

顾伟,张秋萍,张莉,等.江苏省中华绒螯蟹螺原体疫病的检测和普查[J].江苏农业科学,2011(1):293-295.

江苏省中华绒螯蟹螺原体疫病的检测和普查

顾伟¹,张秋萍¹,张莉¹,李菲¹,王文¹,陈辉²,邹勇²,吴霆³,华伯仙³

(1 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室/江苏省水生甲壳动物病害重点实验室 江苏南京 210046 2 江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏南京 210036 3 江苏水仙实业有限公司/江苏省宝应县水生动物疫病预防控制中心,江苏宝应 225800)

摘要: 2008—2009年就江苏省范围内的中华绒螯蟹螺原体疫病进行了普查及跟踪检测,结果显示螺原体疫病在全省普遍存在,尤其是苏南的水产养殖重点县(市、区),螺原体疫病连年暴发,普查的60个县(市、区)中,阳性率达22%,随后的跟踪检测阳性率更高,达67%,必须引起高度重视。

关键词: 中华绒螯蟹;螺原体;疫病调查

中图分类号: S945 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2011)01-0293-03

江苏是水产养殖大省,全省水产养殖总面积达到69.13万 hm²,但水产疫病一直是困扰养殖业发展的一大难题,全省每年因水产疫病造成直接经济损失15亿元,而虾、蟹疫病造成的损失近半。其中中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)“颤抖病”是近年来对水产养殖危害最大的流行病,自1994年暴发以来^[1-2],每年都是影响中华绒螯蟹养殖最严重的疾病。江苏省生物多样性与生物技术重点实验室自1998年以来对该病进行了病理学、病原学及流行病学等方面的研究^[3-7],通过柯赫氏法则验证以及分子生物学、细胞生物学及微生物学等技术,证实该病原为螺原体(*Spirillum*)类病原微生物^[8-9]。而近年来,其他经济水生甲壳动物(克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*、南美白对虾 *Penaeus vannamei*等)也相继发生重大流行病,造成大规模的死亡,并有蔓延趋势,给水产养殖业造成巨大经济损失。我们研究发现其病原也为螺原体类微生物^[10-11],而国外学者在海水养殖的南美白对虾中也发现了螺原体病原,并证实是引起大规模死亡的原因^[12]。由此可见,螺原体已经成为严重危害水产的新型病原。

前期的研究显示同一发病养殖池塘中的不同水生甲壳动物(中华绒螯蟹、克氏原螯虾、南美白对虾等)都会被螺原体病原侵染。这种病原对宿主侵染的广谱性在以往的水产疫病流行中是较少见的,因此,我们利用已建立的水生动物螺原体的分离、培养及鉴定诊断技术,结合江苏省水生动物疫病预防控制中心完善的全省水产养殖疫病的监测、防治网络以及江苏水仙实业有限公司的水产养殖资源和条件,开展了螺原体在水产养殖环境的分布情况和流行病学的调查,以明确江苏省水产螺原体病的主要类型、寄主范围及侵染情况等,为今后江苏省及我国水产螺原体疫病的防治提供有价值的信息。

收稿日期:2010-03-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:30771649、30870090);江苏省水产三项工程项目(编号:J2009-43);南京师范大学大学生实践创新训练项目。

作者简介:顾伟(1981—),女,江苏泰州人,硕士,实验师,研究方向为水产动物疾病学。E-mail:skweiq26@sina.com

通信作者:王文,博士,教授,研究方向为水产动物疾病学。Tel:(025)85891955;E-mail:njwuwang@263.net

1 材料与方法

1.1 中华绒螯蟹样本来源

螺原体疫病普查工作在全省范围内展开,结合各地的水产养殖业发展情况及其养殖规模,采样地区及具体样本数见表1,每个样本含中华绒螯蟹30只,重约50 g只。

表1 螺原体疫病普查地区分布情况

地区	县(市、区)及其样本数
常州	溧阳市(2个)、武进区(2个)、金坛市(3个)
淮安	楚州区(1个)、淮阴区(1个)、盱眙县(1个)、洪泽县(1个)、涟水县(1个)、金湖县(2个)
连云港	赣榆县(2个)、灌南县(1个)、东海县(1个)、灌云县(1个)、海州区(1个)、新浦区(1个)、连云区(1个)
南京	高淳县(4个)、江宁区(1个)
南通	海安县(1个)、海门市(1个)、启东市(1个)、通州区(1个)
宿迁	泗阳县(2个)、泗洪县(2个)、沭阳县(2个)、宿豫区(2个)
苏州	太仓市(1个)、相城区(1个)、吴中区(2个)、昆山市(3个)、吴江市(3个)、常熟市(3个)
泰州	靖江市(1个)、姜堰市(2个)、泰兴市(1个)、兴化市(4个)
无锡	宜兴市(3个)、锡山区(1个)、江阴市(1个)
徐州	铜山区(1个)、沛县(1个)、新沂市(1个)、丰县(1个)
盐城	射阳县(1个)、建湖县(1个)、响水县(1个)、阜宁县(1个)、盐都区(1个)、滨海县(1个)、东台市(1个)、大丰市(1个)
扬州	宝应县(8个)、维扬区(1个)、邗江区(1个)、高邮市(4个)、仪征市(1个)
镇江	丹徒区(1个)、丹阳市(1个)、扬中市(1个)、句容市(1个)
合计	县(市、区)总数 60个(样本总数 96个)

