

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180421002

http://www.yykyjz.cn/

宋增磊, 董宣, 赵若恒, 王秀华, 武和英, 于党辉, 谢国驹, 黄健. 基于TaqMan qPCR检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 122-132

Song ZL, Dong X, Zhao RH, Wang XH, Wu HY, Yu DH, Xie GS, Huang J. Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 122-132

基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中 虾肝肠胞虫并样检测方法的评价*

宋增磊^{1,2} 董宣² 赵若恒³ 王秀华² 武和英^{1,2}
于党辉^{1,2} 谢国驹² 黄健^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 对山东海阳和潍坊的2个养殖凡纳滨对虾群体取样, 采用 TaqMan qPCR 逐尾检测肝胰腺中的虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)载量, 再将提取的DNA样品按5并1(5:1)、25并1(25:1)、50并1(50:1)、100并1(100:1)和150并1(150:1)进行并样, 检测并样的EHP载量。设定不同临界循环数为假定灵敏度, 定性判断各单尾检测阳性及并样组阳性, 比较不同并样模式与检测阳性率、诊断灵敏度、诊断特异性等之间的关系以及定量的准确性。结果表明, 检测灵敏度过低, 会降低高并样率检测的准确性; 阳性率在30%以上时, 高并样率的检测结果与单样品检测相符性很好; 高载量感染的阳性率不低于6.7%时, 50:1以内的并样能准确得出检测结果; 低载量感染的阳性率不低于16%时, 25:1以内的并样能得出较好结果; 高载量感染的1.3%阳性率和低载量感染的8%阳性率可能导致所有并样出现假阴性结果; 各种并样模式均有很好的诊断特异性, 50:1并样的诊断灵敏度与OIE标准推荐的5:1并样的接近; 各并样检测的EHP载量与单样品检测平均值之比在0.27~2.83范围, 二者存在极显著相关性, 各种并样模式的定量检测结果在数量级水平能大致反映样品的平均EHP载量。本研究为水生动物疫病诊断和流行病学调查的样品检测提供了参考依据。

关键词 凡纳滨对虾; 虾肝肠胞虫(EHP); qPCR; 并样检测

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0122-11

水产养殖是一种典型的大群体操作, 其疾病诊断和流行病学研究是基于少量样品的测试而完成的。样

* 现代农业产业技术体系(CARS-48)、中国东盟海上合作基金项目(2016~2018)和中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD10)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016~2018), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD10)]. 宋增磊, E-mail: 479943494@qq.com

① 通讯作者: 黄健, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-21, 收修改稿日期: 2018-05-04

品的代表性是得出正确的疾病诊断结果和可靠的流行病学研究结论的关键,但这一关键在生产中常常被忽视。对一个群体进行随机采样时,达到95%可信度的采样率所需被全部检测到的样品数量与群体中疫病的不同流行率及群体大小相关,以含有10万个以上个体的大群体为例,在2%的疾病流行率时的被检测的样本数要求达到150;10%流行率时要求达到30个样本(Ossiander *et al*, 1973),这样的采样率在实际生产的诊断应用中如果都进行单尾检测会造成极高的成本,使养殖业者难以承受,而并样检测则能够降低成本,但也很容易造成假阴性的现象。因此,需对并样检测方法进行评估,来保证诊断结果的可靠性和可行性(Williams *et al*, 2001)。在OIE标准及美国标准中,都有最多每5个个体进行并样的建议,但这样的并样方法在水生动物疾病研究中并没有明确的研究数据支持(OIE, 2017; FHS, 2014)。在陆生动物疾病研究中,也只有少量研究报道(Muñoz-Zanzi *et al*, 2000; Arnold *et al*, 2009; Rovira, 2008)。因此,有必要对水生动物疾病样品检测中的并样问题开展研究。

自2003年以来,泰国养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*)出现生长缓慢综合征(MSGS),造成了严重的经济损失(Chayaburakul *et al*, 2004)。在2009年,泰国研究者在生长缓慢的斑节对虾肝胰腺中检测到虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)(Tourtip *et al*, 2009),EHP感染并没有明显的临床病变特征,对于该病原的诊断主要通过组织学观察、PCR法、地高辛标记核酸探针原位杂交法以及LAMP检测方法(Tangprasittipap *et al*, 2013; Suebsing *et al*, 2013)。2013年,中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室建立了EHP的SYBR Green qPCR方法,并首次在中国养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中检出EHP。进一步对养殖对虾群体的单尾EHP载量和体长关系分析表明,对虾肝胰腺样品总DNA(HpDNA)中EHP载量在 10^3 copies/(ng HpDNA)以上时,代表了较高的风险水平(刘珍等, 2016)。Liu等(2018)建立了EHP的TaqMan探针qPCR方法,灵敏度高于SYBR Green qPCR和套式PCR方法,并证实上述EHP载量与对虾生长关系的存在,这些研究为EHP的检测和防控提供了多项技术手段。

EHP的定量检测对于养殖风险的判定具有重要意义,但针对大抽样量存在过高的检测工作量和成本问题,为了提高EHP检测的适用性和有效性,有必要考虑应用并样检测方案。本研究以TaqMan qPCR的EHP检测方法为基础,考察不同并样方案对EHP

检测的影响,以期水生动物病原检测技术的实际应用和水生动物流行病学监测提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

2017年6月~7月自山东海阳和潍坊2家养殖场分批采集凡纳滨对虾,海阳样品编号为60401~60450,潍坊样品编号为60301~60350、61401~61450和70701~70750。每尾活虾用3倍以上体积的95%乙醇进行保存。

1.2 肝胰腺总DNA提取

95%乙醇中保存的对虾肝胰腺组织经无菌海水冲洗去除乙醇后,用一次性解剖刀片切取约30 mg,利用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取处理好的样品肝胰腺总DNA,用核酸分析仪(NanoDrop 2000c, Thermo)测定样品的DNA浓度,并分析提取的DNA质量,然后根据DNA浓度的不同,对其进行适当地稀释后,将DNA样品置于-20℃冰箱保存。

1.3 样品EHP载量的检测

将1.2中保存的DNA样品用Liu等(2018)建立的TaqMan探针法实时荧光qPCR进行检测,根据本研究并样检测时的阴性对照扩增曲线确定阴性循环阈值(C_{IN})为31,对各样品EHP载量进行计算。

1.4 样品的并样检测方案

1.4.1 海阳样品的并样检测 将山东海阳的50份样品按照样品编号顺序,每5个为1组,对每个样品取10 μl DNA至1.5 ml离心管中,充分混匀后,确定其浓度仍在200 ng/μl,得到10个5:1(5P)并样方式的样品,分别命名为H5P01~H5P10,再对这10个样品采取同样的方法进行并样,得到2个25:1(25P)并样方式的样品,分别命名为H25P01和H25P02。对这12个新并样的样品进行EHP检测,与组内对应样品检测结果取平均值进行比较。

1.4.2 潍坊样品的并样检测 将山东潍坊的3次跟踪采样的样品分别按照山东海阳样品的并样方法进行处理,每批样品得到5:1(5P)并样后的10个样品,分别命名为W5P01~W5P30,再对30个样品采取同样的方法进行并样,得到6个25:1(25P)并样方式的样品,分别命名为W25P01~W25P06,接着对这6个样品每2个进行并样,得到3个50:1(50P)并样样品,分别命名为W50P01~W50P03,对50P的

3个样品两两并样,得到3个100:1(100P)并样样品,分别命名为W100P01~W100P03,最后对50P的3个样品进行并样,得到1个150:1(150P)并样样品W150P01。对并样后的各样品进行EHP载量检测,与单个样品检测的结果进行比较。

1.5 并样检测的定性分析

为了考察在不同阳性强度的水平下并样对阳性检出的影响,通过划定不同的假定临界循环值(C_a),分别用海阳和潍坊样品的EHP检测的循环阈值(C_t)与 C_a 值比较,样品扩增曲线在 C_a 值之前升起,即 $C_t \leq C_a$,则判定为分析阳性,否则为分析阴性,求出不同 C_a 值的各并样组阳性和阴性数目。根据并样组的单个样品分析阳性判定并样组已知阳性,即并样组中有1个及1个以上单一样品为阳性,则并样组为已知阳性。以上述阴性和阳性数据为基础,计算不同假定临界循环值下的已知阳性数/检测到的阳性数、不同并样模式的已知阳性率和测试阳性率、不同已知阳性率的各并样组的已知阳性数/检测到的阳性数、低阳性率并样组的已知阳性数和检测阳性数、不同并样模式的诊断灵敏度和诊断特异性(OIE, 2017)。

1.6 并样检测的定量分析

在Microsoft Excel 2016中,根据单一样品的EHP载量,按各并样组进行平均,计算并样组EHP的已知载量。与各并样组实际检测的载量进行比较,包括计算检测值与已知载量值的差值和变异系数,分析已知载量与实际检测之间的相关系数(R),根据函数式 $P=TDIST(t, df, 2)$ (其中, $t=|R|/\sqrt{(1-R^2)/df}$, $df=n-2$, n 为样本数)计算双尾概率(P),以 $P<0.05$ 作为显著水平, $P<0.01$ 作为极显著水平。

2 结果

2.1 样品EHP载量的检测结果

对山东海阳50个样品和山东潍坊3次采样的150个样品逐尾进行EHP的载量检测(表1)。其中,海阳群体样品有18个阳性,32个阴性,阳性率为36%;潍坊第1、2次采样群体中样品全部为阴性;第3次采样群体中样品全部为阳性,阳性率为100%。

2.2 并样检测结果的定性分析

2.2.1 不同假定灵敏度下并样检测的阳性率 分别对海阳和潍坊样品进行不同模式的并样检测,比较在不同 C_a 值下,并样组已知阳性数和检测阳性数(表2)。结果显示,在低假定灵敏度下,带阳性的并

样实际检测容易出现阴性,5:1并样时,在多种灵敏度下都存在检出的阳性数量下降的情况,而高灵敏度下实际检测的阳性数量符合已知阳性数量,而50:1以上并样的检测差异主要出现在极低灵敏度的情况。

2.2.2 不同并样模式的阳性检出 比较2个采样群体不同并样模式的分组在16~31个临界循环的假定灵敏度下总的已知阳性率和并样检测阳性率(表3),结果显示,较高并样率下的阳性率总是大于或等于较低并样率下的阳性率。从潍坊群体的50:1~150:1并样的已知阳性率变化可以看到,对单一样品(并样率1:1)并样或从较低并样率的样本再并样时,并样已知阳性率变化范围符合关系:较低并样率的阳性率 \leq 较高并样率的阳性率 \leq 较低并样率的阳性率 \times 较高并样率/较低并样率。当并样前各组阳性率相同时,并样后就有同样的阳性率,当并样前有各并样模式中根据单样品检测结果推定的已知阳性率略高于对并样进行实际检测所得出的阳性率。

2.2.3 不同阳性率并样的阳性检出 按不同并样组中个体的阳性率区间,统计所有16~31个临界循环的假定灵敏度下各并样组按单样品推定的已知阴性或阳性的数量,与并样组经实验检测所得的相应数量进行比较(表4)。结果显示,当阳性率在0.1%~10.0%时,25:1~150:1的并样组均未测出阳性,阳性率为10.1%~20.0%时,上述并样组的实验测试所得的阳性数量与已知阳性数量也有出入,20.0%阳性时,5:1并样组也只测出已知阳性的1/2数量的阳性;阳性率在40.0%的5:1并样组的测试阳性与已知阳性也有少量差异,但30.1%~40.0%阳性率的25:1~150:1并样组所有样品均检出了与已知阳性数量相同的结果;更高阳性率的各并样组的实验测试阳性数量与已知阳性数量均没有差异。

