

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420006

http://www.yykxjz.cn/

王崇, 王秀华, 刘爽, 桑松文, 张庆利. 鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒(CMNV)的初步研究. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 25-32

Wang C, Wang XH, Liu S, Sang SW, Zhang QL. Preliminary study on the natural infection of *Carassius auratus* with covert mortality nodavirus (CMNV). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 25-32

鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒 (CMNV)的初步研究*

王崇^{1,2} 王秀华^{1,2} 刘爽^{1,2} 桑松文^{1,2} 张庆利^{1,2①}

(1. 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
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾病毒性偷死病(Viral covert mortality disease, VCMD)是由偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)引起的一种新发疫病,近年来使中国对虾养殖业遭受了严重的经济损失。为筛查对虾池塘养殖系统中CMNV的自然宿主种类,本研究在山东潍坊一个发生VCMD的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场排水渠中采集了野生鲫鱼(*Carassius auratus*)样品,对其携带和感染CMNV的情况进行了系统分析。逆转录套式PCR检测结果显示,鲫鱼样品的总RNA能扩增出与预期大小一致的CMNV RNA依赖的RNA聚合酶目标基因片段。组织病理和原位杂交分析显示,鲫鱼脑部神经组织空泡化严重,脑皮层锥体细胞和二叠体颗粒细胞核固缩明显,心肌呈现典型的溶解样坏死病理变化,脑和心肌组织的病变部位均可见淡紫色CMNV探针杂交信号。透射电子显微镜观测显示,鲫鱼脑中可见神经组织空泡化,心肌组织坏死严重,CMNV样病毒颗粒占据了心肌细胞内大部分区域。本研究表明,CMNV在自然条件下能够跨越物种障碍、感染对虾养殖池塘排水渠中的野生鲫鱼,并导致靶组织明显的病理损伤,同时也提示,CMNV感染其他鱼类尤其是淡水鱼类的风险值得高度关注。

关键词 病毒性偷死病(VCMD); 偷死野田村病毒(CMNV); 自然感染; 宿主跳跃; 鲫鱼

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0025-08

对虾偷死病(Covert mortality disease, CMD)是近年来严重危害中国对虾养殖业的一种新发疫病(章秋虎, 2004; 邢华, 2004; 徐志进等, 2009; Zhang *et al*, 2014)。2003年或更早的时候,海南、广西等地高密度池塘养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)

出现“偷死”现象,2008~2009年该病在中国南方多省市的养殖凡纳滨对虾中大规模暴发,2010年后开始传播到山东、河北和天津等地(Zhang *et al*, 2017)。发病对虾主要在池底深水区陆续死亡,不容易被观察到,因此,被称为“偷死病”或“死底症”(邢华, 2004;

*国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)、国家自然科学基金面上项目(31672695)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)共同资助[This work was supported by the National R&D Program of China (2017YFC1404503), National Natural Science Foundation of China (31672695), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022015003)]. 王崇, E-mail: 1834142471@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

徐志进等, 2009; 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)。

Zhang 等(2014)研究证实, CMD 是由“偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)”引起的一种病毒性疾病。为了说明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)。CMNV 属于野田村病毒科 α 野田村病毒属(Nodaviridae, *Alphanodavirus*), 是一种单链 RNA 病毒, 病毒粒子为球形(二十面体), 无囊膜, 蔗糖密度梯度离心纯化的病毒粒子直径约为 32 nm。CMNV 主要感染养殖虾类, 目前尚未见有感染鱼类的报道。

对 2013~2015 年间在中国沿海 11 省市 145 个采样点收集的发病虾类样品开展的分子流行病学研究显示, 养殖凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中均可检测到 CMNV 阳性, 其中, 日本对虾的 CMNV 阳性检出率高达 60%, 中国明对虾和罗氏沼虾的检出率较低, 分别为 22%和 24%; 2013、2014 和 2015 年样品的 CMNV 阳性检出率分别为 45.9%、27.9%和 20.9%; 来自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西和海南的虾类样品均可检测到 CMNV 阳性, 其中, 以广东和海南的检出率最高, 达 52.6%和 50.8%, 而辽宁、天津等地的检出率最低, 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.*, 2017)。2015 年, 本实验室在来自越南、厄瓜多尔和墨西哥的发病养殖对虾样品中检出 CMNV。2016 年, Thitamadee 等(2016)利用套式 RT-PCR 检测技术在泰国当地发病对虾中检测到 CMNV, 且检出率很高; Pooljun 等(2016)研究发现, 泰国南部养殖池塘凡纳滨对虾中疑似 VCMD 个体的 CMNV 阳性检出率分别为 30.4%和 37.7%。CMNV 在全球主要对虾养殖地区传播的风险已经引起广泛关注。

2017 年 8 月山东潍坊一个养殖场的凡纳滨对虾疑似 VCMD, 本实验室在该养殖场的池塘内采集了发病对虾和浮游动物样品, 同时也对养殖场排水渠中野生的鲫鱼(*Carassius auratus*)等样品进行了采集和固定保存。分子生物学分析结果显示, 患病对虾、养殖池塘共生生物和鲫鱼样品均呈现 CMNV 阳性。

本研究采用逆转录套式 PCR(RT-nPCR)、组织病理学、组织原位杂交和透射电子显微镜(TEM)技术, 分析了鲫鱼脑和心肌组织中 CMNV 的存在、感染情

况以及 CMNV 感染鲫鱼所导致的病理变化, 以期从不同角度确认该鲫鱼是否被 CMNV 所感染, 是否为 CMNV 的新宿主。

1 材料与方法

1.1 样品采集

鲫鱼样品采集于山东潍坊一养殖场的排水渠中, 体长为 8~10 cm, 取每尾个体的脑和心肌组织, 将组织样品切分为 1 式 3 份, 分别固定于 RNA Later 固定液(天根)、4%多聚甲醛固定液[配制方法参见 Chen 等(2014)]和戊二醛固定液[配制方法参见 Graham 等(2007)]中, 用于后续分子生物学、组织学和超微结构分析。保存在 4%多聚甲醛中的样品固定 24 h 后, 转移到 70%乙醇中贮存。

1.2 组织总 RNA 提取

将 30 mg 鲫鱼心肌及脑组织置于 500 μ l TRIzol 中, 用电动匀浆器将其快速破碎匀浆, 然后, 按照 RNA 快速提取试剂盒(百泰克)说明书, 提取组织样品的总 RNA, 最后, 用超微量分光光度计 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国)测定所制备 RNA 的浓度和纯度。

1.3 逆转录套式 PCR(RT-nPCR)检测

取 1 μ l (100 ng/ μ l)鲫鱼组织总 RNA, 加入 1 μ l 10 mmol/L 的 Noda-R1 引物[引物序列参见 Zhang 等(2014)]和 4 μ l 无 RNA 酶水后, 混匀, 70℃预变性 5 min, 冰浴 2 min, 然后, 依次加入 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 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ l)、0.5 μ l M-MLV 逆转录酶(200 U/ μ l)和 0.75 μ l 无 RNA 酶水后, 混匀, 42℃逆转录 1 h, 70℃变性 5 min, 即获得 cDNA 模板。

按照 Zhang 等(2014)报道的方法进行 RT-nPCR 的第一轮扩增反应; RT-nPCR 的第二步 PCR 采用 TaKaRa Premix TaqTM (Ex TaqTM 2.0)进行, 25 μ l 反应体系: 12.5 μ l 预混合 Taq, 1 μ l 正向引物(Noda-F1: 5'-AAATACGGCGATGACG-3', 10 μ mol/L), 1 μ l 反向引物(Noda-R2: 5'-GGCGGTGAGATGGATTTT-3', 10 μ mol/L), 1 μ l 第一步 RT-PCR 产物和 9.5 μ l ddH₂O。第二步 PCR 的反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s 和 72℃延伸 50 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min。通过第二步 PCR 扩增, 可得到 CMNV 中依赖 RNA 的 RNA 聚合酶基因(*RdRp*) (GenBank 登录号 KM112247)中长度为 207 bp 的扩增产物。RT-nPCR 检测过程中, 同时对阳性对照、阴性

对照 RNA 进行逆转录和第一轮及第二轮 PCR 扩增。

1.4 组织病理学分析

采用 Bell 等(1988)和 Lightner(1996)报道的方法, 对保存在 70%乙醇中的样品进行脱水、石蜡包埋等处理。每份样品制备 4 张厚度为 3 μm 的石蜡切片, 对第 1 张切片进行苏木精和伊红(HE)染色, 用于组织病理学观察(参考上述 Lightner 报道的方法), 第 2 张切片用于地高辛(DIG)标记的 RNA 探针进行 CMNV 组织原位杂交, 第 3、4 张切片用于随机探针和无探针的原位杂交作为阴性和空白对照。利用 Nikon Eclipse E80i 显微镜对组织切片进行观察和拍照。

1.5 组织原位杂交分析

根据 Zhang 等(2017)报道的方法, 利用带有限制性内切酶识别位点的引物对 *RdRp* 基因上一段长为 244 bp 的片段进行扩增, 将扩增所得目标片段克隆到 pBluescript II SK(+)载体中, 用限制性内切酶 *Pst* I 将重组后的载体线性化; 以线性化的载体为模板, 采用 T7 RNA 聚合酶转录出 DIG 标记的 RNA 探针。利用上述探针, 根据前人报道的方法(Nuovo *et al*, 1999; Piette *et al*, 2008; Chen *et al*, 2014)对切片进行原位杂交, 杂交后的切片进行核固红复染着色。利用 Nikon Eclipse E80i 显微镜观察原位杂交切片并拍照。

1.6 透射电子显微镜分析

将保存在戊二醛固定液中、对应编号呈原位杂交检测阳性的样品, 送青岛大学医院电镜中心进行固定、包埋、切片和染色, 操作流程参照 Graham 等(2007), 稍加修改后具体步骤包括: 1%锇酸(0.1 mol/L 甲次磷酸盐缓冲液配制, pH 值为 7.3)固定 3 h, 蒸馏水浸泡 10 min; 接着依次在 50%、70%和 90%乙醇中脱水 20 min, 在无水乙醇中脱水 4 次, 10 min/次; 先用 1:1 的树脂酒精包埋液处理 30 min, 再用 3:1 的树脂酒精包埋液处理 60 min, 然后用纯树脂包埋 3 d, 制备厚度为 0.5 μm 的超薄切片; 切片用醋酸铀和柠檬酸铅进行染色, 用透射电子显微镜(Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd., 日本)观察、拍照。

2 实验结果

2.1 RT-nPCR 检测结果

RT-nPCR 扩增产物的电泳图片显示, 来自鲫鱼样品的 cDNA 经过二轮 PCR, 扩增获得了与预期的 207 bp 大小一致的目标基因片段(图 1), 并且和阳性

对照的扩增片段在相同位置。根据该结果初步判断鲫鱼样品中存在或感染了 CMNV。

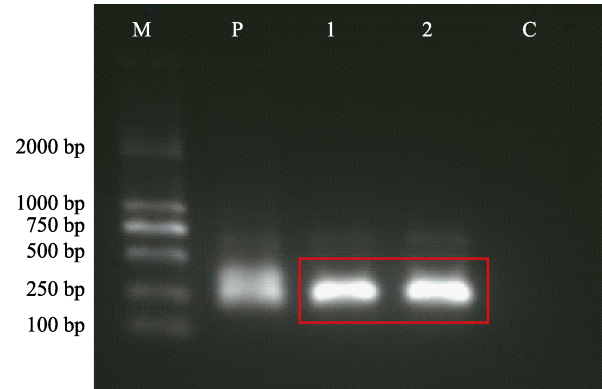


图 1 鲫鱼样品的 CMNV 逆转录套式 PCR 第二轮扩增产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of the amplification products from the second step of CMNV RT-nPCR test for the sample of *C. auratus* naturally infected with CMNV

M: Marker DL2000; P: 阳性对照;
1 和 2: 鲫鱼样品; C: 阴性对照
M: Marker DL2000; P: Positive control; 1 and 2: Samples of *C. auratus*; C: Negative control

2.2 鲫鱼组织病理变化及组织原位杂交

鲫鱼脑神经组织病理图显示, 鲫鱼脑组织二叠体内颗粒细胞层中可见明显的神经组织空泡化, 二叠体内颗粒细胞排列混乱、无序, 细胞核固缩明显(图 2a 和图 2b)。组织原位杂交图(图 2c 和图 2d)显示, 鲫鱼脑组织颗粒细胞层中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 2e 和图 2f)。

鲫鱼脑皮层组织病理图显示, 鲫鱼脑皮层组织空泡化严重, 组成神经元的锥体细胞呈现明显空泡化, 较高比例的细胞核出现固缩变形(图 3a 和图 3b)。该样品的组织原位杂交图显示(图 3c 和图 3d), 呈现坏死部位的神经元周围存在明显浅紫色的 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 3e 和图 3f)。

鲫鱼心肌组织病理图显示, 心肌组织中肌纤维呈现溶解样坏死, 肌细胞空泡化明显, 间隙可见血细胞浸润, 肌细胞的细胞核固缩明显(图 4a 和图 4b)。组织原位杂交图(图 4c 和图 4d)显示, 心肌组织坏死部位出现浅紫色的 CMNV 探针杂交信号。对照组切片中无杂交信号出现(图 4e 和图 4f)。

2.3 鲫鱼组织超微结构病理变化

鲫鱼脑组织超薄切片透射电镜分析结果显示, 脑组织空泡化病变严重, 神经组织坏死明显, 有髓神经

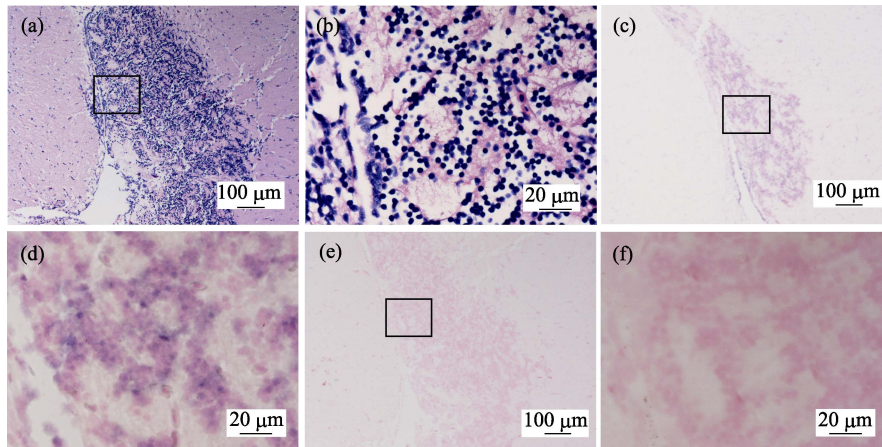


图 2 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑神经组织病理和原位杂交图

Fig.2 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for brain nerve tissue of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑组织病理学 HE 染色图; (b): (a)中黑框内区域的放大图, 可见明显的神经组织空泡化和颗粒细胞核固缩; (c): 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑的组织原位杂交图; (d): (c)中黑框内区域的放大图, 颗粒细胞中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号; (e): 无 CMNV RNA 探针的脑组织原位杂交图; (f): (e)中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for brain of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of nerve and karyopyknosis of the granular cells; (c): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c), visible intense hybridization signal at the granular cells; (e): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

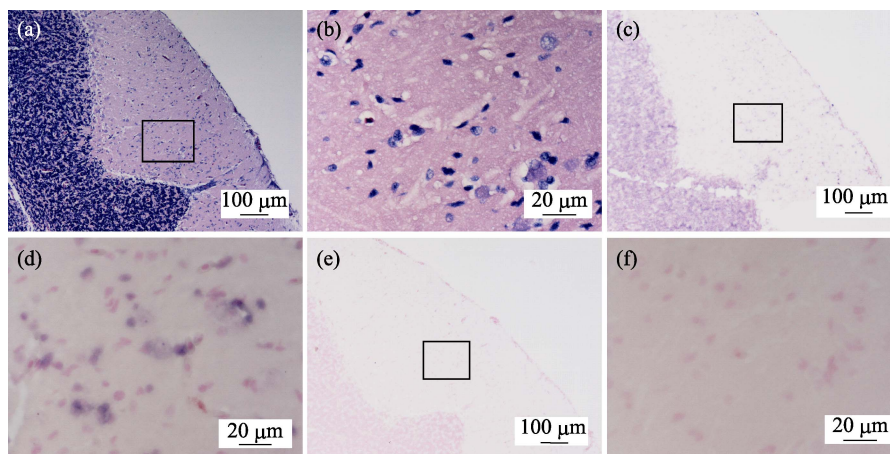


图 3 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑皮层组织病理和原位杂交图

Fig.3 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for brain cortical tissue of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 鲫鱼脑组织病理学 HE 染色图; (b): (a)中黑框内区域的放大图, 可见组成脑皮层的锥体细胞的空泡化和细胞核固缩; (c): 自然感染 CMNV 鲫鱼脑的组织原位杂交图; (d): (c)中黑框内区域的放大图, 坏死的锥体细胞中有明显的蓝紫色 CMNV 探针杂交信号; (e): 无 CMNV RNA 探针的自然感染 CMNV 鲫鱼的脑组织原位杂交图; (f): (e)中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for brain of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of pyramidal cells and karyopyknosis of pyramidal cells in cortical tissue; (c): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c), visible intense CMNV probe hybridization signal at the necrotic neuron; (e): Micrographs of ISH for brain of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

纤维出现脱髓鞘现象, 细胞核固缩变形明显, 但镜下未见明显的 CMNV 样病毒颗粒, 也未观测到其他已知病原体(图 5a 和图 5b)。

鲫鱼心肌组织超薄切片透射电镜分析结果显示, 心肌组织坏死严重, 肌细胞中大面积区域被 CMNV 样病毒颗粒所占据(图 6a 和图 6b); 高放大倍数下可

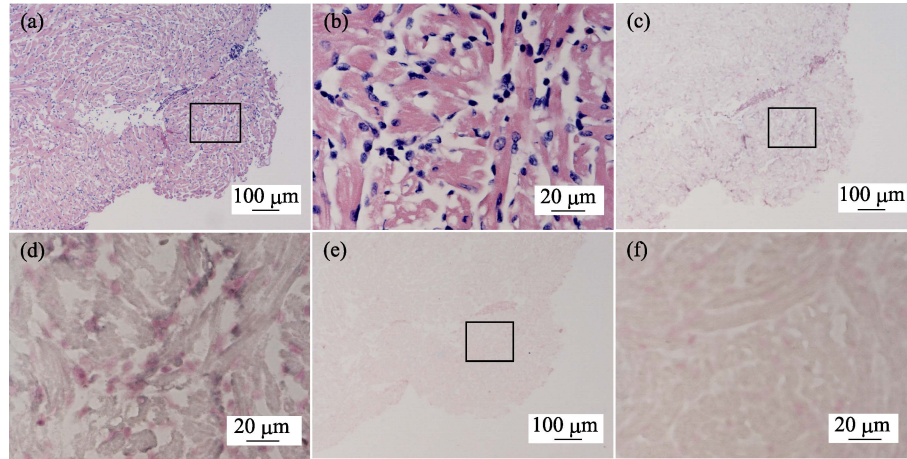


图 4 自然感染 CMNV 的鲫鱼心肌组织病理和组织原位杂交图

Fig.4 Micrographs of HE staining and *in situ* hybridization for cardiac muscle of the *C. auratus* naturally infected with CMNV

(a): 自然感染 CMNV 鲫鱼心肌组织病理学 HE 染色图; (b): (a)中黑框内区域的放大图; (c): 自然感染 CMNV 鲫鱼心肌组织原位杂交图; (d): (c)中黑框内区域的放大图; (e): 无 CMNV RNA 探针的自然感染 CMNV 鲫鱼的心肌组织原位杂交图; (f): (e)中黑框内区域的放大图

(a): Micrographs of HE staining for cardiac muscle of the *C. auratus*; (b): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (a), visible dissolved myoneme of myocyte; (c): Micrographs of ISH for cardiac muscle of the *C. auratus* with the CMNV RNA probe; (d): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (c); (e): Micrographs of ISH for cardiac muscle of the *C. auratus* without the CMNV RNA probe; (f): Magnified micrograph of the zone in the black frame in (e)

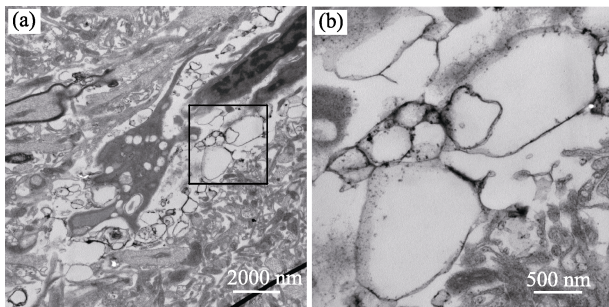


图 5 自然感染 CMNV 的鲫鱼脑组织超薄切片的透射电镜图

Fig.5 Micrographs of ultrathin section for brain of *C. auratus* visualized by transmission electron microscopy (TEM)

(a): 鲫鱼脑组织的超薄电镜图; (b): (a)中黑框内区域的放大图, 可见脑组织中神经空泡化明显
(a): TEM micrographs for the brain; (b): Showed the magnified zone in the black frame in (a), visible cytoplasmic vacuolation of nerve

见心肌细胞内大量清晰的、直径约为 30 nm 的 CMNV 样病毒颗粒(图 6c)。

3 讨论

研究发现, CMNV 的宿主范围广泛, 该病毒除了感染中国主要养殖甲壳类如凡纳滨对虾、中国明对虾、日本对虾、斑节对虾和罗氏沼虾外, 还可以感染对虾养殖池塘中的桡足类(*Parathemisto gaudichaud*)、

螺赢蜚(*Corophium sinense* Zhang)、寄居蟹(*Diogenes edwardsii*)和细长脚虫戎(*Parathemisto gaudichaldi*)等种类(Zhang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018)。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和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溶解样、凝固状坏死(Zhang *et al.*, 2014、2017)。Liu 等(2017)通过人工感染实验证明, CMNV 可通过脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)亲体的雄性生殖细胞或雌性生殖细胞传递至子代, 实现从亲代到子代的垂直传播。

为了筛查 CMNV 可感染的水生动物种类, 本研究对山东潍坊一发生 VCMD 对虾养殖场排水渠中野生的鲫鱼进行了采样和分析, 鲫鱼心肌组织的分子生物学检测呈 CMNV 阳性, 初步判断鲫鱼可携带或感染 CMNV。进一步的组织病理学和组织原位杂交分析结果显示, 鲫鱼样品脑组织出现了较为严重的病理变化, 包括脑皮层和二叠体内神经组织空泡化、组织排列疏松, 脑皮层锥体细胞和二叠体颗粒细胞层细胞核明显固缩等, 说明 CMNV 在自然条件下感染鲫鱼能够导致其脑组织发生明显病变。对鲫鱼样品心肌组织的超微结构分析结果显示, CMNV 可侵染鲫鱼的心脏, 导致心肌组织大面积坏死; CMNV 颗粒占据了心肌细胞内大部分区域, 部分肌肉纤维溶解并为 CMNV 颗粒所取代。上述研究结果证实, CMNV 在自然条件下可感染野生鲫鱼, 并导致其脑和心肌发生明显的病理损伤。

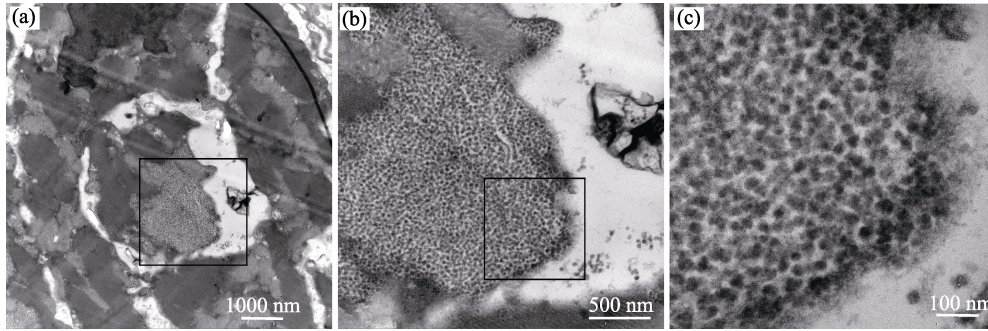


图6 自然感染 CMNV 的鲫鱼心脏组织超薄切片的透射电镜图

Fig.6 Micrographs of ultrathin section for heart of *C. auratus* visualized under transmission electron microscopic (TEM)

(a)~(c): 心脏肌肉组织的超薄电镜图; (b)和(c): 分别为(a)和(b)图中黑框内放大区域, 可见心肌组织中大量散在的 CMNV 样病毒颗粒

(a)~(c) TEM micrographs for the cardiac muscle of the heart: (b) and (c): Showed the magnified zone in the black frame in (a), visible scattering CMNV-like particles in necrotic myocardial cell

由于 CMNV 在分类上归为 α 野田村病毒属, 其与 β 野田村病毒属相关病毒的感染特征可能类似。为了排除上述鲫鱼样品中 β 野田村病毒共感染的可能性, 本研究采用由世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)推荐的、针对 β 野田村病毒的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法, 检测了鲫鱼脑组织的 RNA, 结果显示, 在本研究中鲫鱼样品中没有 β 野田村病毒属已知株系的阳性检出(结果未展示), 从而证实本研究鲫鱼样品中不存在 β 野田村病毒的感染。

通常来讲, 病毒具有强烈的宿主专一性和严格的物种屏障(Wang *et al*, 2004; Kuiken *et al*, 2006; Tang *et al*, 2006)。 α 野田村病毒属内除了野田村病毒(Nodamura virus, NoV)和兽棚病毒(Flock house virus, FHV)外, 多数病毒的宿主范围似乎都仅限于各种昆虫(Selling *et al*, 1990; Stock *et al*, 2009)。作为野田村病毒科的代表种, NoV 病毒的宿主范围较为独特, 除了能够感染昆虫外, 还对哺乳动物宿主具有致病性(Bailey *et al*, 1973、1975)。研究证实, NoV 能够感染猪, 可以被蚊子传播, 会对乳鼠(*Mus musculus*)和仓鼠(*Mesocricetus auratus*)产生致死性(Ball *et al*, 1999; King *et al*, 2011)。FHV 分离自褐新西兰肋翅鳃角金龟(*Costelytra zealandica*) (Scotti *et al*, 1983), 但能够在植物中复制产生感染性病毒粒子(Selling *et al*, 1990)。上述研究均表明, NoV 和 FHV 具有跨宿主传播的能力。相比之下, β 野田村病毒属的宿主范围仅限于不同种的鱼类(Scotti *et al*, 1983; Furusawa *et al*, 2007; Bigarré *et al*, 2009; Souto *et al*, 2015)。迄今为止, 尚未见报道表明 α 野田村病毒具有感染鱼类的能力。前期研究发现, 发生 VCMD 的凡纳滨对虾养殖池塘中, CMNV 除了感染养殖对虾外, 也可感染池塘中共生的鲢虾虎

鱼(*Mugilogobius abei*)(另文发表), 结合本研究所揭示的 CMNV 能够感染野生鲫鱼, 可以发现, CMNV 作为一种虾类新发疫病病毒性病原, 能跨越物种障碍在自然条件下感染鱼类, 实现跨宿主传播。

池塘养殖系统, 除了养殖池塘本身外, 还包括排水渠、废水处理池等设施, 池塘中养殖对虾发病后, 养殖水体会经排水渠向外排放或排入废水处理池中。由于目前中国大部分对虾养殖地区对养殖废水外排管理不严格, 多数养殖场一般将养殖废水就近直接外排至沟渠或近海中, 造成养殖池塘中病原向外扩散的风险。本研究中的养殖场养殖用水来源为近岸河口, 从发病对虾养殖池塘外排水渠的鲫鱼样品中检测到 CMNV 感染, 证实该养殖场暴发 VCMD 疫情后, 其池塘中 CMNV 可能会经排水设施向外传播扩散。同时, CMNV 可在自然状态下感染淡水鱼类——鲫鱼这一事实, 一方面为 CMNV 跨越宿主界限感染鱼类提供了更多证据, 另一方考虑到鲫鱼是淡水或半咸水鱼类, 加之 CMNV 可感染半咸水养殖的罗氏沼虾, CMNV 感染其他鱼类尤其是淡水养殖动物种类的风险值得高度关注。

鲫鱼是一种淡水鱼类, 分类上归属于辐鳍鱼纲、鲤形目、鲤科鲫属, 主要分布于欧亚地区的淡水水域中, 部分沿海近岸的淡咸水中也有少量分布。中国境内, 鲫鱼分布广泛, 各地水域常年均有生产, 是中国一种重要的经济鱼类(谢忠明, 1999; 郁桐炳等, 2004)。本研究证实, CMNV 能够在自然条件下感染鲫鱼导致其脑和心肌组织产生明显病理变化, 说明 CMNV 对鲫鱼具有一定的致病性, 因此, CMNV 危害养殖鲫鱼的风险不容忽视。但对于 CMNV 感染鲫鱼的致死率、主要靶组织等问题, 尚需深入研究。

参 考 文 献

- Bailey L, Newman JFE, Porterfield JS. The multiplication of Nodamura virus in insect and mammalian cell cultures. *Journal of General Virology*, 1975, 26: 15–20
- Bailey L, Scott HA. The pathogenicity of Nodamura virus for insects. *Nature*, 1973, 241(5391): 545
- Ball LA, Johnson KL. Reverse genetics of nodaviruses. *Advances in Virus Research*, 1999, 53: 229–244
- Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1988
- Bigarré L, Cabon J, Baud M, *et al.* Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(8): 667–673
- Chen SL, Zhang GJ, Shao, CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Furusawa R, Okinaka Y, Uematsu K, *et al.* Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77(2): 119–125
- Graham L, Orenstein JM. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nature Protocols*, 2007, 2(10): 2439–2450
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, *et al.* Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2011
- Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, *et al.* Host species barriers to influenza virus infections. *Science*, 2006, 312(5772): 394–397
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996
- 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) in shrimp ponds. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 29–36
- Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, *et al.* *In situ* detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12754–12759
- Piette D, Hendrickx M, Willems E, *et al.* An optimized procedure for whole-mount *in situ* hybridization on mouse embryos and embryoid bodies. *Nature Protocols*, 2008, 3(7): 1194–1201
- 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(1): 445–450
- Scotti PD, Dearing S, Mossop DW. Flock house virus: A nodavirus isolated from *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeida). *Archives of Virology*, 1983, 75(3): 181–189
- Selling BH, Allison RF, Kaesberg P. Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(1): 434–438
- Souto S, Lopez-Jimena B, Alonso MC, *et al.* Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(1–2): 53–61
- Stock SP, Vandenburg J, Glazer I, *et al.* Insect pathogens: Molecular approaches and techniques. Cambridge, MA: CAB International, 2009
- Tang Q, Maul GG. Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins. *Journal of Virology*, 2006, 80(15): 7510–7521
- Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 2016, 452: 69–87
- Wang F, Ma Y, Barrett JW, *et al.* Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nature Immunology*, 2004, 5(12): 1266–1274
- Xie ZM. High quality crucian carp breeding technology. Beijing: China Agriculture Press, 1999 [谢忠明. 优质鲫鱼养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 1999]
- 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]
- Yu TB, Ge XP. Cultivation of high quality crucian carp. Beijing: China Agriculture Press, 2004 [郁桐炳, 戈贤平. 巧养名优鲫鱼. 北京: 中国农业出版社, 2004]
- Zhang QH. To be cautious of “bottom death” in the intensive farming of Pacific white shrimp. *Inland Aquatic Product*, 2004, 29(10): 48–49 [章秋虎. 南美白对虾高密度养殖谨防“死底症”发生. *内陆水产*, 2004, 29(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, Xu TT, Wan XY, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Research*, 2017, 233(2): 113–119

(编辑 马瑾艳)

Preliminary Study on the Natural Infection of *Carassius auratus* with Covert Mortality Nodavirus (CMNV)

WANG Chong^{1,2}, WANG Xiuhua^{1,2}, LIU Shuang^{1,2}, SANG Songwen^{1,2}, ZHANG Qingli^{1,2①}

(1. 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, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Viral covert mortality disease (VCMD) is an emerging disease caused by covert mortality nodavirus (CMNV). VCMD recently resulted in severe economic losses in China due to shrimp aquaculture infections. To identify the natural hosts of CMNV in the pond culture system, samples of *Carassius auratus* were collected for testing purposes from the drainage channel of a shrimp farm affected by VCMD. The results of CMNV reverse transcription nested PCR showed that the RNA of *C. auratus* sample could be amplified and produced the expected target gene fragment. Histopathological analysis showed that CMNV infection in *C. auratus* caused brain nervous tissue vacuolation. Obvious karyopyknosis occurred in the corpora bigemina granular cells and cortical pyramidal cells. *In situ* hybridization analysis showed CMNV positive signals in regions of the brain and cardiac muscle with pathological damage. Transmission electron microscopy analysis verified the brain nervous tissue vacuolation and the presence of CMNV particles in the cardiac muscle. The results of the present study indicate that CMNV can cross the species barrier to infect fish and cause pathological damage in the target tissues. Our findings emphasize the need for paying close attention to the high risk of CMNV infections in other fish species, especially freshwater fishes.

Key words Viral covert mortality disease (VCMD); Covert mortality nodavirus (CMNV); Natural infection; Host jump; *Carassius auratus*

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