

# 采用 OIE 标准检测养殖对虾中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的 PCR 检出类型\*

袁颜颜<sup>1,2</sup> 杨冰<sup>1,2①</sup> 万晓媛<sup>1</sup> 刘笋<sup>1</sup> 刘天齐<sup>1</sup> 黄捷<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 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** 利用世界动物卫生组织(OIE)推荐的4对引物(389F/R、392F/R、77012F/77353R和309F/R),通过普通PCR方法,对本实验室2011-2012年采集于国内不同地区的对虾样品进行IHHNV(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)检测,并对国内存在的IHHNV检出类型进行初步分析。检测结果显示,在凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾中均检测出了IHHNV,而在脊尾白对虾中未检出。其中凡纳滨对虾阳性率最高,中国对虾阳性检测率最低。对虾样品2011年阳性率高于2012年,华东地区高于华北、华南两地。此外,根据4对引物的检测结果,得到国内IHHNV的4种PCR检出类型。

**关键词** 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV); PCR; OIE标准; 对虾

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0067-07

传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)于1981年在美国夏威夷地区的细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中被发现,危害全球对虾养殖业,世界动物卫生组织(OIE)将其收录为需要通报的甲壳类重要疫病之一(OIE, 2012)。IHHNV能够感染多种对虾,尤其对幼虾危害明显(Kalagayan *et al*, 1991)。细角滨对虾对IHHNV有较高的致病性,感染死亡率可达100%(Lightner *et al*, 1983a、b),该病毒可使凡纳滨对虾(*L. vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)患慢性矮小残缺综合征(Runt deformity syndrome, RDS)(Kalagayan *et al*, 1991; Chayaburakul *et al*, 2004; Primavera *et al*, 2000; Bell *et al*, 1984)。

IHHNV是已知对虾病毒中最小的病毒,病毒粒子大小在20-22 nm之间,基因组序列长约4.1 kb,隶属细小病毒科(Bonami *et al*, 1990)。核酸为单链线性DNA,主要以负链的形式存在(Mari *et al*, 1993)。目前,GenBank已收录部分IHHNV地理株基因组序

列,包括了所有编码序列和大部分非编码序列,尚缺少两末端非编码序列。地理株分布于美国(GenBank: AF218266、AF273215)、中国(GenBank: AY355306、AY355307、AY355308、EF633688、JX258653)、越南(GenBank: JN616415、KC513422、JX840067)、澳大利亚(GenBank: GQ475529)、厄瓜多尔(GenBank: AY362548)、韩国(GenBank: JN377975)、泰国(GenBank: AY102034)和印度(GenBank: GQ411199)等地。

IHHNV基因型分为感染型和非感染型两种,其中感染型包括1型和2型;非感染型包括3A和3B型(Tang *et al*, 2002、2003)。1型分布于美国和东亚,主要是菲律宾;2型分布于东南亚;3A型分布于东非、印度和澳大利亚;3B型分布于印度太平洋地区包括马达加斯加、毛里求斯和坦桑尼亚(Tang *et al*, 2006、2003)。1型和2型可感染凡纳滨对虾和斑节对虾,3A型在非洲养殖斑节对虾中被发现了2个病毒镶嵌片段(Tang *et al*, 2003),后被发现于马达加斯加和

\* 国家自然科学基金(31101935)、中央级公益性科研业务费专项资金(20603022011009)、国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)和“泰山学者”建设工程专项经费共同资助。袁颜颜, E-mail: yyshzbd@126.com

① 通讯作者: 杨冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-03-19, 收修改稿日期: 2014-04-10

澳大利亚的斑节对虾样品中(Krabsetsve *et al.*, 2004); 3B 发现于坦桑尼亚的斑节对虾样品中(Tang *et al.*, 2006、2007)。Saksmerprome 等(2010)通过设计重叠引物用于扩增 IHNV 完整基因组片段, 支持了 IHNV 部分基因片段镶嵌于对虾基因当中的假设。Tang 等(2006)证实了嵌入片段(3A 和 3B)并非来源于感染性病毒, 其中 3A 是斑节对虾基因组的一部分, 对对虾没有感染性。

本研究采用 OIE 标准推荐的 4 对引物对我国近年来养殖对虾感染 IHNV 情况进行筛查, 确定病毒感染类型, 以期为该病在我国的流行病学研究和疫情监测提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 对虾及病毒样品

待检样品为 2011-2012 年间在沿海主要对虾养殖地区采集的养殖对虾仔虾、幼虾、成虾及亲虾样品。IHNV DNA 为本实验室提供。

### 1.2 试剂与材料

根据 OIE 《水生动物疾病诊断手册》(2012 版)第

2.2.2 章(OIE, 2012)的 IHNV 诊断标准中推荐的 5 对引物(表 1), 由上海生工生物工程有限公司合成。

其中, 引物对 389F/389R、309F/309R 和 392F/392R 设计于 IHNV 非结构蛋白编码区(ORF1)序列, 77012F/77353R 设计于结构蛋白和非结构蛋白(衣壳蛋白)之间区域序列(图 1), 引物对 MG831F/MG831R 设计于 IHNV 嵌入斑节对虾基因组的相应序列。

### 1.3 DNA 的提取

亲虾、成虾和幼虾样品取鳃丝, 仔虾样品取头胸部或个体, 样品重量约 25-50 mg, 按照 DNA 提取试剂盒(Tiangen 公司)说明书提取 DNA。

### 1.4 PCR

25  $\mu$ l 反应体系中包含: 10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, 2.5 mmol/L dNTP 4.0  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l 正向检测引物 0.75  $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l 反向检测引物 0.75  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司) 0.25  $\mu$ l, 样品模板 0.5  $\mu$ l。针对每一对引物的反应体系按多个样品配置后分装, 每管分别加入模板后离心去气泡, 放入 PCR 仪进行 PCR 反应。PCR 扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。1.5%琼

表 1 OIE 推荐 IHNV 引物信息  
Tab.1 IHNV primers recommended by OIE

| 引物<br>Primers | 产物<br>Product (bp) | 序列 Sequence (5'-3')    | G+C (%) | 温度<br>Temperature( $^{\circ}$ C) | GenBank 或<br>参考文献 Reference    |
|---------------|--------------------|------------------------|---------|----------------------------------|--------------------------------|
| 389F          | 389                | CGGAACACAACCCGACTTTA   | 50      | 72                               | AF218266                       |
| 389R          |                    | GGCCAAGACCAAATACGAA    | 45      | 71                               | Tang <i>et al.</i> , 2000      |
| 77012F        | 356                | ATCGGTGCACTACTCGGA     | 50      | 68                               | AF218266                       |
| 77353R        |                    | TCGTACTGGCTGTTTCATC    | 55      | 63                               | Nunan <i>et al.</i> , 2000     |
| 392F          | 392                | GGGCGAACCAGAATCACTTA   | 50      | 68                               | AF218266                       |
| 392R          |                    | ATCCGGAGGAATCTGATGTG   | 50      | 71                               | Tang <i>et al.</i> , 2000、2007 |
| 309F          | 309                | TCCAACACTTAGTCAAAACCAA | 36      | 68                               | AF218266                       |
| 309R          |                    | TGTCTGCTACGATGATTATCCA | 40      | 69                               | Tang <i>et al.</i> , 2007      |
| MG831F        | 831                | TTGGGGATGCAGCAATATCT   | 45      | 58                               | DQ228358                       |
| MG831R        |                    | GTCCATCCACTGATCGGACT   | 55      | 62                               | Tang <i>et al.</i> , 2007      |

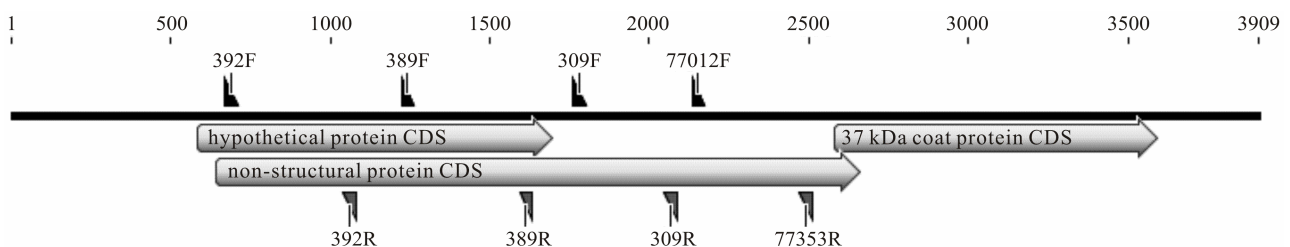


图 1 检测 IHNV 的 OIE 方法的引物在基因组上的分布示意  
Fig.1 Genome distribution diagram of OIE primers for IHNV detection

脂糖凝胶电泳观察检测结果。

### 1.5 测序反应

将各对 PCR 引物反应结果显示强阳性条带的样品扩增产物切胶回收(Zymo Research 公司), 由上海桑尼生物科技有限公司测序。

## 2 结果

### 2.1 检测 IHHNV 的各对引物的 PCR 产物特征

引物对 389F/389R 的扩增反应电泳见图 2-A, PCR 产物大小 389 bp; 引物对 77012F/77353R 的扩增反应电泳见图 2-B, PCR 产物大小 356 bp; 引物对 392F/392R 的扩增反应电泳见图 2-C, PCR 产物大小 392 bp; 引物对 309F/309R 的扩增反应电泳见图 2-D,

PCR 产物大小 309 bp。各引物对含有大量对虾基因组 DNA 的实际样品检测时, 均能产生 IHHNV 的特异产物条带, 没有非特异性杂带的出现, 表明各引物具有较好的特异性。检测引物 MG831F/MG831R 对部分样品进行检测结果显示出特异性较差、非特异性扩增的情况, 因此未将此对引物作为基因型筛查的推荐引物(图 3)。

### 2.2 IHHNV 各对引物的 PCR 产物测序及其与现有序列的比对

将 4 对引物 PCR 产物的测序结果进行 BLAST 比对, 其中 389F/389R 扩增片段序列与中国江苏地理株 JX258653 和 DQ228358 相应序列同源性达到 100%, 与夏威夷地理株同源性为 99%。309F/309R 扩增片段与越南地理株 JX840067、中国福建地理株 EF633688、中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、厄瓜多尔

