

罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究

钱冬^{1,2}, 刘问², 潘晓艺², 曹铮², 于涟³

(1. 浙江大学 生物医学工程与仪器科学学院, 浙江 杭州 310028; 2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001;
3. 浙江大学 动物预防医学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 罗氏沼虾肌肉白浊病(Whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii*) 是近年来流行于罗氏沼虾苗种阶段的严重疾病, 该病病原已确定为罗氏沼虾诺达病毒(*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV). 作者在病毒超离提纯的基础上, 制备了罗氏沼虾诺达病毒兔抗血清, 并应用抗罗氏沼虾诺达病毒单克隆抗体 2B5, 建立了三抗体夹心酶联免疫检测方法(TAS-ELISA). TAS-ELISA 最适反应条件为: 兔抗体以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包板, 小鼠单抗 2B5 的工作浓度为 1: 50000, 该法检测 MrNV 的灵敏度达 0.98 ng, 对 WSSV、TSV 及其他细菌感染死亡的罗氏沼虾没有非特异性反应. 通过对 2000—2002 年病虾及疑似病虾的病毒检测, 表明 TAS-ELISA 法比间接 ELISA 法和核酸电泳法有更高的阳性检出率和符合率; 此外还探索了降低孵育温度和缩短孵育时间对病毒检测的影响, 表明各步孵育温度和时间分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 min 对于白浊症状的病苗检测无明显影响, 使得本法更加适合于生产实践.

关键词: 罗氏沼虾肌肉白浊病; 罗氏沼虾诺达病毒; TAS-ELISA; 应用

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

QIAN Dong^{1,2}, LIU Wen², PAN Xiaoyi², CAO Zheng², YU Lian³ (1. College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Institute of Preventive Veterinary, Hangzhou 310029, China)

Establishment and application of TAS-ELISA for the detection of *M. rosenbergii* Nodavirus. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2006, 32(4): 377-382

Abstract: Whitish muscle of *Macrobrachium rosenbergii* was a new serious disease occurred in recent years in the main region of giant freshwater prawns in China, and *M. rosenbergii* Nodavirus (MrNV) was confirmed as the pathogen of the diseases. The rabbit antiserum and monoclonal antibody 2B5 against MrNV, purified with ultra-speed centrifugation from diseased prawn postlarvae, were developed and used for the establishment of TAS-ELISA. The optimal condition of TAS-ELISA: rabbit antibody used for plate precoating was 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, work concentration of Mab 2B5 was 1: 50000. The sensitivity of TAS-ELISA to purified MrNV was 0.98 ng, without cross reaction to WSSV, TSV and other dead prawn postlarvae caused by bacterial infection. The positive detection rate as well as coincident rate were compared with different methods and showed that TAS-ELISA was better than

收稿日期: 2004-06-18

基金项目: 中国水产科学研究院科研基金(2003-4-4); 浙江省自然科学基金(M303493).

作者简介: 钱冬(1963—), 男, 浙江嵊州人, 研究员, 主要从事水产动物病害及疫苗研究. Tel: 0572-2045132; E-mail: qdmonas@163.com.

通讯作者: 于涟, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事动物免疫学与微生物学研究. Tel: 0571-86971894; E-mail: yulian@zju.edu.cn.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnk>

indirect ELISA and RNA characterization with electrophoresis, when the diseased and suspicious prawn samples were analysed. Besides, the easy TAS-ELISA was developed with lower temperature and shorter incubation time, which made TAS-ELISA more practical in field detection.

Key words: whitish muscle diseases; *M. rosenbergii* Nodavirus; TAS-ELISA; application

罗氏沼虾肌肉白浊病(Whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii*)是近年来流行于我国罗氏沼虾主要养殖省市的疾病,主要危害罗氏沼虾虾苗,患病虾苗出现肌肉白浊、白斑或白尾症状,导致病虾大量死亡,严重时可达 60%~100%,是近年来罗氏沼虾育苗和养殖的主要疾病^[1]. 作者前期工作表明该病的病原为罗氏沼虾诺达病毒(*M. rosenbergii* Nodavirus, MrNV)^[2]. 到目前为止,该病毒仅发现于肌肉白浊病的罗氏沼虾虾苗中,从发病情况及流行病学分析,该病由亲虾传播的可能性极大,带病毒苗种的跨地区运输和带病毒种虾的使用,是造成该病迅速传播扩散的重要原因.

