

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) TaqMan MGB检测方法的建立

张 丽^{1,2}, 刘 群^{1,2}, 赵良炜^{1,2}, 陈浩楠^{1,2}, 包海岩^{1,2}, 姚洪旺³, 李 娜^{1,2}, 孙 妍^{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专业实验室, 天津

³天津水之源生物科技有限公司, 天津

收稿日期: 2024年11月20日; 录用日期: 2024年12月13日; 发布日期: 2024年12月23日

摘要

本研究建立了一种对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHHNV*) TaqMan MGB探针荧光定量PCR检测方法。根据GenBank中已登录的IHHNV基因序列(GenBank登录号: AF218226)设计引物和探针建立的检测方法, 采用构建的pMD-18-IHHNV质粒建立的标准曲线为 $y = -0.3084X + 12.631$, $R^2 = 0.9995$ 。另外该定量检测方法的最低检出限为5 copies/ μ l, 与对虾其它常见疫病均无交叉反应, 且不同浓度标准品组内的变异系数(CV)在0.08%~0.26%之间, 与普通PCR检测结果比较显示对虾样品的IHHNV阳性检出率提高, 说明该方法具有良好的灵敏度、特异性和重复性, 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

凡纳滨对虾, 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒, TaqMan MGB, 检测方法

Establishment of TaqMan MGB Detection Method for Infectious Subcutaneous and Hematopoietic Tissue Necrosis Virus (IHHNV) in Shrimp

Li Zhang^{1,2}, Qun Liu^{1,2}, Liangwei Zhao^{1,2}, Haonan Chen^{1,2}, Haiyan Bao^{1,2}, Hongwang Yao³, Na Li^{1,2}, Yan Sun^{1,2*}

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Professional Laboratory of Aquaculture Disease, Tianjin

*通讯作者。

文章引用: 张丽, 刘群, 赵良炜, 陈浩楠, 包海岩, 姚洪旺, 李娜, 孙妍. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)TaqMan MGB 检测方法的建立[J]. 水产研究, 2024, 11(4): 235-242. DOI: 10.12677/ojfr.2024.114027

³Tianjin Water Star Biotechnology Co., Ltd., Tianjin

Received: Nov. 20th, 2024; accepted: Dec. 13th, 2024; published: Dec. 23rd, 2024

Abstract

This study established a contagious subcutaneous and hematopoietic tissue necrosis virus TaqMan in shrimp MGB probe fluorescence quantitative PCR detection method. The primers and probes for this method were designed based on the IHHNV gene sequence already registered in GenBank (GenBank accession number: AF218226). The standard curve was established using the constructed pMD-18-IHHNV plasmid, with the equation $y = -0.3084X + 12.631$ and $R^2 = 0.9995$. In addition, the minimum detection limit of this quantitative detection method is 5 copies/ μ l. This method has no cross reactivity with other common diseases of shrimp. The coefficient of variation (CV) within different concentration standard groups of this method ranges from 0.08% to 0.26%. Compared with ordinary PCR detection results, the IHHNV positive detection rate of shrimp samples has increased. This method demonstrates good sensitivity, specificity, and reproducibility. This method can provide technical support for the early and rapid diagnosis of infectious subcutaneous and hematopoietic tissue necrosis disease in shrimp.

Keywords

Litopenaeus Vannamei, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), TaqMan MGB, 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

传染性皮下及造血器官坏死病(*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis*, IHHN)是甲壳类动物常见的病毒之一，也是世界动物卫生组织(The World Organization for Animal Health, WOAH)规定必须申报的甲壳类疾病之一^[1]。其又名慢性矮小残缺综合症(*Runt-Deformity Syndrome*, RDS)，其病原是对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Vecrosis Virus*, IHHNV)^[2]。IHHNV 是无囊膜二十面体结构，大小为 22 nm^[3]，对细角滨对虾(*Litopeuces svylirostris*)对 IHHNV 的感染性较强，死亡率高达 90%^[4]。对虾被 IHHNV 感染后，存活个体在成为病毒终生携带体的同时，还可以通过垂直传播方式把病毒传给下一代，通过水平传播方式把病毒传至其它种群^[5]。

IHHNV 在世界许多国家都有报道，如墨西哥、澳大利亚、新加坡、马来西亚、泰国、印度尼西亚、菲律宾、印度、韩国、巴西、阿根廷、委内瑞拉等，自 2001 年以来，中国沿海地区的对虾和蟹中均检测到 IHHNV^[6]。说明 IHHNV 在我国已形成了一定的流行趋势，目前仍是严重危害我国对虾养殖产业的主要病原。2014~2020 年，天津机场对虾苗种监测点的检测结果显示，凡纳滨对虾苗种普遍存在携带 IHHNV 的情况，至 2019 年 IHHNV 检出率达到最高峰 12.5%。从育苗场抽样检测的结果显示，近几年 IHHNV 阳性率虽然有所下降，但每年仍有检出^[7]。邓威等发现 2015~2016 年天津市对虾养殖主产区已普遍存在 IHHNV 感染^[8]。

目前 IHHNV 的诊断技术主要有组织学检测和分子生物学诊断。组织学检测具体是指通过对病理组

组织制作切片，再对组织切片中的特定的组织成分进行原位的定性、定位或定量研究。组织学检测方法虽然具有成本优势，但在操作上繁琐，并且检测的时间长，所需试剂多，不适用诊断。分子诊断技术是从分子的水平，利用分子扩增的原理将少量的病原体的特定基因组进行扩增，并通过检测手段进行检测。其应用在 IHHNV 的诊断上目前有两种，即基于 PCR 分子检测方法和等温扩增检测方法，该类方法具有高灵敏性和特异性等优点[9]。TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 在检测的灵敏度、速度和检出率上均优于常规 PCR [10]。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[11]。但徐丽美等通过研究发现了每毫克组织含 10^3 个病毒粒子可作为传染性皮下及造血器官坏死病暴发的危险临界数值[12]，张娜等发现养殖过程中进行有效的生物安保措施是预防对虾传染性皮下及造血组织坏死病的最有效的方法，而该病无有效的治疗方法[13]。因此，用一种灵敏、快速的 IHHNV 检测方法进行 IHHNV 的准确定量，可以在养殖生产上为防控该病的大面积爆发提供必要的数据支持。本研究利用天津地区 IHHNV 毒株，建立了 IHHNV 的 TaqMan MGB 定量检测方法，完成了反应体系的优化，检测方法的特异性、重复性、灵敏度等多项指标的评价，为该病原的准确定量提供技术支撑。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验病虾来源

患病的凡纳滨对虾采集于天津滨海新区某养殖场，经 IHHNV 国标方法[14]检测并测序后，确定为 IHHNV 阳性对虾病料，取其肝胰腺和鳃丝组织，于-80℃保存。后续用于特异性实验的健康对虾核酸样本以及携带对虾白斑病、高致病性副溶血弧菌、虾肝肠胞虫病、虹彩病毒病的核酸样本均由本实验室保存。

2.1.2. 主要设备和试剂

主要仪器：荧光定量 PCR 仪(ABI)，PCR 仪(ABI)、凝胶成像系统(Biometra)、金属浴(天根生物)、离心机(Sigma)、电泳仪(北京六一)。

试剂：海洋动物组织基因组提取试剂盒 DNA(天根生化科技有限公司)，质粒提取试剂盒均购自大连宝生物(TakaRa)，本文所用引物均由 TaKara 合成。

2.2. 方法

2.2.1. 引物探针的设计

根据 GenBank 中已登录的 IHHNV 基因序列(GenBank 登录号: AF218226)为靶基因，使用 PrimerExpress 软件按照引物设计原理，设计并筛选出 1 对引物和 1 条 TaqMan MGB 探针(表 1)。

Table 1. Primer and probe sequences for IHHNV

表 1. IHHNV 引物和探针序列

引物和探针	序列(5'~3')	长度(nt)	产物大小(bp)
F	GGCCTAGTAACAAGAACAGGAG	22	
R	CTGTTATTTGACTGATTCTGGGTTTC	25	103
P	AGAGCGTAGGACTTCCGATGAGGT	25	

2.2.2. 阳性质粒的构建

将感染 IHHNV 的对虾鳃丝组织采用基因组提取试剂盒进行 DNA 提取，以提取的基因组作为 PCR

反应模版, 使用 IHHNV 质粒扩增引物(表 2)进行 PCR 扩增, 其中反应体系(总体积 25 μ l)为: 上游引物 F1 (10 μ mol) 0.75 μ l、下游引物 R1 (10 μ mol) 0.75 μ l、模板 0.5 μ l、2 \times Premix Taq buffer 12.5 μ l、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.25 μ l、DEPC 水 10.25 μ l。反应条件为: 95℃ 5 min、95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 7 min, 4℃ 保存。所得 PCR 产物经回收后与 pMD18 载体连接, 以构建重组 IHHNV 质粒 pMD-18-IHHNV, 作为阳性质粒。将重组对虾 pMD-18-IHHNV 质粒转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 构建对虾 IHHNV 重组大肠杆菌 pMD-18-IHHNV-TOP10 株, 并对重组菌株进行了测序与鉴定。

Table 2. Primer sequences for IHHNV

表 2. IHHNV 质粒扩增引物序列

引物	序列(5'~3')	长度(nt)	产物大小(bp)
F1	ATCGGTGCACTACTCGGA	18	
R1	TCGTACTGGCTGTTCATC	18	356

2.2.3. IHHNV 荧光定量 PCR 扩增体系的优化

使用 1.2.1 步骤中设计的引物与探针, 以 1.2.2 构建的 IHHNV 质粒为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增优化实验。对引物、探针、模板等浓度、退火温度、扩增循环数等条件进行了优化和摸索, 最终确定反应体系为: 上游引物 F (10 μ mol) 1.5 μ L; 下游引物 R (10 μ mol) 1.75 μ L; 探针 P (10 μ mol) 1.5 μ L; 模板 2 μ L; 2 \times Probe PCR buffer Mix 12.5 μ L; DEPC 水 5.75 μ L, 总体积为 25 μ L。扩增反应条件为: 94℃ 预变性 10 s; 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 20 s; 共 40 个循环, 在每一循环退火结束时收集荧光信号。

2.2.4. IHHNV 荧光定量 PCR 检测标准曲线的建立

参照质粒提取试剂盒说明书, 提取 pMD-18-IHHNV 质粒, 扩增片段大小为 356 bp。用超微量分光光度计测定质粒 DNA 的浓度并根据公式: 重组质粒拷贝数(copies/ μ l) = (质粒浓度 \times 10⁻⁹ \times 6.02 \times 1023) / (660 道尔顿/碱基 \times 碱基数) [15], 使用 Easy dilution (TaKara) 将重组 IHHNV 质粒 pMD-18-IHHNV 进行 10 倍梯度稀释(1 \times 108 copies/ μ l – 1 \times 101 copies/ μ l), 以 8 个浓度梯度的重组质粒作为建立标准曲线的模板, 进行荧光定量 PCR 扩增, 所用引物探针、扩增反应体系及反应条件均与步骤 1.2.3 相同。上述 9 个浓度梯度, 每个浓度重复 3 次, 取 3 次的均值, 以循环数为横坐标, 荧光强度的对数值为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.2.5. 灵敏度评价

采用了 Easy Dilution (TaKara) 将重组 IHHNV 质粒 pMD-18-IHHNV 进行梯度稀释, 稀释后的质粒作为检验该荧光定量方法灵敏度的评价模板, 进行 PCR 扩增, 所用引物探针、扩增反应体系及反应条件均与步骤 1.2.3 相同。

2.2.6. 特异性评价

采用 1.2.3 的 IHHNV 荧光定量 PCR 检测方法对对虾传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)、对虾白斑综合症病毒(WSSV)、对虾肝肠胞虫(EHP)、对虾虹彩病毒(DIV)、高致病性副溶血弧菌(AHPND)进行检测, 用于评价该方法区别鉴定对虾传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)与其它对虾常见几种重大疫病病原的特异性。

2.2.7. 重复性评价

以重组 IHHNV 质粒 pMD-18-IHHNV 浓度为 1 \times 10⁷ copies/ μ l、1 \times 10⁶ copies/ μ l、1 \times 10⁵ copies/ μ l 为模板, 采用 1.2.3 中 IHHNV 荧光定量 PCR 检测方法进行重复性试验。每个模版分别进行 3 次重复检

测, 记录 Ct 值, 统计并计算变异系数, 变异系数(CV) = 标准偏差(SD)/平均值(MN)。

2.2.8. 临床样品的检测应用

从本市滨海新区随机抽取 3 家对虾养殖场的 20 份对虾样品, 采用本研究建立的 IHHNV 荧光定量检测方法进行检测, 同时采用国标法进行验证和确认。

3. 结果与分析

3.1. 标准曲线的绘制

绘制的标准曲线如图 1 所示, 得到的相关系数 $R^2 = 0.9995$, 方程式为 $y = -0.3084X + 12.631$, 从图 3 可以看出, 1×10^8 copies/ μl ~ 1×10^1 copies/ μl 浓度的 PCR 扩增曲线均有效。

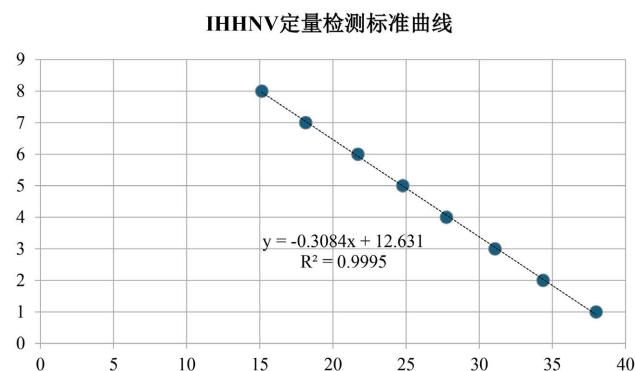


Figure 1. Standard curve established for IHHNV fluorescence quantitative PCR detection method
图 1. IHHNV 荧光定量 PCR 检测方法建立的标准曲线

3.2. 灵敏度评价结果

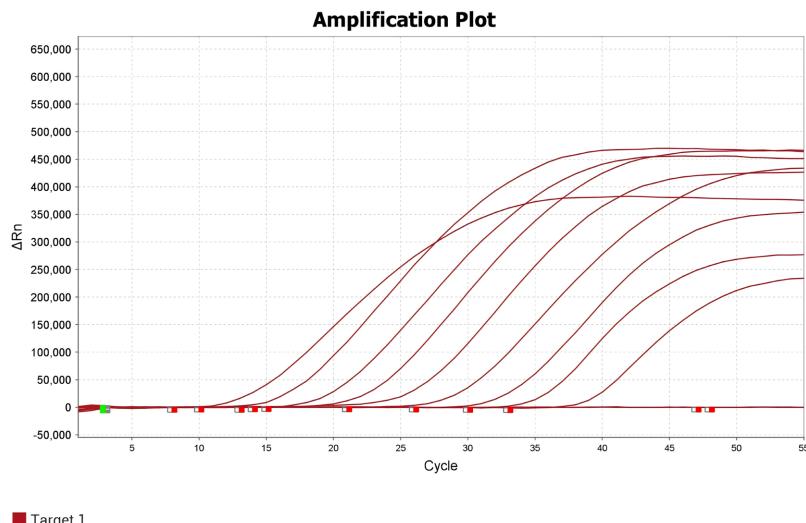


Figure 2. Sensitivity detection results of IHHNV real-time fluorescence quantitative PCR detection method. Among them, 1~10 are 1×10^8 copies/ μl , 1×10^7 copies/ μl , 1×10^6 copies/ μl , 1×10^5 copies/ μl , 1×10^4 copies/ μl , 1×10^3 copies/ μl , 1×10^2 copies/ μl , 1×10^1 copies/ μl , 5 copies/ μl , 1 copy/ μl , and 11 are negative control samples

图 2. IHHNV 实时荧光定量 PCR 检测方法灵敏度检测结果图, 其中 1~10 分别为 1×10^8 copies/ μl 、 1×10^7 copies/ μl 、 1×10^6 copies/ μl 、 1×10^5 copies/ μl 、 1×10^4 copies/ μl 、 1×10^3 copies/ μl 、 1×10^2 copies/ μl 、 1×10^1 copies/ μl 、5 copies/ μl 、1 copies/ μl , 11 为阴性对照品

灵敏度评价结果如图 2 所示, 本研究建立的检测方法对重组对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒质粒 pMD-18-IHHNV 的最低检出限为 5 copies/μl。

3.3. 特异性评价结果

特异性检测结果如图 3 所示, 除对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒外, 其他病原(菌)均未出现有效扩增曲线, 表明该检测方法在检测鉴定对虾常见几种病原间具有良好的特异性。

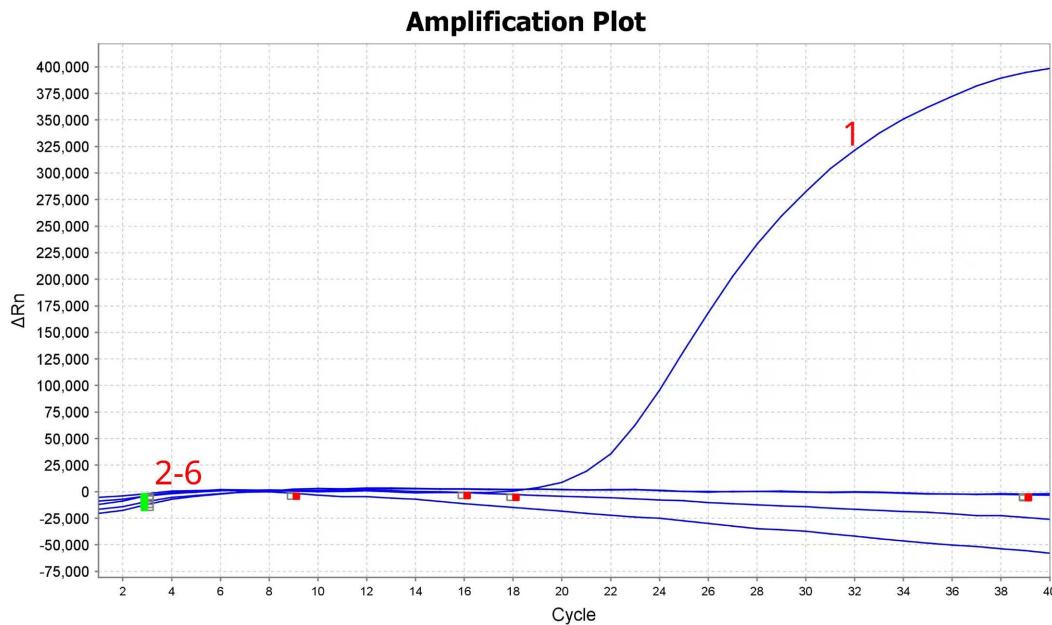


Figure 3. Specific detection results of IHHNV real-time fluorescence quantitative PCR detection method. Among them, 1 is a positive quality control, 2~5 are respectively shrimp white spot syndrome virus, shrimp highly pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, shrimp rainbow virus, shrimp hepatointestinal parasite, and 6 is a negative control substance

图 3. IHHNV 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性检测结果, 其中 1 为阳性质控, 2~5 分别为对虾白斑综合症病毒、对虾高致病性副溶血弧菌、对虾虹彩病毒、虾肝肠胞虫, 6 为阴性对照品

3.4. 重复性评价结果

从表 3 的结果可以看出, 不同浓度标准品组内的变异系数(CV)在 0.08%~0.26% 之间, 表明该方法具有较好的重复性。

Table 3. Results of repeatability evaluation analysis of IHHNV fluorescence quantitative detection method
表 3. IHHNV 荧光定量检测方法重复性评价分析结果

标准品浓度	CT 值	平均值 $\bar{X} \pm SD$	变异系数 % CV
105 copies/μl	27.95、28.03、28.28	28.09 ± 0.030	0.11%
106 copies/μl	20.83、20.71、20.58	20.71 ± 0.016	0.08%
107 copies/μl	18.86、18.95、18.53	18.78 ± 0.049	0.26%

3.5. 临床样品检测结果的比较

用常规 PCR 方法和本试验方法对 20 份临床样品进行检测, 结果如表 4 显示常规 PCR 方法检测样品阳性率为 25% (5/20), 本试验方法检测样品阳性率为 30% (6/20), 其中 5 份与常规方法检测结果一致,

1 份为同批次出现阳性样品养殖场样品, 荧光定量检测 CT 值为 34.78, 说明本文建立的 IHHNV 荧光定量检测方法与传统 PCR 方法相比较, 灵敏度更高, 可以降低对虾 IHHNV 的漏检率。

Table 4. The results of clinical sample detection
表 4. 临床样品检测结果

指标	PCR	荧光定量 PCR
阳性	5	6
可疑	0	2
阴性(荧光定量 ct 值 ≥ 38)	15	12
共计	20	20

4. 讨论

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒是已知对虾病毒中最小的病毒[16], 于 1981 年首次发现, 现广泛分布于全球各种野生和养殖对虾中[3]。Yang 等通过对我国沿海的对虾和蟹类样品的 IHHNV 检测, 证实自 2001 年起我国已有 IHHNV 的流行[17]。从 2014 年~2020 年天津凡纳滨对虾育苗场抽样检测 IHHNV 的结果来看, 每年都有检出, 至 2020 年检出率达到 19.51%, 因此对于 IHHNV 防控, 检测结果的快速准确尤为重要[7]。实时荧光定量 PCR 被认为是目前最敏感、特异性、重复性最好的核酸定性、定量检测方法[18]。根据信号基团的不同, 实时荧光定量 PCR 可以分为染料法和探针法, 探针法中使用的探针多是 TaqMan 探针, 与染料法相比, 在一定程度上避免了假阳性问题的出现[19]。

本试验根据 IHHNV 基因组的保守序列, 设计了 TaqMan-MGB 探针, 并对反应条件中引物浓度、探针浓度等条件进行优化, 确定了该荧光定量 PCR 的最佳反应体系, 建立了 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 检测 IHHNV 的方法。本实验以 pMD18-T-IHHNV 重组质粒为标准品, 绘制了标准曲线。本试验通过大量样品的检测结果表明, 该方法检 IHHNV 的灵敏度高, 约为 5 个病毒粒子/反应, 在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/ μl 的范围内具有良好的线性关系, 定量范围宽, 特异性、重复性好。本方法简便快速, 从样品制备到获得检测结果仅需 3 h~4 h, 适合于该病原的快速定量检测, 为对虾 IHHNV 在生产上早诊断, 早预防提供了技术方法。

5. 结论

本研究建立的对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) TaqMan MGB 检测方法具有反应速度快、特异性强、灵敏度高等优点。该方法采用构建的重组质粒作为阳性标准品, 在对反应条件和反应温度优化后, 灵敏度达到了 5 copies/ μl , 能够完成对 IHHNV 的快速定量检测, 为对虾 IHHNV 在生产上的检测及防控提供了有效的技术手段。

项目基金

天津市农业发展服务中心种业青年科技创新项目“凡纳滨对虾新品种‘海兴农 3 号’的引进与养殖技术研究”, 项目编号: zxkj202422。

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: 22ZXBTNSN00080。

参考文献

- [1] 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) PCR 检测方法的建立[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(2): 1-5.
- [2] 白丽蓉, 赵志英. 对虾传染性皮下与造血组织坏死病毒(IHHNV)的研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(14): 114-119.
- [3] 闫冬春, 陈博堃. 传染性皮下及造血组织坏死病毒致病性研究进展[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 167-172.
- [4] 杨慧赞, 童桂香, 郑晓聪, 等. IHHNV PCR 检测方法改进及广西流行株基因型分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(5): 1127-1132.
- [5] Lightner, D.V. (1996) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, 304.
- [6] 王静静, 于吉悦, 侯子豪, 常林瑞, 李婷, 闫冬春. 传染性皮下及造血组织坏死病毒对南美白对虾仔虾的人工感染研究[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2021, 37(2): 151-156.
- [7] 孙悦, 刘健, 叶桂煊, 等. 2014 年-2020 年天津凡纳滨对虾苗种主要病毒携带情况调查[J]. 中国水产, 2022, 55(5): 95-96.
- [8] 邓威, 许杰, 刘群, 等. 2015-2016 年天津市对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒感染调查[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(9): 23-25, 101.
- [9] 夏小明. 对虾 WSSV 和 IHHNV 病毒重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法的研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [10] 高正琴, 邢进, 冯育芳, 岳秉飞, 贺争鸣. TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 995-1000.
- [11] 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.
- [12] 徐丽美, 杨丰. 利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系[J]. 高技术通讯, 2001, 11(12): 9-11.
- [13] 张娜, 谢艳辉, 仇保封, 郑舒尹, 斯泽恩, 李家侨. 对虾产品疫病双重荧光 RPA 方法的建立和初步应用[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(1): 78-86.
- [14] OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- [15] 安徽, 郑晶, 车颖欣, 等. 诺如病毒和轮状病毒三重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(8): 49-54, 58.
- [16] Lightner, D.V. (2011) Virus Diseases of Farmed Shrimp in the Western Hemisphere (The Americas): A Review. *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**, 110-130. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>
- [17] Yang, B., Song, X., Huang, J., Shi, C. and Liu, L. (2007) Evidence of Existence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp Cultured in China. *Veterinary Microbiology*, **120**, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.011>
- [18] 柯昌文, 郑夔, 张欣, 等. TaqMan MGB 探针实时聚合酶链反应检测登革病毒[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(8): 716-720.
- [19] 姜文灿, 岳素文, 江洪, 等. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展[J]. 临床检验杂志(电子版), 2015, 4(1): 797-805.