

# 虾蟹新型病原螺原体的发现和研究

王 文<sup>1,2</sup>

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

(2.江苏省水生甲壳动物病害重点实验室,江苏 南京 210023)

**[摘要]** 螺原体是一种个体极小、形态多变、没有细胞壁的非特殊细菌,它们 20 世纪 70 年代首次在植物和昆虫体内发现,有些是农作物(玉米、柑橘等)和有益昆虫(蜜蜂)的致病菌。从患有“颤抖病”的中华绒螯蟹(俗称河蟹)中分离到的螺原体是首次从水生甲壳动物中发现的新型病原,命名为中华绒螯蟹螺原体(*Spiroplasma eriocheiris* sp. Nov),它是“颤抖病”的致病菌。这一发现将人们对螺原体的分布由陆地扩大到水域。除河蟹外,螺原体对其他经济水生甲壳动物也具有广泛的侵染性,如克氏原螯虾(俗称小龙虾)、凡纳滨对虾(南美白对虾)、罗氏沼虾、日本沼虾(俗称青虾)中也相继发现了螺原体。经分子生物学、免疫学分析、交叉感染实验以及超微病理学特征比较等方面的研究,最终确定这些不同宿主来源的螺原体与引起河蟹“颤抖病”的螺原体为同一种类,表明该种螺原体可以在不同的水生甲壳动物物种之间进行交叉感染和传播。为了有效防控螺原体引起的虾蟹疫病,不仅需要开展病原的生物学特性和其致病机理的研究,而且需要建立一个从快速诊断到实时监控再到有效防治的综合防控技术,本综述对这一新型虾蟹病原的基础研究和应用技术方面的研究进行归纳总结。

**[关键词]** 经济水生甲壳动物(虾蟹),螺原体,致病菌,疫病防控

**[中图分类号]** Q958 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2016)01-0001-13

## Discovery and Studies of a Novel Pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in Economically Important Species of Crustaceans

Wang Wen<sup>1,2</sup>

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Spiroplasma is a tiny microorganism, with polymorphism and without cell wall. It was found in plants and insects in the 1970s to be a kind of pathogen of crops (corn or citrus) and beneficial insect such as bee. The spiroplasma isolated from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) with tremor disease has been verified to be a causative agent and it is the first spiroplasma found in aquatic crustaceans, which is nominated as novel spiroplasma species *Spiroplasma eriocheiris* sp. Nov. This discovery has extended people's view of spiroplasmas distributions from land terrene to water area. Besides *Eriocheir sinensis*, spiroplasmas are also infective to other aquatic crustaceans such as *Procambarus clarkia*, *Penaeus vannamei*, *Macrobrachium rosenbergii* and *Macrobrachium nipponensis*. All of the spiroplasmas isolated from above crustaceans are proved to be the same species as *Spiroplasma eriocheiris* with methods of molecular biology, immunology, cross infection and ultrastructural pathology. This indicates that spiroplasma pathogen can transmit among the different kinds of crustaceans. In order to prevention and control the disease of economic cultured crustaceans infected by spiroplasma, a comprehensive control technique from rapid diagnosis to real time protection should be established. This review sums up the fundamental and applied studies on this novel pathogen.

**Key words:** economically important species of crustaceans, spiroplasma, pathogen, prevention and control of diseases

收稿日期: 2015-11-16.

基金项目: 国家自然科学基金(30371118、30771649、30870090、31170120、31272686)、江苏省科技攻关项目(BE2007343)、江苏省农业三项工程项目(J2009-43)、江苏省水产三项工程项目(PJ2011-65).

通讯联系人: 王文, 教授, 博导, 研究方向: 水生动物疾病学、病原微生物学. E-mail: wenwang@njnu.edu.cn

经济水生甲壳动物(虾蟹)是我国水产养殖动物,也是出口创汇的重要水产养殖品种,每年仅江苏省虾蟹的产值就达 600 多亿元。但是,水产病害尤其是新型水产病原引起的病害,一直困扰着虾蟹产业可持续发展。据国家质检总局报道,每年我国经济水生甲壳类病害造成的直接经济损失约为 70 亿元。中华绒螯蟹(俗称河蟹)“颤抖病”是上世纪 90 年代出现的一种危害极大的水产病害,由于发病后期河蟹出现附肢颤抖症状故取名“颤抖病”,因为病蟹附肢环起也称“环爪病”(图 1)。该病发病率 30%~70%,死亡率近 100%,给河蟹养殖业带来巨大损失<sup>[1]</sup>,2008 年农业部已将该病列为新修订的“动物疫病病种名录”中。近十多年的研究表明引起河蟹颤抖病的病原是一种新型的水产病原——螺原体,该病原已在水生甲壳动物中广泛传播,而且分布范围广、危害大,给经济水生甲壳动物养殖业的健康发展带来巨大危害,这也是世界水产病害研究面临的新课题。本综述就该病原的发现、验证、命名及检测和防控等方面的研究做一总结。



图1 患“颤抖病”的河蟹,发病后期附肢颤抖并呈现环爪状  
Fig.1 The diseased crab with tremor disease showing encircled appendage

## 1 河蟹螺原体的发现及命名

### 1.1 河蟹“颤抖病”病原的发现

运用光镜和电镜技术对患有“颤抖病”的河蟹进行组织和细胞病理学研究,发现有一种形态类似于立克次氏体的微生物大量分布在病蟹的血淋巴细胞和肌肉神经组织中(图 2)。该微生物是否是“颤抖病”的致病原还需要通过科赫氏法则(Koch's postulates)的验证,也就是要确定一种疾病是由微生物引起的,需要满足 4 个条件:首先,这种微生物得存在于所有病例中;其次,它们要可以分离,并能在培养基中培养;再次,即使经过多次传代,它们也应该能在健康个体中引起原发性的感染;最后,在因接种而患病的个体中,应该可以再次分离并培养出同一种微生物。

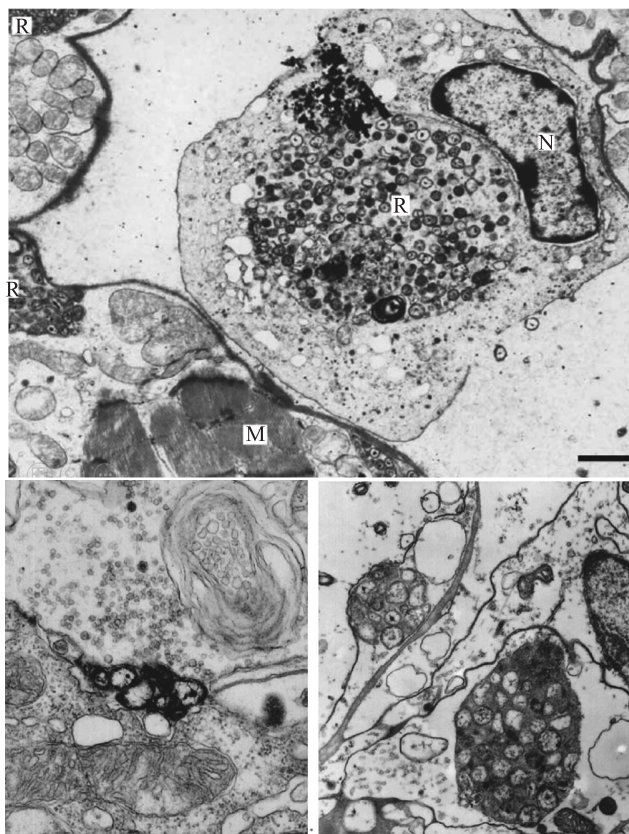


图2 电子显微镜下观察到的侵染到河蟹血淋巴细胞(上)、肌肉(左下)和神经(右下)中的“颤抖病”病原

Fig.2 The ultrastructure of hemocytes(up), muscle (left bottom) and nervous tissues (right bottom) of the crab with tremor disease

## 1.2 河蟹“颤抖病”病原的分离、培养及纯化

按照科赫氏法则要求,首先要将病蟹中发现的类似于立克次氏体的微生物进行分离、培养和纯化,然后再用该微生物进行人工回感健康的河蟹,复制出“颤抖病”病症并重新从回感发病的河蟹中分离出同样的病原。将患“颤抖病”河蟹的血液经 220 nm 孔径滤膜过滤,然后在无菌条件下接种于 7 日龄鸡胚。将接种病原的鸡胚和接种生理盐水的对照组鸡胚置于 35 ℃ 培养箱,每天观察、记录鸡胚情况。5 d~8 d 后所有接种病原的鸡胚均死亡,而接种生理盐水的对照组鸡胚生长良好。从接种病原鸡胚的卵黄囊和尿囊中收集到大量的微生物,将该微生物进行健康河蟹的回感实验及电镜超微病理学观察,证实其与自然界患“颤抖病”的河蟹病的病症完全一致,而且其病理感染特征也完全一致(此过程称为科赫氏法则验证)。将这些尿囊液和卵黄液分离并收集起来保存在-70 ℃ 中,这就是第一代“颤抖病”病原体纯培养分离物<sup>[2]</sup>。

## 1.3 河蟹“颤抖病”病原体的分子生物学鉴定

16S rRNA 基因(16S rDNA)分析方法是近年来发展起来的生物种类谱系分析的“分子尺”和细菌鉴定的“金标准”,已被广泛运用于生物的系统分类。为了进一步明确“颤抖病”病原微生物的分类地位,运用该方法对从鸡胚中分离纯化的“颤抖病”病原微生物进行了分析,结果出乎人意料,这种微生物并不是先前通过电镜观察初步判断的立克次氏体类微生物<sup>[3-7]</sup>,而是螺原体类微生物<sup>[8]</sup>。采用细菌 16S rRNA 基因保守序列作为引物(广普引物),进行病原体 DNA 扩增,琼脂糖凝胶电泳后,进行质粒 DNA 重组和分子克隆,经 PCR 鉴定及酶切鉴定结果为阳性的样品,送生工(上海)生物工程技术公司测定 DNA 序列,将测定的 16S rDNA 序列在美国国立生物信息中心(NCBI)的 GenBank 上比对,结果显示“颤抖病”病原体与非凡螺原体 *Spiroplasma mirum* 的 16S rRNA 基因有 98% 以上的相似性。经过系统分析,进一步确定了“颤抖病”病原体在分类学中的地位,它属于螺原体类微生物,与非凡螺原体(*Spiroplasma mirum*)的亲缘关系最近<sup>[8]</sup>,*Spiroplasma mirum* 是从兔子身上寄生的兔虱中分离的螺原体。

## 1.4 河蟹螺原体的证实及命名

螺原体是一类非常独特的微生物,具螺旋结构和运动性,体积很小,可以滤过 220 nm 孔径滤膜,是目前世界上最小的单细胞生物之一。螺原体是柔膜体纲(Mollicutes)、虫原体目(Entomoplasmatales)、螺原体科(Spiroplasmataceae)、螺原体属(*Spiroplasma*)生物,是 20 世纪 70 年代才发现的一类寄生于植物和昆虫的微生物<sup>[9-11]</sup>,它们大多数能引起植物和昆虫的病害。长期以来这类微生物的寄主被认为只有植物和昆虫这两大类<sup>[12]</sup>,在水生甲壳类动物体内发现螺原体类微生物是一个特例,所以需要根据分子生物学的实验结果,进行微生物学、形态学及免疫学等方面的进一步验证。

微生物实验显示“颤抖病”病原体可以滤过 220 nm 孔径滤膜,并可以在特殊的人工培养基(M1D、R2)中生长,因为没有细胞壁而对青霉素类药物不敏感,用暗视野或相差光学显微镜观察,可以看到该病原的运动性和螺旋结构,电镜负染可清楚显示其螺旋结构(图 3)。

将河蟹“颤抖病”病原与现有所有螺原体的抗体分别进行一一对应的免疫学实验验证(与美国 Gasparich 教授实验室合作),完成了血清学实验鉴定,最后正式命名“颤抖病”病原为中华绒螯蟹螺原体 *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov.,该螺原体不仅是一个新种,而且属于一个新的血清族 XLIII<sup>[13]</sup>(图 4),该菌株获得了国家发明专利(一种螺原体菌株及其应用 ZL 2007 1 0190266.7)。

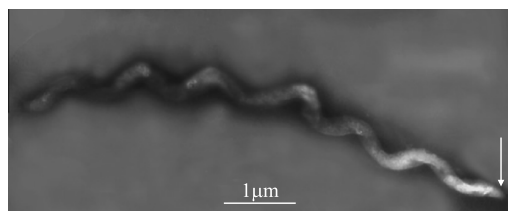


图 3 河蟹螺原体电镜负染照片(显示其典型的螺旋结构)  
Fig.3 Negative staining electron microscopic image of *Spiroplasma eriocheiris* showing its typical helix structure

## 2 螺原体的分布

最早的螺原体是由美国植物病理学家 Robert.Davis 在患矮小病的玉米中发现的,起初认为是一种类似于支原体的微生物<sup>[9]</sup>,之后 Williamson 和 Tully 等人成功用人工培养基分离培养了该病原,并发现其特有的螺旋状结构就称为螺原体<sup>[10-11]</sup>。绝大多数螺原体分离自昆虫和扁虱,其中包括鞘翅目、双翅目、半翅目、同翅目、膜翅目、鳞翅目、蜻蜓目及蛛螨类。而河蟹螺原体的发现改变了人们对螺原体发布的认识,将螺原体的分布范围从陆地扩大到水域<sup>[14-15]</sup>,对螺原体的宿主范围和生态学研究都具有重要意义<sup>[16]</sup>。值得关注的是近年来发现,螺原体对水生甲壳动物有广泛的侵染性<sup>[17]</sup>。



## 螺原体的新种命名

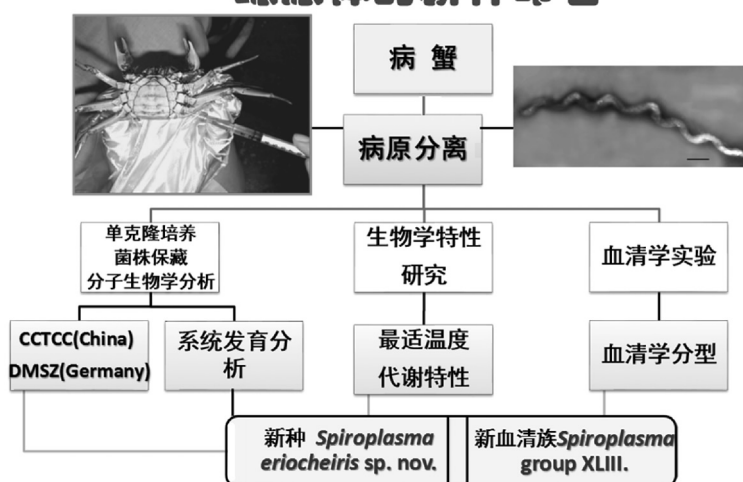


图4 河蟹螺原体的分离、鉴定及命名

Fig.4 The isolation, identification and novel species naming of *Spiroplasma eriocheiris*

### 2.1 其他水生甲壳动物螺原体病原的发现和确定

继河蟹螺原体病原微生物后,2004年在与河蟹同养一个池塘的克氏原螯虾(*Procambarus Clarkii*)也发现了大量死亡,在病虾的肌肉、神经、血淋巴细胞及各器官的结缔组织中发现了与河蟹“颤抖病”病原类似的病原体,其感染特性也极为相似,用培养螺原体的两种常规培养基 M1D 和 R2 都获得了纯培养物,通过光镜验证其具运动性,电镜显示出其典型的螺旋结构,并进行了科赫氏法则的验证,然后通过分子生物学鉴定,结果证实该病原菌确为螺原体类病原微生物,是克氏原螯虾的致病微生物。这是继河蟹后在淡水甲壳类中发现的第二个螺原体类病原微生物<sup>[18]</sup>。

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*),又名南美白对虾,是世界公认养殖产量最高的三大优良养殖经济对虾之一,自1988年由中国科学院海洋研究所引进后,目前已形成了以海水养殖为主,海淡水养殖并存的格局,淡水养殖主要以浙江、江苏、山东等省市为主。在发生河蟹“颤抖病”养殖池塘附近凡纳滨对虾也发病,且发病迅速、发病期长、多反复、死亡率高,通过实验室PCR检测,能在病虾肌肉和虾塘底泥中检测到螺原体16S rDNA特异序列<sup>[18]</sup>,并用螺原体培养基从病虾体内分离出螺原体,从而证实螺原体引起淡水养殖的凡纳滨对虾暴发性流行病。有趣的是,美国学者Nunan用螺原体的鉴定方法对他们之前认为的类立克次氏体引起的凡纳滨对虾大量死亡疾病<sup>[19]</sup>进行重新验证,证实该病的致病原也是一种螺原体 *Spiroplasma penaei*<sup>[20-21]</sup>,该疫病在南美海域养殖的凡纳滨对虾非常严重,导致大量养殖企业倒闭。这表明螺原体病原在水生甲壳动物中的地域分布具有广泛性,不仅分布于淡水也分布于海水,是世界水产病害研究遇到的新课题,值得密切关注。

2010年夏季,江苏省高邮市罗氏沼虾发生重大疫病,现场取样后进行了病理学研究,在病虾的肌肉、神经、血淋巴细胞及各器官的结缔组织中发现了与河蟹螺原体类似的病原,其感染特性也极为相似,用螺原体培养基分离、培养病原后进行电镜观察,结果显示螺原体典型的螺旋结构,用螺原体16S rDNA特异序列的引物进行验证也得到了阳性结果。之后又进行了科赫氏法则的验证,确定引起这次罗氏沼虾疫病的病原是螺原体<sup>[22]</sup>。

2011-2012年连续两年夏季,在江苏省宝应县一些发生河蟹“颤抖病”的养殖塘中发现与河蟹混养的日本沼虾 *Macrobrachium nipponense*(俗称青虾)出现死亡,经过PCR检测发现螺原体为阳性,随即进行了光镜和电镜取样以及病原的分离,分离出的病原显示螺原体的典型特征,而且超微病理学结果也显示该病原的侵染部位与螺原体侵染其他虾蟹宿主的部位完全相同<sup>[23]</sup>。

至此,已经在河蟹和4种不同类型的淡水养殖虾类(克氏原螯虾<sup>[18]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[18]</sup>、罗氏沼虾<sup>[22]</sup>、日本沼虾<sup>[23]</sup>)和海水养殖的凡纳滨对虾<sup>[21]</sup>中发现了螺原体病原,揭示螺原体对水生甲壳动物的普遍侵染性和广泛的发布性,螺原体病原已经在主要养殖虾蟹类之间传播,必须引起高度重视。

## 2.2 不同水生甲壳动物螺原体病原的生物学特性、免疫学和分子生物学研究

从河蟹和虾类中分离的螺原体是否不同类型? 他们与陆生种类的螺原体是否存在差异? 为了探索这些问题需要开展微生物学、免疫学和分子生物学方面的研究。

首先从美国菌种保藏中心(ATCC)购买与河蟹螺原体亲缘性最近的陆生螺原体菌株——非凡螺原体(*Spiroplasma mirum*)并进行人工培养和复活。将虾蟹分离出的螺原体分别与此种螺原体进行微生物培养和生物学特性的比较和研究,发现虾蟹螺原体与非凡螺原体存在一些明显的差异。虾蟹螺原体最适生长温度 30 ℃,而非凡螺原体最适生长温度 37 ℃,且衰亡较快。运用人工交叉回感实验研究不同来源螺原体的侵染特性,即用河蟹螺原体去回感不同的虾类,用不同虾类的螺原体去回感河蟹,结果显示,不同来源的螺原体的感染特性和引起的病症完全一样,只是感染程度和感染时间上存在一些差异<sup>[24]</sup>。而当用非凡螺原体分别回感河蟹和虾时,却未见发病。这表明陆生的非凡螺原体不能感染水生甲壳动物。

分别用以上不同来源的螺原体注射雄性新西兰大耳兔制备多抗,然后用 Western Blot 方法进行检测血清学交叉反应试验。结果显示从河蟹和虾类分离培养的螺原体抗原产生的抗体分别对自身和对方的抗原和抗体都有相互交叉反应,而虾蟹螺原体与非凡螺原体之间没有交叉反应<sup>[25]</sup>,因而可以推测从河蟹和虾类中分离培养的螺原体是在不同甲壳动物宿主间传播同一种螺原体病原,而它们与陆生种类的非凡螺原体有较大的差异。

将不同水生甲壳动物来源的螺原体和非凡螺原体 *S.mirum* 进行 16S rDNA 分析发现,所有水生甲壳动物来源的螺原体都与非凡螺原体 *S.mirum* 在 16S rDNA 上有 98%以上的相似性<sup>[23]</sup>。基因树分析表明水生甲壳类动物来源的螺原体都聚在一起(图 5),这与免疫学的初步研究结果相吻合。

综上所述,河蟹及虾的螺原体与已知的非凡螺原体 *S.mirum* 虽然在 16S rDNA 上有 98%以上的相似性,但免疫学检测结果有差异,而且在培养特点上也有差异。因而可以判断从虾蟹分离出的螺原体病菌不仅是水生动物新型病原菌而且也是螺原体类家族的一个新类群。

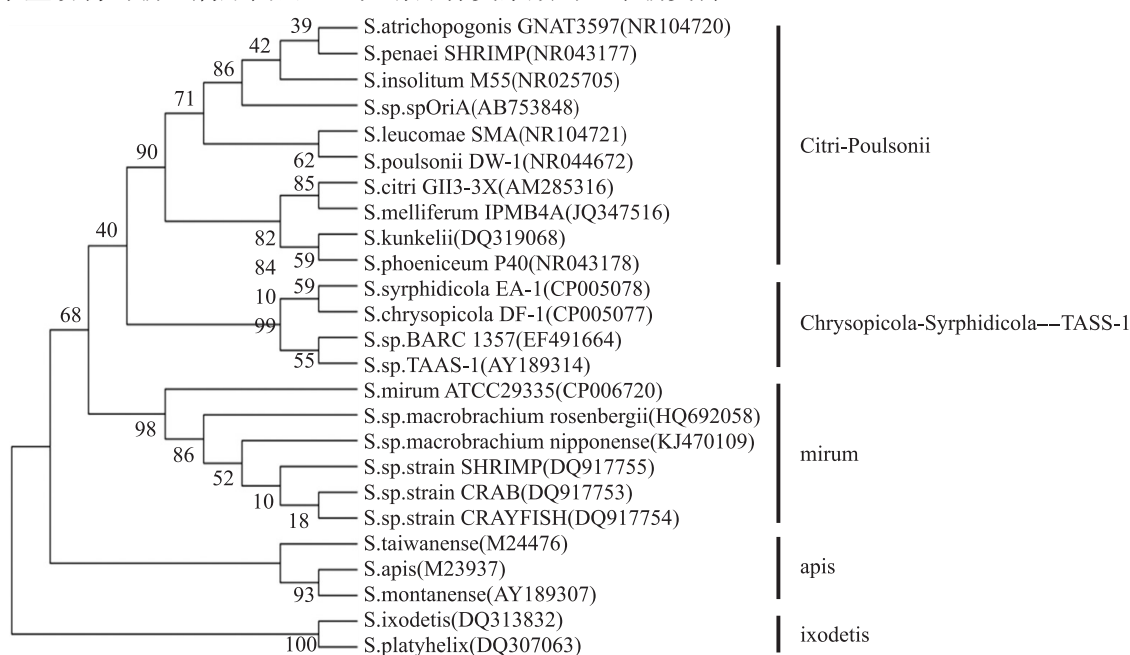


图 5 不同宿主分离出的螺原体 16S rRNA 系统发育进化树

Fig.5 The phylogenetic tree of 16S rRNA from different species and strains of *spiroplasmas*

## 3 螺原体的致病机理

### 3.1 虾蟹螺原体疫病感染模型的建立和感染特性及机制的研究

#### 3.1.1 螺原体致病的病理学特征

螺原体作为植物(农作物)、昆虫(如蜜蜂)、水生经济甲壳动物(虾蟹)的重大致病菌,定植于不同宿主体内,由于侵染的宿主不同,螺原体的侵染方式和病理学特征也各不相同。螺原体在陆地上的传播途径主

要通过昆虫与植物交互感染进行<sup>[15]</sup>. 柑橘螺原体 *Spiroplasma citri* 和玉米螺原体 *Spiroplasma kunkelii* 主要寄生于植物筛管部和吸食植物汁液的昆虫体内,螺原体在植物的筛管中大量增殖导致植物形成僵化、矮缩等病症. 蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 能穿过蜜蜂的中肠屏障到达淋巴组织,并在淋巴组织内大量繁殖从而使蜜蜂死亡<sup>[26]</sup>. 河蟹螺原体则是通过鳃或体表(尤其是蜕壳期)进入体内,首先感染血淋巴细胞,在其内大量增殖,并随血淋巴将病原带至机体各器官的结缔组织中,形成系统性感染,最终导致河蟹死亡,尤其是神经系统和神经与肌肉细胞连接处的增殖导致蟹附肢出现颤抖症状,这也是“颤抖病”名称的来历,而其他淡水虾类感染螺原体后的病理特征与河蟹极为相似<sup>[18]</sup>,免疫组化研究也显示这一侵染特性<sup>[27]</sup>. 此外, Nunan 等从海水养殖的凡纳对虾中发现的螺原体 *Spiroplasma penaei* 也形成系统性感染<sup>[21]</sup>.

血淋巴是甲壳动物最重要的免疫组织,担负着甲壳动物固有免疫最主要的功能<sup>[28]</sup>. 前期研究表明,螺原体进入蟹体内最先侵染的是血淋巴细胞<sup>[8]</sup>. 病原进入细胞后在其内大量增殖形成包涵体,最终导致细胞破裂,病原释放出并去感染其他正常组织和细胞(图6). 螺原体是无细胞壁的特殊细菌,且相对于其他细菌来说螺原体类病原不产生外毒素和内毒素<sup>[29]</sup>,所以其侵染和在宿主细胞内的增殖对致病的作用就显得格外重要.

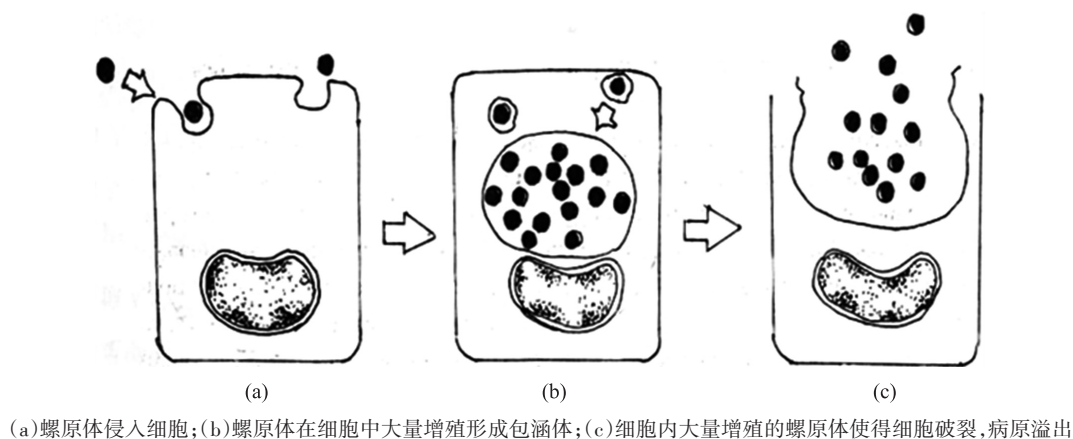


图6 螺原体病原侵染蟹血淋巴细胞示意图

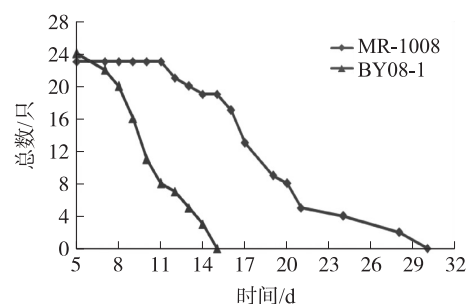
Fig.6 The schematic diagram of crustaceans hemocyte infected by spiroplasma pathogen

### 3.1.2 蟹个体及血淋巴细胞螺原体感染模型的建立和感染后免疫机制的研究

从患病蟹分离出螺原体病原后,要进行经典的微生物学“科赫氏法则”验证后才能确定致病原. 通过“科赫氏法则”,也就是人工回感实验的验证<sup>[30]</sup>,可以掌握不同蟹宿主感染螺原体的时间和计量以及发病周期等信息<sup>[24]</sup>(图7),通过这些积累,可以建立成熟的河蟹、克氏原螯虾和罗氏沼虾动物感染模型方法<sup>[2,31,34]</sup>,为在个体水平上深入开展致病机理研究奠定了基础.

螺原体侵染蟹宿主的主要靶细胞是血淋巴细胞,所以建立蟹血淋巴细胞体外培养方法可以更深入地探讨病原侵染宿主靶细胞的分子致病机制. 梁廷明等摸索了体外培养蟹血淋巴细胞的原代培养方法<sup>[31]</sup>,顾伟等优化了该方法从而建立了蟹血淋巴细胞螺原体感染模型<sup>[32]</sup>(图8). 丁正峰、杜婕等分别建立了克氏原螯虾和罗氏沼虾的血淋巴原代细胞培养技术和螺原体感染血淋巴细胞的模型<sup>[33-34]</sup>,为深入探讨这水生甲壳动物血淋巴细胞螺原体感染的分子机制奠定了基础.

孟庆国、杜婕、修云吉、黄颖等利用以上个体和细胞感染模型及相关技术分别研究了螺原体刺激后中华绒螯蟹、克氏原螯虾和罗氏沼虾血淋巴细胞中免疫相关基因的表达变化规律<sup>[35-53]</sup>.



BY08是从河蟹中分离的螺原体;MR-1008是从罗氏沼虾中分离的螺原体

图7 两种来源的螺原体回感蟹死亡率与死亡时间的比较

Fig.7 The comparison of mortality rate and death time between artificial infections by two different spiroplasma strains isolated from crab and prawn



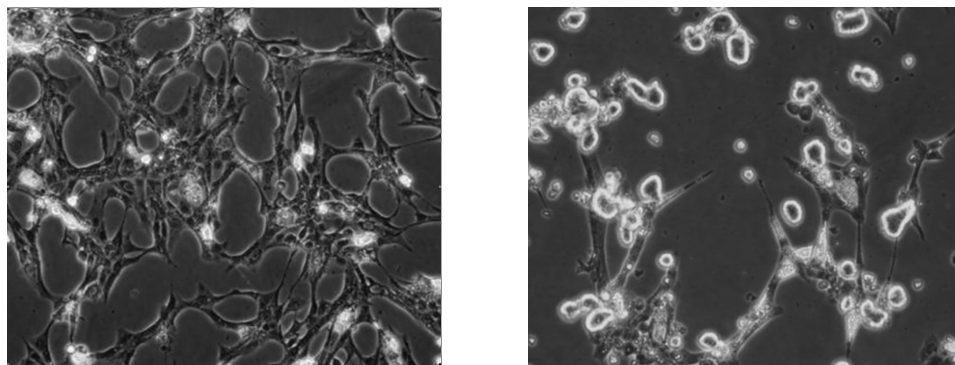


图8 河蟹血淋巴细胞体外原代培养 24 h(左)及螺原体感染模型(右)

Fig.8 Primary cultured hemocytes of *Eriocheir sinensis* for 24 h (left) and infected by *spiroplasma* (right)

## 4 虾蟹螺原体检测及螺原体疫病防控关键技术

### 4.1 虾蟹螺原体检测技术

#### 4.1.1 光镜快速诊断方法的建立

根据螺原体主要侵染虾蟹血淋巴细胞的特点,建立了虾蟹活体血淋巴光镜的简易、快速检测方法(国家发明专利号:01137316.4),这个技术可以对健康和感染的虾蟹动物进行微量取血,进行活体实时监测.利用螺原体侵染蟹血细胞后形成包涵体及病原体具游动性的特点,建立了光镜快速诊断方法.可在不染色的情况下直接观察血液滴片,能直观地发现侵染到血细胞的病原体,方法便捷、快速、准确,能在 5 min 之内对还未表现出典型症状的早期感染虾蟹作出诊断.同时为验证分子生物学和免疫学的检测实验结果的可靠性提供了一个验证方法.

#### 4.1.2 分子生物学检测技术的建立

常规的病原微生物的聚合酶链式反应(PCR)检测过程中,通常采用苯酚法或试剂盒进行被检样品的 DNA 提取,这些方法繁琐、费时,苯酚法需要的样品量大,不适宜微量检测及动物的活体血液检测,苯对操作人员还有毒性;试剂盒则成本较高,而且使用范围较局限,通常一种试剂盒只能针对一两种不同环境中的样品进行提取.采用法医常用的 Chelex-100 试剂提取环境(底泥)、分离培养的病原菌以及被检测组织(包括寄主肌肉、内脏组织、血液等)中的模板 DNA,取得了良好效果,对底泥中极微量的病原菌也能检测出来<sup>[54]</sup>.另外,将实验室分离纯培养的病原菌稀释成已知的不同浓度梯度,采用相同方法扩增、检测.通过比较检测样品的电泳条带和稀释浓度梯度的条带的亮度,并通过相关软件将条带明暗差异转换成数字差异,可以对样品中螺原体的浓度相对含量进行比较.经过改进的这一 PCR 检测方法与现有的常规 PCR 技术相比,敏感、便捷、快速,经济,能在 2 h~4 h 内作出诊断,是进行大批量检测虾蟹螺原体感染的有效手段,该技术获得国家发明专利(螺原体病原微生物的 PCR 快速检测技术,国家发明专利号:200510041005.x),并获国家水生动物防疫标准(SC/T 7220—2015)<sup>[55]</sup>.

#### 4.1.3 螺原体的微生物学培养及电镜检测技术

利用螺原体可以在 M1D 或 R2 特殊培养基中生长繁殖的特性,将病虾蟹组织进行碾磨后用 220 nm 孔径滤膜滤过,然后接种到含有酚红的 M1D 或 R2 培养基中,3 d~5 d 后如果培养基由粉红色变为橘黄色则表明这些病蟹体内含有螺原体病原,将该培养基中的培养物进行电镜负染观察可以看到具有典型螺旋结构的螺原体,则可以准确判定螺原体病原<sup>[8]</sup>.

#### 4.1.4 ELISA 检测技术及快速诊断试剂盒的研制

生产实际中急需一种实用性强、快速有效的该病原的检测技术,针对这一需要,探索以多抗技术为基础的免疫学检测方法,研制不需要任何仪器设备和复杂技术的螺原体病原的快速检测试剂盒.利用螺原体通过血淋巴在蟹体内传播的特性,建立一种可以通过微量采集蟹血淋巴检测其内螺原体病原的方法,可以提前对螺原体的侵染情况做出判断.首先摸索获得高效价的多克隆抗体免疫方法,制备出该病原高效价的多抗,利用传统间接 ELISA 方法进行效价检测;优化 ELISA 检测方法,并对其进行总体性能评价,包括敏感性、特异性、重复性检测等.研制的 ELISA 检测试剂盒灵敏度达 0.573  $\mu\text{g/mL}$ ,特异性良好,本检测

方法变异系数无论批内还是批间均不超过 10%,有很好的稳定性.该试剂盒在不需特殊仪器设备的条件下,能在 2.5 h 内有效检出侵染到蟹体内的颤抖病病原<sup>[56]</sup>,可用于螺原体感染的早期快速诊断及流行病学研究.《一种检测水生动物螺原体的酶联免疫试剂盒》已经获得国家发明专利(ZL 2007 1 0025337.8).

4.2 虾蟹螺原体疫病防控关键技术

近年来许多病害也时常流行,这些都严重制约着特种水产养殖业的发展.而对这些悬而未决的病害许多养殖户盲目用药,不仅污染了水源,而且给水产可持续发展带来障碍,所以尽快明确致病因子,进而有针对性地采取有效的防治措施是迫切需要解决的问题<sup>[57]</sup>.

为了将实验室的研究更好地应用于生产实际,有必要研发适用于基层的水产螺原体快速诊断试剂盒,建立实时监测技术,筛选防治螺原体的有效药物,建立包括苗种检疫、清塘、苗种消毒、营造良好养殖环境、科学用药等综合防控螺原体疫病的关键技术.

4.2.1 有效药物的筛选

药物治疗是治疗虾蟹螺原体病最直接有效的手段,吴霆等结合生产实际,开展了螺原体对水产常用清塘剂、消毒剂、杀菌驱虫药、抗微生物药及部分中草药的体外药敏试验、药效实验,筛选出对虾蟹螺原体敏感的药物<sup>[58-59]</sup>.封琦等针对筛选出的有效药物开展了药理及药代动力学研究<sup>[60-61]</sup>,以期摸索出最佳的科学用药方法.

4.2.1.1 药敏试验

吴霆等进行了螺原体对水产常用清塘剂、消毒剂、杀菌驱虫药、抗微生物药及部分中草药的体外药敏试验,结果发现螺原体对国家公布的无公害食品水产用药中的抗微生物药物氟苯尼考(FF)和土霉素(OTC)最为敏感<sup>[57-58]</sup>,FF 的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)分别为 0.16 mg·L<sup>-1</sup>和 2.5 mg·L<sup>-1</sup>,OTC 的 MIC 和 MBC 分别为 0.04 mg·L<sup>-1</sup>和 0.62 mg·L<sup>-1</sup>(表 1).

表 1 不同药物对螺原体的敏感性实验结果

Table 1 The results of different drug sensibility to *Spiroplasma eriocheiris*

药物		MIC/(mg·L <sup>-1</sup> )	MBC/(mg·L <sup>-1</sup> )
清塘药	生石灰	400	1 000
	茶籽饼	300	600
	清塘净	—	—
杀菌驱虫药	敌百虫	—	—
	敌杀死	7.8	37.5
	硫酸铜	15.6	25
	硫酸锌	3.9	50
	次氯酸钙	0.62	80
消毒剂	三氯异氰尿酸	2.5	125
	二氧化氯	37.5	>500
	溴氯海因	20	400
	二溴海因	2.5	300
	高锰酸钾	12.5	31.25
抗微生物药	青霉素	—	—
	复方磺胺甲基异噁唑	20	>80
	OTC	0.04	0.62
	FF	0.16	2.5
中草药	地锦草	—	—
	五倍子	500	5 000
	黄连	500	1 000
	黄柏	1 000	10 000
	黄芩	—	—
	大青叶	—	—
	穿心莲	—	—
	连翘	—	—
	黄芪	—	—

注:“—”代表试验浓度内无抑制和杀灭效果.



## 4.2.1.2 药效试验

用氟苯尼考(FF)对中华绒螯蟹进行急性毒性试验(表2), FF 96hLD<sub>50</sub> 为 1 106.624 mg/kg, 安全使用量为 111 mg/kg, 远远大于其 MIC 和 MBC, 药敏试验和急性毒性试验结果表明 FF 具有治疗河蟹“颤抖病”较好的前景, 在实验室人工诱病的治疗试验中, 回感组河蟹用 FF 治疗的存活率达 53.3%, 远高于未用药治疗的回感对照组的 6.7%, 药物治疗效果显著( $P<0.05$ )<sup>[58-59]</sup>. 急性毒性试验显示土霉素 OTC 对河蟹安全性低毒, 24 h LD<sub>50</sub> 和 48 h LD<sub>50</sub> 分别为 366 mg/kg、340 mg/kg, 安全浓度为 82.5 mg/kg. 回感治疗试验结果说明最好存活率高达 80%.

表2 氟苯尼考(FF)对河蟹96 h的急性毒性试验

Table 2 The acute toxicity test of florfenicol (FF) to *Eriocheir sinensis* for 96 h

剂量/(mg/kg)	河蟹数	死亡数	死亡率
450	14	0	0.000
675	14	2	0.143
1 012.500	14	5	0.357
1 518.750	14	11	0.786
2 278.125	14	14	1.000
对照	14	0	0.000

## 4.2.1.3 药代动力学研究

为了减少环境中的农药残留, 避免盲目用药, 需要进行河蟹体内的药代动力学研究. 封琦等建立并优化了一整套适于河蟹体内 OTC 残留检测的高效液相色谱检测方法, 分别分析了 OTC 在血淋巴、肌肉、肝脏组织中的药代动力学特征<sup>[60-61]</sup>. 根据药代动力学原理推算出来的用药合理剂量为 36.37 mg/kg 体重.

综上所述研究结果说明: 对螺原体进行了体外药物敏感性试验, 筛选出了最为敏感的药物氟苯尼考(FF)和土霉素(OTC); 利用 FF 对中华绒螯蟹进行急性毒性试验和回感治疗试验研究, 证明 FF 和 OTC 是治疗水产螺原体疫病的有效药物.

## 4.2.2 防控关键技术的集成与应用

根据前期建立的螺原体快速检测方法和筛选的有效药物, 结合生产实际, 把相关的技术进行集成, 然后应用于生产实际, 取得了明显成效, 河蟹“颤抖病”发病率降低到 3% 以下<sup>[62]</sup>. 虾蟹螺原体疫病检测与综合防控技术示意图见图 9.

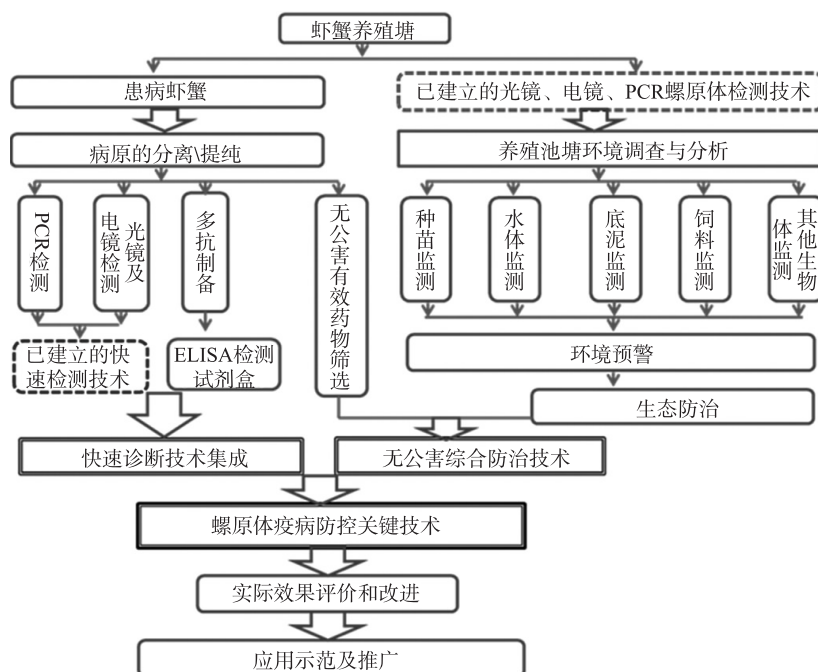


图9 虾蟹螺原体疫病检测与综合防控技术示意图

Fig.9 The sketch map of detection and comprehensive control for *spiroplasma* disease

## 5 研究展望

### 5.1 虾蟹新型病原——螺原体的生物特性研究

由于虾蟹螺原体是近年来新发现的水产病原,它不同于常见的病原微生物,具有很多非常独特的生物学特性,如螺旋结构和尖端(Tip)结构,具有运动性、趋化性及嗜神经性等,而这些特性又与其侵染和传播相关.在完成了该病原微生物的基因组学和一些重要功能基因筛选基础上<sup>[63-65]</sup>,进一步探讨其独特的生物学特征有助于全面了解该病原的特点,丰富微生物学研究内容.该微生物的细胞骨架支撑着其独特的螺旋结构,而其 Tip 结构则与它的粘附和侵染密切相关,这些结构和功能的解析及研究有助于揭示这种病原独特的粘附和侵染机制.实验已经证实螺原体具有运动性和趋化性,但从其基因组中并没有找到与运动和趋化性相关的基因,揭示该病原菌的运动和趋化性很可能是一种不同于其他细菌的全新机制,有必要进行系统深入的研究和探讨.

### 5.2 虾蟹螺原体与宿主的相互关系

虾蟹属于无脊椎动物,其免疫为天然免疫及非特异性免疫,血淋巴细胞是虾蟹体内参与免疫防御的重要细胞<sup>[66]</sup>.而螺原体侵染虾蟹的主要靶细胞是血淋巴细胞<sup>[8,18,20,22,31,34,39]</sup>,所以开展血淋巴细胞在螺原体感染过程中的免疫机制研究有助于诠释虾蟹免疫防御机理,揭示螺原体病原与宿主的相互关系,并为疾病防治新对策奠定基础.由于虾蟹基因组尚未解码,且稳定的细胞系仍未建立,故进行螺原体与宿主间基因和蛋白功能研究十分困难,可以利用模式动物果蝇细胞开展研究.果蝇与甲壳动物都属于无脊椎动物,缺乏真正的抗体和特异性的免疫细胞,机体防御反应依靠非特异的先天免疫,基因组间同源性较高,许多基因、蛋白、生化途径和信号通路高度保守.如今果蝇已经被广泛应用在虾蟹病毒研究模型上<sup>[67-69]</sup>.因此从果蝇细胞模型出发,弄清病原体重要调控蛋白对宿主的影响,具有重要的理论和实践意义.前期感染实验证实,河蟹螺原体可以感染果蝇 Schneider-2(S2)细胞,而且河蟹螺原体侵染 S2 细胞的病理学特征与其感染河蟹靶细胞(血淋巴细胞)完全相同(未发表).S2 细胞是目前最常用的模式生物细胞系,可以从螺原体感染果蝇 S2 细胞的研究中获得相关的基因和蛋白,然后再回到虾蟹靶细胞及个体上去开展相关的实验验证,更有效地在分子水平上进行这种无细胞壁病原菌感染宿主的分子机制研究.此外,近年来 miRNA 在病原与宿主相互作用中发挥着重要作用<sup>[70-73]</sup>.欧江涛等首次从河蟹和克氏原螯虾体内筛选和挖掘到一些螺原体感染后免疫相关 miRNA 信息<sup>[74-75]</sup>,基于这些研究基础有望从另一个侧面诠释虾蟹螺原体与宿主的关系.

### 5.3 虾蟹螺原体疫病的绿色防控技术

随着有机农业理念的引入和保护环境意识的增强,仅靠药物的单一水产病害防治技术迫切需要拓展和改进.水产病害防治技术最新发展趋势是在病害防治方面注重消除水产品质量安全的隐患和对环境的危害,尽量降低使用农药的安全风险;尽量降低破坏生态的风险<sup>[76]</sup>.基于改善宿主健康状况和养殖生态环境的免疫制剂、绿色生物渔药、绿色生态制品在水产中的开发和应用将逐步取代目前药物滥用的局面.以健康养殖技术为基础的水生动物病害综合防疫体系是目前国际上普遍认可和接受的渔业病害防治技术系统.所以今后虾蟹螺原体疫病的防控需要进一步提升,应用生物、免疫、生态技术,建立一个对宿主和环境都有利的绿色综合防控技术.

## [参考文献]

- [1] 魏泽能.河蟹流行病学调查[J].淡水渔业,1999,29(11):16-17.
- [2] WANG W, RONG L, GU W, et al. Study on experimental infections of TDA from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens[J]. Research in microbiology, 2003, 154(10):677-680.
- [3] 顾志峰,王文,杜开和,等.患“颤抖病”中华绒螯蟹体内类立克次体生物的寄生[J].湖泊科学,2000(3):289-291.
- [4] 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(4):367-388.
- [5] WANG W, GU Z. Rickettsia-like organism associated with tremor disease and mortality of the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Diseases of aquatic organisms, 2002, 48(2):149-153.

- [6] 张凤英,王进科,朱清顺,等. 患“颤抖病”中华绒螯蟹病原的电镜观察[J]. 大连水产学院学报,2002,17(4):336-340.
- [7] 王进科,朱清顺,周刚,等. 中华绒螯蟹感染类立克次氏体微生物的研究[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(3):273-278.
- [8] WANG W, WEN B, GASPARICH G E, et al. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Microbiology, 2004, 150: 3 035-3 040.
- [9] DAVIS R E, WORLEY J F, WHITCOMB R F, et al. Helical filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease [J]. Science, 1972, 176: 521-523.
- [10] WILLIAMSON D L, WHITCOMB R F. Mycoplasmas: A cultivable spiroplasma causes corn stunt disease [J]. Science, 1975, 188: 1 018-1 020.
- [11] TULLY J G, WHITCOMB R F, CLARK H F. Pathogenic mycoplasmas: Cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma [J]. Science, 1977, 195: 892-894.
- [12] GASPARICH G E. Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity [J]. Frontiers in bioscience, 2002(7): d619-640.
- [13] WANG W, GU W, GASPARICH G E. et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., a novel species associated with mortalities in *Eriocheir sinensis*, Chinese mitten crab [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2011, 61: 2 745-2 752.
- [14] REGASSA L B, GASPARICH G E. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity [J]. Frontiers in bioscience, 2006(11): 2 983-3 002.
- [15] GASPARICH G E. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts [J]. Biologicals, 2010, 38(2): 193-203.
- [16] 于汉寿,刘淑园,阮康勤,等. 螺原体的分类及其生物多样性研究进展[J]. 微生物学报,2009,49(5):567-572.
- [17] WANG W. Bacterial diseases of crabs: A review [J]. Journal of invertebrate pathology, 2011, 106: 18-26.
- [18] WANG W, GU W, DING Z, et al. A novel spiroplasma pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: decapod), in China [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(1): 131-137.
- [19] NUNAN L M, NOBLE B, LE GROUMELLE M, et al. Experimental infection of *Penaeus vannamei* by a rickettsia-like bacterium (RLB) originating from *P. monodon* [J]. Diseases of aquatic organisms, 2003, 54(1): 43-48.
- [20] NUNAN L, PANTOJA C, SALAZAR M, et al. Characterization and molecular methods for detection of a novel spiroplasma pathogenic to *Penaeus vannamei* [J]. Diseases of aquatic organisms, 2004, 62: 255-264.
- [21] NUNAN L M, LIGHTNER D V, ODUORI M A, et al. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2005, 55: 2 317-2 322.
- [22] LIANG T, LI X, DU J, et al. Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host [J]. Aquaculture, 2011, 318: 1-6.
- [23] XIU Y, WU T, MENG X, et al. Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, in China: A new freshwater crustacean host [J]. Aquaculture, 2015, 437: 270-274.
- [24] 李新伦. 罗氏沼虾螺原体病原微生物的分离和生物学特性研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- [25] 毕可然. 生甲壳动物新型病原-螺原体的分子生物学研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- [26] BOVÉ J M. Spiroplasmas: Infectious agents of plants, arthropods and vertebrates [J]. Wiener klinische wochenschrift, 1997, 109: 604-612.
- [27] 连林坤. 虾蟹螺原体病免疫组化和病理学比较研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2011.
- [28] LIN X, SODERHALL I. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines [J]. Blood, 2011, 117: 6 417-6 424.
- [29] STÜLKE J, EILERS H, SCHMIDL S R. Mycoplasma and spiroplasma in: *Encyclopedia of microbiology* [M]. Oxford: Elsevier, 2009: 208-219.
- [30] WANG W, ZHU N, GU Z, et al. Study on the transmission of tremor disease (TD) in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda) [J]. Journal of invertebrate pathology, 2002, 81(3): 202-204.
- [31] LIANG T, JI H, DU J, et al. Primary culture of hemocytes from *Eriocheir sinensis* and their immune effects to the novel crustacean pathogen *Spiroplasma eriocheiris* [J]. Molecular biology reports, 2012, 39: 9 747-9 754.
- [32] GU W, YAO W, ZHAO Y, et al. Establishment of spiroplasma-infected hemocytes as an *in vitro* laboratory culture model of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Veterinary microbiology, 2014, 171(1/2): 215-220.
- [33] DING Z, DU J, OU J, et al. Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* *in vitro* [J]. Aquaculture, 2012(356/357): 371-380.



- [34] DU J, OU J, LI W, et al. Primary hemocytes culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and their susceptibility to the novel pathogen spiroplasma strain MR-1008[J]. Aquaculture, 2012(330/333): 21–28.
- [35] MENG Q, DU J, YAO W, et al. An extracellular copper/zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* and its relationship with *Spiroplasma eriocheiris*[J]. Aquaculture, 2011, 320: 56–61.
- [36] MENG Q, JI H, BI K, et al. Spiralin-like protein SLP31 from *Spiroplasma eriocheiris* as a potential antigen for immunodiagnoses of tremor disease in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Folia microbiologica, 2010, 55: 245–250.
- [37] MENG Q, LI W, LIANG T, et al. Identification of adhesin-like protein ALP41 from *Spiroplasma eriocheiris* and induction immune response of *Eriocheir sinensis*[J]. Fish and shellfish immunology, 2010, 29: 587–593.
- [38] MENG Q, OU J, JI H, et al. Identification and characterization of spiralin-like protein SLP25 from *Spiroplasma eriocheiris*[J]. Veterinary microbiology, 2010(4): 473–477.
- [39] DU J, ZHU H, REN Q, et al. Flow cytometry studies on the *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes subpopulations and immune responses to novel pathogen spiroplasma MR-1008[J]. Fish and shellfish immunology, 2012, 33(4): 795–800.
- [40] DU J, ZHU H, LIU P, et al. Immune responses and gene expression in hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* challenged by a novel pathogen spiroplasma MR-1008[J]. Fish and shellfish immunology, 2013, 34(1): 315–323.
- [41] XIU Y, HOU L, LIU X, et al. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Fish and shellfish immunology, 2015, 46(2): 603–611.
- [42] XIU Y, WANG Y, JING Y, et al. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two different types of lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Fish and shellfish immunology, 2015 45(2): 465–469.
- [43] XIU Y, FENG J, LU W, et al. Identification of a novel cognate cytosolic Hsp70 gene(MnHsc70-2) from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and comparison of its expressions with the first cognate Hsc70(MnHsc70-1) under different stresses[J]. Cell stress chaperones, 2014, 19(6): 949–961.
- [44] XIU Y, WU T, LIU P, et al. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and b-1, 3-glucan binding protein from oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Molecular biology reports, 2014, 41: 3 935–3 944.
- [45] HUANG Y, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Identification, characterization, and functional studies of a Pelle gene in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Fish and shellfish immunology, 2015, 45: 704–716.
- [46] HUANG Y, ZHAO L, FENG J, et al. A novel integrin function in innate immunity from Chinese mitten crab(*Eriocheir sinensis*)[J]. Developmental & comparative immunology, 2015, 52: 155–165.
- [47] HUANG Y, MA F, WANG W, et al. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like gene, involved in the antibacterial response in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & comparative immunology, 2015, 50: 129–138.
- [48] HUANG X, HUANG Y, SHI Y, et al. Function of a novel C-type lectin with two CRD domains from *Macrobrachium rosenbergii* in innate immunity[J]. Developmental & comparative immunology, 2015, 49(1): 121–126.
- [49] HUANG Y, CHEN H, WANG Z, et al. Novel myeloid differentiation factor 88, EsMyD88, exhibits EsTube-binding activity in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & comparative immunology, 2014, 47: 298–308.
- [50] HUANG Y, HUANG X, HOU L, et al. Molecular cloning and characterization of three novel Hemocyanins from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Aquaculture, 2014, 434: 385–396.
- [51] HUANG Y, AN L, HUI K, et al. An LDLa domain-containing C-type lectin is involved in the innate immunity of *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & comparative immunology, 2014, 42: 333–344.
- [52] HUANG Y, HUANG X, WANG Z, et al. Function of two novel single-CRD containing C-type lectins in innate immunity from *Eriocheir sinensis*[J]. Fish and shellfish immunology, 2014, 37: 313–321.
- [53] HUANG Y, TAN J, WANG Z, et al. Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & comparative immunology, 2014, 46: 255–266.
- [54] DING Z, BI K, WU T, et al. A simple PCR method for the detection of pathogenic spiroplasmas in crustaceans and environmental samples[J]. Aquaculture, 2007, 265: 49–54.
- [55] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 水生动物疫病标准汇编[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 239–244.
- [56] WANG J, HUANG H, FENG Q, et al. Enzyme-lined immunosorbent assay for the detection of pathogenic spiroplasma in commercially exploited crustaceans from China[J]. Aquaculture, 2009, 292: 166–171.
- [57] 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.

- [58] 吴霆. 中华绒螯蟹颤抖病病原体对药物的敏感性及其药物治疗的初步研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2007.
- [59] 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, 27: 325–329.
- [60] FENG Q, GAO T, JI H, et al. Kinetic analysis of oxytetracycline residues in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, muscle following intramuscular administration[J]. Journal of fish diseases. 2010, 33: 639–647.
- [61] FENG Q, WU G, LIANG T, et al. Pharmacokinetics of oxytetracycline in hemolymph from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 2011, 34: 51–57.
- [62] 吴霆, 华伯仙, 顾伟, 等. 中华绒螯蟹颤抖病诊断和防治技术[J]. 中国水产, 2010(8): 59–61.
- [63] 孟庆国. 中华绒螯蟹螺原体比较基因组学及主要蛋白功能研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2010.
- [64] 梁廷明. 中华绒螯蟹螺原体感染宿主过程中重要功能基因的筛选及研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2011.
- [65] 孟庆国, 黄艳青, 靳明建, 等. 中华绒螯蟹螺原体对中华绒螯蟹和 RAW264.7 细胞免疫反应研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2012, 35(2): 77–82.
- [66] SMITH V J, BROWN J H, HAUTON C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection[J]. Fish and shellfish immunology, 2003, 15: 71–90.
- [67] OKUGAWA S, MEKATA T, INADA M, et al. The SOCS and STAT from JAK/STAT signaling pathway of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: molecular cloning, characterization and expression analysis[J]. Molecular and cell probes, 2013, 27(1): 6–14.
- [68] WANG J H, VALANNE S, RÄMET M. Drosophila as a model for antiviral immunity[J]. World journal of biological chemistry, 2010, 1(5): 151–159.
- [69] LIU W J, CHANG Y S, WANG A H, et al. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene ie1[J]. Journal of virology, 2007, 81: 1 461–1 471.
- [70] HE Y, JU C, ZHANG X. Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans[J]. Molecular immunology, 2015, 68: 399–403.
- [71] XU D, LIU W, ALVAREZ A, et al. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp[J]. Developmental & comparative immunology, 2014, 47(2): 287–97.
- [72] KENNY N J, QUAH S, HOLLAND P W. et al. How are comparative genomics and the study of microRNAs changing our views on arthropod endocrinology and adaptations to the environment?[J]. General and comparative endocrinology, 2013, 188(1): 16–22.
- [73] REN Q, HUANG Y, HE Y, et al. A white spot syndrome virus microRNA promotes the virus infection by targeting the host STAT[J]. Scientific reports, 2015, 16(5): 18 384.
- [74] OU J, MENG Q, LI Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma* infection using a deep sequencing approach[J]. Fish and shellfish immunology, 2012, 32: 345–352.
- [75] OU J, LI Y, DING Z, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection[J]. Fish and shellfish immunology, 2013, 35(2): 607–617.
- [76] 唐启升, 丁晓明, 刘世禄, 等. 我国水产养殖业绿色、可持续发展战略与任务[J]. 中国水产, 2014: 4–9.

[责任编辑: 黄 敏]