目前对罗氏沼虾诺达病毒还没有方便、特异、灵敏的检测方法,使得罗氏沼虾的健康苗种检测和检疫不能得到可靠的技术支持. 近年来,作者在罗氏沼虾病毒分离鉴定后,开展了病毒抗血清和小鼠单克隆抗体的研制工作,在此基础上,开展了病毒的检测技术研究,建立了 TAS-ELISA 法,本文报道这一研究结果.

1 材料与方法

1.1 实验材料

提取病毒用罗氏沼虾发病虾苗,取自浙江省湖州市发病苗场,规格为 0.07 g·尾⁻¹,呈典型肌肉白浊病症状, -20℃ 冰冻保存备用;制备抗血清用新西兰大白兔购自浙江省医科院实验动物中心,体重 1.8 kg;福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;抗罗氏沼虾诺达病毒单克隆抗体为本实验室制备;纯化对虾白斑综合症病毒(WSSV)由武汉病毒所石正丽研究员提供,对虾桃拉综合症病毒(TSV)取自桃拉病检测阳性南美白对虾;辣根过氧化物标记羊抗鼠抗体购自上海华美生物公司.

1.2 罗氏沼虾诺达病毒的提取

参照文献[2].

1.3 兔抗病毒血清的制备

新西兰大白兔饲养两周后进行免疫,将提纯病毒与等体积福氏完全佐剂充分混合后进行皮下、皮内、肌肉和脚掌多点注射,免疫剂量为 50 μg;首次免疫后第 15 d、第 30 d 分别以提纯病毒加福氏不完全佐剂进行多点加强免疫;第 45 d 耳静脉注射 100 μg 提纯病毒,第 60 d 颈动脉放血. 以提纯罗氏沼虾诺达病毒 1 μg·mL⁻¹包板,间接 ELISA 法测定血清效价. 血清分装后, -20℃ 冻存备用.

1.4 鼠抗诺达单克隆抗体的制备

用提纯病毒免疫 BALB/C 小鼠的脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合,用间接 ELISA 筛选阳性孔,经有限稀释法克隆,得到 12 株能特异分泌抗 MrNV 单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞. 注射小鼠,制备腹水单克隆抗体,ELISA 效价为(1:10⁵)~(1:10⁶). 挑选效价高的腹水单抗 2B5,用于罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测^[3].

1.5 TAS-ELISA 操作步骤

基本按文献报道方法^[4],简述如下:兔抗血清以 50% 饱和硫酸铵沉淀法作初步提纯,用 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液稀释抗体,每孔加入 100 μL 抗体,37℃ 包被 1 h,再 4℃ 过夜;以 PBST 冲洗包被板后,以 0.5% BSA 封闭 37℃ 1 h;依次加入病毒样品、抗病毒单抗、辣根过氧化物标记羊抗小鼠抗体孵育,各步孵育时间为 37℃ 1 h,孵育结束后以 PBST 冲洗 3 次以上;以邻苯二胺显色后加浓硫酸终止反应,测定 OD₄₉₀.

1.6 最佳工作浓度的确定

分别以不同浓度兔抗体包被酶标板及使用不同浓度的小鼠单抗,摸索 TAS-ELISA 的最佳工作浓度.

1.7 TAS-ELISA 的特异性测定

以提纯对虾白斑综合症病毒(WSSV)、患桃拉病南美白对虾、有类似肌肉白浊病症状的种虾、育苗池死亡罗氏沼虾苗等, 按 TAS-ELISA 法测定其非特异性反应.

1.8 TAS-ELISA 灵敏度的测定

将提纯罗氏沼虾诺达病毒从 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 开始, 用 PBS 作 4 倍系列稀释, 以健康罗氏沼虾组织匀浆上清液作为阴性对照, 按 TAS-ELISA 法测定可检出病毒的最低浓度.

1.9 TAS-ELISA 对生产性样品的测定

以 2000—2002 年期间收集的罗氏沼虾疫苗或可疑样品, 分别以 TAS-ELISA 法、间接 ELISA 法及病毒核酸电泳法测定病毒存在情况, 计算阳性检出率, 按样品养殖场的发病情况

计算符合率.

1.10 TAS-ELISA 快速测定

基本操作过程同 TAS-ELISA 法, 各步孵育温度分别为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$, 孵育时间分别为 60、30、20、10 min.

2 结果与分析

2.1 兔抗 MrNV 血清 ELISA 滴度的测定

以提纯罗氏沼虾诺达病毒包板, 健康罗氏沼虾组织匀浆上清液作为阴性对照, 间接 ELISA 法测定兔血清的抗病毒 ELISA 效价. 根据 OD₄₉₀ 计算 P/N 值, 以 P/N 大于 2.1 为阳性, 结果见表 1. 由表 1 可见, 兔抗病毒血清的 ELISA 滴度为 1: 51200.

表 1 兔抗病毒血清的 ELISA 效价测定
Table 1 Titre of rabbit antiserum against MrNV

	兔抗 MrNV 血清						
	1/50	1/200	1/800	1/3200	1/12800	1/51200	1/102400
MrNV/(1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.927	1.681	1.558	1.394	1.189	1.025	0.533
MrO/(1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.533	0.328	0.082	0.082	0.041	0.041	0
P/N	4.7	4.1	3.8	3.4	2.9	2.5	1.3

注: MrNV—超离提纯的罗氏沼虾诺达病毒; MrO—健康罗氏沼虾组织匀浆上清液.

2.2 兔抗血清包板最佳工作浓度的确定

兔抗血清以 50% 饱和硫酸铵沉淀后, 测定蛋白浓度, 以不同蛋白浓度包被酶标板, 测定最佳的包板工作浓度, 结果见图 1. 由图 1 可见, 粗提兔抗体以不同浓度包板时, 对于测定病毒的灵敏度不同, 其中 0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 包板效果较好, 故兔抗体的包板工作浓度确定为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3 小鼠单克隆抗体最佳工作浓度的确定

以 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提纯罗氏沼虾诺达病毒包板, 以健康罗氏沼虾组织匀浆上清液为阴性对照, 按间接 ELISA 法测定小鼠单抗 2B5 的 ELISA 效价, 共测定 3 次, 计算出 2B5 的 ELISA 效价为 10^{-6} , 但在 10^{-5} 与 10^{-6} 之间 OD 值出现明显的下降, 初步确定以 (1: 50000) ~ (1: 100000) 作为小鼠单抗 2B5 的工作浓度(表 2).

2.4 TAS-ELISA 法的特异性

以 TAS-ELISA 法测定单抗 2B5 对白斑综

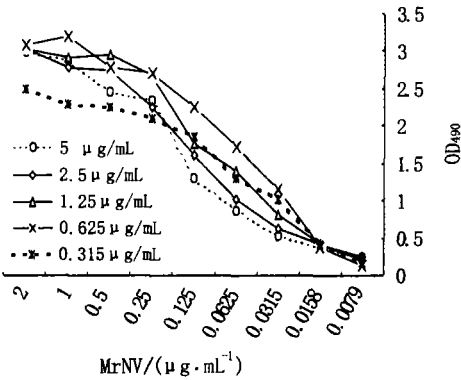


图 1 兔抗血清包板最佳工作浓度的测定
Fig. 1 Tests of work concentration of rabbit antiserum against MrNV

合症病毒(WSSV)、患桃拉病的南美白对虾、类似肌肉白浊病症状的种虾、育苗池死亡罗氏沼虾苗等. 由表 3 可见, 在本反应体系内, 2B5 对 WSSV、桃拉病虾、类似肌肉白浊病症状的种虾、育苗池死亡罗氏沼虾苗均没有反应, 而

对患肌肉白浊病的虾苗表现出较强的阳性反应.表明本方法有极好的特异性.

2.5 TAS-ELISA 的灵敏度

将提纯罗氏沼虾诺达病毒以 PBS 作 4 倍系列稀释,以健康罗氏沼虾组织匀浆上清液作

为阴性对照,按 TAS-ELISA 法测定可检出病毒的最低浓度.根据提纯病毒和阴性对照的测定值计算 P/N 值,以 P/N 值大于 2 1 为阳性.由表 4 可见,在本反应体系内,TAS-ELISA 法测出的最低病毒含量为 0.98 ng.

表 2 小鼠单抗 2B5 的效价测定
Table 2 ELISA titre of 2B5 against MrNV

组 别	提纯 MrNV					对照虾 10 ⁻²
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
1	2.872	3.011	3.057	2.965	1.019	0.417
2	2.872	3.15	3.15	2.409	1.003	0.649
3	2.733	3.196	3.15	2.826	1.297	0.509
平均值	2.826	3.119	3.119	2.733	1.106	0.525

表 3 TAS-ELISA 对其他病毒及病虾的特异性测定
Table 3 Specific test of TAS-ELISA to relative virus and diseased shrimp

被检样品	MrNV	WSSV	TSV	Control	Mr-1	Mr-2	Mr-M	Mr-S
OD ₄₉₀	2.131	0.069	0.057	0.067	0.046	0.056	0.139	0.695

注:Mr-1:育苗池底死虾;Mr-2:育苗池底死虾(腐烂);Mr-M:有类似白浊症状种虾肌肉;Mr-S:有类似白浊症状种虾血清.

表 4 TAS-ELISA 法的灵敏度测定
Table 4 Sensitivity of TAS-ELISA to purified MrNV

提纯病毒含量/ng	1000	250	62.5	15.6	3.9	0.98	0.24	0.061	0.015
OD ₄₉₀	2.918	2.640	1.575	0.990	0.556	0.509	0.278	0.232	0.232
阴性对照	0.232	0.232	0.232	0.232	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185
P/N	12.60	11.40	6.80	4.27	3.00	2.75	1.50	1.25	1.25

2.6 TAS-ELISA 法对生产性样品的测定

对 2000—2002 年期间本实验室收集的罗氏沼虾病苗或可疑样品,分别以 TAS-ELISA 法、间接 ELISA 法及病毒核酸电泳法测定病毒存在情况,计算阳性检出率,并按采集样品的发病记录,计算检测符合率,结果见表 5、表 6.由表 5 可见,发病记录与病虾是否出现白浊症状及间接 ELISA、TAS-ELISA、核酸电泳法所得的结果不完全一致,已发病且又呈典型白浊症状的虾苗用各种方法均可测出病毒阳性,已发病但未显症虾苗用核酸电泳法不能检出病毒核酸,而用间接 ELISA 法、TAS-ELISA 法可测出病毒,且 TAS-ELISA 法可更有效地检出病毒,包括一些养殖池塘发病不很明显的虾苗,计

算三种方法的阳性检出率,核酸电泳法为 34.62%,间接 ELISA 法为 38.46%,TAS-ELISA 法为 73.08%,如以实际发病的虾苗计算检测符合率,则 TAS-ELISA 法为 93.75%,而电泳法和直接 ELISA 分别为 50.6%和 56.25%.由此可见 TAS-ELISA 法可更为有效地检出虾苗中的诺达病毒.

2.7 TAS-ELISA 快速测定

为生产单位更好应用 TAS-ELISA 法进行罗氏沼虾诺达病毒的检测,开展了不同孵育温度和孵育时间对病毒检出的影响.由表 7 可见,降低孵育温度和缩短孵育时间,可使病毒检出的灵敏度下降,反应结果变弱,但对于典型病虾 25℃孵育时间 20 min,仍可较好地检测出病毒.

表 5 2000—2002 年期间病虾材料的诺达病毒测定

Table 5 MrNV detection of diseased and suspicious prawn samples collected during 2000-2002													
No	样品来源 与时间	发病	症状	间接 ELISA	核酸 电泳	TAS- ELISA	No	样品来源 与时间	发病	症状	间接 ELISA	核酸 电泳	TAS- ELISA
1	杭州 00/05	未发	不白	0.05	-	0.000	14	吴江 2 02/05	发病	不白	0.05	-	2.391
2	杭州 00/05	发病	白	0.41	+	2.850	15	高邮 1 02/05	不明	白	0.04	-	2.329
3	湖州 01/04	发病	白	0.03	+/-	0.950	16	高邮 2 02/05	不明	白	0.16	++	2.912
4	感染虾 01/05	发病	白	0.04	+/-	2.299	17	高邮 3 02/05	不明	白	0.06	-	0.950
5	湖州 01/04	发病	白	0.47	+	2.759	18	高邮 4 02/05	不明	白	0.05	-	2.759
6	湖州 01/07	发病	白	0.25	-	2.759	19	湖州 1 02/05	发病	不白	0.04	-	2.207
7	嘉善 1 02/05	发病	不白	0.22	+	2.912	20	湖州 1 02/05	发病	白	0.08	+	2.820
8	嘉善 2 02/05	发病	白	0.15	+	2.942	21	湖州 2 02/05	发病	白	0.22	++	2.789
9	嘉善 2 02/05	发病	不白	0.04	-	0.490	22	湖州 2 02/05	发病	不白	0.03	-	1.870
10	嘉善 3 02/05	发病	白	0.32	+	2.973	23	湖州 3 02/05	发病	白	0.14	-	2.759
11	湖州 1 02/05	不明	不白	0.04	-	0.184	24	白虾 02/06	未发	白	0.10	-	0.215
12	湖州 2 02/05	不明	不白	0.06	-	0.153	25	湖州 4 02/06	不明	不白	0.03	-	0.215
13	吴江 1 02/05	发病	混合	0.22	+	2.820	26	湖州 4 02/06	不明	白	0.03	-	0.215

表 6 不同病毒检测方法的阳性率和符合率

Table 6 Positive and coincident rate of MrNV detection with different methods			
检测方法	阳性检出数	阳性检出率/ %	符合率/ %
核酸电泳法	9	34.62	50.60
间接 ELISA 法	10	38.46	56.25
TAS-ELISA 法	19	73.08	93.75

表 7 不同孵育温度和时间对罗氏沼虾诺达病毒检出的影响

Table 7 Effects on the MrNV detection by incubation temperature and time in TAS-ELISA													
组 别		37 ℃				30 ℃				25 ℃			
		60 min	30 min	20 min	10 min	60 min	30 min	20 min	10 min	60 min	30 min	20 min	10 min
提纯	0.0625 μg	1.23	0.246	0.082	0	1.066	0.246	0.082	0	0.943	0.287	0.164	0
MrNV	0.0312 μg	1.23	0.205	0.041	0	0.984	0.246	0.041	0	0.984	0.328	0.123	0
病 虾	1: 10 匀浆	3.485	2.911	2.296	1.558	3.485	2.665	2.337	1.558	3.28	2.706	2.255	1.271
健康虾	1: 10 匀浆	0.123	0	0	0	0.123	0	0	0	0.123	0.041	0	0

3 讨 论

罗氏沼虾肌肉白浊病是由罗氏沼虾诺达病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV) 引起的严重疾病^[2,5-6], 1996 年前后出现在我国, 患病虾苗出现肌肉白浊、白斑或白尾症状, 导致病虾大量死亡, 严重时可高达 60% ~ 100%, 是近年来罗氏沼虾育苗和养殖的主要疾病. 2000 年起在我国罗氏沼虾主要养殖省市流行, 特别是江苏、浙江、广西等省是罗氏沼虾

的主要苗种生产地, 更是该病的重灾区. 该病还发现于中北美洲地区, 当地称为白尾病, 几乎与我国相同时间出现流行. 虽然近年来陆续建立了一些诺达病毒的检测方法, 包括病毒的电镜观察、核酸电泳法^[1], 以及法国学者建立的基于小鼠多抗血清的双夹心 ELISA^[7]、RT-PCR 法^[8]等, 但这些方法对于基层单位的应用都存在费时费钱等问题. 在我国广大地区, 根据症状判断疾病仍然是广泛采用的疾病诊断方法.

作者在 MrNV 兔抗血清和小鼠单克隆抗体研制的基础上, 开展了罗氏沼虾诺达病毒的

TAS-ELISA 检测技术研究,通过对兔抗体、小鼠单抗工作浓度的摸索,成功地建立了可方便应用于生产单位进行罗氏沼虾肌肉白浊病检测的 TAS-ELISA 检测技术. 该技术对于罗氏沼虾诺达病毒的最低检测灵敏度可达 1 ng, 对 WSSV、拉病虾及其他细菌感染引起的死虾无非特异性反应. 采用快速法, TAS-ELISA 反应温度可降至 25 °C, 反应孵育时间可缩短至 20 min. 这一方法适合于各育苗场直接开展病毒的检测工作, 使养殖户对可疑虾苗进行病毒的快速检测. 由于 TAS-ELISA 采用特异性抗体预包被酶标板, 在样品测定时, 预包被的抗体起到捕捉样品中病毒的作用, 进一步提高了灵敏度和特异性, 特别适合于病毒含量较少样品的检测. 通过对 2000—2002 年间收集的病虾及疑似病虾的检测和灵敏度比较, 表明 TAS-ELISA 法比间接 ELISA 法和核酸电泳法有更高的阳性检出率和符合率, 适用于生产中患病虾苗和可疑虾苗的病毒检测.

诺达病毒(Nodavirus) 又称野田村病毒, 因首先发现于日本岩手县野田村的蚊子中而得名, 以往仅发现于昆虫和鱼类中, 罗氏沼虾诺达病毒是首个从甲壳动物中发现的诺达病毒. 到目前为止, 罗氏沼虾诺达病毒仅发现于罗氏沼虾发病虾苗中. 通过对罗氏沼虾肌肉白浊病的发病情况及流行病学分析, 该病种虾垂直传播的可能性极大, 因此带病毒苗种的跨地区运输和带病毒种虾的使用, 将可能继续扩大该病的传播扩散, 对罗氏沼虾养殖业带来严重的潜在威胁. 但令人遗憾的是, 至今还没有明确的证据表明种虾携带病毒, 也未能对种虾群体开展系统的病毒检测. 由于种虾本身并未发现有诺达病毒的感染, 因此更多的是病毒携带状态. TAS-ELISA 法 1 ng 的检测限度可能使得群体水平上携带病毒较低的种虾在未经病毒富集的情况下较难检测到病毒, 这也是今后需要进一

步加以解决的问题.

References:

- [1] QIAN Dong(钱冬). Advances on the whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae [J]. **Scientific Fish Farming**(科学养鱼), 2003(Suppl.): 68-70. (in Chinese)
- [2] QIAN Dong, SHI Zheng-li, CAO Zheng, *et al.* (钱冬, 石正丽, 曹铮, 等). Isolation and characteristics of *Nodavirus* which causing the whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**(中国水产科学), 2003, 10(6): 457-461. (in Chinese)
- [3] LIU Wen, QIAN Dong, WU Jian-xiang, *et al.* (刘问, 钱冬, 吴建祥, 等). Production and application of monoclonal antibodies to *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus [J]. **Journal of Fisheries of China** (水产学报), 2005, 29(4): 529-533. (in Chinese)
- [4] 杨廷彬, 尹学念. 实用免疫学 [M]. 长春: 长春出版社, 1994.
- [5] QIAN Dong, YANG Guo-liang, LIU Wen, *et al.* (钱冬, 杨国梁, 刘问, 等). Preliminary studies on the whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae [J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**(水生生物学报), 2002, 26(5): 472-476. (in Chinese)
- [6] Qian D, Shi Z, Zhang S, Bonami J R, *et al.* Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **J Fish Dis**, 2003, 26(5): 521-527.
- [7] Romestand B, Bonami J R. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. **J Fish Dis**, 2003, 26(2): 71-75.
- [8] Widada J S, Durand S, Cambournac I, *et al.* Genome based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR [J]. **J Fish Dis**, 2003, 26(6): 583-590.