

熊关庆, 杨玉涔, 冯杨, 等. 克氏原螯虾 WSD 的 PCR 诊断及组织病理损伤研究[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(2): 331-337.



克氏原螯虾 WSD 的 PCR 诊断及组织病理损伤研究

熊关庆¹, 杨玉涔^{1*}, 冯杨¹, 杨世勇^{1*}, 黄小丽^{1*}, 汪开毓²,
苗懿¹, 刘钊¹, 段靖¹, 赵仲孟¹

(1. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】近年来白斑综合症病毒(WSSV)严重威胁着克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的健康养殖, 本研究旨在确定一例克氏原螯虾暴发性死亡的病因。【方法】对患病虾进行临床症状观察, 取其鳃、心脏、肝胰腺、肠道、肌肉、眼睛等组织分别进行套氏 PCR 检测和组织病理学观察。【结果】患病虾临床剖解特征表现为肠段中空无食物, 肠壁透明, 肠管较细; 套氏 PCR 结果显示患病虾体内 WSSV 呈阳性; PCR 产物测序并进行系统发育树分析显示, 该基因序列与 WSSV 的核苷酸序列同源性为 100%, 进一步证实本次患病克氏原螯虾体内携带 WSSV。病理组织切片显示, 该病靶器官主要为肝胰腺、心脏、鳃、肠道, 患病虾均表现为中度至重度坏死性肝胰腺炎、中度充血性鳃炎、中度坏死性心肌炎、以及轻度肠炎, 肌肉组织未发现明显病变。【结论】推断造成本次克氏原螯虾大量死亡的原因为 WSSV 感染。

关键词: 克氏原螯虾; WSSV; PCR 检测; 系统发育树; 组织病理学

中图分类号: S945.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2020)02-0331-07

PCR Diagnosis and Histopathological Damage of White Spot Disease of *Procambarus clarkii*

XIONG Guan-qing¹, YANG Yu-cen^{1*}, FENG Yang¹, YANG Shi-yong^{1*},
HUANG Xiao-li^{1*}, WANG Kai-yu², MIAO Yi¹, LIU Zhao¹,
DUAN Jing¹, ZHAO Zhong-meng¹

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chendu 611130, China;
2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chendu 611130, China)

Abstract: [Objective] In recent years, white spot syndrome virus (WSSV) has been seriously threatening the healthy breeding of *Procambarus clarkii*. In order to determine the cause of sudden death of a case of *Procam-*

收稿日期: 2019-09-10 修回日期: 2019-11-15

基金项目: 四川省农业科技成果转化项目(15NZ0008)、四川省科技厅应用基础研究项目(2015JY0206)和四川农业大学双支计划(03573105)

Project supported by the Sichuan Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Project (15NZ0008), Applied Basic Research Project of Sichuan Science and Technology Department (2015JY0206) and Double Branch Plan of Sichuan Agricultural University (03573105)

作者简介: 熊关庆, orcid.org/0000-0001-7504-7514, xiongguanqing@163.com; * 共同第一作者; * 通信作者: 杨世勇, yangshiyong@sicau.edu.cn; 黄小丽, 副教授, 博士, 主要从事水生动物病害学研究, orcid.org/0000-0001-6570-4779, hxlidyq@126.com。

barus clarkii [Method] The clinical symptoms of the diseased shrimps were observed, PCR detection and histopathological observation were performed on gill, heart, hepatopancreas, intestinal, muscle, eye and other tissues. [Result] The results showed that the main clinical manifestations of the diseased shrimps were decreased intake and poor vitality. The gross pathological manifestations were not typical, mainly showing that part of the intestinal segment is hollow without food, the intestinal wall was transparent, and the intestinal canal was thin. After stripping the beginning of the chest armor, some diseased shrimps exhibited a lot of white spots on the membrane between the head and chest armor and the muscle. The results of PCR showed that WSSV was positive in the diseased shrimps. The product sequencing and phylogenetic tree analysis showed that the homology between the gene sequence and the nucleotide sequence of WSSV was 100%. It was further confirmed that WSSV was present in *Procamaeusclarkii*. Pathological tissue sections showed that the target organs of the disease were mainly hepatopancreas, hearts, gills and intestines, and the shrimps all showed moderate to severe necrotizing hepatopancreatitis, moderate congestive gills, moderate necrotizing myocarditis, and mild enteritis. No obvious lesions were found in the muscle tissue. [Conclusion] It is concluded that the cause of the large number of deaths of *Procambarus clarkii* is WSSV infection.

Keywords: *Procambarus clarkii*; WSSV; PCR detection; phylogenetic tree; histopathology

【研究意义】克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称“小龙虾”,属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Malacostraca)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae)、原螯虾属(*Procambarus*)^[1]。原产美国南部和墨西哥北部,我国于20世纪90年代引进并在全国大部分地区推广养殖^[2]。近年来,克氏原螯虾在我国养殖产业中迅速发展,已成为一种特色化、规模化的特种养殖品种。随着克氏原螯虾养殖业集约化和规模化发展,疾病问题也日益凸显,严重威胁着该品种的持续健康发展。目前已报道的克氏原螯虾病原包括:澳洲红螯螯虾肝胰腺呼吸肠孤样病毒(Cherax quadricarinatus hepatopancreatic reo-like virus, CqHRV)、澳洲红螯螯虾杆状病毒(Cherax quadricarinatus bacilliform virus, CqBV)、贵族螯虾杆状病毒(Astacus astacus bacilliform virus, AaBV)、白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)等^[3],其中WSSV的危害尤为突出。【前人研究进展】WSSV是一种危害极大的杆状病毒,该病毒主要感染水生甲壳类动物,包括中国对虾(*P. chinensis*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)等在内的多种对虾均可感染^[4]。1992年首次在中国台湾地区发现养殖的对虾感染白斑病毒^[5],到1994年已经扩展到全亚洲的对虾养殖地区,1999年到达美国中部和南部,2001年欧洲和澳洲地区也相继有关于对虾感染WSSV的报道^[6]。WSSV不仅易感对虾,感染途径亦很简单,采用投喂和浸泡两种方式均能感染,并造成其患病死亡^[7]。通常对虾感染WSSV后7~10 d死亡率可达100%,临床表现为体表暗红,发病初期头胸甲上出现少量白色斑点^[8],严重时白色斑点连接成片,且肠胃中空^[9]。此外,WSSV亦能感染螃蟹和克氏原螯虾^[10],有研究表明,WSSV在淡水克氏原螯虾体内增殖和感染的特性与对虾极其相似^[11]。近年来,包括浙江^[12]、湖北^[13]和江苏^[14]等我国大部分地区相继出现WSSV感染克氏原螯虾的报道,鉴于该病毒的严重危害程度,2009年被农业部《一、二、三类动物疫病病种名录》列为水生生物一类动物疫病病毒^[15]。【拟解决的关键问题】2018年5月,四川某克氏原螯虾养殖场出现以摄食减少、活力降低、体色变暗为主要症状并伴有大规模死亡的暴发性疾病,发病率和死亡率达50%以上,给养殖户造成了巨大的经济损失。为了找到该病的发病原因及病理损害特点,本研究对发病克氏原螯虾进行临床症状观察,并通过PCR检测、系统发育树分析,来推测本次患病克氏原螯虾的病原;同时,结合组织病理学技术检测各组织病理损伤程度,拟确定该病主要损伤靶器官,并分析致病原因,旨在为WSSV的诊断提供参考借鉴。

1 材料方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 病虾来自四川某克氏原螯虾养殖场,送检时仍存活。

1.1.2 实验试剂 甲醛溶液,冰乙酸,100%乙醇,二甲苯,琼脂糖,苏木精-伊红染色液,DNA 提取试剂盒(成都擎科梓熙生物技术有限公司)等。

1.2 剖检观察及病料采集

将患病克氏原螯虾冰冻麻醉后剖检。首先进行体表完整性及体表症状观察,接着打开头胸甲,观察鳃,肝胰腺等大体病变情况,并迅速采集鳃、心脏、肝胰腺、胃肠道和腹节肌肉,分别取少量组织用液氮快速冻存后放入-80℃条件下保存,剩余组织放入 AFA 固定液中保存。

1.3 患病虾体内 WSSV 的 PCR 检测

根据大体病理观察推测出患病虾的病变由感染 WSSV 引起,通过 PCR 检测鉴定,参照何琪瑶^[16]等设计的引物(表 1)利用套氏 PCR 方法检测克氏原螯虾 WSSV。将-80℃保存的鳃、心脏、肝胰腺、肌肉组织混合后用液氮快速研磨,研磨至粉末状后参照 DNA 提取试剂盒说明书快速提取患病克氏原螯虾组织 DNA,先用外套引物进行第一步 PCR 扩增。PCR 扩增体系:12.5 μL 2×*Taq* Master Mix,上、下游引物各 1 μL,加入模板 2 μL,8.5 μL ddH₂O。扩增条件:94℃ 10 min,94℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 7 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。接着将扩增产物 10 倍稀释后用内套引物进行第二步 PCR 扩增,第二步 PCR 扩增产物处理同上一步,PCR 产物由成都擎科梓熙生物技术有限公司测序,将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对。

表 1 检测 WSSV 的引物
Tab.1 Detection of primers for WSSV

引物序列 Primer sequences	目的基因片段大小/bp Gene fragment size
F1:ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG R1:TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA	1 447
F2:GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA R2:TAGCGAGAGCCTGTAATCA	941

F1、R1 为外套引物,F2、R2 为内套引物
F1 and R1 are coat primers,F2 and R2 are internal primers

1.4 WSSV 的遗传进化分析

将测序结果通过 NCBI 的 BLAST 查找同源性序列,利用 DNAMAN 进行序列编辑和比对分析,此外,利用 MEGA7.0 邻近法构建系统进化树。

1.5 患病虾组织切片制备及病理损伤观察

将 AFA 液固定的鳃、心脏、肝胰腺、肠道、腹节肌肉和眼睛取出,鳃、腹节肌肉和眼睛用脱钙液脱钙 5 h,接着水洗过夜,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片(3 μm),苏木精-伊红(H&E)染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察组织病理损伤,并拍照记录。

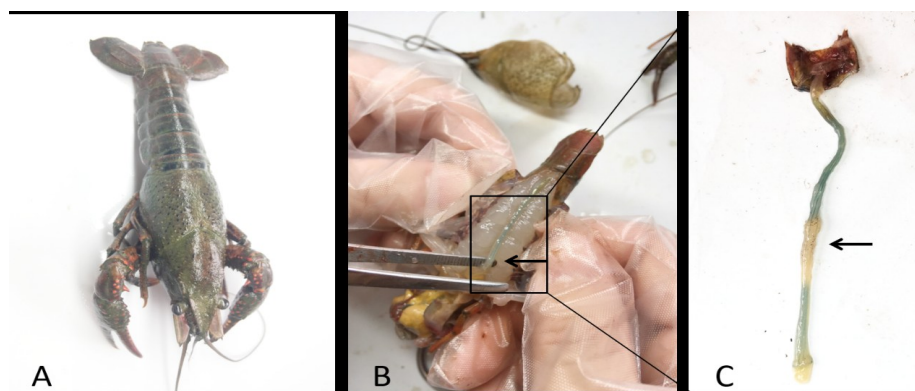
2 结 果

2.1 患病虾的临床症状和解剖特征

患病克氏原螯虾主要临床症状为体色变暗、摄食减少、活力较差(图 1A)。剖解后发现,病虾内脏器官大体病变不典型,主要表现为部分肠段中空无食物,肠壁透明,肠管较细(图 1B-C);其余器官如肝胰腺、鳃等无明显变化。