对并样组内阳性率(即并样组中的单样品的阳性率)低而未能有效检出的情况进行具体分析(表5),结果显示,在海阳样品中,最终并样组(25:1)中有2尾以下对虾为阳性(阳性率8.0%)时,其相关的5:1和25:1有已知阳性的并样组均未能检出阳性;最终并样组有3尾对虾为阳性(阳性率12.0%)时,其相关的5:1已知阳性的并样组有部分阳性检出,但25:1并样组未能检出;最终并样组中有4尾对虾为阳性(阳性率为16.0%)时,相关的5:1并样组有部分阳性检出,但25:1的并样组未能检出。在潍坊样品中,最终并样组(150:1)有2尾对虾为阳性(阳性率1.3%)时,其相关的所有5:1~150:1并样组均未能检出阳性;有6尾对虾为阳性(阳性率4.0%)时,已知阳性5:1并样组部分能检出阳性,但25:1~150:1的并样组

表 1 凡纳滨对虾样品中肝胰腺的 EHP 拷贝数

Tab.1 EHP copies in hepatopancreas of farmed *L. vannamei*

样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP
60301	0	60401	0	61401	0	70701	$(4.74\pm 1.30)\times 10^4$
60302	0	60402	0	61402	0	70702	$(9.68\pm 0.29)\times 10^3$
60303	0	60403	0	61403	0	70703	$(6.39\pm 0.59)\times 10^3$
60304	0	60404	$(1.79\pm 0.25)\times 10^3$	61404	0	70704	$(5.49\pm 0.47)\times 10^2$
60305	0	60405	$(1.45\pm 0.17)\times 10^3$	61405	0	70705	$(9.99\pm 1.76)\times 10^3$
60306	0	60406	$(4.92\pm 0.10)\times 10^2$	61406	0	70706	$(5.15\pm 0.68)\times 10^3$
60307	0	60407	0	61407	0	70707	$(2.17\pm 0.02)\times 10^4$
60308	0	60408	$(9.63\pm 0.49)\times 10^1$	61408	0	70708	$(2.02\pm 0.33)\times 10^3$
60309	0	60409	0	61409	0	70709	$(9.72\pm 0.11)\times 10^2$
60310	0	60410	0	61410	0	70710	$(9.72\pm 0.11)\times 10^2$
60311	0	60411	0	61411	0	70711	$(1.04\pm 0.17)\times 10^4$
60312	0	60412	0	61412	0	70712	$(1.62\pm 0.02)\times 10^4$
60313	0	60413	0	61413	0	70713	$(2.05\pm 0.03)\times 10^4$
60314	0	60414	0	61414	0	70714	$(5.11\pm 0.60)\times 10^4$
60315	0	60415	$(2.36\pm 0.17)\times 10^2$	61415	0	70715	$(1.70\pm 0.17)\times 10^3$
60316	0	60416	0	61416	0	70716	$(6.64\pm 0.90)\times 10^3$
60317	0	60417	$(2.36\pm 0.66)\times 10^2$	61417	0	70717	$(3.98\pm 0.11)\times 10^4$
60318	0	60418	0	61418	0	70718	$(3.46\pm 0.56)\times 10^4$
60319	0	60419	0	61419	0	70719	$(3.53\pm 0.08)\times 10^3$
60320	0	60420	0	61420	0	70720	$(1.98\pm 0.50)\times 10^3$
60321	0	60421	0	61421	0	70721	$(1.58\pm 0.02)\times 10^3$
60322	0	60422	$(1.83\pm 0.15)\times 10^3$	61422	0	70722	$(5.27\pm 0.07)\times 10^3$
60323	0	60423	$(2.02\pm 0.16)\times 10^2$	61423	0	70723	$(3.78\pm 0.27)\times 10^3$
60324	0	60424	0	61424	0	70724	$(1.27\pm 0.03)\times 10^4$
60325	0	60425	$(1.22\pm 0.11)\times 10^2$	61425	0	70725	$(7.42\pm 1.51)\times 10^2$
60326	0	60426	$(1.20\pm 0.16)\times 10^2$	61426	0	70726	$(7.82\pm 1.68)\times 10^3$
60327	0	60427	0	61427	0	70727	$(1.18\pm 0.06)\times 10^2$
60328	0	60428	$(1.06\pm 0.08)\times 10^2$	61428	0	70728	$(1.06\pm 0.19)\times 10^3$
60329	0	60429	0	61429	0	70729	$(3.07\pm 0.17)\times 10^3$
60330	0	60430	0	61430	0	70730	$(2.32\pm 0.45)\times 10^2$
60331	0	60431	0	61431	0	70731	$(2.44\pm 0.22)\times 10^3$
60332	0	60432	0	61432	0	70732	$(9.52\pm 0.76)\times 10^3$
60333	0	60433	0	61433	0	70733	$(1.63\pm 0.77)\times 10^4$
60334	0	60434	$(2.48\pm 0.23)\times 10^2$	61434	0	70734	$(9.24\pm 1.08)\times 10^4$
60335	0	60435	$(3.88\pm 0.45)\times 10^1$	61435	0	70735	$(1.91\pm 0.06)\times 10^4$
60336	0	60436	0	61436	0	70736	$(3.76\pm 0.17)\times 10^3$
60337	0	60437	$(7.47\pm 1.03)\times 10^1$	61437	0	70737	$(3.88\pm 0.01)\times 10^3$
60338	0	60438	0	61438	0	70738	$(1.77\pm 0.14)\times 10^2$
60339	0	60439	$(2.31\pm 0.10)\times 10^2$	61439	0	70739	$(6.52\pm 0.70)\times 10^2$
60340	0	60440	0	61440	0	70740	$(3.10\pm 0.24)\times 10^4$
60341	0	60441	0	61441	0	70741	$(6.26\pm 0.14)\times 10^3$
60342	0	60442	0	61442	0	70742	$(5.77\pm 0.09)\times 10^2$
60343	0	60443	$(7.81\pm 0.81)\times 10^2$	61443	0	70743	$(8.71\pm 0.38)\times 10^2$
60344	0	60444	0	61444	0	70744	$(1.01\pm 0.09)\times 10^4$
60345	0	60445	0	61445	0	70745	$(2.84\pm 0.66)\times 10^3$
60346	0	60446	0	61446	0	70746	$(1.03\pm 0.07)\times 10^3$
60347	0	60447	$(1.34\pm 0.07)\times 10^2$	61447	0	70747	$(1.24\pm 0.79)\times 10^5$
60348	0	60448	$(5.45\pm 1.21)\times 10^2$	61448	0	70748	$(5.41\pm 0.29)\times 10^4$
60349	0	60449	0	61449	0	70749	$(1.63\pm 0.08)\times 10^3$
60350	0	60450	0	61450	0	70750	$(4.74\pm 0.10)\times 10^3$

注: EHP 为每 ng 肝胰腺总 DNA 的 EHP SSU rRNA 基因的拷贝数(copies/ng HpDNA)。0 代表大于 31 个 qPCR 扩增循环的阴性检测结果

Note: EHP means copies of SSU rRNA gene of EHP per ng total hepatopancreatic DNA (copies/ng HpDNA). 0 means negative result above 31 cycles during qPCR amplification

表2 不同假定灵敏度下并样组阳性情况
Tab.2 The positive number of sample detection at different assumed sensitivities

假定临界 循环值 Assumed threshold cycles	不同并样的已知阳性数/检测阳性数 Ratio of known positive numbers to detected positive numbers by different pooling				
	5 : 1 (n=40)	25 : 1 (n=8)	50 : 1 (n=3)	100 : 1 (n=3)	150 : 1 (n=1)
16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
17	2/0	1/0	1/0	2/0	1/0
18	5/2	2/0	1/0	2/0	1/0
19	6/4	2/1	1/1	2/0	1/0
20	9/5	2/2	1/1	2/0	1/0
21	10/8	2/2	1/1	2/2	1/1
22	10/9	2/2	1/1	2/2	1/1
23	12/9	3/2	1/1	2/2	1/1
24	12/11	3/2	1/1	2/2	1/1
25	14/11	4/3	1/1	2/2	1/1
26	17/11	4/3	1/1	2/2	1/1
27	19/13	4/3	1/1	2/2	1/1
28	20/17	4/4	1/1	2/2	1/1
29	20/19	4/4	1/1	2/2	1/1
30	20/20	4/4	1/1	2/2	1/1
31	20/20	4/5	1/1	2/2	1/1
合计 Sum	196/159	45/37	15/13	30/22	15/11

注: 已知阳性是根据单样品检测结果推定的并样组结果, 并样组中有一个单样品在假定临界循环值(C_a)下判定为阳性, 则该并样组为已知阳性; C_a 指假定的判定阳性和阴性的临界循环数, 样品检测到扩增的循环数大于 C_a 值, 判定该样品为阴性

Note: Known positive was resulted from the detected individuals in the pooled sample group. If an individual in the pooled samples was positive under the assumed threshold cycles (C_a), the pooled sample group was decided as a known positive. C_a is the critical cycles to determine positive and negative. If non amplification was detected above C_a , the sample was determined as negative

均未能检出阳性; 有 10 和 17 尾对虾为阳性(阳性率分别为 6.7%和 11.3%)时, 已知阳性的 5 : 1、25 : 1 和 50 : 1 并样组能有阳性检出, 但 100 : 1 和 150 : 1 的并样均为能检出。

2.2.4 并样检测的诊断灵敏度和诊断特异性 统计所有 16~31 个临界循环的假定灵敏度下不同并样模式的已知阳性和已知阴性对应于检测阳性和检测阴性的数量, 其中, 已知阳性并样检出为阳性则为真阳性, 已知阴性检出为阳性则为假阳性, 已知阴性检出为阴性则为真阴性, 已知阳性检出为阴性则为假阴性, 计算得出各并样模式下的诊断灵敏度和诊断特异性(表 6), 结果显示, 5 : 1~50 : 1 的诊断灵敏度均不低

于 80%, 且 5 : 1 和 50 : 1 的诊断灵敏度接近, 100 : 1~150 : 1 的诊断灵敏度有所下降。5 : 1~25 : 1 的诊断特异性为 99.5%~98.8%, 50 : 1~150 : 1 的诊断特异性均达 100%。

2.3 并样检测的定量分析

2.3.1 并样检测值与平均值的比较 对海阳和潍坊群体单样品 EHP 载量平均值和并样检测的 EHP 载量进行比较(表 7)。结果显示, 海阳样品的 10 个 5 : 1 并样检测值有 4 个高于单样品平均值, 6 个低于单样品平均值, 其中, 3 个并样的差值在平均值的 50%以上; 2 个 25 : 1 并样的检测值分别不高于和低于平均值的 50%。潍坊样品的 5 : 1 并样中, 20 个阴性并样中 1 个检出了弱阳性, 其余阴性并样在 31 个循环内仍为阴性; 9 个阳性并样的检测值均高于平均值, 其差异幅度为平均值的 10%~183%。潍坊样品 25 : 1 并样中, 4 个阴性并样有 1 个在 31 个循环内检出了弱阳性; 2 个阳性并样的检测值均低于平均值, 差异幅度在平均值的 5%~50%范围。50 : 1~150 : 1 的并样中, 除了阴性并样的检测值依然为阴性, 其余阳性并样的检测值均低于平均值, 差异幅度在 14%~61%范围。总体来说, 在 31 个循环的检测灵敏度区间, 海阳和潍坊的 5 : 1~150 : 1 并样的定量检测结果与单个样品的平均值的比值在(0.27±0.28)~(2.83±0.08)范围内, 平均为(1.26±0.78), 说明各种并样模式所得的定量检测结果在数量级水平能大致反映样品的平均 EHP 载量。

2.3.2 并样的 EHP 载量的定量检测值与并样组已知量的相关性 分析并样的 EHP 载量的定量检测值的对数(LgD)与并样组根据单一样品计算得到的已知量的对数(LgK)的关系(图 1), 结果显示, 二者呈线性关系($R=0.9741$), 相关性极显著($P=2.64 \times 10^{-19}$), $LgD=(1.055 \pm 0.028)LgK-(0.153 \pm 0.095)$ 。

3 讨论

2017 年国家虾蟹产业技术体系开展的被动监测结果显示, 虾肝肠胞虫(EHP)已在中国虾类主要养殖区广泛分布, 在山东、河北、江苏、上海、浙江、福建、广东、海南和新疆均有不同程度地检出。EHP 感染引起的肝胰腺微孢子虫病(HPM)是近年来养殖对虾经常发生生长缓慢的主要原因, 对虾肝胰腺中 EHP 的载量在 10^3 copies/ng HpDNA 以上时, 代表了较高的风险(刘珍等, 2016), 而且体长相同时, EHP 阳性群体的平均体重比阴性群体低 30%, 个体大小和体重差异显著增加(刘雅梅等, 2017)。由于 EHP 感染

表 3 不同并样模式的阳性率
Tab.3 The positive rates under different pooling modes

并样方式 Pooling mode	并样已知阳性率 Known positive rate		并样测试阳性率 Detected positive rate	
	海洋样品	潍坊样品	海洋样品	潍坊样品
	Haiyang samples	Weifang samples	Haiyang samples	Weifang samples
1 : 1	12.9% (103/800)	21.5% (517/2400)	–	–
5 : 1	40.0% (64/160)	27.5% (132/480)	30.0% (48/160)	23.1% (111/480)
25 : 1	50.0% (16/32)	30.2% (29/96)	34.4% (11/32)	27.1% (26/96)
50 : 1	56.3% (9/16)	31.3% (15/48)	ND	27.1% (13/48)
100 : 1	–	62.5% (30/48)	–	45.8% (22/48)
150 : 1	–	93.8% (15/16)	–	68.8% (11/16)

注: 并样已知阳性率为并样已知阳性组数/并样总样品组数, 样品的分组按并样组合进行, 组内有 1 个以上样品检出阳性, 则该组为并样已知阳性; 并样测试阳性率为实验测试的阳性并样数/总并样数。ND: 未测试; –: 不存在或无法计算, 下同

Note: Known positive rate is the ratio of known number of positive groups of pooled samples to the number of all sample groups of pooled samples. Pooled samples was grouped according to the combination of samples to be pooled. Known positive groups are the number of groups with at least one positive sample in the group. Detected positive rate of pooled samples is detected number of pooled positives to the number of pooled samples. ND: Not detected; –: Not exist or unable to calculate, the same as below

表 4 不同阳性率的并样的已知/检测的阴性和阳性数比较
Tab.4 Comparison of known and detected negative or positive numbers of pooled samples with different positive rate of single sample in pooled group

并样组内阳性率 Inner positive rate of pooling group	不同并样的已知数/检测数 Ratio of known number to detected number by different pooling				
	5 : 1	25 : 1	50 : 1	100 : 1	150 : 1
Negative (0%)	444/469	83/92	33/35	18/26	1/5
0.1%~10.0%	–	3/0	1/0	6/0	3/0
10.1%~20.0%	45/23	8/2	2/1	2/0	2/1
20.1%~30.0%	–	1/1	0/0	2/2	3/3
30.1%~40.0%	45/42	12/12	1/1	4/4	7/7
40.1%~50.0%	–	0/0	1/1	16/16	0/0
50.1%~60.0%	14/14	2/2	0/0	0/0	0/0
60.1%~70.0%	–	2/2	1/1	0/0	0/0
70.1%~80.0%	17/17	1/1	1/1	0/0	0/0
80.1%~90.0%	–	2/2	1/1	0/0	0/0
90.1%~100.0%	75/75	14/14	7/7	0/0	0/0

注: 并样组内阳性率为并样组中的单样品的阳性率, 0%阳性率的数据为并样组已知/检测的阴性组数, 0.1%~100.0%的数据均为并样组已知/检测的阳性组数

Note: The inner positive rate of pooling group means the positive rate of individuals in a pooling group. The numbers in the row of 0.0% are known numbers/detected numbers of negative groups of the pooling groups. The numbers in rows of 0.1%~100.0% are known numbers/detected numbers of positive groups of the pooling groups

还没有有效的防治药物, 苗种产地检疫工作中进行该病原的定性或定量检测, 对于该病的预防具有重要意义。本研究对采集的 2 个群体的样品进行逐尾检测, 海阳群体采样的阳性率为 36%; 而潍坊群体前 2 次采样共计 100 尾稚虾, 经 31 个循环的扩增均未检出阳性, 表明早期采样可能遇到阳性率很低的情况, 需要进行大样本量的采样和检测。PCR 检测的成本可达 40~200 元/反应, 在认证实验室开展检测的成本可能

更高, 养殖场对大样本量的逐尾检测从成本来说显然是无法承受的, 因此, 并样检测通常是产业唯一能接受的检测方式。

在大量样本中检出很少的阳性对于检测方案是个挑战。在阳性率低的情况下, 并样检测随着混合样本数的增加, 样本中阳性靶标会被稀释, 这就需要检测方法具有很高的灵敏性和特异性(顾卫东, 1998; Arnold *et al*, 2009)。中国水产科学研究院黄海水产研

表5 低阳性率的并样检测分析
Tab.5 Detection of pooled samples with low positive rate

阳性数/总数 Positives/Total	阳性率 Positive rate	5 : 1		25 : 1		50 : 1		100 : 1		150 : 1	
		K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T
1/25	4.0%	1/5	0/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
2/25	8.0%	2/5	0/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
3/25	12.0%	4/10	2/10	2/2	0/2	-	-	-	-	-	-
4/25	16.0%	4/5	1/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
2/150	1.3%	2/30	0/30	1/6	0/6	1/3	0/3	2/3	0/3	1/1	0/1
6/150	4.0%	5/30	3/30	2/6	0/6	1/3	0/3	2/3	0/3	1/1	0/1
10/150	6.7%	6/30	5/30	2/6	1/6	1/3	1/3	2/3	0/3	1/1	0/1
17/150	11.3%	9/30	6/30	2/6	2/6	1/3	1/3	2/3	0/3	1/1	0/1

注：阳性数/总数为最终并样组的阳性个体数量和总个体数量之比，前4行为海阳样品，后4行为潍坊样品；K/T：已知阳性并样数/总并样数；D/T：检测到的阳性并样数/总并样数

Note: Positives/Total is the ratio of the number of positive individuals to the number of total individuals in the final pooling group. The above 4 rows are data of Haiyang samples, and the below 4 rows are data of Weifang samples. K/T: Ratio of known positive pooled sample / total pooled sample. D/T: Ratio of detected positive pooled sample / total pooled sample

表6 不同并样模式的诊断灵敏度和诊断特异性
Tab.6 Diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of different pooling modes

并样模式 Pooling mode	真阳性 TP	真阴性 TN	假阳性 FP	假阴性 FN	诊断灵敏度 DSe(%)	诊断特异性 DSp(%)
5 : 1	171	442	2	25	87.2	99.5
25 : 1	36	82	1	9	80.0	98.8
50 : 1	13	33	0	2	86.7	100.0
100 : 1	22	18	0	8	73.3	100.0
150 : 1	11	1	0	4	73.3	100.0

注：诊断灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性)；诊断特异性=真阴性/(真阴性+假阳性)

Note: DSe = TP/(TP+FN); DSp = TN/(TN+FP); TP: True positive; TN: True negative; FP: False positive; FN: False negative; DSe: Diagnostic sensitivity; DSp: Diagnostic specificity

表7 海阳样品2种检测结果的比较
Tab.7 The comparison of two kinds of test results of samples from Haiyang

编号 Code	样品平均值 Mean of pooled samples (copies/ng)	并样检测值 Detected value of pooled samples (copies/ng)	差值 Difference (copies/ng)	变异系数 Variable coefficient (%)
H5P01	$(6.48 \pm 0.80) \times 10^2$	$(1.22 \pm 0.99) \times 10^3$	$(5.71 \pm 10.7) \times 10^2$	88.3±179.1
H5P02	$(1.18 \pm 0.03) \times 10^2$	$(9.70 \pm 1.70) \times 10^1$	$-(2.07 \pm 2.0) \times 10^1$	-(17.8±31.2)
H5P03	$(4.73 \pm 0.34) \times 10^1$	$(6.06 \pm 0.77) \times 10^1$	$(1.33 \pm 1.11) \times 10^1$	28.1±49.0
H5P04	$(4.72 \pm 1.32) \times 10^1$	$(7.17 \pm 0.41) \times 10^1$	$(2.43 \pm 1.73) \times 10^1$	51.9±90.5
H5P05	$(4.31 \pm 0.34) \times 10^2$	$(6.11 \pm 0.89) \times 10^2$	$(1.80 \pm 1.23) \times 10^2$	41.8±47.4
H5P06	$(4.51 \pm 0.46) \times 10^1$	$(4.14 \pm 0.54) \times 10^1$	$-(3.76 \pm 10.0) \times 10^0$	-(8.2±146.5)
H5P07	$(5.73 \pm 0.54) \times 10^1$	$(5.25 \pm 0.35) \times 10^1$	$-(4.87 \pm 8.90) \times 10^0$	-(8.4±128)
H5P08	$(6.10 \pm 0.41) \times 10^1$	$(4.46 \pm 0.91) \times 10^1$	$-(1.64 \pm 1.32) \times 10^1$	-(26.9±46.6)
H5P09	$(1.56 \pm 0.16) \times 10^2$	$(9.96 \pm 0.78) \times 10^1$	$-(5.65 \pm 2.38) \times 10^1$	-(36.2±43.6)
H5P10	$(1.36 \pm 0.25) \times 10^2$	$(6.77 \pm 1.50) \times 10^1$	$-(6.80 \pm 4.00) \times 10^1$	-(50.2±66.0)
H25P01	$(2.58 \pm 0.27) \times 10^2$	$(3.42 \pm 0.23) \times 10^2$	$(8.35 \pm 5.00) \times 10^1$	32.6±51.5
H25P02	$(9.11 \pm 1.08) \times 10^1$	$(5.32 \pm 0.80) \times 10^1$	$-(3.79 \pm 1.88) \times 10^1$	-(41.6±49.1)
W5P01~W5P16	0	0	0	-
W5P17	0	$(2.35 \pm 1.21) \times 10^1$	$(2.35 \pm 1.21) \times 10^1$	-

续表 7

编号 Code	样品平均值 Mean of pooled samples (copies/ng)	并样检测值 Detected value of pooled samples (copies/ng)	差值 Difference (copies/ng)	变异系数 Variable coefficient
W5P18~W5P20	0	0	0	-
W5P21	$(1.48 \pm 0.31) \times 10^4$	$(2.81 \pm 0.37) \times 10^4$	$(1.33 \pm 0.68) \times 10^4$	89.9±69.3
W5P22	$(6.17 \pm 0.24) \times 10^3$	$(6.76 \pm 1.57) \times 10^3$	$(5.95 \pm 18.10) \times 10^2$	9.6±70.0
W5P23	$(2.00 \pm 0.17) \times 10^4$	$(4.58 \pm 0.36) \times 10^4$	$(2.58 \pm 0.53) \times 10^4$	129.0±33.0
W5P24	$(1.73 \pm 0.16) \times 10^4$	$(3.01 \pm 0.59) \times 10^4$	$(1.28 \pm 0.75) \times 10^4$	74.0±55.9
W5P25	$(4.81 \pm 0.16) \times 10^3$	$(6.54 \pm 1.05) \times 10^3$	$(1.73 \pm 1.21) \times 10^3$	36.0±34.4
W5P26	$(2.67 \pm 0.43) \times 10^3$	$(6.31 \pm 0.84) \times 10^3$	$(3.64 \pm 1.27) \times 10^3$	136.3±59.4
W5P27	$(2.80 \pm 0.26) \times 10^4$	$(7.71 \pm 1.27) \times 10^4$	$(4.91 \pm 1.53) \times 10^4$	175.4±59.9
W5P28	$(7.90 \pm 0.53) \times 10^3$	$(2.12 \pm 0.21) \times 10^3$	$-(5.78 \pm 0.74) \times 10^3$	-(73.2±18.5)
W5P29	$(4.14 \pm 0.36) \times 10^3$	$(1.17 \pm 0.02) \times 10^4$	$(7.56 \pm 0.56) \times 10^3$	182.6±18.3
W5P30	$(3.71 \pm 0.22) \times 10^4$	$(7.08 \pm 0.27) \times 10^4$	$(3.37 \pm 0.49) \times 10^4$	90.8±19.7
W25P01~W25P02	0	0	0	-
W25P03	0	$(1.54 \pm 0.85) \times 10^1$	$(1.54 \pm 0.85) \times 10^1$	-
W25P04	0	0	0	-
W25P05	$(1.26 \pm 0.14) \times 10^4$	$(6.30 \pm 0.41) \times 10^3$	$-(6.31 \pm 1.81) \times 10^3$	-(50.0±36.6)
W25P06	$(1.60 \pm 0.12) \times 10^4$	$(1.52 \pm 0.03) \times 10^4$	$-(7.53 \pm 15.0) \times 10^2$	-(5.0±159.4)
W50P01~W50P02	0	0	0	-
W50P03	$(1.43 \pm 0.13) \times 10^4$	$(1.16 \pm 0.40) \times 10^4$	$-(2.68 \pm 5.30) \times 10^3$	-(18.9±85.2)
W100P01	0	0	0	-
W100P02	$(7.14 \pm 0.65) \times 10^3$	$(6.13 \pm 2.05) \times 10^3$	$-(1.01 \pm 2.70) \times 10^3$	-(14.1±102.2)
W100P03	$(7.14 \pm 0.65) \times 10^3$	$(2.81 \pm 0.32) \times 10^3$	$-(4.33 \pm 0.97) \times 10^3$	-(60.6±28.6)
W150P01	$(4.76 \pm 0.43) \times 10^3$	$(3.49 \pm 0.86) \times 10^3$	$-(1.27 \pm 1.29) \times 10^3$	-(26.7±61.0)

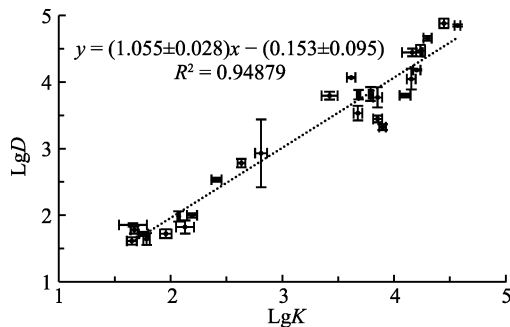


图 1 并样的 EHP 载量的定量检测值与并样组已知量的相关性

Fig.1 The correlation between of the detected amounts and the known amounts of EHP in pooling groups

LgK: 根据单样品检测求出的并样组 EHP 量的对数;

LgD: 检测到的并样组 EHP 量的对数

LgK: The logarithmic of EHP amount of the pooled samples calculated from the data of single samples;

LgD: The logarithmic of EHP amount of the pooled samples directly detected

究所海水养殖病害防控与分子病理学实验室建立的 EHP 的 TaqMan 探针 qPCR 方法,比套式 PCR 和 SYBR

Green qPCR 方法有更高的灵敏性和特异性(Liu *et al*, 2018)。在此基础上,本研究用海阳和潍坊养殖场采集的凡纳滨对虾样品分别进行 5 : 1、25 : 1、50 : 1、100 : 1 和 150 : 1 并样检测。由于并样率越高,样本越低,为了避免使用大量单个个体在高比例并样时数据量过低使结果难以统计比较,本研究采用了设定不同临界循环数的假定灵敏度的方式对 qPCR 定量结果进行定性分析的方法,从而使每个样品的 1 次 qPCR 的定量结果能产生 16 个可定性分析的数据,模拟了样品中存在高于和低于临界目标核酸量时所产生的多种组合状态。

对并样阳性率的分析表明,并样率越高,并样检测所得到的阳性率也越高。推算单样本感染率均值(r)可以通过并样数(n)和并样阳性率(r_p),经公式 $r=1-(1-r_p)^{1/n}$ 估测,方差(v)通过公式 $v=[r_p(1-r_p)^{(2/n-1)}]/(n^2 T)$ 计算,其中, T 为样品总数(Kline *et al*, 1989; 顾卫东, 1998),上述关系对于较高阳性率或较高并样率的情况误差很大,用本研究中海阳和潍坊的 5 : 1 并样的已知阳性率推算的单样本感染率与实际数据的差异系数达 25%~71%。从本研究的数据

来看,并样的阳性率符合“较低并样率的阳性率 \leq 较高并样率的阳性率 \leq 较低并样率的阳性率 \times 较高并样率/较低并样率”的关系。

对 EHP 的并样检测来说,更重要的结果是得出采样群体内是否有阳性存在。群体中流行率越高,所需的采样率越低(Ossiander *et al*, 1973)。本研究的定性分析揭示,样品个体阳性率 $>20\%$ 时,5:1~150:1的各并样组检测到的阳性率与已知情况完全一致;但在样品中个体阳性率 $<20\%$ 时,并样检测结果会出现差异。在潍坊样品中,阳性率 $\leq 10/150$ 时,100:1~150:1并样均无法有效检出阳性,但50:1以下的并样有较稳定的检出;阳性率 $\leq 6/150$ 时,25:1以上的并样均无法检出阳性;阳性率 $\leq 2/150$ 时,所有并样均无法检出阳性。在海阳的样品中,阳性率 $\leq 4/25$ 时,25:1的并样无法有效检出阳性,阳性率 $\leq 2/25$ 时,5:1以上的并样均无法检出阳性。考虑到不同流行率所需的采样率(Ossiander *et al*, 1973),由上述情况推测,如果1个群体只进行1个检测反应,则最灵敏的情况只能检出群体中7%以上的阳性率,应采集50尾样品合并为1个并样检测;而如果该群体的平均EHP载量在 10^2 copies/ng HpDNA的水平,则可能只能检出16%以上的阳性,应采集25尾对虾合并为1个并样检测。Muñoz-Zanzi等(2000)通过成本分析表明,对牛群的并样检测的最低成本与并样率和疫病流行率有关,流行率在0.5%~3.0%范围内,最低成本的并样率在15:1~6:1范围。

前人数多数采用数理统计计算对并样开展研究。在并样检测灵敏度和特异性方面,滕海英等(2011)研究了给定灵敏度和特异性下并样方法对提高总阳性率的估计精度的作用。Muñoz-Zanzi等(2006)对影响并样检测的灵敏度和特异性的流行率、并样率、感染动物的病原浓度和检测方法的检测限等参数进行了推演。本研究则结合实际检测数据,统计假定灵敏度下所得出的已知阳性、已知阴性、检测阳性和检测阴性的数量,根据OIE诊断方法验证标准(OIE, 2017)计算出各并样模式下的诊断灵敏度和诊断特异性。结果表明,无论哪种并样模式均有很好的诊断特异性;而诊断灵敏度在5:1~50:1并样率下均不低于80%,5:1和50:1的诊断灵敏度十分接近,但100:1~150:1的诊断灵敏度有明显下降。从这一分析来看,OIE标准和美国标准规定并样不超过5个个体的要求(OIE, 2017; FHS, 2014),在多数情况下可以考虑扩展到50个个体。

EHP感染的风险与其载量有较强的关系(刘珍等, 2016),定量分析对于EHP检测具有重要意义。本研

究观察到并样检测的定量结果与单一个体检测的平均值具有极显著相关性($P=2.64\times 10^{-19}$),测定值与个体平均值的比在0.27~2.29范围,处于同一数量级,可以为群体量的测定提供参考。

综上所述,通过基于TaqMan qPCR的EHP检测的并样分析,在定性上国际标准中推荐的5:1并样检测方式可以扩展到50:1的检测方式,可为群体中存在7%以上的感染率提供兼顾准确性和低成本的检测方案,其诊断特异性和诊断灵敏度与5:1并样检测接近,可以缩短检测时间,节省检测费用。更低感染率的检测应通过增加检测反应数量实现,简单提高并样率反而会降低有效检测的能力;并样检测的定量结果能用于群体感染载量水平的粗略评估。并样检测评估为水生动物疫病诊断和流行病学调查提供了参考依据。

参 考 文 献

- Arnold ME, Mueller-Doblies D, Carrique-Mas JJ, *et al*. The estimation of pooled-sample sensitivity for detection of *Salmonella* in turkey flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 936–943
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al*. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89–96
- FHS. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. *American Fisheries Society*, 2014, <http://www.afs-fhs.org/bluebook/bluebook-index.php>
- Gu WD. Estimation of vector prevalence by using pool sampling. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 1998, 16(1): 29–33 [顾卫东. 混合样本方法估测媒介感染率. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16(1): 29–33]
- Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, *et al*. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(7): 1449–1452
- Liu YM, Qiu L, Cheng DY, *et al*. The relationship of body length and weight in the *Litopenaeus vannamei* populations detected *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 96–103]
- Liu YM, Qiu L, Sheng AZ, *et al*. Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 151:

- 191–196
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Muñoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, *et al.* Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhea virus persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(3): 195–203
- Muñoz-Zanzi C, Thurmond M, Hietala S, *et al.* Factors affecting sensitivity and specificity of pooled-sample testing for diagnosis of low prevalence infections. *Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 74(4): 309–322
- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 2017, <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
- Ossiander FJ, Wedemeyer G. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1973, 30(9): 1383–1384
- Rovira A, Cano JP, Muñoz-Zanzi C. Feasibility of pooled-sample testing for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies on serum samples by ELISA. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1): 60–68
- Suebsing R, Prombun P, Srisala J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*, in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1254–1263
- Tangprasitipap A, Srisala J, Chouwdee S, *et al.* The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinary Research*, 2013, 9(1): 139
- Teng HY, Zhang LM, Sun QW, *et al.* Pooled sampling method under given sensitivity and specificity in improving accuracy of point estimator of population rate. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2011, 32(1): 72–75 [滕海英, 张罗漫, 孙庆文, 等. 给定灵敏度和特异度下混合样本方法对提高总体率点估计精度的作用. *第二军医大学学报*, 2011, 32(1): 72–75]
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *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*, 2009, 102(1): 21–29
- Williams CJ, Moffitt CM. A critique of methods of sampling and reporting pathogens in populations of fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2001, 13(4): 300–309

(编辑 马瑾艳)

Evaluation on the Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Pooled DNA Samples of *Litopenaeus vannamei* Based on TaqMan qPCR

SONG Zenglei^{1,2}, DONG Xuan², ZHAO Ruoheng³, WANG Xiuhua²,
WU Heying^{1,2}, YU Danghui^{1,2}, XIE Guosi², HUANG Jie^{1,2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306. 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Two populations of *Litopenaeus vannamei* from Haiyang and Weifang in Shandong Province were sampled. TaqMan qPCR was used to measure *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in the shrimp hepatopancreas one by one, and then the extracted DNA samples were pooled by 5-pool (5 : 1), 25-pool (25 : 1), 50-pool (50 : 1), 100-pool (100 : 1), and 150-pool (150 : 1) to test the EHP in the pooled samples. The amplification used a special threshold cycle value (C_t) of samples lower/higher than an assumed critical cycle value (C_a), differentiated as an analyzed positive/negative ratio in the single sample test and pooled sample test. The relationship between different pooling modes and the analyzed positive rate, diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, and quantitative accuracy were compared. The results showed that the detection for high pooling rate samples could be reduced in very low analytic sensitivity. When the positive rate of individuals in the pooled samples was above 30%, the detection results of the high pooling rate were consistent with that of the single sample detection. If the positive rate of individuals with heavy infections in the pooled sample were not less than 6.7%, satisfying results could be obtained in the sample with a pooling rate below 50 : 1; while the positive rate of individuals with light infections in the pooled sample were not less than 16%, the satisfying result could be obtained in the sample with a pooling rate below 25 : 1. The pooled samples with a positive rate below 1.3% of individuals with heavy infection, or a positive rate below 8% of individuals with light infection, might lead to false negative results in all pooling rates. All of the pooling modes have good diagnostic specificity. The sample with a 50 : 1 pooling rate had a similar diagnostic sensitivity to the sample with a 5 : 1 pooling rate, which is the highest pooling rate recommended by the OIE standard. It had a very significant correlation between the mean of the detected EHP load of pooled sample, and the mean of the known EHP load calculated according to the single sample, with a ratio of 0.27~2.83. The quantitative test results of the pooled samples could roughly reflect the average EHP load of the single sample at the order of magnitude. This study provides a reference for sample detection in aquatic animal disease diagnosis, and epidemiological investigations.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP); qPCR; Pooled sample detection

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn