

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240402002

http://www.yykxjz.cn/

徐瑞东, 夏继涛, 李萍, 余星潼, 姚亮, 李文强, 贾田畅, 张庆利. 2022—2023年虾类传染性肌坏死病毒(IMNV)流行情况调查. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 183–193

XU R D, XIA J T, LI P, YU X T, YAO L, LI W Q, JIA T C, ZHANG Q L. Investigation of the prevalence of infectious myonecrosis virus (IMNV) from 2022 to 2023. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 183–193

2022—2023年虾类传染性肌坏死病毒(IMNV) 流行情况调查*

徐瑞东^{1,2} 夏继涛¹ 李萍¹ 余星潼¹ 姚亮¹
李文强¹ 贾田畅¹ 张庆利^{1①}

(1. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所)

青岛海洋科技中心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; 2. 中国农业科学院 北京 100081)

摘要 2020年,由传染性肌坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)引起的虾类传染性肌坏死(infectious myonecrosis, IMN)首次在中国暴发,使对虾养殖产业遭受了严重的经济损失。为掌握近年IMNV在我国的流行情况,2022—2023年间,本研究在全国主要虾类养殖地区开展了IMNV流行病学调查,并利用分子生物学、组织病理学等方法对所采集的样本进行分析。在山东、江苏、浙江、海南、天津、广西、福建、河北等地开展流行病学调查并采集样品829份,所采集的样品包括凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)、日本对虾(*P. japonicus*)、中国对虾(*P. chinensis*)与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等主要养殖虾类以及饵料、其他水产经济物种和养殖用水。采用TaqMan探针实时荧光定量PCR(TaqMan RT-qPCR)对所采集的样品进行了IMNV检测。调查中发现,患病对虾腹节或尾节骨骼肌出现IMN感染样的典型斑块状或弥散性白色坏死症状,凡纳对虾、日本对虾、中国对虾等主要养殖虾类中均可检测到IMNV阳性,阳性样品主要来自环渤海地区的山东、河北、天津等省市;除养殖虾类外,采集的虾类鲜活饵料(主要是中华卤虫 *Artemia sinica*)和养殖场抽滤的近海海水中也可检测到IMNV阳性。2022年所采集样品中IMNV阳性检出率为6.27%(23/367),2023年所采集样品中IMNV阳性检出率为15.80%(73/462)。对TaqMan RT-qPCR检测呈阳性的样品进行组织病理与原位杂交分析,病虾腹节和尾节发白肌肉组织切片中可见IMNV感染特征性凝固状坏死,且发生病理损伤的肌肉组织中有明显的IMNV探针蓝紫色杂交信号。本研究表明,2022—2023年间我国多省市的养殖对虾、生物饵料及近海海水中存在较高的IMNV阳性检出率,虾类养殖过程中需加强IMNV检测与监测预警,以降低其进一步扩散与流行危害风险。

关键词 传染性肌坏死病毒(IMNV); 流行病学; TaqMan RT-qPCR; 组织病理; 组织原位杂交
中图分类号 S945.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2025)01-0183-11

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39; 2021XT0602; 2023TD42)、中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022022024)和国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)共同资助。徐瑞东, Email: ruidongxu9@163.com

① 通信作者: 张庆利, 研究员, Email: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-04-02, 收修改稿日期: 2024-04-24

水产养殖集约化与多样化为养殖动物病毒性疾病的暴发提供了便利条件,在过去20年里,重大和新发虾类传染病的传播对全球对虾养殖业构成了严重威胁。其中,由传染性肌坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)引发的传染性肌坏死(infectious myonecrosis, IMN)于2020年传入我国境内引发疫情(Wan *et al.*, 2023),导致北方沿海养殖对虾遭受了严重产量损失。

IMN最早发生于2002年巴西东北部皮奥伊州的凡纳对虾养殖场,患病对虾腹节骨骼肌出现局部或弥散状白色坏死病灶,部分对虾坏死的肌肉会变红,坏死肌肉内主要的病理变化为肌肉组织中出现凝固状坏死、血细胞浸润和淋巴器官球状体异位等,其时美国亚利桑那大学研究者对这种新疾病进行了跟踪研究,并证实该病的病原体为IMNV(Tang *et al.*, 2005)。2006年,印度尼西亚多地养殖凡纳对虾出现腹节肌肉不透明和发白等类似IMN的症状,随后被证实为IMNV感染(Senapin *et al.*, 2007)。此后,IMN在印度尼西亚的东爪哇岛、巴厘岛和西爪哇岛等主要对虾养殖地区被报道(Tauhid *et al.*, 2009)。2016—2021年间,IMNV先后传入印度和埃及,并引起当地养殖凡纳对虾发病(Sahul Hameed *et al.*, 2017; Aly *et al.*, 2021)。IMNV的传播、扩散开始引起全球主要对虾养殖国家的广泛关注,目前该病已被世界动物卫生组织(WOAH)收录为需通报的疾病。

IMNV粒子为二十面体,直径约为40 nm,在氯化铯中浮力密度为1.366 g/mL(Poulos *et al.*, 2006),病毒具有一个等轴衣壳,该衣壳由120个亚单位组成(Tang *et al.*, 2008)。病毒基因组由一个7 561~8 230 bp的双链RNA分子组成(闫冬春等, 2009; Poulos *et al.*, 2006),病毒基因组中有2个非重叠开放阅读框架(ORFs)(Tang *et al.*, 2008):ORF1前半部分编码一个RNA结合蛋白,后半部分编码一个分子质量约为106 kDa的衣壳蛋白;ORF2编码一个RNA依赖的RNA聚合酶(Senapin *et al.*, 2007)。

IMNV的主要易感宿主包括凡纳对虾、虎纹对虾(*P. esculentus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)和南方褐虾(*Farfantepenaeus subtilis*)(Coelho *et al.*, 2009)。另外,斑节对虾(*P. monodon*)、细角滨对虾(*P. stylirostris*)为IMNV的疑似易感宿主,但目前有关这2种对虾满足WOAH《水生动物法典》中对易感宿主定义的资料尚不完整(Tang *et al.*, 2005)。卤虫是确认的IMNV传播媒介生物(Iunes *et al.*, 2021),双壳类和多毛动物被认为是IMNV传播的可能媒介载体(AAHED Advisory,

2019)。IMNV在海鸟肠道和粪便中可能仍有传染性,并通过海鸟粪便或病虾残体在养殖场内和养殖场之间传播(Vanpatten *et al.*, 2004)。迄今为止,IMNV仅在养殖对虾中被报道,其在野生种群中的存在尚未得到证实(WOAH, 2021)。不同生长阶段的对虾,包括早期幼体、幼体、仔虾以及生长期对虾等均可被IMNV感染。IMNV还可与罗氏沼虾野田村病毒(MrNV)、白斑综合征病毒(WSSV)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)共同感染凡纳对虾(Oktaviana *et al.*, 2014),且不同病毒之间会发生竞争,如感染WSSV的对虾体内IMNV的载量较低(de Freitas *et al.*, 2024)。IMNV可通过患病个体间的蚕食行为或经病原污染的水体进行水平传播,自然感染IMNV的雄性对虾个体的精子细胞存活率低,且感染IMNV的雌虾卵巢阳性率为100%,因此,通常认为母本是IMNV垂直传播的源头(Jha *et al.*, 2021)。

Utomo等(2023)开展了益生菌防控IMNV感染研究,发现应用益生菌合成制剂可增强对虾对IMNV感染的抵抗能力。但从实践角度看,对虾疾病发生后的治疗效果往往不佳,而开展广泛流行病学调查,查明病原分布和流行规律,在此基础上研发可检测所有株系的检测方法进行早期检测和预警,可能才是应对包括IMNV在内的对虾病原扩散和危害的高效策略(Chaivisuthangkura *et al.*, 2013)。

作者实验室通过系统调查研究发现,IMNV变种(CN-20-1)可能经由被染病的IMNV亲体自泰国传入我国,2020年导致辽宁对虾养殖遭受了IMN冲击(Wan *et al.*, 2023)。为查明IMNV在我国养殖对虾中流行的趋势,本研究2022—2023年间开展沿海省市养殖对虾IMNV流行病学调查,对采集来自山东、江苏、浙江、海南、天津、广西、福建、河北等地的829份样品进行分子生物学与组织病理学分析,以期为我国养殖对虾IMNV防控提供第一手的流行病学基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

对于虾类样品,在养殖现场用一次性解剖刀将虾类头胸部沿着中心均分切成2份,取1/2头胸部和尾节肌肉保存在4%多聚甲醛溶液(4% PFA)中用于后续组织病理学分析,剩余头胸部与尾部肌肉切碎混匀保存于RNA Later固定液(天根生物,中国)中,用于IMNV分子生物学检测。

对于其他物种样品,用一次性解剖刀将其切碎后取组织混样,并保存于RNA Later固定液中,用于IMNV分子生物学检测。

养殖用水样品则采用便携式 eDNA 采样器 (Smith-Root, 美国) 进行抽滤, 其中滤膜的孔径大小为 0.45 μm , 抽滤结束后, 将滤膜保存于 RNA Later 固定液中, 用于 IMNV 分子生物学检测。

1.2 RNA 提取和纯化

用无菌的镊子或牙签取出保存于 RNA Later 中的样品组织, 放入 1.5 mL 的无菌无酶离心管中用 RNase-free H_2O 清洗, 用吸水纸吸去多余水分后采用 RNAiso plus (TaKaRa, 中国) 法抽提样本的总 RNA; 最后, 利用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测量所制备 RNA 的浓度和纯度。

保存于 RNA Later 固定液的滤膜用 QiaGen 公司的 Allprep DNA/RNAMini Kit 进行 RNA 提取, RNA 浓度和纯度的检测方法同上。

1.3 利用 TaqMan RT-qPCR 方法检测样品中 IMNV

采用 WOA 的《水生动物诊断试验手册》(2021) 中 IMNV 的 TaqMan RT-qPCR 的引物与探针 (表 1) 检测样品中的 IMNV。反应体系为 20 μL 。各组分及用量如下: 一步法预混液 15.04 μL (立见生物, 中国), 引物 IMNV-412F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , 引物 IMNV-545R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , 探针 IMNV-p1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , RNA-free H_2O 2.76 μL , 核酸模板 1 μL 。在冰上配制反应体系。利用 QuantStudio3 实时荧光定量 PCR 仪进行 TaqMan RT-qPCR 扩增, 扩增前模板 95~100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3~5 min。反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 进行反转录; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 变性延伸共 40 个循环。病毒拷贝数根据此前建立的标准曲线公式计算 (赵文秀, 2023)。

表 1 IMNV TaqMan RT-qPCR 的引物和探针序列
Tab.1 Primer and probe sequences of IMNV TaqMan RT-qPCR

引物名称 Name of primer	引物和探针序列 Sequences of primer and probe (5'~3')
IMNV-412F	GGACCTATCATAATAGCGTTGCA
IMNV-545R	AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT
IMNV-p1	FAM-CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG-TAMRA

1.4 样品阳性检出率计算

不同年份不同地区样品中 IMNV 阳性检出率计算公式为:

$$\frac{\text{某年份某地区IMNV阳性的样品数}}{\text{该年份该地区的总样品数}} \times 100\%$$

不同年份不同种类样品中 IMNV 阳性检出率计算公式为:

$$\frac{\text{某年份某种类IMNV阳性的样品数}}{\text{该年份该种类的总样品数}} \times 100\%$$

1.5 组织病理学观察

选取 TaqMan RT-qPCR 检测呈阳性的样品进行组织切片病理学观察。具体步骤: 样品置于 4% PFA 组织固定液中固定 12~24 h, 然后转移至 70% 乙醇中, 按照组织样本处理标准流程, 对样本进行脱水、包埋和切片处理, 制备组织病理切片 (Bell *et al*, 1988)。根据常规组织切片染色方法 (Zhang *et al*, 2005) 对切片进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 随后利用 Nikon Eclipse E80i 显微镜 (Nikon, 德国) 对组织切片进行观察和拍照。

1.6 原位杂交分析

参照 Wan 等 (2023) 报道的方法制备 IMNV 的

RNA 探针, 并利用 IMNV 的 RNA 探针和组织切片进行组织原位杂交 (ISH) 和显色, 对原位杂交显色后的切片进行核固红复染和封片, 然后, 在 Nikon Eclipse E80i 显微镜下进行观察 (Liu *et al*, 2017)。

2 结果与分析

2.1 样品采集情况

2022—2023 年所采集样品的信息见表 2~表 5。

2022 年从山东、江苏、浙江、海南、天津和广西及其临近海域共采集样品 367 份 (表 2、表 5), 其中凡纳对虾、罗氏沼虾、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)、鹰爪虾 (*Trachypenaeus curvirostris*) 和斑节对虾等虾类样品 276 份 (表 3), 其他生物包括对虾饵料生物, 如环节动物门的双齿围沙蚕 (*Perinereis aibuhitensis*); 近海海洋动物, 如脊索动物门的半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、木叶鲷 (*Pleuronichthys cornutus*)、海鲢 (*Elops saurus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 以及软体动物门的菲律宾帘蛤 (*Ruditapes philippinarum*)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、贻贝 (*Mytilus edulis*)、魁蚶 (*Anadara broughtonii*)、红皱岩螺 (*Rapana venosa*)、短蛸 (*Octopus ocellatus*)、中国枪乌贼 (*Loligo chinensis*) 等样品 91 份 (表 4)。

2023年从山东、海南、天津、福建和河北等地及其临近海域共采集462份样品(表2、表5),其中凡纳对虾、日本对虾、中国对虾、鹰爪虾、斑节对虾与虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)等虾类样品356份(表3),其他生物包括对虾饵料生物,如节肢动物门的中华卤虫(*Artemia sinica*)、环节动物门(Annelida)的双齿围沙蚕、原腔动物门(Protocoelomata)的褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*);近海海洋动物,如脊索动物门的银鲳(*Pampus argenteus*)、绿鳍鱼(*Chelidonichthys kumu*),节肢动物门的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、赤甲红(*Charybdis japonica*),软体动物门的强肋锥螺(*Turritella fortilirata*)、猫眼蝾螺(*Turbo petholatus*)、贻贝、文蛤(*Meretrix meretrix*)、毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)、菲律宾帘蛤、太平洋牡蛎、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)、红皱岩螺、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、真蛸(*Octopus vulgaris*)、中国枪乌贼,以及海水等样品共计106份(表4)。

表2 样品采集省市及数量信息

Tab.2 The distribution of sampling sites and amount of samples

省市 Province and City	2022	2023
山东 Shandong	122	317
江苏 Jiangsu	50	/
浙江 Zhejiang	48	/
海南 Hainan	52	21
天津 Tianjin	59	46
广西 Guangxi	36	/
福建 Fujian	/	23
河北 Hebei	/	55
总计 total	367	462

表3 虾类样品种类及数量信息

Tab.3 The information of the type and number of shrimp samples

虾类样品 Shrimp samples	2022	2023
凡纳对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	167	325
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	91	/
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	/	8
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	/	6
脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>	7	/
鹰爪虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i>	7	5
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	4	8
虾蛄 <i>Oratosquilla oratoria</i>	/	4
总计 Total	276	356

表4 水产经济物种生物种类及数量信息

Tab.4 The information of other seafood organism species and population

种类 Samples	2022	2023
中华卤虫 <i>Artemia sinica</i>	/	3
双齿围沙蚕 <i>Perinereis aibuhitensis</i>	20	3
轮虫 <i>Rotifer</i>	/	1
脊索动物门 Chordata	32	4
节肢动物门 Arthropoda	/	12
软体动物门 Mollusca	39	68
海水 Seawater	/	15
总计 Total	91	106

表5 样品采集月份及数量信息

Tab.5 Information on the month and number of samples collected

月份 Months	2022	2023
一月 Jan.	/	/
二月 Feb.	/	27
三月 Mar.	75	9
四月 Apr.	/	40
五月 May.	11	19
六月 Jun.	88	45
七月 Jul.	76	98
八月 Aug.	14	109
九月 Sep.	93	/
十月 Oct.	/	23
十一月 Nov.	10	86
十二月 Dec.	/	6
总计 Total	367	462

2.2 凡纳对虾 IMNV 感染临床症状

图1是采集自河北黄骅对虾养殖场的凡纳对虾, TaqMan RT-qPCR 检测显示, 图1A 凡纳对虾个体为 IMNV 阴性, 图1B 凡纳对虾个体为 IMNV 阳性。如图1所示, 图1A 的凡纳对虾无明显的 IMNV 感染临床症状, 图1B 的凡纳对虾个体腹节肌肉弥散状坏死(图1B, 白色箭头处)且尾节肌肉发白坏死, 呈现明显的 IMNV 感染临床症状。

2.3 IMNV 的流行区域分析

对流行病学调查中所采集的样品进行 TaqMan RT-qPCR 检测, 并将样品检测结果按照采样年份和区域进行分析, 结果如图2所示。2022年不同省市样品中 IMNV 阳性检出率分别为: 天津 16.95% (10/59)、

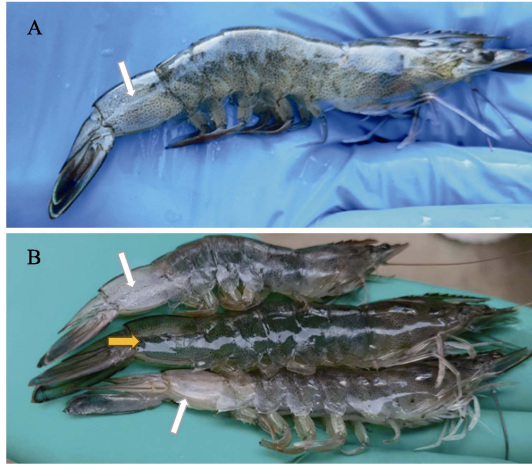


图 1 患 IMN 凡纳对虾临床症状

Fig.1 Clinical symptoms of IMNV infection in *P. vannamei*

A: 患病凡纳对虾(样品编号: 20230227007)外观图片;
B: 患病与健康凡纳对虾对比图: 样品编号: 上 20230227006(患病)、中 20230227016(健康)、下 20230227007(患病)。
图 A 凡纳对虾腹节(含尾节)肌肉呈弥散状坏死。图 B 上下 2 尾凡纳对虾尾节(白色箭头处)肌肉坏死, 呈现发白症状。图 B 中间位置的凡纳对虾的腹节及尾节(黄色箭头处)透明, 无明显的临床症状。

A: External image of diseased *P. vannamei* (Sample No: 20230227007); B: Comparing images of healthy and diseased *P. vannamei*: Sample No: Upper 20230227006(diseased), Middle 20230227016 (healthy), Lower 20230227007 (diseased).

In Fig. A, the abdominal segment (including the telson) muscles of the shrimp show diffuse necrosis, with the muscles at the white arrow appearing distinctly white and necrotic. In contrast, the *P. vannamei* at the top and bottom sites in Fig. B exhibit a pale body color, with the tail segment (white arrow) having white, opaque muscle tissue, showing a diffuse pattern of necrosis. In the middle shrimp in Fig. B, the tail segment of *P. vannamei* (yellow arrow) is transparent, with no apparent clinical symptoms.

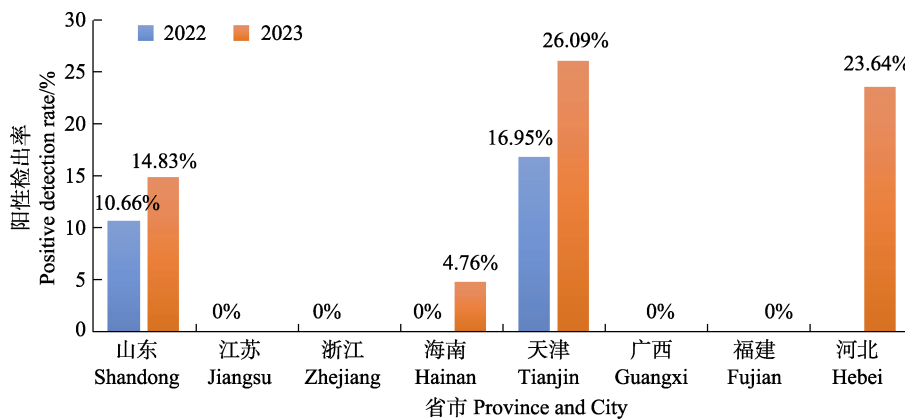


图 2 2022—2023 中国不同省份 IMNV 阳性检出率

Fig.2 The IMNV positive detection rates in different provinces of China in 2022–2023

山东 10.66% (13/122)、江苏 0.00% (0/50)、浙江 0.00% (0/48)、海南 0.00% (0/52)和广西 0.00% (0/36); 2023 年不同省市样品中 IMNV 阳性检出率分别为: 河北 23.64% (13/55)、天津 26.09% (12/46)、山东 14.83% (47/317)、福建 0.00% (0/23)和海南 4.76% (1/21)。

从不同地理区域来源样品的检测结果看, 河北、天津和山东等环渤海省市主要对虾养殖地区 2022 年 IMNV 的阳性检出率为 16.83%(17/101), 而 2023 年 1—4 月该病毒阳性检出率增长为 59.54% (78/131), 这说明 IMNV 已在环渤海对虾养殖地区普遍流行。同时, 2023 年采集自海南的对虾样品中开始出现 IMNV 阳性检出。

2.4 IMNV 流行物种分析

对流行病学调查中所采集的样品进行 TaqMan RT-qPCR 检测, 将样品检测结果按照所采集的虾类品种进行分析, 结果如图 3 所示。2022 年多种虾类样品的 IMNV 阳性检出率如下: 凡纳对虾 13.77% (23/167)、罗氏沼虾 0.00% (0/91)、脊尾白虾 0.00% (0/7)和鹰爪虾 0.00% (0/7); 2023 年多种虾类品种样品中 IMNV 阳性检出率如下: 凡纳对虾 13.85% (45/325)、日本对虾 87.50%(7/8)、中国对虾 66.67% (4/6)和鹰爪虾 0.00%(0/5)。

对流行病学调查中所采集的样品进行 TaqMan RT-qPCR 检测, 将样品检测结果按照生物分类学进行分类后分析, 结果如图 4 所示。2022 年多种水产品样品中 IMNV 阳性检出率均为 0.00%的样品种类, 包括环节动物门(0/20)、脊索动物门(0/32)、软体动物门(0/39)。其中环节动物门的样品种类为双齿围沙蚕(0/20), 脊索动物门的样品种类包括半滑舌鳎 (0/5)、木叶鲷(0/6)、海鲢(0/15)和小黄鱼(0/6), 软体动物门的样品种类包括红皱岩螺(0/7)、贻贝(0/6)、魁蚶(0/6)、菲律宾帘蛤(0/6)、太平洋牡蛎(0/6)、短蛸(0/6)和中国枪乌贼(0/2)。

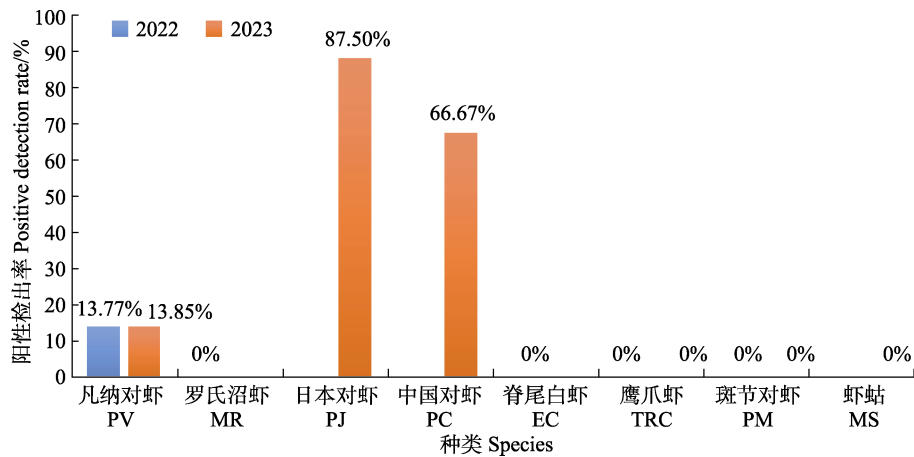


图3 2022—2023 多种虾类品种 IMNV 阳性检出率

Fig.3 The IMNV positive detection rates for multiple shrimp species in 2022–2023

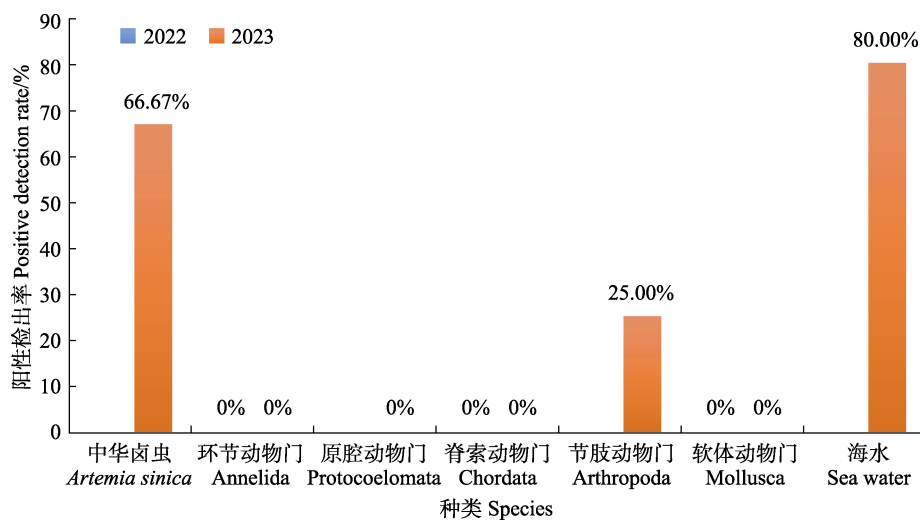


图4 2022—2023 多种水产经济物种 IMNV 阳性检出率

Fig.4 The IMNV positive detection rates for multiple fish products in 2022–2023

2023 年多种水产品样品中 IMNV 阳性检出率如下：节肢动物门 33.33% (5/15)、海水 80.00% (12/15)，其余样品的 IMNV 阳性检出率均为 0.00%，包括环节动物门(0/3)、原腔动物门(0/1)、脊索动物门(0/4)、软体动物门(0/68)。其中，节肢动物门的样品种类为中华卤虫 66.67%(2/3)、三疣梭子蟹 42.86%(3/7)和赤甲红 0.00% (0/5)，环节动物门的样品种类为双齿围沙蚕(0/3)，原腔动物门的样品种类为轮虫(0/1)，脊索动物门的样品种类为银鲳(0/2)、绿鳍鱼(0/2)，软体动物门的样品种类为锥螺(0/5)、猫眼螺(0/5)、红皱岩螺(0/3)、贻贝(0/14)、文蛤(0/5)、毛蚶(0/5)、菲律宾帘蛤(0/6)、太平洋牡蛎(0/5)、皱纹盘鲍(0/3)、缢蛏(0/10)、真蛸(0/2)和中国枪乌贼(0/5)。

2.5 患病对虾的组织病理学观察及原位杂交分析

对在 TaqMan RT-qPCR 检测中呈 IMNV 阳性的虾

类样品进行组织病理和原位杂交分析。组织病理切片经 HE 染色的结果显示，患病凡纳对虾尾节肌肉组织发生凝固状样坏死(图 5A、B)，并伴有核固缩现象(图 5B)；ISH 分析结果显示，在肌肉坏死病灶部位可观察到大量 IMNV 探针的蓝紫色杂交信号(图 5C、D)。

3 讨论

在过去的十多年里，随着养殖规模的快速扩张，我国养殖虾类新疫病不断出现。包括病毒性偷死病 (VCMD)(Zhang *et al.*, 2014)[也称作持续性死亡综合征(running mortality syndromes, RMS)]、急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)(黄桂仙等, 2024) 虾肝肠胞虫病 (*Enterocytozoon hepatopenaei* disease, EHPD)(刘珍等, 2016; 余星潼等, 2024)、十足目虹彩病毒病 1 (decapod

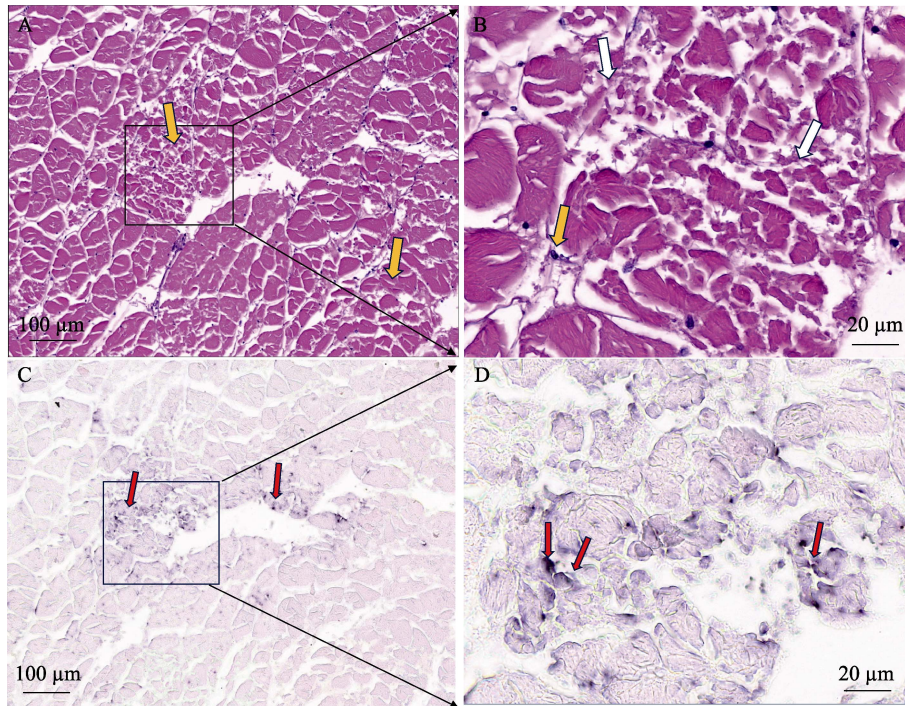


图 5 凡纳对虾尾节肌肉的组织病理及原位杂交图片

Fig.5 Histopathology and *in situ* hybridization (ISH) analysis of the caudal ganglion muscles of *P. vannamei*

A: 凡纳对虾(样品编号: 20230227007)尾节肌肉的组织病理切片(HE 染色);

B: 图 A 中方框内肌肉严重坏死区域局部放大 5 倍后的图片, 可见肌肉呈现凝固状坏死(白色箭头)和核固缩现象(黄色长箭头);

C: 凡纳对虾尾节肌肉组织的原位杂交图片, 蓝紫色示 IMNV 探针的杂交信号;

D: 图 C 中方框内肌肉严重坏死区域局部放大 5 倍后的图片, 可见肌肉坏死区域有大量蓝紫色 IMNV 探针的阳性杂交信号。

A: Histopathological sections of *P. vannamei* (Sample No: 20230227007) tail segment muscle (HE staining);

B: Local magnification (5 × magnification) of the severely necrotic area of the muscle in Fig.A, the muscle shows coagulated necrosis (white arrow) and nuclear pyknosis (long yellow arrow); C: ISH images of *P. vannamei* tail segment muscle tissue;

D: Local magnification (5 × magnification) of the severely necrotic area of the muscle in Fig.C, shows positive hybridisation signals of the blue-violet IMNV probe in the area of muscle necrosis.

iridescent virus 1, DIV1, 早期被称作 shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)(Srisala *et al.*, 2021; Qiu *et al.*, 2017)玻璃苗弧菌病(translucent post-larvae disease, TPD)(Zou *et al.*, 2020)等在内的新发疫病先后在我国养殖对虾中出现, 给养殖对虾业绿色高质量发展造成了严重影响。但截至 2020 年初, 我国养殖对虾中尚未见有 IMN 发生或危害的报道(Wan *et al.*, 2023)。

IMN 最早在南美洲养殖对虾中发生, 其病原 IMNV 目前已传播至美洲、亚洲和非洲的多个对虾养殖国家并引发严重 IMN 疫情, 使当地养殖对虾遭受重大经济损失。IMNV 在巴西出现后, 当地养殖对虾产量下降了 40% (de Andrade, 2016); 2006 年扩散至印度尼西亚后, 在当地对虾养殖规模不断扩张的情况下, 也引起对虾总产量下降了 38% (De Andrade, 2016)。2016 年以来, 巴西的帕拉州、马拉尼昂州、皮奥伊州、塞拉州、北里奥格兰德州、阿拉戈亚州、

塞尔吉普州和巴伊亚州等地养殖对虾出现了新的 IMNV 毒株, 相比于早期 IMNV 毒株, 其导致患病对虾更快死亡且死亡率更高(累积死亡率可达 80%) (Andrade *et al.*, 2022)。2016 年, 印度西孟加拉邦、泰米尔纳德邦等对虾养殖地区发生了较大规模的 IMN 疫情, 患病对虾呈现典型 IMN 症状, 发病池塘对虾死亡率为 20%~50% (Suryakodi *et al.*, 2022); 2019 年, 印度安得拉邦和泰米尔纳德邦的患病对虾在套式 PCR 第 1 轮检测中即呈现 IMNV 强阳性, 患病对虾呈现典型 IMN 症状(Jithendran *et al.*, 2021)。2020 年, 辽宁丹东市一对对虾养殖场被证实发生了严重的 IMN 病害, 这是我国养殖凡纳对虾中首次出现 IMN 疫情 (Wan *et al.*, 2023)。2021 年, IMNV 被证实已传播到了非洲, 埃及毗邻地中海沿岸的 2 个省(Damietta 和 North Sinai)的多个对虾养殖场患病对虾表现出典型的 IMN 症状(Aly *et al.*, 2021)。IMNV 在全球的广泛传

播,给多个对虾养殖国家带来严重的水生生物安全威胁,开始引起世界主要对虾养殖国家和地区的重视。

本研究针对我国主要虾类养殖地区的 IMNV 流行病学调查结果表明,采集自环渤海地区包括山东、河北和天津等省市的水产动物样品中可以检测出 IMNV,除环渤海地区外,采集自海南的对虾样品中也检测到 IMNV 阳性。作者实验室前期研究发现,截至 2021 年底我国境内 IMNV 尚未在除辽宁外的对虾养殖区大范围扩散(Wan *et al.*, 2023)。本研究的结果表明,IMNV 在环渤海地区已扩散至河北、天津和山东等地,并在海南养殖对虾中流行和存在,说明 IMNV 已在环渤海对虾养殖地区普遍流行。作者在流行病学现场调查中发现,2022—2023 年 IMN 在河北、天津和山东等省市多地持续发生,如 2022 年冬,河北和天津海水工厂化养殖凡纳对虾中 IMN 发生率超过 90%;2023 年春夏季受 IMN 疫情冲击,山东东营海水工厂化对虾养殖场 IMN 发生率超过 80%,当年大部分海水工厂化对虾养殖场转产或停产。IMNV 在环渤海地区的广泛传播和危害,使该地区 1 333 km² 以上养殖对虾面临巨大的 IMN 疫情暴发风险。尽管本研究未在 2022—2023 年采集自江苏、浙江、福建和广西等省市的样品中检测到 IMNV 阳性,但考虑到河北、天津和山东对虾育苗企业规模不断扩张,该病毒通过苗种销售扩散至我国沿海和内陆其他对虾养殖地区的风险仍不容忽视。

本研究的结果显示,2022 年所采集的样品中 IMNV 阳性检出率为 6.27% (23/367),2023 年所采集的样品中 IMNV 阳性检出率为 15.80% (73/462)。相较于 2022 年,2023 年的 IMNV 阳性检出率显著升高,这说明 IMNV 仍在快速传播,未来其流行范围可能会进一步扩大,流行率也可能会持续上升。从不同种类样品中 IMNV 的阳性检出率来看,2022 年 IMNV 主要在凡纳对虾中检出 13.77% (23/167),2023 年情况发生了明显变化,日本对虾和中国对虾中阳性检出率最高,分别为 87.50% (7/8)和 66.67% (4/6),凡纳对虾样品中 IMNV 阳性检出率仍维持在 13.85% (45/325)。除了对虾外,重要海水养殖甲壳类如三疣梭子蟹以及重要饵料生物中华卤虫中也有 IMNV 阳性检出,考虑到三疣梭子蟹的生态位以及中华卤虫在甲壳类生产中的重要作用,二者携带进而传播 IMNV 的风险不容忽视。

调查中发现,山东、河北和天津等地海水工厂化养殖对虾 IMN 的发生与渤海近岸海水被 IMNV 污染有密切关系。本研究通过对渤海湾海水的检测,发现养殖用水在 IMNV 检测中呈现阳性。2022 年

夏秋季,渤海毗邻的山东滨州和东营养殖对虾中开始出现 IMN 疫情,到 2023 年 4 月初,渤海毗邻滨州、东营的近岸海水(养殖场进水口)中 IMNV 浓度约在 371 拷贝/ μ L RNA (折合 14.8 拷贝/mL 海水)—58 100 拷贝/ μ L RNA (折合 2 324 拷贝/mL 海水)之间。调查中还了解到,山东滨州和东营使用渤海近岸海水的对虾工厂化养殖场发生 IMN 疫情的比例超过 80%,而使用地下水的对虾工厂化养殖场发生 IMN 疫情的比例不到 20%。上述检测和调查结果说明,海水(或其浮游生物、悬浮物等)中可能有残留的活性 IMNV 能引起对虾感染。联合国粮农组织(Tang *et al.*, 2019)印发的《对虾 IMNV 防控手册》中指出,IMN 发病池塘养殖水体需要经过 50 mg/L 氯制剂消毒方可向环境中排放,避免 IMNV 随水体排放到环境中造成扩散。本研究关于养殖海水中 IMNV 高拷贝检出的结果以及联合国粮农组织指导意见表明,我国对虾养殖从业者也需要高度关注对虾养殖废水排放所导致的 IMNV 传播扩散风险。

本研究还在用作凡纳对虾饵料的中华卤虫样本中检测到 IMNV 阳性,这表明 IMNV 有较大的可能感染中华卤虫或被其携带;中华卤虫是重要的对虾饵料,中华卤虫样品中 IMNV 阳性检出提醒养殖从业者将来也需关注中华卤虫传播 IMNV 的风险。对鱼类、贝类以及螺类样品进行 IMNV 的 TaqMan RT-qPCR 检测发现,这些样品中均未检测到 IMNV 阳性,初步判断这些种类不是 IMNV 传播扩散的重要媒介。

综上所述,IMNV 已扩散到环渤海主要对虾养殖省市以及海南省,导致养殖对虾遭受了重要经济损失,使我国对虾养殖生物安全面临新的威胁。为遏制 IMN 疫情快速传播势头,最大限度降低 IMN 对我国养殖对虾产业的影响,保障对虾种业和养殖过程安全,建议渔业主管部门和养殖从业者强化 IMNV 检测与监测预警,注意养殖用水消毒处理,防止海水以及饵料生物传播 IMNV 所致的 IMN 疫情扩散和持续流行危害风险。

参 考 文 献

- AAHED Advisory. Soil and water quality management for shrimp farming. CIBA, 2019, 19-01, 11
- ALY S M, MANSOUR S M, THABET R Y, *et al.* Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2021, 143: 57-67
- ANDRADE T P D, CRUZ-FLORES R, MAI H N, *et al.* Novel

- infectious myonecrosis virus (IMNV) variant is associated with recent disease outbreaks in *Penaeus vannamei* shrimp in Brazil. *Aquaculture*, 2022, 554(Suppl C): 738159
- BELL T A L, LIGHTNER D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, 1988
- CHAIVISUTHANGKURA P, SENAPIN S, WANGMAN P, *et al.* Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test. *Archives of Virology*, 2013, 158(9): 1925–1930
- COELHO M G L, SILVA A C G, NOVA C M V V, *et al.* Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN). *Aquaculture*, 2009, 294(1/2): 1–4
- DE ANDRADE T P. IMNV: History and pathogen profile. FAO/NFTEC/YSFRI workshop on emergency preparedness and response and contingency planning, 2016, Beijing, China
- DE FREITAS J O, VIANA J T, ROCHA R D S, *et al.* Quantitative real-time PCR reveals viral interference between white spot syndrome virus (WSSV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2024, 579: 740159
- HUANG G X, LI X P, TIAN J T. Estimation of genetic parameters for growth and acute hepatopancreatic necrosis resistance in different strains of *Penaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(6): 133–143 [黄桂仙, 李旭鹏, 田吉腾. 凡纳对虾不同品系生长和急性肝胰腺坏死病抗性遗传参数估计. *渔业科学进展*, 2024, 45(6): 133–143]
- IUNES R S, BRANCO P C, PRESSINOTTI L N, *et al.* Does the heterotrophic system influence the cellular immune response of *Litopenaeus vannamei* shrimp? *In vitro* phagocytosis indices and superoxide anion production comparisons. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2021, 2: 100009
- JHA R K, BABIKIAN H, KRISTINA, *et al.* Managing infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Vannamei* shrimp culture: Learning by doing. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2021, 9(1): 385–391
- JITHENDRAN K P, NAVANEETH KRISHNAN A, JAGADEESAN V, *et al.* Co-infection of infectious myonecrosis virus and *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* farms in the east coast of India. *Aquaculture Research*, 2021, 52(10): 4701–4710
- LIU S, LI J T, TIAN Y, *et al.* Experimental vertical transmission of covert mortality nodavirus in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of General Virology*, 2017, 98(4): 652–661
- LIU Z, ZHANG Q L, WAN X Y, *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]
- OKTAVIANA A, WIDANARNI, YUHANA M. The use of synbiotics to prevent IMNV and *Vibrio harveyi* co-infection in *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2014, 21(3): 127–134
- POULOS B T, TANG K F J, PANTOJA C R, *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, 2006, 87(4): 987–996
- QIU L, CHEN M M, WAN X Y, *et al.* Characterization of a new member of Iridoviridae, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11834
- SAHUL HAMEED A S, ABDUL MAJEED S, VIMAL S, *et al.* Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(12): 1823–1830
- SENAPIN S, PHEWSAIYA K, BRIGGS M, *et al.* Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 2007, 266(1/2/3/4): 32–38
- SRISALA J, SANGUANRUT P, THAIUE D, *et al.* Infectious myonecrosis virus (IMNV) and decapod iridescent virus 1 (DIV1) detected in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2021, 545: 737262
- SURYAKODI S, AHMED A N, BADHUSHA A, *et al.* First report on the occurrence of white spot syndrome virus, infectious myonecrosis virus and *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* reared in freshwater systems. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(5): 699–706
- TANG J H, OCHOA W F, SINKOVITS R S, *et al.* Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(45): 17526–17531
- TANG K F J, PANTOJA C R, POULOS B T, *et al.* *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 63(2/3): 261–265
- TANG K, BONDAD-REANTASO M G, ARTHUR J R. Shrimp infectious myonecrosis strategy manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2019.
- TAUKHID, NUR'AINI Y L. Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2009, 61(3): 255–262
- UTOMO A S, YUHANA M, WIDANARNI W, *et al.* Immune

- response, gene expression, and intestinal microbial composition of Pacific white shrimp fed with multispecies synbiotic for the prevention of coinfection disease. *Aquaculture International*, 2023, 31(1): 53–64
- VANPATTEN K A, NUNAN L M, LIGHTNER D V. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, 2004, 241(1/2/3/4): 31–46
- WAN X Y, XIE G S, WANG C, *et al.* A confirmed case of infectious myonecrosis virus (IMNV) infection in cultured *Penaeus vannamei* in China. *Aquaculture*, 2023, 577: 739953
- WOAH. Aquatic code online access. Infection with infectious myonecrosis virus, 2021, 2.2.5
- YAN D Q, TANG K F J, LIGHTNER D V. Advance in penaeid shrimp infectious myonecrosis. *Marine Sciences*, 2009, 33(9): 89–91 [闫冬春, TANG K F J, LIGHTNER D V. 对虾传染性肌坏死病研究进展, *海洋科学*, 2009, 33(9): 89–91]
- YU X T, WAN X Y, JIA T C, *et al.* Epidemiological survey of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in cultured shrimp along the coast of China from 2021 to 2022. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 146–154 [余星潼, 万晓媛, 贾田畅, 等. 2021—2022 年我国沿海养殖虾类中虾肝肠胞虫(EHP)流行病学调查. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 146–154]
- ZHANG Q L, LIU Q, LIU S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 12): 2700–2709
- ZHANG X W, YAP Y L, DANCHIN A. Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus. *Archives of Virology*, 2005, 150(1): 1–20
- ZHAO W X. Preparation of three RNA virus standard samples of shrimp and molecular repidemiological investigation of covert mortality nodavirus (CMNV). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2023 [赵文秀. 虾类三种 RNA 病毒标准品的制备及偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2023]
- ZOU Y, XIE G S, JIA T C, *et al.* Determination of the infectious agent of translucent post-larva disease (TPD) in *Penaeus vannamei*. *Pathogens*, 2020, 9(9): 741

(编辑 马璀璨)

Investigation of the Prevalence of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) from 2022 to 2023

XU Ruidong^{1,2}, XIA Jitao¹, LI Ping¹, YU Xingtong¹, YAO Liang¹,
LI Wenqiang¹, JIA Tianchang¹, ZHANG Qingli¹①

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center; Key Laboratory of Marine Aquaculture Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 2. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Infectious muscle necrosis (IMN) caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) broke out for the first time in Chinese shrimp in 2020, causing substantial economical loss to the shrimp farming industry. To understand the prevalence of Chinese IMNV in recent years, an epidemiological survey of IMNV was conducted in major Chinese shrimp farming areas between 2022–2023. Samples were analyzed using molecular biology and histopathology. A total of 829 samples were collected from Shandong, Jiangsu, Zhejiang, Hainan, Tianjin, Guangxi, Fujian, and Hebei. These samples included major farmed shrimp species, such as *Penaeus vannamei*, *P. japonicas*, *P. chinensis*, and *Macrobrachium rosenbergii*, as well as live feed, other aquatic economic species, and culture water. TaqMan real-time quantitative fluorescence RT-PCR (TaqMan RT-qPCR) was used for molecular detection. The skeletal muscle of diseased shrimp exhibited the typical plaque or diffuse white necrosis symptom of IMNV infection. IMNV was detected in major farmed shrimp

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

species such as *P. vannamei*, *P. japonicus*, and *P. chinensis*. The positive samples were mainly distributed in Shandong, Hebei, Tianjin, and other provinces or cities around the Bohai Sea. In addition to farmed shrimp, IMNV-positive shrimp live bait (mainly *Artemia*) and offshore seawater filtered close to the farm was also detected. The IMNV-positive rates of samples collected in 2022 and 2023 were 6.27% (23/367) and 15.80% (73/462), respectively. The IMNV-positive TaqMan RT-qPCR samples were further analyzed using histopathological and *in situ* hybridization methods. The characteristic coagulation necrosis of IMNV infection was found in the white muscle tissue sections of the ventral and caudal segments of the diseased shrimp, with a clear blue-violet hybridization signal of the IMNV probe in the muscle tissue with pathological damage. The results of this study indicated a high positive rate of IMNV in cultured shrimp, biological live bait, and offshore seawater in many Chinese provinces between 2022–2023. Detection, monitoring, and early warning of IMNV infection in the shrimp farming process should be strengthened to reduce the risk of further spread and IMN epidemics.

Key words Infectious myonecrosis virus (IMNV); Epidemiology; TaqMan RT-qPCR; Tissue histopathology; *In situ* hybridization