

中华绒螯蟹“颤抖病”病原、 病理学初步研究^{*}

顾志峰¹ 王 文¹ 杜开和¹ 吴庆龙^{2**} 李文朝² 陈亚芬²

(1:南京师范大学生命科学学院,南京 210097;2:中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京 210008)

提 要 本文对健康和患“颤抖病”的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)进行超微病理学研究,在病蟹中发现类立克次体生物大量寄生。该微生物多呈球状或棒状,直径在 $0.22 - 0.35\mu\text{m}$ 之间,具细胞壁和细胞膜,但无典型的细胞核。该微生物在发病初期主要出现于血细胞中,发病晚期大量出现于鳃腔中和心脏、附肢肌肉、消化道、消化腺和生殖腺中的结缔组织及神经胶质中,回感实验表明该生物是江苏淮阴地区河蟹“颤抖病”的病原体,还对其致病机理进行了初步分析和讨论。

关键词 中华绒螯蟹 颤抖病 类立克次体 病理学

分类号 Q939.3

中华绒螯蟹俗称“河蟹”,是我国淡水名产之一,我国许多地区有大规模的养殖。随着养蟹业不断发展,河蟹病害问题日益突出,其中较严重的病害是近年来流行的“颤抖病”,又称“环爪病”、“抖抖病”。该病一旦发生就难以控制,经济损失严重,因而引起有关部门的重视,并对该病的病原体检测等进行了研究,但结果各不相同。有人认为病原体是以弧菌为主^[1],有人则认为可排除细菌、寄生虫和病毒等病原微生物的致病性^[2],有的发现了病毒或病毒样颗粒^[3-5]。

作者自1999年起开始对本病进行了病原检测和防治等方面的研究,发现了病蟹体内类立克次体生物(ROs)的大量寄生^[6]。通过对该微生物的形态、入侵部位、在组织中的特性以及回感实验等研究和分析,认为ROs是江苏省淮阴地区河蟹“颤抖病”的病原体。此外还就该地区河蟹“颤抖病”的致病机理等进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 正常河蟹采集

1999年7月15日和2000年7月20日两次从苏州东太湖地区未发生过河蟹病害的成蟹养殖场采集健康河蟹,共50只,每只体重为50-75g,带回后养于250L水族箱,水族箱备有加热、过滤、充气等设备,内种植苦草,投喂玉米、活螺蛳肉,隔两天换经曝气的自来水。

1.2 病蟹采集

1999年6月-9月先后三次从江苏省洪泽县老子山镇、仁和镇和泗洪县临淮镇等地河蟹养殖场采集已经出现“颤抖病”病症的病蟹;2000年6月-7月先后五次从江苏金湖县、淮安县的河蟹养殖场采集具有典型“颤抖病”症状的病蟹,共计300多只,每只体重为30-100g。对于

* 中国科学院与江苏省院省合作研究项目。

收稿日期:2000-10。顾志峰,男,1975年生,在读研究生。

** 通信联系人, E-mail: qlwu@niglas.ac.cn

具有典型颤抖病症状的濒死病蟹,当场活体解剖,采集河蟹的主要组织和器官,4%戊二醛固定,放入冰瓶带回;表现发病初期症状和典型发病症状的病蟹带回,室温饲养于多个 30L 的水箱中,箱中放置少量苦草、充气,每天换经过曝气的自来水。

1.3 电镜制样、切片与观察

戊二醛固定的健康和患病河蟹的组织块经过进一步修小后,锇酸固定, Epon812 包埋,Recherd-Jung 超薄切片机半薄切片,切片厚 $1\mu\text{m}$,亚甲兰染色,光镜下观察并拍照;半薄切片定位后进行超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,日立 H-6000 型透射电镜观察并拍照。

1.4 血液涂片与染色

用 75% 酒精擦净河蟹体表,从基部拔去第四对步足,使血液流出,滴于干净载玻片上,涂成薄层,火焰干燥, Giemsa 染色,酒精脱水分色,树脂封片。

1.5 人工感染

2000 年 6-9 月在对濒死河蟹进行主要组织和器官的电镜制样及血液涂片的同时,取其血液,进行人工感染试验。人工回感试验分成三组进行:第一组将 2 只发病中期的病蟹与 4 只正常蟹放于同一水箱内混养,并在水箱内滴加濒死病蟹的血液;第二组将 4 只正常蟹第四对步足剪去,然后与发病中期的 2 只病蟹放于同一水箱混养,并在水箱滴加濒死病蟹的血液;第三组将病蟹血液用注射器从健康蟹的第四对步足的基部注射到体内,每只注射 0.1mL,放于一水箱饲养,每组用四只。另外取 4 只健康蟹,注射等量生理盐水作为对照。饲养水为经曝气的自来水,试验温度控制在 $26-28^{\circ}\text{C}$ 。

在以上试验基础上再对有效感染的实验组进行 4 次重复实验。感染试验后期按照同样方法进行电镜制样和切片及血液涂片和染色,并进行超微病理学观察研究。

2 试验结果和分析

2.1 病蟹症状

在野外土池中,病蟹在发病初期表现为不食,活动少,常伏于水底不动或上岸不回,第四对步足无力。到发病中期时,症状更加明显,病蟹只是吐沫,不能长距离爬动,翻身后不能自己翻回,遇惊吓时步足常出现剧烈颤抖。到发病晚期,病蟹的受惊反应不明显或无,步足无力,仅可见两眼和触角竖立,解剖时发现心脏还在跳动。

2.2 人工感染试验

第一和第二组的与健康蟹混养的病蟹在第三、第四天后出现死亡,而正常蟹在饲养一个月后仍正常。第三组人工感染的健康蟹在第 3d 至第 7d 即出现发病症状,症状与池塘养殖过程中出现的河蟹“颤抖病”病症相同,第 10d 左右陆续出现死亡。而随后按照同样方法用病蟹血液注射进行回感实验 4 批,结果相同。

2.3 光镜观察结果

在低倍镜下,正常蟹与病蟹的组织结构差异性不明显,但在高倍镜下能观察到病蟹各器官的结缔组织被破坏的情况。这些区域的细胞肿胀,空泡化。

2.4 电镜观察结果

在患“颤抖病”的河蟹(包括感染患病的河蟹)的步足肌肉、鳃、中肠、后肠、心脏和生殖腺等组织中均发现了类立克次体生物(Rickettsia-like organisms,简称 RLOs)(图版 I 2-6,图版 II 8

-12, 图版Ⅲ-14), 而取自其他地区的正常河蟹中则从未发现这种微生物(图版Ⅰ-1, 图版Ⅱ-7)。RLOs 常呈球状或棒状, 直径在 $0.22-0.35\mu\text{m}$ 之间, 具细胞壁和细胞膜, 但无典型的细胞核, 在细胞中央有类似核区的结构, 电镜下这部分为深着色区, 其周围具有丰富的丝状结构(图版Ⅰ-6▲所示), 胞体中有分散的核糖体分布(图版Ⅰ-6)。在 RLOs 不同发育时期, 核糖体浓度有所差异, 故常可见到明暗两种形态(图版Ⅰ-5)。此外, RLOs 的形态也随不同发育时期而变化很大。繁殖分裂期间, 其常呈现哑铃状、锥状、月牙状等不规则体(图版Ⅰ-5)。

在发病程度不同的个体中, RLOs 的数量、感染部位也不同。在发病中期的中华绒螯蟹中, RLOs 主要分布在血液、鳃、心脏中的血细胞中, 常可见 RLOs 在血细胞中靠近细胞核形成包涵体(图版Ⅰ-2, 3)。

在发病晚期的中华绒螯蟹中, RLOs 广泛分布于各组织中。在鳃腔中, 有的血细胞已经解体, 仅可见血细胞中的颗粒残留在鳃腔中, RLOs 释放出来, 散于鳃腔中; 有的血细胞中出现一个大的空泡, 内有零星的 RLOs; 在血细胞一边可见散出的微生物。在个别发病晚期病蟹的鳃上皮细胞和角质层之间的空隙中, 可见类病毒颗粒(Virus-like particles, 简称 VLP)。

在发病晚期的病蟹心脏中, 有时可见解体的血细胞, 但细胞核完整, 细胞核边有一个 RLOs 包涵体, 外面的包膜出现破裂。RLOs 还大量入侵心肌细胞, 分布于心肌细胞的肌纤维膜中以及相邻心肌细胞之间的肌纤维膜中(图版Ⅱ-8), 或单个游离, 或两到三个到几十个聚集, 但无论单个游离还是多个聚集, 其外面也有一层膜包裹。由于 RLOs 的入侵, 使心肌膜与外面的基质之间形成较大的空隙。在肌原纤维之间很少发现病原体。

