

甲殼類白點病病毒檢測方法與動物感染模式之建立

魯懿萍*、沈秀燕、施雨華、許愛萍、曾俊憲、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 白點病病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 為危害臺灣養殖業最重要之甲殼類病毒性疾病之一。開發無白點病病毒感染甲殼類種原技術為目前業界所需，而在飼料添加抗病毒劑即為其中一種方式，然如何評估其效力則需先建立適當之動物模式。本研究以 PCR、Real-time PCR 技術先建立偵測甲殼類檢體白點病病毒核酸定性及定量方法；以免疫化學染色技術建立偵測組織內病毒分佈方法，再進一步將以注射及浸泡途徑人工接種 WSSV 病毒至白蝦實驗動物，建立白蝦感染本病模式，作為未來 WSSV 種毒生產、動物攻毒及進一步評估抗病毒劑效力之方法。藉由上述所建立之方法，已穩定生產出高濃度且無其他病原污染之種毒，並建立以注射及浸泡途徑之白蝦動物感染模式與確認其 LD₅₀ 及 LT₅₀。藉由免疫化學染色試驗結果顯示，本所製劑組先前開發之抗甲殼類白點病病毒卵黃抗體對感染白蝦組織中 WSSV 抗原具特異免疫結合活性，未來可供進一步評估此抗體保護白蝦抗 WSSV 感染之效力，也可用來開發檢測 WSSV 抗原快速檢測試劑之用。

關鍵字：白點病病毒、聚合酶鏈鎖反應、即時定量聚合酶鏈鎖反應、免疫化學染色

緒言

水產養殖業是成長最快速的食物供給產業之一，從 1984 年到 1995 年間，水產養殖以 10% 的年成長率，遠大於畜牧業的 3% 與漁獲業的 1.6% 年成長率，這數據顯示，水產養殖在全球糧食需求上已日趨重要。而佔全球水產總重不到 1% 的養殖蝦類，卻佔全球水產品 10% 的出口值，可見其經濟價值之高。臺灣的蝦類養殖於 1987 年達於頂峰，年產量 80,000 噸，一半以上外銷，產量與外銷量皆為世界第一，使得臺灣一度成為「養蝦王國」。然而，1992 年，遭白點病病毒感染的蝦群集體暴斃案例陸續出現，使得臺灣的蝦業養殖更是雪上加霜，導致東南亞與大陸的蝦類養殖有機會在 1990 年代取臺灣成為全球養蝦的重鎮 [1, 2, 3, 10]。

甲殼類傳染性的疾病包括病毒、細菌、類立克次氏體及寄生蟲之感染症，其中以病毒感染症對養蝦產

業的危害最大，特別是甲殼類白點病。罹患此症蝦體之外骨骼（蝦殼）上經常會出現白點或白斑，發病期為 2-10 天，死亡率可高達 100%，傳播迅速，是一種相當可怕的病毒性傳染疾病。近年因 PCR 等檢測技術發達應用於種蝦苗進場前篩檢，將過去每年因此病所造成蝦類養殖的損失率在 20-70% 控制至 5-10% 以下，已大幅降低農民損失 [2, 3, 6, 10, 12]。

本病之宿主範圍相當廣，例如池中的橈腳類、水中昆蟲及十足目生物中的各種甲殼類（海螯蝦、螃蟹、蝦、虎蝦等類）皆為白點病病毒之宿主。前人研究沿海種蝦的帶原檢測顯示本病平均之帶原率高達 80%。由於此病毒具有水平及垂直之傳染能力，加上某些蝦種養殖仍完全仰賴捕獲天然種蝦生產蝦苗，所以在無法取得大量未受病毒感染的種蝦下，幾乎無法生產出無病毒之蝦苗，同時此病毒能在環境中（蝦池）可生存達 2 年，沿海水域及養殖池一旦被病毒污染，

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

就不易清除，對它的預防與抑制亦變得困難。此外在甲殼類中之蝦類白點病具有快速發病的特性；輕微帶原之蝦隻在緊迫環境下，如：水溫、鹽度之驟變、缺氧、密度過高等，都有可能在一夕之間引爆本病導致池蝦全數死亡 [2, 3, 5, 11, 13]。

白點病病毒為一種新大型的 DNA 病毒，屬於 *Nimaviridae* 科的 *Whispovirus* 屬病毒。病毒顆粒具有封套並呈長桿狀，長約 210-420 nm，寬約 70-167 nm。其病毒核蛋白鞘 (nucleocapsid) 長約 330-350 nm，寬約 58-67 nm；有橢圓、紡錘或桿狀三種型態，其表面可見核蛋白鞘組成之次單位特殊橫紋構造，與病毒之縱軸成垂直。此外，部分病毒顆粒的一端具有似尾巴突起 (tail-like projection) 之構造。完整的白點病病毒基因體是由一雙股環狀 DNA 組成，全長約 305,107 bp，共有 181 個 open reading frames (ORFs)，具九段相似的基因區域，其中含有 47 個重覆的片段，G+C 組成比例佔 41%。白點病病毒是目前已知有完整定序的動物病毒中，擁有最大病毒基因體大小的病毒 [1, 4, 7, 8, 14]。

藉由蛋白質體學技術分析 WSSV 病毒結構，目前發現至少有 58 個結構性蛋白，其中有 30 種以上的病毒封套蛋白，而 VP28 和 VP26 數量佔封套蛋白約 60%。VP28 為封套蛋白中數量最多的蛋白，並且在感染過程中扮演吸附蛋白 (attachment protein) 的角色，使病毒與宿主細胞產生結合，病毒因此可以進入細胞裡。VP26 位於封套蛋白與核蛋白之間的基質，N 端固定在封套封套蛋白上，C 端與核蛋白結合，扮演連結的角色，此外 VP26 會與肌動蛋白或與肌動蛋白結合的蛋白產生交互作用，使病毒進入宿主細胞內後會朝向細胞核運輸 [2, 3, 4, 8, 14]。

目前科學家對白點病之預防仍束手無策，不過在研究上，大致會分為三大方向來解決問題。包括以免疫學角度，如以酵母細胞壁萃取物 β -glucan 來提升蝦體的免疫力；以分子生物學的角度，如以篩選的方式培育無病毒的母蝦而生產無病毒的子代蝦苗；也有以微生物學的角度，透過 probiotics (益菌) 在池中的菌相改善養殖的環境。近年來有學者利用分子生物學工具人工表達病毒蛋白，試圖開發疫苗及抗病毒抗體，或利用乳鐵蛋白添加於飼料中，以期對抗病毒感

染，然目前效果仍有限，未有應用階段之商品進入市場 [1]。

近年我國積極發展外銷觀賞水族產業，其中觀賞蝦亦因有感染本病之困擾，而嚴重影響我國外銷市場競爭力。目前無論養殖觀賞蝦或食用蝦產業皆有開發無白點病病毒感染種原之技術缺口，亟需學界協助。本研究為評估本所製劑研究組團隊先前已建立好利用新城病病毒 (Newcastle disease virus) 反向遺傳學 (reverse genetics) 平臺及禽類卵黃抗體生產平臺兩項關鍵技術所開發出之抗甲殼類白點病病毒卵黃抗體之應用可行性，藉由先建立白點病病毒檢測方法與動物感染模式，並以免疫化學染色法初步評估卵黃抗體活性，以供未來能進一步建立抗體力價檢測及保護效力評估標準方法，並期能藉由應用此抗病毒抗體之卵黃添加於飼料中，能全程保護蝦隻養殖過程不受本病病毒感染，增加農民收益。

材料與方法

甲殼類白點病病材之收集與處理

收集 107 年至 108 年本所生物研究組北區魚病室及南區屏東水生動物實驗室各類送檢甲殼類病材，一方面為農民做檢測服務，一方面自其中收集有感染白點病病材供本研究相關試驗用。將部分病材以 Davidson's 固定劑，於 24-72 小時後置換為 70% 乙醇，供長期儲存做後續病理石蠟切片與免疫化學染色用。另部分病材置 -20°C 冰箱保存，供後續進行核酸萃取、聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 及基因定序，以確認病材中各種甲殼類疾病感染情形、種毒選定與病毒生產之用。另亦自行行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心分讓人工感染白點病病毒白蝦之血淋液，供後續種毒生產與人工感染試驗用。

甲殼類組織之均質化與核酸之萃取

將送檢甲殼類樣品以滅菌後的剪刀採取 200 mg 組織 (除去複眼部分)，置入原本就滅好菌含鋼珠小離心管中，注入 0.7 mL 的 PBS。將小離心管置入微珠震盪均質機 (Taco™ Prep, 瑞基海洋, 臺灣) 中均質兩次，每次 26 秒。以微量吸管抽取 50 μ L 乳劑加入商用 DNA 萃取套組 (TANBead™, 臺灣圓點, 臺灣)

中之 450 μ L Lysis buffer，室溫作用 10 分鐘後，放入自動核酸萃取機 (TANBead SLA-32TM，臺灣圓點，臺灣) 中，抽取 DNA。剩餘的乳劑則放入 -20°C 的冰箱保存備用。

以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, QPCR) 方法建立偵測檢體甲殼類白點病毒定性及定量方法

依據 2019 年版世界動物衛生組織 (OIE) 水生動物疾病檢驗手冊及亞太地區水產養殖中心網絡 (NACA) 公佈之方法 [15-20]，於實驗室測試優化之試驗條件，建立並確效白點病毒 (WSSV)、傳染性皮下及造血組織壞死症病毒 (IHNV)、陶拉症候群病毒 (TSV)、黃頭病病毒 1 型 (YHV-1)、傳染性肌肉壞死症病毒 (IMNV)、壞死性肝胰腺炎 (NHP)、急性肝胰臟壞死症 (AHPND)、對蝦桿狀病毒 (BP)、對蝦肝胰腺微孢子蟲 (EHP)、偷死野田村病毒 (CMNV) 及對蝦血球虹彩病毒 (SHIV) 等 11 種重要甲殼類疾病之 PCR 檢驗技術。另也依據 2019 年版世界動物衛生組織 (OIE) 水生動物疾病檢驗手冊公佈之方法建立 WSSV QPCR 檢驗技術 [20]，並將所建立之 WSSV QPCR 檢驗技術進行優化條件測試與其偵測極限值評估。上述各疾病檢驗所使用引子、探針、PCR 產物大小、方法依據之文獻列於表 1。應用上述建立之 PCR 及 QPCR 方法於本研究所有甲殼類送檢病材、種毒生產及人工感染試驗之 WSSV 定性與定量方法。

以免疫化學染色 (immunohistochemistry, IHC) 試驗建立偵測甲殼類白點病病蝦組織內病毒分佈位置之方法

選取確認單純感染 WSSV 之白蝦病例檢體，將經 Davidson's 固定之檢體，進一步進行石蠟包埋、病理切片、H&E 染色與免疫化學染色。免疫化學染色試驗流程如下：

1. 4-5 μ m 厚度石蠟切片進行組織脫蠟。將切片浸入二甲苯 2 缸，各 10 分鐘。

2. 組織回水。將切片依序分別浸入 100% 酒精→95% 酒精→80% 酒精→70% 酒精→水洗，每缸各 3 分鐘。
3. 將切片浸入 95-100°C Sodium citrate buffer (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) 中約 10~20 分鐘做抗原修復。
4. 冷卻至少 20 分鐘。
5. 以 PBST 室溫下清洗 2 次，每次 2 分鐘。
6. 以 3% Hydrogen peroxide in PBS 室溫下作用 10 min，以阻斷內源性 HRP 酵素。
7. 以 PBST 室溫下清洗 3 次，每次 3 分鐘。
8. 以 5% 胎牛血清 (FBS) in PBS 室溫下 5 分鐘做 Blocking。
9. 於切片組織範圍滴上稀釋好之抗甲殼類白點病毒 VP28 卵黃抗體 (anti-WSSV VP28 IgY) (本所製劑組製作提供)，在 37°C 下作用 45 分鐘。
10. 以 PBST 室溫下清洗 3 次，每次 3 分鐘。
11. 於切片組織範圍滴上稀釋 1,000 倍之 2 級抗體 HRP-labelled Rabbit anti-chicken IgY IgG (H+L) conjugate (Cat. No.: 303-035-003, Jackson Immuno Research, 美國)，在室溫下作用 30 分鐘。
12. 以 PBST 室溫下清洗 3 次，每次 3 分鐘。
13. 以超純水清洗 1 次。
14. 於切片組織範圍滴上 AEC 呈色劑 (Cat. No.: AEC 101, Sigma, 美國)，室溫下作用 10-15 分鐘。
15. 以超純水清洗 1 次。
16. 以 Gill's Hematoxylin 染色劑 (Leica, 美國)，對比染色 1~5 分鐘。
17. 以自來水室溫下流水式清洗 10 分鐘。
18. 以濾紙稍微壓乾多餘水份。
19. 於切片滴上 Aquamount[®] (Dako, 美國) 水性包埋劑，並蓋上蓋玻片做封片以供顯微鏡下觀察。陽性呈色顏色為紅色，組織背景細胞核為藍色。

白點病病毒生產與人工感染白蝦白點病病毒模式之建立

自生物安全防疫控管較佳之白蝦養殖場購買

20-25 g 白蝦，並以消毒過之千分之 30 鹽度海水全種飼養實驗蝦隻。實驗蝦隻試驗前皆以前述建立之 11 種蝦隻疾病之 PCR 與 WSSV QPCR 檢測是否有任何病原帶原狀況，確認無攜帶病原後始可供後續 WSSV 病毒生產或人工接種試驗用。

將行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心分讓之白點病病毒血淋液種毒以生理食鹽水稀釋 5,000 倍後，接種至健康白蝦第 3 節腹腔肌肉內，每隻 0.5 mL。約經 24-72 小時待實驗蝦活力下降或體色變或瀕臨死亡時，即撈取出實驗蝦，抽取其所有血淋液後，將蝦組織以 L-15 細胞培養液研製成 5 倍乳劑，添加 5% 胎牛血清後，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘後取上清液。取一部分上清液進行 WSSV QPCR，以定量所生產批次種毒乳劑病毒含量，其餘乳劑上清液分裝後保存於 -80°C 冰箱備用。

經 QPCR 定量好病毒濃度之種毒，以注射至第 3 節腹腔肌肉內方式（濃度 1×10^0 至 1×10^6 copies/隻）及浸泡 6 小時病毒液後置換乾淨海水方式（濃度 1×10^6 至 1×10^{10} copies/隻）人工感染 WSSV 至實驗白蝦。注射方式接種之實驗組，每個病毒濃度接種 4 隻；浸泡方式之實驗組，每個病毒濃度感染 8 隻。人工感染病毒後觀察 7 天並每天記錄死亡及存活隻數，實驗結束後進一步計算兩種人工感染方式之半致死劑量 LD_{50} 及半致死時間 LT_{50} ，以作為未來以注射或浸泡途徑建立蝦隻人工感染 WSSV 模式及攻毒試驗劑量參考依據。 LD_{50} (median lethal dose) 是指能殺死一半試驗白蝦活體之 WSSV 的劑量； LT_{50} (median lethal time) 是指能殺死一半試驗白蝦活體的時間。實驗後之海水及相關用具皆會經由消毒後再排放或清洗，以避免造成二次的環境污染。

結果

蝦類白點病病材之收集及蝦類各種疾病病原核酸檢測結果

本研究共收集 117 件甲殼類臨床病例檢體，所有病例皆收集自高雄與屏東地區養殖場。自行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心分讓人工感染白點病病毒之白蝦血淋液及各臨床病例檢體之各項疾病分子檢測結果如表 2 所示。其中美國螯蝦共 14 例

(35.71% WSSV PCR 陽性，42.86% EHP PCR 陽性)、大和藻蝦共 39 例 (2.56% EHP PCR 陽性)、水晶蝦共 11 例 (未測到相關病原)、白蝦共 37 例 (13.51% WSSV PCR 陽性，43.24% IHNV PCR 陽性，43.24% EHP PCR 陽性)、草蝦共 7 例 (57.14% WSSV PCR 陽性)、泰國蝦共 8 例 (50% WSSV PCR 陽性)。合計所有病例檢體各疾病檢測結果，PCR 陽性率最高為 EHP 18.80% (22/117)，其次為 WSSV 17.09% (20/117) 及 IHNV 13.68% (16/117)。而分讓自行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心之人工感染白點病病毒之白蝦血淋液未有檢測出其他病原合併感染情形。後續實驗選擇以此檢體直接做為本研究後續種毒生產及人工感染 WSSV 模式建立之病毒檢體來源。另也選擇兩個白蝦病例及兩個草蝦病例組織乳劑，繼續以前述種毒生產方法增幅病毒，以供未來能持續進行病毒純化與全基因體次世代定序以比較各病毒株間基因差異及研發抗病毒抗體試劑用。

種毒生產及所建立之 WSSV QPCR 檢驗技術優化條件、偵測極限值之測定結果

本研究生產 WSSV 種毒來源、生產量、其各項疾病分子檢測結果與病毒濃度定量結果如表 3 所示。共有 13 批次種毒生產，每批種毒皆未檢測到有其他病原共感染情形，病毒濃度定量結果在 1.21×10^6 至 2.1×10^9 copies/ μ L 之間。而實驗室所建立之 WSSV QPCR 檢驗技術之最適 DNA 模板取量結果如表 4；annealing 溫度等優化條件測試結果如表 5 所示。結果最適 DNA 模板取量為 1 μ L；最適 annealing 溫度為 60°C；而所建立之 WSSV QPCR 偵測極限值評估結果如圖 1 所示為 39.77 ± 1.95 copies/ μ L。

免疫化學染色試驗結果

以健康白蝦人工腹腔接種 WSSV 之實驗白蝦所製作之病理切片，利用本所製劑系所生產抗甲殼類白點病病毒卵黃抗體進行免疫化學染色結果如圖 2 (A~C) 所示。人工腹腔注射感染 WSSV 之實驗白蝦鏡下組織病理學觀察結果可發現於鰓、胃、中腸之結締組織、心臟、肌肉、神經膠原細胞、肝胰腺、綠腺

及複眼等組織或器官皆有細胞核肥大現象，且核內構造消失，以及有染色呈均質化之嗜鹼性包涵體出現。免疫化學染色結果在鰓部上皮病毒包涵體出現位置或附近有特異紅色抗原呈色出現；而對照健康蝦切片則無紅色呈色出現。以免疫染色之最適初級抗體稀釋倍數 1:40 進行染色可成功定位抗原位置，顯示由本所製劑研究組研發之抗 WSSV VP28 IgY 初級抗體對實驗白蝦組織病理切片上之 WSSV 抗原具特異免疫結合活性。

蝦白點病病毒生產與人工感染白蝦白點病病毒模式之建立結果

白蝦以注射方式及浸泡方式人工感染 WSSV 試驗每日累計蝦隻存活數如圖 3 及圖 4 所示。結果發現，以注射方式人工感染 WSSV 之 LD_{50} 為 1×10^4 copies， LT_{50} 為 3 天 (72hrs)；以浸泡方式人工感染 WSSV 之 LD_{50} 為 1×10^6 copies， LT_{50} 為 5 天 (120hrs)。

討論

本研究結果藉由建立 OIE 水生動物疾病檢驗手冊及亞太地區水產養殖中心網絡公佈之 PCR 及 QPCR 檢驗方法，進一步做優化與確效試驗，以建立甲殼類白點病病毒定性及定量標準方法，並藉由這些方法確認能夠穩定生產出無其他病原污染之 WSSV 種毒，也進一步成功建立白蝦注射及浸泡兩種人工感染模式，並測定出兩種感染模式之 LD_{50} 及 LT_{50} ，可供未來各種抗病毒劑（如本所製劑研究組研發之抗 WSSV VP28 IgY 抗體）保護效力測試時，WSSV 攻毒試驗標準流程之制定。

利用抗原和抗體間專一性的結合反應可建立組織病理切片免疫化學染色法檢查，不但可檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在，亦可以用來測知抗原的表現量，同時也可觀察抗原所表現的位置。本研究應用本所先前開發之抗甲殼類白點病病毒 VP28 卵黃抗體成功建立 WSSV 免疫化學染色法，偵測人工感染試驗蝦檢體病理切片中白點病病毒分佈量與位置，同時證實此卵黃抗體具有特異免疫結合活性，顯示此抗體具未來進一步應用來添加於飼料對抗 WSSV 或開發

檢測 WSSV 抗原之快速檢測試劑的可能性。惟目前初步開發出來之抗甲殼類白點病病毒卵黃抗體抗體力價稍低，未來利用濃縮技術提升抗體力價後，預期將可擴大應用範圍。

目前尚無對 WSSV 具感受性的細胞株可以專門用來增殖病毒。雖然先前研究成功以初代蝦血淋液細胞培養方式增殖 WSSV 病毒，但因容易汙染不建議使用於臨床病例分離診斷之應用 [7]。生物增幅為目前較穩定成功之 WSSV 病毒增幅方式，本研究即成功以白蝦作為動物模式平臺，具有操作容易及病毒生產量多之優點，除可供作抗病毒劑效力評估時，病毒攻毒動模式使用外，更可做為臨床病例 WSSV 增幅用，以供後續病毒學、分子流行病學、病理學等進一步研究用。

表 1、本研究蝦隻疾病 PCR 及 QPCR 檢驗所使用引子、探針、PCR 產物大小及方法依據

疾病名稱	檢測方法	引子	產物大小 (bp)	方法依據
白點病病毒 (WSSV)	PCR	146F2 : 5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3' 146R2 : 5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'	941	OIE* chapter 2.2.8.
傳染性皮下及造血組織壞死症病毒 (IHNV)	PCR	77012F : 5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3' 77353R : 5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	356	OIE* chapter 2.2.4.
	PCR	309F : 5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3' 309R : 5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TTC-A-3'	309	
陶拉症候群病毒 (TSV)	RT-PCR	9992F : 5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3' 9195R : 5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	231	OIE* chapter 2.2.7.
黃頭病病毒 1 型 (YHDV-1)	RT-PCR	10F : 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3' 144R : 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'	135	OIE* chapter 2.2.9. Protocol 1
傳染性肌肉壞死症病毒 (IMNV)	Nested	4587F : 5'-CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA-3' 4914R : 5'-ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT-3'	328	OIE* chapter 2.2.5.
		4725NF : 5'-GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA-3' 4863NR : 5'-AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G-3'	139	
	RT-PCR			
壞死性肝胰腺炎 (NHP)	PCR	NHPF2 : 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T-3' NHPR2 : 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3'	379	OIE* chapter 2.2.3.
急性肝胰臟壞死症 (AHPND)	PCR	VpPirvpB-392F : 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirvpB-392R : 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'	392	OIE* chapter 2.2.1.
對蝦桿狀病毒 (BP)	PCR	6581 : 5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3' 6582 : 5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'	644	OIE* chapter 2.2.11.
對蝦肝胰腺微孢子蟲 (EHP)	PCR	EHP-510F : 5'-GCC-TGA-GAG-ATG-GCT-CCC-ACG-T-3' EHP-510R : 5'-GCG-TAC-TAT-CCC-CAG-AGC-CCG-A-3'	510	K.F.J. Tang <i>et al.</i> Journal of Invertebrate Pathol 130: 37-41, 2015
	Nested	EHP SWP 1F : 5'-TTG-CAG-AGT-GTT-GTT-AAG-GGT-TT-3' EHP SWP 1R : 5'-CAC-GAT-GTG-TCT-TTG-CAA-TTT-TC-3'	514	Jaroenlak <i>et al.</i> , PLoS ONE 11: journal.pone. 0166320, 2016
		EHP SWP 2F : 5'-TTG-GCG-GCA-CAA-TTC-TCA-AAC-A-3' EHP SWP 2R : 5'-GCT-GTT-TGT-CTC-CAA-CTG-TAT-TTG-A-3'	148	
偷死野田村病毒 (CMNV)	Nested	CMNV-7F1 : 5'-AAA-TAC-GGC-GAT-GAC-G-3' CMNV-7R1 : 5'-ACG-AAG-TGC-CCA-CAG-AC-3'	619	Zhang <i>et al.</i> , J. Gen.Virol 95: 2700-2709, 2014
		CMNV-7F2 : 5'-CAC-AAC-CGA-GTC-AAA-CC-3' CMNV-7R2 : 5'-GCG-TAA-ACA-GCG-AAG-G-3'	165	
	RT-PCR			
對蝦血球虹彩病毒 (SHIV)	Nested	SHIV-F1 : 5'-GGG-CGG-GAG-ATG-GTG-TTA-GAT-3' SHIV-R1 : 5'-TCG-TTT-CGG-TAC-GAA-GAT-GTA-3'	457	Liang Qiu <i>et al.</i> , Sci Rep 7: 11834, 2017
		SHIV-F2 : 5'-CGG-GAA-ACG-ATT-CGT-ATT-GGG-3' SHIV-R2 : 5'-TTG-CTT-GAT-CGG-CAT-CCT-TGA-3'	129	
	RT-PCR			
白點病病毒 (WSSV)	Real-time PCR	Forward : 5'- TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG -3' Reverse : 5'- GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A -3' Probe : [FAM]AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A [BHQ1]	69	SV Durand & DV Lightner, J Fish Dis 25: 381-389, 2002

*Manual of diagnostic tests for aquatic of office international des epizooties (OIE)

表 2、東港水試所分讓 WSSV 種毒及本研究收集病例檢體種類及各項疾病分子檢測結果

疾病種類 動物種類											
	WSSV	IHHN	TSV	YHDV-1	IMMN	NHP	AHPND	BP	EHP	CMNV	SHIV
東港水試所白 蝦 WSSV 血淋 液種毒	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
美國螯蝦	35.71% (5/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	42.86% (6/14)	0% (0/14)	0% (0/14)
大和藻蝦	2.56% (1/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)	0% (0/39)
水晶蝦	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)
白蝦	13.51% (5/37)	43.24% (16/37)	0% (0/37)	0% (0/37)	0% (0/37)	0% (0/37)	0% (0/37)	0% (0/37)	43.24% (16/37)	0% (0/37)	0% (0/37)
草蝦	57.14% (4/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)
泰國蝦	50% (4/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
合計	17.09% (20/117)	13.68% (16/117)	0% (0/117)	0% (0/117)	0% (0/117)	0% (0/117)	0% (0/117)	0% (0/117)	18.80% (22/117)	0% (0/117)	0% (0/117)

表 3、WSSV 種毒來源、增殖生產量及其各項疾病分子檢測結果

種毒來源	種毒量 (mL)	WSSV	IMNV	IHHN	TSV	YHDV-1	NHP	AHPND	EHP	CMNV	SHIV	QPCR 測定 病毒量 (copies/ μ L)
水試所 WSSV 血淋液種毒	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5×10^6
東港水試所種毒第一批增 幅白蝦血淋液	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.21×10^6
水試所種毒第二批增幅白 蝦組織混合液上清液	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5×10^6
水試所種毒第三批增幅白 蝦組織混合液上清液	660	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.19×10^6
草蝦病例一混合液上清液	78	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11×10^9
草蝦病例二混合液上清液	35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5×10^7
草蝦病例二第一批增幅白 蝦血淋液	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1×10^6
草蝦病例二第一批增幅白 蝦組織混合液上清液	150	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3×10^6
白蝦病例一混合液上清液	23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5×10^7
白蝦病例二混合液上清液	116	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1×10^9
白蝦病例二第一批增幅白 蝦血淋液	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.46×10^6
白蝦病例二第一批增幅白 蝦組織混合液上清液	160	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.7×10^6
白蝦病例二第二批增幅白 蝦組織混合液上清液	167	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.8×10^6

表 4、WSSV 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (QPCR) DNA 模板取量條件測試結果

質體 DNA 連續 10X 稀釋	Template 量: 0.5μL			Template 量: 1 μL			Template 量: 2 μL		
	Cq 值	定量值 (copies/uL)	判讀	Cq 值	定量值 (copies/uL)	判讀	Cq 值	定量值 (copies/uL)	判讀
10 ⁻¹	17.25	3.85E+06	+	8.70	2.31E+09	+	15.60	1.54E+07	+
10 ⁻²	23.31	3.85E+04	+	12.11	2.31E+08	+	22.04	1.54E+05	+
10 ⁻³	29.35	3.85E+02	+	15.13	2.31E+07	+	28.58	1.54E+03	+
10 ⁻⁴	35.91	3.85E+00	+	19.14	2.31E+06	+	34.88	1.54E+01	+
10 ⁻⁵	N/A	3.85E-01		22.49	2.31E+05	+	38.42	1.54E+00	
10 ⁻⁶				25.69	2.31E+04	+			
10 ⁻⁷				29.31	2.31E+03	+			
10 ⁻⁸				32.29	2.31E+02	+			
10 ⁻⁹				35.71	2.31E+01	+			
10 ⁻¹⁰				N/A	2.31E+00				
10 ⁻¹¹									
10 ⁻¹²									
Blank	N/A	N/A		N/A	N/A		N/A	N/A	
NTC	N/A	N/A		N/A	N/A		N/A	N/A	
Negative	N/A	N/A		N/A	N/A		N/A	N/A	

表 5、WSSV 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (QPCR) annealing 溫度條件測試結果

質體 DNA 連續 10X 稀釋序	質體 DNA 定量值 (copies/μl)	各 annealing 溫度之 End RFU 值							
		55°C	56°C	57°C	58°C	59°C	60°C	61°C	62°C
		R ² = 0.999, E=97.2 %, Slope=-3.392, y-int=40.692	R ² = 0.999, E=98.5 %, Slope=-3.358, y-int=40.954	R ² = 0.999, E=97.9 %, Slope=-3.373, y-int=40.337	R ² = 0.999, E=104.8 %, Slope=-3.212, y-int=38.851	R ² = 0.999, E=103.6 %, Slope=-3.238, y-int=38.966	R ² = 0.997, E=103.7 %, Slope=-3.235, y-int=38.197	R ² = 0.999, E=106.6 %, Slope=-3.174, y-int=38.218	R ² = 0.999, E=110.5 %, Slope=-3.094, y-int=37.384
10 ⁻³	7.74 10 ⁶	2953	3078	3113	3118	3086	2470	2487	2181
10 ⁻⁵	7.74 10 ⁴	2833	3022	2803	2633	2661	2412	2307	1870
10 ⁻⁷	7.74 10 ²	2187	2296	2231	2109	1980	1753	1647	1402
10 ⁻⁹	7.74	719	761	862	940	802	1000	784	763
10 ⁻¹⁰	7.74 10 ⁻¹	33.5	21.3	96.5	249	311	216	-0.0462	36.6

甲殼類白點病毒檢測方法與動物感染模式之建立

測試序號	WSSV-qPCR 實驗數據 (ABI Step One Plus)												
	Template: 1 μ L OIE qPCR prime Qubit BR (ng/ μ L) : 136												
	R2 = 0.995, E = 82.279%, Slope = 3.835, y-int = 45.754												
1	拷貝數	3.88E+10	3.88E+09	3.88E+08	3.88E+07	3.88E+06	3.88E+05	3.88E+04	3.88E+03	388.00	38.80	3.88	0.39
	C _T	5.46	9.51	12.93	16.92	18.91	23.92	27.7	32.06	32.94	34.46	Undetermined	Undetermined

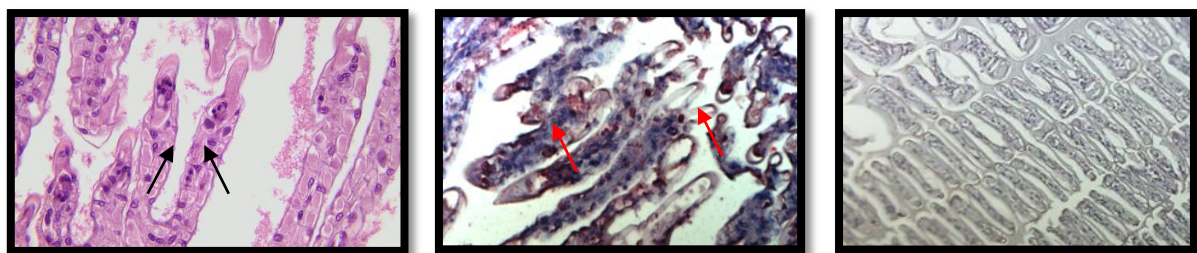
測試序號	WSSV-qPCR 實驗數據 (ABI Step One Plus)												
	Template: 1 μ L OIE qPCR prime Qubit BR (ng/ μ L) : 144												
	R2 = 0.997, E = 78.0462%, Slope = 3.991, y-int = 45.213												
2	拷貝數	4.11E+10	4.11E+09	4.11E+08	4.11E+07	4.11E+06	4.11E+05	4.11E+04	4.11E+03	411.00	41.10	4.11	0.41
	C _T	Undetermined	7.02	11.50	14.87	17.43	22.44	26.93	31.65	34.65	38.76	Undetermined	Undetermined

測試序號	WSSV-qPCR 實驗數據 (ABI Step One Plus)												
	Template: 1 μ L OIE qPCR prime Qubit BR (ng/ μ L) : 138												
	R2 = 0.994, E = 77.123%, Slope = 4.028, y-int = 46.026												
3	拷貝數	3.94E+10	3.94E+09	3.94E+08	3.94E+07	3.94E+06	3.94E+05	3.94E+04	3.94E+03	394.00	39.40	3.94	0.39
	C _T	Undetermined	7.48	11.62	15.39	18.32	23.80	27.50	32.02	37.02	38.24	Undetermined	Undetermined

拷貝數值計算	
編號	偵測極限值
測試1	38.8
測試2	41.1
測試3	39.4
平均值	39.77
1x SD值	0.97
2x SD值	1.95

C _T 值計算	
編號	偵測極限值
測試1	34.46
測試2	38.76
測試3	38.24
平均值	37.15
SD值	1.92
2x SD值	3.83

圖 1、本研究 WSSV QPCR 偵測極限值測試結果。所建立之 WSSV QPCR 偵測極限值評估結果如表六所示為 39.77 ± 1.95 copies/ μ L。



(A)

(B)

(C)

圖 2、以健康白蝦及人工腹腔注射感染 WSSV 之實驗白蝦所製作之病理切片，利用本所製劑系所生產抗甲殼類白點病毒 VP28 卵黃抗體進行免疫化學染色結果如圖 (A) ~ (C) 所示。

(A) 人工腹腔注射 WSSV 之實驗白蝦鰓部組織，HE 染色，箭頭所指可見嗜鹼性核內包涵體。

(B) 利用本所製劑組所生產抗甲殼類白點病毒卵黃抗體 (40X 稀釋) 進行免疫化學染色結果，箭頭所指可見 AEC 紅色特異性呈色位置為 WSSV 特異抗原位置所在。

(C) 健康白蝦以本所製劑研究組所研發生產之抗甲殼類白點病毒 VP28 卵黃抗體 (40X 稀釋) 進行免疫化學染色結果無紅色特異呈色出現。

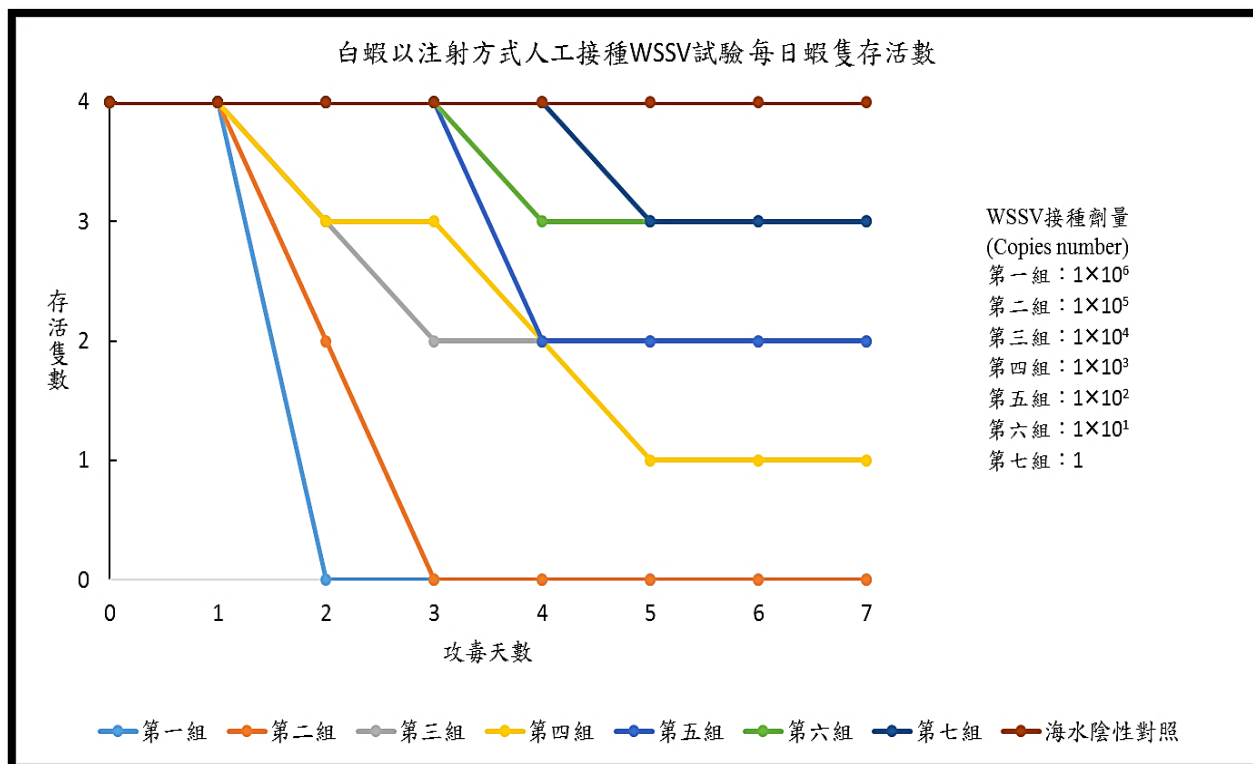


圖 3、白蝦以注射方式人工接種 WSSV 試驗每日累計蝦隻存活數。

LD_{50} 為 1×10^4 copies · LT_{50} 為 3 天 (72 hrs)。

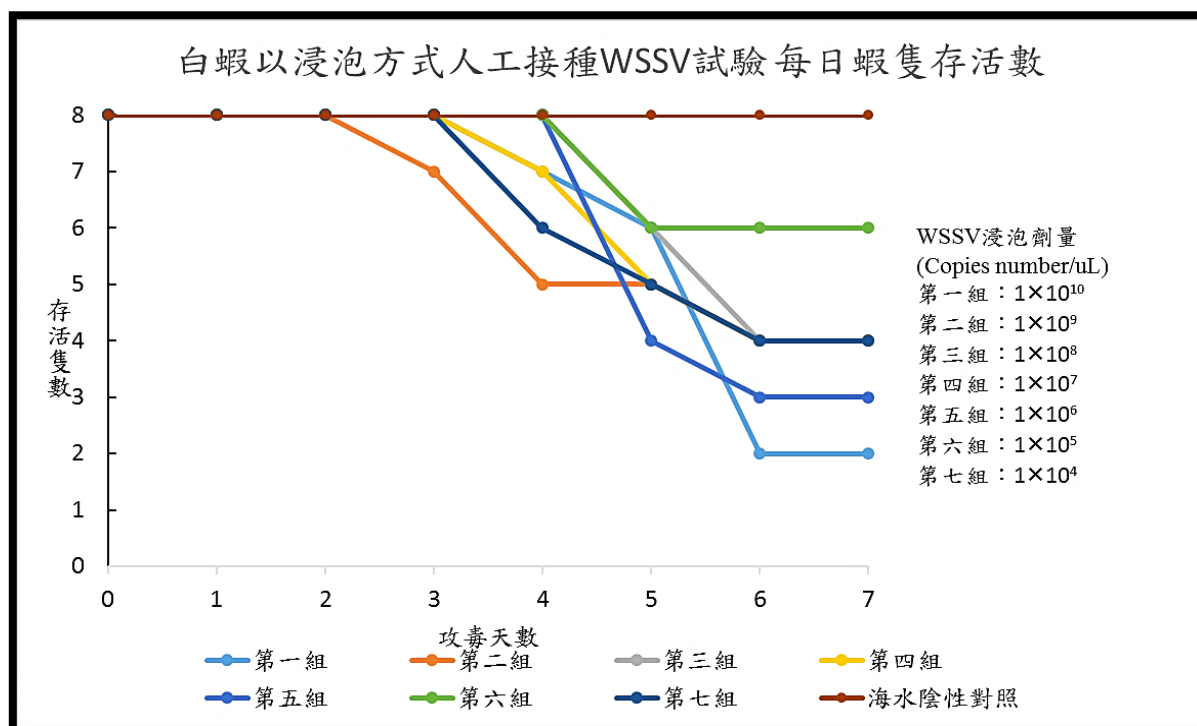


圖 4、白蝦以浸泡方式人工接種 WSSV 試驗每日累計蝦隻存活數。

LD_{50} 為 1×10^6 copies · LT_{50} 為 5 天 (120 hrs)。

參考文獻

- 楊泰興。2019 年。對抗全球蝦白點病，解開生物界哥帝爾斯結的關鍵領導者羅竹芳——(她們，好厲害)。PanSci 泛科學。
<https://pansci.asia/archives/176592>
- Tsai MF, Yu HT, Tzeng HF, Leu JH, Chou CM, Hung CJ, Wang CH, Lin JY, Valk JM, Kou GH, Lo CF. Identification and Characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277:100-110. 2000.
- Tsai, MF, Lo CF, Van Hulten MCW, Tzeng HF, Chou CM, Huang VJ, Wang CH, Lin JY, Valk JM, Kou GH. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92-99. 2000.
- Van Hulten, MCW, Tasi, MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlask JM. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol* 81: 307-316. 2000.
- Chen LL, Lo CF, Chiu YL, Chang CF, Kou GH. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Dis Aquat Org* 40:157-161. 2000.
- Hsu HC, Lo CF, Liu KF, Su MS, Kou GH. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis Aquat Org* 39:1319. 2000.
- Wang CH, Yang HN, Tang CY, Lu CH, Kou GH, Lo CF. Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis Aquat Org* 41:91-104. 2000.
- Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35:175-185. 1999.
- Tsai MF, Kou GH, Liu HC, Liu KF, Chan, CF, Peng SE, Hsu HC, Wang CH, Lo CF. Long term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis Aquat Org* 38:107-114. 1999.
- Lo CF, Kou GH. Virus associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan. A review. *Fish Pathol* 33:365-371. 1998.
- Lo CF, Ho CH, Chen CH, Liu KF, Chiu YL, Yeh PY, Peng SE, Hsu HC, Liu HC, Chang CF, Su MS, Wang CH, Kou GH. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org* 30:53-72. 1997.
- Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, Chou CM, Yeh, PY, Huang CJ, Chou HY, Wang CH, Kou GH. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25:133-141. 1996.
- Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, Chang CF, Liu KF, Su MS, Wang CH, Kou GH. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detection in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org* 27:215-225. 1996.
- Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239-242. 1995.

15. Manual of diagnostic test for aquatic animals, chapter 2.2.8, Office International Des Epizooties; OIE. 2019.
16. Tang KF, Pantoja CR, Redman RM, Han JE, Tran LH, Lightner DV, Han JE, Tran LH, Lightner DV. Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) , a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. J Invert Pathol 130: 37-41. 2015.
17. Jaroenlak P, Sanguanrut P, Williams BAP, Stentiford GD, Flege TW, Sritunyalucksana K, Itsathitphaisarn O. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environment samples in shrimp farms. PLoS ONE 11: e0166320. 2016.
18. Zhang QL, Liu Q, Liu S, Yang H, Liu S, Zhu LL, Yang BJinJ, Ding L, Wang X, Liang Y, Wang Q, Huang J. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. J. Gen. Virol 95:2700-2709. 2014.
19. Qiu L, Chen MM, Wan XY, Li C, Zhang QL, Wang RY, Cheng DY, Dong X, Yang B, Wang XH, Xiang JH, Huang J. Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) , found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Sci Rep 7: 11834. 2017.
20. Durand SV, Lightner DV. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. J Fish Dis 25:381-389. 2002.

Establishment of a crustacean white spot syndrome virus detection method and animal infection model

YP Lu*, HY Shen, YH Shih, AP Hsu, TH Chun, C Tu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most important crustaceans viral diseases negatively affecting the aquaculture industry in Taiwan. Methods for the establishment of WSSV-free crustaceans in aquaculture is currently a growing industry demand. Addition of antiviral agents to shrimp feed is one of the developed methods, but it requires the establishment of an appropriate animal model for the evaluation of efficacy. In this study, PCR and Real-time PCR were used to establish a qualitative and to quantitative method for WSSV nucleic acid detection in crustaceans specimens. An immunocytochemistry technique was also established as a method for detecting viral distribution within tissues. To institute an animal model of WSSV infection, white shrimp were artificially inoculated with seed virus via injection and soaking. This method can also be employed to produce seed virus, while the animal infection model can be used for the design of white shrimp challenge experiments and to evaluate the effectiveness of various antiviral agents. We were thus able to produce seed virus successfully and stably in high concentrations without other contaminating pathogens, while establishing an animal infection model for white shrimp by injection and soaking routes along with confirmed LD₅₀ and LT₅₀ values. The results of the immunochemical staining experiments show that the previously developed anti-wssv egg yolk antibody has specific immunological binding activity to the wssv antigen in the infected shrimp tissues. This antibody can be further evaluated for its effectiveness in conferring immunity to shrimp against WSSV and can also be used to develop rapid detection reagents for WSSV antigens.

Keywords: *white spot syndrome virus, polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, immunohistochemistry.*

