰腺和肌肉等组织保存于95%乙醇溶液中备用。

1.2 RNA 提取和纯化

将保存在95%乙醇溶液中的对虾组织取出,先用无RNA 酶H₂O 清洗1遍,吸水纸吸去多余水分,然后采用RNAiso plus(TaKaRa)法抽提对虾总RNA,最后通过Nanodrop 2000(Thermo Scientific, 美国)测量所制备RNA 的浓度和纯度。

表 1 样品采集省市及数量信息

Tab.1 Sampling sites and the amount of samples

省/市 Province/City		数量 Amount	
		2016	2017
河北	Hebei	56	98
河南	Henan	2	/
山东	Shandong	98	76
江苏	Jiangsu	11	2
上海	Shanghai	1	2
浙江	Zhejiang	31	105
福建	Fujian	40	21
广东	Guangdong	10	24
海南	Hainan	5	63
总计	Total	254	387

“/”表示无样品,下同

“/” indicated no sample, the same as below

表 2 样品种类及数量信息

Tab.2 The information of sampling species and amount of samples

对虾种类 Shrimp species		数量 Amount	
		2016	2017
凡纳滨对虾	<i>L. vannamei</i>	193	362
中国明对虾	<i>F. chinensis</i>	16	5
日本囊对虾	<i>M. japonicus</i>	23	9
斑节对虾	<i>P. monodon</i>	3	6
罗氏沼虾	<i>M. rosenbergii</i>	17	/
日本沼虾	<i>M. nipponense</i>	1	5
脊尾白虾	<i>E. carinicauda</i>	1	/
总计	Total	254	387

表 3 CMNV RT-nPCR 所用引物序列

Tab.3 Primers for CMNV RT-nPCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'~3')	扩增片段长度 Length of amplicons	引物位置 Position of primer
Noda-F1	AAATACGGCGATGACG	619 bp	232~247
Noda-R1	ACGAAGTGCCCACAGAC		834~850
Noda-F3	CACAACCGAGTCAAACC	165 bp	256~272
Noda-R3	GCGTAAACAGCGAAGG		405~420

注:“引物位置”是指引物在 CMNV *RdRp* 基因(GenBank 登录号: KM112247)片段上的起始和终止碱基位置。下同

Note: Position of primer indicates the position of the starting and ending nucleotide base of the primer in the CMNV *RdRp* gene (GenBank accession number: KM112247) sequence. The same as below

1.4 利用 RT-LAMP 方法检测样品中 CMNV 和 MDNV

根据 Zhang 等(2017a)建立的 RT-LAMP 方法对样品进行检测,引物序列见表 5,按照表 6 配制反应体系。反应体系在实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)中 63°C 孵育 60 min; 然后根据扩增曲线有无判断样品是否为 CMNV 阳性。除引物不同外,MDNV 的 RT-LAMP 方法与 CMNV 的 RT-LAMP 方法相同。

1.3 利用 RT-nPCR 方法检测样品中 CMNV

根据 Zhang 等(2014)报道的 RT-nPCR 方法,通过逆转录和套式 PCR 方法检测 CMNV 靶基因片段。具体步骤如下:

(1) 逆转录过程

首先,配制逆转录引物预混液体系,每个反应管中含 4 μ l 无 RNA 酶 H₂O、1 μ l 引物 Noda-R1(10 μ mol/L)、1 μ l 待测 RNA 样品(浓度在 10 ng/ μ l~1 μ g/ μ l),70°C 预变性 10 min 后,立即放入冰浴中冷却 2 min。

其次,配制逆转录酶预混物:2 μ l 5 \times M-MLV 逆转录酶缓冲液、0.5 μ l dNTP(10 mmol/L)、0.25 μ l RNase 抑制剂(40 U/ μ l)、0.5 μ l M-MLV 逆转录酶(200 U/ μ l),无 RNA 酶 H₂O 补至 4 μ l,混匀。42°C 反应 1 h,70°C 变性 10 min 后,可获得 cDNA 模板。

