

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) LAMP检测方法的建立

孙 妍^{1,2*}, 董学旺^{1,2}, 魏俊利^{1,2}, 顾中华³, 陈浩楠^{1,2}, 刘 群^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 包海岩^{1,2}

¹天津市动物疫病预防控制中心, 天津

²天津市水生动物疫病监测中心, 天津

³天津市农业发展服务中心, 天津

收稿日期: 2023年12月4日; 录用日期: 2024年3月13日; 发布日期: 2024年3月21日

摘 要

本研究建立了一种检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)的环介导等温扩增法(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。根据GenBank中注册的IHHNV-VN基因序列设计出6条特异性引物, 成功建立了IHHNV-LAMP检测方法。该方法检出限为6 copies/μl, 且与对虾其它常见疫病均无交叉反应。采用LAMP和常规PCR方法对40份具有典型IHHNV感染症状的对虾样品进行检测, 结果显示: LAMP方法的阳性检出率为97.5%, PCR方法的阳性检出率为85%, 表明建立的IHHNV-LAMP方法不仅具有高灵敏度、高特异性而且还有较高的准确性, 能够为对虾传染性皮下及造血组织坏死病的早期快速诊断提供技术支撑。

关键词

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒, 环介导等温扩增, 检测方法

Establishment of a LAMP Assay for Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)

Yan Sun^{1,2*}, Xuewang Dong^{1,2}, Junli Wei^{1,2}, Zhonghua Gu³, Haonan Chen^{1,2}, Qun Liu^{1,2},
Li Zhang^{1,2}, Haiyan Bao^{1,2}

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Surveillance Center of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin

³Tianjin Agricultural Development Service Center, Tianjin

Received: Dec. 4th, 2023; accepted: Mar. 13th, 2024; published: Mar. 21st, 2024

*通讯作者。

文章引用: 孙妍, 董学旺, 魏俊利, 顾中华, 陈浩楠, 刘群, 张丽, 包海岩. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) LAMP 检测方法的建立[J]. 水产研究, 2024, 11(1): 30-37. DOI: 10.12677/ojfr.2024.111004

Abstract

This study established a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp. Six specific primers were designed based on the registered IHHNV-VN gene sequence in GenBank, and a successful IHHNV-LAMP detection method was established. The detection limit of this method is 6 copies/ μ l. And there is no cross reaction with other common diseases of shrimp. 40 shrimp samples with typical symptoms of IHHNV infection were detected using LAMP and conventional PCR methods. The results showed that the positive detection rate of LAMP method was 97.5%, and the positive detection rate of PCR method was 85%. This indicates that the established IHHNV-LAMP method not only has high sensitivity and specificity, but also high accuracy, which could provide technical support for the early and rapid diagnosis of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in shrimp.

Keywords

Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV),
Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Detection Method

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

对虾传染性皮下及造血组织坏死病(Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, IHHN)也称慢性矮小残缺综合征(Runt-deformity syndrome, RDS), 于 1981 年在美国夏威夷地区养殖细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)首次发现[1]。该病的致病原为传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)是引起全世界养殖对虾病害的主要病原之一, 已经被世界动物卫生组织(The World Organization for Animal Health, WOA)划定为需向其申报的甲壳动物疫病之一[2]。我国拥有全球最大的对虾养殖产业, 养殖生产总量占居世界第一。近年来由于对虾养殖规模的不断扩大, 病毒性疫病的问题也日益严重, 其中传染性皮下及造血组织坏死病作为危害最为严重的对虾病毒之一对我国对虾养殖产业带来的不良影响也不容忽视。

IHHNV 能够感染多种对虾, 特别是对幼虾的危害尤为明显。1983 年, Lightner 报道了关于从哥斯达黎加和厄瓜多尔商业进口到夏威夷的凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)幼虾 90%死亡的案例[3], Hsieh 等也报道了 IHHNV 导致大量幼年的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)死亡事件[4]。IHHNV 也可以引起成虾的患病, 据报道 IHHNV 可以导致凡纳滨对虾[5]和斑节对虾(*Penaeus monodon*) [6]产生慢性矮小残缺综合征(RDS), 该病致死率不高, 是一种慢性疾病, 具体表现为生长缓慢、额肩歪斜、角质层和吻部畸形等, 最终导致商品虾规格参差不齐, 产量明显下降, 经济损失严重等后果。Lightner 等研究还发现, 感染 IHHNV 或患病后存活下来的细角滨对虾和凡纳滨对虾会终生带毒, 并可通过垂直和水平的传播方式把病毒传染给下一代或其他物种[7]。对虾病毒性疫病暴发后情况难以控制, 迄今为止人们尚无针对 IHHNV 感染的有效防治措施, 因此快速、便捷、灵敏的检测技术的开发与应用就变得尤为重要。

目前已开发应用于检测对虾病毒疫病的方法主要包括组织病理、斑点原位杂交、聚合酶链式反应(PCR)、荧光定量 PCR 等方法。WOAH 推荐的 IHHNV 检测方法为普通 PCR 方法和荧光定量 PCR 方法,

我国现行针对该病的国家标准也只推荐了普通 PCR 的检测方法。基于 PCR 检测原理研发的检测技术虽然灵敏度高,特异性强,但耗时长,不仅需要昂贵的仪器设备还需要专业技术人员进行操作,使用范围基本仅限于科研单位和检疫机构,无法在实际生产中推广使用。本研究在综合考虑应用成本、操作简便程度以及适用性等方面,将 GenBank 登录的 IHNV 基因保守序列进行充分比对分析后,设计了 3 对特异性引物,建立了该病毒的 LAMP 检测方法,可以快速、准确地检出 IHNV 病毒。该方法不需要昂贵的仪器设备和专业的技术人员,只需要一台简单的水浴锅或恒温加热器即可,成本低廉、方便携带,生产一线技术人员经过简单培训就可以轻松掌握,非常适用于在实际生产中推广使用,同时也能够为国际上对虾贸易往来过程中该病的实时监控提供可靠的技术手段。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 病虾来源

患病的凡纳滨对虾采集自天津市滨海新区某对虾养殖基地,具有典型的 IHNV 感染症状,经 IHNV 国标方法检测[8]并测序后确认为 IHNV 感染,由本实验室保存;经检测未感染 IHNV 的对虾组织核酸以及携带南美白对虾常见疫病的病料核酸(包括对虾白斑病、高致病性副溶血弧菌、虾肝肠胞虫病、对虾偷死病、对虾虹彩病毒病以及对虾肌肉白浊病)均由本实验室保存。

2.1.2. 主要仪器和试剂耗材

主要仪器:PCR 仪(ABI)、凝胶成像系统(BioRad)、金属浴(天根生物)、冷冻离心机(*Sigma*)、电泳仪(北京六一)、移液器(Eppendorf)、核酸检测仪(NanoDrop)等;

试剂耗材:海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒(天根生物);10 mM dNTP、质粒提取试剂盒(TakaRa);*Bst*DNA 聚合酶(NEB)、钙黄绿素染料(北京蓝谱)、甜菜碱(*Sigma*)等,本文所用引物均由 Invitrogen 合成。

2.2. 方法

2.2.1. IHNV-LAMP 引物设计

根据 GenBank 已登录的 IHNV 全部毒株序列,经生物软件 Clustal X 找到保守序列区,综合分析后最终选取 IHNV-VN (GenBank 登录号: JN616415.1)为靶基因,利用在线设计软件 Primer Explorer version 5 (<http://primerexplorer.jp/e>),按照引物设计原则,设计并筛选出 6 条最佳用于 IHNV 扩增的 LAMP 引物序列(表 1),分别命名为外引物 IHNV-F3/IHNV-B3,内引物 IHNV-FIP/IHNV-BIP 和环引物 IHNV-LF/IHNV-LB。

Table 1. Primer sequence for IHNV-LAMP
表 1. IHNV-LAMP 引物序列表

引物名称	5'-3'序列
IHNV-FIP	GTTGTGTTCCGCTACTACAGCTCGATCATGGAAGCAATGGA
IHNV-BIP	TGAAGGGACTCCCAACGGATCTCACTCTCTTCCAGTCG
IHNV-F3	GAGACAACCGACGACATC
IHNV-B3	TCTCTGATGACGAAGGTGT
IHNV-LF	CATCGGTAGGTTCCAGTCG
IHNV-LB	CGGACGAAATGGACGGAA

2.2.2. LAMP 反应体系的优化

将感染 IHHNV 对虾的基因组 DNA 作为 LAMP 扩增反应的模板, 在基础反应条件为 63℃ 60 min, 80℃ 10 min 的条件下进行反应。其基础反应体系为: 2.5 μ l 10 $\times$ *Bst*DNA 聚合酶 buffer, 3.5 μ l 10 mM dNTP, 1.5 μ l 100 mM MgSO₄, 0.4 μ l 100 μ M IHHNV-FIP, 0.4 μ l 100 μ M IHHNV-BIP, 0.2 μ l 100 μ M IHHNV-LF, 0.2 μ l 100 μ M IHHNV-LB, 0.05 μ l 100 μ M IHHNV-F3, 0.05 μ l 100 μ M IHHNV-B3, 8 Units *Bst*DNA 聚合酶, 1 μ l 钙黄绿素染料, 3 μ l 5M 甜菜碱, 灭菌水适量, 2 μ l 模板, 总体系共 25 μ l。

在上述基础反应条件的基础上, 分别进行最适反应条件和反应体系的优化实验。反应条件: 分别设定扩增温度为 63℃、64℃、65℃和 66℃, 扩增时间为 30 min、40 min、50 min 和 60 min; 灭活温度为 80℃、85℃和 95℃, 灭活时间为 5 min、7 min 和 10 min 的扩增条件, 进行交叉实验优化最佳反应条件。

反应体系: 分别设定 5M 甜菜碱加入量梯度为 1 μ l、2 μ l、3 μ l 和 4 μ l; 10 mM dNTP 加入量梯度为 2 μ l、3 μ l、3.5 μ l 和 4 μ l; 100 mM MgSO₄ 加入量梯度为 1.5 μ l、2.5 μ l 和 3.5 μ l; *Bst*DNA 聚合酶加入量梯度为 1.5 μ l、2.5 μ l 和 3 μ l, 进行交叉实验优化最佳反应体系, 最终优化出 IHHNV-LAMP 的最佳扩增效率体系。

2.2.3. 灵敏度实验

将用于 IHHNV-LAMP 引物设计的 VN 基因序列与 pUC57 载体连接, 构建 VN-pUC57 质粒, 质粒构建工作由上海生工完成。利用质粒提取试剂盒提取 VN-pUC57 质粒, 利用核酸检测仪测定所提取质粒的初始浓度, 根据公式: 质粒拷贝数/ μ l = 质粒浓度(g/ μ l)/质粒分子量 $\times$ 阿佛加德罗常数, 计算出 VN-pUC57 质粒拷贝数为 6×10^9 , 用灭菌水按 10 倍递进稀释法将质粒稀释到 6×10^9 、 6×10^8 、 6×10^7 、 6×10^6 、 6×10^5 、 6×10^4 、 6×10^3 、 6×10^2 、60、30、6 个质粒个数, 分别作为模板加入到相同的 IHHNV-LAMP 反应体系中, 水浴 65℃放置 30 分钟后观察结果。

2.2.4. 特异性实验

以携带南美白对虾常见疫病的病料核酸(包括对虾白斑病、高致病性副溶血弧菌、虾肝肠胞虫病、对虾偷死病、对虾虹彩病毒病以及对虾肌肉白浊病)为模板进行 IHHNV-LAMP 特异性实验。分别将 6 种携带南美白对虾常见疫病的病料核酸和确认携带 IHHNV 的对虾病料核酸加入到 LAMP 反应体系中进行扩增, 检测本研究建立的 IHHNV-LAMP 检测体系的特异性。

2.2.5. 准确性实验

挑选 40 尾具有典型感染 IHHNV 症状的对虾, 每尾虾同时采用国标方法和 IHHNV-LAMP 检测方法进行 IHHNV 的检测, 将这两种方法得到的结果进行比较, 判断 LAMP 方法的准确性。

3. 结果与分析

3.1. IHHNV-LAMP 的优化结果

综合分析经各反应条件和反应体系的交叉实验结果, 最终确定最佳反应条件为: 65℃ 30 min, 95℃ 5 min; IHHNV-LAMP 扩增效率最佳的反应体系为: 2.5 μ l 10 $\times$ *Bst*DNA 聚合酶 buffer, 3 μ l 10 mM dNTP, 2.5 μ l 100 mM MgSO₄, 0.4 μ l 100 μ M IHHNV-FIP, 0.4 μ l 100 μ M IHHNV-BIP, 0.2 μ l 100 μ M IHHNV-LF, 0.2 μ l 100 μ M IHHNV-LB, 0.05 μ l 100 μ M IHHNV-F3, 0.05 μ l 100 Mm IHHNV-B3, 8 Units *Bst*DNA 聚合酶, 1 μ l 钙黄绿素染料, 1 μ l 5M 甜菜碱, 2 μ l 模板灭菌水定容总体积至 25 μ l。

3.2. IHHNV-LAMP 反应体系的灵敏度

如图 1 所示: 加入重组质粒个数从 6×10^9 个到 6 个的 IHHNV-LAMP 反应体系均显示了阳性结果,

未加入重组质粒的 IHHNV-LAMP 反应体系显示结果为阴性,因此该 IHHNV-LAMP 反应体系的灵敏度(检测下限)为 6 个病毒粒子。

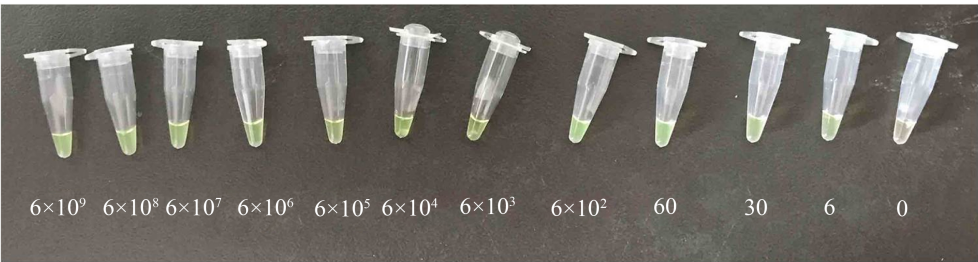


Figure 1. The sensitivity of IHHNV-LAMP reaction system
图 1. IHHNV-LAMP 反应体系的灵敏度

3.3. IHHNV-LAMP 反应体系的特异性

如图 2 显示: 本研究建立的 IHHNV-LAMP 检测方法只对 IHHNV 阳性基因组扩增,而对其它 6 种水生动物常见病原 DNA 均没有扩增反应,说明建立的 IHHNV-LAMP 检测方法对对虾其它常见病毒病的病原均无交叉反应,特异性良好。

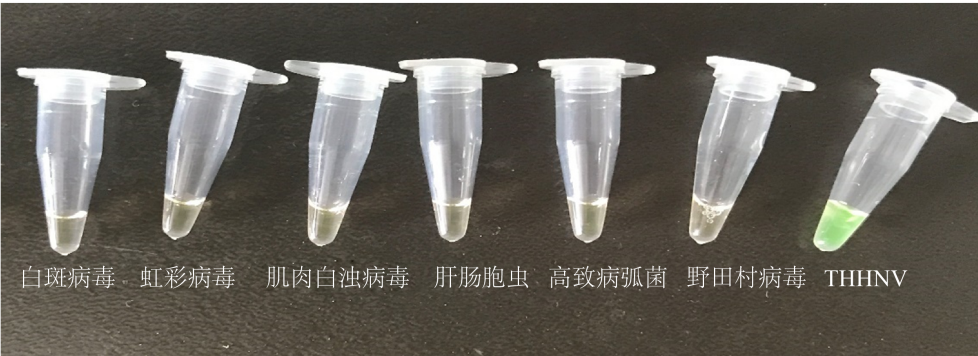


Figure 2. The specificity of IHHNV-LAMP reaction system
图 2. IHHNV-LAMP 反应体系的特异性

3.4. IHHNV-LAMP 快速检测试剂盒的准确性

通过对 40 尾具有感染 IHHNV 典型症状的对虾样品的检测,结果显示(见图 3): IHHNV-LAMP 检测方法能检出 39 尾阳性,阳性检出率为 97.5%;采用国标方法进行检测能检出 34 尾阳性,阳性检出率为 85%,且其中 11 号、12 号、13 号、15 号、16 号、20 号、21 号和 25 号样品为弱阳性(统计结果见表 2)。说明 IHHNV-LAMP 快速检测方法与传统国标方法相比灵敏度和准确性更高。

4. 讨论

IHHNV 病毒粒子大小在 20~22 nm 之间,基因组大小约 4.1 kb,根据其形态学及生物化学等特性被分类为细小病毒科(*Parvoviridae*),其核酸为单链线性 DNA,主要以负链的形式存在[9]。目前,GenBank 已收录部分 IHHNV 地理株基因组序列,地理株主要分布于美国、中国、越南、澳大利亚、泰国、韩国和印度等地,IHHNV 基因组序列包括了所有编码序列和大部分非编码序列,其两端的非编码序列仍然缺少[10]。一些研究表明,不同地区分离到的 IHHNV 分离株之间病毒基因组序列存在一定差异,Tang 等对

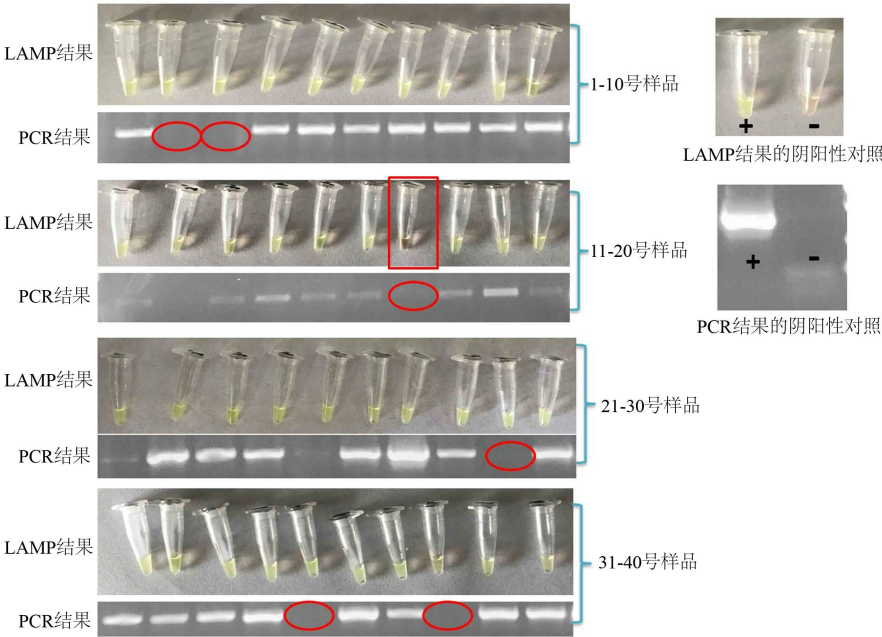


Figure 3. Comparison results of IHHNV-LAMP and PCR method for 40 shrimp samples with typical symptoms of IHHNV infection (Box: Negative samples in LAMP test results; Ellipse: Negative sample in PCR detection results)
图 3. 40 尾具有感染 IHHNV 典型症状对虾样品的 IHHNV-LAMP 快速检测试剂盒与传统 PCR 方法检测结果的比对(方框: LAMP 检测结果中的阴性样品; 椭圆: PCR 检测结果中的阴性样品)

Table 2. Comparison of LAMP and PCR detection results for sick shrimp samples
表 2. 患病对虾 LAMP 和 PCR 检测结果的比较

样品号	LAMP 结果	PCR 结果	样品号	LAMP 结果	PCR 结果
1	+	+	21	+	+(弱带)
2	+	-	22	+	+
3	+	-	23	+	+
4	+	+	24	+	+
5	+	+	25	+	+(弱带)
6	+	+	26	+	+
7	+	+	27	+	+
8	+	+	28	+	+
9	+	+	29	+	-
10	+	+	30	+	+
11	+	+(弱带)	31	+	+
12	+	+(弱带)	32	+	+
13	+	+(弱带)	33	+	+
14	+	+	34	+	-
15	+	+(弱带)	35	+	+

续表

16	+	+(弱带)	36	+	+
17	-	-	37	+	-
18	+	+	38	+	+
19	+	+	39	+	+
20	+	+(弱带)	40	+	+

1982 年至 1997 年间美国地区收集的 14 个不同 IHHNV 分离株进行序列比对,发现存在 0.5%的核酸差异,对从东南亚地区以及非洲地区收集到的 14 个不同 IHHNV 分离株序列分析发现分别存在 8.2%和 14.1%的较大差异[11]。另外,还有研究表明 IHHNV 基因型分又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。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[12]。综上可见,IHHNV 基因组序列存在多样性,且编码蛋白基因序列较短,同时还可能存在与宿主基因组整合的现象[13],因此针对 IHHNV 基因组序列设计扩增引物时不仅需要对比对现有 IHHNV 基因组的前提下,找到保守且能够代表具有致病性特征的基因序列作为目标序列,还要与本地区流行病毒株相吻合,这也就很好地解释了很多业内工作者在开发 IHHNV 各种检测方法过程中,普遍认为引物难设计,且扩增效率不高,检出率不稳定等各种困难。本研究在了解我国地区 IHHNV 主要流行毒株的前提下,充分对比了不同 IHHNV 地理株基因组序列,最终选取了 IHHNV-VN (GenBank 登录号: JN616415.1)为靶基因进行 LAMP 引物序列的设计,在比较筛选了多种引物对的情况下,最终优选出本文发表的 6 条引物序列,其特异性、灵敏度、准确性及可重复性均表现良好。

IHHNV 迄今为止没有有效的防治方法和药物,只有通过全面及时的检测和综合预防来避免病毒的传播和爆发,一方面对亲本进行严格检疫,切断病毒垂直传染途径,另一方面应在养殖过程中及时监测,防治病害的暴发和流行。因此,建立快速、有效、准确的检测和诊断技术是预防此类疫病的重要技术手段。传统的检测方法主要有肉眼观察和组织学方法,组织学方法不适用于常规的快速检测。PCR、荧光定量 PCR 以及酶联免疫吸附试验(ELISA)应用于检测水生动物病毒性疫病,操作复杂,需要昂贵的实验仪器和专业的技术人员,限制了在生产中的推广应用。环介导等温扩增技术(LAMP)可结合特定的荧光染料从而出现肉眼可见的显色反应,人们可以根据颜色的变化来得出结果,非常适用于实际生产中实时追踪检测疫病的携带情况。何琳[14]、Arunrut [15]、葛辉[16]等均建立了 IHHNV 环介导等温扩增技术,李红梅[17]、俞焕腾[18]建立了检测 IHHNV 的实时荧光定量环介导等温技术。本研究也采用了环介导等温扩增技术开发了 IHHNV 快速检测技术,与上述文献相比,采用的实验方法相同,但其反应时间大大缩短,不仅节省了时间,还避免了由于反应时间过长导致的假阳性出现,另外该方法通过构建的质粒进行灵敏度测定,其最低检出限达到 6 copies/μl,且阳性检出率高于现行国标方法,相较其他文献灵敏度显著提高,推测这与引物扩增效率高,特异性强存在一定关系。

5. 结论

本研究建立的 IHHNV-LAMP 检测方法具有简便、快速、特异性强、灵敏度高等优点。在优化了反应条件和反应温度后,其灵敏度达到了 6 copies/μl,30 min 内就可以完成对 IHHNV 的定性检测,且与对虾其它常见疫病均无交叉反应,该技术适用于在实际生产一线使用,为 IHHNV 的池边临床快速诊断和大规模疫病的监控提供了技术支撑。

基金项目

天津市农业产学研“揭榜挂帅”关键技术集成攻关类项目“南美白对虾池塘高密度养殖疫病防控技术的集成应用”，项目编号：GBGG202301。

天津市科技计划项目“盐碱水凡纳滨对虾养殖与病害防控技术示范与应用”，项目编号：22ZXBTSN00080。

参考文献

- [1] Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bell, T.A. (1983) Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis, a Newly Recognized Virus Disease of Penaeid Shrimp. *Invertebrate Pathology*, **42**, 62-70.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90202-1)
- [2] OIE, World Organization for Animal Health (2014) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, Paris, 119-137.
- [3] Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bell, T.A. (1983) Detection of IHHN Virus in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* Imported into Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, **14**, 212-225.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1983.tb00077.x>
- [4] Hsieh, C.Y., Chuanga, P.C., Chenb, L.C., *et al.* (2006) Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) Infections in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, **258**, 73-79.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.007>
- [5] Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., *et al.* (1991) IHHN Virus as an Etiological Factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of Juvenile *Penaeus vannamei* Cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, **22**, 235-243.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1991.tb00740.x>
- [6] Primavera, J.H. and Qunitio, E.T. (2000) Runt-Deformity Syndrome in Cultured Giant Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, **20**, 796-802. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990101>
- [7] Lightner, D.V. (1996) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures of Disease of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 304.
- [8] 全国水产标准化技术委员会. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [9] Bonami, J.R., Trumper, B., Mari, J., *et al.* (1990) Purification and Characterization of the Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus of Penaeid Shrimps. *Journal of General Virology*, **71**, 2657-2664.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-11-2657>
- [10] 袁颜颜, 杨冰, 万晓媛, 等. 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[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 67-73.
- [11] Tang, K.F. and Lightner, D.V. (2002) Low Sequence Variation among Isolates of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) Originating from Hawaii and America. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**, 93-97.
<https://doi.org/10.3354/dao049093>
- [12] Tang, K.F. and Lightner, D.V. (2006) Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis (IHHNV) in the Genome of the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, **118**, 185-191.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.003>
- [13] Saksmerprome, V., Puiprom, O., Noonin, C., *et al.* (2010) Detection of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR Analysis and DNA Sequencing. *Aquaculture*, **298**, 190-193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.012>
- [14] 何琳, 徐海圣, 王美珍, 等. LAMP 快速检测对虾 IHHNV 的方法与应用[J]. 病毒学报, 2010, 26(6): 490-495.
- [15] Arunrut, N., Prombun, P., Saksmerprome, V., *et al.* (2011) Rapid and Sensitive Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus by Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick. *Journal of Virological Methods*, **171**, 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.022>
- [16] 葛辉, 吴建绍, 杨章武, 等. 凡纳滨对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)可视化环介导等温扩增(LAMP)技术方法的优化与应用[J]. 渔业研究, 2021, 43(4): 357-365.
- [17] 李红梅, 江晓, 任春华, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 热带生物学报, 2016, 70(3): 307-313.
- [18] 俞焕腾. 实时荧光定量 LAMP 技术检测四种对虾病原微生物方法研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 中国计量大学, 2019.