1.2 中华绒螯蟹样本处理与检测

1.2.1 主要试剂 10%甲醛溶液用于光镜样本的固定;4%戊二醛溶液用于负染样本的固定;磷酸缓冲液 PBS(100 mL中含2.53%的 NaH₂PO₄·2H₂O、83 mL 2.52%的 NaOH、17 mL H₂O, pH值7.5)螺原体培养基 Heart Infusion Broth(BD公司产品)、水生动物螺原体 ELISA快速检测试剂盒(南京师范大学生命科学学院水产科学研究所研制)、Chelex100(Sigma公司产品)、Taq DNA聚合酶、蛋白酶 K(TaKaRa公司产品)。

1.2.2 样本处理及检测方法 1 mL一次性注射器取中华绒螯蟹血淋巴液,分别与 PBS及 10%甲醛溶液混匀,4℃保存,

肌肉样本 -20℃冻存,待检。对所采样本,利用实验室建立的光镜、电镜观察、分离培养技术、PCR快速检测技术及 ELISA检测试剂盒进行了全面检测。

一次普查采取混样检测的方法,即 1个样本中的 30只中华绒螯蟹血淋巴液混匀用于光镜、电镜、分离培养及 ELISA

检测,肌肉样本混合匀浆用于 PCR检测。一次普查的阳性结果作为二次跟踪取样的依据。二次跟踪取样每个中华绒螯蟹样本 10只,单只进行检测。具体的检测方法及阳性判断依据见表 2。

表 2 试验用检测方法

检测方法	具体操作	阳性依据
光镜	血淋巴液用 2 倍的 10% 甲醛溶液固定,滴片, Nk ^α 50 相差显微镜观察	血细胞形成包涵体,细胞膜外黏附或游离有螺原体微生物
电镜	上述血淋巴的甲醛固定液,负染,日立 H7650 电镜观察	电镜下见典型螺原体微生物
分离培养	血淋巴液加等量 PBS 过 0.22 μm 滤膜,接种 100 μL 滤液至 1 mL R2 培养基, 30℃ 恒温培养,每天观察培养基颜色变化,并取少量菌液滴片, Nk ^α 50 相差显微镜观察	R2 培养基由红变橘黄,澄清无沉淀,光镜下可见典型螺原体微生物
PCR	参考国家发明专利 [13]	
ELISA	参考国家发明专利 [14]	

各组样本经表 2 所示 5 种方法检测,所有结果都吻合的样本确定为阳性,以阳性样本确定螺原体疫病阳性地区。

2 结果与分析

调查结果显示,江苏省水生动物螺原体疫病存在广泛,在全省普查的 60 个县(市、区)中,螺原体疫病阳性率达 22%,尤其是苏南地区,螺原体疫病密集。南京、常州、无锡、镇江等地区,阳性县(市、区)均过半;苏州地区虽然阳性县(市、区)只有昆山和吴中,占全部县(市、区)的 1/3 但昆山取的 3 个样本及吴中的 2 个样本均为强阳性,疫病发生非常集中。

一次普查中的阳性地区,绝大多数在随后的跟踪检测中也为阳性,阳性率为 67%,其中南京、宿迁、苏州、扬州等地高达 100%,其他地区也达到 50%,说明螺原体的疫病发生具有很强的连续性(表 3)。

表 3 2008—2009 年江苏省螺原体疫病普查情况

地区	普查(2008 年 6—7 月)			跟踪(2008 年 8 月至 2009 年 7 月)			报道文献
	县(市、区)阳性数 数(个)	阳性率 (%)	县(市、区)阳性数 数(个)	阳性率 (%)	县(市、区)阳性数 数(个)	阳性率 (%)	
常州*	3	2	67	2	1	50	[15—16]
淮安	6	0	0				[17]
连云港	7	0	0				
南京*	2	2	100	1	1	100	
南通	4	0	0				[18]
宿迁*	4	1	25	1	1	100	[3—4]
苏州*	6	2	33	2	2	100	[18—20]
泰州	4	0	0				
无锡*	3	2	67	2	1	50	
徐州	4	1	25	1	0	0	
盐城	8	0	0				
扬州*	5	1	20	1	1	100	[15—16]
镇江*	4	2	50	2	1	50	
合计	60	13	22	12	8	67	

注: * 表示实验室已分离并保存有该地中华绒螯蟹螺原体菌株。

结合有关中华绒螯蟹“颤抖病”暴发的有关研究文献资料,我们发现,以往大规模暴发过中华绒螯蟹“颤抖病”的地区在这次的螺原体疫病普查中检测多数呈阳性,而宝应、金坛、高淳、昆山等地螺原体疫病则是连年发生(图 1)养殖户损失惨重。



图 1 江苏省中华绒螯蟹螺原体疫病分布情况

3 讨论

中华绒螯蟹“颤抖病”报道初期,尽管流行病学的调查和研究尚不完善,病原生物学的研究也还不很透彻,但关于“颤抖病”防治的方法却很多,不同研究者根据所持的不同病原观点提出了一系列的防治措施[21—26]。各类防治方法虽然是基于不同的病原观点提出的,均对疾病产生的 3 个要素(环境、病原、机体)给予重视,不同程度地采用了综合性防治,各类预防措施中所采取的药物彻底清塘(消灭环境中残留的病原和病原携带者)和改良养殖环境为主的生态防病,对于一些中华绒螯蟹“颤抖病”高发区的发病率的降低确实起了一定的作用,然而这些预防措施是所有水产疫病防治的基本原则,并不是有针对性的预防中华绒螯蟹“颤抖病”。经过几年的生产实践检验,对于中华绒螯蟹的“颤抖病”的防治多数没

有效果或效果不好, 中华绒螯蟹“颤抖病”仍然是连年发生, 并且殃及其他水产养殖品种, 与患病中华绒螯蟹同塘或是附近塘养殖的虾类也暴发大规模的疫病^[10], 并呈现蔓延之势, 究其原因, 主要是防治措施并没有真正地对症下药。中华绒螯蟹体内以及养殖水体中微生物的多样性以及螺原体微生物的小体积(类似病毒, 可以滤过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜)和其形态的多变性^[9]可能是“颤抖病”病原难以确定的主要原因。病原学、病理学、流行病学研究及跟踪取样工作的缺乏, 很可能是导致研究者的研究结论存在一定的地区局限性的原因, 另外, 对“颤抖病”定义的模糊也对研究者研究其确切病原造成了一定影响。因此, 我们建议将中华绒螯蟹“颤抖病”命名为中华绒螯蟹螺原体病。因为当一种疫病的病原和病因确定后, 应该以病原来命名疫病而不是以病症来命名。

中华绒螯蟹螺原体疫病的连年暴发与其病原的特异性是密不可分的。对中华绒螯蟹螺原体的生物学特性研究表明, 该螺原体对 pH 值、温度及盐度的强耐受性在螺原体中是很少见的^[12], 说明该螺原体在自然环境中具备寄生的广泛性, 实际的疫病普查结果也证实了这一点。螺原体能在人工培养基上生长繁殖, 在自然环境中也可以脱离活体存在。我们在“颤抖病”发病池塘的底泥中检测到有少量的螺原体^[28], 螺原体能在池塘底泥中存活, 且低温对其致死效应很小, 而中华绒螯蟹为底栖动物, 也为螺原体的侵染提供有利条件, 使得“颤抖病”多年连续暴发成为可能。

我们在养殖试验过程中发现, 河蟹养殖塘螺原体病害的发生与养殖密度高低没有直接联系, 而基于该病原特殊的生物学性质, 其病害发生与养殖塘有无“颤抖病”病史密切相关, 即养殖塘曾经暴发过“颤抖病”, 塘中残留有螺原体病原, 则该塘口再次发生螺原体病害的概率很大。

在确定了病原后, 针对该螺原体病原进行了一系列体外体内的敏感药物筛选^[129], 药敏试验发现, 该螺原体对绝大多数的渔业常规中西药物均不敏感, 这也就很好地解释了现有的药物防治方法不能有效防治螺原体疫病, 更不能彻底消灭螺原体疫病。研究发现, 从清塘、养殖环境、苗种检疫和饲料等方面进行全面排查、把关, 能有效控制原发性病原的发生, 并能初步建立螺原体疫病的检测及综合防治体系。本次的流行病学调查研究对有针对性的水产螺原体疫病的防控提供了有价值的信息, 普查结果进一步确定了螺原体疫病在江苏省范围内的分布情况, 在此基础上, 可以有的放矢地采取防治措施, 将建立的螺原体疫病防治技术进行推广应用, 以实现全省中华绒螯蟹的健康养殖。

参考文献

- [1] 潘连德. 养殖河蟹“抖抖病”的病原检验与病理学初步研究[J]. 水产科技情报, 1998 25(6): 273—277
- [2] 魏泽能. 河蟹颤抖病的流行病学调查[J]. 淡水渔业, 1999 29(7): 16—17.
- [3] 顾志峰, 王 文, 杜开和, 等. 中华绒螯蟹“颤抖病”病原、病理学初步研究[J]. 湖泊科学, 2000 12(4): 367—372
- [4] 王 文, 顾志峰, 朱宁宁, 等. 患颤抖病中华绒螯蟹体内类立克次体侵染的光镜和电镜观察[J]. 中国水产科学, 2001 8(4): 32—35
- [5] 王 文, 朱宁宁, 李正荣, 等. 类立克次体(RLO)侵染中华绒螯蟹神经组织的光镜和电镜观察[J]. 动物学研究, 2001(6): 24—28
- [6] Wang W, Gu Z F. Rickettsia-like organism associated with tumor disease and mortality of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Dis Aquat Organ, 2002 2: 149—153
- [7] Wang W, Zhu N N, Gu Z F, et al. Study on the transmission of tumor disease(TD) in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda) [J]. J Invertebr Pathol, 2002 81(3): 202—204
- [8] Wang W, Rong L W, Gu W, et al. A Spiroplasma associated with tumor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Microbiology, 2004 150: 3035—3040.
- [9] Wang W, Wen B H, Gasparich G E, et al. Morphology of Spiroplasma in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tumor disease[J]. Res Microbiol, 2004 155(8): 630—635
- [10] Wang W, Gu W, Ding Z F, et al. A novel Spiroplasma pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in China [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005 249: 131—137
- [11] Bi K, Huang H, Gu W, et al. Phylogenetic analysis of Spiroplasma from three freshwater crustaceans (*Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkii* and *Penaeus vannamei*) in China [J]. J Invertebr Pathol, 2008 99: 57—65
- [12] Nuan L M, Li S H, Mer D V, Oduor M A, et al. Gasparich Spiroplasma *Penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei* Pacific white shrimp [J]. JSEM, 2005 55: 2317—2322
- [13] 王 文, 丁正峰, 顾 伟. 螺原体病原微生物的 PCR 快速检测技术[J]. 中国, ZL200510041005. X 号, 2006—02—15.
- [14] 王 文, 王俊海, 黄 桦, 等. 一种检测水生动物螺原体的酶联免疫试剂盒: 中国, CN101105494A 号, 2008—01—16
- [15] 孙学强, 郭爱珍, 陆承平. 中华绒螯蟹颤抖病的人工复制试验[J]. 南京农业大学学报, 2000 23(1): 74—76
- [16] 孙学强, 陆承平. 河蟹颤抖病病毒的分离纯化及其动物致病性试验[J]. 中国病毒学, 2002 17(2): 185—188
- [17] 何介华, 贺 路, 曾令兵, 等. 中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究[J]. 淡水渔业, 1999 29(3): 10—11.
- [18] 魏育红, 薛仁宇, 贡成良, 等. 呼肠弧病毒引起河蟹颤抖病的人工感染与药物防治研究[J]. 内陆水产, 2001(4): 9—10.
- [19] 陆宏达, 金丽华, 薛 美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999 23(1): 61—68
- [20] 陆宏达, 范丽萍, 薛 美. 中华绒螯蟹细菌性病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 1999 23(4): 381—386
- [21] 赵新伟, 陈焕报. 河蟹“颤抖病”及其预防技术[J]. 水产养殖, 1999(4): 29
- [22] 黄琪琰, 金丽华, 陆宏达, 等. 河蟹颤抖病的防治[J]. 中国水产, 2000(1): 34—36
- [23] 江 河. 河蟹颤抖病的综合防治技术[J]. 齐鲁渔业, 2004 21(7): 28—29
- [24] 祝仁堡. 池塘养蟹颤抖病的防治方法[J]. 中国水产, 2004(2): 51—52
- [25] 薛仁宇, 曹广力, 魏育红, 等. 细菌性“颤抖病”病原的体外中药药敏试验[J]. 水利渔业, 2002 22(2): 39—41.
- [26] 方 敏, 宋林生, 崔朝霞. 中华绒螯蟹颤抖病研究进展[J]. 海洋科学, 2005 29(1): 64—66
- [27] 顾 伟. 中华绒螯蟹颤抖病病原体的生物学特性[D]. 南京: 南京师范大学, 2006: 26—28
- [28] Ding Z F, Bi K, Wu T, et al. A simple PCR method for the detection of pathogenic Spiroplasma in crustaceans and environmental samples [J]. Aquaculture, 2007 265 (1/2/3/4): 49—54
- [29] 吴 霆, 顾 伟, 王 文. 中华绒螯蟹颤抖病药物治疗的初步研究[J]. 水产科学, 2008(7): 325—329.