2.2 患病虾 PCR 检测结果

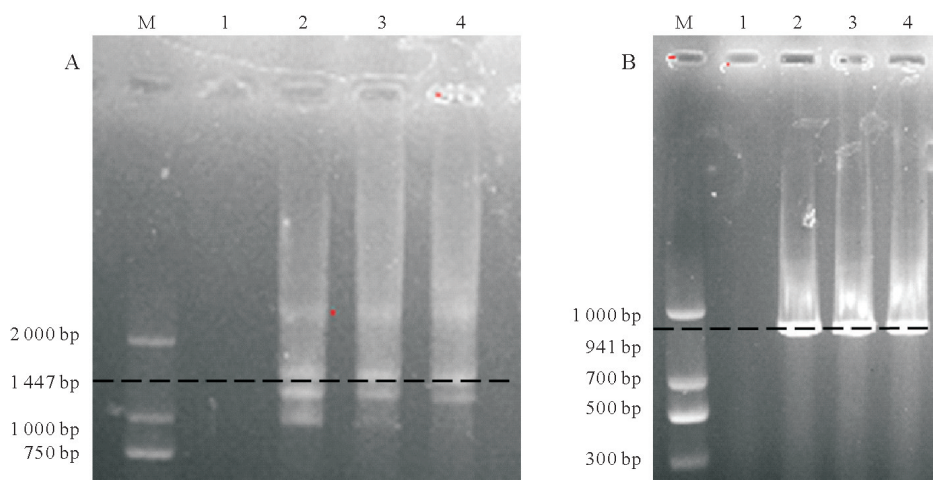
将-80℃保存的鳃、肝胰腺、肠道和肌肉进行混合匀浆,提取混合组织的 DNA,用 WSSV 外引物进行 PCR 扩增,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示,所有样品均扩增出一条 1 447 bp 的特异性条带(图 2A)。接着使用 WSSV 内引物对样品进行套氏 PCR 检测,所有样品均扩增出一条约 940 bp 的条带(图 2B)。套氏 PCR 产物经成都擎科梓熙生物技术有限公司进行序列测定后,获得长度为 941 bp 的序列。通过 BLAST 比对,显示该序列与 GenBank 中 WSSV 有 100% 的同源性,确定本次患病克氏原螯虾体内检测病毒为 WSSV 阳性。



A:患病虾体色变暗;B:肠道有空肠现象,箭头示空肠;C:肠道中空
A:The body color of the diseased shrimp becomes dark;B:The intestinal tract has jejunum phenomenon, and the arrow shows the jejunum;C:Jejunum symptoms

图1 患病虾临床特征

Fig.1 Clinical characteristics of diseased shrimp



A:外套引物扩增条带;B:内套引物扩增条带。M:DNA marker,1代表阴性对照,2、3、4代表样品
A is the coat primer amplification band and B is the inner primer amplification band.M represents DNA marker, 1 represents negative control, 2, 3, and 4 represent samples

图2 PCR检测WSSV

Fig.2 PCR detection of WSSV

2.3 患病虾遗传进化分析结果

将测定序列结果分别命名为 xgq-1、xgq-2 和 xgq-3,用 MEGA7.0 软件构建系统进化树(图 3)。结果显示,该基因序列与 WSSV 聚为一簇,与印度株(MH883318.1)、墨西哥株(MG432482.1)和中国株(KX686117.1)等序列同源性为 100%,进一步确认患病克氏原螯虾体内携带有 WSSV。

2.4 患病虾组织病理观察

经组织病理学观察发现患病虾各组织存在如下病变。

肝胰腺:患病克氏原螯虾肝胰腺组织结构松散,但管腔结构仍然存在,分界较明显。低倍下可见肝小管管腔扩张,星型结构消失,部分肝细胞坏死、崩解,使肝小管断裂,残缺(图 4A);高倍下可见间质有不同程度炎性细胞浸润(图 4B),此外还可见部分肝细胞胞核染色质浓缩,胞核崩解、碎裂(图 4C)。表现为中度至重度坏死性肝胰腺炎,

鳃:可见鳃丝及鳃小片血管严重扩张,充盈(图 4D);鳃丝入鳃动脉和出鳃动脉内均可见大量炎性细胞(图 4E);高倍下可见柱细胞极度肿胀,少量坏死(图 4F)。表现为中度充血性鳃炎。

心脏:有大量炎性细胞浸润,部分区域嗜碱性染色增强(图 4G);高倍下可观察到大量坏死细胞及少量嗜酸性粒细胞(图 4H)。表现为中度坏死性心肌炎。

肠道:可在黏膜下层见到呈团分布的炎性细胞,其余病理变化不典型(图 4I)。肠道表现为轻度肠炎。其他组织器官无明显组织病理表现。

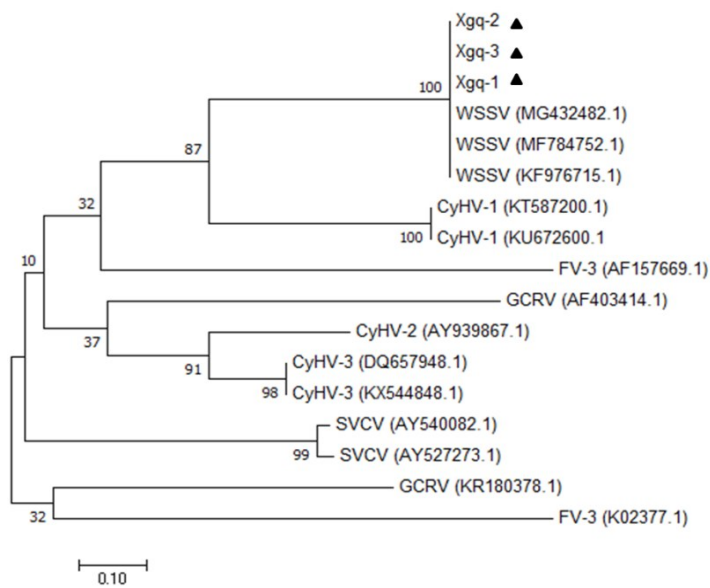
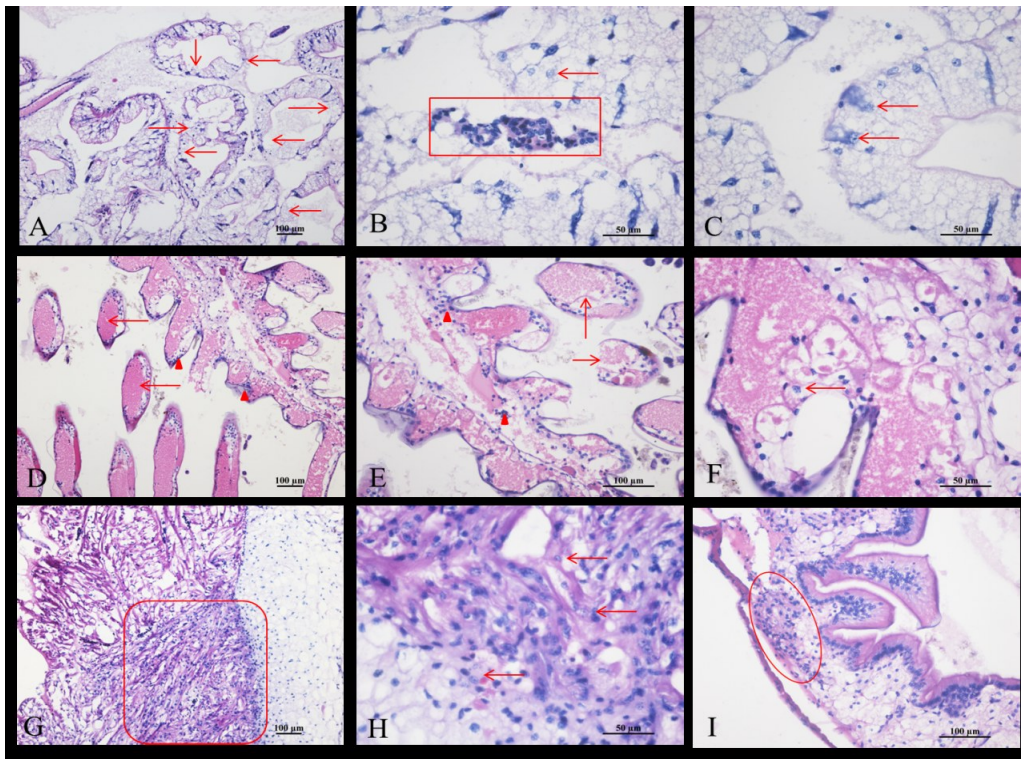


图3 WSSV 的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of WSSV



A:肝小管管腔扩张,星型结构消失,部分肝细胞坏死,使肝小管断裂、残缺,箭头表示残缺的肝小管(H.E 100×);B:肝小管有大量炎性细胞浸润,方框内表示炎症细胞,箭头表示坏死细胞(H.E 400×);C:肝小管细胞坏死,箭头表示坏死细胞(H.E 400×);D:鳃丝血腔严重扩张,箭头表示扩张的血腔(H.E 100×);E:鳃丝血腔内大量炎性细胞浸润,三角形表示炎性细胞(H.E 200×);F:柱细胞肿胀、少量坏死,箭头表示坏死细胞(H.E 400×);G:心脏大面积炎性,方框表示炎症区域(H.E 100×);H:心脏炎症区域内可见大量坏死细胞,箭头表示坏死细胞(H.E 400×);I:肠粘膜下层可见轻度炎性细胞浸润,椭圆内表示炎症细胞浸润区(H.E 200×)

A: The lumen of the hepatic tubule dilates, the star-shaped structure disappears, and some hepatic cells are necrotic, leading to the rupture and incomplete of the hepatic tubule, the arrow shows the incomplete hepatic tubule(HE 100×); B: Large infiltration of inflammatory cells in the hepatic tubules, the box shows the inflammatory cells, and necrotic cells are indicated by arrows(HE 400×); C: Necrosis of hepatic tubule cells, arrow indicates necrotic cells(HE 400×); D: Blood cavity of gill filamentis severely dilated, arrow indicates dilated blood cavities(HE 100×); E: A large number of inflammatory cells infiltrate into the blood cavity of gill filament, the triangle indicates inflammatory cells(HE 200×); F: Column cells are swollen and slightly necrotic, arrow shows the necrotic cells(HE 400×); G: A large area of inflammation of heart, the box shows the area of inflammation(HE 100×) in the heart; H: Numerous necrotic cells are seen in the inflammatory areas of the heart, arrows indicate necrotic cells(HE 400×)); I: Mild inflammatory infiltration is seen in the submucosal layer of the intestine, with the inflammatory infiltration area circled(HE 200×)

图4 患病虾组织病理学表现
Fig.4 Histopathological manifestations of diseased shrimp

3 讨论与结论

目前,WSSV检测方法较多,需筛选一种较为简捷且准确度高的方法。套式PCR检测法^[17]是一个检测WSSV的国家标准,是一种使用两对PCR引物扩增完整的片段的方法,与其他方法更具敏感性高、特异性高等优点^[18]。李文杰^[19]等利用套氏PCR检测克氏原螯虾WSSV,结果显示该方法检测极限达到36 pg,比一步PCR灵敏度提高了1 000倍。本研究采用套氏PCR检测方法,利用外引物扩增出1 450 bp左右的序列,将第一轮PCR反应产物作为内引物扩增的模板,最终得到一条约940 bp的序列,通过BLAST比对及系统发育进化树分析,确定本次患病克氏原螯虾为WSSV阳性。

组织病理学诊断法亦是判断白斑综合征(white spot disease, WSD)的重要方法,由于WSD组织病理学研究起步较晚,且主要以研究对虾为主,目前关于克氏原螯虾感染WSD的组织病理学研究相对缺乏、水平不高,由于病变特征不明,攻击靶器官不清,阻碍了对该病发病机制的深入理解。建立完善的组织病理变化标准,以期为克氏原螯虾WSSV的鉴定提供参考。本研究中患病克氏原螯虾表现为明显的中度至重度坏死性肝胰腺炎、中度充血性鳃炎、以及轻度肠炎,与魏克强^[12]及何琪瑶^[16]报道的一致,但未发现骨骼肌组织病变,却观察到患病虾出现中度坏死性心肌炎。心脏是脊椎动物循环系统中的动力,是维持机体正常的代谢和功能的重要器官,一旦出现病变,对机体危害极大,这可能是造成患病克氏原螯虾死亡的主要原因。本次观察到克氏原螯虾感染WSSV后心脏出现严重的病变,这在之前还未有相关报道。因此,最终确定WSSV主要靶器官为肝胰腺、心脏、鳃和肠道,为WSD组织病理学诊断法提供重要的参考价值。

近年来,克氏原螯虾需求大增,市场往往供不应求,进一步刺激了该品种的扩张性养殖。因此,对养殖过程中疾病的控制尤为重要。WSSV对水生甲壳类动物危害极大,是克氏原螯虾养殖过程中的主要威胁。疫苗是病毒病的防治最有效的手段,目前,已研制出多种抗WSSV疫苗,魏克强^[20]、Jeroen^[21]等制备出抗WSSV的重组VP28蛋白疫苗,并通过实验证明疫苗对克氏原螯虾抗病毒有一定的保护作用;卢亚楠等^[22]还制备了WSSV的3种外壳蛋白VP28、VP19、VP15基因疫苗的特异性卵黄抗体,疫苗处理后克氏原螯虾存活率达到80%以上。虽然目前研制的疫苗在实验室范围内体现了良好的抗WSSV保护作用,但离生产应用还有很长的路要走,使用更为方便的口服疫苗将是控制WSD的重要方向。此外,研究发现WSSV既能横向传播,亦可垂直传播^[23],且只有当水环境中病毒浓度达到一定程度才能造成感染,大部分发病区域是由于水质变差给病毒的感染创造了有利的条件。因此,在生产中,应该随时监测水质情况,一旦恶化及时调理或换水;此外,虾苗的繁殖也要重视,大部分养殖户虾苗来自于上年塘中剩余亲虾,自产虾苗需要进行抽样监测,如有发现病毒感染,及时淘汰,从源头上控制。本研究通过对克氏原螯虾WSD的诊断及组织病理损伤研究,为生产中WSD的鉴定提供一个较为完整的参考模型。

参考文献:

- [1] 王卫民. 软壳克氏原螯虾在我国开发利用的前景[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 375-381.
Wang W M. Development and utilization of *Procambarus crustaceans* in China [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(4): 375-381.
- [2] 唐鑫生. 克氏原螯虾[J]. 生物学通报, 2001, 36(9): 19-20.
Tang X S. Crawfish [J]. Journal of Biology, 2001, 36(9): 19-20.
- [3] 陈昌福, 杨军, 刘远高, 等. 克氏原螯虾暴发性疾病病原及其传播途径的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 763-767.
Chen C F, Yang J, Liu Y G, et al. A preliminary study on the etiology and transmission of fulminant disease in *Procambarus kirschner* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(6): 763-767.
- [4] 宋晓玲, 史成银, 黄健, 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.
Song X L, Shi C Y, Huang J, et al. Detection of white-spot syndrome virus by DNA dot hybridization in shrimp and its bait and environmental organisms [J]. Chinese Science of Fisheries, 2001, 8(4): 36-40.
- [5] 徐洪涛, 朴春爱. 对虾白斑病毒感染的电子显微镜观察及DNA杂交证据[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 252-256.
Xu H T, Piao C A. Electron microscope observation and DNA hybridization evidence of white spot virus infection in prawn [J]. Acta Microbiology Sinica, 2000, 40(3): 252-256.
- [6] 于力, 李庆章. 虾白斑综合症病毒的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6): 486-490.
Yu L, Li Q Z. Research progress of shrimp white spot syndrome virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(6): 486-490.

- [7] Chou P H, Lin Y C, Teng P H, et al. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 173(1): 67-74.
- [8] Yoganandhan K, Syed M S, Sudhakaran R, et al. Temporal analysis of VP28 gene of Indian white spot syndrome virus isolate (WSSV) in different crustacean hosts[J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1): 71-81.
- [9] 谢希贤, 杨丰. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白VP24的定位研究[J]. *厦门大学学报(自然版)*, 2006, 45(3): 415-418.
Xie X X, Yang F. Localization of structural protein VP24 of prawn white spot syndrome virus [J]. *Journal of Xiamen University (Nature Edition)*, 2006, 45(3): 415-418.
- [10] Wang C Y, Lo C F, Chang P S, et al. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan[J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1): 221-231.
- [11] Cai S, Huang J, Wang C, et al. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1995, 19(2): 112-119.
- [12] 魏克强. 白斑综合症病毒浙江分离株在动物模型克氏原螯虾组织中的分布[J]. *中国细胞生物学学报*, 2006, 28(6): 897-901.
Wei K Q. Distribution of zhejiang isolates of leukoplakia syndrome virus in the tissues of the animal model *Procambarus crassipes* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, 28(6): 897-901.
- [13] 陈昌福. 人工养殖克氏原螯虾中出现的问题与对策[J]. *渔业致富指南*, 2008(17): 16-18.
Chen C F. Problems and countermeasures in the artificial breeding of *Procambarus clarkia* [J]. *Guidelines for Fishery Prosperity*, 2008(17): 16-18.
- [14] 薛晖, 王晓丰, 丁正峰, 等. 白斑综合症病毒江苏分离株变异区和缺失区基因的序列比较[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1196-1201.
Xue H, Wang X F, Ding Z F, et al. Sequence comparison of genes in mutation and deletion regions of jiangsu isolates of white-spot syndrome virus [J]. *Chinese Fisheries Science*, 2011, 18(5): 1196-1201.
- [15] 马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合症病毒的概述[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2012, 35(4): 90-100.
Ma X Y, Li P, Yan J, et al. Overview of prawn white-spot syndrome virus [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2012, 35(4): 90-100.
- [16] 何琦瑶, 汪开毓, 刘韬, 等. 湖北省潜江地区克氏原螯虾白斑综合症PCR诊断及组织病理学观察[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 131-140.
He Q Y, Wang K Y, Liu T, et al. PCR diagnosis and histopathological observation of propinus crayfish syndrome in qianjiang area, Hubei Province [J]. *Acta Aquatica Sinica*, 2008, 42(1): 131-140.
- [17] 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部全国水产技术推广总站. 白斑综合症(WSD)诊断规程: 第2部分: 套式PCR检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
Huang hai fisheries research institute, Chinese academy of fishery sciences, national aquatic technology promotion station, ministry of agriculture. Diagnostic procedures for white spot syndrome (WSD): part 2: PCR detection method [S]. Beijing: China Standard Press, 2012.
- [18] 景亚运. HD-3复方中草药对凡纳滨对虾免疫酶影响和抗WSSV感染分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
Jing Y Y. Effect of hd-3 compound Chinese herbal medicine on immune enzyme and anti-wssv infection of *Penaeus vannamei* [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016.
- [19] 李文杰, 周国勤, 朱菲莉, 等. 检测克氏原螯虾白斑综合症病毒(WSSV)的巢式PCR方法的建立与初步应用[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2009, 32(2): 98-102.
Li W J, Zhou G Q, Zhu F L, et al. Establishment and preliminary application of nested PCR method for detection of protocrayfish white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, 32(2): 98-102.
- [20] 魏克强, 许梓荣. 家蚕蛹表达的重组Vp28疫苗对克氏原螯虾的抗病毒保护效应[J]. *实验生物学报*, 2005, 38(3): 190-198.
Wei K Q, Xu Z R. Antiviral protective effect of recombinant Vp28 vaccine expressed in silkworm pupae on *Procambarus clarkia* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 38(3): 190-198.
- [21] Jeroen W, Vlak J M, Hulten M L C W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 571-579.
- [22] 卢亚楠, 李晓宇, 林秋叶, 等. WSSV外壳蛋白基因疫苗的特异性卵黄抗体的制备及其对克氏螯虾的保护作用[C]. 中国水产学会学术年会, 2011.
Lu Y N, Li X Y, Lin Q Y, et al. Preparation of specific yolk antibody of WSSV shell protein gene vaccine and its protective effect on crayfish [C]. Annual Meeting of Chinese Fisheries Association, 2011.
- [23] Mazumder S K, Ghaffar M A, Das S K, et al. Low occurrence of WSSV in *Penaeus monodon nauplii* and post-larvae produced from PCR-negative broodstocks[J]. *Aquaculture International*, 2016, 23(4): 1-15.