在发病晚期的病蟹足步肌肉中, RLOs 入侵肌肉细胞情况与其入侵心肌细胞的情况类似, 主要分布于肌纤维膜中。在肌肉中的毛细血管中, 可见有零星的 RLOs 分布(图版Ⅰ-4)。在肌细胞中的胞质中, RLOs 常多个聚集在一起, 在肌原纤维中, RLOs 常单个或两到三个分布于肌质网中(图版Ⅱ-9, 图版Ⅲ-16)。由于 RLOs 的入侵, 肌丝的走向区域紊乱, 轮廓模糊。

在发病晚期的病蟹的消化道中, RLOs 主要分布于上皮细胞下面和肌层之间的固有膜中。在肌层的肌原纤维之间, RLOs 也大量分布(图版Ⅱ-10)。

在发病晚期的病蟹的雄性生殖腺中, RLOs 分布于曲精小管之间的结缔组织中以及输精管上皮细胞下的结缔组织中(图版Ⅱ-12)。在结缔组织的内皮细胞中, 可见该微生物充满整个管腔。有时也发现该微生物在上皮细胞中聚集。在卵巢中, 该微生物分布于生殖上皮外的结缔组织中以及结缔组织中的血细胞中(图版Ⅱ-11)。

在发病晚期的病蟹的神经组织(胸神经节)中, RLOs 的侵染也同其它器官类似, 主要侵染神经组织的结缔组织——神经胶质。在该处的血管和细胞间隙中, RLOs 也大量分布(图版Ⅲ-15)。与健康河蟹的神经组织(胸神经节)相比较, 可明显发现病蟹神经组织结构模糊, 神经细胞间隙扩大, 部分细胞空泡化。

2.5 血液涂片观察结果

中华绒螯蟹血细胞可分为三类: 无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞。颗粒细胞体积较大(图版Ⅲ-13▲所示), 小颗粒细胞(图版Ⅲ-13△所示)和无颗粒细胞(图版Ⅲ-13*所示)体积较小^[6]。正常蟹血液中颗粒细胞较多, 而发病蟹血液中颗粒细胞明显减少, 小颗粒细胞质中常可见 Giemsa 阳性反应区域(图版Ⅲ-14*所示), 有时可见膨胀破裂的小颗粒细胞(图版Ⅲ-14△所示)。晚期病蟹的血液明显稀化, 不如正常蟹粘稠。

3 分析和讨论

3.1 “颤抖病”病原体归属

根据电镜观察结果,从该微生物的大小、个体和群体形状、内部结构、寄生部位及其在细胞内的繁殖方式,可以判定其为类立克次体生物.在患“颤抖病”中华绒螯蟹中的胸部附肢肌肉、胸部神经节、血液、心脏、消化道、消化腺(中肠腺)和生殖腺中都发现大量 RLOs,而作为对照组的正常中华绒螯蟹各器官组织中则从未发现 RLOs,表明 RLOs 与颤抖有密切的关系.患病中期的中华绒螯蟹表现出不食,步足阵发性的颤抖等症状,而 RLOs 在肢体肌肉中大量分布,直接侵染称为肌肉“动力库”——钙库的肌质网,还破坏肌细胞的肌体纤维膜和肌原纤维;同时河蟹的神经胶质被破坏,部分神经细胞功能可能受损,细胞间隙扩大,神经系统也受到了严重损害,从而导致了河蟹的肢体无力和颤抖;此外 RLOs 还经血淋巴侵染循环系统、消化系统和生殖系统,可能造成不食、无力等全身性的症状.由此推断,RLOs 是导致江苏省淮阴地区中华绒螯蟹患“颤抖病”的主要病原体.

在个别患颤抖病晚期的中华绒螯蟹的鳃组织中,除了发现 RLOs 外,也偶尔发现了类病毒颗粒,但是数量很少.在观察的所有典型病蟹中,只有一只病蟹的鳃中发现类病毒颗粒,而 RLOs 则遍布整个机体结缔组织和肌肉.由于病蟹体质差,机体免疫力下降,其他病原体有可能乘虚而入,因此作者认为该病蟹鳃中的病毒感染很可能是并发感染.

立克次体可在节肢动物的各种器官内寄生^[7].中华绒螯蟹属于节肢动物,而“颤抖病”又以肢体阵发性颤抖为主要症状,可以判定其体内肌肉系统(包括心肌、胸肢肌、肠道肌等)和神经系统及各器官的结缔组织中大量的 RLOs 侵染是引起该症状的主要原因.由于 RLOs 体积小,其侵染和繁殖方式特殊,因而在光镜和电镜观察中很容易被忽视.

有关 RLOs 感染甲壳类水产动物并引起严重疾病的报道较多. Bonami 等^[8]发现一种蟹(*Carcinus mediterraneus*)的鳃、消化道、消化腺、生殖腺中有 RLOs 分布,RLOs 在结缔组织细胞的空泡中繁殖. Johnson^[9]在患病蓝水蟹(*Paralithodes platypus*)的消化腺上皮中发现大量的 RLOs 感染. Ketterer 等^[10-12]在其他水生甲壳类体内也发现 RLOs 的侵染.以上由 RLOs 引起的疾病死亡率都很高.

3.3 病原体的致病机理

根据电镜观察结果,在发病初期的病蟹中,RLOs 主要出现于血细胞中,在血细胞中大量繁殖.发病晚期的中华绒螯蟹中,病原体才在附肢肌肉、心脏、消化道结缔组织、生殖腺结缔组织中大量发现,这些部位都有大量的血管分布,这表明 RLOs 在血细胞中繁殖,并随血细胞带至全身各个组织和器官中,引起中华绒螯蟹患病.在这些被感染的器官和组织中的结缔组织中都有大量 RLOs,而在上皮组织中却未见到,这表明 RLOs 侵染具组织特异性. RLOs 主要侵染血细胞中的小颗粒细胞,这在和电镜、光镜下都得到证实(图版 I-2,图版 III-14).多个菌体要在小颗粒细胞的胞质空泡中形成光镜下可见的桑葚状的包涵体(inclusion)和电镜下的聚集体,也可见单个菌体在细胞质内. RLOs 以内陷的形式进入宿主细胞,形成感染早期的内吞体(endosome),并大量生长繁殖,形成电镜下可见的含菌空泡样结构(图版 I-2).空泡与溶酶体不发生融合,以致 RLOs 进入小颗粒细胞后避免了溶酶体等胞质内杀菌和抑菌物对它们的破坏作用,此时的小颗粒细胞已不再是机体中的防御细胞,而是 RLOs 的滋生地和传播体. RLOs

成熟后,小颗粒细胞破裂瓦解(图版 I-5),将大量 RLOs 释放出来,进一步感染其他细胞或靶组织——结缔组织。以上特征与立克次体目中的埃立克次体(*Ehrlichia*)的特征很相似^[7]。故推测该致病 RLOs 可能属于埃立克次体类。RLOs 在蟹个体之间如何相互感染及在养殖池塘中的传播途径等还有待进一步探讨,这可能与中华绒螯蟹的开放式循环有关。

参 考 文 献

- 1 杨先乐,蔡完其.中华绒螯蟹“抖抖病”流行情况初步调查.水产科技情报,1998,25(6):278-279
- 2 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
- 3 陆宏达,范丽萍,薛美.中华绒螯蟹小核糖核酸病毒及其组织病理学.水产学报,1999,23(1):61-68
- 4 何介华,贺路,曾令兵等.中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究.淡水渔业,1999,29(3):10-11
- 5 陈辉,薛仁宇,贡成良.中华绒螯蟹 1 中球状病毒颗粒的电镜观察.中国水产科学,1999,6(3):114-115
- 6 顾志峰等.患“颤抖病”中华绒螯蟹体内类立克次体生物的寄生.湖泊科学,2000,12(3):289-290
- 7 森胜囊.无脊椎动物的生体防御,学会出版センター[东京].1992.182-198
- 8 喻树荣等.立克次体与立克次体病.北京:军事医学科学出版社.1999.142-153
- 9 Bonami J R, R Pappalardo. Rickettsial infection in marine crustacea. *Experientia*, 1980, 36:180-181
- 10 Johnson P T. A rickettsia of the blue king crab, *Paralithodes platypus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1984, 44:112-113
- 11 Ketterer P J, D J Taylor, H C Prior. Systemic rickettsia-like infection in farmed freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. In: M Shariff, R P Subasinghe, J R Arthur eds. Diseases in Asian Aquaculture (I); Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Philippines, 1992.173-179
- 12 Bower S M, G R Meyer, J A Boutillier. Stained prawn disease (SPD) of *Pandalus platyceros* in British Columbia, Canada, caused by a rickettsial infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 24:41-54
- 13 Bower S M, McGladdery S E, Price I M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994, 4:1-199

Etiological and Pathological Study on “Appendage Shaking Disease” of *Eriocheir sinensis*

GU Zhifeng¹ WANG Wen¹ DU Kaihe¹
WU Qinglong² LI Wenchao² CHEN Yafen²

(1: College of Biological Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China;

2: Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

Abstract

In this paper, the pathology of “Appendage Shaking Disease” is studied by comparing normal and affected crabs via ultratructural investigation. A microorganism, whose size is between virus and bacterium, measured 0.22 - 0.35 μ m, is granular or clavate, bounded by a cell wall and a membrane, but it has no nucleus. In early stage of infection, the microorganisms are mainly located in blood cells, and in the last stage, most RLOs are distributed in the connective tissue of

nervous organization, gill cavity, heart, periopod muscle, and digestive system. According to their size; shape, inner structure, locating places, and propagation mode, it can be inferred that they are Rickettsia-like organisms (RLOs) which should be the pathogens of "Appendage Shaking Disease". The pathogeny of RLOs is analyzed and discussed in this paper as well.

图版说明 (Captions of plates)

图版 I :

- 1 正常蟹鳃组织中的血液细胞, 示小颗粒细胞超微结构($\times 4000$); The hemolymph cell in the gill of normal crab, showing the ultrastructure of semigranular cell ($\times 4000$);
- 2 病蟹组织中的血液细胞, 示 RLOs 侵入小颗粒细胞的胞质空泡内并大量繁殖增生($\times 4000$); The hemolymph cell in the tissue of affected crab, showing RLOs had invaded vacuole in the semigranular cell and was propagating in a great number ($\times 4000$);
- 3 病蟹心肌组织中的小颗粒细胞, 示细胞破裂瓦解, RLOs 已释放出来, 空泡中还存留一些 RLOs($\times 4000$); The semigranular cell in the heart of affected crab, showing the cell was disintegrating and RLOs are released, only a few RLOs left in the cell ($\times 4000$);
- 4 病蟹附步足肌肉组织中的毛细血管, 示管内游离的 RLOs($\times 8000$); The capillary in the periopod muscle of affected crab, showing the free RLOs in the capillary ($\times 8000$);
- 5 病蟹心肌血液的小颗粒细胞中处在繁殖增生期的 RLOs($\times 12000$); The semigranular cell in the heart of affected crab, showing RLOs was propagating in the semigranular cell ($\times 12000$);
- 6 放大的 RLOs, 示其细胞壁和核区($\times 60000$); The amplified RLOs, showing the cell wall and nuclear area ($\times 60000$);

图版 II

- 7 正常蟹心肌细胞($\times 3500$); The myocardium of normal crab ($\times 3500$);
- 8 病蟹心肌组织中大量的 RLOs 侵染($\times 10000$); RLOs invading the myocardium of affected crab in a large number ($\times 10000$);
- 9 病蟹步足肌肉细胞肌质网中的 RLOs($\times 17000$); RLOs in the sarcoplasmic reticulum of periopod muscle in affected crab ($\times 17000$);
- 10 病蟹后肠粘膜下层结缔组织中的 RLOs($\times 8000$); RLOs invading the submucosa connective tissue of hindgut in affected crabs ($\times 8000$);
- 11 病蟹卵巢结缔组织中的血淋巴细胞内的 RLOs($\times 5000$); RLOs in the hemolymph cell of the connective tissue in affected crabs' ovary ($\times 5000$);
- 12 病蟹精巢结缔组织中的 RLOs($\times 8000$); RLOs in the connective tissue of spermary in affected crabs ($\times 8000$);

图版 III

- 13 正常蟹血液细胞涂片 Giemsa 染色后, 示三种类型的血细胞($\times 120$); The blood film stained with Giemsa solution of normal crab, showing three kinds of hemolymph cells ($\times 120$);
- 14 病蟹血液细胞涂片 Giemsa 染色后, 示无颗粒细胞(*所示)和小颗粒细胞质内 Giemsa 着色的 RLOs 包涵体($\times 300$); The blood film stained with Giemsa solution of affected crab, showing the hyaline cell (*) and the cytoplasmic RLOs inclusion in semigranular cell ($\times 300$);
- 15 神经组织中的类立克次体($\times 3000$); ROLs in the nerve tissue ($\times 3000$);
- 16 感染后病蟹附肢肌肉中的类立克次体($\times 25000$); ROLs in the periopod muscle of affected crabs by artificial infection ($\times 25000$);

Mi: 线粒体; R: 类立克次体; N: 细胞核; CW: 细胞壁; SR: 肌质网; T: T 管; MF: 肌纤维; My: 肌膜

Mi: mitochondria; R: Rickettsia-like organisms; N: nucleus; CW: cell wall; SR: sarcoplasmic reticulum; T: T tube; MF: muscle fiber; My: Sacrolemma





