

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210930001

http://www.yykxjz.cn/

张翔, 谷莉, 郑玉东, 李晨, 白昌明, 辛鲁生, 王崇明, 刘金兰. 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)易感宿主调查. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 174-185

ZHANG X, GU L, ZHENG Y D, LI C, BAI C M, XIN L S, WANG C M, LIU J L. Survey of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) susceptible hosts based on *in situ* LAMP technique. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 174-185

# 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒 (OsHV-1)易感宿主调查\*

张翔<sup>1,2</sup> 谷莉<sup>1,2</sup> 郑玉东<sup>2,3</sup> 李晨<sup>2</sup>  
白昌明<sup>2</sup> 辛鲁生<sup>2</sup> 王崇明<sup>2①</sup> 刘金兰<sup>1①</sup>

(1. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384;

2. 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 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学水产动物病害与免疫学实验室 山东 青岛 266003)

**摘要** 牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)给世界双壳贝类养殖业造成了严重的经济损失。10余种双壳贝类陆续被认定为易感宿主,仍有其他几种贝类仅有PCR核酸阳性数据,因确诊证据不足导致其易感性未得到充分评估。原位环介导等温核酸扩增(LAMP)检测技术相对传统原位杂交技术具有灵敏度高、方便快捷、可作为病原微生物感染证据的优点。为了在OsHV-1流行病学调查过程中实现病毒感染的快速检测和确诊,根据已报道的OsHV-1特异性LAMP检测引物,设计内引物,优化反应条件,建立了OsHV-1的原位LAMP检测方法。基于该方法对2019年以来采集的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)样本进行检测。结果显示,毛蚶样本的OsHV-1原位LAMP检测结果呈阳性;其他几种贝类部分样本的实时定量PCR(qPCR)检测呈阳性,但原位LAMP检测呈阴性。对毛蚶样本的原位LAMP检测结果分析发现,病毒杂交信号主要分布在外套膜和肝胰腺等器官的结缔组织,推测感染的细胞为成纤维细胞和血淋巴细胞;在闭壳肌和斧足肌肉组织的肌细胞细胞核中也发现较多杂交信号。鳃丝内和周边偶现阳性信号,推测来自渗出的血淋巴细胞。基于原位LAMP技术的OsHV-1检测结果显示,毛蚶是OsHV-1的一种易感宿主,毛蚶结缔组织、肌肉组织和血淋巴细胞对该病毒有强亲嗜性。

**关键词** 牡蛎疱疹病毒;原位LAMP;易感性;流行病学调查

**中图分类号** S966.12 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0174-12

疱疹样病毒粒子感染贝类的案例首次报道于1972年,引起一批实验用美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)种贝死亡,这也是此类病毒感染无脊椎动物的首例报道(Farley *et al*, 1972)。牡蛎疱疹病毒(Ostreid

\* 国家自然科学基金(32073014)、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开放课题(2019-BH-A02)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系共同资助。张翔, E-mail: 1010601939@qq.com

① 通信作者:王崇明,研究员, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn;刘金兰,教授, E-mail: ljlan1115@163.com

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-11-19

herpesvirus 1, OsHV-1)感染案例最早发现于 1991 年, 引起育苗场长牡蛎(*Crassostrea gigas*)幼虫的大规模死亡, 对这一世界性海洋主养贝类养殖产业造成严重打击(Barbosa-Solomieu *et al.*, 2015; Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992)。目前, 尚不清楚 1972 年病例疱疹样病毒粒子与 OsHV-1 是否为同一种病毒。产业健康发展的需求刺激多国科研机构围绕 OsHV-1 开展了病原学、流行病学、病原生态学和防控手段等众多领域的研究(Alfaro *et al.*, 2019; Rodgers *et al.*, 2019; Rosani *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2016; 白昌明等, 2021), OsHV-1 为首个被正式命名、系统分类地位明确的无脊椎动物疱疹病毒。与常见脊椎动物疱疹病毒普遍表现较高的宿主特异性不同, OsHV-1 宿主范围较广, 目前已证实被 OsHV-1 感染的物种有 10 余种, 分属双壳纲(Bivalvia)、牡蛎目(Osteroidea)、珍珠贝目(Pterioidea)、蚶目(Arcoida)、帘蛤目(Veneroidea)下不同的科和属(白昌明等, 2021)。同时, 有多种双壳贝类以及荷兰、挪威等国的养殖贝类仅有 PCR 检测 OsHV-1 核酸阳性的结果, 不能作为发生病毒感染的直接证据(Barbieri *et al.*, 2019; Gittenberger *et al.*, 2016; Mortensen *et al.*, 2016)。这些易感性存疑的结果为流行病学监测计划的制定、动物检疫和疫病防控措施的实施造成障碍。

目前已开发出多种 OsHV-1 检测方法, 如 PCR (Batista *et al.*, 2007)、原位杂交(Lipart *et al.*, 2002)、原位 PCR (李亚楠等, 2019)、组织病理、透射电镜、环介导等温核酸扩增(LAMP) (Ren *et al.*, 2009; Zaczek-Moczydlowska *et al.*, 2020)和重组酶聚合酶扩增(RPA) (Gao *et al.*, 2018)等。根据世界动物卫生组织(OIE)水生动物手册的建议, OsHV-1 感染的确诊需要核酸特异性检测阳性结果, 结合组织病理和透射电镜影像才能做出诊断; 单独使用核酸扩增技术对病原进行检测的方法不能用于感染案例的确诊(OIE, 2019)。透射电镜如果直接观察到处于不同时期的疱疹样病毒粒子, 也可以作为病毒感染确诊的证据; 但透射电镜检测的灵敏度和特异性低, 尚需要 PCR 等特异性检测手段确认观察到的疱疹样病毒粒子是 OsHV-1。原位杂交同时具备核酸检测特异性和组织原位观察的优势, 是确诊病毒感染的一种重要技术手段(Lipart *et al.*, 2002)。原位杂交虽然特异性强, 但存在灵敏度不高、检测程序复杂、步骤繁琐等缺点(Muro-Cacho, 1997)。受限于透射电镜和原位杂交技术的使用限制, PCR 仍然是目前最广泛使用的 OsHV-1 流行病学调查方法, 这也导致出现很多核酸阳性病例未得到确诊的物种和地

区。OsHV-1 原位 PCR 检测方法作为原位杂交技术的延伸, 提高了原位杂交的灵敏度(李亚楠等, 2019), 但仍然存在操作程序复杂、需要高值专用设备(如组织切片 PCR 工作站等)的问题。本研究拟根据原位 LAMP 技术原理, 建立一套兼具高灵敏度、简便快捷的 OsHV-1 检测方法, 并利用该方法对 2019 年以来采集的发病贝类样本进行检测, 为 OsHV-1 潜在易感宿主的鉴定提供依据; 同时解析该病毒在新宿主中的分布规律和组织嗜性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集与保存

魁蚶病料采集于 2018 年 9 月, 用于原位 LAMP 反应条件的摸索和检测方法的建立。长牡蛎、福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)样本于 2019—2021 年采集自不同海区 and 养殖场非正常死亡案例(表 1)。采集的发病贝类样本普遍出现沉底(幼虫)、双壳闭合不全、反应迟钝、外套膜萎缩等临床症状。从表现临床症状的群体中选择受刺激时闭壳反应弱、内脏团完好、无异味的个体。现场或低温运回实验室后, 分别采集发病贝类外套膜、鳃、肝胰腺和闭壳肌等组织器官, 切取约 5 mm 厚, 立即浸入至少 10 倍于采样组织体积的 Davidson's AFA 固定液中, 固定 24~48 h 后, 直接进行组织切片或将固定的组织块儿移入 70%乙醇溶液中室温存放。从各解剖个体剩余组织中剪取约 30 mg 外套膜组织, 置于 1.5 mL 离心管中, 直接用于 DNA 提取或-40℃保存备用。

### 1.2 DNA 提取与病毒载量测定

使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP324) (北京天根生化科技有限公司)提取各贝类样本组织总 DNA, 按照试剂盒说明书操作。利用 TaqMan 实时定量 PCR (qPCR)技术对各样本中 OsHV-1 核酸载量进行定量(Martenot *et al.*, 2010)。反应引物和探针分别为: 上游引物 BF: 5'-GTCGCATCTTTGGATTAAACA A-3'、下游引物 B4: 5'-ACTGGGATCCGACTGACAA C-3', 探针及生物素标记 B-6FAM-TGCCCTGTTCAT CTTGAGGTATAGACAATC-BHQ-1。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 使用 Fast Start Essential DNA Probes Master 试剂盒(Roche, Cat. No.06402682001), 反应体系: 12.5 μL 2×PCR mix, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 探针(10 μmol/L) 0.5 μL,

DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 添加水(试剂盒配备) 8  $\mu\text{L}$  至总反应体系为 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 40 个循环, 反应程序在 Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 仪器控制下完成。每批次 qPCR 均使用 10 倍梯度稀释( $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^4$ 、 $1\times 10^3$ 、 $1\times 10^2$ 、 $1\times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 的标准品进行定量分析。

### 1.3 LAMP 反应引物的优化与验证

根据 Zaczek-Moczydlowska 等(2020)研究中的 OsHV-1 LAMP 检测方法, 外侧上、下游引物分别为 OsHV-LP-F: TTTTCAGTTCGTGCTCGGATT, OsHV-LP-B: TCCGGAACAATTGACCAAGC。内侧上、下游引物分别由 2 部分组成, 上游引物 OsHV-LP-FIP 为 F1c (CCAGTTGTATTTGGGCATGCC)和 F2 (GAGGCACATTCATTTCCCT), 中间由 4 个 T (Thymine, 胸腺嘧啶)连接(F1c+TTTT+F2); 下游引物 OsHV-LP-BIP 为 B1c (TCAGGCAGGCATTCAATTTGGC)和 B2 (CCCCAGAAACAGGTCACAG), 中间由 4 个 T (Thymine, 胸腺嘧啶)连接(B1c+TTTT+B2)。在借鉴 Zaczek-Moczydlowska 等(2020)研究的内、外引物信息的基础上, 为提高 LAMP 的反应速度和稳定性, 使用 LAMP 引物设计软件 (PrimerExplorer, <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>)设计 4 对环引物, 并筛选得到扩增效果最好的 1 对环引物 OsHV-LP-LF: 5'-AGATA CAGTAGTTGGG AGTCTTACT-3'和 OsHV-LP-LB: 5'-ATGGTTCACGG GAGTGATCC-3', 以便适应在切片上进行 LAMP 扩增时出现的复杂多变的扩增环境。

为避免开盖导致的气溶胶污染风险, 通过核酸检测试纸条和一次性检测装置, 直接检测 LAMP 扩增效果, 为满足扩增结束后, 直接进行核酸试纸条检测的需求, 分别使用 Biotin 和 6-FAM 标记内引物 OsHV-LP-FIP 和外引物 OsHV-LP-F 的 5'端。每个 LAMP 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ , 包括如下组分: 10 $\times$ Thermopol 反应缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgSO}_4$  (100 mmol/L) 3.5  $\mu\text{L}$ , 引物 OsHV-LP-FIP、OsHV-LP-BIP (20  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ 、OsHV-LP-LF、OsHV-LP-LB (20  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、OsHV-LP-F、OsHV-LP-B (10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ 、dNTPs (10 mmol/L) 3.5  $\mu\text{L}$ , 甜菜碱(1.2 mol/L) 6  $\mu\text{L}$ , 8 U Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs), 已提取的 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。反应在 PCR 仪中进行, 反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ , 反应时间为 60 min, 最后, 85 $^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min。

### 1.4 OsHV-1 原位 LAMP 检测步骤

常规方法进行切片、展片后, 使用粘附载玻片捞片, 随后在烤片机(Leica HI1220)上烘烤约 12 h, 使

组织牢固地粘附在切片上, 防止缓冲液浸洗等原位 LAMP 复杂操作引起的组织脱片。OsHV-1 原位 LAMP 检测参考 Chen 等(2019)研究中的步骤, 具体操作如下:

**1.4.1 脱蜡与水化** 首先, 将充分烘烤粘附的切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行常规脱蜡水化: 二甲苯 5 min (3 次), 无水乙醇 5 min (2 次), 95%乙醇 5 min, 85%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 50%乙醇 5 min。

**1.4.2 消化与变性** 0.2 mol/L HCl 室温浸浴 20 min; 蛋白酶 K (20  $\mu\text{g/mL}$ ) 37 $^{\circ}\text{C}$  消化 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 然后, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冷却 5 min。

**1.4.3 原位 LAMP 扩增** 将切片置于湿盒中, 按照上述 1.2 节所述配制 LAMP 反应体系[使用带有地高辛标记的 dNTP (Roche)], 每张切片滴加 LAMP 反应体系 150  $\mu\text{L}$ , 盖上盖玻片, 在杂交炉中 65 $^{\circ}\text{C}$  扩增 60 min。杂交完成后移去盖玻片, 按如下步骤依次使用 SSC 梯度缓冲液浸洗: 2 $\times$ SSC 室温 5 min (2 次), 1 $\times$ SSC 37 $^{\circ}\text{C}$  5 min (2 次), 0.5 $\times$ SSC 42 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 0.1 $\times$ SSC 42 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 清除非特异性信号。

**1.4.4 抗体孵育** 向每张切片滴加封闭剂(MAB: 10% BMB: 山羊血清原液=7:2:1) 1 mL, 室温下封闭 1 h。吸去预杂交液, 滴加 500  $\mu\text{L}$  抗体孵育液[碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体(Roche): 封闭剂=1:1000]孵育 90 min。孵育完成后, 将切片转移到杂交缸中, 首先使用 Buffer I (Tris-HCl 100 mol/L、NaCl 150 mol/L)浸洗 10 min (2 次), 随后, 使用 Buffer II (Tris-HCl 100 mol/L、NaCl 100 mol/L、 $\text{MgCl}_2$  250 mol/L)浸洗 5 min。

**1.4.5 显色与复染** 吸取 200  $\mu\text{L}$  配制好的碱性磷酸酶底物显色剂(40  $\mu\text{L}$  25 $\times$ NBT 加入到 1 mL 1 $\times$ AP 反应缓冲液)滴加在切片组织样本上, 湿盒内室温显色(显色时间优化: 30 min、45 min、60 min), 苯胺棕复染 2 min。复染完成后, 用 Buffer III (Tris-HCl 100 mol/L、EDTA 10 mol/L)浸洗 30 min 终止反应, 并清洗切片。

**1.4.6 脱水与封片** 将切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行酒精梯度脱水: 50%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 85%乙醇 5 min, 95%乙醇 5 min, 无水乙醇 5 min (2 次), 二甲苯 5 min (3 次), 二甲苯透明, 树脂封片。显微镜(Nikon Eclipse E80i)下观察组织切片的杂交信号并拍照。

### 1.5 基于原位 LAMP 检测方法的 OsHV-1 易感宿主调查

应用 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法对 2019—2021 年间收集的长牡蛎、福建牡蛎、栉孔扇贝、虾夷扇贝、毛蚶和菲律宾蛤仔的发病贝类样本进行检测(表 1)。

选择这些物种的原则是国内外曾报道过 OsHV-1 核酸检测阳性案例, 但我国近年来在相关物种(特定生物阶段)尚缺乏 OsHV-1 感染确诊的证据。采集样本时已经利用 qPCR 方法对每批次样本感染率以及阳性样本携带 OsHV-1 核酸拷贝数进行测定, 并挑选部分样本进行组织固定、制作石蜡切片和病理检测。为验证本研究所开发 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法的稳定性和特异性, 重新对保存蜡块进行切片、原位 LAMP 扩增、抗体孵育, 最后使用碱性磷酸酶显色剂显色后, 光镜下观察蓝紫色阳性信号在不同组织中的分布情况并拍照。每批原位 LAMP 操作过程中均使用已知感染和未感染 OsHV-1 的魁蚶组织切片作为阳性和阴性对照。使用 Kappa 统计量检验 qPCR 检测方法与原位 LAMP 检测方法对样本检测结果的一致性。

## 2 结果

### 2.1 LAMP 反应引物的优化与验证

最终使用的外侧、内侧以及环引物对见表 1。核酸试纸检测结果显示, 感染 OsHV-1 的魁蚶检测结果为阳性(图 1b), 而未感染 OsHV-1 魁蚶的反应结果均为阴性(图 1a), 表明该 LAMP 体系可应用于后续原位 LAMP 测试。

表 1 OsHV-1 原位 LAMP 反应体系所用引物

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
OsHV-LP-F	6-FAM-TTTCAGTTCGTGCTCGGATT	外侧引物 Outer primers
OsHV-LP-B	TCCGGAACAATTGACCAAGC	
OsHV-LP-FIP	Biotin-CCAGTTGTA-TTTGGGCATGC CCTTTGAGGCACATTCCATTCCCT	内侧引物 Inner primers
OsHV-LP-BIP	TCAGGCAGGCATTCAATTTGGCTTTT CCCCAGAAACAGGTCACAG	
OsHV-LP-LF	AGATACAGTAGTTGGGAGTCTTACT	环引物 Loop primers
OsHV-LP-LB	ATGGTTCACGGGAGTGTATCC	

### 2.2 原位 LAMP 检测方法建立

本研究在建立 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法过程中, 参考 Chen 等(2019)报道的十足目虹彩病毒 1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)原位 LAMP 检测方法, 以及本团队在开发鲍疱疹病毒(Haliothid herpesvirus 1, HaHV-1)原位 LAMP 检测技术过程中积累的经验, 最终形成如前所述的 OsHV-1 原位 LAMP 检测具体步骤。按照该操作流程进行操作, 最终观察到的病毒信

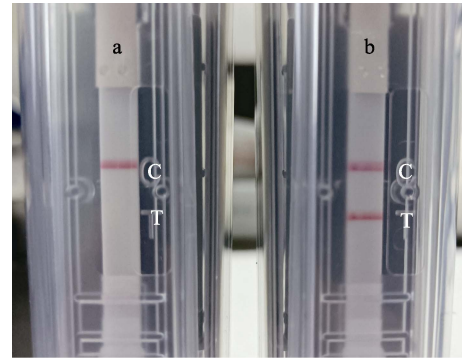


图 1 核酸试纸条测试 LAMP 扩增结果

Fig.1 LAMP amplification results detected by nucleic acid strips

- a: 阴性对照; b: 阳性样本; C: 质控线; T: 测试线。  
a: Negative control; b: Positive sample;  
C: Quality control line; T: Test line.

号显色清晰、易分辨(图 2B)。不加抗体的阴性对照未出现病毒信号(图 2C)。图 2 为使用已知感染 OsHV-1 的魁蚶组织, 进行原位 LAMP 检测时得到结果的示例。从组织病理 HE 染色结果可以看出, 组织损伤、血淋巴渗出和浸润主要发生在结缔组织(图 2A), 肌肉组织无炎症反应。与病理观察结果相一致, 病毒阳性信号集中出现在发生组织损伤和炎症反应的结缔组织中。根据细胞形态及其分布, 推测出现病毒阳性信号的细胞为血淋巴细胞和成纤维细胞(图 2D)。

### 2.3 基于原位 LAMP 检测方法的 OsHV-1 易感宿主调查

使用新开发的原位 LAMP 方法对保存的蜡块样本进行检测。结果显示, 几个批次的长牡蛎、福建牡蛎、栉孔扇贝、虾夷扇贝和菲律宾蛤仔样本未检测到病毒感染, 从多个批次的毛蚶样本中检测到 OsHV-1 感染杂交信号(表 2)。原位 LAMP 检测方法 with qPCR 检测方法对样本的检测结果经 Kappa 一致性检验, 具有高度一致性, K 值为 0.638 (表 3)。OsHV-1 杂交信号在毛蚶内脏团多个器官中浸润的血淋巴细胞内被观察到, 说明血淋巴细胞对该病毒非常易感。肝胰腺小管出现不同程度的上皮细胞坏死、组织损伤, 但病毒信号主要出现在结缔组织、肝胰腺小管间浸润的血淋巴细胞中(图 3)。外套膜结缔组织出现损伤和坏死, 肌肉组织偶见损伤和血细胞浸润。根据这些器官原位 LAMP 检测结果, 推测结缔组织中被感染的细胞类型主要为成纤维细胞和浸润血淋巴细胞; 肌肉组织被感染的为肌细胞的细胞核(图 4)。肌细胞携带病毒杂交信号的现象在富含肌肉纤维的斧足和闭壳肌中也经

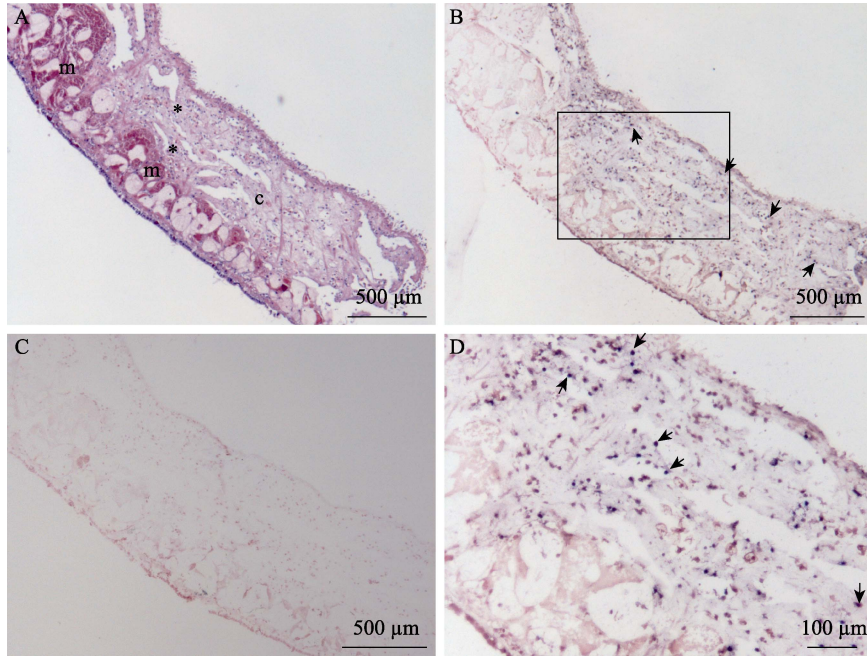


图2 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法开发结果示例

Fig.2 An example of the test results during the development of OsHV-1 *in situ* LAMP method

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测; C: 原位 LAMP 检测不加抗体阴性对照; D: 图 B 中黑色方框区域的局部放大  
 m: 肌肉组织; c: 结缔组织; \*: 血细胞浸润; 黑色箭头示病毒杂交信号。  
 A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection; C: Negative control (without antibody) of OsHV-1 *in situ* LAMP tests;  
 D: High magnification graphic of regions labeled by rectangular boxes in Fig.2B  
 m: Muscle; c: Connective tissue; \*: Haemocyte infiltration; Black arrows indicate viral hybridization signals.

表 2 OsHV-1 原位 LAMP 检测 2019—2021 年间发病贝类样本列表

Tab.2 Samples collected from 2019 to 2021 for verification of OsHV-1 *in situ* LAMP method

采样时间 Sampling time	采样地点 Sampling site	宿主物种 Host species	死亡率 Mortality rate /%	样本数* Sample number	感染率 Prevalence /%	载量 Load /(copy/ng total DNA)	原位 LAMP <i>in-situ</i> LAMP
2019-05	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	90	15(10)	93.3	4.39×10 <sup>6</sup>	+
2019-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	95	30(17)	90.0	8.69×10 <sup>6</sup>	+
2019-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	72	30(14)	96.7	3.84×10 <sup>5</sup>	+
2019-06	广东潮州 Chaozhou, Guangdong	福建牡蛎 <i>C. angulata</i>	60	60(10)	43.3	3.65×10 <sup>2</sup>	-
2019-07	山东即墨 Jimo, Shandong	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	35	30(8)	0	/	-
2019-08	山东潍坊 Weifang, Shandong	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	50	30(7)	0	/	-
2020-03	福建宁德 Ningde, Fujian	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	30	22(10)	0	/	-
2020-03	福建宁德 Ningde, Fujian	福建牡蛎 <i>C. angulata</i>	40	38(5)	7.9	8.64×10 <sup>1</sup>	-
2020-11	山东潍坊 Weifang, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	60	20(10)	40.0	6.24×10 <sup>2</sup>	-
2020-05	山东长岛 Changdao, Shandong	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	30	30(6)	0	/	-
2020-08	山东长岛 Changdao, Shandong	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	35	30(8)	0	/	-
2020-08	山东烟台 Yantai, Shandong	虾夷扇贝 <i>M. yessoensis</i>	90	20(11)	0	/	-
2021-05	山东乳山 Rushan, Shandong	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	40	30(5)	0	/	-
2021-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	90	20(6)	95.0	9.37×10 <sup>4</sup>	+
2021-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	50	2	100	3.69×10 <sup>2</sup>	-

\*: 括号内数字为固定的蜡块样本数。\*: The number in brackets is the number of wax blocks.

表 3 OsHV-1 原位 LAMP 检测与 qPCR 检测结果 Kappa 一致性分析  
Tab.3 Analysis of Kappa concordance between OsHV-1 *in situ* LAMP assay and qPCR results

qPCR	原位 LAMP			Kappa 值
	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	
阳性 Positive	54	8	62	0.638
阴性 Negative	1	11	12	
合计 Total	55	19	74	

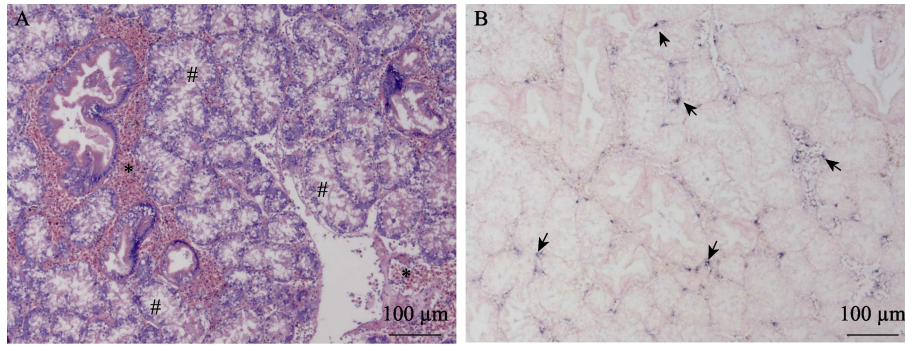


图 3 肝胰腺原位 LAMP 检测结果  
Fig.3 *In situ* LAMP detection in the hepatopancreas

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测

\*: 血细胞浸润区; #: 肝胰腺小管上皮坏死; 黑色箭头被 OsHV-1 感染的细胞。

A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection

\*: Infiltrated haemocytosis; #: Epithelial cell and tissue necrosis of the hepatopancreatic tubules; Black arrows show OsHV-1 signals.

常被观察到(图 5 和图 6), 这些结果说明, 毛蚶的肌细胞对 OsHV-1 的亲嗜性较强。部分个体鳃丝样本出现轻度肿胀, 肿胀的鳃丝中有血淋巴细胞浸润, 并观察到病毒阳性信号, 推测杂交信号正是来源于浸润的血淋巴细胞(图 7)。肝胰腺器官的组织病变和病毒杂交信号在各发病个体中稳定出现, 推荐肝胰腺作为毛蚶感染 OsHV-1 组织病理、原位 LAMP 检测的首选目标器官。

### 3 讨论

贝类养殖产业是我国海水养殖产业的重要组成部分, 特别是 20 世纪 80 年代, 以扇贝养殖为驱动力掀起的我国海水养殖第三次浪潮, 引领了我国海水养殖产业的跨越式发展。自 20 世纪 90 年代以来, 贝类养殖产量在海水养殖总产量中的占比稳居 70%以上

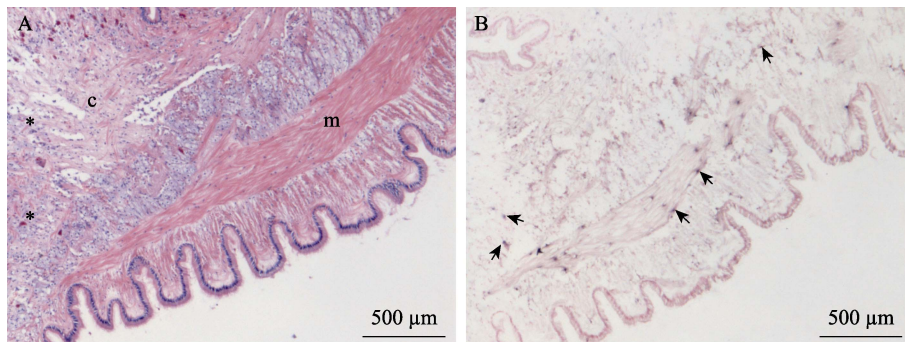


图 4 外套膜原位 LAMP 检测结果  
Fig.4 *In situ* LAMP detection in the mantle

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测

m: 肌肉组织; c: 结缔组织; \*: 血细胞浸润; 黑色箭头示病毒杂交信号。

A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection

m: Muscle; c: Connective tissue; \*: Infiltrated haemocytosis; Black arrows show OsHV-1 signals.

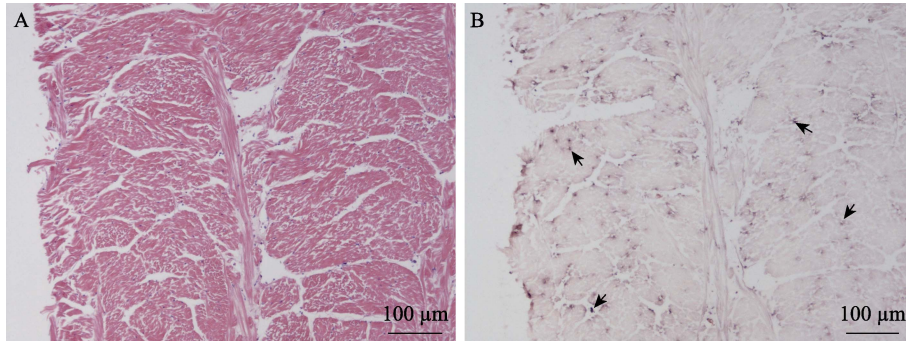


图 5 斧足原位 LAMP 检测结果  
 Fig.5 *In situ* LAMP detection in the axe foot

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测  
 图 B 中的黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞。  
 A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection  
 Black arrows in Fig.B show OsHV-1 signals.

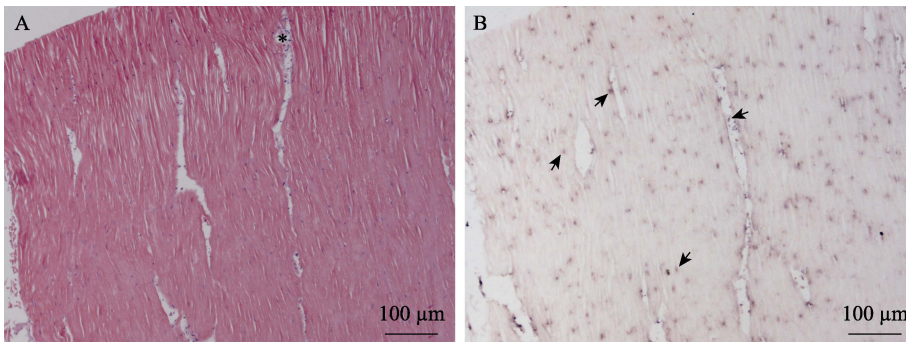


图 6 闭壳肌原位 LAMP 检测结果  
 Fig.6 *In situ* LAMP detection in the muscle

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测  
 \*: 血细胞浸润; 黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞。  
 A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection  
 \*: Haemocyte infiltration; Black arrows show OsHV-1 signals.

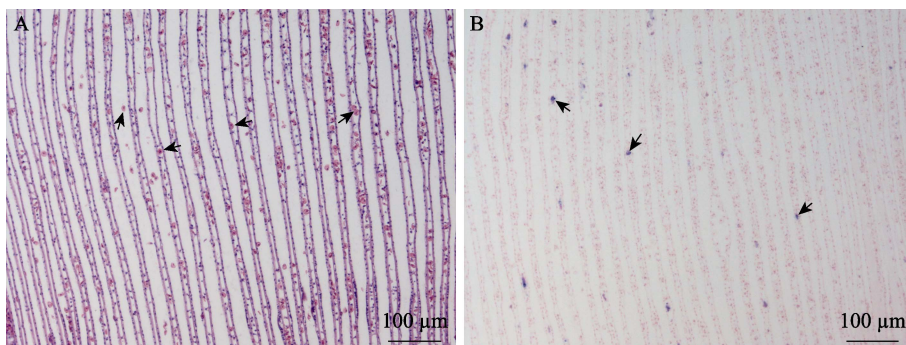


图 7 鳃原位 LAMP 检测结果  
 Fig.7 *In situ* LAMP detection in the gill

A: HE 染色(黑箭头示异常增多的血淋巴细胞); B: 原位 LAMP 检测(黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞)  
 A: HE staining (Black Arrows show increased haemocytes); B: *In situ* LAMP detection (Black arrows show OsHV-1 signals)

(阙华勇等, 2016)。随着贝类养殖产业总体规模的不断扩大, 养殖病害问题日益严重。据统计, 2020 年中国贝类养殖产业因疾病造成的经济损失高达 120.0 亿元(中国水生动物卫生状况报告)。OsHV-1 是近年来我国和世界贝类养殖产业面临的一种主要病毒性病原, 其具有宿主范围广、变异株频繁出现等特点(Arzul *et al.*, 2017; 白昌明等, 2021; 张淑敏等, 2020), 这给该病毒的流行病学调查和防控工作带来了极大挑战。对重要病原微生物易感宿主的准确认定, 是制定有效疫病防控措施的前提。2014 年, OIE 对水生动物疾病易感宿主的标准进行了修订, 至少满足以下 3 个原则才能被认定为易感宿主: 病例来源于自然感染或无创人工感染实验(混养、浸浴或投喂), 通过注射等侵害性人工感染方式、浸浴时病原浓度高于自然环境或水体理化条件异于自然水体(如高温)等条件下发生的病例不能用于易感性评估; 病原微生物的种类得到充分鉴定; 有明确证据表明病原微生物在宿主体内发生复制, 或病原微生物寄生部位伴有感染发生(OIE, 2021)。这些原则给 OsHV-1 流行病学调查过程中适宜采用的技术手段提供了参考。原位杂交技术作为一项集 OsHV-1 分子水平种特异性与病毒组织分布原位检测于一体的技术手段, 为 OsHV-1 感染的确诊提供了一个解决方案(Lipart *et al.*, 2002)。但由于该方法操作繁琐、耗时较长, 不适合开展大规模流行病学调查工作。

原位 LAMP 技术自 2003 年被提出以来(Maruyama *et al.*, 2003), 已被应用于包括传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)(Jitrakorn *et al.*, 2016)和十足目虹彩病毒 1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)(Chen *et al.*, 2019)等水生动物病原在内的多种病原微生物检测(Hashimoto *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2011)。与传统原位杂交和原位 PCR 检测技术相比, 原位 LAMP 具有核酸扩增反应温度低、对组织破坏小, 恒温扩增不需要特殊实验设备以及实验操作更方便、快捷等优点(Maruyama *et al.*, 2003)。本研究在结合已有 OsHV-1 LAMP 特异性引物的基础上, 补充设计环引物, 构建 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法。应用该方法对 2019 年来本团队收集的非正常死亡贝类样本进行检测, 首次确认毛蚶是 OsHV-1 的易感宿主。在毛蚶外套膜、胰腺腺结缔组织, 以及富含肌肉细胞的斧足和闭壳肌中也发现较多病毒杂交信号, 推测部分肌肉组织中的病毒杂交信号来自肌细胞的细胞核。在毛蚶鳃丝中也发现病毒杂交信号, 根据信号出现的位置和细胞形态推测其来源于血淋巴细胞。

聚合酶链式反应(PCR)与荧光定量(qPCR)检测技

术由于其灵敏度高、特异性强, 并且可以进行定量检测的技术优势, 已被广泛用于 OsHV-1 等多种水生动物病原感染的筛查和确诊研究中。本研究使用的 OsHV-1 qPCR 检测方法的检测灵敏度为 6 病毒拷贝/mg 组织(Martenot *et al.*, 2010), 同时, 液相 PCR 在密闭环境下进行, 具有稳定性强的优势。本研究所使用的 LAMP 检测方法灵敏度为  $10^3$  病毒拷贝/反应(Zaczek-Moczydlowska *et al.*, 2020), 同时, 反应在开放的载破片上进行, 稳定性较差。但 qPCR 的检测需要提取病毒 DNA 作为模板, 提取过程破坏了病毒感染的组织, 且易受污染, 造成假阳性。原位 LAMP 检测技术与之相比虽然灵敏度较低, 但规避了 qPCR 无法定位病毒在组织分布的缺点。本研究结果表明, qPCR 适合开展 OsHV-1 的大规模流行病学筛查, 原位 LAMP 适合开展 OsHV-1 感染确诊研究。

20 世纪 90 年代末, 栉孔扇贝曾是我国北方最重要的海水养殖贝类之一, 年产量最高时达 60 万 t 以上, 在海水养殖产业中占有极其重要的地位(张福绥等, 1999)。由于大规模、高密度的单一品种养殖, 海区生态系统失衡, 导致病害暴发, 引起栉孔扇贝发生大规模死亡(宋微波等, 2001; 王崇明等, 2002)。对从死亡栉孔扇贝中纯化的疱疹样病毒粒子的基因组测序和系统发育关系分析的结果显示, 该疱疹病毒与 OsHV-1 为同种病毒的不同变异株, 我国学者根据其致病特点将其命名为扇贝急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV)。AVNV 与 OsHV-1 参考株基因组相似度为 97.0%。受海区生态环境失衡和 AVNV 病害的影响, 我国栉孔扇贝养殖产业迅速萎缩, 年产量最低时跌至不足 20 万 t (Guo *et al.*, 2016)。对非正常死亡栉孔扇贝开展的被动流行病学调查显示, 2001—2007 年 AVNV 感染率(>60%)和感染强度(> $10^4$  拷贝/ng 总 DNA)普遍较高(2000 年之前的样本缺失), 2008—2013 年感染率(<50%)和感染强度(< $10^3$  拷贝/ng 总 DNA)普遍下降, 2014—2020 年未检测到确诊病例(Bai *et al.*, 2015)。本研究使用新开发的 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法, 对近年来采集的栉孔扇贝样本进行检测的结果也为阴性。

长牡蛎原产于西北太平洋中韩日俄海域, 因其生长快、抗逆性强, 被引进到全球各地广泛养殖(Guo, 2009; 张国范等, 2020)。从全球范围来看, 长牡蛎也是受 OsHV-1 病害影响最严重的物种, 主要引起幼虫和幼贝的大规模死亡(Barbosa Solomieu *et al.*, 2015)。我国长牡蛎感染 OsHV-1 的案例最早报道于 2009 年, 但目前因 OsHV-1 感染引起的大规模死亡案例仅发生于幼虫阶段。福建牡蛎是长牡蛎的暖水姊妹亚种, 在



欧洲又被称为葡萄牙牡蛎(张国范等, 2020)。西班牙和葡萄牙学者从当地福建牡蛎样本中检测到 OsHV-1 核酸(López Sanmartín *et al*, 2016a、2016b), 但尚无确诊案例报道。本研究利用 qPCR 从福建牡蛎种贝中检测到低载量的 OsHV-1 DNA, 但原位 LAMP 检测结果为阴性。2 个批次的福建牡蛎样本采集自育苗场, 同期曾发生过长牡蛎幼虫感染 OsHV-1 死亡案例。推测由于场区未做好生物安保措施, 水体或环境中存在 OsHV-1 污染, 从而导致 qPCR 检测福建牡蛎种贝呈弱阳性。

OsHV-1 病害自 20 世纪 90 年代在我国发生以来, 其宿主范围不断扩大, 并随着海区生态环境等因素发生变化, 给该病毒病的防控造成困难。近年来, 我国长牡蛎三倍体人工育种和养殖规模不断扩大, OsHV-1 感染引起的幼虫死亡案例频繁发生。目前, 我们对我国大宗养殖贝类与常见野生贝类对 OsHV-1 的易感性尚不完全了解, 本研究基于原位 LAMP 技术建立了 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法, 并应用到 OsHV-1 的易感宿主调查工作中; 为后续开展 OsHV-1 流行病学、易感宿主调查和组织亲嗜性等研究提供技术支持。

## 参 考 文 献

- ALFARO A C, NGUYEN T V, MERIEN F. The complex interactions of *Ostreid herpesvirus 1*, *Vibrio* bacteria, environment and host factors in mass mortality outbreaks of *Crassostrea gigas*. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1148–1168
- ARZUL I, CORBEIL S, MORGA B, *et al*. Viruses infecting marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 147: 118–135
- BAI C M, WANG C M, XIA J Y, *et al*. Emerging and endemic types of *Ostreid herpesvirus 1* were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 98–106
- BAI C M, XIN L S, WANG C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 214–226 [白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 214–226]
- BARBIERI E S, MEDINA C D, Vázquez N, *et al*. First detection of *Ostreid herpesvirus 1* in wild *Crassostrea gigas* in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 166: 107222
- BARBOSA SOLOMIEU V, RENAULT T, TRAVERS M A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 2–10
- BATISTA F M, ARZUL I, PEPIN J F, *et al*. Detection of *ostreid herpesvirus 1* DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. *Journal of Virological Methods*, 2007, 139(1): 1–11
- CHEN X, QIU L, WANG H, *et al*. Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of decapod iridescent virus 1 (DIV1). *Viruses*, 2019, 11(4): 387
- FARLEY C A, BANFIELD W G, KASNIC Jr G, *et al*. Oyster herpes-type virus. *Science*, 1972, 178(4062): 759–760
- GAO F, JIANG J Z, WANG J Y, *et al*. Real-time quantitative isothermal detection of *Ostreid herpesvirus-1* DNA in *Scapharca subcrenata* using recombinase polymerase amplification. *Journal of Virological Methods*, 2018, 255: 71–75
- GITTENBERGER A, VOORBERGEN-LAARMAN M A, ENGELSMA M Y. *Ostreid herpesvirus OsHV-1 mu Var* in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(1): 105–109
- GUO X M, FORD S E. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2016, 371: 1689
- GUO X M. Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2009, 1(3/4): 251–259
- HASHIMOTO M, SAKAMOTO H, IDO Y, *et al*. In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Plasmodium* species in wide-range thin blood smears. *Malaria Journal*, 2018, 17: 235
- HINE P, WESNEY B, HAY B. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, 12(2): 135–142
- JITRAKORN S, ARUNRUT N, SANGUANRUT P, *et al*. In situ DIG-labeling, loop-mediated DNA Amplification (ISDL) for highly sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Aquaculture*, 2016, 456: 36–43
- LI Y N, BAI C M, LIU J L, *et al*. Establishment and application of indirect *in situ* polymerase chain reaction for detection of *Ostreid herpesvirus-1* (OsHV-1). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 679–687 [李亚楠, 白昌明, 刘金兰, 等. 牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)间接原位杂交 PCR 检测方法的建立与初步应用. *水产学报*, 2019, 43(3): 679–687]
- LIPART C, RENAULT T. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods*, 2002, 101(1/2): 1–10
- LÓPEZ SANMARTÍN M, LÓPEZ FERNÁNDEZ J R, CUNHA M E, *et al*. *Ostreid herpesvirus* in wild oysters from the Huelva coast (SW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016a, 120(3): 231–240
- LÓPEZ SANMARTÍN M, POWER D M, DE LA HERRÁN R,

- et al.* Evidence of vertical transmission of ostreid herpesvirus 1 in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016b, 140: 39–41
- MARTENOT C, ODEN E, TRAVAILLÉ E, *et al.* Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1/2): 86–89
- MARUYAMA F, KENZAKA T, YAMAGUCHI N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx<sub>2</sub>* gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5023–5028
- MORTENSEN S, STRAND A, BODVIN T, *et al.* Summer mortalities and detection of Ostreid herpesvirus microvariant in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 117(3): 171–176
- MURO-CACHO C A. *In situ* PCR. Overview of procedures and applications. *Frontiers in Bioscience*, 1997, 2(3): 15–29
- NICOLAS J, COMPS M, COCHENNEC N. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1992, 12(1): 11–13
- OIE. Criteria for listing species as susceptible to infection with a specific pathogen. In: OIE. Aquatic animal health code. OIE Publications Unit Paris, 2021, 1–4
- OIE. Infection with Ostreid herpesvirus 1 micro variants. In: OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. OIE Publications Unit Paris, 2019, 1–14
- QUE H Y, ZHANG G F. Status and trend of molluscan mariculture techniques in China. *Studia Marina Sinica*, 2016(1): 69–76 [阙华勇, 张国范. 我国贝类产业技术的现状与发展趋势. *海洋科学集刊*, 2016(1): 69–76]
- REN W C, WANG C M, CAI Y Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of acute viral necrotoxic virus in scallop *Chlamys farreri*. *Acta Virologica*, 2009, 53(3): 161–167
- RODGERS C, ARZUL I, CARRASCO N, *et al.* A literature review as an aid to identify strategies for mitigating ostreid herpesvirus 1 in *Crassostrea gigas* hatchery and nursery systems. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 565–585
- ROSANI U, YOUNG T, BAI C M, *et al.* Dual analysis of virus-host interactions: The case of Ostreid herpesvirus 1 and the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Evolutionary Bioinformatics*, 2019, 15: 1–8
- SONG W B, WANG C M, WANG X H, *et al.* New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*. *Marine Science*, 2001, 25(12): 23–26 [宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. *海洋科学*, 2001, 25(12): 23–26]
- WANG C M, WANG X H, SONG X L, *et al.* Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 180–184 [王崇明, 王秀华, 宋晓玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察. *水产学报*, 2002, 26(2): 180–184]
- WHITTINGTON R, HICK P, EVANS O, *et al.* Pacific oyster mortality syndrome: A marine herpesvirus active in Australia. *Microbiology Australia*, 2016, 37(3): 126–128
- YE Y, WANG B, HUANG F, *et al.* Application of *in situ* loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods. *Food Control*, 2011, 22(3/4): 438–444
- ZACZEK-MOCZYDLOWSKA M A, MOHAMED-SMITH L, TOLDRÀ A, *et al.* A single-tube HNB-based loop-mediated isothermal amplification for the robust detection of the Ostreid herpesvirus 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 6605
- ZHANG F S, YANG H S. Analysis of the causes of mass mortality of farming *Chlamys farreri* in summer in coastal areas of Shandong, China. *Marine Science*, 1999(1): 44–47 [张福绥, 杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析. *海洋科学*, 1999(1): 44–47]
- ZHANG G F, LI L, QUE H Y. An evolution of oyster mariculture industry in China: New knowledge, variety and product. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 740–749 [张国范, 李莉, 阙华勇. 中国牡蛎产业的嬗变——新认知、新品种和新产品. *海洋与湖沼*, 2020, 51(4): 740–749]
- ZHANG S M, BAI C M, XIN L S, *et al.* Gene cloning and expression of Ostreid herpesvirus 1 envelope protein (ORF111). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 183–190 [张淑敏, 白昌明, 辛鲁生, 等. 牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白(ORF111)的基因克隆及表达. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 183–190]

(编辑 马瑾艳)

## Survey of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) Susceptible Hosts Based on *in situ* LAMP Technique

ZHANG Xiang<sup>1,2</sup>, GU Li<sup>1,2</sup>, ZHENG Yudong<sup>2,3</sup>, LI Chen<sup>2</sup>, BAI Changming<sup>2</sup>,  
XIN Lusheng<sup>2</sup>, WANG Chongming<sup>2①</sup>, LIU Jinlan<sup>1①</sup>

(1. College of Fishery, Tianjin Agriculture University, Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China; 2. 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, Shandong 266071, China; 3. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

**Abstract** Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) has caused a serious economic loss to the global bivalve aquaculture industry. Given its wide host range and the frequent emergence of mutated strains, OsHV-1 infection threatens mollusk production. Unlike the common vertebrate herpesviruses that generally exhibit high host specificity, more than ten bivalve species have been identified as potentially susceptible to OsHV-1 infection, including members of Ostreoida, Pteroida, Arcoida, and Veneroida. A variety of OsHV-1 detection methods have been developed, such as PCR, *in situ* hybridization, *in situ* PCR, histopathology, transmission electron microscopy, ring-mediated isothermal nucleic acid amplification (LAMP), and recombinase polymerase amplification (RPA). The sensitivity and specificity of transmission electron microscopy detection are low, and specific complementary detection methods such as PCR are needed to confirm the occurrence of OsHV-1. *In situ* hybridization, although highly specific, has the disadvantages of low sensitivity, complicated procedures, and high investment of effort. PCR methods are still the most widely used for epidemiological investigation of OsHV-1. However, PCR cannot alone confirm infection, which has led to the emergence of unconfirmed cases of OsHV-1 infection in many species and regions. According to the World Organization for Animal Health's (OIE) Aquatic Animal Manual, positive nucleic acid-specific detection combined with histopathology and transmission electron microscopy is required for the confirmed diagnosis of OsHV-1 infection. Other detection methods, such as LAMP and RPA, which use nucleic acid amplification alone to detect OsHV-1, can not confirm infection as the presence of nucleic acids is not equivalent to viral infection. As a result, the susceptibility of several bivalve species to OsHV-1 infection has not been evaluated. Instead, several obstacles remain with regards to the development of epidemiological surveillance programs and the implementation of quarantine, prevention, and control measures for OsHV-1 infection. Compared with traditional *in situ* hybridization and *in situ* PCR assays, *in situ* LAMP has the advantages of low nucleic acid amplification reaction temperature, less damage to tissue, constant temperature amplification that does not require special experimental equipment, and more convenient and efficient experimental design. In this study, we selected a set of LAMP primers designed for specific detection of OsHV-1, and a pair of loop primers were designed to improve the specificity and stability of the LAMP reaction on slides. An optimized *in situ* LAMP method for OsHV-1 detection was developed, which provides a rapid diagnostic method with high specificity and sensitivity to identify hosts that are potentially susceptible to OsHV-1 infection, and to characterize the distribution pattern and tissue affinity of the virus in new hosts. The

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn; LIU Jinlan, E-mail: ljlan1115@163.com

optimized protocol and quantitative PCR (qPCR) were then used to detect OsHV-1 infection in bivalve samples (*Crassostrea gigas*, *C. angulata*, *Chlamys farreri*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Ruditapes philippinarum*, and *Scapharca subcrenata*) collected from 2019 to 2021. OsHV-1 hybridization signals were observed in *S. subcrenata* samples alone, although positive qPCR results were obtained in more species. Further investigation of pathological characteristics and associated viral hybridization signals indicated that OsHV-1 infection always occurred in fibroblasts and hemocytes in the connective tissues of the mantle and hepatopancreas, nucleus of muscle cells in the foot, and adductor muscle. Signals were also occasionally observed in infiltrated hemocytes between and within the gill filaments. OsHV-1 hybridization signals were observed within the hemocytes infiltrating several organs of the furcula visceral cluster. The hemocytes of *S. subcrenata* seem to be particularly susceptible to OsHV-1 infection. Histopathological lesions and viral hybridization signals in the hepatopancreas organ were consistently observed in individuals with clinical signs, and we recommend the hepatopancreas as the preferred target organ for histopathological and *in situ* LAMP assays for OsHV-1 infection in *S. subcrenata*. *In situ* LAMP-based detection indicated that *S. subcrenata* was a susceptible host for OsHV-1, and the connective tissue, muscle tissue, and hemolymph cells had a strong affinity for the virus. At present, the susceptibility of many cultured and wild shellfish to OsHV-1 infection is still unknown. Since the emergence of mollusk mortalities associated with OsHV-1 infection occurred in China in the 1990s, its host range has expanded and changed along with the environment, which has complicated its prevention and control. In recent years, the scale of artificial breeding and cultivation of triploid *C. gigas* has expanded in China, and larval mortalities are frequently associated with OsHV-1 infection. The *in situ* LAMP detection method for OsHV-1 infection developed in this study proved to be convenient and fast and could be a valuable tool for the rapid detection and confirmation of OsHV-1 infection.

**Key words** Ostreid herpesvirus 1; *In situ* LAMP; Susceptibility; Epidemiological study