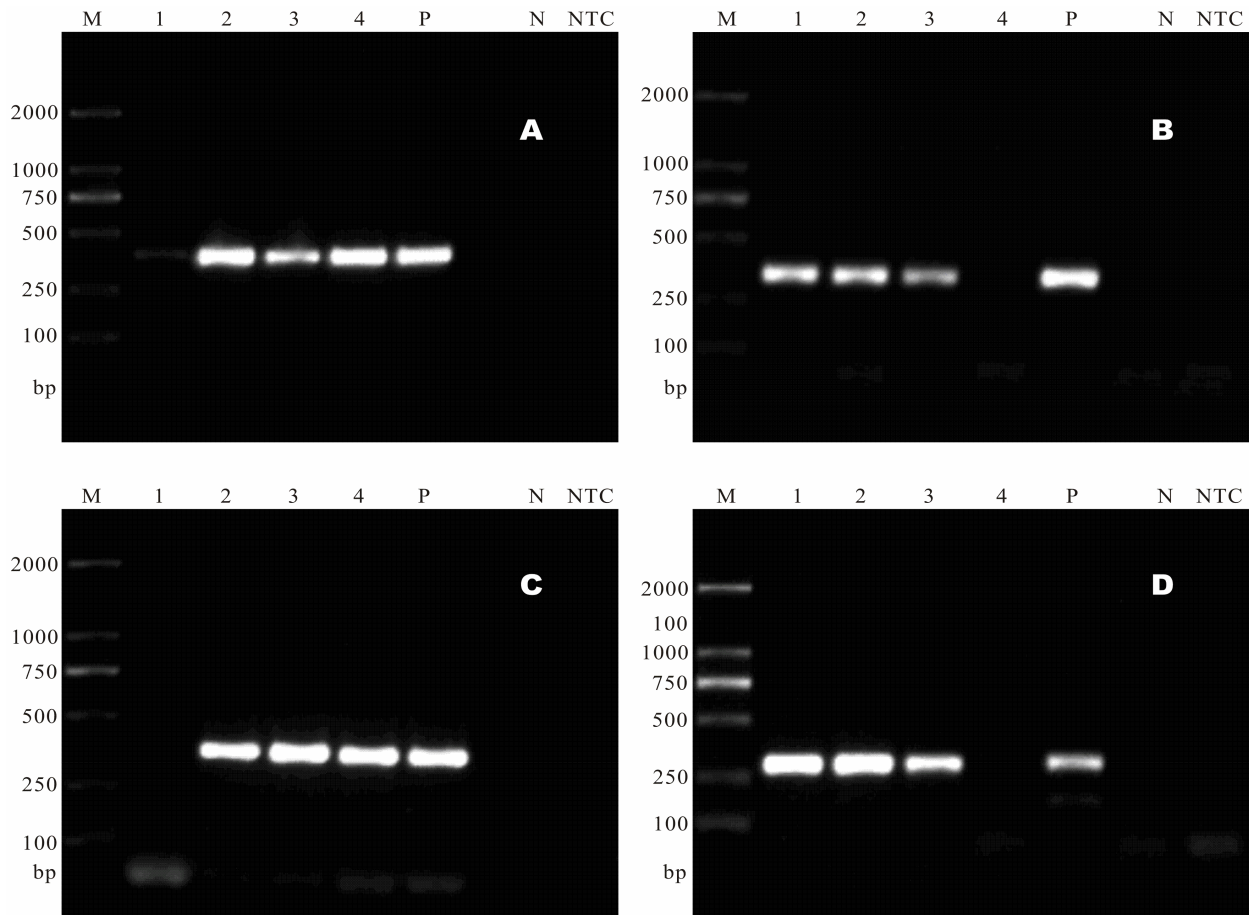


图 2 部分对虾样品的 PCR 检测结果

Fig.2 PCR detection results for partial shrimp samples

A: 引物 389F/389R 的 PCR; B: 引物 77012F/77353R 的 PCR; C: 引物 392F/392R 的 PCR; D: 引物 309F/309R 的 PCR;

M: DL2000 DNA 分子标准; 1-4: 4 份检测样品; P: 阳性对照; N: 阴性对照; NTC: 空白对照

A: PCR with primers 389F/389R; B: PCR with primers 77012F/77353R; C: PCR with primers 392F/392R; D: PCR with primers 309F/309R; M: DL2000DNA Ladder; 1-4: Four samples; P: Positive control; N: Negative control; NTC: No template control

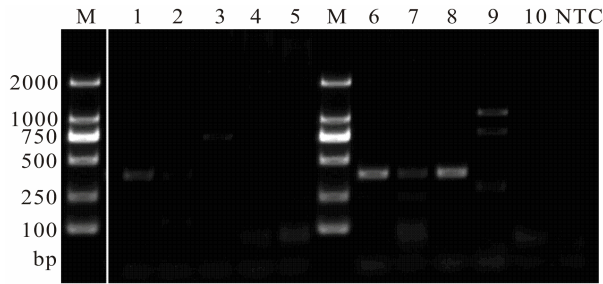


图3 对虾样品的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR detection results for partial shrimp samples

M: DL2000 DNA 分子标准; 1-10: 10 份检测样品;

NTC: 空白对照

M: DL2000DNA Ladder; 1-10: Ten samples; NTC: No template control

地理株 AY362548.1 相应序列同源率为 100%，与夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。77012F/77353R 扩增片段序列与韩国地理株 JN377975、厄瓜多尔地理株 AY362548、中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、加利福尼亚地理株 AF273215 同源率是 100%，与夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。392F/R 扩增片段序列与中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、福建地理株 EF633688、夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。

### 2.3 IHNV 各对引物检测实际样品的阳性率

收集了 2011 和 2012 年来自全国的 143 份不同生长阶段的样品，其中 91 份凡纳滨对虾、36 份中国对虾、12 份斑节对虾、2 份宽沟对虾，2 份脊尾白虾。经 IHNV 各对 PCR 引物的检测显示，凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾均检测出 IHNV 阳性，脊尾对虾为阴性。2011-2012 年凡纳滨对虾 IHNV、不同虾种 IHNV 及不同区域 IHNV 不同检出类型情况分别见表 2、表 3、表 4。此外还对本实验室采集的少许蟹类(近方蟹、天津厚蟹和三疣梭子蟹)和浮游生物进行检测，但未检出阳性结果。

### 2.4 样品中 IHNV 的不同检测类型

4 对引物对 143 份对虾样品的 IHNV 检测，得到 49 份为阳性的结果，这些结果表现为 4 种检测结果(表 5)。其中类型 I，4 种引物 PCR 结果全为阳性的比例为 90%；类型 II，只有引物对 389F/390R 的 PCR 结果全为阳性的比例为 4%；类型 III，除 77012F/77353R 全为阳性的比例为 4%；类型 IV，389F/389R 和 309F/309R 为阳性的比例为 2%。389F/389R 在所有阳性样品中一直都能检出阳性结果，以此作为 100%的诊断灵敏度，309F/309R、392F/392R、77012F/77353R 的

表 2 2011-2012 年凡纳滨对虾 IHNV 不同检出类型情况  
Tab.2 Detected types of IHNV in *L. vannamei* during 2011-2012

| 年份 Year | 样品品种<br>Sample species   | 样品总数<br>Sample number | 389F/389R<br>阳性 Positive | 392F/392R<br>阳性 Positive | 77012F/77353R<br>阳性 Positive | 309F/309R<br>阳性 Positive |
|---------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 2011    | 凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> | 24                    | 17(70.8%)                | 17(70.8%)                | 17(70.8%)                    | 17(70.8%)                |
| 2012    | 凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> | 67                    | 23(34.3%)                | 21(31.3%)                | 19(28.4%)                    | 24(35.8%)                |

表 3 不同虾种中 IHNV 的不同检出类型情况  
Tab.3 Detected types of IHNV in different shrimp species

| 样品品种<br>Sample species      | 样品总数<br>Sample number | 389F/389R<br>阳性 Positive | 392F/392R<br>阳性 Positive | 77012F/77353R<br>阳性 Positive | 309F/309R<br>阳性 Positive |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>    | 91                    | 40(44.0%)                | 40(44.0%)                | 40(44.0%)                    | 40(44.0%)                |
| 斑节对虾 <i>P. monodon</i>      | 12                    | 5(41.7%)                 | 5(41.7%)                 | 5(41.7%)                     | 5(41.7%)                 |
| 中国对虾 <i>F. chinensis</i>    | 36                    | 3(8.3%)                  | 3(8.3%)                  | 3(8.3%)                      | 3(8.3%)                  |
| 宽沟对虾 <i>M. latisulcatus</i> | 2                     | 1                        | 1                        | 1                            | 1                        |
| 脊尾白虾 <i>P. carincauda</i>   | 2                     | 0                        | 0                        | 0                            | 0                        |

表 4 不同区域 IHNV 的不同检出类型情况  
Tab.4 Detected types of IHNV in different regions

| 采集区域<br>Collection region | 样品总数<br>Sample number | 389F/389R<br>阳性 Positive | 392F/392R<br>阳性 Positive | 77012F/77353R<br>阳性 Positive | 309F/309R<br>阳性 Positive |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 华东 East China             | 88                    | 32(36.4%)                | 30(34.1%)                | 28(31.8%)                    | 30(34.1%)                |
| 华南 South China            | 34                    | 13(38.2%)                | 12(35.3%)                | 12(35.3%)                    | 13(38.2%)                |
| 华北 North China            | 21                    | 3(14.3%)                 | 4(19.0%)                 | 4(19.0%)                     | 4(19.0%)                 |

表 5 不同引物对 IHHNV 的 PCR 检出类型  
Tab.5 PCR detected types of IHHNV using different primer pairs

| 检出类型<br>Detected type              | 392F/392R | 389F/389R | 309F/309R | 77012F/77353R | 阳性数<br>Positives | 检测类型所占比例<br>Proportion of detection type(%) |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|------------------|---------------------------------------------|
| I                                  | +         | +         | +         | +             | 44               | 90.0                                        |
| II                                 | -         | +         | -         | -             | 2                | 4.1                                         |
| III                                | +         | +         | +         | -             | 2                | 4.1                                         |
| IV                                 | -         | +         | +         | -             | 1                | 2.0                                         |
| 诊断灵敏度<br>Diagnostic sensitivity(%) | 91.8      | 100       | 95.9      | 90.0          | -                | -                                           |

诊断灵敏度分别为 95.9%、91.8%和 90.0%。根据 4 对引物的检测类型的不同可知, 类型 I、III、IV 因引物 309F/309R 为阳性, 属于感染型, 而类型 II 只有 389F/389R 为阳性, 无法确定属于哪种类型。

### 3 讨论

OIE 所推荐的 4 对引物分别用于检测 IHHNV 两种基因型, 其中 389F/389R 和 392F/392R 设计于非结构蛋白编码区 NS-1, 可以检测感染型和非感染型 IHHNV(Tang *et al.*, 2002、2003; Krabsetsve *et al.*, 2004; Chayaburakul *et al.*, 2005); 309F/309R 设计于左侧 ORF 区域, 该对引物和 3A 和 3B 型有 8 个(36%)和 4 个(18%)错配, 只能检测感染型 IHHNV(Tang *et al.*, 2007); 引物 77012F/77353R 来自于 IHHNV 结构蛋白编码区和非结构蛋白编码区之间(OIE, 2012)。使用 4 对引物对 2011 年和 2012 年本实验室采集的对虾样品进行 IHHNV 检测, 初步获得了 4 种检测类型。推测可能与检测技术灵敏度、基因片段随机嵌入、引物自身特异性等有关。

根据 4 对引物 PCR 产物电泳和测序结果可知, 该 4 对引物的扩增产物特异性好, 没有非特异性杂带, 产物序列也很少有突变。表明 4 对检测引物的可靠性, 可排除因引物自身特异性导致的不同检测结果的产生。但在检测过程中, 4 对引物对同一样品进行不同次的检测时会出现不同结果的现象, 说明部分引物在检测弱阳性样品时的重复性较差。本研究在使用引物 MG831F/MG831R 检测 IHHNV 嵌入型的过程中发现该引物特异性较差, 非特异性扩增较普遍, 因此没有将该对引物作为基因型筛查的参考引物。

已报道的试验数据(Chayaburakul *et al.*, 2005)和用覆盖几乎所有 IHHNV 基因组的重叠引物对样品进行 PCR 检测的方法(Saksmerprome *et al.*, 2011)证实, 不同对虾对 IHHNV 具有不同的免疫能力, 且任意长度和数量的 IHHNV 基因片段普遍会镶嵌于斑节对虾基因组中, 凡纳滨对虾等种类感染的 IHHNV 则还没

有类似的片段插入的报道。本研究出现的不同检出类型的 II、III 和 IV 是否也有可能是这种插入的情况所致还需深入研究。

不同地区野生和养殖对虾的带毒率各不相同, 在 0-100%之间(Covarrubias *et al.*, 1999; Motte *et al.*, 2003; Nunan *et al.*, 2001; Pantoja *et al.*, 1999)。引物 389F/389R 也是 IHHNV 的 PCR 检测方法的国家标准中采用的引物(黄健等, 2010), 且本实验室已通过感染实验证实 309F/309R 引物阳性的样品可通过投喂方式感染健康凡纳滨对虾。杨冰等(2005)检测卤虫、轮虫、桡足类、沙蚕以及绒螯近方蟹等对虾养殖饵料和环境生物, 其中绒螯近方蟹检出了 IHHNV。本研究对采集的少量蟹类和浮游生物也进行了 IHHNV 的检测, 尚未得到阳性结果; 检测的养殖对虾中, 凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾不同程度地检测出了 IHHNV 阳性, 而脊尾白虾未发现感染情况。本检测结果表明, IHHNV 在国内养殖对虾中已较普遍地感染, 且在华东和华南地区形成了一定的流行趋势。

### 参 考 文 献

- 杨冰, 宋晓玲, 黄健, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的流行病学与检测技术研究进展. 中国水产科学, 2005, 12(4): 519-524
- 黄健, 杨冰, 朱泽闻, 等. 中华人民共和国国家标准 GB/T 25878-2010-对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)检测 PCR 法
- Bell TA, Lightner DV. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 1984, 38(3): 185-194
- Bonami JR, Trumper B, Mari J, *et al.* Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J Gen Virol, 1990, 71(11): 2657-2664
- Chayaburakul K, Lightner DV, Sriurairattana S, *et al.* Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. Dis Aquat Organ, 2005, 67(3): 191-200



- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis Aquat Organ*, 2004, 60(2): 89–96
- Covarrubias MS, Nunan LM, Lightner DV, *et al.* Prevalence of IHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J Aquat Anim Health* 1999, 11(3): 296–301
- Kalagayan H, Godin D, Kanna R, *et al.* IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J World Aquacul Soc*, 1991, 22(4): 235–243
- Krabsetsve K, Cullen BR, Owens L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Dis Aquat Organ*, 2004, 61(1–2): 153–158
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J Invertebrate Pathol*, 1983a, 42(1): 62–70
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA, *et al.* Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Aquaculture Society*, 1983b, 14(1–4): 212–225
- Mari J, Bonami JR, Lightner D. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J General Virol*, 1993, 74(12): 2637–2643
- Motte E, Yugcha E, Luzardo J, *et al.* Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 57–70
- Nunan LM, Arce SM, Staha RJ, *et al.* Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J World Aquaculture Society*, 2001, 32(3): 330–334
- Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol*, 2000, 2(4): 319–328
- Pantoja CR, Lightner DV, Holtschmit KH. Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *J Aquatic Animal Health*, 1999, 11(1): 23–34
- Primavera H, Quintio ET. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Crustacean Biol*, 2000, 20(4): 796–802
- Saksmerprome V, Puiprom O, Noonin C, *et al.* Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 2010, 298(3–4): 190–193
- Saksmerprome V, Jitrakorn S, Chayaburakul K, *et al.* Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res*, 2011, 160(1–2): 180–190
- Tang KF, Lightner DV. Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) originating from Hawaii and Americas. *Dis Aquat Organ*, 2002, 49(2): 93–97
- Tang KF, Lightner DV. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res*, 2006, 118(1–2): 185–191
- Tang KF, Navarro SA, Lightner DV. A PCR assay for discriminating between Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ*, 2007, 74(2): 165–170
- Tang KF, Poulos BT, Wang J, *et al.* Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(2): 91–99
- Tang KF, Durand SV, White BL, *et al.* Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 2000, 190(3–4): 203–210
- World Organization for Animal Health (OIE). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases Paris France: 2012, 119–137, <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.2.02\\_IHNV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.2.02_IHNV.pdf)>

(编辑 冯小花)

## PCR Detecting Types by the OIE Standards for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Farmed Shrimp

YUAN Yanyan<sup>1,2</sup>, YANG Bing<sup>1,2</sup>①, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, LIU Sun<sup>1</sup>, LIU Tianqi<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is a kind of common virus in shrimp culture industry in China, influencing prawn breeding all over the world. IHHNV is harmful to *Litopenaeus stylirostris* and the mortality can be as high as 90%. For *Litopenaeus vannamei*, the mortality is not high, but can suffer from runt deformity syndrome (RDS). IHHNV infection in *Penaeus monodon* is usually subclinical, but RDS, reduced growth rates and reduced culture performance have been reported in IHHNV-infected stocks. OIE recommended 5 sets of primer pairs to detect different genotypes of IHHNV. In order to know the detecting types in China, we used four sets of primer pairs in the PCR protocols recommended by the OIE standards to detect penaeid shrimp samples collected in 2011 and 2012 from different provinces. These four sets of primer pairs are 389F/389R, 392F/392R, 77012F/77353R, 309F/309R, respectively. The detection results showed that IHHNV positives were detected in the samples of *L. vannamei*, *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* and *Melicertus latisulcatus*, but not in the sample of *Palaemon carinicauda*. The positive percentage of *L. vannamei* was the highest, 70.8% (389F/R) in 2011 and 34.3% (389F/R) in 2012, and that of *F. chinensis* was the lowest, which is 8.3%. The more positive of penaeid shrimp samples in 2011 were detected than that in 2012. The positive percentage of IHHNV in penaeid shrimp samples from East China is higher than that from North China and South China. We got four detecting types from the PCR detection with 4 sets of primer pairs recommended by the OIE standards. For detected type I, the positive rate is 90% for all the four primer sets. For detected type II, the positive rate is 4% for primer set 389F/R. For detected type III, the positive rate is 4% for primer sets of 389F/389R, 392F/392R and 309F/309R. For detected type IV, the positive rate is 2% for primer sets of 389F/389R and 309F/309R. The survey provided valuable information for the future study and surveillance on epidemiology of IHHNV.

**Key words** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV); Polymerase chain reaction (PCR); OIE standards; Penaeid shrimp

① Corresponding author: YANG Bing, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn