

doi: 10.7541/2018.003

中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合症病原及病理学研究

杨宗英^{1,2} 张一柳¹ 胡 颢¹ 刘力硕¹ 蔡红桂³ 张凤翔⁴ 杨先乐¹

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 南昌市农业科学院, 南昌 330038;

3. 兴化市安丰镇水产站, 兴化 225766; 4. 兴化市渔业技术指导站, 兴化 225700)

摘要: 为了探讨中华绒螯蟹“水瘪子”病病因, 对病蟹进行了寄生虫检查、病原生物分离、回接攻毒及电镜观察等病原学研究, 同时采用常规石蜡切片技术, 以健康蟹为对照, 对病蟹的不同组织进行了病理学观察。结果表明, 病原分析未见致病性生物; 病蟹的鳃、肌肉和肝胰腺发生了不同程度的病变, 主要的病理特征为鳃组织增厚, 鳃腔增大, 血细胞增多, 细胞核边缘化; 肝胰腺组织中单层上皮细胞空泡化, 并出现转运泡, 随着病情的加重, 肝细胞排列紊乱, 转运泡和空泡的数量增多, 体积增大, 且转运泡内内容物增多, 更甚者肝小管基膜破裂、内容物外流, 细胞核解体, 肝细胞出现坏死; 肌细胞的病变特征主要是肌丝松弛变性、细胞核固缩深染。病原学研究和发病情况调查表明该病为非生物性疾病, 依据该病的临床症状、病理变化以及发病原因, 将该病命名为中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合症。

关键词: 中华绒螯蟹; 肝胰腺坏死综合症; 病原学; 病理学

中图分类号: S947.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)01-0017-09

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹、毛蟹、清水蟹、大闸蟹, 因其味道鲜美而深受人们喜爱。我国的中华绒螯蟹养殖模式在不断地改善和发展, 养殖产量也在逐年上升, 但是随着我国养殖产业的蓬勃发展, 集约化程度不断提高, 中华绒螯蟹的病害问题也显得尤为突出。江苏省是中国中华绒螯蟹养殖大省, 兴化市则被授予“河蟹养殖第一县”的称号, 中华绒螯蟹养殖业成为了当地的支柱产业。然而, 2015年大面积暴发的中华绒螯蟹“水瘪子”病对兴化的中华绒螯蟹养殖业造成了沉重的打击, 尤其7月中旬“灿鸿”台风过境后, 江苏省兴化市80%以上的塘口出现了该病^[1], 蟹农损失惨重。中华绒螯蟹“水瘪子”病已引起了各级政府和广大蟹农的关注。

本文首次对采自中华绒螯蟹“水瘪子”病流行区的病蟹进行病原学和病理学的系统研究, 旨在为中华绒螯蟹“水瘪子”病发病原因的确定及诊断提供科学参考, 也为在养殖过程中对该病的防控提供

一定的指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用患病中华绒螯蟹采自江苏省兴化市安丰镇发病养殖塘, 100只, 规格为80—100 g, 健康蟹采自江苏省张家港市中华绒螯蟹养殖基地, 规格100—120 g, 采样时间均为2016年9月份。病蟹肝胰腺淡黄色或土黄色, 鳃丝水肿或稍发黑, 附肢发软、附肢肌肉萎缩; 健康蟹肝胰腺呈橘红色, 肌肉饱满。

1.2 病原学检测

寄生虫检测 将30只病蟹体表、肝胰腺、鳃、肌肉等组织制成水浸片, 参照《水生动物寄生虫学》^[2], 对病蟹进行寄生虫检查。

细菌学检测 取30只病蟹, 用无菌水冲洗干净后, 75%酒精棉球反复擦拭病蟹的步足外表及外壳, 进行初步的蟹体消毒, 用灭菌注射器从病蟹的

收稿日期: 2017-02-23; 修订日期: 2017-05-24

基金项目: 河蟹“水瘪子”病控制技术(A1-2037-17-000114)资助 [Supported by the research on control technology of “shuibiezi” diseased *Eriocheir sinensis*]

作者简介: 杨宗英(1988—), 女, 河南驻马店人; 博士研究生, 助理工程师; 主要从事研究方向为水产生物免疫学与病害控制。E-mail: lxyangzongying@163.com

通信作者: 杨先乐, 教授; E-mail: xlyang@shou.edu.cn

第三步足基部抽取血淋巴,迅速将1滴血淋巴滴到普通营养琼脂上作划线分离,同时取肝胰腺、鳃、腹水、肌肉等组织于普通营养琼脂上作划线分离,28℃培养24h,待平板上长出形态一致的优势菌落后,挑选单菌落再次进行划线分离,获得纯培养物后接种于斜面培养基上保存。菌种的鉴定参考周德庆^[3]和Bachanan等^[4]的方法。

将分离纯化的菌株在新鲜斜面培养基上于28℃培养24h,分别用无菌生理盐水洗下制成菌悬液,用麦氏比浊管比浊和血球计数板计数后,将菌液浓度稀释为 1×10^8 CFU/mL。选择取自张家港市中华绒螯蟹养殖基地健康无病,附肢健全的中华绒螯蟹,在90 L水族箱中进行分组饲养2周,待死亡率低于5%且稳定时,将分离纯化的菌悬液从健康中华绒螯蟹第三步足基部注入体腔(0.2 mL/只)进行攻毒试验,其中每株菌的攻毒试验组设置3个重复,每个重复放入健康中华绒螯蟹30只,对照组注射等量无菌生理盐水。将不同菌株感染的中华绒螯蟹试验组和对照组置于不同持续充氧的水族箱中,饲养3个月并观察试验蟹是否发病,水温25—28℃,水体pH7.10—7.25,溶解氧6.45—6.75 mg/L。试验期间每天正常投喂一次中华绒螯蟹全价配合饲料,每天换水1/2。

病毒学检验 取10只病蟹的病变组织,加入等体积生理盐水匀浆,10000 r/min离心20min,上清液用孔径0.22 μm的滤膜过滤,滤液经营养琼脂28℃培养24h,确保无菌后作为病蟹组织的无菌组织滤液备用^[5]。取一份滤液于30只健康中华绒螯蟹的第三步足基部注射(0.2 mL/只),对照组每只蟹注射等量的灭菌生理盐水,同样置于充氧的水族箱中进行养殖观察,另取少许滤液滴在有支持膜的铜网上,几分钟后用干净滤纸从网边吸去多余的液体,待滤液稍干后,用2%磷钨酸液染色1min,滤纸吸去染液后,在日立H60透射电镜下观察^[6]。

同时取病蟹的肝胰腺等病变组织,用2.5%戊二醛溶液前固定,1%锇酸后固定,固定样品经酒精、丙酮脱水,Epon 812树脂包埋,制备超薄切片,透射电镜观察,检查病变组织内可能存在的病毒颗粒及包涵体^[7]。

1.3 组织切片的制备

选取30只病蟹和正常蟹的肝胰腺、鳃、附肢肌肉等组织,Bouin氏液固定,固定样品经70%、80%、95%、100%梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋。使用手摇式切片机切片(厚度约5 μm),H.E(苏木精-伊红)染色,Olympus显微镜观察、拍片^[8]。

2 结果

2.1 病症

发病初期,病蟹摄食量减少或者完全停止摄食、食线不饱满,活动能力弱,附肢无力,反应迟钝,有些病蟹还伴有磨爪。后期可见病蟹壳发黑,和正常的青壳有很大的差别,底盘比较脏,附肢中空,用手轻按即会下陷。

将健康蟹和病蟹分别腹部向上放置,健康蟹可以迅速翻身,病蟹翻身艰难且速度较慢甚至无法翻身。解剖30只病蟹,初期可发现病蟹鳃丝肿大,肝胰腺肿胀并伴有将肿胀的肝胰腺排出体外的倾向,所占比例为33.33%,严重时可见鳃丝呈灰白色或者黑色并且脆,甲壳内有大量积液,打开甲壳过一段时间,积液可以形成果冻状,肝胰腺由橘黄色变成淡黄色、土黄色或者白色并伴有鳃丝水肿、肌肉萎缩,所占比例为50.00%,随着病情加重,病蟹的肝胰腺糜烂呈浆糊化,并且具有黑鳃、灰鳃,胸腔积水及个别病蟹排泄肝胰腺等症状,蟹体有强烈的异味,所占比例为16.67%。

2.2 病原生物检测结果

寄生虫检测结果 病蟹体表和体内很少有寄生虫寄生,在患病严重的蟹体偶尔发现有累枝虫、钟形虫,30只病蟹中,有4只蟹检出有寄生虫寄生,所占比例为13.33%,其中2只蟹检出钟形虫,2只蟹检出累枝虫,数量很少,这些少量的纤毛虫不足以引起中华绒螯蟹发病,且在部分健康蟹的甲壳或鳃上同样能够检测出几个纤毛虫类寄生虫,30只健康蟹中,有5只检出有寄生虫寄生,所占比例为16.67%,其中3只检测出有少量的钟形虫,2只检测出有少量的聚缩虫,其他寄生虫未检出。

细菌学检测结果 病蟹体内分离到的优势菌有5株,分别是S077-1、S077-2、S077-3、S077-4、S077-5,参照周德庆^[3]和Bachanan等^[4]的研究结果,经鉴定有3株菌属于弧菌属(*Vibrio* sp.),在30只病蟹中出现的频率分别是16.67%、23.33%和10.00%,1株菌属于希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)出现频率为20.00%,1株菌属于不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.),出现频率为10.00%,细菌回感试验,感染组和对照组中华绒螯蟹在养殖3个月内均未出现任何病症。

病毒学检测结果 病蟹组织除菌上清液接种健康蟹,接种蟹在养殖3个月内未见中华绒螯蟹出现“水瘪子”病样症状,负染电镜观察也未见除菌上清液中有病毒颗粒存在,且电镜观察病蟹组织也未见明显的病毒颗粒和包涵体。

2.3 正常中华绒螯蟹的组织学观察及病蟹组织病理变化

正常中华绒螯蟹肝胰腺的组织学观察和病蟹肝胰腺组织病理变化 同十足目的其他种类相似, 正常中华绒螯蟹的肝胰腺由无数肝小管组成, 肝小管是肝胰腺的结构和功能的基本单位, 肝小管的中央是管腔。每一肝小管都是由位于基膜上的单层柱状上皮细胞构成, 细胞核排列整齐, 细胞间界线清楚, 上皮细胞分为胚细胞(EC)、分泌细胞(BC)、吸收细胞(FC)和储存细胞(RC)(图版 I -1)。中华绒螯蟹在发病初期肝胰腺为淡黄色, 肝细胞大部分水肿、变性, 出现少量的转运泡和空泡, 细胞排列轻度紊乱(图版 I -2), 随着病情的发展, 肝小管柱状上皮细胞肿大加剧, 部分细胞间界线消失, 细胞出现融合, 空泡数量增多且体积增大(图版 I -3); 转运泡体积增大且转运泡内的颗粒物增多(图版 I -4); 基膜部分破裂, 且有部分肝细胞坏死, 可见坏死物落入管腔中(图版 I -5); 基膜与柱状上皮细胞完全分离, 肝细胞结构模糊, 部分细胞解体, 散落在管腔中(图版 I -6); 基膜与上皮细胞完全分离, 且基膜破裂, 部分细胞核碎裂或崩解, 内容物外流(图版 I -7); 肝小管结构消失, 仅见模糊的肝小管轮廓, 肝胰腺外观呈浆糊状(图版 I -8)。

正常中华绒螯蟹鳃的组织学观察和病蟹鳃病理变化 正常中华绒螯蟹每条鳃都由具有支撑和运输功能的鳃轴及向两侧发出的相互平行的鳃叶构成, 正常鳃叶由外向内分别是角质膜, 上皮细胞层和鳃腔, 其中网状的鳃腔由上皮细胞和柱状细胞共同形成, 鳃腔中有曲折迂回的通道, 有少量游离的血细胞(图版 II -1、2)。患病中华绒螯蟹鳃叶增厚, 上皮层破坏, 角质膜呈波浪状拱起, 甚至断裂, 上皮细胞排列不规则, 上皮细胞层出现空泡; 鳃腔扩大, 鳃腔中血细胞增多(图版 II -3、4)。

正常中华绒螯蟹肌肉的组织学观察和病蟹肌肉病理变化 中华绒螯蟹的附肢肌肉为横纹肌, 肌纤维排列整齐, 横纹清晰, 细胞核呈梭形或圆形, 位于细胞边缘(图版 II -5), 患病中华绒螯蟹, 纤维松散, 部分肌纤维轻度变性或横纹消失(图版 II -6)。

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹“水瘪子”病的发病特征和流行情况

根据已做调查汇总^[9], 中华绒螯蟹“水瘪子”病主要在江苏省中华绒螯蟹主养区兴化发生, 并且是在2015—2016年才大面积暴发的疾病。据文献^[10]

记载, 该病的发生至少有7年之久, 之前的发病率较低, 并未引起人们的广泛关注, 2015年该病的大面积暴发给兴化的中华绒螯蟹养殖业造成了沉重的打击, 经济损失达10亿多元^[1]。该病在3—4月份就开始大量出现, 在5—8月份上旬是该病的高发期, 死亡率较高, 在高温期过后, 死亡率逐渐下降直至达到平稳甚至恢复的状态。该病在仔蟹期、扣蟹期和成蟹期均存在, 对于仔蟹和扣蟹, 该病的危害主要是导致肝胰腺变成淡黄色或土黄色, 对于成蟹, 往往还会导致成蟹脱壳不遂或脱壳后很难钙化, 甲壳薄且脆。

3.2 中华绒螯蟹的病理特点

解剖病蟹可见病蟹的肝胰腺大多呈现水肿、萎缩、糜烂的状态; 头胸甲内有积液, 积液呈果冻状; 鳃丝水肿或伴有灰鳃、黑鳃; 附肢发软, 剪开附肢可见肌肉萎缩且有水状液体流出。病变组织石蜡切片观察结果显示, 病变最严重的器官是肝胰腺, 病情较轻的中华绒螯蟹, 肝胰腺的肝细胞水肿、空泡样变性、排列紊乱。肝胰腺呈浆糊状坏死的, 病理切片显示, 肝小管萎缩甚至结构消失, 细胞核崩解。鳃组织相对肝胰腺病变较轻, 主要症状为鳃叶增厚, 鳃组织中出现细胞浊肿, 鳃叶上皮细胞及柱状细胞广泛变性, 排列不规则, 角质膜呈波浪状拱起, 部分区域出现细胞坏死, 鳃腔扩张, 鳃腔中血细胞增多, 上皮细胞层出现空泡; 肌肉组织病变相对来说最轻, 主要表现为肌纤维松弛, 部分肌纤维变性或横纹消失。

依据本病的初步研究结果可推测中华绒螯蟹“水瘪子”病, 是一种严重的器官损害性疾病, 肝胰腺是主要的靶器官且病变最严重。肝胰腺是甲壳类动物重要的消化免疫器官, 其消化酶活力远超过肠道和胃^[11], 同时甲壳动物肝胰腺的也与物质的贮存、排泄和蜕皮周期有关^[12], 其重要的功能之一就是对毒物的分解作用, 大部分进入中华绒螯蟹体内的毒物都要肝胰腺分解为无毒物质。患“水瘪子”病的中华绒螯蟹, 肝胰腺发生严重的病理变化, 且局部发生坏死, 使中华绒螯蟹的肝胰腺功能受到严重损伤, 再加上中华绒螯蟹鳃组织细胞发生变性、坏死, 会直接影响到中华绒螯蟹的气体交换^[13, 14]。此时会发现中华绒螯蟹食欲下降或者不吃食, 由于摄食量减少或停止摄食, 长期的能量供应缺乏会对中华绒螯蟹本身的正常生理活动造成不可挽回的影响^[15]。病蟹出现活动缓慢, 上草或上岸不回, 活力下降, 大螯握力减少等症状。这也导致了病蟹免疫力下降, 更容易受到外界环境的影响, 出现死亡。

目前对中华绒螯蟹“水瘪子”病的诊断主要根

据其临床症状——肝胰腺萎缩坏死。但仅仅凭借这些发病症状来诊断中华绒螯蟹的“水瘪子”病,严格来说是不准确的。因为中华绒螯蟹生活的水环境复杂,水体理化因子的突变或持续性毒害以及水体中存在的多样性病原都可能使中华绒螯蟹发生病变,并且中华绒螯蟹的许多疾病均可能出现相似的症状。本文在患“水瘪子”病中华绒螯蟹组织器官中观察到的病理变化,如肝细胞空泡化、肝细胞坏死,鳃叶肿胀,细胞核破裂等是中华绒螯蟹“水瘪子”病的一个重要特征,根据这些特征可以准确诊断中华绒螯蟹“水瘪子”病。

3.3 发病原因

在对中华绒螯蟹“颤抖病”研究中,通过电子显微镜观察可在中华绒螯蟹病变组织内发现病毒颗粒^[13]、螺原体^[16]和类立克次氏体^[17]等病原生物,电镜观察患“水瘪子”病蟹的病变组织和病变组织上清液时,未见病毒颗粒等病原生物,且无菌滤液回感也未出现任何症状;寄生虫学检测极少见蟹体有纤毛虫寄生;在肝细胞坏死的肝组织和鳃中分离、纯化出5株优势菌,但是回感试验证实5株菌并非中华绒螯蟹“水瘪子”病的致病菌,并且研究发现随着病蟹病情的加重,感染细菌的量越多,由此确定坏死细胞及组织中出现的细菌是由于病蟹免疫力下降而导致的继发感染。除此之外,之前对中华绒螯蟹“水瘪子”病的发病情况^[9]进行调查时发现,在养殖方式上,养殖密度越高的发病率往往越高;用菊酯、敌百虫等高毒农药清塘的发病率明显比用生石灰、茶籽粕等无毒、低残留的高;同一养殖户不同塘口饲养的不同苗种发病率也有不同,但是并没有显示出对品种显著的依赖性;中华绒螯蟹养殖户在治疗中华绒螯蟹“水瘪子”病方面,无论是用杀虫药(对纤毛虫类有效的药),杀菌、抑菌药物(抗生素类)还是抗病毒药物(吗啉呱等)均无效。由此判断,生物性病原并不是引发中华绒螯蟹“水瘪子”病的关键因子。

患“水瘪子”病的病蟹其主要的病变组织为肝胰腺和鳃,其病理变化与斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[18]和小龙虾(*Orconectes propinquus*)受到异物^[19]或异常环境因子^[20]胁迫,中华绒螯蟹受到药害胁迫^[21]、高氨氮胁迫^[22]和饲喂含组织胺的饲料^[23],中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)受到高pH胁迫^[24],三疣梭子蟹在低盐胁迫^[25]时表现出来的病理特征相似,都是肝细胞的空泡样变性、出现转运泡、坏死和鳃叶增厚、上皮细胞变性、鳃角质膜拱起,局部空泡化,鳃腔

中血细胞增多。有研究表明,甲壳动物在环境胁迫条件下,会将自身储存的营养物质主要用于维持机体的基本生理代谢^[26],当胁迫因子超过肝胰腺的解毒能力时,肝胰腺的正常结构和生理功能将被破坏,肝细胞内空泡和转运泡数量增多,体积增大。有研究推测B细胞及其内部转运泡数量增多,体积增大有助于肝胰腺对营养物质的代谢吸收^[27]。还有研究表明转运泡内的颗粒物质和空泡中包裹的物质是胁迫机体的一些异物,转运泡和空泡能够将其排出体外,起到解毒的目的^[21, 22]。Rabin^[28]认为甲壳动物血细胞的功能主要有凝固、吞噬和合成糖原的功能,患病中华绒螯蟹鳃腔中血细胞增多,应该是血细胞通过对异物的吞噬作用或者释放能量以供鳃细胞利用,是机体的一种自我防御体现^[29-31]。比较这些病变特征,可以得出中华绒螯蟹是由于受到了一些毒害因子的胁迫,所以呈现出了“水瘪子”病样的症状,但是究竟是哪些有害因子导致中华绒螯蟹患“水瘪子”病,还需要进行进一步的研究。

3.4 致病机理

甲壳动物的体色的主要取决于类胡萝卜素的含量,中华绒螯蟹缺乏相关的酶系,所需类胡萝卜素必须从食物中获得。虾青素是体表色素中主要的类胡萝卜素,虾青素本身呈现红色,在与蛋白质结合后生产蓝色虾青素蛋白沉积于甲壳动物体表^[32]。与虾青素不同, β -胡萝卜素主要储存在甲壳动物的脂肪组织中,其本身的颜色因浓度的差异,可涵盖由橘红至黄色的所有色系,在肝胰腺中, β -胡萝卜素所占的比例高达42%—90%^[33],正因为 β -胡萝卜素的含量不同,致使甲壳动物的肝胰腺也呈现不同程度的黄色。虾青素和 β -胡萝卜素是甲壳动物防御系统中非酶促系统的重要成员,其中虾青素的单线态氧淬灭能力是 α -生育酚的100倍^[34], β -胡萝卜素是 α -生育酚的50倍^[35, 36],毒害因子胁迫往往会导致产生大量的活性氧自由基,对中华绒螯蟹造成氧化胁迫^[37],在中华绒螯蟹受到毒害因子胁迫时,虾青素和 β -类胡萝卜素很可能最先被动用清除体内的活性氧自由基,从而引起类胡萝卜素的含量减少,出现了“水瘪子”病蟹体色变黑和肝胰腺颜色退色变白的症状^[38]。还有一点就是类胡萝卜素是脂溶性的,不饱和脂肪酸的含量越高越有利于类胡萝卜素的吸收和沉积^[39],胁迫因子可以引起中华绒螯蟹脂质过氧化,使细胞膜脂肪酸的不饱和度降低,吸收和沉积类胡萝卜素的能力也随之降低^[40]。

肝胰腺不仅是甲壳动物重要的消化器官,同时也是重要的解毒器官,其组织结构的可在一定程度上反映生物体受胁迫的程度^[41]。甲壳动物在

受到胁迫时会将自身储存的营养物质主要用于维持机体的基本生理代谢^[26], 肝胰腺病变发白, 肝细胞空泡化将进一步造成肝胰腺代谢异常, 对营养物质的消化吸收能力降低, 从而导致全身性功能障碍, 免疫机能下降, 同时继发细菌感染会导致中华绒螯蟹的黑鳃、灰鳃等症状。甲壳动物的血细胞除有重要的免疫防御功能之外, 也和呼吸有关^[42], 鳃腔中血淋巴减少和血细胞凝集会严重影响中华绒螯蟹鳃的呼吸功能, 因此“水瘪子”病蟹容易缺氧, 上草、上边不回。“水瘪子”病蟹整体免疫机能的下降也使病蟹对外界环境的变化极为敏感, 在环境出现骤变或长途运输时很容易出现死亡。

3.5 中华绒螯蟹“水瘪子”病的科学定名

中华绒螯蟹“水瘪子”病是当地养殖户的俗称, 因为病蟹大多黄和肌肉不饱满, 有的甚至无黄, 且头胸甲内有积液, 剪断附肢也有水状液体流出, 为此养殖户形象地称之为“水瘪子”。从组织学和解剖学上来说, 蟹黄就是中华绒螯蟹的肝胰腺, 因此养殖户所说的无黄也就是中华绒螯蟹的肝胰腺不饱满, 健康中华绒螯蟹的肝胰腺呈橘黄色, 病蟹的肝胰腺颜色变淡, 且随着病情发展, 出现萎缩坏死。目前, 对于水产动物病害的研究, 存在一病多症、一症多病、同名异病和同病异名等问题, 给科研工作者带来很大的困难, 本文研究初步表明中华绒螯蟹“水瘪子”病为非生物性疾病, 根据病因和病症给予中华绒螯蟹“水瘪子”病科学的定名, 即中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合症(Hepatopancreatic necrosis syndrome, HPNS)。

参考文献:

- [1] Yang X L. Talk on the guide for aquatic animal disease research from “Shuibiezi” disease in *Eriocheir sinensis* [J]. *Scientific Fish Farming*, 2015,(10): 1—1 [杨先乐. 从河蟹“水瘪子”谈我国水产动物病害研究的导向. 科学养鱼, 2015,(10): 1—1]
- [2] Wu S Q. Aquatic Animal Parasitology [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2015, 6—12 [吴绍强. 水生动物寄生虫学. 北京: 中国农业出版社. 2015, 6—12]
- [3] Zhou D Q. Microbiology Laboratory Manual [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1986, 283—290 [周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科技出版社. 1986, 283—290]
- [4] Bachanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Baltimore: The Williams and Wilkins Company. 1984, 408—521
- [5] Yin Z, Liu J H. Animal Virology (the second edition) [M]. Beijing: Science Press. 1997, 305—306 [殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京: 科学出版社. 1997, 305—306]
- [6] Ding Z, Yao Y, Zhang F, et al. The first detection of white spot syndrome virus in naturally infected cultured Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis*, in China [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, **220**: 49—54
- [7] Lu C P, Zhu S, Guo F S, et al. Electron microscopic observation on a non-occluded-baculo-like virus in shrimps [J]. *Archives of Virology*, 1997, **142**(10): 2073—2078
- [8] Yang Y H, Wang L X, Li X Z, et al. Comparatives study on morphology and histology of digestive system of *Silurus lanzhouensis* and catfish (*Silurus asotus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(1): 174—181 [杨元昊, 王立新, 李学智, 等. 兰州鲇与鲇消化系统的形态学及组织学比较研究. 水生生物学报, 2017, **41**(1): 174—181]
- [9] Yang Z Y, Zhang Y L, Liu L S, et al. The morbidity situation of “Shuibiezi” disease in *Eriocheir sinensis* in 2015-2016 [J]. *Scientific Fish Farming*, 2016,(10): 54—55 [杨宗英, 张一柳, 刘力硕, 等. 2015-2016河蟹“水瘪子”病发病情况. 科学养鱼, 2016,(10): 54—55]
- [10] Zhang F X, Gu M, Zhang J L. Prevention and control measure of “shuibiezi” disease in *Eriocheir sinensis* [J]. *Scientific Fish Farming*, 2010,(8): 53 [张凤翔, 顾明, 张建楼. 河蟹“水瘪子”病的预防措施. 科学养鱼, 2010,(8): 53]
- [11] Zhou Y K, Liu L H, Chen L Q, et al. The change of digestive enzyme activity of hepatopancreas in the development of ovarian in *Eriocheir sinensis* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2005, **25**(2): 19—21 [周永奎, 刘立鹤, 陈立侨, 等. 卵巢发育过程中河蟹肝胰腺消化酶活力的变化. 水利渔业, 2005, **25**(2): 19—21]
- [12] Li F H, Li S J. Studies on the hepatopancreas of larval *Scylla serrata* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1988, **29**(1): 29—33 [李富花, 李少菁. 锯缘青蟹幼体肝胰腺的观察研究. 海洋与湖沼, 1988, **29**(1): 29—33]
- [13] Lu H D, Tian Q Q, Jia X X, et al. Pathological changes of shuibiezi diseased Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in the different stages of disease [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(6): 1242—1250 [陆宏达, 田全全, 贾相相, 等. 中华绒螯蟹水瘪子病不同发病阶段的病理变化特点. 水生生物学报, 2017, **41**(6): 1242—1250]
- [14] Pan L D. Pathogeny and histopathological study on “pectoral limb shiver” disease in farmed *Eriocheir sinensis* [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1998, **25**(6): 273—277 [潘连德. 养殖河蟹“抖抖病”的病原检验与病理学初步研究. 水产科技情报, 1998, **25**(6): 273—277]
- [15] Zhang Y. Histopathological study on hepatopancreas

- symptoms of *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai Ocean University, Shanghai. 2013 [张瑶. 中华绒螯蟹肝胰腺病症的病理分析. 硕士学位论文. 上海海洋大学, 上海. 2013]
- [16] 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
- [17] 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**(Pt 9): 3035—3040
- [18] Bautista M N, Lavilla Pitogo C R, Subosa P F, *et al.* Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon* [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1994, **65**(1): 5—11
- [19] Roldan B M, Shivers R R. The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinquus*) hepatopancreas and antennal gland [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1987, **86**(1): 201—214
- [20] Wang Q, Wang J G, Lu H D, *et al.* Chronic toxicity of zinc sulphate in *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, **19**(1): 126—137 [王权, 王建国, 陆宏达, 等. 硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理. 中国水产科学, 2012, **19**(1): 126—137]
- [21] Zhang F. Accumulation characteristics and toxicity response to exposure to perfluorooctanesulfonate in Chinese mitten handed crab, *Eriocheir sinensis*, under different salinities [D]. East China Normal University, Shanghai. 2015 [张帆. 不同盐度下中华绒螯蟹对全氟辛烷磺酸盐的累积特征及毒性响应. 硕士学位论文. 华东师范大学, 上海. 2015]
- [22] Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(3): 412—418 [洪美玲, 陈立桥, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. 中国水产科学, 2007, **14**(3): 412—418]
- [23] Zhao L L. Effect of histamine on the digestive function, immune and ovarian development of *Neomysis* and *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai Ocean University. Shanghai. 2012 [赵柳兰. 组织胺对新糠虾和中华绒螯蟹的消化功能、免疫力以及卵巢发育的影响. 硕士学位论文. 上海海洋大学, 上海. 2012]
- [24] Zhao X Y. Effects of pH stress on Physiological and Biochemical indexes in three species of shrimps [D]. Shanghai Ocean University, Shanghai. 2011 [赵先银. pH胁迫对三种养殖对虾生理生化指标的影响. 硕士学位论文. 上海海洋大学, 上海. 2011]
- [25] Han X L, Gao B Q, Wang H F, *et al.* Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, **35**(1): 104—110 [韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响. 渔业科学进展, 2014, **35**(1): 104—110]
- [26] Yu H N. Effects of Environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei* [D]. Jinan University, Guangzhou. 2007 [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 硕士学位论文. 暨南大学, 广州. 2007]
- [27] Zhao W H, Wang Z S, Zhang Y X, *et al.* Effects of estradiol on fatty acid composition and tissue structure of hepatopancreas in *Macrobrachium nipponense* [J]. *Marine Fisheries*, 2014, **36**(6): 542—548 [赵卫红, 王资生, 张余霞, 等. 雌二醇对日本沼虾肝胰腺的脂肪酸含量及组织结构的影响. 海洋渔业, 2014, **36**(6): 542—548]
- [28] Rabin H. Hemocytes, hemolymph, and defense-reactions in crustaceans [J]. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 1970, **7**(2): 195—207
- [29] Lu J R, Lai W. Effects of cadmium on tissue and ultrastructure of gill of *Eriocheir sinensis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1991, **22**(6): 566—569 [卢敬让, 赖伟. 镉对中华绒螯蟹鳃组织结构及其亚显微结构的影响. 海洋与湖沼, 1991, **22**(6): 566—569]
- [30] Yang Z, Zhao Y, Li N, Yang J. Effect of waterborne copper on the microstructures of gill and hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and its induction of metallothionein synthesis [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, **52**(2): 222—228
- [31] Rubel A. Histological and electron microscopical observation on the effects of different salinities and heavy metalions on the gills of *Jeara nordmanni* [J]. *Cell & Tissue Research*, 1967, **167**(1): 65—95
- [32] Cianci M, Rizkallah P J, Olczak A, *et al.* The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3. 2-resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(15): 9795—9800
- [33] Mahaeajan A, Vaseehran B, Rajalakshmi S, *et al.* Effect of copper on morphology, weight, and chromosomal aberrations in the spiny lobster, *Panulirus homarus*, (Linnaeus, 1758) [J]. *Biological Trace Element Research*, 2011, **144**(1): 769—780

- [34] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. *Pure & Applied Chemistry*, 1991, **63**(1): 141—146
- [35] Di M P, Kaiser S, SIES H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1989, **274**(2): 532
- [36] Conn P F, Schalch W, Truscott T G. The singlet oxygen and carotenoid interaction [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 1991, **11**(1): 41—47
- [37] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea [J]. *Aquaculture*, 2000, **199**(1—3): 121—131
- [38] Chang G L, Cheng Y X, Wu X G, *et al.* Comparative studies of micro-ultrastructure and fatty acid composition of normal and albino hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 687—693 [常国亮, 成永旭, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹白化症、正常肝胰腺组织结构及脂肪酸组成的比较研究. 水生生物学报, 2008, **32**(5): 687—693]
- [39] Fox H M, Vevers G. The Nature of Animal Colors [M]. Sidgwick and Jackson, Ltd, London. 1960, 62
- [40] Cengiz E I, Kan Y, Kizmaz V, *et al.* The protective role of vitamin E on the fatty acid composition of phospholipid structure in gill and liver tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, **80**(2): 381—385
- [41] Papathanassiou E, King P E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus*, (pennant) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology*, 1984, **77**(2): 243—249
- [42] Xu X H, Zhang Y Q, Yan B L, *et al.* Immunological and histological responses to sulfide in the crab *Charybdis japonica* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, **150**(5): 144—150

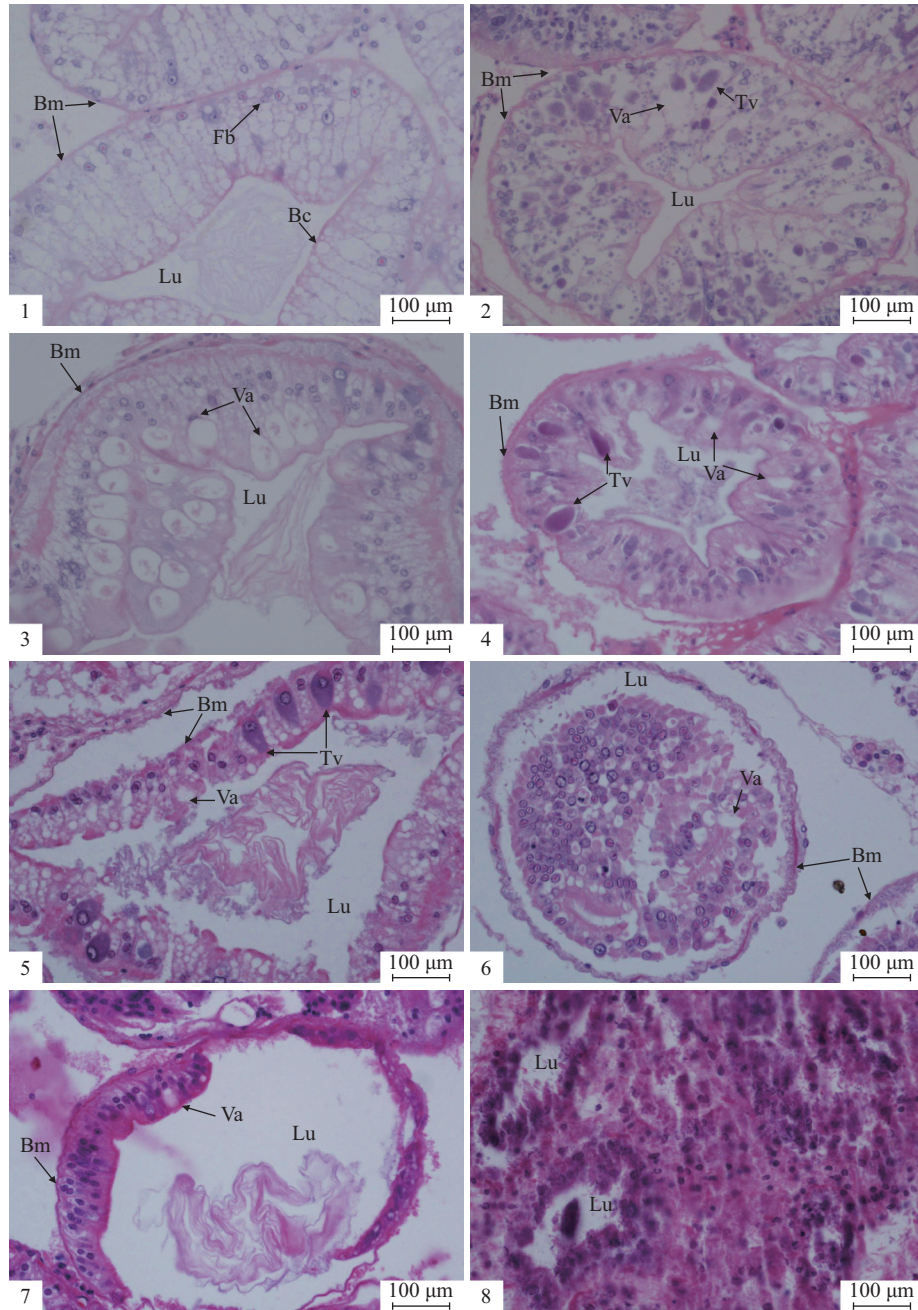
ETIOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL STUDY ON HEPATOPANCREATIC NECROSIS SYNDROME IN *ERIOCHEIR SINENSIS*

YANG Zong-Ying^{1,2}, ZHANG Yi-Liu¹, HU Kun¹, LIU Li-Shuo¹, CAI Hong-Gui³,
ZHANG Feng-Xiang⁴ and YANG Xian-Le¹

(1. State Collection Center of Aquatic Pathogen, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Nanchang Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330038, China; 3. Aquatic station of Anfeng townlet, Xinghua 225766, China; 4. Aquaculture Promotion Centers of Xinghua City, Xinghua 225700, China)

Abstract: A disease called “Shuibiezi” in *Eriocheir sinensis* was prevailed on Xinghua city, Jiangsu province since 2015, and slowly spread to other main areas of crab rearing in the whole nation. To explore the causes, the etiology by parasites examination, pathogenic bacteria isolation, challenge experiment and electron microscopy observation, and the histopathology by routine paraffin-section technique were conducted with healthy *E. sinensis* as control groups. Results showed that no pathogenic microorganism was detected by etiology research. Pathological changes with different degrees were observed in gills, muscles and hepatopancreas of diseased crabs, and the main pathological characteristics were gill tissue thickening, enlarged gill cavity, increased number of hemocyte, and marginalized nucleus. Vacuolization of the epithelial cells of the hepatopancreas and transferred vacuoles appeared. With the severity of the conditions, hepatic cells were irregular-arranged, and the number and volume of vacuoles and transferred vacuoles increased, and the number of granular materials in transferred vacuoles increased. With the most severe disease, the hepatic tubules were so ruptured that substances in cells were leaked, and the nucleus of hepatic cells were broken and hepatic cells appeared necrosis. The main lesion characteristics of muscle were muscular fibers appeared to be relaxed and pyknotic of nuclei. Etiology and incidence investigation revealed that the disease was caused by non living agents. Based on the main pathological characteristics and pathogenesis, this disease nominate scientifically as hepatopancreatic necrosis syndrome.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Hepatopancreatic necrosis syndrome; Etiology; Histopathology

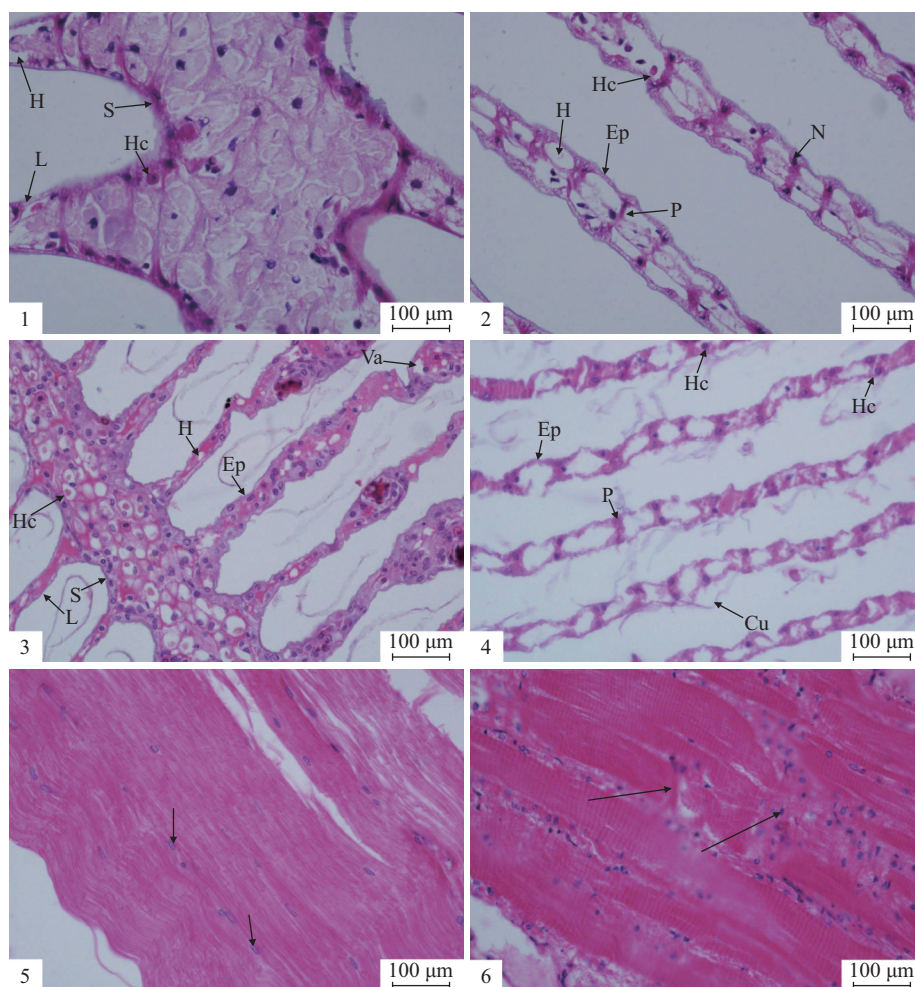


图版 I 对照组和患病中华绒螯蟹肝胰腺组织病理观察

Plate I The histology of hepatopancreas of control group and disease Chinese mitten crab

1. 正常肝小管(Ht), 肝细胞排列整齐, 管腔(Lu)清晰, 基膜(Bm)完整, 核圆形位于基底部, 示Bc(分泌细胞), Fb(储存细胞), $\times 400$; 2. 肝细胞部分空泡样变性, 少量的转运泡出现, 示空泡(Va), 转运泡(Tv), $\times 400$; 3. 肝小管管腔变形, 空泡数量增多, 体积增大, $\times 400$; 4. 转运泡数量增多, 体积增大, 转运泡内的颗粒物增多, 细胞排列紊乱, $\times 400$; 5. 管腔变性, 部分基膜破裂, 部分管壁细胞坏死, 落入管腔中, $\times 400$; 6. 基膜与单层柱状细胞之间完全分离, 肝细胞结构模糊, 部分细胞解体, 散落在管腔中, $\times 400$; 7. 基膜破裂, 部分细胞核碎裂或崩解, 内容物外流, $\times 400$; 8. 肝小管结构消失, 仅见模糊的肝小管轮廓, 呈无结构的组织团, $\times 400$

1. Normal hepatic lobule, hepatopancreas cells arranged well, lumen (Lu) clear, basement membrane (Bm) has integrity structure, nuclear circle located at base, arrows point the B cells (B) and R cells (R), $\times 400$; 2. Some hepatic cells appear cavity, some transferred vacuoles appear in B cells, arrows point vacuole (Va) and transferred vacuole (Tv), $\times 400$; 3. Showing lumen variant, the number of vacuoles increased and size enlarged, $\times 400$; 4. Enlarged size and increased number transferred vacuoles, and the number of granular materials in transferred vacuoles was increased, and hepatic cells arranged irregular, $\times 400$; 5. Lumen degeneration, part of the basement membranes were ruptured, some hepatic cells appear necrosis and fell into the lumen, $\times 400$; 6. Basement membrane was separated from epithelial cells, the structure of hepatic cells were fuzzy, some hepatic cells appear crushing and many cell debris appear in the lumen, $\times 400$; 7. Basement membrane was ruptured, some nucleus psychosis and broken, cell debris and contents flow out of the lumen, $\times 400$; 8. Hepatic lobule lose normal structure, only have vague outline of the lobule and vague tissue masses, $\times 400$



图版 II 对照组和患病中华绒螯蟹鳃和肌肉组织病理观察

Plate II The histology of gill tissue and limbs muscle of control group and disease Chinese mitten crab

1. 正常鳃, 示鳃轴(S)、鳃叶(L)、血腔(H)、血细胞(Hc), $\times 400$; 2. 正常鳃叶, 示上皮细胞(Ep)、血腔(H)、血细胞(Hc)、上皮细胞核(N)、柱状细胞(P), $\times 400$; 3. 病蟹鳃, 示鳃叶增厚, 上皮细胞排列不规则, 血细胞增多, 出现空泡(Va), $\times 400$; 4. 病蟹鳃, 示呈波状拱起甚至断裂的角质膜(Cu)、上皮层破坏程度加大、血细胞增多, 鳃叶腔扩大, $\times 400$; 5. 正常蟹横纹肌组织, 横纹清晰, 示细胞核呈圆形或梭形位于细胞边缘, $\times 400$; 6. 病蟹肌肉组织, 示部分肌纤维变性或横纹模糊, $\times 400$

1. Normal gill, showing the gill axis (S), gill lobe (L), blood cavity (H), hemocyte (Hc), $\times 400$; 2. Normal gill lobe, showing epithelial cells (Ep), blood cavity (H), heocyte (Hc), epithelial cell nucleus (N), Pillar cell (P), $\times 400$; 3. Gill of diseased crab, showing increased number of hemocyte (Hc), irregular-arranged, and vacuoles appear in the epithelial cells, $\times 400$; 4. Gill of diseased crab, showing the cuticle (Cu) arched upward in waveform or was ruptured, the degree of epithelial cells deterioration aggravated, part of gill lobe cavity expansion, and the number of hemocyte were increased, $\times 400$; 5. Normal muscle tissue, showing the muscle fiber (MF), the nucleus was located in the cell edge, $\times 400$; 6. Muscle tissue of diseased crab, showing part of the muscle fibers transverse blurred, $\times 400$