

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230215002

http://www.yykxjz.cn/

余星潼, 万晓媛, 贾田畅, 夏继涛, 徐婷婷, 姚亮, 赵文秀, 张庆利. 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

YU X T, WAN X Y, JIA T C, XIA J T, XU T T, YAO L, ZHAO W X, ZHANG Q L. Epidemiological investigation of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in shrimp cultured along the coast of China from 2021 to 2022. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(4): 146–154

2021—2022 年我国沿海养殖虾类中 虾肝肠胞虫(EHP)流行病学调查*

余星潼^{1,2} 万晓媛² 贾田畅² 夏继涛² 徐婷婷²
姚亮² 赵文秀² 张庆利^{2①}

(1. 湖州师范学院生命科学院 浙江 湖州 313000;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室
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 山东 青岛 266071)

摘要 2013 年以来,我国沿海各省市养殖对虾中先后出现虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)感染且感染率居高不下,使我国虾类养殖产业遭受了严重经济损失。为查明 2021—2022 年沿海省市养殖虾类中 EHP 的流行情况,本研究在沿海地区开展了养殖虾类 EHP 流行情况调查,共采集样品 936 份,并采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR (TaqMan qPCR)和组织病理检测对样品进行分析。TaqMan qPCR 检测结果表明,2021 和 2022 年所采集的虾类样品中, EHP 的阳性检出率分别为 10.67% (54/506)和 13.72% (59/430);2021 和 2022 年主要在凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)中检出 EHP 阳性,阳性检出率分别为 14.10% (54/383)和 16.71% (58/347),且检出 EHP 阳性的凡纳对虾主要来自山东、辽宁、广东、河北和天津等省市;1 份脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)样品中检出 EHP 阳性,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、克氏原螯虾(*Procambarus cruentus*)、斑节对虾(*P. monodon*)、日本对虾(*P. japonicus*)和中国对虾(*P. chinensis*)等虾类样品中未检出 EHP 阳性。对 TaqMan qPCR 检测呈阳性的凡纳对虾进行组织病理检测,在其肝胰腺上皮细胞中观测到分散或成簇的 EHP 孢子以及处于生长阶段的 EHP 原质团。本研究表明,2021—2022 年 EHP 仍在我国沿海地区养殖的凡纳对虾中流行,尽管其流行率较前几年呈下降趋势,但其对凡纳对虾养殖产业的危害仍不容忽视。

关键词 虾肝肠胞虫(EHP); 流行病学调查; TaqMan 实时荧光定量 PCR (TaqMan qPCR); 组织病理
中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)04-0146-09

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 微孢子虫属(*Enterocytozoon*),是一类主要寄生于对虾
在分类上属于肠微孢子虫科(Enterocytozoonidae)、肠 肝胰腺上皮细胞的微孢子虫(Texier et al, 2010)。EHP

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39; 2021XT0602)、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。余星潼, E-mail: yuxingtong998@163.com

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

收稿日期: 2023-02-15, 收修改稿日期: 2023-04-07

最早发现于泰国生长迟缓的斑节对虾(*Penaeus monodon*)中(Chayaburakul *et al*, 2004); Tourtip 等(2009)根据其组织学、超微结构等特征, 将其正式命名为 EHP。成熟的 EHP 孢子呈卵圆形或梨形, 大小为 $0.7\ \mu\text{m}\times 1.1\ \mu\text{m}$, 其基本结构由孢壁、锚定盘、孢原质、极丝、细胞核、极质体、核糖体和后极泡等组成。该病原靶组织为虾类肝胰腺, 感染后引起虾类肝胰腺微孢子虫病(Hepatopancreatic microsporidiosis, HPM) (Salachan *et al*, 2016; Flegel *et al*, 2018)。

EHP 主要感染斑节对虾、凡纳对虾(*P. vannamei*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和太平洋蓝对虾(*P. stylirostris*)(Tangprasittipap *et al*, 2013; Jang *et al*, 2022), 日本对虾(*P. japonicus*)也是 EHP 的疑似易感宿主(Tangprasittipap *et al*, 2013; Thitamadee *et al*, 2016)。卤虫(*Artemia salina*)、桡足类(Copepoda)、多毛类(Polychaetes)均可携带 EHP, 因此, 对虾养殖中使用鲜活或冷冻的卤虫、桡足类和多毛类等存在传播 EHP 的风险(Tang *et al*, 2015; 叶键等, 2017; 丁慧昕等, 2018)。EHP 也可以通过含有孢子的虾类粪便和养殖水进行传播(Pan *et al*, 2018; Tang *et al*, 2016; Salachan *et al*, 2016; Karthikeyan *et al*, 2019、2020)。除水平传播方式外, Khac 等(2018)通过 PCR 检测和组织病理学分析发现, EHP 或可经由阳性的亲虾垂直传播给子代。目前, EHP 在全球流行的范围广泛, 泰国、印度、文莱、越南、印度尼西亚、马来西亚、韩国和委内瑞拉等亚洲(Thitamadee *et al*, 2016; Rajendran *et al*, 2016)和美洲国家皆存在 EHP 的广泛流行, 并且检出率呈逐年上升趋势(Biju *et al*, 2016; Moser *et al*, 2022)。2013 年, 我国河北、天津等地养殖的凡纳对虾最早检出 EHP 阳性(刘宝彬等, 2017), 2014 年, 在海南、江苏和山东等地养殖凡纳对虾中也同样检出 EHP 阳性(刘珍等, 2016); 随后, EHP 在全国主要对虾养殖区包括山东、河北、江苏、上海、浙江、福建、广东、海南和新疆等地养殖凡纳对虾中流行(农业部渔业渔政管理局等, 2018)。EHP 感染对虾后, 虽不会引起死亡, 但会导致其肝胰腺上皮细胞坏死和破裂, 致使肝胰腺消化吸收功能下降和营养储存功能受损, 从而引起对虾生长迟缓甚至停滞(Röszer, 2014; Santhoshkumar *et al*, 2017), 由此大大降低对虾产量, 严重影响对虾养殖业的绿色高质量发展(刘雅梅等, 2017)。

EHP 个体极其微小, 且其感染对虾的早期症状不明显, 较难通过光学显微镜观察或凭症状现场确诊, 因此, 常采用实验室的检测方法进行诊断。组织病理切片染色后可对 EHP 感染中后期的组织病理变化进

行观察, 但在感染早期难以利用该方法确诊 EHP 感染, 且组织切片制作时间长、流程复杂, 不适合作为 EHP 检测的便捷技术手段。相比之下, 分子生物学方法具有快速、简便和灵敏度高等特点, 已成为实验室检测 EHP 的常用手段(李英瑕等, 2022)。

本研究于 2021—2022 年在我国沿海地区开展养殖虾类 EHP 流行情况调查, 利用 TaqMan 实时荧光定量 PCR (TaqMan qPCR)方法对所采集的虾类样品进行分子生物学检测, 并对 EHP 阳性样品进行组织病理分析, 以期阐明 2021—2022 年 EHP 在我国沿海省市主要养殖虾类中的流行情况, 明确 EHP 对养殖虾类的危害风险。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集时, 用一次性解剖刀将虾类个体的头胸部纵向一分为二, 其中 1/2 保存在 4% PFA 固定液中用于后续组织病理学分析, 剩余样品部分切碎混匀保存于 95%乙醇固定液中, 用于 TaqMan qPCR 的检测。

1.2 DNA 提取

取 30 mg 保存在 95%乙醇固定液中的样品, 利用海洋动物组织基因组 DNA 试剂盒(天根, 北京)按照试剂盒操作手册提取样品的总 DNA。然后, 使用微量分光光度计 NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Waltham, 美国)测量总 DNA 的浓度和纯度。

1.3 利用 TaqMan qPCR 方法检测样品中 EHP

参照中华人民共和国水产行业标准(行 SC/T 7232 - 2020)推荐的 TaqMan qPCR 方法, 采用 Fast Start Essential DNA Probes Master 试剂盒(罗氏, 中国)对 EHP 靶基因片段进行检测。检测中用到的引物序列见表 1。

表 1 EHP TaqMan 荧光定量 PCR 方法所用引物序列
Tab.1 Primer sequences of EHP TaqMan qPCR

引物/探针 Primers	引物/探针序列 Primer/Probe sequences (5'~3')
EHP-157-F	AGTAAACTATGCCGACAA
EHP-157-R	AATTAAGCAGCACAAATCC
EHP-157-P	FAM-TCCTGGTAGTGTCCTTCCGT-TAMRA

在冰上配制 TaqMan qPCR 体系, 总体积为 20 μL , 各组分用量如下: 2 $\times$ Master Mix 10 μL , RNA-free H₂O 7.6 μL , 引物 EHP-157-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μL 、EHP-157-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μL , 探针 EHP-157-P

(10 μmol/L) 0.2 μL, EHP 阳性模板 1 μL。

利用 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 仪进行 TaqMan qPCR 扩增,反应程序设置:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。

1.4 组织病理学观察

选择 TaqMan qPCR 检测呈阳性的样品进行组织切片和病理学观察。将保存在 4%-PFA 固定液中的样品(已固定 12~24 h)转移至 70%乙醇中,然后,按照已报道的方法制备病理切片。并进行苏木精-伊红(HE)染色。使用 Nikon Eclipse E80 光学显微镜(日本)对出现明显病理变化的部位进行观测并拍照记录。

2 结果

2.1 流行病学调查与样品采集情况

2021 年主要在山东、海南、江苏、辽宁、河北、新疆等省(自治区)的虾类养殖地区开展调查和样品采集。调查发现,北方沿海省份养殖户反映发病对虾中生长迟缓现象较为常见。在上述省份共采集各类虾类样品 506 份,包括凡纳对虾、斑节对虾、日本对虾、脊尾白虾和罗氏沼虾(表 2 和表 3)。

2022 年主要在山东、江苏、河北、浙江,天津、广西、辽宁、海南等省市(自治区)虾类养殖地区开展调查和样品采集,调查依然发现,北方省市养殖户反映发病对虾生长迟缓现象较多。2022 年共采集 430 份虾类样品,包括凡纳对虾、斑节对虾、脊尾白虾、日本对虾、罗氏沼虾和克氏原螯虾(表 2 和表 3)。

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	样品数量 Amount of samples	
	2021	2022
山东 Shandong	266	154
江苏 Jiangsu	93	41
海南 Hainan	5	33
辽宁 Liaoning	20	41
河北 Hebei	2	24
湖南 Hunan	2	
新疆 Xinjiang	15	
广西 Guangxi		35
广东 Guangdong	103	31
天津 Tianjin		70
浙江 Zhejiang		1
总计 Total	506	430

表 3 样品种类及数量信息
Tab.3 The information of sampling species and amount of samples

虾种类 Shrimp species	样品数量 Amount of samples	
	2021	2022
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	383	347
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	91	34
克氏原螯虾 <i>Protoparce crucei</i>	2	1
斑节对虾 <i>P. monodon</i>		2
日本对虾 <i>P. japonicus</i>	5	11
脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>		1
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	25	34
总计 Total	506	430

2.2 不同虾类中 EHP 阳性检出率分析

利用 EHP 的 TaqMan qPCR 方法对所采集的样品进行检测,发现在 2021—2022 年所采集的 7 种主要养殖虾类中,仅凡纳对虾和脊尾白虾样品中检出 EHP 阳性,其余虾类未检出阳性。其中,2021 年凡纳对虾中 EHP 的阳性检出率为 14.10% (54/383)、2022 年为 16.71% (58/347)。脊尾白虾样品量较少,仅在 2022 年采集到 1 份样品,样品中有 EHP 的阳性检出(图 1 和表 4)。

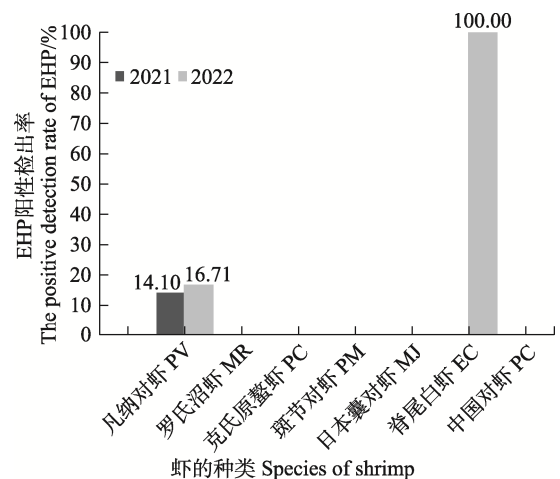


图 1 2021—2022 年不同虾类 EHP 阳性检出率
Fig.1 EHP positive detection rates in different shrimp species in 2021-2022

2.3 不同年度样品中 EHP 阳性检出率分析

对所采集虾类样品的 TaqMan qPCR 检测结果按照采样年份进行分析,结果显示,2021 和 2022 年样品中 EHP 阳性检出率分别为 10.67% (54/506)和 13.72% (59/430) (图 2、表 5),总体上,2022 年虾类样品中 EHP 阳性检出率相较于 2021 年有所上升。

表 4 2021—2022 年不同虾类 EHP 阳性检出数
Tab.4 Number of positive EHP detections for different shrimp species in 2021–2022

虾种类 Shrimp species	2021		2022	
	检测样品 Tested samples	阳性样品 Positive samples	检测样品 Tested samples	阳性检出 Positive samples
凡纳对虾 <i>P. vannamei</i>	383	54	347	58
脊尾白虾 <i>E. carinicauda</i>	—	—	1	1

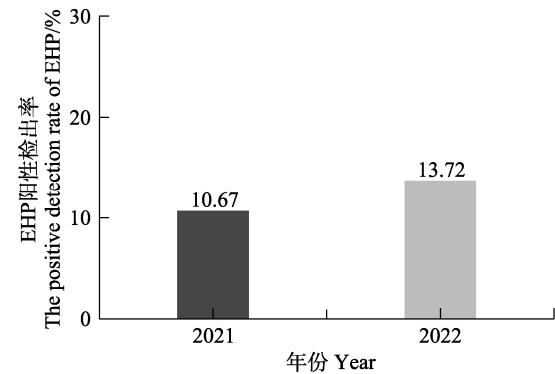


图 2 2021—2022 年 EHP 阳性检出率
Fig.2 Annual positive detection rate of EHP in 2021–2022

表 5 2021—2022 年 EHP 阳性检出数
Tab.5 Number of positive EHP detections in 2021–2022

年份 Years	检测样品 Tested samples	阳性样品 Positive samples
2021	506	54
2022	430	59

2.4 EHP 的流行区域分析

TaqMan qPCR 检测显示, 2021 年采集自山东、辽宁和广东三省的样品中存在 EHP 阳性检出, 检出率分别为 18.80% (50/266)、10% (2/20)、1.94% (2/103) (图 3 和表 6); 2022 年采集自山东、辽宁、河北和天津四省市的样品中有 EHP 阳性检出, 检出率分别为 16.88% (26/154)、14.63% (6/41)、29.17% (7/24)和 28.57% (20/70) (图 3 和表 6); 总体上看, 北方省市养殖虾类样品中 EHP 阳性检出率较高。

2.5 患病对虾肝胰腺组织病理观察结果

在显微镜高放大倍率下, 病虾肝胰腺上皮细胞内可见处于不同生活史阶段的 EHP, 如多核 EHP 原质团和聚集性孢子, 上皮细胞中也可见成熟的 EHP 孢子和待释放到肝胰腺小管管腔中的孢子(图 4B、C), 肝胰腺小管外组织间隙液中可观测到成熟的 EHP 孢子(图 4D)。

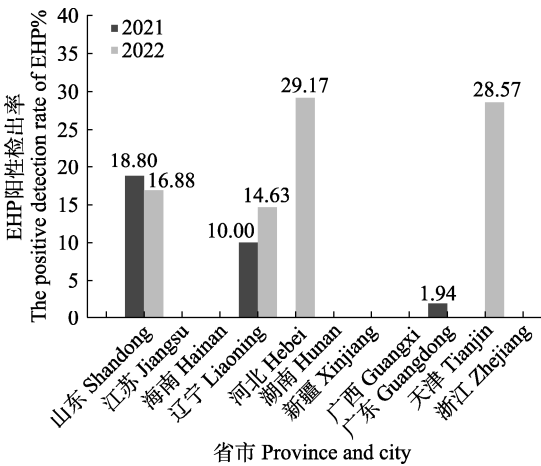


图 3 2021—2022 年 EHP 阳性检出省市
Fig.3 Provinces and cities with positive EHP detections in 2021–2022

表 6 2021—2022 年 EHP 阳性检出省市
Tab.6 Provinces and cities with positive EHP detections in 2021–2022

省市 Province and City	2021		2022	
	检测样品 Tested samples	阳性样品 Positive samples	检测样品 Tested samples	阳性样品 Positive samples
山东 Shandong	266	50	154	26
辽宁 Liaoning	20	2	41	6
河北 Hebei	2	0	24	7
广东 Guangdong	103	2	31	0
天津 Tianjin	—	—	70	20

3 讨论

2017 年起, 农业农村部国家水生动物疫病监测计划开始在全国主要对虾养殖地区开展 EHP 流行情况的监测, 其中, 2017 年在包括 12 个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团的 420 个监测点中, EHP 平均阳性检出率为 22.1% (93/420); 2018 年在包括 15 个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团采集的样品中, EHP 平均阳性检出率为 22.45% (288/1283); 2019 年在包括 15 个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团采集的样品中, EHP 平均阳性检出率为 14.5% (85/588); 2020 年在包括 9 省(直辖市)采集的样品中, EHP 平均阳性检出率为 14.7% (34/232)。从监测结果来看, EHP 的阳性检出率显著高于同时期十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1: 2018 年 12.2%, 2019 年 8.5%, 2020 年 8.8%)和致急性肝胰腺坏死弧菌(*Vibrio causing acute hepatopancreas necrosis disease*, V_{AHPND} , 2019 年及之前无监测数据, 2020 年 4.5%)这 2 种虾类

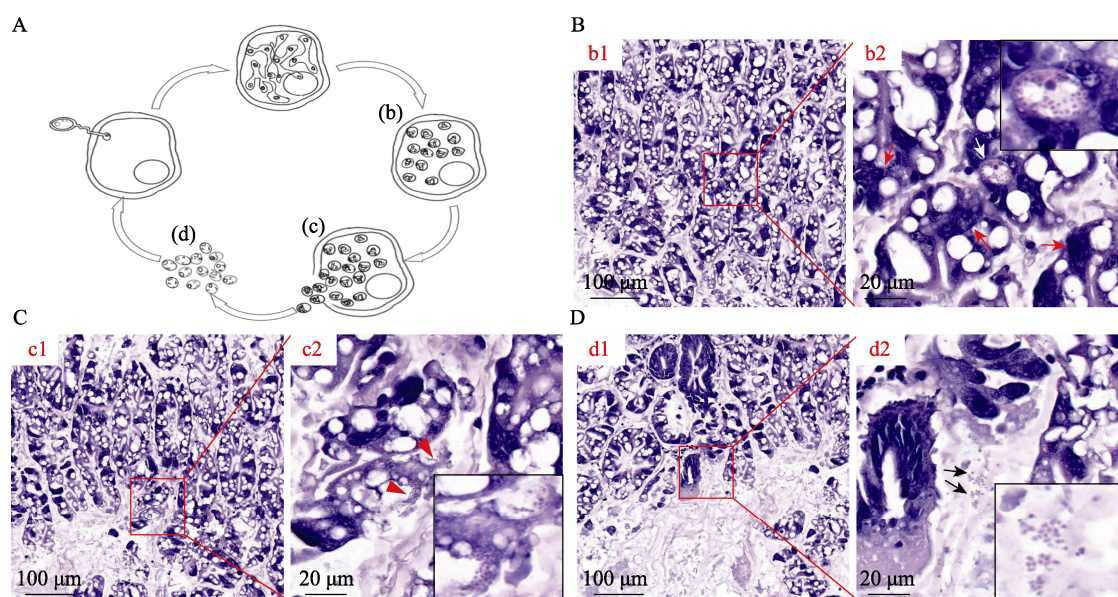


图 4 凡纳对虾肝胰腺组织中的虾肝肠胞虫的 HE 病理切片

Fig.4 HE pathological sections of shrimp EHP in hepatopancreas of *P. vannamei*

A: EHP 孢子感染宿主细胞及其胞内生命周期示意图(省略产孢原质团和孢子母细胞 2 个阶段): 孢子萌发, 极管刺破细胞膜, 将具感染性的孢原质转移到细胞质中; 孢原质进行核分裂, 而胞质未分裂, 产生分枝状的裂殖原质团; 孢子母细胞生成孢子; 宿主细胞破裂释放成熟的孢子; 宿主细胞外的成熟孢子。

图 A 中的 b~d 分别示意图 B~D 中 EHP 生活史的不同周期。

B: 被感染肝胰腺小管上皮细胞中存在 EHP 原质团(图 b2 中红色箭头所示)和聚集性孢子(如图 b2 中白色箭头所示, 并被放大后置于右上角)。其中, 图 b2 为图 b1 中局部区域的放大图。

C: 脱落的上皮细胞内含有即将释放到肝胰腺小管腔的 EHP 孢子(如图 c2 中红色三角形所示, 并被放大后置于左下角)。其中, 图 c2 为图 c1 中局部区域的放大图。

D: 游离在肝胰腺小管外血淋巴液中的 EHP 成熟孢子(如图 d2 中黑色箭头所示, 并被放大后置于左下角)。其中, 图 d2 为图 d1 中局部区域的放大图。

A: Schematic diagram of EHP spore infected host cells and their intracellular life cycles (The two stages of sporogenous mass and spore mother cell were omitted). Stages of the life cycle of EHP: Spore germination, in which the spore punctures the target host cell membrane with the polar tube and transfers the content into the cytoplasm; The sporoplasm undergoes nuclear division to generate a branched plasmodium; Spore mother cell produce the spore; The host cell ruptures to release mature spores; Mature spores outside the host cell.

b~d in Fig. A are schematic of the different periods of EHP life history from Fig. B~D, respectively.

B: EHP plasmodia (red arrows in Fig. b2) and aggregated spores (the white arrow in the Fig. b2 image, and is enlarged and placed in the upper right corner) were present in the infected hepatopancreas tubular epithelial cells.

Fig. b2 is a magnified view of the framed area in Figure b1.

C: Exfoliated epithelial cells contain EHP spores (indicated by the red triangle in Fig. c2 and zoomed in to the bottom right corner) that are about to be released into the lumen of the hepatopancreatic tubules.

Fig. c2 is a magnified view of the local area in Fig. c1.

D: Mature EHP spores (indicated by the black arrow in the Fig. d2 diagram and also shown in the magnified image at bottom right) free in the haemolymph in the extratubular interstitial fluid of the hepatopancreas.

Fig. d2 is a zoomed-in view of the local area in Fig. d1.

新发病原。2017 年以来的国家水生动物疫病监测结果显示, EHP 感染引起的 HPM 在我国主要虾类养殖区域流行分布, 包括山东、河北、广东、广西、海南、福建、江苏、浙江和天津等沿海地区以及新疆生产建设兵团所在的内陆地区; EHP 阳性检出种类主要包括凡纳对虾、斑节对虾、中国对虾和克氏原螯虾等我国

养殖甲壳动物主要经济种类(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020), 在我国流行危害形势较为严峻, 是制约我国虾类养殖业绿色高质量发展的重要疫病病原之一。2021—2022 年间, 本研究针对沿海省市 EHP 的流行与感染情况进行了调查和分析, 初步揭示了该病原最近 2 年内在我国主要养殖虾类中的流行趋势。

本研究结果显示, 2021 年沿海省市虾类样品中 EHP 的阳性检出率为 10.67%, 相比于 2017—2020 年国家水生动物疫病监测计划中 EHP 的阳性检出率呈下降趋势, 但 2022 年沿海省市虾类样品中 EHP 的阳性检出率达 13.72%, 上升到 2019—2020 年全国监测数据中 EHP 的阳性检出率水平, 即 EHP 的流行有抬头趋势, 值得引起重视。2021 年国家水生动物疫病监测计划也在全国部分虾类养殖地区开展了 EHP 流行情况的监测, 共在河北、辽宁、江苏、安徽、江西、山东、湖北和海南 8 省采集样品 92 份, 测得的 EHP 阳性检出率为 4.5% (5/92), 考虑到该年度国家水生动物疫病监测计划所分析样品的数量极为有限(92 份), 可能难以较为客观地反映我国主要虾类养殖地区的 EHP 流行情况(农业农村部渔业渔政管理局等, 2022); 2022 年国家水生动物疫病监测计划中共对在全国采集的 70 份样品进行 EHP 监测分析(监测结果尚未发布), 样品数量也非常有限。本研究分别对 2021 年和 2022 年采集自我国沿海省市的 506 份和 430 份虾类样品进行 TaqMan qPCR 检测分析, 分析的样本量较多, 检测方法特异性、灵敏性高, 因此, 检测结果更为可靠, 为全面了解我国 2021—2022 年间沿海地区主要养殖虾类中 EHP 的流行情况提供了可供参考的重要资料。

本研究对采集自不同省市样品中 EHP 的检测分析结果显示, 2021 年采集自辽宁(10%)、山东(18.80%)的样品中 EHP 阳性检出率较高, 2022 年采集自辽宁(14.63%)、河北(29.17%)、天津(28.57%)和山东(16.88%)的样品中 EHP 阳性检出率较高, 该结果说明 EHP 仍在沿海主要对虾养殖地区流行, 且北方沿海省市的流行率高于南方。这与作者在流行病学调查中从养殖户采集到的信息一致, 即北方沿海省市养殖场中 EHP 流行较为严重。2017—2018 年国家水生动物疫病监测计划中对 EHP 的监测结果显示, 该病原在广东、福建和上海等地养殖虾类中流行率最高, 2019—2021 年国家水生动物疫病监测计划中对 EHP 的监测结果显示, 该病原在辽宁、河北、山东等地养殖虾类中流行率最高(农业农村部渔业渔政管理局等, 2019、2020、2021、2022), 本研究结果也与国家水生动物疫病监测计划 EHP 监测数据的变动趋势一致。本研究结果表明, EHP 仍然是危害我国沿海地区尤其是北方养殖对虾的主要疫病病原之一。

本研究的结果还显示, EHP 主要在凡纳对虾中检出, 且阳性检出率高达 15.34%。因克氏原螯虾、斑节对虾和脊尾白虾的检测数量较少, 不符合流行病学调查的要求, 故未对以上虾类的流行情况进行进一步

的分析。在对 TaqMan qPCR 检测呈 EHP 阳性的样品进行组织病理学分析中, 患病对虾肝胰腺上皮细胞中可观测到散在或成簇的 EHP 孢子以及处于生长阶段的 EHP 原质团。尽管 EHP 感染不直接导致虾类死亡, 但能引起患病虾生长迟滞而严重影响养殖虾类产量。因此, 应继续加强虾类养殖过程中 EHP 流行情况的监测, 并积极开展无 EHP 种苗推广, 最大限度降低其对虾类养殖产业的影响。

综上所述, 2021—2022 年针对我国沿海省市以及部分内陆城市养殖虾类的流行病学调查和分子流行病学分析表明, EHP 流行率较前几年总体呈下降趋势, 说明近几年我国虾类养殖产业中对 EHP 的防控取得了显著成效; 但调查分析结果也显示, EHP 在我国北方沿海省市养殖虾类中仍广泛流行, 应进一步采取包括严格亲体和苗种 EHP 检疫, 推广无 EHP 种苗等措施, 以进一步降低 EHP 流行范围和危害风险, 助力我国虾类养殖产业的绿色高质量发展。

参 考 文 献

- BIJU N, SATHIYARAJ G, RAJ M, *et al.* High prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimps *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* sampled from slow growth ponds in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(3): 225–230
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2019 aquatic animals in China. Beijing: China Agriculture Press, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2019 中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2020 aquatic animals in China. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2020 中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2021 aquatic animals in China. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2021 中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2022 aquatic animals in China. Beijing: China Agriculture Press, 2022 [农业农村部渔业渔政管理局. 2022 中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2022]
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture, National Fisheries

- Technology Extension Center. 2017 aquatic animals in China. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2017 中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- CHAYABURAKUL K, NASH G, PRATANPIPAT P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89–96
- DING H X, SHI H, XIE J J, *et al.* Preliminary study on distribution and transmission ways of *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Litopenaeus vannamei*'s culture environment. *Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science*, 2018, 37(1): 14–19 [丁慧昕, 施慧, 谢建军, 等. 虾肝肠胞虫(EHP)在凡纳滨对虾养殖水环境中的分布情况及传播途径初步研究. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(1): 14–19]
- FLEGEL T W, SRITUNYALUUCKSANA K. Recent research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and *Enterocytozoon hepatopenaei* in Thailand. *Asian Fisheries Society*, 2018, 31(S): 57–269
- JANG G I, KIM S M, OH Y K, *et al.* First report of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) cultured in the Republic of Korea. *Animals (Basel)*, 2022, 12(22): 3149
- KARTHIKEYAN K, SUDHAKARAN R. Experimental horizontal transmission of *Enterocytozoon hepatopenaei* in postlarvae of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(3): 397–404
- KARTHIKEYAN K, SUDHAKARAN R. Exploring the potentiality of *Artemia salina* to act as a reservoir for microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* of penaeid shrimp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 25: 101607
- KHAC H V, THANH T N T, THU G N T, *et al.* Vertical transmission and early diagnosis of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2018, 12(3): 1125–1131
- LI Y X, XU T T, LIU S, *et al.* Validation of a highly sensitive kit for the rapid detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in field. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 218–225 [李英瑕, 徐婷婷, 刘爽, 等. 虾肝肠胞虫(EHP)现场快速高灵敏度检测试剂盒的性能评价研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 218–225]
- LIU B B, YANG B, LÜ X W, *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 Y M, QIU L, CHENG D Y, *et al.* The relationship of body length and weight in the *litopenaeus vannamei* populations detected *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 96–103]
- 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]
- MOSER R J, FRANZ L, FIRESTONE S M, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* real-time and shrimp MultiPath™ PCR assay validation for South-East Asian and Latin American strains of Penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2022, 149: 11–23
- PAN G Q, BAO J L, MA Z G, *et al.* Invertebrate host responses to microsporidia infections. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 83: 104–113
- RAJENDRAN K V, SHIVAM S, EZHIL PRAVEENA P, *et al.* Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 2016, 454: 272–280
- RÖSZER T. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell and Tissue Research*, 2014: 358: 685–695
- SALACHAN P V, JAROENLAK P, THITAMADEE S, *et al.* Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 2016, 13(1): 9
- SANTHOSHKUMAR S, SIVAKUMAR S, VIMAL S, *et al.* Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP - infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(4): 529–539
- TANG K F J, HAN J E, ARANGUREN L F, *et al.* Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140: 1–7
- TANG K F J, PANTOJA C R, REDMAN R M, *et al.* Development of *in situ* hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 130: 37–41
- TANGPRASITTIPAP A, SRISALA J, CHOUWDEE S, *et al.*

- The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. BMC Veterinary Research, 2013, 9: 139
- TEXIER C, VIDAUD C, VIGUÈS B, *et al.* Microsporidia: A model for minimal parasite-host interactions. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(4): 443–449
- THITAMADEE S, PRACHUMWAT A, SRISALA J, *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture, 2016, 452, 69–87
- TOURTIPT S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 21–29
- YE J, SHI L K, WANG L, *et al.* Beware that *Artemia* can carry *Enterocytozoon hepatopenaei*. Scientific Fish Farming, 2017(11): 62 [叶键, 施礼科, 王力, 等. 警惕卤虫可携带虾肝肠胞虫. 科学养鱼, 2017(11): 62]

(编辑 马瑾艳)

Epidemiological Investigation of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Shrimp Cultured Along the Coast of China from 2021 to 2022

YU Xingtong^{1,2}, WAN Xiaoyuan², JIA Tianchang², XIA Jitao², XU Tingting²,
YAO Liang², ZHAO Wenxiu², ZHANG Qingli^{2①}

(1. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences;

Key Laboratory of Marine Aquaculture Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a specialized intracellular parasitic microsporidian species that infects the hepatopancreas of shrimp and causes hepatopancreatic microsporidiosis (HPM). It was discovered in stunted *Penaeus monodon* in Thailand in 2004. It is a fungal pathogen that can infect various crustacean hosts. It affects farmed shrimp in Southeast Asia and South America, including Thailand, Vietnam, China, Indonesia, India, Malaysia, South Korea and Venezuela. An *E. hepatopenaei* infection does not cause death in shrimp, but can lead to necrosis and rupture of the hepatopancreatic epithelial cells. This results in reduced digestive and absorptive functions of the hepatopancreatic gland and impaired nutrient storage functions. Therefore, an EHP infection usually leads to shrimp growth retardation or stagnation that greatly reduces shrimp production and seriously affects the high-quality development of shrimp farming. *E. hepatopenaei* infections were detected in farmed shrimp in coastal provinces of China since 2013 and their high infection rate causes serious economic losses to the cultured shrimp industry. It is difficult to confirm EHP infections solely based on the symptoms of diseased shrimp in the field owing to the extremely small size of EHP and the lack of obvious symptoms in the early stages of EHP infection. Furthermore, the early stages of infection are difficult to accurately detect by light microscopy and histopathological sections. Pathological changes of EHP infection are only observed in the middle and later stages by histopathological sections. In addition, tissue section preparation is time-consuming and complex. This makes it unsuitable as a practical technical method to detect EHP. In contrast, molecular biology methods have become a common laboratory method to detect EHP. This study collected 936 shrimp samples from coastal areas in China from 2021 to 2022, detected EHP

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

positive samples by TaqMan quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and analyzed the morphology by histopathology. This study aims to clarify the prevalence of EHP in major shrimp farming species in coastal provinces and cities in China from 2021 to 2022, and to clarify the hazard risk of EHP in cultured shrimp.

TaqMan qPCR assays showed that the positive detection rate of EHP in shrimp samples from coastal areas was 10.67% (54/506) in 2021. There was a decreasing trend compared with the national aquatic animal disease surveillance plan from 2017 to 2020. However, the positive rate of EHP in shrimp samples from coastal areas reached 13.72% (59/430) in 2022. There was an increase in the EHP positive detection rate compared with the national surveillance data from 2019 to 2020. The detection results of EHP in samples collected from different regions showed that the positive rate of EHP was high in samples collected from Liaoning (10%) and Shandong (18.80%) in 2021, and in samples collected from Liaoning (14.63%), Hebei (29.17%), Tianjin (28.57%), and Shandong (16.88%) in 2022. The results of samples collected from different shrimp varieties showed that EHP was mainly detected in *P. vannamei* in 2021 and 2022, with positive rates of 14.10% (54/383) and 16.71% (58/347), respectively. Among them, one sample of *Exopalaemon carinicauda* was positive for EHP, while no EHP positive sample was detected in *Macrobrachium rosenbergii*, *Protocrayfish cruzi*, *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus*, and *Penaeus chinensis*. This study collected and analyzed 506 and 430 shrimp samples from coastal provinces and cities in China in 2021 and 2022, respectively by TaqMan qPCR. These detection results are more reliable than those of previous studies owing to the large sample size and the high specificity and sensitivity of the detection method. The results provided an important reference for a comprehensive understanding of the epidemic situation of EHP in major cultured shrimp in coastal areas of China from 2021 to 2022. Histopathological examination of EHP-positive *P. vannamei* revealed that scattered or clustered EHP spores and EHP protoplasts were observed in hepatopancreatic epithelial cells.

The epidemiological survey and molecular epidemiological analysis of shrimp farmed in coastal provinces, municipalities, and some inland provinces of China in 2021 to 2022 showed that the prevalence rate of EHP is generally decreasing compared to previous years. This indicated that remarkable achievements were made to prevent and control EHP in China's shrimp farming industry in recent years. However, EHP is widely prevalent in farmed shrimp in coastal provinces in Northern China. Therefore, measures such as strict EHP quarantine of brood stock and seedlings and the promotion of non-EHP seedlings should be taken to further reduce the epidemic range and risk of EHP and promote the green and high-quality development of the shrimp culture industry in China.

Key words EHP; Epidemiological investigation; TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR (TaqMan qPCR); Histopathology