

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0141-06

PCR 检测试剂诊断对虾白点病毒^{*}

刘正忠, 黄玉雯, 苏 城

(锐基国际股份有限公司, 台北)

摘 要: 对虾白点病 (white spot disease, WSSV) 目前急需准确、快速的病毒诊断技术. PCR 诊断方法是目前已知的最佳选择. 但 PCR 技术在使用上存在着某些问题, 例如专一性、灵敏度、假阳性、假阴性及定量等, 是选择 PCR 做为病毒诊断试剂时, 必须慎重考虑的问题. 市面上已有商品化的虾白点病毒诊断试剂供养殖者选用. IQ2000 系统采用已经过证实的白点病毒核酸序列作为 PCR 的反映标的, 具专一性强、灵敏度高、可同时进行定性及定量检测、包含了内控制组及阳性标准品、可有效地排除假阴性及假阳性的问题等特点. 无论在学术研究及实际养殖上都可证明其功效. 以 IQ2000 为基础所发展出来的虾白点病毒安全指标, 可提供养殖户作为虾白点病毒防治的参考依据.

关键词: 对虾白点病毒; PCR 检测试剂; 诊断; 应用

中图分类号: S945.4⁺7 **文献标识码:** A

自 1990 年起在亚洲所发生的对虾白点病 (white spot disease, WSSV) 持续造成养殖草虾及斑节对虾的大量死亡, 为亚洲海水虾养殖业当前最为严重的问题之一^[1]. 近 2 年亚洲部分地区持续引进美洲白虾 (*P. vannamei*), 由于缺乏适当的检疫体系, 因此也同时将原来盛行于中南美洲的病毒也引进亚洲地区. 1999 年初, 白点病毒也陆续在中南美洲各养虾区被诊断出来, 并造成极大的恐慌^[2]. 因此如何防止各类病毒持续蔓延所造成的重大损失, 成为各地养虾业最迫切的课题之一. 近年来学术界陆续研究了许多应用分子生物学所发展的技术作为诊断病毒的工具, 例如 PCR^[3]、DotBlot^[4]、*in-situ* hybridization、ELISA 等. 其中又以 PCR 最受瞩目, 但 PCR 的诊断过程中, 有许多潜在的问题是忽略的, 如易产生假阳性或假阴性, 不易获得定量的结果, 不同实验室之间的检验结果不易相互比较和人员训练的要求较高等. 因此如何克服这些潜在的问题, 便成为 PCR 病毒诊断应用上的关键. 以商业化的检测试剂—IQ2000 WSSV Detection & Prevention System 为例, 提出解决方案. 同时也以此系统 2 年来在养殖业和学术界的应用实例及其成效为例, 协助养殖者了解如何正确的将 PCR 检测技术应用到实际养殖, 以降低疾病所造成的损失.

1 PCR 在养殖业实际应用中存在的问题

PCR 方法的高灵敏度是其他检验方法无法匹敌的, 而每一反应可检测到个位数特定核酸

^{*} 收稿日期: 1999-09-15

序列的能力，更是大部分需要高灵敏度的病毒诊断所不可或缺的。而其高专一性、原理简单、易学易懂、价格合理等因素，更加突显出 PCR 的优越性。因此，有关利用 PCR 技术来检测病毒的文献，更如雨后春笋般陆续被发表^[5]。但是，隐藏在 PCR 技术的潜在问题，却鲜少有人提出。如若 PCR 设备未定期校正，其实际工作温度与所显示的温度很可能产生少微的差距。此一温度上的差距，可直接影响到 PCR 机器升降温速度不同而造成 2 台 PCR 机器每一圈的反应效率相差 10% 左右，那么在 30 圈后，将会造成灵敏度相差 15~20 倍。因此，必须要很妥善地利用 PCR 技术方能得到正确的检测结果。大家可以想像，当养殖人员根据文献上的指示，利用 PCR 方法检测病毒时，如果该方法灵敏度只有 1/20 甚至更低，便很容易导致错误的论断。这种因不正确的检测结果所造成的损失，恐怕很难估计。

上面的例子只是冰山的一角，其他如因 DNA 萃取过程不当所造成品质不好，无法有效地进行 PCR 反应而导致的假阳性结果；因样品交互污染或因 PCR 终产物的污染而产生的假阳性结果；因人员训练不足而产生的错误；因样品采集部位的错误而导致实验失败；因病毒的突变而导致原始设计不再能有效检测突变病毒的基因序列；因试剂（如酵素降解）而导致 PCR 反应效率的降低；因选择设计的基因序列与其他病毒太相似而造成的交互反应（cross reaction）等等，只要其中任何的环节发生问题，PCR 都可能提供养殖业者错误的讯息。而这些问题每天都在那些运用 PCR 的养殖业者周围发生。另外，因为疫情的发生，与活体是否感染病毒及其体内的病毒总量有密切的关系。一般 PCR 检测通常只能提供定性的结果，如果要得到定量的结果，往往需要很繁锁的手续，或是使用非常昂贵的试剂及仪器，使实际应用受到限制。

2 商业化白点病毒 PCR 检测试剂的实例

在此，以实际运用在海水虾养殖上的商业化白点病毒检测试剂 IQ2000 WSSV Detection & Prevention System 为例，讨论 PCR 检测试剂如何克服以上的问题，并应具有哪些特点。首先，IQ2000 系统运用独特的设计在同一检测反应中，可同时呈现定性和定量的检测结果，并将阳性的检体区分为严重感染、中度感染、轻度感染、极微量感染 4 个等级。另外，本试剂提供一组内控制组（internal standard），利用 PCR 扩增病毒序列的同时，还针对对虾的共同特定基因序列：18S rRNA 进行反应，阴性的样品将会产生特定相对分子质量的终产物。因此可避免因为 DNA 品质不良而导致假阳性的结果（图 1）。

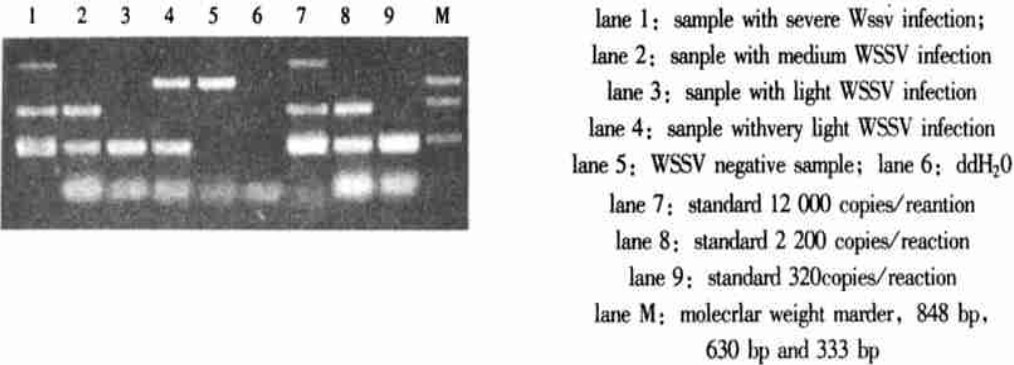


图 1 IQ2000 白点病毒检测系统的实验结果

另外, IQ 2000 系统在 PCR 反应过程中, 只加入而不取出, 因此大量地减低了 PCR 终产物的污染所造成的假阳性结果. 而系统内附的 DNA 萃取试剂, 操作简易, 并可获得品质良好的 DNA, 可提高检测的效率并降低假阳性的结果.

IQ2000 系统同时提供了经过准确定量的阳性标准品, 此标准品是由人为克隆的, 只包括少部分的病毒基因序列, 所以完全不具有感染性, 但却能够进行特定的 PCR 反应. 由于已经过准确的定量, 因此利用此标准品, 即可检验系统的灵敏度是否达到标准: 灵敏度不足或是过度灵敏都会降低数据的实用性. 此外, 利用不同稀释浓度的标准品也可以检验系统的定量功能是否正常, 不同实验室间也可以依标准品的反应结果做为比较彼此检测数据的依据, 并校正自己的 PCR 机器.

IQ2000 系统的理论基础建立在采用已经过证实的核酸序列作为 PCR 反应的标的, 不会与其他已知病毒产生交互反应 (cross reaction) 这一研究成果上. 同时, 经东南亚各国、中国台湾、日本、美国德州, 中南美洲所采集的样品证实, 此试剂可以检测出目前已知在不同地区及带原物种的白点病毒^[9].

3 IQ2000 系统在学术研究上的运用实例

实验设计是选择台湾南部的 4 个养殖管理技术相当的私人养殖场 (表 1), 并追踪其

表 1 白点病毒检测结果

养殖池	采样时间	样品大小\ cm	检测结果					
			1-step P(+) ¹⁾	2-step P(-)	N(-)		DF ²⁾	
1 号池, 密度为 50 尾/ m ² , 感染时间为 19980405	0430	2. 0~ 5. 0	0	1/ 10	9/ 10		0	
	0514	7. 0~ 9. 0	1/ 5	4/ 5	0		0	
			Level1 ³⁾	Level2	Level3	Level4	N(-)	DF
	0528	3. 5~ 8. 0	1/ 11	4/ 11	6/ 11	0	0	0
			1-step P(+) ¹⁾	2-step P(-)	N(-)		DF	
2 号池, 密度为 24 尾/ m ² , 感染时间为 19980510	0514	1. 0~ 1. 5	0	10/ 11	1/ 11		0	
			Level1	Level2	Level3	Level4	N(-)	DF
	0528	4. 5~ 5. 5	0	0	0	1/ 3	2/ 3	0
	0611	3. 0~ 3. 5	4/ 12	6/ 12	1/ 12	1/ 12	0	0
			1-step P(+) ¹⁾	2-step P(-)	N(-)		DF	
3 号池, 密度为 48 尾/ m ² , 感染时间为 19980510	0430	3. 0~ 9. 0	0	1/ 10	9/ 10		0	
	0514	3. 5~ 9. 0	0	1/ 3	2/ 3		0	
			Level1	Level2	Level3	Level4	N(-)	DF
	0528	3. 5~ 11. 0	1/ 11	4/ 11	6/ 11	0	0	0
	0611	6. 0~ 15. 0	0	0	0	4/ 5	1/ 5	0
			1-step P(+) ¹⁾	2-step P(-)	N(-)		DF	
4 号池, 密度为 24 尾/ m ² , 感染时间为 19980430	0430	2. 0~ 4. 0	0	2/ 10	8/ 10		0	
	0514	3. 0~ 8. 0	0	20/ 25	5/ 25		0	
			Level1	Level2	Level3	Level4	N(-)	DF
	0528	3. 5~ 9. 0	0	0	0	0	10/ 10	0
	0611	4. 5~ 12	0	0	0	8/ 20	12/ 20	0
	0626	9. 5~ 14	0	0	0	0	15/ 15	0
	0709	10~ 14	0	0	0	3/ 10	7/ 10	0

1) 为 2 步 PCR 检测法; 2) 检测失败; 3) 为 1 步 PCR 检测法

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

中白点病的感染程度与死亡率及疫情暴发之间的关系. 从实验的结果显示, 当感染的等级由轻度感染转变为中度感染时, 即为白点病的疫情开始暴发, 于 3~7 d 内将会发生大量死亡的现象. 相反, 在良好的控制之下, 微量感染的虾苗仍然能够在较低紧迫(stress)的情况下存活, 并能成功收成. 因此养殖成功的关键, 除了与养殖密度, 养殖池管理, 营养以及其他外在可能造成紧迫的因素(如气候、水质变化)等之外, 放养虾苗的病毒感染程度, 即疾病的监控, 也是非常关键的因素(表 1). 养殖业者如果仅只专注在放养虾苗的病毒问题, 并不能保证养殖一定会成功, 但是的确能够降低养殖的风险. 在取得更大的样品统计之后(共 100 000 次), 针对于种虾(垂直感染造成虾苗带原)、虾苗、成虾、环境因素(外在的带原者, 如螃蟹, 其他虾种及池中的甲壳类生物)和天然饲料(如种虾催熟时所用的乌贼、螃蟹等)等 5 类, 经过有系统的研究后, 提出一套白点病毒防治上的安全指标(WSSN Index)(图 2). 举例而言, 就种虾的筛选部分, 当种虾检测呈阴性时, 其产下并孵化的虾苗如未被外界病毒感染, 为不含白点病毒的虾苗. 反之, 如果种虾已知为中度感染以上, 则其虾苗将会带原, 且病毒量有很大的机会会造成日后白点病疫情的暴发, 如种虾为微量感染, 则可透过洗卵的程序去除附著的病毒, 并应于放养虾苗前(PL8~PL12), 再针对虾苗进行检测, 以确定洗卵程序的效用和确保虾苗未被白点病毒感染. 最新的研究结果显示, 种虾最佳的检验时机应为产卵后立刻检验^[8].

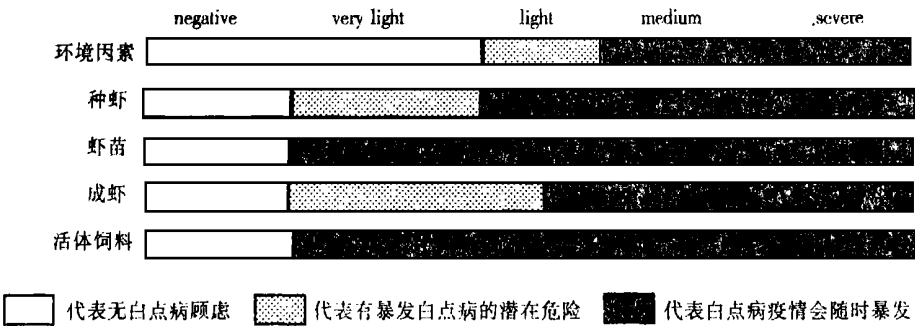


图 2 白点病毒在不同检体上的安全指标

4 IQ2000 系统在实际养殖上的运用实例

这套白点病毒检测及预防系统, 已经实际运用在部分东南亚以及中南美洲的大型海水虾养殖公司. 以泰国的 A 公司为例, 他们将此套检测系统完全融入养殖过程之中, 经由 2 年多超过 100 000 次检验所累积的经验, 已将因白点病所造成养殖失败率, 由 1997 年的 40%, 降低到 1999 年 5% 以下; 在印尼的 B 公司, 则在 1 年半前开始时利用 IQ2000 WSSV 系统来筛选种虾, 并选择购买感染率较低地区的种虾作为供应来源. 同时严密控制虾苗的健康品质, 只放养完全不带白点病毒的虾苗进入养殖池中, 结果显示, 因白点病所造成的养殖失败率也由 1 年半前的 35%, 降低到目前的 5% 以下.

5 PCR 检测试剂在应用上需面对的问题

虽然 IQ2000 白点病毒检测试剂的成功, 的确能够帮助养殖业者预防病毒性疾病, 但是在实际运用上仍有一些问题有待克服.

(1) 养殖业的生态. 由于疾病控制的因素环环相扣, 因此检测的机制必须能够涵盖养殖

的全程.但部分地区在养殖生态上,将虾苗孵化场和养殖场分开,前者专门负责生产虾苗,而后者则向前者购买虾苗放养.如此一来,除非有具公信力的第三者,协助开立证明,否则就算虾苗孵化场确有从事检验,但如果养殖日后为环境因素而导致白点病毒疫情暴发,其责任归属将难以澄清,另如养殖场具有 PCR 检验设备及能力,亦须得到孵化场的全力配合,因为并不是每一个孵化场愿意接受检验.因为一旦被检验出为阳性,将会造成虾苗滞销,也连带影响商誉.

(2) 养殖业的过度集中.水平感染为白点病传染的途径之一,如果各个养殖池彼此间距离太近,而其中只有部分业者进行检测,则那些未进行检测并且疫情暴发池的排水在未经过恰当处理的情况下,将会污染该地区的整体养殖环境.一旦沿海的甲壳类都因为不当的排放污染源而变成带病原者后,除非进行检测的养殖业者,有完善的水处理系统和阻绝措施,否则亦将难逃污染的命运.

(3) 养殖流程无法配合.例如部分养殖业者的种虾催熟过程中,使用螃蟹肉做为饲料,即使原来的种虾未遭感染,也会因为喂食带病原的生物而感染.因此,养殖的流程中,必须去除任何可能的传染因素,否则就算进行检验,亦徒劳无功.

(4) 种虾来源的不足.在若干季节,如环境变化过大,其种虾带病原的几率,可高达 50%~70%.在此情况下,养殖业者为了生存,也不得不使用被白点病毒感染的种虾.其实,在这种情况下,绝大部分养殖业者投资了人力、饲料、能源之后,往往还是以悲剧收场.

上述的这些问题,不仅仅是 IQ2000 系统所遭遇的问题,也是其他病毒检测系统必须共同面对的课题.虽然 IQ2000 系统已提供养殖界一个良好的范例,并成功地整合了学术界、试剂开发厂商和养殖业者.但是如何进一步将生物技术在海水虾养殖业中发展,并有利于更多的养殖业者,仍然需要大家共同努力.

致谢:国立台湾大学动物系罗竹芳教授和郭光雄教授在试剂开发过程中的支持与协助,以及他们所提供的研究资料.

参考文献:

- [1] CHOU H Y, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan[J]. Dis Aquat Org. 1995, 23: 165~173.
- [2] Estudian la presencia de la mancha blanca/ white spot(WSSV) y la cabeza amarilla/yellow head (YHV) en Ecuador[J]. Acuicultura del Ecuador, 1999, 9~11.
- [3] TAKAHASHI Y, et al. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of bacilliform virus(RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus(SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius [J]. J Fish Dis, 1996, 19: 399~403.
- [4] MARI J, et al. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes[J]. Dis Aquat Org. 1998, 33: 11~17.
- [5] NUNAN L M, et al. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus(TSV) in experimentally infected shrimp[J]. Dis Aquat Org. 1998, 34: 87~91.
- [6] LO C F, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs, and other arthropods[J]. Dis Aquat Org. 1996, 27: 215~225.
- [7] LO C F, et al. Monitoring cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection during their growth period by polymerase chain reaction[A]. The Fifth Asian Fisheries Forum[C]. Chiang Mai, Thailand, 1998.

[8] HSU H G. et al. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders[J] . Submitted to Dis Aquat Org.

The Applications of Commercialized PCR-based Detection Technology on Diagnosis of Shrimp White Spot Syndrome Virus （WSSV）

LIU Zheng-zhong^{*} , HUANG Yu-wen, SU Chen

Abstract: An accurate and efficient viral disease detection technology is urgently required for shrimp culture industry to prevent white spot disease. And PCR based detection system is generally believed to be the best choice. However, there are potential problems associated with the application of PCR based technology, such as detection specificity and sensitivity, false positive, false negative, and capability for quantitation, et al. All these above mentioned potential problems should be considered carefully when choosing PCR based technology for virus detection. IQ2000 WSSV detection and prevention system, a commercialized WSSV detection Kit available in the market, for example, has been successfully and widely adopted by many shrimp farms in the last two years. IQ2000 utilizes the most conserved region of viral sequence as its target sequence for PCR reaction; therefore, it provides excellent specificity and sensitivity. Also, IQ2000 system provides diagnostic results in quantitative format, which is very useful information for the disease control purpose. The potential problem of false negative and false positive results in regular PCR diagnosis can be eliminated by incorporation of internal standard and well designed diagnostic procedure. WSSV index, an index developed by using IQ2000 WSSV Detection and Prevention System, can be very useful for White Spot Disease prevention in shrimp culture industry.

Keywords: white spot disease; PCR; diagnosis; application