

广东省粤西地区凡纳滨对虾 3 种主要病毒的 PCR 与 LAMP 检测及流行病学特点分析

江晓^{1,2}, 任春华¹, 胡超群¹, 赵哲¹

1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 应用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)和环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)两种检测技术分别对 2009 年广东省粤西地区养殖体系中凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 白斑综合症病毒(White Spot Syndrome, WSSV)、桃拉病毒(Taura Syndrome Virus, TSV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)的携带情况进行了调查。结果显示, WSSV 和 TSV 的携带率较高, 是该地区凡纳滨对虾的主要流行病毒种类; LAMP 检测方法与 PCR 方法具有相当的灵敏度和特异性, 但 LAMP 检测方法更加简单方便、快速且成本低。

关键词: 凡纳滨对虾; 白斑综合症病毒; 传染性皮下及造血组织坏死病毒; 桃拉病毒; 聚合酶链式反应; 环介导等温扩增; 检测

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)06-0097-07

Epidemiological investigation of three kinds of major virus in *Litopenaeus vannamei* from western Guangdong Province

JIANG Xiao^{1,2}, REN Chun-hua¹, HU Chao-qun¹, ZHAO Zhe¹

1. South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China;

2. Graduate University of CAS, Beijing 100049, China

Abstract: In order to investigate the infected rates of White Spot Syndrome Virus (WSSV), Taura Syndrome Virus (TSV) and Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) among aquatic *Litopenaeus vannamei*, we tested the samples from western Guangdong Province using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). The results show that there were higher infected rates of WSSV and TSV, which suggests these two viruses were the dominant pathogens in this region. These data reveal that the LAMP method was equivalent to the PCR method in specificity and sensitivity, but the LAMP method was more convenient, rapid and low cost than the PCR.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; White Spot Syndrome Virus; Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus; Taura Syndrome Virus; detection

对虾养殖业是世界海水养殖业的支柱性产业, 其中凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 具有生长快、个体大、产量高及广盐适应性等优点, 随着其人工繁育和人工养殖技术的日益成熟, 已成为我国最主

要的养殖虾类^[1]。

由于各种对虾病毒病原的感染和病毒性流行病的爆发, 每年都给对虾养殖业带来巨大损失^[1], 因此对虾病毒病原的研究, 一直是各国学者研究的热

收稿日期: 2010-06-02; 修订日期: 2011-04-20。卢冰编辑

基金项目: 国家农业公益性行业(农业)科研专项 (200803012); 国家虾现代产业技术体系(nycytx-46); 广东省海洋渔业成果推广项目 (A200901B03); 广东省-中国科学院合作项目(2009B091300088)

作者简介: 江晓(1983—), 女, 湖北省黄冈市人, 博士, 专业方向为海洋生物学。E-mail: jiangxiao4367@126.com

通信作者: 胡超群, 男, 研究员, 主要从事海洋水产增殖、病害控制及生物技术研究。E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

点之一^[2]。目前已经发现有近 20 种不同的对虾病毒, 从它们以前和目前的致病情况以及将来潜在的危害来看, 有 3 种病毒, 即白斑综合症病毒(White Spot Syndrome, WSSV)、桃拉病毒(Taura Syndrome Virus, TSV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)对凡纳滨对虾养殖造成的危害最大^[3]。

本文对广东省阳江、湛江等地的凡纳滨对虾养殖场的仔虾、幼虾及成虾进行了随机取样, 并应用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 和环介导等温扩增(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)2 种检测技术对 WSSV、IHNV 及

TSV 的携带情况进行了调查, 探讨这 3 种病毒在广东省粤西地区养殖体系中的发生和流行情况, 以更好地控制病害的发生。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2009 年 4 月、7 月和 10 月份 3 次分别从广东省阳江、湛江等地的凡纳滨对虾养殖场随机采集仔虾(发育期 P2—P10, 体长小于 1cm)、幼虾(体重 5—8g·尾⁻¹)及成虾(体重大于 8g)进行病毒检测, 采集到的样本采用液氮冷藏并迅速运回本实验室, 样品采集情况见表 1。

表 1 样品采集情况表

Tab. 1 Composition of the detection samples

4 月采样(共 47 尾)			7 月采样(共 70 尾)			10 月采样(共 34 尾)		
仔虾	幼虾	成虾	仔虾	幼虾	成虾	仔虾	幼虾	成虾
13	0	34	0	10	60	0	0	34

1.2 实验方法

1.2.1 被检虾样基因组总 DNA 及 RNA 提取

取凡纳滨对虾的肌肉组织 25—30mg 置于 1.5mL 离心管中, 加入 200 μ L 组织裂解液, 捣烂, 室温裂解 30min; 用 Axygen 公司的基因组 DNA 提取试剂盒(Genomic DNA Purification Kit)提取基因组总 DNA; 按照试剂盒提供的操作步骤, 最后用 50 μ L 灭菌去离子水溶解, -20 保存备用。

取凡纳滨对虾的肌肉组织 50—100mg 置于 1.5mL 离心管中, 加入 500 μ L RNAiso Reagent (Takara 公司)后匀浆, 室温静置 5min; 加入 100 μ L 氯仿, 震荡混匀, 室温静置 5min; 12000r/min、4℃条件下离心 15min; 将上清液转移至新的离心管中, 加入与上清液等体积的异丙醇; 室温静置 10min; 12000r/min、4℃条件下离心 10min; 向沉淀中加入 1mL 的 75%乙醇清洗沉淀, 12000r/min、4℃条件下离心 5min; 弃上清液保留沉淀, 干燥后溶于 80 μ L 的 DEPC (焦炭酸二乙酯) 处理水中, -20 保存备用。

1.2.2 被检虾样的病毒携带情况检测

应用 PCR 和 LAMP 两种检测技术分别对被检虾样的 WSSV、IHNV 和 TSV 的携带情况进行检测。

1.2.2.1 WSSV、IHNV 及 TSV 的 PCR 检测

用 PCR 方法检测 IHNV 和用 RT-PCR 检测 TSV 的 PCR 扩增条件均参照本实验室已公开的发明专利(专利公开号为 1410549 的快速检测对虾传染性

皮下及造血组织坏死病毒试剂盒^[4]; 专利公开号为 1410550 的快速检测对虾桃拉病毒试剂盒^[5])。WSSV PCR 检测引物由本实验室自行设计, 其序列为: 5'-TGGCTACATCTGCATTGCTC (wssv2f) 及 5'-TAGA GACGTGGCTGGAGAGG (wssv2r), 扩增条件为: 94℃、2min; 94℃、30 s, 58℃、45 s, 72℃、45s, 30 个循环。各检测均以无菌去离子水为模板进行阴性对照扩增, 将扩增后的样品进行琼脂糖凝胶电泳, 并对其中的部分阳性株进行克隆测序, 以进一步验证结果的准确性。

1.2.2.2 WSSV、IHNV 及 TSV 的 LAMP 检测

被检虾样 WSSV、IHNV 和 TSV 的 LAMP 检测方法均采用本实验室专利(专利公开号为 101691615A 的 WSSV LAMP 检测试剂盒^[6], 专利公开号为 101643793 的 IHNV LAMP 检测试剂盒^[7]; 专利公开号为 101845519A 的 TSV LAMP 检测试剂盒^[8])。参照试剂盒的说明配好反应体系, 以无菌去离子水为模板进行阴性对照扩增, 将恒温金属浴调至 64℃后, 把反应体系置于其中反应 60min; 反应结束后, 加入 1 μ L SYBR Green 荧光染料轻轻振荡, 直接观察反应液的颜色变化判断结果。

2 结果

2.1 WSSV、IHNV 及 TSV 的 PCR 检测结果

部分被检凡纳滨对虾 PCR 检测的扩增结果如图 1 所示。其中, WSSV 扩增出长度约 340bp 的核酸片

段, IHNV 扩增出长度约 540bp 的核酸片段, TSV 扩增出长度约 360bp 的核酸片段。

将得到的扩增产物进行切胶回收, 克隆后送测序公司测序, 将测序结果与美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information , NCBI) 数据库中对应的 WSSV、IHNV 和 TSV3 种病毒的相似序列分别进行比对鉴定。其中, WSSV 测序片段与

NCBI 中对应的 WSSV 全序列(登录号: AF332093)比对后相似率为 100%, IHNV 测序片段与 NCBI 中对应的 IHNV 全序列(登录号: AF273215)比对后相似率为 99%, TSV 测序片段与 NCBI 中对应的 TSV 全序列(登录号: GQ502201)比对后相似率为 100%, 说明检测的阳性株与 NCBI 序列库中已有的各自阳性株有高度相似性, 检测结果有效。各序列比对结果如图 2—4 所示。

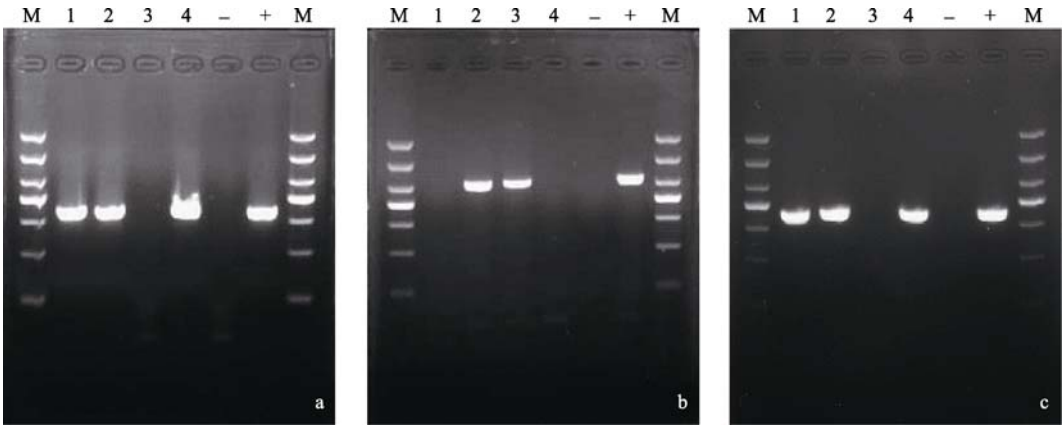


图 1 凡纳滨对虾各病毒 PCR 及 RT-PCR 扩增电泳图

a. WSSV PCR 检测电泳图; b. IHNV PCR 检测电泳图; c. TSV RT-PCR 检测电泳图。 M: DL1000 DNA Marker; 1—4: 凡纳滨对虾样品 PCR 或者 RT-PCR 扩增结果; -: 阴性对照; +: 阳性对照

Fig. 1 Detection of WSSV by PCR among *L. vannamei* samples (a), of IHNV by PCR among *L. vannamei* samples (b), and of TSV by RT-PCR among *L. vannamei* samples (c). M: DL1000 DNA Marker; Lines 1–4: PCR or RT-PCR results of four *Litopenaeus vannamei* samples; sign “-” is for negative control; and “+” for positive control

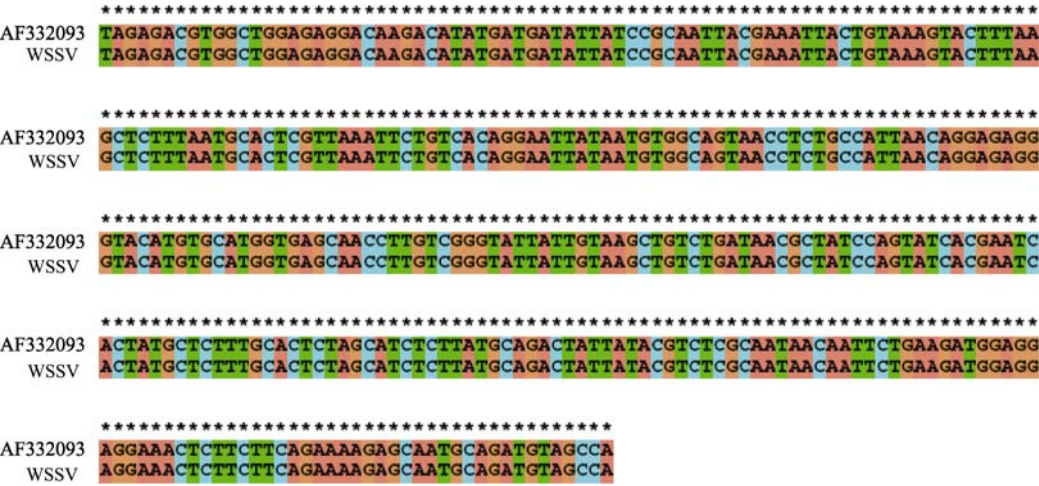


图 2 WSSV 测序片段与 NCBI 数据库中对应的 WSSV 全序列 AF332093 序列比对图

Fig. 2 An alignment of WSSV sequence fragments, compared with NCBI corresponding WSSV complete genome of AF332093

2.2 WSSV、IHNV 和 TSV LAMP 检测结果

被检虾样 LAMP 反应结果如图 5 所示, 以 WSSV 和 IHNV 阳性 DNA 及 TSV 阳性 RNA 为模板的反应产物呈现明显的亮绿色, 而以 WSSV 和 IHNV 阴性 DNA、TSV 阴性 RNA 和以无菌去离子水为阴性对照的反应液则为橙黄色。

2.3 WSSV、IHNV 及 TSV 在被检凡纳滨对虾中的分布情况

本次共检测凡纳滨对虾 151 尾(批), 其中 WSSV 携带率为 22 % 左右, IHNV 携带率为 5 % 左右, TSV 携带率为 23 % 左右, 说明 WSSV 和 TSV 是该地区的主要传播种类。WSSV、IHNV 及 TSV 的 PCR 检测结果及 LAMP 检测结果见表 2。

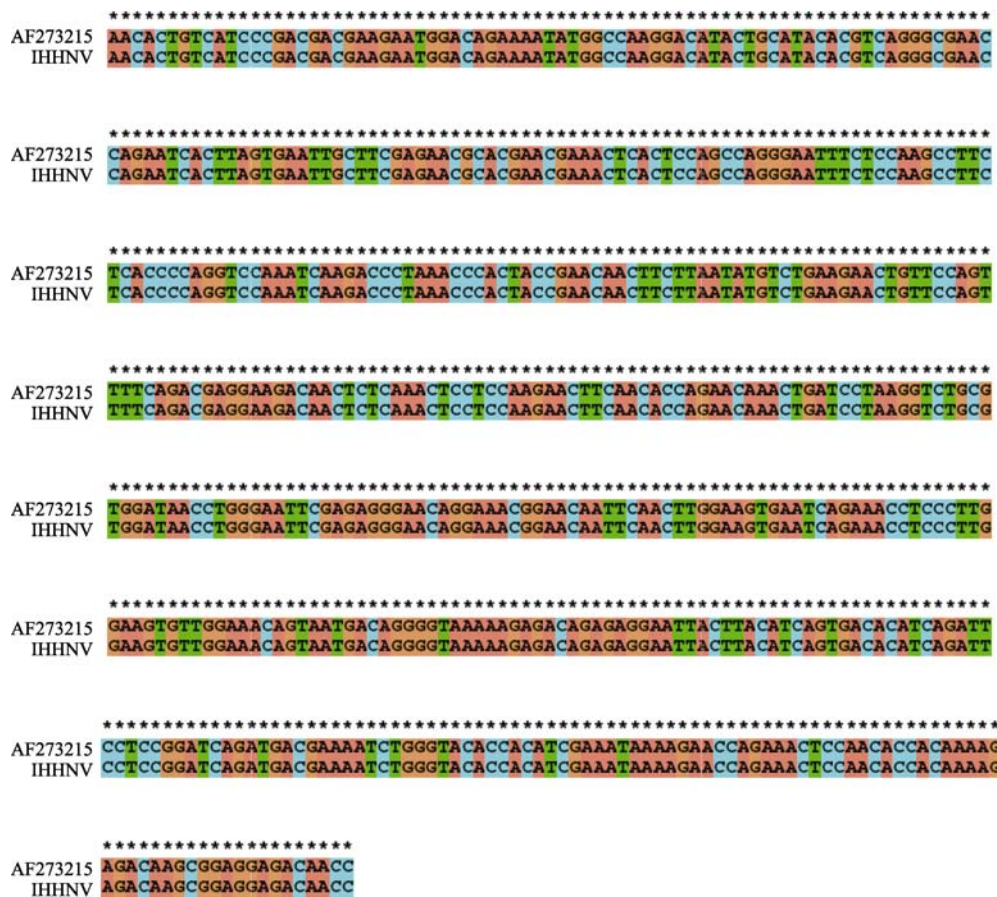


图 3 IHHNV 测序片段与 NCBI 数据库中对应的 IHHNV 全序列 AF273215 序列比对图

Fig. 3 An alignment of IHHNV sequence fragments, compared with NCBI corresponding IHHNV complete genome of AF2732153

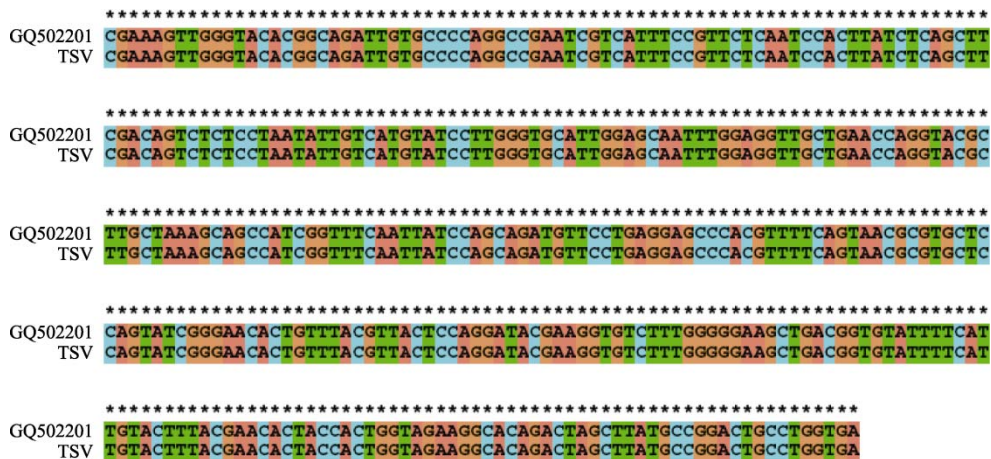


图 4 TSV 测序片段与 NCBI 数据库中对应的 TSV 全序列 GQ502201 序列比对图

Fig. 4 An alignment of TSV sequence fragments, compared with NCBI corresponding TSV complete genome of CQ502201

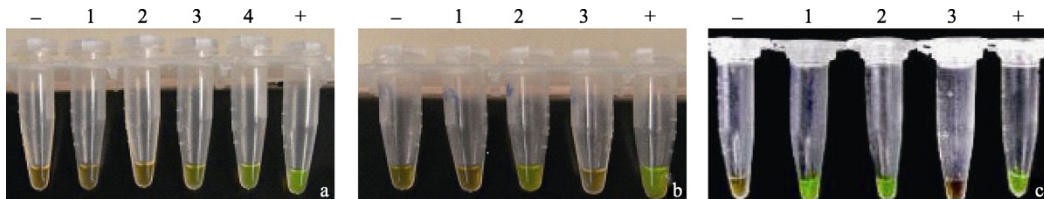


图 5 凡纳滨对虾各病毒 LAMP 检测图

a. 凡纳滨对虾 WSSV LAMP 检测结果; b. 凡纳滨对虾 IHHNV LAMP 检测结果; c. 凡纳滨对虾 TSV LAMP 检测结果。-: 阴性对照; 1—4: 样品; +: 阳性对照

Fig. 5 Detection of WSSV by LAMP with *L.vannamei* (a); of IHHNV by LAMP with *L. vannamei*; and of TSV by LAMP with *L. vannamei*. Sign “-” is for negative control, and sign “+” for positive control. Lines 1—4 : PCR or RT-PCR results of four *L.* samples

表 2 凡纳滨对虾不同生长阶段 WSSV、IHHNV 及 TSV 检测结果
Tab. 2 Investigation of WSSV, IHHNV and TSV by PCR and LAMP

		仔虾(13 批)			幼虾(10 尾)			成虾(128 尾)		
		WSSV	IHHNV	TSV	WSSV	IHHNV	TSV	WSSV	IHHNV	TSV
PCR	阳性株	0	0	2	8	0	6	25	5	27
	阳性率/%	0	0	15.38	80	0	60	19.53	3.9	21.09
LAMP	阳性株	1	2	2	9	0	7	28	6	29
	阳性率/%	7.69	15.38	15.38	90	0	70	21.88	4.69	22.66

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾不同生长阶段 3 种病毒的感染特点

3.1.1 凡纳滨对虾不同生长阶段 WSSV 感染特点

从表 2 可以看出, 在对虾生长的 3 个阶段, WSSV 主要出现在幼虾和成虾中, 随机调查阳性率分别为 80 % 和 20 %。原因可能如下。

1)由于白斑杆状病毒的宿主非常广泛, 虾类等甲壳动物极易感染^[9], 使凡纳滨对虾极易从外界环境通过其他野生甲壳类而感染 WSSV, 故有些在仔虾和幼虾阶段没有感染 WSSV 的个体在成虾阶段又会患病;

2)在粤西地区, 凡纳滨对虾主要采取集约化高密度养殖, 随着仔虾个体不断增大, 投饵量也不断加大, 残饵和排泄物不断积聚, 造成幼虾感染病毒几率比仔虾大;

3)由于 WSSV 感染后在一个星期左右就会造成对虾死亡^[10], 因此, 存活并能生长至成虾阶段的个体一般未被病毒感染或感染率低^[11-12], 故在成虾阶段的携带率(20%)反而与幼虾阶段(80%)相比呈下降趋势。

3.1.2 凡纳滨对虾不同生长阶段 IHHNV 感染特点

从表 2 可以看出, 在仔虾中, 应用 PCR 方法没有检测到 IHHNV, 但应用 LAMP 技术, 在 13 批仔虾中, 检测到呈 IHHNV 阳性的仔虾 2 批, 占 15%; 在幼虾阶段, 应用 2 种方法均没有检测到 IHHNV; 但是在成虾阶段, IHHNV 随机调查阳性率均为 4%。原因可能如下。

1)由于 LAMP 检测技术较之 PCR 方法灵敏 100 倍, 故某些 IHHNV 携带量较低的虾体可以通过此方

法检测出来, 而 PCR 方法检测结果则呈阴性^[13-14];

2)部分仔虾样品中每份样品不是单尾仔虾, 而是多尾仔虾组成一份样品, 相对提高了以批为单位的样品阳性检出率;

3)IHHNV 对凡纳滨对虾仅造成矮小残缺综合征^[15-16], 感染 IHHNV 或患病后存活下来的凡纳滨对虾会终生携带病毒, 并通过垂直传播和水平传播方式将病毒传给下一代和其他种群^[17], 故本次实验中, IHHNV 可能是由于成虾中的部分患病虾被作为亲虾进行繁殖, 从而将 IHHNV 通过亲虾携带传染给仔虾;

4)在粤西地区, 凡纳滨对虾主要采取集约化高密度养殖, 大面积的苗种放养, 患病个体逐渐被淘汰, 因此在幼虾中没有出现 IHHNV; 5)随着仔虾个体不断增大, 投饵量也不断加大, 残饵和排泄物不断积聚, 造成幼虾感染病毒几率增大^[18-19], 故在成虾阶段本来没有携带 IHHNV 的对虾反而感染该病毒。

3.1.3 凡纳滨对虾不同生长阶段 TSV 的感染特点

从表 2 可以看出, TSV 在幼虾中的患病率极高(60 %), 庞德斌等^[20]研究也发现, TSV 发病虾规格为 6—9 cm, 而本次取样中, 幼虾的体长大约为 5—9cm, 两者结果一致。在本实验中, TSV 随机抽查阳性率较高, 说明该病毒为粤西地区凡纳滨对虾养殖的主要流行病毒。同时, 在仔虾、幼虾及成虾中均有发现, 但是仔虾的随机抽查阳性率很低, 仅为(15%), 说明可能存在垂直传播, 但主要以水平传播为主, 这也与前人研究结论一致^[20]。

3.2 WSSV 的流行特点

从表 3 中可以看出, WSSV 在 4 月、7 月及 10

表 3 凡纳滨对虾不同养殖月份 WSSV、IHHNV 及 TSV 检测结果
Tab. 3 Investigation of WSSV, IHHNV and TSV by PCR and LAMP

		4 月采样(共 47 尾)			7 月采样(共 70 尾)			10 月采样(共 34 尾)		
		WSSV	IHHNV	TSV	WSSV	IHHNV	TSV	WSSV	IHHNV	TSV
PCR	阳性数	6	0	18	20	5	0	7	0	17
	阳性率/%	12.76	0	38.29	28.57	7.14	0	20.59	0	50
LAMP	阳性数	8	2	19	23	6	1	7	0	18
	阳性率/%	17.02	4.26	40.42	32.86	8.57	1.4	20.59	0	52.94

月均有分布, 4 月和 10 月的随机抽查阳性率相似, 均为 20% 左右; 7 月的随机抽查阳性率稍高, 在 30% 左右, 说明该病毒仍然是粤西地区的主要流行性病毒^[1]。前人的研究也表明, 6—8 月, 水温 25℃ 左右, 是凡纳滨对虾 WSSV 最容易暴发的阶段^[10]; 而环境突变, 如连续阴雨天气造成池水突变是诱发 WSSV 的主要条件, 故 7 月的随机抽查率较其他月份稍高^[21]。

3.3 IHNV 的流行特点

从表 3 中可以看出, IHNV 用 PCR 方法在 4 月和 10 月中均没有检测到, 7 月的检出率也仅为 7%; 用 LAMP 方法在 10 月末检测到 IHNV, 4 月和 7 月的随机检测阳性率分别为 4% 和 9%, 原因可能是由于 LAMP 检测技术较之 PCR 方法灵敏 100 倍, 故某些 IHNV 携带量较低的虾体可以通过此方法检测出来, 而 PCR 方法检测结果则呈阴性^[13-14]; 另一方面, 2009 年 6 月底到 7 月初, 广东粤西地区出现了较长时间的雨季天气, 集约化高密度养殖, 加之池水突变, 造成养殖池生物量过高, 氨氮、亚硝酸盐等指标上升, 成为疾病暴发的主要诱因, 故初期携带较低含量 IHNV 的对虾表现出发病症状, 即本来 4 月没有检出的超低含量的 IHNV 又在 7 月被检测出来; 或者水体和饵料中存活的少量病毒通过水平传播感染健康虾体^[18,19]。

3.4 TSV 的流行特点

从表 3 可以看出, TSV 主要在 4 月、10 月两次检测中出现, 且在幼虾中的患病率极高(60%)。庞德斌等^[20]研究也发现, TSV 病毒发病虾规格为 6—9 cm, 两者结果一致。在本实验中, TSV 随机抽查阳性率较高, 说明该病毒为粤西地区凡纳滨对虾养殖的主要流行病毒。同时, 在本实验中, 10 月检测的 34 尾虾中, 有 6 尾幼虾为 WSSV 和 TSV 共患病个体, 说明 WSSV 和 TSV 可混合感染凡纳滨对虾, 与谢芝勋等^[22]的研究结果相似。

3.5 PCR 和 LAMP 检测结果与方法比较

本次实验采用 PCR 和 LAMP 两种检测方法, 结果显示, 两种方法的检测结果基本一致; LAMP 检测出的阳性株均包括 PCR 方法检测出的阳性株, 且一些没有被 PCR 方法检测出的阳性株也被 LAMP 方法检测出来, 这主要是因为 LAMP 方法较之 PCR 方法特异性更高, 灵敏性更强。Sun 等^[13]研究发现, LAMP 检测方法检测灵敏性比 PCR 方法高 100 倍; 赵哲等^[14]通过对 IHNV 的荧光定量 PCR 和 LAMP 两种检测技术的对比研究发现, 两者具有相当的灵敏度、特异性和精确性。

PCR 技术具有灵敏性高、特异性强、操作简便和快速等特点, 是应用较广的虾病检测方法之一。本文所介绍的凡纳滨对虾的 WSSV 和 IHNV 的 PCR 技术及 TSV 的 RT-PCR 技术, 特异性能达到 99% 以上, 测定结果准确可靠、灵敏, 但是不能定量。

LAMP 是一种新型的核酸等温扩增技术, 该技术针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶(*Bst* DNA polymerase)在恒温条件下即可完成核酸扩增反应, 扩增出 LAMP 特征性梯状条带。与 PCR 技术相比, 它在保持传统 PCR 技术优点的基础上, 不需要模板的热变性及温度循环过程, 在等温条件下就能完成反应, 缩短了检测时间; 特殊的引物设计进一步增强了反应的特异性; 等温扩增后的产物直接加入荧光染料, 通过观察反应液的颜色变化即可用肉眼判读实验结果, 操作方便快捷; 特别是它不需要使用昂贵的热循环仪, 凝胶电泳和紫外投射仪等设备, 降低了检测成本。

为了适应对虾养殖现场检测的需要, 检测方法不仅要具有较高的灵敏性和准确性, 快速、简单、成本低等特点也是必不可少的因素。显然, LAMP 技术在这些方面较之 PCR 技术更胜一筹。

3.6 凡纳滨对虾病毒病原的检测及预防对策

近年来, 对凡纳滨对虾 WSSV、IHNV 和 TSV 的研究较为详细, 已构建了这些病毒的基因文库, 部分基因片段或基因组全序列已测定。但到目前为止, 凡纳滨对虾病毒病害尚无有效的药物治疗方法, 防止病毒病原感染和传播是目前控制虾病大规模爆发的有效途径。现在, 一些高敏感性、高特异性、简单、快速的检测方法已被应用于对虾病毒病的诊断中, 本实验室 2 种对虾病毒病检测发明专利建立在快速的 PCR 诊断技术基础之上, 经过多年来在华南沿海地区的推广使用, 因其敏感性和特异性高、简单、快速等特点, 已得到广泛认可。现在, 我们新研发的 WSSV、IHNV 和 TSV LAMP 检测试剂盒也申请了发明专利, 即将投入市场。通过本实验也可以看出, PCR 和 LAMP 技术在凡纳滨对虾快速检测方面行之有效。

另外, 通过本次调查, 我们发现, 经过近 10 年的不断努力, 通过严格控制亲虾的品质及引进无病毒感染的种苗, 广东省的凡纳滨对虾品质已得到提升, 但是, WSSV 和 TSV 依旧是粤西地区的主要流行病毒。所以, 建立凡纳滨对虾虾苗快速、灵敏、准确的病毒检测体系, 严格控制亲虾的品质, 有目的地选择无病原的苗种, 并在养殖过程中, 根据疾

病爆发的规律,在不同时期对虾体、养殖水体及饵料随机采样进行检测,可以及时掌握凡纳滨对虾病

毒的传播和流行情况,阻止外来病原的引入,对推动凡纳滨对虾养殖业的健康发展十分必要。

参考文献

- [1] 宋盛宪. 对虾养殖现状、发展趋势与对策[J]. 水产科技, 2006 (2): 1-7.
- [2] 史成银, 黄捷, 杨冰, 等. 应用 PCR 和 RT-PCR 技术对 4 种对虾病毒的检测[J]. 海洋水产研究, 2003, 24 (1): 1-5.
- [3] 谢芝勋, 谢丽基, 庞耀珊等. 三种对虾病毒多重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16 (5): 909-910.
- [4] 胡超群, 沈琪, 任春华, 等. 快速检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒试剂盒: 中国, 1410549[P]. 2003-04-16.
- [5] 胡超群, 沈琪, 任春华, 等. 一种快速检测对虾桃拉病毒试剂盒: 中国, 1410550[P]. 2003-04-16.
- [6] 赵哲, 任春华, 胡超群, 等. 一种用于检测对虾白斑综合症病毒的试剂盒及其检测方法: 中国, 101691615A[P]. 2010-04-07.
- [7] 赵哲, 任春华, 胡超群, 等. 一种用于检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒的试剂盒及其检测方法: 中国, 101643793[P]. 2010-02-10.
- [8] 赵哲, 任春华, 胡超群, 等. 一种用于快速检测对虾桃拉病毒的 LAMP 试剂盒及其检测方法: 中国, 101845519A [P]. 2010-09-29.
- [9] 宋晓玲, 史成银, 黄捷, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 36-40.
- [10] 宣引明, 陆小平, 戴永良, 等. 南美白对虾养殖主要病害分析及对策[J]. 科学养鱼, 2009 (3): 48-49.
- [11] 江世贵, 何建国, 吕玲, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(增刊): 164-171.
- [12] LO C F, HO C H, CHEN C H, et al. Detection of tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in peneaidbrooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Disease of Aquatic Organisms, 1997, 30: 53-72.
- [13] SUN Z F, HU C Q, REN C H, et al. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 131 (1): 41-46.
- [14] 赵哲, 任春华, 江晓, 等. 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHHNV 的特异性和灵敏性比较[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 984-989.
- [15] KALAGAYAN H, GODIN D, KANNA R, et al. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1991, 22 (4): 235-243.
- [16] LIGHTNER D V, BELL T A, REDMAN R M, et al. A review of some major diseases of economic significance in peneaidprawns/shrimps of the Americas and Indo-Pacific[R]. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 1992: 57-80.
- [17] LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures of diseases of cultured peneaid shrimp [M]. World Aquaculture Society, 1996: 305.
- [18] LIGHTNER D V. The peneaid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas[J]. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, 1996b, 15: 579-601.
- [19] BROWDY C L, HOLLOWAY J D, KING C O, et al. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates[J]. Journal of Crustacean Biology, 1993, 13: 87-94.
- [20] 庞德彬, 彭劲松, 邢华. 南美白对虾桃拉病毒(TSV)防治技术[J]. 中国水产, 2001, 6: 86-87.
- [21] 张文革. 南美白对虾常见病害及其防治技术[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27 (3): 39-40.
- [22] 谢芝勋, 庞耀珊, 何竞铭, 等. 应用多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合症病毒和桃拉病毒[J]. 中国兽医学报, 2005, 25 (1): 13-15.