(2) 套式 PCR 反应

引物序列及扩增片段信息参见表 3,参照表 4 配制套式 PCR 反应体系。RT-nPCR 第 1 轮 PCR 扩增程序:94°C 变性 3 min;94°C 20 s、50°C 20 s、72°C 40 s,30 个循环;72°C 延伸 7 min。第 2 轮 PCR 扩增程序:94°C 变性 3 min;94°C 20 s、50°C 20 s、72°C 30 s,30 个循环;72°C 延伸 7 min。电泳检测第 1、2 轮 PCR 产物,若被检样品第 1 轮出现 619 bp、第 2 轮出现 165 bp 扩增带为 CMNV 强阳性,如只在第 2 轮出现 165 bp 扩增带则为弱阳性;否则为阴性。

1.5 利用 TaqMan RT-qPCR 方法检测样品中 CMNV

参照常见病毒的荧光定量方法(刘珍等,2016; Pooljun *et al*, 2016; 刘宝彬等, 2017),采用 One Step PrimeScriptTM RT-PCR (Perfect real time)试剂盒 (TaKaRa)及表 7 中的引物和探针进行 TaqMan RT-qPCR,检测样品中的 CMNV。

反应体系为 25 μ l,各组分及用量如下:2 \times One

表4 CMNV RT-nPCR 的反应体系
Tab.4 Amounts of each ingredients used in the CMNV RT-nPCR

第1轮 PCR 扩增体系 Mixture for the first-step PCR		第2轮 PCR 扩增体系 Mixture for the second-step PCR	
组份 Ingredient	体积 Volume(μ l)	组份 Ingredient	体积 Volume(μ l)
10×Ex <i>Taq</i> Buffer	2.5	10×Ex <i>Taq</i> Buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2	MgCl ₂ (25 mmol/L)	2
dNTP(2.5 mmol/L each)	2	dNTP(2.5 mmol/L each)	2
Noda-F1(10 μ mol/L)	1	Noda-F3(10 μ mol/L)	1
Noda-R1(10 μ mol/L)	1	Noda-R3(10 μ mol/L)	1
<i>Ex Taq</i> (5 U/ μ l)	0.1	<i>Ex Taq</i> (5 U/ μ l)	0.1
ddH ₂ O	15.4	ddH ₂ O	15.4
cDNA	1	第1轮 PCR 产物	1
总体积 Total	25	总体积 Total	25

表5 CMNV 和 MDNV RT-LAMP 引物序列
Tab.5 Primer sequences of CMNV and MDNV RT-LAMP

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence	引物位置 Position of primer
CMNV-F3	TGCCAAGCAAATACGAGCT	971~988
CMNV-B3	CATCAGCGATGTCACGGC	1145~1162
CMNV-FIP	GTCGTCGACGGTTAGGTTGCGTTTTCCAAGCACTTCCCGACAA	1041~1061, 995~1014
CMNV-BIP	CGTCCAAAAGGACCTCCGCATTTTTGGAGACCTTGGTCACGC	1122~1139, 1069~1090
CMNV-LF	GCTCACGGCTTTGGATAACC	1015~1034
CMNV-LB	GATTGCATGCGTCAACCTCA	1098~1116
MDNV-F3	CAGACGCTTGCTGTGACC	105~122
MDNV-B3	TATCGGCGGCGTTTTGAG	291~308
MDNV-FIP	ATCGCAACATTGCACGGCAATTTTTCGAAGGTTATCTCGCTACGG	127~146, 174~194
MDNV-BIP	CTGCTGGAACCGCGCTAGAATTTTGAACCATCTGCAGTCAACC	267~286, 207~226
MDNV-LF	TCTCCAACCAATGGTGTTAGAGAAT	147~171
MDNV-LB	CCAGACGGAAGACGTACATGACT	231~253

表6 CMNV 和 MDNV RT-LAMP 反应体系
Tab.6 Amounts of each ingredients used in the CMNV and MDNV RT-LAMP

组分 Ingredient	加样量 Amount(μ l)	终浓度 Final concentration
1×Isothermal amplification buffer	2.5	
MgSO ₄ (100 mmol/L)	1	4 mmol/L
Betaine(5 mol/L)	6	1.2 mol/L
dNTPs(20 mmol/L)	1.5	1.2 mmol/L
FIP(20 μ mol/L)	2	1.6 μ mol/L
BIP(20 μ mol/L)	2	1.6 μ mol/L
F3(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
B3(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
LF(20 μ mol/L)	1	0.8 μ mol/L
LF(20 μ mol/L)	1	0.8 μ mol/L
MLV 逆转录酶(200 U/ μ l)	0.2	40 U
<i>Bst</i> 2.0 WarmStart [®] DNA Polymerase(8 U/ μ l)	0.8	6.4 U
Eva Green(25 μ mol/L)	0.8	0.8 μ mol/L
RNase-free H ₂ O	4.2	
RNA	1	

表 7 CMNV TaqMan RT-qPCR 方法所用引物序列
Tab.7 Primer sequences of CMNV TaqMan RT-qPCR

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence	引物位置 Position of primer
CMNV-TAQ-F2	CGAGCTAATCCAAGCACTTC	886~905
CMNV-TAQ-R1	ACCTGTTAGGTACGCTACCA	1063~1084
CMNV-TAQ-P	FAM-CGCTCACGGCTTTGGAT ACCTT-TAMRA	911~932

Step RT-PCR Buffer III 12.5 μ l, Ex *Taq* HS 0.4 μ l, Prime Script RT enzyme Mix II 0.4 μ l, 引物 CMNV-TAQ-R1 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, CMNV-TAQ-F2 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, 探针 CMNV-TAQ-P1(10 μ mol/L) 0.5 μ l, CMNV 阳性模板 1 μ l, 其余用无 RNA 酶 H₂O 补足。在冰上配置反应体系。

利用 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 仪进行 TaqMan RT-qPCR 扩增, 反应程序: 50.8 $^{\circ}$ C 保温 15 min 进行逆转录; 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 52.7 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。

1.6 样品阳性检出率计算

每种方法检出 CMNV/MDNV 阳性的样品数除以利用该方法检测的总样品数, 并以百分比表示, 即为基于该方法的 CMNV/MDNV 阳性检出率; 将呈现 RT-nPCR 或 RT-LAMP 或 TaqMan RT-qPCR 任一种检测方法 CMNV 阳性的样品数目相加(对于呈现 2 种或 2 种方法以上阳性的样品只计算 1 次), 除以总样品数, 并以百分比表示, 即为 CMNV 的总阳性检出率(CMVN_Total)。

2 结果

2.1 CMNV 在不同虾类中的阳性率分析

采用 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法分别对 2016 年所采集的 254 份和 2017 年所采集的 387 份样品进行检测分析, 结果发现, 采用不同方法检测所得到的 CMNV 阳性率并不相同(图 1)。RT-nPCR 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾样品中可检测到 CMNV, 其阳性检出率分别为 8.0%(44/553)、9.5%(2/21)和 46.0%(17/37)。RT-LAMP 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾样品中可以检测到 CMNV, 其阳性检出率分别为 3.8%(21/553)、4.8%(1/21)、16.2%(6/37)、22.2%(2/9)和 5.9%(1/17)。TaqMan RT-qPCR 检测结果显示, 凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾样品中可以检测到 CMNV, CMNV 的阳性检出率分别为 10.3%(57/553)、57.1%(12/21)和 67.6%

(25/37)。上述 3 种方法均能检出 CMNV 阳性的对虾种类为凡纳滨对虾、中国明对虾和日本囊对虾。

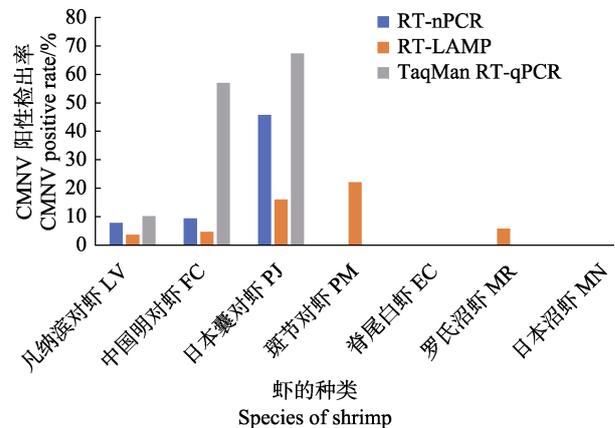


图 1 基于 3 种方法分析 2016~2017 年不同虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.1 CMNV positive rate in different shrimp samples based on three detecting methods

L. vannamei, *F. chinensis*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* and *M. nipponense* were skeletonized as LV, FC, PJ, PM, MR, and MN in the figure, respectively

2.2 CMNV 和 MDNV 的年度阳性检出率分析

对 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法的检测结果按照采样年份分析(图 2)。RT-nPCR 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 11.8%(30/254)和 7.8%(30/387)。RT-LAMP 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 6.7%(17/254)和 3.9%(15/387)。TaqMan RT-qPCR 的检测结果显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 17.7%(45/254)和 12.4%(48/387)。基于上述 3 种方法检测结果计算得出, 2016、2017 年样品中 CMNV 总阳性检出率

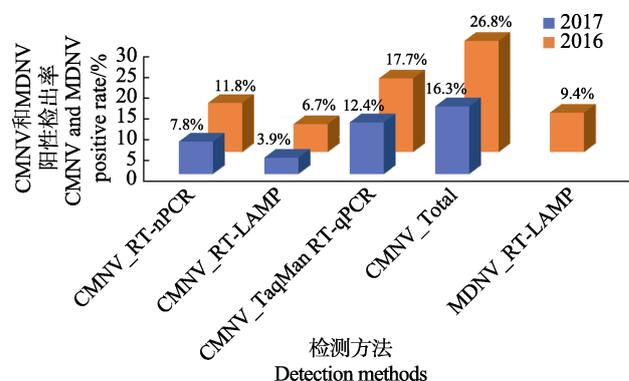


图 2 基于 3 种方法分析 2016、2017 年虾类样品中 CMNV 和 MDNV 的阳性检出率

Fig.2 CMNV and MDNV positive rates in shrimp samples collected in 2016 and 2017 based on three detecting methods

分别为 26.8%(68/254)和 16.3%(63/387)。此外,MDNV 的 RT-LAMP 检测结果显示,2016 年样品中 MDNV 的阳性检出率为 9.4%(24/254)。

2.3 2016、2017 年度 CMNV 的流行区域分析

对 RT-nPCR、RT-LAMP 和 Taqman RT-qPCR 3 种方法的检测结果,按照采样年份和区域分析,结果如图 3 和图 4 所示。2016 年度的 254 份样品来自河北、河南、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等省市,其中,RT-nPCR 检测显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 19.7%(11/56),山东为 19.4%(19/98);RT-LAMP 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 5.4%(3/56),山东为 7.1%(7/98),浙江为 3.2%(1/31),福建为 15.0%(6/40);TaqMan RT-qPCR 检

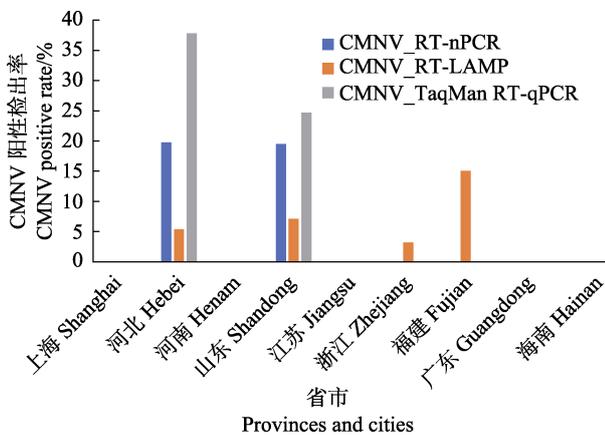


图 3 基于 3 种方法分析 2016 年不同省市虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.3 CMNV positive rate in shrimp samples collected from different provinces and cities in 2016 based on three detecting methods

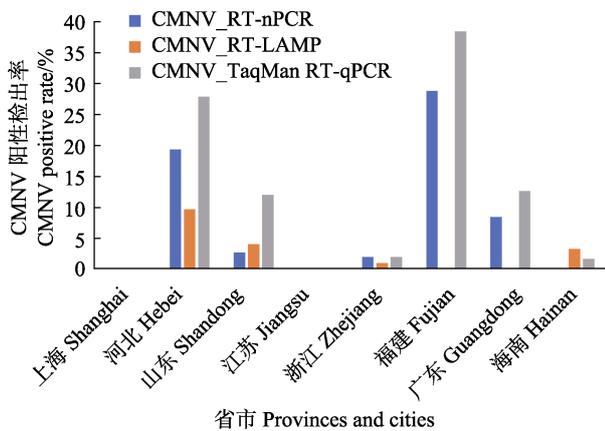


图 4 基于 3 种方法分析 2017 年不同省份虾类样品中 CMNV 的阳性检出率

Fig.4 CMNV positive rate in shrimp samples collected from different provinces and cities in 2017 based on three detecting methods

测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 37.5%(21/56),山东为 24.5%(24/98)。

2017 年的 387 份样品来自河北、山东、江苏、上海、浙江、福建、广东和海南等省市。其中,RT-nPCR 检测显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 19.2%(18/94),山东为 2.6%(2/76),浙江为 1.9%(2/105),福建为 28.6%(6/21),广东为 8.3%(2/24);RT-LAMP 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 9.6%(9/94),山东为 4.0%(3/76),浙江为 1.0%(1/105),海南为 3.2%(2/63);TaqMan RT-qPCR 检测结果显示,不同省市样品中 CMNV 阳性检出率如下:河北为 27.7%(26/94),山东为 11.8%(9/76),浙江为 1.9%(2/105),福建为 38.1%(8/21),广东为 12.5%(3/24),海南为 1.6%(1/63)。

3 讨论

过去几年,VCMD 的广泛发生与流行使中国养殖对虾产业遭受了严重的经济损失(Zhang *et al*, 2014、2017b)。为了更深入地了解这种新发疫病的流行病学特征,2013~2015 年本实验室针对中国沿海省市的主要对虾养殖地区开展了 CMNV 的流行病学调查发现,沿海各省市虾类样品中均有 CMNV 流行和感染;患病种类涉及中国养殖甲壳动物主要经济种类,如凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾;患病个体大都表现出肝胰腺颜色变浅,甲壳变软,生长缓慢等 VCMD 的典型症状;组织病理学分析揭示,患病凡纳滨对虾、日本囊对虾和斑节对虾等腹节肌肉均呈现溶解样坏死;超微结构病理学分析显示,患病个体的肌肉、肝胰腺中均可见大量 CMNV 样病毒颗粒,另外,患病凡纳滨对虾体内包被肝胰腺的海绵状结缔组织鞘(Tunica propria, 为结缔组织)也是病毒的富集区域。基于 RT-LAMP 检测的分析结果显示,2013~2015 年中国沿海养殖虾类中 CMNV 的流行率分别为 45.9%(130/283)、27.9%(84/301)和 20.9%(54/259)。总体来看,CMNV 呈现出流行范围广、宿主种类多和流行率高的特点(Zhang *et al*, 2017b)。

本研究参照朱罗罗等(2016)分子流行病学调查方法,针对 2016~2017 年采自中国沿海省市的 641 份虾类样品的分析结果显示,沿海大部分省市的养殖虾类样品中均有 CMNV 的阳性检出,表明 CMNV 仍在中国主要对虾养殖地区流行。忽略检测样本数量最少的 3 个省市(上海、河南和江苏),其他 6 个省(河北、山东、浙江、福建、广东和海南)养殖虾类样品中

CMNV 检出率差异很大, 为 1.6%~38.1%不等。研究结果也显示, CMNV 在凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、斑节对虾和罗氏沼虾等养殖甲壳类中普遍存在, 在日本囊对虾、斑节对虾和中国明对虾中检出率均较高。

为了考察 CMNV 不同分子生物学分析方法的可靠性和适用范围, 本研究采用 CMNV 的 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 3 种方法对所采集的样品进行了检测分析。结果显示, 不同检测方法所得出的 CMNV 阳性检出率差异很大, 如基于 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 方法, 641 份样品中 CMNV 的阳性率分别为 9.4%(60/641)、5.0%(32/641) 和 14.5%(93/641)。造成差异的原因可能是检测方法的灵敏度不同; 但前期研究表明, CMNV 的 RT-LAMP 检测方法的灵敏度高于 RT-nPCR 检测方法, 而同一批样品基于 RT-LAMP 的 CMNV 检出率反而低于基于 RT-nPCR 的 CMNV 检出率。进一步分析检测结果发现, 经 RT-nPCR 检测呈现 CMNV 阴性的样品中, 部分为 RT-LAMP 检测的 CMNV 阳性; 经 RT-LAMP 检测呈现 CMNV 阴性的样品中, 部分为 TaqMan RT-qPCR 检测的 CMNV 阳性; 经 TaqMan RT-qPCR 检测呈现 CMNV 阴性的样品中, 部分为 RT-LAMP 和 RT-nPCR 检测的 CMNV 阳性。该结果说明, 利用上述任意一种方法对 CMNV 样品进行检测时, 均存在假阴性的结果; 造成这种现象可能与所采集样品中 CMNV 靶基因序列发生了不同变异有关。

前期基于 CMNV 的 RT-LAMP 检测方法对 2013~2015 年中国沿海 11 省市养殖虾类样品的检测结果显示, CMNV 的阳性检出率从 2013 年的 45.9%(130/283) 下降到 2014 年的 27.9%(84/301) 和 2015 年的 20.9%(54/259)(Zhang *et al.*, 2017b); 本研究基于 RT-LAMP 检测方法的分析结果也显示, 2016、2017 年样品中 CMNV 阳性检出率分别为 6.7%(17/254) 和 3.9%(15/387); 该结果似乎说明, CMNV 在中国沿海省市养殖对虾中的流行率在不断下降。而 2013~2017 年在沿海省市的实际走访和调查中发现, 主要虾类养殖地区 VCMD 的发病案例并未明显减少。考虑到 CMNV 作为一种单链 RNA 病毒, 其 RNA 依赖的 RNA 聚合酶在进行基因组复制时缺乏 5'~3'校正功能, 会导致病毒出现较快变异。对 CMNV 变异情况进行持续跟踪分析发现, 一些发病对虾中不存在 CMNV 原始株(河北株)的感染, 但存在一种类似 CMNV 变异株系的新型野田村病毒的感染, 为了与 CMNV 原始株系进行区分, 将这种类似 CMNV 变异株的新型野田村病毒暂时命名为 MDNV。在研究中也发现, 采用目前

CMNV 的 RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 检测方法, 无法扩增 MDNV 的 *RdRp* 基因; 此前, Zhang 等(2014)报道的 CMNV RT-nPCR 方法也存在缺陷, 无法检测 CMNV 的部分变异株系。基于 RT-nPCR、RT-LAMP 和 TaqMan RT-qPCR 方法对 2016、2017 年样品的分析中, CMNV 阳性检出率有差异, 以及基于 RT-LAMP 分析方法显示, 2013~2017 年中国沿海省市养殖对虾中 CMNV 流行率下降, 应主要是由于上述 3 种方法均是基于 CMNV 原始株系的 *RdRp* 基因开发, 而这 3 种方法所用引物的高特异性无法适应 CMNV 变异株而导致的。

基于上述 3 种方法的检测结果计算得出, 2016 年样品中 CMNV 总阳性检出率为 26.8%(68/254), 而 CMNV 变异株系(MDNV)的阳性检出率为 9.4%(24/254), 考虑到 MDNV 变异幅度较大导致 CMNV 上述 3 种检测方法与 MDNV 无交叉反应, 以及 MDNV 检测方法与 CMNV 原始株系亦无交叉反应, 而 2015 年样品中尚未检测到 MDNV 株系(数据未包括在本研究中), 2016 年沿海省市池塘养殖虾类中 CMNV 和 MDNV 两种新发野田村病毒的阳性检出率合计达 36.2%(92/254)。由此来看, 中国养殖虾类中新发野田村病毒的流行率并没有明显降低, 只是流行株系发生了较大变化。

综上所述, 2013~2017 年针对中国沿海省市养殖虾类的流行病学调查和分子流行病学分析结果表明, CMNV 作为一种新发病毒, 其流行范围广、宿主种类多、流行率高, 并且主要特征性基因出现了明显变异, 该病毒在虾类养殖业中的危害应引起足够重视。

致谢: 中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室同事和研究生协助取样, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- Gu SJ. Analysis of causes of the covert mortality disease of Pacific white shrimp and its control strategies. *Scientific Fish Farming*, 2012(8): 62-63 [顾水江. 南美白对虾偷死病发病原因分析及防治对策. *科学养鱼*, 2012(8): 62-63]
- Liu BB, Yang B, Lü XW, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by real-time PCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 158-166 [刘宝彬, 杨冰, 吕秀旺, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧

- 光定量 PCR 检测. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 158–166]
- Liu S, Li JT, Tian Y, *et al.* Experimental vertical transmission of covert mortality nodavirus in *Exopalaemon carinicauda*. Journal of General Virology, 2017, 98(4): 652–661
- Liu S, Wang XH, Xu TT, *et al.* Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV). Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 154: 29–36
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 119–126]
- Pooljun C, Direkbusarakom S, Chotipuntu P, *et al.* Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for detection of covert mortality nodavirus (CMNV) in penaeid shrimp. Aquaculture, 2016, 464: 445–450
- Song SX, Zhuang SP. Measures for control of “bottom death” of Pacific white shrimp. Fish Science and Technology, 2006(6): 36–38 [宋盛宪, 庄世鹏. 防治南美白对虾“底死症”的措施. 水产科技, 2006(6): 36–38]
- Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture, 2016(452): 69–87
- Xing H. Discussion of the control measures for the “bottom death” (covert mortality disease) of Pacific white shrimp. China Fisheries, 2004(4): 88–89 [邢华. 南美白对虾“死底症”(偷死病)的控制措施探讨. 中国水产, 2004(4): 88–89]
- Xu ZJ, Ji F. Comprehensive control of the covert mortality disease of Pacific white shrimp. Fishery Guide to be Rich, 2009(1): 60–61 [徐志进, 纪富. 南美白对虾偷死病的综合防治. 渔业致富指南, 2009(1): 60–61]
- Zhang QH. To be cautious of “bottom death” in the intensive farming of Pacific white shrimp. Scientific Fish Farming, 2004(10): 48–49 [章秋虎. 南美白对虾高密度养殖谨防“死底症”. 科学养鱼, 2004(10): 48–49]
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. Journal of General Virology, 2014, 95(12): 2700–2709
- Zhang QL, Liu S, Yang HL, *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of covert mortality nodavirus in shrimp. Journal of Invertebrate Pathology, 2017a, 150: 130–135
- Zhang QL, Xu TT, Wan XY, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. Virus Research, 2017b, 233(2): 113–119
- Zhu LL, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Molecular epidemiology of a new yellow head virus strain in China. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 68–77 [朱罗罗, 张庆利, 万晓媛, 等. 我国一株新型黄头病毒的分子流行病学. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 68–77]

(编辑 马瑾艳)

Molecular Epidemiological Survey of Covert Mortality Nodavirus (CMNV) in Cultured Crustaceans in China in 2016~2017

LI Xiaoping^{1,2}, WAN Xiaoyuan¹, ZHANG Qingli^{1,2①}, HUANG Jie^{1,2}, DONG Xuan¹,
WANG Xiuhua¹, QIU Liang^{1,2}, SONG Zenglei^{1,2}, CHENG Dongyuan¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Covert mortality nodavirus (CMNV), a recently emerged RNA virus, is the pathogen responsible for viral covert mortality disease, which has caused serious losses of shrimp aquaculture in China in recent years. In order to determine the transmission, prevalence, and evolution of CMNV in the coastal provinces and cities in China, national wide survey of the molecular epidemiology of the CMNV and its variants was conducted, based on analysis of shrimp samples collected from 2016 and 2017 by using the methods of RT-nPCR, RT-LAMP, and TaqMan RT-qPCR in present study. The analyses found the presence of CMNV-positive specimens in the major species of cultured crustaceans, including *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, and *Macrobrachium rosenbergii*. CMNV-positive specimens appeared in almost all the coastal provinces, such as Hebei, Shandong, Zhejiang, Fujian, Guangdong, and Hainan. The results based on RT-nPCR assays showed that the prevalence rates of CMNV among the collected samples were 11.8% (30/254) and 7.8% (30/387) in 2016 and 2017, respectively. The results based on RT-LAMP assays showed that the prevalence rates of CMNV were 6.7% (17/254) and 3.9% (15/387) in 2016 and 2017, respectively. The results based on TaqMan RT-qPCR assays showed that the prevalence rates of CMNV were 17.7% (45/254) and 12.4% (48/387) in 2016 and 2017, respectively. The total prevalence rates of CMNV were 26.8% (68/254) and 16.3% (63/387) in 2016 and 2017, respectively, based on the above mentioned three methods. The results based on RT-LAMP assays showed that the prevalence rate of MDNV was 9.4% (24/254) in 2016. The high prevalence of CMNV in the major shrimp species and in the main farming areas revealed that this virus still threatened shrimp aquaculture in China during 2016~2017. Moreover, mutation of the RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene of CMNV will raise the risk of appearing of false-negative result in CMNV molecular tests, which is of great concern. Meanwhile, the high prevalence rates of the emerging CMNV variant, MDNV, is a reminder that close attention needs to be paid to the high risk of MDNV transmission widely in farmed crustaceans.

Key words Covert mortality nodavirus (CMNV); Molecular epidemiological survey; RT-nPCR; RT-LAMP; TaqMan RT-qPCR; Movement disorder nodavirus (MDNV)

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn