

天津地区1例凡纳滨对虾病害的病原学检测与分析

孙妍^{1,2}, 刘群^{1,2}, 徐贇霞^{1,2}, 陈浩楠^{1,2}, 赵良玮^{1,2}, 董学旺^{1,2}, 魏俊利^{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

收稿日期: 2023年3月10日; 录用日期: 2023年5月31日; 发布日期: 2023年6月9日

摘要

采用流行病学调查、细菌分离鉴定、寄生虫观察和分子生物学方法对天津滨海新区凡纳滨对虾养殖场采集的1例患病凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)样品开展病原学研究。寄生虫和细菌鉴定结果显示, 患病对虾未发现寄生虫和细菌感染; 病原学检测结果显示, 患病对虾肝肠胞虫(EHP)和传染性肌坏死病毒(IMNV)核酸检测结果均为阳性, 其它相关病原检测结果均为阴性; EHP、IMNV目的基因产物测序后经NCBI BLAST, 与已报道的EHP、IMNV相关序列相似性分别介于99.56%~100%、98.33%~100%; 系统发育树分析结果显示, 本研究EHP胞壁蛋白1基因与马来西亚分离株、印度尼西亚分离株、泰国分离株及印度分离株的EHP胞壁蛋白1基因聚为一支, 亲缘关系较近; IMNV TJ2022 OQ438431与印度尼西亚分离株、印度分离株、巴西分离株聚为一支, 亲缘关系较近。揭示本研究凡纳滨对虾发病样品可能由EHP和IMNV感染所致, 需引起养殖从业者的高度关注。

关键词

凡纳滨对虾, 传染性肌肉坏死病毒, 虾肝肠胞虫, 系统进化树分析

Pathogenic Detection and Analysis of a Case of *Litopenaeus vannamei* Disease in Tianjin

Yan Sun^{1,2}, Qun Liu^{1,2}, Yunxia Xu^{1,2}, Haonan Chen^{1,2}, Liangwei Zhao^{1,2}, Xuewang Dong^{1,2}, Junli Wei^{1,2}

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Surveillance Center of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin

Received: Mar. 10th, 2023; accepted: May 31st, 2023; published: Jun. 9th, 2023

文章引用: 孙妍, 刘群, 徐贇霞, 陈浩楠, 赵良玮, 董学旺, 魏俊利. 天津地区 1 例凡纳滨对虾病害的病原学检测与分析[J]. 微生物前沿, 2023, 12(2): 55-62. DOI: 10.12677/amb.2023.122007

Abstract

In this article, the laboratory diagnostic analysis, including epidemiological investigation, isolation and identification of bacteria, microscopic observation of parasites and PCR detection of various pathogenic bacteria in shrimp were carried out to identify the pathogen of diseased *Litopenaeus vannamei* in Tianjin Binhai district. The identification results of parasites and bacteria showed that there were no parasites and bacterial infections in this batch of diseased shrimp; The results of pathogenic PCR showed that EHP and IMNV were positive; The sequences of the PCR products showed 99.56% to 100%, and 98.33% to 100% similarity with the reported EHP and IMNV separately, after sequencing and BLAST on NCBI. The phylogenetic analysis of the target sequence showed that the amplified EHP gene sequence had the highest similarity with the EHP cell wall protein 1 sequence of Malaysia isolate, Indonesia isolate, Thailand isolate and India isolate; the amplified IMNV gene sequence had high affinity with the Indonesian isolate, Indian isolate and Brazilian isolate of each year, which was clustered into one branch. It was revealed that the diseased *Litopenaeus vannamei* may be caused by the co-infection of EHP and IMNV, which should pay more attention.

Keywords

Litopenaeus vannamei, Infectious Myonecrosis Virus, *Enterocytozoon hepatopenaei*, Phylogenetic Tree Analysis

Copyright © 2023 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

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于 1988 年被引进中国以来,几乎取代了中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)获得巨大的经济效益。然而随着养殖规模和养殖密度的不断扩大,加之生态环境的不断恶化,凡纳滨对虾的病害问题日益突出。2017 年山东省虾蟹养殖产业现状调查研究显示,对虾病害发生情况趋势逐年加重,对虾白斑综合征病毒、传染性皮下及造血组织坏死病毒、弧菌等常见疫病并未从根本上解决,对虾肝肠胞虫病、虾虹彩病毒病等新发疫病也在该省对虾养殖区出现,并造成极大经济损失[1]; 2019 年天津地区土池淡水对虾养殖现状分析报告也显示,抽样调查的 10 个亏损池塘中,80%是由对虾偷死野田村病和急性肝胰腺坏死症导致[2]; 2019 年江苏地区凡纳滨对虾养殖病害主要包括对虾肝肠胞虫病、急性肝胰腺坏死症等[3]; 2021 年河北省对虾病害分析报告指出对虾肝肠胞虫阳性检出率最高,提示未来可能造成较大经济损失[4]。

由此可见,病害问题已成为制约我国凡纳滨对虾产业增产增效的主要原因。苗种和亲本的大规模跨国、跨区域移动现象在我国凡纳滨对虾养殖中十分普遍,导致对虾疫病被伴随传入我国并扩散[5],给养殖户造成巨大经济损失,已呈现出由南方向北方扩展的流行趋势。因此,需高度重视对虾新发疫病的暴发,加大新发疫病的监测力度,已成为我国对虾养殖可持续发展的迫切要求。

2022 年 12 月,天津市滨海新区几个相邻的凡纳滨对虾工厂化养殖车间相继发生对虾缓慢死亡,体长不均一,部分对虾尾部肌肉白浊等现象。本研究以其中 2 个工厂化车间症状典型的凡纳滨对虾为研究

对象,开展病原学鉴定,旨在初步探索潜在的发病致病原,为我国北方地区凡纳滨对虾的病害防控提供借鉴。

2. 材料与amp;方法

2.1. 材料

2.1.1. 试验动物

试验用患病凡纳滨对虾采自天津市滨海新区某养殖场的2个工厂化车间,平均体长为 (4.0 ± 1.3) cm,病虾活体充氧打包后立即运送本实验室,在无菌条件下按照样品检测要求处理。

2.1.2. 试剂及仪器

主要试剂:CTAB 购自北京索莱宝;Premix Ex Taq、无酶水等购自 TaKara;营养琼脂、营养肉汤等购自北京陆桥;引物由英俊公司合成纯化;测序工作由上海生工完成。

主要仪器:高速冷冻离心机(艾本德);PCR 仪(ABI);微量移液器(艾本德);电泳仪(北京六一);凝胶成像系统(伯乐)。

2.2. 方法

2.2.1. 患病对虾流行病学调查及临床症状观察

2022 年 12 月,天津市滨海新区几个相邻的工厂化养殖场养殖的凡纳滨对虾出现了摄食量降低、活力差、尾部肌肉白浊、体长规格不均一、缓慢死亡等症状。经调查,该养殖场及周边养殖场此前未发生此类病症,所购苗种源于外省市某苗种场。养殖时间约 30 天,养殖水温约 26℃,放养密度约 1 万尾/m²,发病持续时间约 14 天,累计死亡率约 30%,且抗生素、益生菌等药物和免疫增强剂的使用效果欠佳。现场采集具有典型症状的对虾置于车载低温冰箱,并带回实验室进行采样分析。

2.2.2. 细菌及寄生虫检查

挑取具有典型症状的患病对虾,无菌条件下分别将患病对虾鳃丝、肌肉、肝胰腺、心脏以及淋巴器官等接种于营养琼脂平板,28℃培养 48 h,观察细菌生长情况,挑取优势菌纯化 3 次,置于装有 20%甘油的营养肉汤培养基中,-80℃保存备用。采用 SN/T 2503-2010《淡水鱼中寄生虫检疫技术规范》[6]中水浸片显微镜检测方法进行病虾肝胰腺、鳃丝、心脏、肌肉、附肢等部位寄生虫的检测。

2.2.3. 菌株 16S rDNA 的鉴定

采用水煮法提取保存菌株的 DNA [7],并使用 16S rDNA 通用引物对分离出的菌株 DNA 进行 PCR 扩增,上游引物序列为 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGG 3',下游引物序列为 1492R: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'。扩增的 PCR 产物送上海生工测序,测序结果通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站进行在线比对。

2.2.4. 病毒检测

将患病对虾的鳃丝、肝胰腺、肌肉等组织进行解剖混合后,打碎研磨成组织匀浆液,采用 2%CTAB 法[8]提取组织匀浆液的核酸。根据 GB/T 28630.2-2012 [9]、GB/T 25878-2010 [10]、SC/T 7232-2020 [11]、SC/T 7237-2020 [12]、SC/T 7233-2020 [13]、SN/T 3492-2013 [14]、SN/T 1151.1-2011 [15]中相关病原 PCR 检测方法分别进行对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)、对虾传染性皮下及造血器官坏死病病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)、对虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)、对虾虹彩病毒(Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)、对虾急性肝胰腺坏死症(Acute

Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)、对虾传染性肌肉坏死病病毒(Infectious myonecrosis virus, IMNV)以及桃拉病毒(Taura syndrome virus, TSV)的检测。若 PCR 结果为阳性,则将扩增产物送往上海生工测序,测序结果通过 NCBI 网站进行在线比对。

2.2.5. 相关阳性病原基因序列的系统进化分析

将测序反馈测序结果通过 NCBI 数据库中的 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性分析,并从中分别下载相关基因序列,通过 Clustal x 软件进行多重比对,采用 MEGA 7 软件中邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树(Bootstrap 设置为 1000 次重复),以确定。

3. 结果与分析

3.1. 患病虾的临床症状

采集的患病虾体长规格不均一,活力差,部分对虾体色发白,附肢、游泳足、尾扇变红,尾部、腹部肌肉组织坏死,呈白浊状(见图 1)。



Figure 1. Clinical symptoms of diseased *Litopenaeus vannamei* cultured in the temporary pond (The arrow indicates the white and turbid part of the muscle)

图1. 养殖场采集患病凡纳滨对虾临床症状(箭头:肌肉白浊部位)

3.2. 细菌及寄生虫检测

病虾鳃丝、肝胰腺、肌肉、心脏及淋巴器官接种于营养琼脂平板 28℃ 培养 48 h 后,有少量细菌生长,无优势菌株。经纯化后,挑取其中 3 个单菌落进行 16SrDNA PCR 扩增,扩增产物经测序和 BLAST 比对分析,结果显示,3 株分离菌均为乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)。

经制片和显微观察,患病对虾肝胰腺、鳃丝、心脏和肌肉组织均未观察到寄生虫。

3.3. 病毒检测

琼脂糖凝胶电泳结果显示,所检测的 7 种对虾病原菌中, EHP 和 IMNV 2 种病原扩增产物的电泳条带与阳性对照条带大小一致,片段大小分别为 514 bp 和 328 bp,其它 5 种病原均未扩增出目标条带,判定为阴性。患病对虾样品 EHP PCR 扩增产物测序反馈序列经 BLAST 比对结果显示,与 NCBI 数据库中 EHP 胞壁蛋白 1 基因(GenBank No.: MG015710)序列相似性最高(100%);患病对虾样 IMNV PCR 扩增产物测序反馈序列(GenBank No.: OQ438431)经 BLAST 比对结果显示,与 NCBI 数据库中凡纳滨对虾 IMNV

印度尼西亚株全基因组(GenBank No.: KJ636782)序列相似性最高(100%), 确认该患病虾为 EHP 和 IMNV 核酸阳性。

3.4. EHP 与 IMNV 扩增片段基因序列的系统进化分析

EHP 系统进化树分析结果显示(图 2(A)), 扩增得到的 EHP 孢壁蛋白 1 基因序列与 EHP 马来西亚分离株(GenBank No.: MW000459)、EHP 印度尼西亚分离株(GenBank No.: KY593133)、EHP 泰国分离株(GenBank No.: MG015710)、EHP 印度分离株(GenBank No.: MH365434)聚为一支, 与中国分离株(GenBank No.: MW269619)聚为一大类, 与孢子虫属(GenBank No.: OQ023043)形成不同分支; IMNV 系统进化树分析结果显示(图 2(B)), 扩增得到的 IMNV 基因序列与印度尼西亚分离株(GenBank No.: KJ636787)、印度分离株(GenBank No.: KY608806)、巴西分离株(GenBank No.: MZ593846)等聚为一大支, 与所属的整体病毒科(*Totiviridae*)其它病毒种序列形成不同分支。

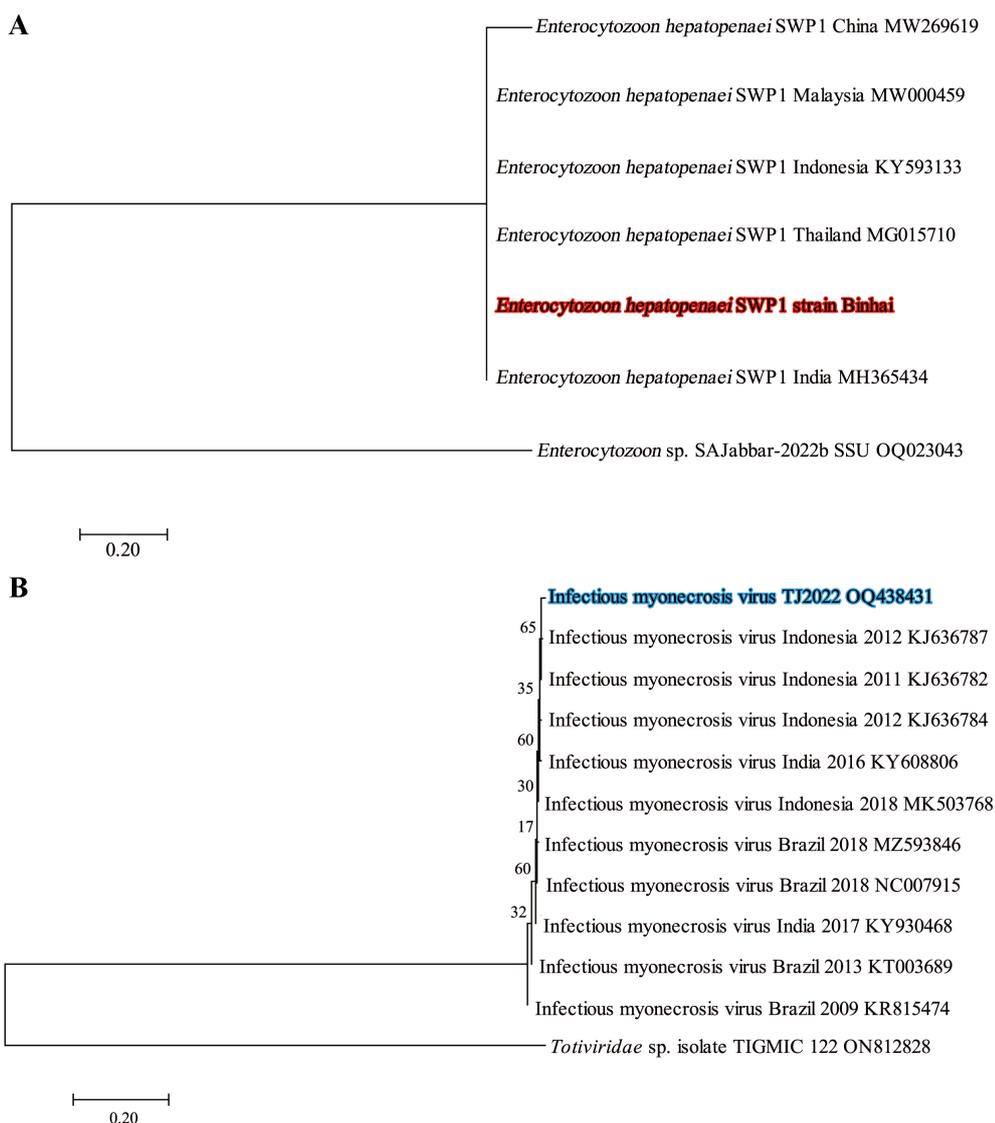


Figure 2. Phylogenetic tree constructed on the basis of gene sequences of EHP and IMNV amplified
图 2. EHP 和 IMNV 扩增序列的系统发育树

4. 讨论

本研究中的患病凡纳滨对虾主要症状表现为体长不均一，尾部、腹部肌肉出现白浊以及缓慢死亡。通过水浸片观察，未观察到寄生虫；经过重要组织器官细菌分离鉴定，只有少量细菌生长，无优势菌，经 16S rDNA 鉴定为乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)，推测此乳酸菌属为养殖户日常投喂的益生菌。经多种对虾常见病原 PCR 检测，在病虾肌肉和肝胰腺组织中扩增出符合 IMNV 和 EHP 基因大小的片段，测序比对后确认患病虾为 IMNV 和 EHP 核酸阳性，而患病对虾尾部、腹部肌肉白浊，体长不均一等表征明显，临床症状典型。综上推测，本研究所述天津地区工厂化养殖车间凡纳滨对虾发病的原因可能是由 IMNV 和 EHP 两种病原混合感染所致，但仍需进一步研究证实。

近年养殖的凡纳滨对虾中 EHP 的感染较普遍，EHP 最早于 2004 年在泰国患生长缓慢综合征(Monodon slow growth syndrome, MSGS)的斑节对虾(*Penaeus monodon*)中被发现，2009 年被正式命名和报道[16]，随后，东南亚地区各国家也相继报道了该病害[17] [18]。EHP 会造成对虾肝胰腺大面积损伤，阻碍对虾对营养物质的吸收，使其生长缓慢甚至停滞[19]。自 2013 年 EHP 传入中国后，各地区养殖的凡纳滨对虾先后出现 EHP 感染，感染率居高不下[20]。本研究将测序得到的 EHP 基因序列与 NCBI 中不同国家注册的 EHP 胞壁蛋白 1 进行比较分析，发现本文所述 EHP 相关基因与泰国、印度、印度尼西亚以及马来西亚 EHP 分离株胞壁蛋白 1 聚为一支，亲缘关系最近，而与中国分离株亲缘关系稍远。由此推测，本研究中凡纳滨对虾感染的 EHP 也许并非养殖场内部环境存在 EHP 病原感染所致，可能是经外省市购买的虾苗本身携带 EHP 病原，或用于孵化该批虾苗的亲虾由外部地区引进时携带病原产生的垂直传播造成的。同时也提示，在进口或跨省调运亲虾和虾苗的过程中一定要做好产地检疫工作，最大限度地防止外来毒株在我国各地区传播。

对虾传染病肌肉坏死病(Infectious myonecrosis, IMN)于 2002 年首次在巴西发现[21]，感染的对虾腹部末端及尾扇出现肌肉发白坏死的症状，致病原最终确定为 IMNV [22]。该病发病慢，呈缓慢死亡，但累计死亡率较高，能够达到 70%以上。自巴西养殖的凡纳滨对虾发病后，很快就蔓延到印度尼西亚等国家[21]。我们查阅了相关文献，结合本实验室常年对天津地区凡纳滨对虾的监测数据，显示天津地区截至 2022 年 8 月之前还未检测到该病原。2022 年 12 月天津滨海新区对虾工厂化养殖场发现的发病凡纳滨对虾为本地区发现的首例 IMN 感染病例。本次 IMNV 基因序列的系统进化树分析结果表明，该序列与已在 NCBI 上发布的巴西分离株、印度尼西亚分离株以及印度分离株基因序列亲缘关系近，且各序列之间的保守性很高。因此，开展中国大陆主要凡纳滨对虾养殖地区对虾肌坏死病流行病学调查，开发简便易行的病原检测试剂盒，了解该病主要传播途径等工作已刻不容缓，将对预防该病具有积极的意义，目前本实验室针对 IMN 的病理学分析和防控措施的研究正在同步进行。

在一定条件下，对虾经常会感染多种病原，Manivannan S 等人首次报道了一印度养殖场中的斑节对虾幼体同时受到了杆状病毒(Bacu Loviruspenaei, BP)、肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)和 WSSV 共三种病原的感染[23]。王博雅等报道了辽宁地区某养殖场内凡纳滨对虾同时感染了 IHNV、WSSV、TSV 和 EHP 等四种病原[24]。Selvin 和 Lipton 报道在大量暴发 WSSV 的养殖对虾体内分离出强毒力的溶藻弧菌，证明了 WSSV 浸染患病的对虾很容易受到弧菌等致病菌的二次感染[25]。这些报道都说明了存在多种病原体共同感染对虾的情况，包括病毒与病毒、病毒与细菌、病毒与寄生虫的共感染。本研究中养殖对虾存在 IMNV 与 EHP 共感染的现象，这与 Jithendran KP 等在对印度东海岸沿线的对虾养殖场进行调研的发现十分相似，绝大部分养殖场也存在 IMNV、EHP 共感染的现象[26]。这种多种病原共感染的机制现在普遍认为是由于在感染一种病毒之后，虾体免疫力下降继而导致细菌、寄生虫等病原菌的二次感染，因此本研究中在对虾 IMNV 和 EHP 共感染现象也可能是由于虾苗引进过程中携带 IMNV，

摄食、游泳等能力下降, 加剧了虾体免疫力下降, 又在养殖过程中感染了 EHP, 出现了体长大小不均一、肌肉白浊等症状。这也提示我们, 在进行对虾病害防治工作中应对多种病原采取综合防控措施。

5. 结论

本文采用流行病学调查、细菌分离鉴定、寄生虫观察以及分子生物学方法对天津滨海新区 2022 年 12 月出现的患病凡纳滨对虾致病原进行研究分析, 确认此次凡纳滨对虾为 EHP 和 IMNV 核酸阳性, 可能是由 EHP、IMNV 共同感染导致, 此案例为天津地区发现的首例传染性肌肉坏死病感染病例, 应引起广大科研工作者和对虾养殖业者的高度重视。

参考文献

- [1] 刘洪军, 王晓璐, 叶海斌, 等. 山东省虾蟹类养殖产业现状分析与可持续性发展对策[J]. 中国海洋经济, 2017(2): 13-34.
- [2] 张连英, 杨文颖, 张晶伟, 等. 天津地区土池淡水养殖南美白对虾现状分析调研报告[J]. 科学养鱼, 2019(5): 1-3.
- [3] 陈百尧, 万夕和. 江苏地区南美白对虾养殖现状及高温季节病害防控[J]. 科学养鱼, 2020(7): 20-23.
- [4] 刘晓丽, 李全振, 田洋, 等. 2021 年河北省水生动物病情分析报告[J]. 河北渔业, 2022(5): 11-13, 19.
- [5] 闫冬春. 对虾传染性肌肉坏死病研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(9): 89-91.
- [6] 国家认证认可监督管理委员会. SN/T2503-2010 淡水鱼中寄生虫检疫技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] 闻子钰, 梁昊, 顾一心, 等. 细菌核酸提取方法对荧光定量 PCR 检测差异分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 621-624.
- [8] 权永兵, 黄永辉, 徐淼锋, 等. 改良十六烷基三甲基溴化铵-磁珠核酸提取方法及在植物转基因检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8042-8047.
- [9] 全国水产标准化技术委员会. GB/T28630.2-2012 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分: 套式 PCR 检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [10] 全国水产标准化技术委员会. GB/T25878-2010 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.
- [11] 全国水产标准化技术委员会. SC/T7232-2020 虾肝肠胞虫病诊断规程[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [12] 全国水产标准化技术委员会. SC/T7237-2020 虾虹彩病毒病诊断规程[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [13] 全国水产标准化技术委员会. SC/T7233-2020 急性肝胰腺坏死病诊断规程[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [14] 全国水产标准化技术委员会. SC/T7228-2019 传染性肌肉坏死病诊断规程[S]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [15] 国家认证认可监督管理委员会. SN/T1151.1-2011 虾桃拉综合征检疫技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [16] Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., et al. (2009) *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a Parasite of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine Structure and Phylogenetic Relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, **102**, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>
- [17] Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M., et al. (2015) Development of *in situ* Hybridization and PCR Assays for the Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a Microsporidian Parasite Infecting Penaeid Shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, **130**, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.009>
- [18] Rajendran, K.V., Shivam, S., Ezhil, P., et al. (2016) Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, **454**, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.034>
- [19] Santhoshkumar, S., Sivakumar, S., Vimal, S., et al. (2016) Biochemical Changes and Tissue Distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Naturally and Experimentally EHP-Infected White Leg Shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *Journal of Fish Diseases*, **40**, 529-539. <https://doi.org/10.1111/jfd.12530>
- [20] 姜宏波, 陈裕文, 陈启军. 虾肝肠胞虫病的研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2020, 51(3): 370-376.
- [21] Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M. and Flegel, T.W. (2007) Outbreaks of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Indonesia Confirmed by Genome Sequencing and Use of an Alternative RT-PCR Detection Method. *Aquaculture*, **266**, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.026>

- [22] Poulos, B.T., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Bonami, J.R. and Lightner, D.V. (2006) Purification and Characterization of Infectious Myonecrosis Virus of Penaeid Shrimp. *Journal of General Virology*, **87**, 987-996. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81127-0>
- [23] Manivannan, S., Otta, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2002) Multiple Viral Infection in *Penaeus monodon* Shrimp Postlarvae in an Indian Hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, **48**, 233-236. <https://doi.org/10.3354/dao048233>
- [24] 王博雅, 王力, 刘美如, 等. 凡纳滨对虾 3 种主要病毒和虾肝肠胞虫在辽宁地区的流行情况分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(2): 150-154.
- [25] Selvin, J. and Lipton, A.P. (2003) *Vibrio alginolyticus* Associated with White Spot Disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**, 147-150. <https://doi.org/10.3354/dao057147>
- [26] Jithendran, K.P., Krishnan, A.N., Jagadeesan, V., et al. (2021) Co-Infection of Infectious Myonecrosis Virus and *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* Farms in the East Coast of India. *Aquaculture Research*, **52**, 4701-4710. <https://doi.org/10.1111/are.15304>