

文章编号: 1000-0615(2018)01-0131-10

DOI: 10.11964/jfc.20170510843

## 湖北省潜江地区克氏原螯虾白斑综合征PCR诊断及组织病理学观察

何琦瑶<sup>1</sup>, 汪开毓<sup>1\*</sup>, 刘 韬<sup>1</sup>, 刘绍春<sup>2</sup>, 贺 扬<sup>1</sup>,  
叶彩燕<sup>1</sup>, 何晟毓<sup>1</sup>, 秦振阳<sup>1</sup>, 谢 恒<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

2. 北京渔美康生物技术有限公司, 北京 102300)

**摘要:** 近年来在湖北省范围内人工养殖的克氏原螯虾暴发了严重的疾病, 其中白斑综合征病毒(WSSV)已成为危害克氏原螯虾健康养殖的重要病原。2016年5月湖北省潜江市养殖区暴发了一种传染性疾病, 为探究此次疾病病因和流行规律, 将染病虾进行临床症状观察、对病料进行PCR检测、系统发育树分析、人工感染和组织病理学观察。结果显示, 发病克氏原螯虾临床症状主要表现为摄食减少, 活力下降, 反应迟钝; 组织病理学观察结果显示, 克氏原螯虾的肝胰腺、肠、肌肉、鳃组织均出现不同程度变性和坏死以及炎性细胞浸润等典型病理学变化, 与WSSV感染克氏原螯虾出现的病变相似; PCR检测患病克氏原螯虾样品, 结果显示WSSV呈阳性, 阳性检出率为55.56%(15/27), 未检测到斑节对虾杆状病毒(MBV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV); 检测产物测序并进行系统发育树分析, 结果显示, 该基因序列与WSSV的EG3株(KR083866.1)核苷酸序列同源性为100%。将病虾的肝胰腺、肠和肌肉组织投喂健康克氏原螯虾, 投喂组均表现为急性死亡(累积死亡率为100%), 并出现与自然发病虾相同的症状。WSSV的巢式PCR检测结果显示, 人工感染病虾为WSSV阳性。根据以上显示, 本次养殖克氏原螯虾大规模死亡的病原是WSSV。

**关键词:** 克氏原螯虾; 白斑综合征; 组织病理学

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)属于淡水螯虾的一个种。克氏原螯虾在动物分类学上隶属于节肢动物门(Arthropoda)、软甲纲(Malacostraca)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae)、原螯虾属(*Procambarus*)<sup>[1]</sup>。2008年起, 湖北地区人工养殖的克氏原螯虾不断暴发流行病。目前已报道的克氏原螯虾病原包括: 澳洲红螯螯虾杆状病毒(*Cherax quadricarinatus* bacilliform virus, CqBV)、佛罗里达螯虾(蓝魔虾)杆状病毒(*Cherax destructor* bacilliform virus, CdBV)、贵族螯虾杆状病毒(*Astacus astacus* bacilliform virus, AaBV)、白

斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)、蓝魔虾系统类病毒(*Cherax destructor* systemic parvo-like virus, CdSPV)、寄生澳洲红螯螯虾鳃上的推定类病毒(Putative parvo-like virus in gills of *Cherax quadricarinatus*)、卵分离死亡病毒(Spawner-isolated mortality virus, SMV)、传染性胰腺坏死病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)、澳洲红螯螯虾肝胰腺呼肠孤样病毒(*Cherax quadricarinatus* hepatopancreatic reo-like virus, CqHRV)和螯虾盖蒂病毒样病毒(*Cherax Giardia-virus-like virus*, CGV)<sup>[2]</sup>, 其中WSSV对克氏原螯虾

收稿日期: 2016-05-19 修回日期: 2017-10-10

资助项目: 四川省科技厅应用基础项目(2014JY0143); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

的危害尤为突出。

WSSV, 属线头病毒科(Nimaviridae), 白斑病毒属(*Whispovirus*), 为一种无包涵体杆状病毒, 此病毒严重危害水生甲壳类动物, 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<sup>[3-5]</sup>。WSSV的宿主广泛, 可感染甲壳类动物, 尤其是虾类、蟹类等, 近年来陆续有报道WSSV是造成克氏原螯虾流行病并导致大量死亡的病原<sup>[6-7]</sup>。2016年5月湖北省潜江地区养殖的克氏原螯虾出现大规模的死亡, 为进一步明确此次发病的原因, 本研究通过对发病克氏原螯虾进行临床症状观察、PCR检测、系统发育树分析、人工感染及组织病理学观察, 从而确定导致此次克氏原螯虾死亡的病原是WSSV, 以期为潜江地区克氏原螯虾WSSV的防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

患病克氏原螯虾采集于湖北潜江市发病严重区A(总口镇、熊口镇)、B(浩口镇、张金镇)、C(龙湾镇、江陵县), 各取濒死克氏原螯虾

20~30尾, 平均体质量约28 g, 体长约10 cm。健康克氏原螯虾购自四川省成都市温江水产市场, 平均体质量约21 g, 体长约8 cm。琼脂糖、组织DNA提取试剂盒均购于自宝生物工程(大连)有限公司; PCR扩增引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成; 2×*Taq* Master Mix购于成都擎科梓熙生物技术有限公司。

### 1.2 症状观察及采样

对所采集的A、B、C组患病克氏原螯虾进行临床症状和解剖症状观察。选取濒死克氏原螯虾, 除去头胸甲, 用眼科剪迅速采集鳃和肝胰腺, 同时剪开尾部采集肠道和肌肉, 分别置于-80 °C保存和10%甲醛溶液中固定。

### 1.3 引物设计

参照近年来检测引起的克氏原螯虾感染暴发性流行病病原的报道以及根据临床发病症状筛选出3种能够对克氏原螯虾造成严重危害的病毒: 传染性皮下及造血组织坏死病毒(*Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*, IHHNV)、斑节对虾杆状病毒(*Monodon baculovirus*, MBV)、白斑综合征病毒(WSSV)<sup>[8]</sup>, 并参照杨冰等<sup>[9]</sup>的方法合成可检测3种病毒的引物(表1)。

表1 检测WSSV、IHHNV、MBV 3种病毒的引物

Tab. 1 The primers used for identification of WSSV, IHHNV, MBV

病毒名称 virus name	引物序列 primer sequence	片段大小/bp size
WSSV <sup>[8]</sup>	F1: ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG R1: TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA F2: GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA R2: TAGCGAGAGCCTGTAATCA	1 447 941
IHHNV <sup>[9]</sup>	F3: TAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGG R3: TGGGTAGACTAGGTTTCCAAGGGATGGTT	703
MBV <sup>[10]</sup>	F4: TCCAATCGCGTCTGCGATACT R4: CGCTAATGGGCGACAAGTCTC	365

### 1.4 DNA提取

将-80 °C保存的27尾濒死克氏原螯虾的肝胰腺、鳃、肠道和肌肉组织混合后剪碎并称取0.05 g组织, 参照组织DNA提取试剂盒说明书进行病虾组织DNA提取。

### 1.5 PCR检测及系统发育树构建

以提取的濒死克氏原螯虾组织DNA为模板, 利用引物分别进行WSSV、IHHNV、MBV特异性PCR检测。PCR反应体系总体积为25 μL, 其中含12.5 μL 2×*Taq* Master Mix, 上下游引物各1 μL,

2 μL模版, 8.5 μL ddH<sub>2</sub>O。检测WSSV的PCR反应程序为: 94 °C 预变性10 min; 94 °C变性1 min, 55 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 循环30次; 72 °C终延伸7 min。检测IHHNV和检测MBV的PCR反应程序为: 94 °C 预变性4 min; 94 °C变性1 min, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环30次; 72 °C终延伸10 min。反应结束后取反应产物6 μL用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 在凝胶成像系统中观察并拍照。PCR产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行序列测定, 将测序结果在GenBank上进行BLAST比对, 并用MEGA 6构建系统发育树。

### 1.6 组织切片制备

将甲醛溶液固定的组织样品进行脱水、透明、包埋, 制备石蜡组织包埋块, 并利用组织切片机进行石蜡切片(5 μm), 展片于用蛋白甘油预包的载玻片上37 °C烘烤60 min, 进行常规H.E染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍照。

### 1.7 人工感染实验

在实验室暂养5 d后选取健康存活的克氏原螯虾30尾用于人工感染实验, 实验期间水温保持在22~25 °C。10尾投喂正常饲料作为对照组, 20尾投喂潜江地区采集的濒死克氏原螯虾组织作为感染组, 攻毒后连续观察1周, 记录临床症状和死亡情况, 并采集死亡克氏原螯虾的鳃、肝胰腺、肠和肌肉4种组织进行PCR检测。

## 2 结果

### 2.1 临床症状及剖检结果

患病濒死克氏原螯虾临床症状主要表现为

摄食减少、活力下降、反应迟钝, 部分静卧于池边水草上, 体色发暗。剖检结果显示, 病克氏原螯虾腹部脏污, 头胸甲及腹节甲壳易剥离, 内层有软甲壳, 体内有积液, 肝胰腺肿大颜色变浅(图版 I -1, 2), 鳃丝发黑(图版 II -1), 胃肠道空虚、颜色发绿(图版 II -2), 血淋巴不易凝固。

### 2.2 PCR检测结果及系统发育树分析

对濒死克氏原螯虾(A组5尾, B组4尾, C组18尾, 共计27尾)。组织DNA模板用WSSV外引物扩增后, 3个不同采样区的病虾样本均显示1447 bp的特异性条带(A组2条, B组4条, C组9条, 共计15条), 检测阳性率为55.56%(15/27), 样品阴性对照无扩增产物(图1)。随机选取第一步检测结果为阳性的8个样品(A组2个, B组2个, C组4个)使用内引物(941 bp)进行巢式PCR检测, 所有检测样品条带与目的条带大小一致(图2), 说明此养殖区的患病克氏原螯虾体内携带WSSV。PCR检测IHHNV和MBV均未扩增出目标条带, 说明患病螯虾体内不携带IHHNV和MBV。PCR

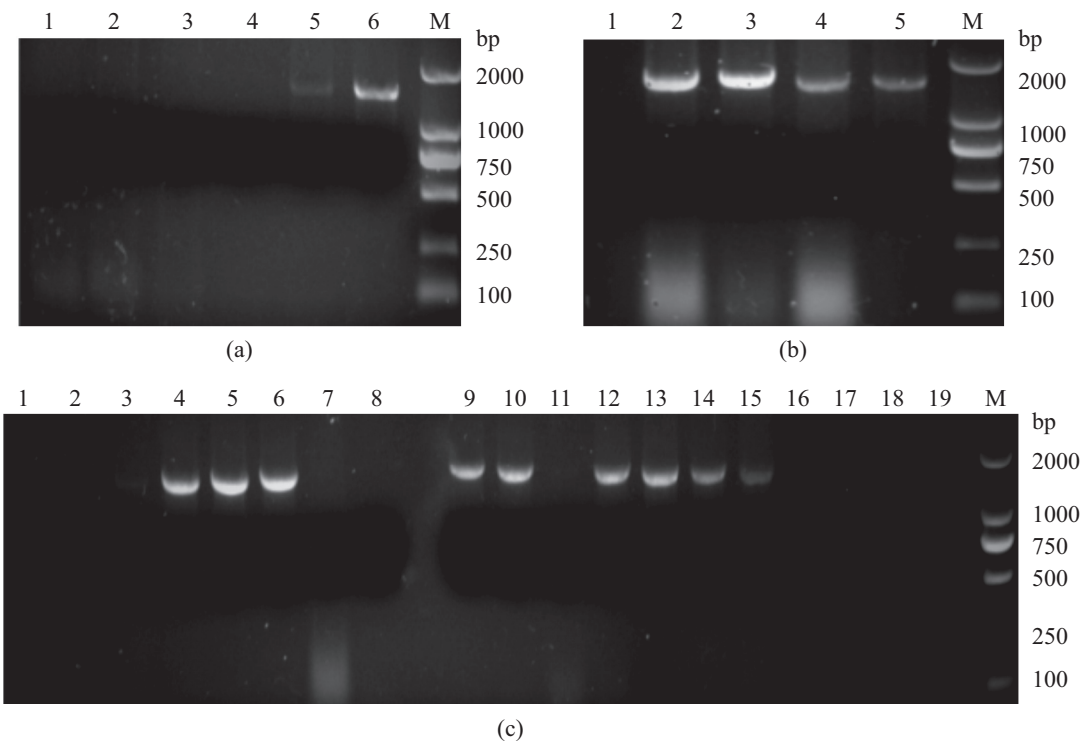


图1 PCR检测WSSV

(a) 1. 阴性对照, 2-6. 采样点A, M. DL2000分子量标准; (b) 1. 阴性对照, 2-5. 采样点B, M. DL2000分子量标准; (c) 1. 阴性对照, 2-19. 采样点C, M. DL2000分子量标准

Fig. 1 WSSV detection by PCR

(a) 1. negative control, 2-6. sampling point A, M. DL2000 Marker; (b) 1. negative control, 2-5. sampling point B, M. DL2000 Marker; (c) 1. negative control, 2-19. sampling point C, M. DL2000 Marker

产物经成都擎科梓熙生物技术有限公司测定后，获得长度为1447 bp的序列。将测序结果在GenBank中进行核酸BLAST分析，选取同源性的最高的基因序列，用MEGA 6软件将其与本研究的序列(登录号：MF101757)及GenBank中WSSV、IHHNV、锦鲤疱疹病毒(*Koi herpesvirus*, KHV) TK基因的保守序列、传染性造血器官坏死病毒(*Infectious hematopoietic necrosis virus*, IHHNV)G基因的序列构建系统进化树。结果显示，该基因序列与WSSV聚为一簇，且与WSSV的MEX2008株(登录号：KU216744.1)、CN01株(登录号：KT995472.1)、EG3株(登录号：KR083866.1)等序列同源性为100%，进一步证实患病克氏原螯虾体内携带WSSV(图3)。

### 2.3 组织病理观察

濒死克氏原螯虾肝胰腺的病理变化严重，

肝胰腺组织结构松散，呈坏死状态，但腺状结构没有破坏，仍然可见。肝细胞肿大，空泡变性和坏死，但细胞轮廓仍然存在，核染色质溶解，呈空泡状甚至破裂。细胞靠近肝小管腔面，细胞膜破裂，使肝小管表面呈缺失破损状态(图版 I -3)，有的细胞内有巨大空泡形成(图版 I -4)。胚胎细胞(E-细胞)、存储/吸收细胞(R-细胞)、排泄细胞(B-细胞)和纤维细胞的细胞完整性缺失。肝小管的管腔明显扩大，有的区域破裂(图版 I -5)，间质增宽，炎性水肿，血淋巴管内及周围较多炎性细胞浸润(图版 I -6)；肝小管细胞广泛空泡变性，在细胞内有很多空泡呈海绵状结构。细胞核染色质溶解呈空泡化，严重时细胞溶解，间质疏松，水肿，有较多炎性细胞浸润(图版 I -7)。

濒死克氏原螯虾鳃丝细胞肿大、结构模糊，细胞核肿大，结缔组织和上皮细胞均出现

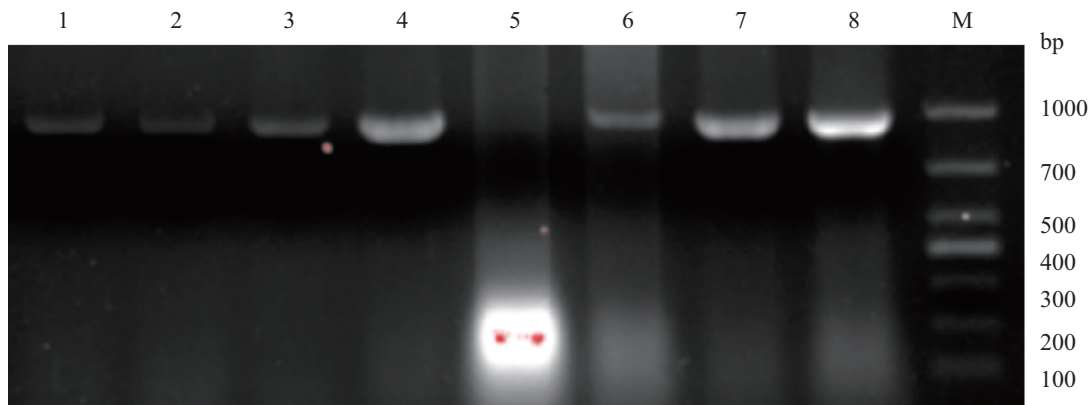


图2 PCR检测WSSV

1-8. 巢式PCR外引物检测结果阳性的样品(1-2. 采样点A, 3-4. 采样点B, 5-8. 采样点C), M. DL1000分子量标准

Fig. 2 WSSV detection by PCR

1-8. positive samples were detected by nested PCR (1-2. sampling point A, 3-4. sampling point B, 5-8. sampling point C), M. DL1000 Marker

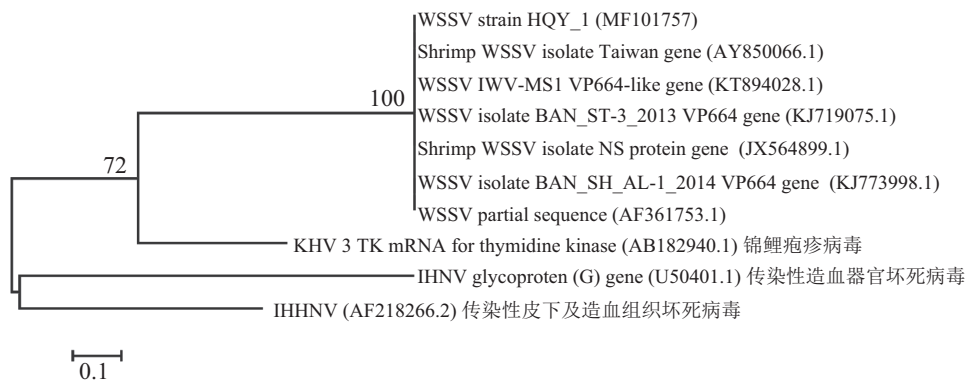
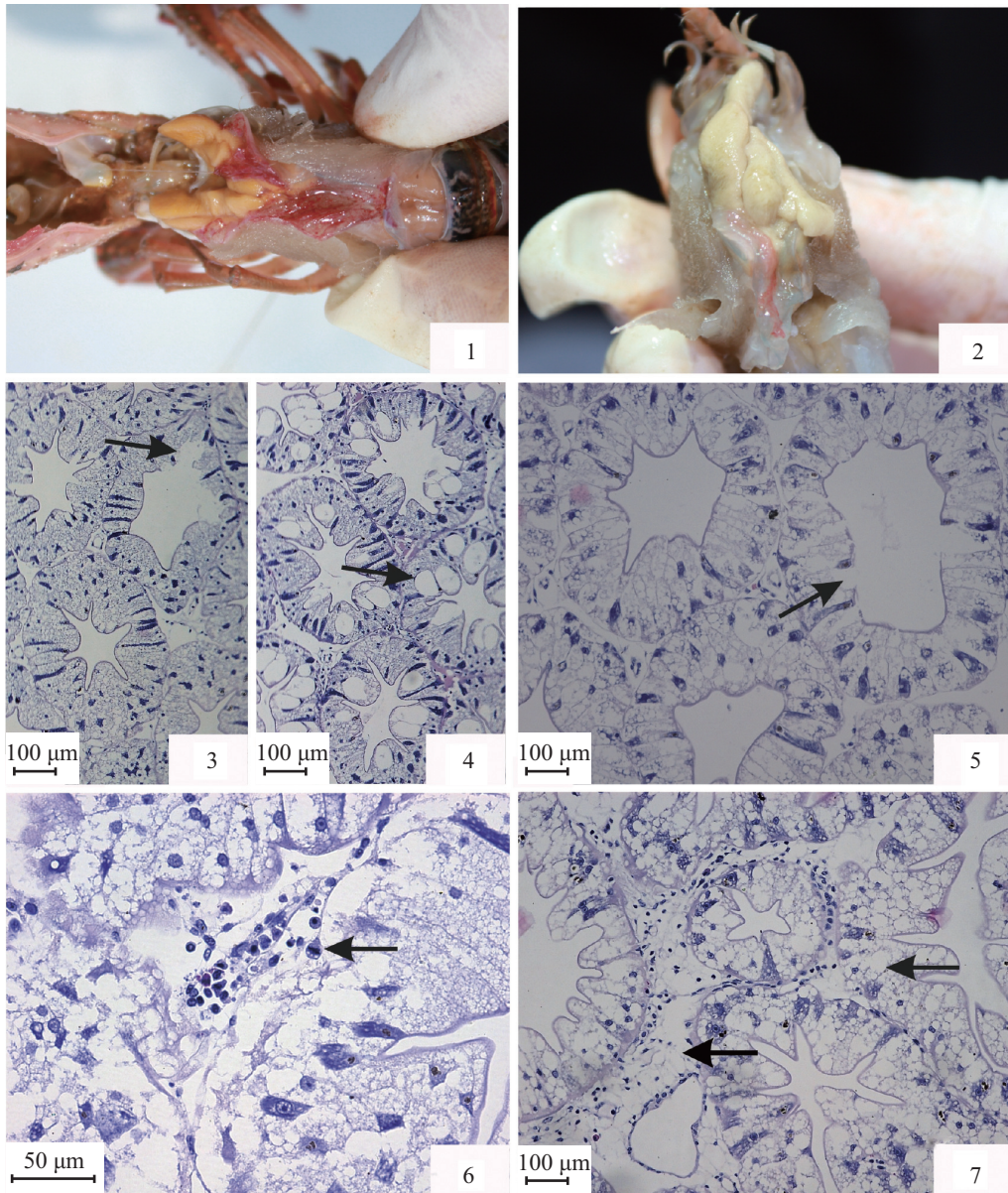


图3 系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acids





图版 I 濒死克氏原螯虾肝胰腺病理变化

1: 肝胰腺颜色正常, 2: 肝胰腺颜色变淡; 3-7: 肝胰腺组织病理观察(H.E); 3-4: 肝细胞原有结构消失, 空泡化; 5: 肝小管腔隙扩大; 6: 肝小管间隙的炎性细胞浸润; 7: 间质炎性细胞浸润

Plate I Anatomy of hepatopancreas, optical microscope observation of hepatopancreas

1. normal hepatopancreas , 2. abnormal hepatopancreas; 3-7. optical microscope observation of hepatopancreas (H.E); 3-4. hepatocyte structure collapse, vacuolization; 5. enlargement of the cavity; 6. inflammatory cells infiltrated in hepatopancreas; 7. interstitial inflammatory cell infiltration

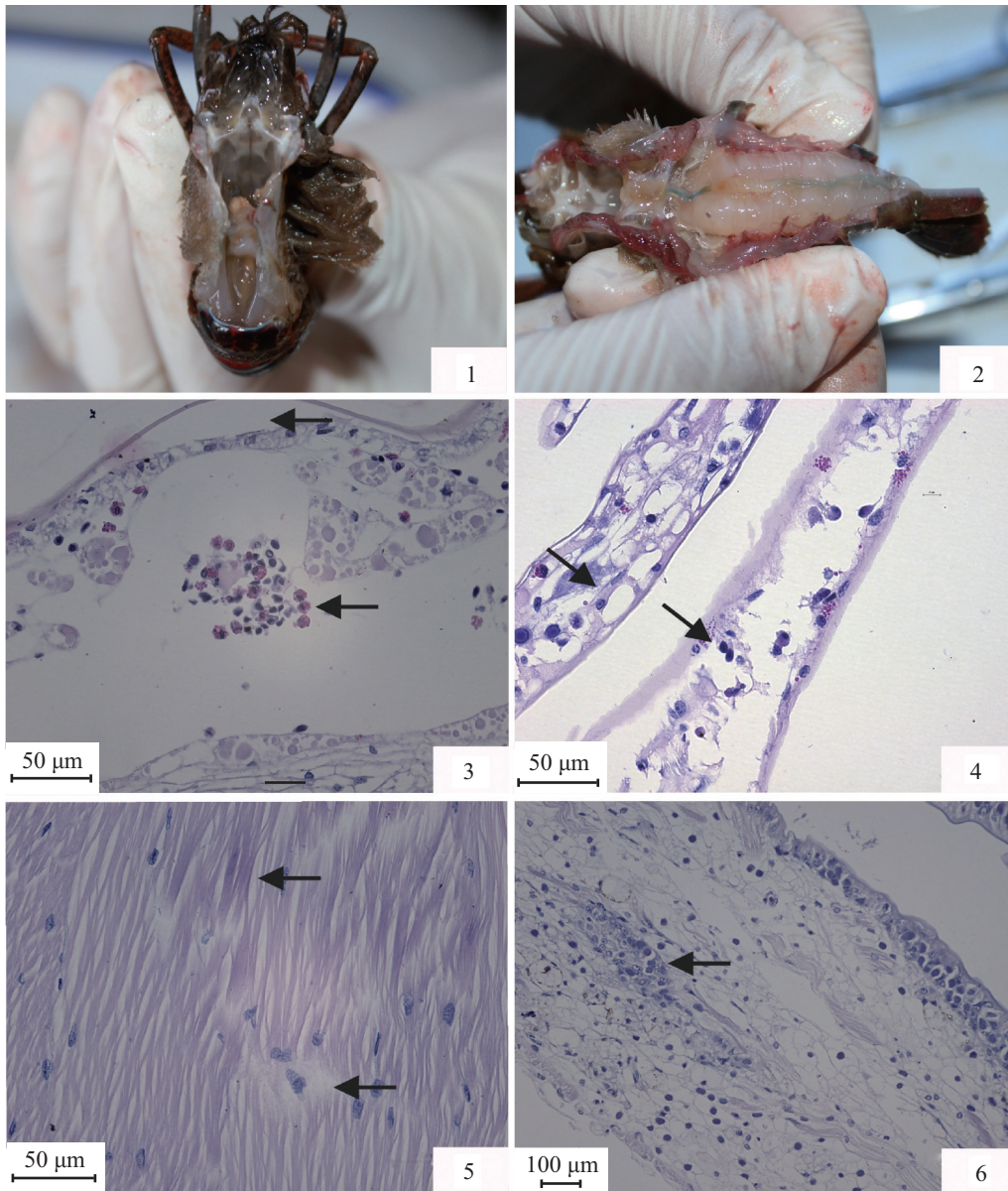
坏死, 核碎裂, 嗜酸性粒细胞增多(图版 II -3)。鳃上皮细胞广泛水泡变性, 呈空泡化。间质炎性水肿, 间隙增宽, 炎性细胞浸润(图版 II -4)。肌肉肌浆染色不均, 呈波浪状纹理, 有的节段肌浆浓缩, 嗜酸染色增强, 呈均质化, 严重者肌纤维断裂溶解(图版 II -5)。肠柱状上皮组织坏死, 上皮细胞核浓缩、碎裂。上皮下结缔组织炎性水肿, 间隙增宽, 炎性细胞浸润。血管充

血, 内有较多单核性细胞聚集靠边, 并有穿出管壁的趋势(图版 II -6)。

2.4 人工感染螯虾的死亡情况及PCR检测结果

感染组克氏原螯虾于第2天开始出现死亡, 感染后7 d内全部死亡(图4)。感染组克氏原螯虾的症状与自然发病组症状相同, 进食减少、静卧不动、反应迟钝、螯肢及附肢无力等。感染组的克氏原螯虾7 d的死亡率达到100%, 对照组





图版 II 濒死克氏原螯虾鳃、肠、肌肉解剖观察病理变化

1. 剖检图, 鳃丝颜色异常; 2. 剖检图, 肠道颜色异常; 3-4. 鳃组织病理观察(H.E); 3. 嗜酸性粒细胞增多; 4. 空泡化, 炎性细胞浸润; 5. 肌纤维断裂; 6. 炎性细胞浸润

**Plate II Anatomy and microscope observation of gill, intestines and muscle of *P. clarkii***

1. anatomy of gill, abnormal gill filament; 2. anatomy of intestines, abnormal intestines; 3、4. optical microscope observation of gill (H.E); 3. eosinophilia; 4. vacuolar degeneration, inflammatory cellular infiltration; 5. rupture the muscle fibers; 6. inflammatory cellular infiltration

未出现死亡。感染组克氏原螯虾PCR检测的病毒阳性检出率为100%(20/20), 而对照组阳性检出率为0%(0/10)(图5)。

### 3 讨论

#### 3.1 临床症状及PCR检测结果分析

IHHNV、MBV、WSSV是严重危害虾类健

康的3种常见病毒, 三者能够同时感染多种虾, 有着相似的宿主范围, 类似的发病症状。感染IHHNV的虾摄食减少, 行为异常, 表皮上皮和腹部背板接合处经常出现白色斑点<sup>[11-12]</sup>; 感染MBV的虾食欲减少, 活动呆滞, 鳃、附肢和体表常带有大量的附生生物, 受感染后幼体部分体色加深<sup>[13]</sup>; 感染WSSV的虾后期不摄食, 反应迟钝。本研究观察到的濒死克氏原螯虾临床症

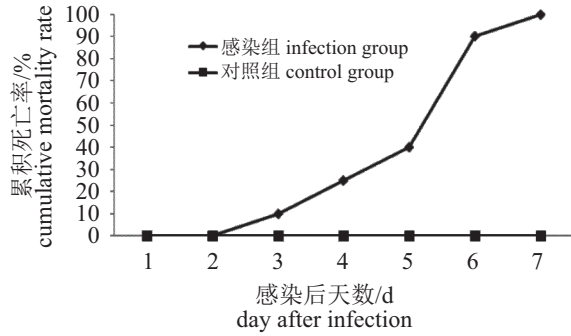


图 4 人工感染实验结果

Fig. 4 Results of artificial infection experiment

状为摄食减少、活力下降、反应迟钝、螯肢无力等, 与朱斐等<sup>[14]</sup>研究结果相似, 而IHHNV对仔虾和幼虾的危害最为严重<sup>[15]</sup>, 未观察到感染IHHNV和MBV的特征性发病症状。

本研究利用PCR检测濒死克氏原螯虾组织DNA的检测阳性率为55.56%(15/27), 未检测出IHHNV和MBV。PCR检测结果中发现, 同一个采样区并非所有样品都能检测出目标条带, 推测出现这种情况的原因是病毒在克氏原螯虾体内的不同组织分布含量不同, 可以通过增加样品采集数量或者改变样品扩增过程中模板的含

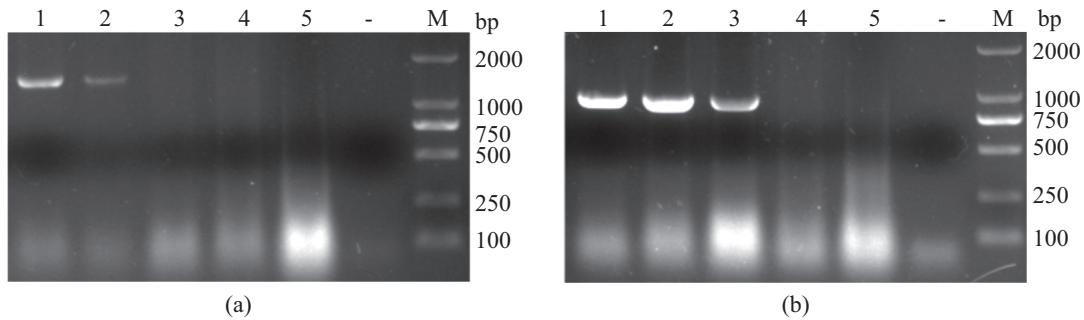


图 5 WSSV感染螯虾与健康螯虾组织的PCR检测结果

(a) 外引物PCR产物; (b) 内引物PCR产物 1-3. 投喂感染组, 4-5. 对照组, —. 阴性对照, M. DL2000 Marker

Fig. 5 WSSV DNA detected by PCR from *P. clarkii* exposed to WSSV by oral infection

(a) outer primers; (b) internal primers 1-3. infection group, 4-5. control group, —. negative control, M. DL2000 Marker

量来提高准确性<sup>[16]</sup>。

### 3.2 组织病理学观察及人工感染分析

MBV主要侵害易感虾类的肝胰腺和前、中肠上皮组织, 并在细胞核内产生嗜酸性的圆形或病毒包涵体<sup>[17-18]</sup>。IHHNV主要感染的靶器官是易感虾类的表皮、腮、肠道、造血器官、肌肉等, 主要的靶细胞为上皮细胞、肌细胞等, 光学显微镜下观察发现, 被感染的细胞核内有嗜酸性被染成红色的呈晶体状排列的包涵体<sup>[19]</sup>。WSSV引起易感虾类靶细胞是上皮细胞和肌细胞, 靶细胞核肿大, 空泡化, 甚至破裂。细胞质浑浊, 细胞坏死<sup>[20]</sup>。肝胰腺、肠、肌肉、鳃等靶组织出现结构松散, 呈坏死状态。本研究病理组织学观察结果显示, 患病克氏原螯虾的肝胰腺、肠、肌肉、鳃组织均出现不同程度变性和坏死以及炎性细胞浸润等典型病理学变化, 病理学观察结果与魏克强<sup>[21]</sup>及Manjusha<sup>[22]</sup>报道的结果一致, 具有典型的白斑综合征病理变化, 结合PCR检测及系统发育树结果, 可以推测此次湖

北潜江市爆发的克氏原螯虾疫病的病原为WSSV。

仅通过PCR和组织病理研究无法确定WSSV就是此次湖北螯虾暴发流行病的病原, 为进一步确定病原, 本研究进行了人工感染实验, 结果显示投喂病虾组织的克氏原螯虾死亡率达到100%, 对照组克氏原螯虾无死亡, 且对人工感染的克氏原螯虾进行巢式PCR检测, 阳性率为100%。综合以上的检测结果可以确定引起此次潜江地区克氏原螯虾暴发疾病的病原为WSSV。

### 3.3 展望

白斑综合征组织病理学研究起步较晚, 且以研究对虾白斑综合征较为深入, 对克氏原螯虾感染白斑综合征病毒的组织病理研究较少、水平不高, 且白斑综合征病毒对不同感染对象之间的组织病理学对比有待进一步深入。结合组织病理学研究白斑综合征病毒入侵克氏原螯虾体内的途径与感染机制的学术和应用价值很大, 应重视克氏原螯虾患白斑综合征的组织病理学研究。

## 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. The exploitation and utilization of red swamp crayfish in china[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(4): 375-381(in Chinese).
- [2] 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.* Pathogenic organisms for explosive epidemic disease of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(6): 763-767(in Chinese).
- [3] 闫冬春. 白斑综合征病毒(WSSV)的PCR检测条件优化及浮游动物中间宿主的调查研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.  
Yan D C. White spot syndrome virus (WSSV) PCR detection optimization and zooplankton mid-host investigation[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004 (in Chinese).
- [4] 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死: 对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10.  
Huang J, Song X L, Yu J, *et al.* Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp[J]. Marine Fisheries Research, 1995, 16(1): 1-10(in Chinese).
- [5] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 21(1): 69-77.
- [6] 兰江凤, 代云佳, 林鑫. 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 318-325.  
Lan J F, Dai Y J, Lin L. Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 318-325(in Chinese).
- [7] 潘子豪, 杨政霖, 陆承平. 安徽地区克氏原螯虾白斑综合征的诊断及溯源[J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 492-497.  
Pan Z H, Yang Z L, Lu C P. Diagnosis of white spot syndrome virus in farm crawfish in Anhui province and its epidemiological source[J]. Acta microbiologica Sinica, 2013, 53(5): 492-497(in Chinese).
- [8] 世界动物卫生组织. 水生动物疾病诊断手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.  
World Organization for Animal Health. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001 (in Chinese).
- [9] 杨冰, 宋晓玲, 黄捷, 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.  
Yang B, Song X L, Huang J, *et al.* Development of a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(2): 1-5(in Chinese).
- [10] 徐丽美, 杨丰. 利用多重PCR同时检测WSSV和MBV两种对虾病毒的研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5): 101-104.  
Xu L M, Yang F. Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and monodon baculovirus (MBV) by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in *Penaeus monodon*[J]. Chinese High Technology Letters, 2005, 15(5): 101-104(in Chinese).
- [11] 吴昊. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(中国福建株)的基因组克隆及其重组衣壳蛋白自组装成病毒样颗粒的初步研究[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2007.  
Wu H. Genome cloning of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolated from Fujian in China and assembly of vires-like particles of recombinant IHHNV capsid protein[D]. Xiamen: Third Institute Of Oceanography, State Oceanic Administration, 2007 (in Chinese).
- [12] Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: a non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections[J]. *Aquaculture International*, 2005, 13(4): 341-349.
- [13] Penaeus Monodon-type baculovirus disease, MBVD[J]. *Penaeus Monodon*-type baculovirus disease, MBVD[J]. China Fisheries, 2011(11): 56-57.
- [14] 朱斐, 吕梦园, 许梓荣. 白斑综合征病毒感染克氏原螯虾后的PCR检测及组织病理学研究[J]. 淡水渔业,



- 2012, 42(6): 43-48.
- Zhu F, Lv M Y, Xu Z R. PCR detection of white spot syndrome virus infected *Procambarus clarkii* and histopathological study[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(6): 43-48(in Chinese).
- [15] Withyachumnarnkul B, Chayaburakul K, Laoaroon S, et al. Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 69(2-3): 129.
- [16] 闫冬春, 董双林, 黄健. PCR检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中假阴性的探讨[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(2): 146-150.
- Yan D C, Dong S L, Huang J. PCR false negative result in white spot syndrome virus (WSSV) detection[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2007, 38(2): 146-150(in Chinese).
- [17] 周宸, 曾志南. 对虾杆状病毒病组织病理研究[C]//第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会. 青岛: 中国海洋潮沼学会, 2007.
- Zhou C, Zeng Z N. Preliminary studies on baculoviral disease in Chinese penaeid shrimps[C]//The 2nd National Cultured Prawn Disease Integrated Control and Environmental Management Seminar, 2007(in Chinese).
- [18] 吴友吕, 王方国, 洪健. 长毛对虾杆状病毒病研究[J]. 电子显微学报, 1994(5): 356.
- Wu Y L, Wang F G, Hong J. Preliminary studies on penaeus penicillatus baculovirus[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 1994(5): 356(in Chinese).
- [19] 杨冰. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的检测及其流行情况初步调查[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- Yang B. Detection and prevalence of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004 (in Chinese).
- [20] 雷质文, 黄健, 莫照兰. 人工感染白斑综合征病毒的克氏原螯虾的病理学试验[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(10): 23-25.
- Lei Z W, Huang J, Mo Z L. A pathological experiment of *Procambarus clarkii* artificially-infected with white spot syndrome virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(10): 23-25(in Chinese).
- [21] 魏克强. 白斑综合征病毒浙江分离株在动物模型克氏原螯虾组织中的分布[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 897-901.
- Wei K Q. The distribution of white spot syndrome virus Zhejiang strain in tissue cells of *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2006, 28(6): 897-901(in Chinese).
- [22] Manjusha M. White spot syndrome virus in penaeids: histopathology, development of polyclonal antisera and a cocktail vaccine[D]. Cochin: Cochin University of Science and Technology.

## Histopathological study and PCR detection of white spot syndrome virus from infected *Procambarus clarkii*

HE Qiyao<sup>1</sup>, WANG Kaiyu<sup>1\*</sup>, LIU Tao<sup>1</sup>, LIU Shaochun<sup>2</sup>, HE Yang<sup>1</sup>,  
YE Caiyan<sup>1</sup>, HE Shengyu<sup>1</sup>, QIN Zhenyang<sup>1</sup>, XIE Heng<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Beijing YumeiKang Bio-Tech Co., Ltd, Beijing 102300, China)

**Abstract:** In May 2016, a severe infectious disease occurred among the farmed *Procambarus clarkii* in Qianjiang, Hubei Province. Histological examination, virus isolation, nested-PCR, artificial infection experiment and phylogenetic analysis were performed to explore its causes and the epidemic law. Principal symptoms included darkening of the body, reduction in vigour, low feeding. Histopathologically, hepatopancreas, intestines, muscle, gill showed varying degrees of degeneration, necrosis and inflammatory cellinvasion. Pathologic changes were the same as the white spot syndrome virus (WSSV) infected arthropod. PCR detection results also showed that tissues of dying *P. clarkii* were positive to WSSV, the positive rates of PCR was 55.56%(15/27), while those were negative to monodon baculovirus disease (MBV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHNV). *P. clarkii* that died in oral infection was positive for the presence of WSSV by Nested-PCR. The sequenced amplification products shared 100% identity with white spot syndrome virus isolate EG3, complete genome (GenBank access number: KR083866.1). Phylogenetic analysis showed that the isolate was belonging to WSSV. The hepatopancreas, intestine and muscle tissue of the diseased *P. clarkii* were fed to the healthy *P. clarkii*. The results showed that a cumulative mortality of 100% was observed in the infected *P. clarkii*, while no death in control group. Therefore WSSV was determined to be the pathogen of the *P. clarkii*.

**Key words:** *Procambarus clarkia*; white spot syndrome virus; histopathological

**Corresponding author:** WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

**Funding projects:** Sichuan Science and Technology Agency Application Foundation Project (2014JY0143); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848)