

# 患“牛奶病”中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 主要组织病理观察

刘群<sup>1,2</sup>, 孙妍<sup>1,2</sup>, 魏俊利<sup>1,2</sup>, 董学旺<sup>1,2</sup>, 陈浩楠<sup>1,2</sup>, 王菁<sup>1,2</sup>, 张丹<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>天津市动物疫病预防控制中心, 天津

<sup>2</sup>天津市水生动物疫病监测中心, 天津

<sup>3</sup>天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津

收稿日期: 2022年5月21日; 录用日期: 2022年6月1日; 发布日期: 2022年6月10日

## 摘要

应用组织病理学方法, 对患“牛奶病”中华绒螯蟹肝胰腺、肌、肠组织进行观察。结果显示, 病蟹活力较弱, 对外界刺激反应慢或基本不反应, 头胸甲腔内蓄积有乳白色血淋巴, 头胸部肌组织及步足基部关节膜连接处呈不透明乳白色, 肝胰腺呈白色半流体糜烂状; 肝胰腺细胞排列紊乱, 部分基膜破裂, 多数细胞核固缩、溶解, 存在大量空泡并游离于小管腔, 有大量呈蓝色嗜碱性菌体聚集、堆积; 部分肠粘膜脱落并游离于肠腔, 脱落部位的单层柱状细胞排列较松散, 结缔组织层增大变厚, 存在大量呈蓝色嗜碱性菌体堆积; 肌纤维排列紊乱, 呈结构性肿胀、断裂、溶解、坏死, 部分细胞完全溶解消失, 肌纤维束排列松散、不规则, 纤维间结缔组织被蓝色嗜碱性菌体浸润。

## 关键词

中华绒螯蟹, 牛奶病, 组织病理

# Histopathological Observation of Emulsification Disease in Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*

Qun Liu<sup>1,2</sup>, Yan Sun<sup>1,2</sup>, Junli Wei<sup>1,2</sup>, Xuewang Dong<sup>1,2</sup>, Haonan Chen<sup>1,2</sup>, Jing Wang<sup>1,2</sup>,  
Dan Zhang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

<sup>2</sup>Tianjin Surveillance Center of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin

<sup>3</sup>Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture, College of Aquatic Products, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: May 21<sup>st</sup>, 2022; accepted: Jun. 1<sup>st</sup>, 2022; published: Jun. 10<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 刘群, 孙妍, 魏俊利, 董学旺, 陈浩楠, 王菁, 张丹. 患“牛奶病”中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)主要组织病理观察[J]. 水产研究, 2022, 9(2): 48-54. DOI: 10.12677/ojfr.2022.92006

## Abstract

Histopathological methods were used to observe the hepatopancreas, muscle and hindgut of Chinese mitten crab suffering from emulsification disease. Results showed that the clinical signs of the disease included weakly vitality, slow or unresponsive response to external stimuli, emulsify hemolymph, opaque whitish muscle at cephalothorax and base of claw joints, white semi-fluid emulsified hepatopancreas; Cell arrangement was disordered, part of the basal membrane ruptured, most of the nucleus shrunk and dissolved, there were a large number of vacuoles and free in the small tubular cavity, a large number of blue basophilic bacteria gathered and accumulated; part of the intestinal mucosa was shed and free of the intestinal lumen, the monolayer of columnar cells at the site of detachment was loosely arranged, the layer of the connective tissue was enlarged and thickened, a large number of blue basophilic bacteria accumulated; The arrangement of muscle fibers was disordered, showing structural swelling, rupture, dissolution, and necrosis, some cells were completely dissolved and disappeared, the arrangement of muscle fiber bundles was loose and irregular, and the connective tissue between fibers was infiltrated by the blue basophilic bacteria.

## Keywords

*Eriocheir sinensis*, Emulsification Disease, Histopathological Observation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的淡水经济养殖品种,深受广大消费者喜爱,在水产养殖中占有重要地位。近年来,随着人们对其需求越来越大,养殖规模不断增大,产量日益提高,2020年中国中华绒螯蟹养殖产量达77.5万吨[1]。在中华绒螯蟹养殖中,病害问题频繁发生,如马红丽等[2]、Bao等[3]认为二尖梅奇酵母引起中华绒螯蟹“牛奶病”,由螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)感染引起的中华绒螯蟹(*E. sinensis*)“颤抖病”[4],由副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) [5]和鳃弧菌(*V. anguillarum*) [6]等引起的弧菌病,肝胰腺坏死病(hepatopancreatic necrosis disease, HPND) [7],以及由纤毛虫引起的寄生虫病[8]等,已在国内主要养殖地区相继发生,并呈逐年增加趋势,对养殖产业造成了巨大经济损失。

2021年3月,天津市宁河区某养殖场发现部分发病严重的中华绒螯蟹(*E. sinensis*)肢体无力,肝胰腺呈白色半流体糜烂状,头胸甲内蓄积大量牛奶状乳白血淋巴,养殖户称其为“牛奶病”。本文前期研究基础证实二尖梅奇酵母是本案例“牛奶病”的病原,但目前对该病引起的组织病理变化相关报道相对较少。为此,本研究对患“牛奶病”中华绒螯蟹进行了组织病理学分析,以了解其主要病灶组织肝胰腺、肌、肠等组织病理变化,从而为中华绒螯蟹“牛奶病”的临床诊断和防治提供一定的理论参考。

## 2. 材料与amp;方法

### 2.1. 实验用蟹

患“牛奶病”和健康中华绒螯蟹(*E. sinensis*)均采自天津地区某中华绒螯蟹养殖场,体质量15g左右,

以头胸甲内蓄积乳白色血淋巴典型症状的中华绒螯蟹[2] [3]作为病理学研究材料。通过对健康中华绒螯蟹进行感官判断后,采用细菌 16S rDNA 通用引物[9]、真菌 18S rDNA 通用引物[10]进行分子生物学指标判定,确认无病原体后使用。

## 2.2. 实验用蟹样品取样

无菌条件下解剖症状典型病蟹,剪取肝胰腺、肌、肠组织,用于组织病理观察的组织块(不超过 0.5 cm<sup>3</sup>)置于 Davidson's AFA 固定液固定。

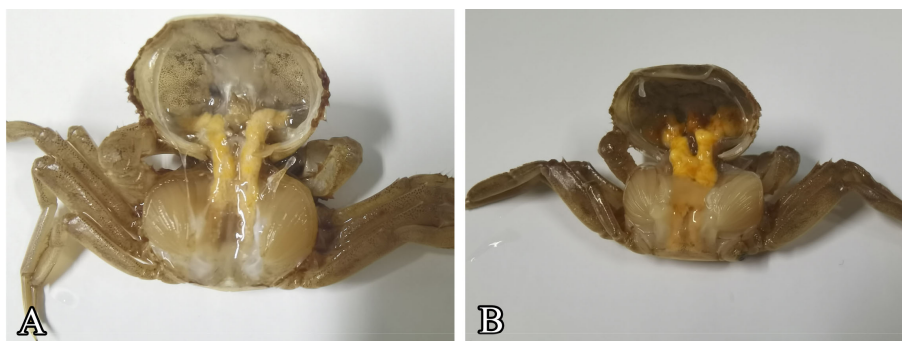
## 2.3. 石蜡切片制备与观察

用于组织病理观察的组织块固定 24 h 后置于 70%乙醇(体积分数),浸泡 36 h 后即可制备病理切片。参考刘群等[11]所述石蜡切片制备方法进行组织病理观察和分析。

## 3. 结果

### 3.1. 病蟹临床症状与组织病理观察

通过对病蟹(图 1(A))、健康蟹(图 1(B))外观观察比较,病蟹活力较弱,对外界刺激反应慢或基本不反应,肢体无力,摄食减少,体表未见异常,大多仍可存活于暂养池 15 d 左右而不死亡,掀开头胸甲可见其腔内蓄积乳白色血淋巴,头胸部肌组织呈不透明乳白色,肝胰腺呈白色半流体糜烂状,观察步足肌组织可见其基部关节膜连接处肌组织呈不透明乳白色。



注: (A) 自然发病蟹表现; (B) 健康蟹表现。

**Figure 1.** Clinical symptoms of *Eriocheir sinensis* cultured in the temporary pond  
**图 1.** 养殖场所采集蟹临床症状

### 3.2. 组织病理观察

#### 3.2.1. 肝胰腺组织病理观察

病蟹肝胰腺细胞排列紊乱,细胞质较疏松,多数细胞核固缩、溶解;肝胰腺小管上皮细胞异常,排列较为疏松,间隙明显,存在较多红细胞和大量呈蓝色嗜碱性菌体聚集、堆积;部分基膜破裂,上皮细胞存在大量空泡并游离于小管腔(图 2(A))。对比健康蟹肝胰腺组织结构界限清晰,肝胰腺小管上皮细胞核多位于基底部,排列紧密、整齐,呈椭圆形或圆形(图 2(B))。

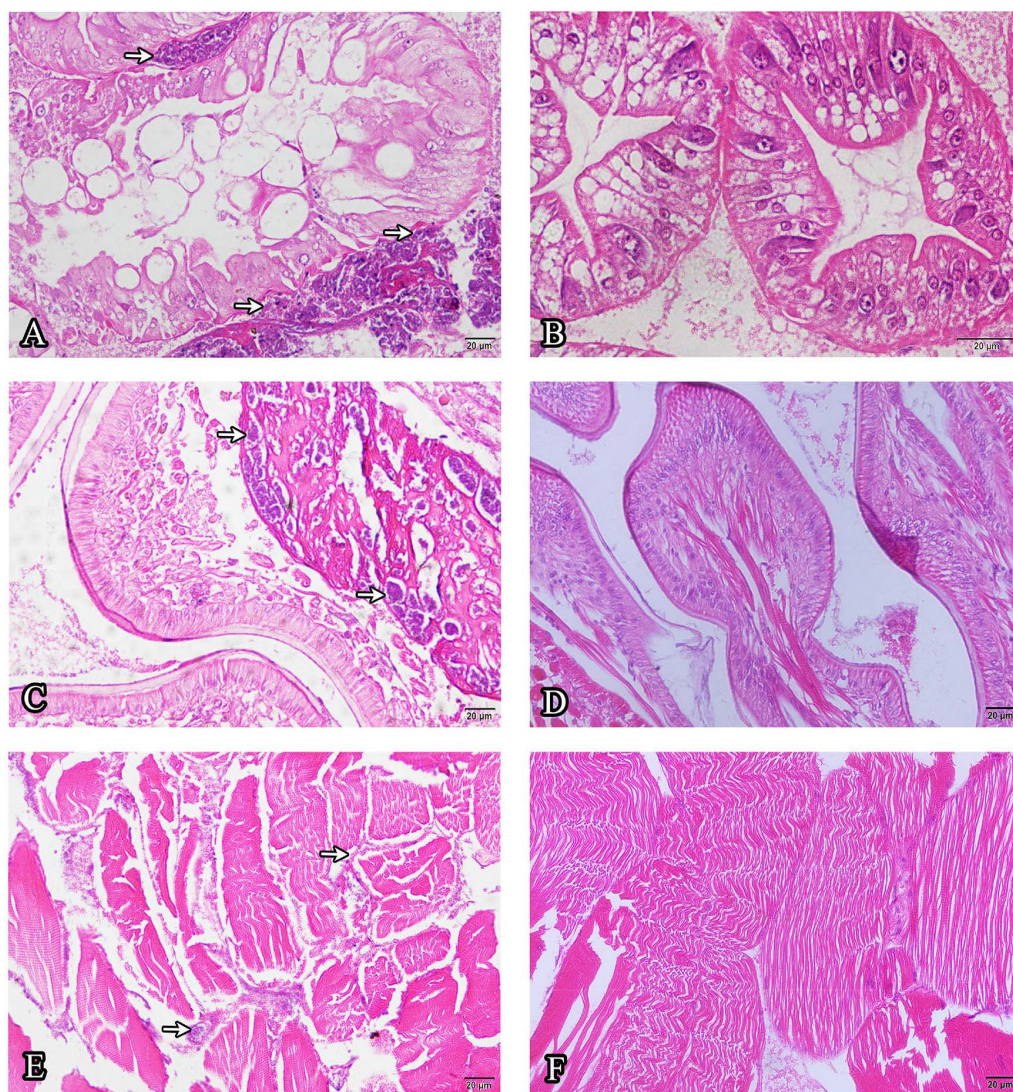
#### 3.2.2. 肠组织病理观察

病蟹部分肠粘膜脱落并游离于肠腔,脱落部位的单层柱状细胞排列较松散,结缔组织层增大变厚,存在大量呈蓝色嗜碱性菌体堆积(图 2(C))。对比健康蟹肠粘膜向肠腔突起褶皱成皱襞。粘膜、上皮层、基

膜、结缔组织层、肌肉层和不连续细胞层等结构基本正常，各层排列有序、整齐(图 2(D))。

### 3.2.3. 肌组织病理观察

病蟹肌纤维排列紊乱，呈结构性肿胀断裂、溶解、坏死，部分细胞完全溶解消失，肌纤维束排列松散、不规则，纤维间结缔组织被呈蓝色嗜碱性菌体浸润(图 2(E))。对比健康蟹肌纤维排列较整齐、规则，可见少量嗜碱性细胞核(图 2(F))。



注：(A)为病蟹肝胰腺组织，肝胰腺小管上皮细胞存在大量空泡并游离于小管腔，细胞排列疏松、间隙明显，多数细胞核固缩、溶解，大量嗜碱性菌体聚集、堆积于间隙，空白箭头示嗜碱性菌体，放大倍数 200×；(B)为健康蟹肝胰腺组织，肝胰腺小管上皮细胞核多位于基底部，排列紧密、整齐，界限清晰，放大倍数 400×；(C)为病蟹肠组织，部分肠粘膜脱落并游离于肠腔，细胞排列较松散，存在大量嗜碱性菌体堆积，空白箭头示嗜碱性菌体，放大倍数 200×；(D)为健康蟹肠组织，肠粘膜、基膜等结构基本正常，各层排列有序、整齐，放大倍数 200×；(E)为病蟹肌组织，纤维排列紊乱，呈断裂、坏死状，纤维间结缔组织被嗜碱性菌体浸润，空白箭头示嗜碱性菌体，放大倍数 200×；(F)为健康蟹肌组织，肌纤维排列较整齐、规则，放大倍数 200×。

**Figure 2.** Major histopathological changes between the diseased and healthy *Eriocheir sinensis*

**图 2.** 病蟹与健康蟹主要组织病理

## 4. 讨论

“牛奶病”，因濒死蟹发病时头胸甲腔内充满大量牛奶状乳白色液体而得名[12]，是近年来甲壳动物养殖中一种危害较大的爆发性流行病。早在上世纪90年代初便发现患此病的中华绒螯蟹，但未引起足够重视。但近年来，此病愈加频发，已严重影响甲壳动物健康养殖。

目前，对该病主要致病原研究尚有许多不同见解，仍存在较大争议。施慧等[13]、许文军等[12]认为三疣梭子蟹(*Povtunus trituberculatus*)“牛奶病”由假丝酵母菌(*Candida olephila*)感染引起；王高等[14]认为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)是引起三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*)“牛奶病”的致病原；马红丽等[2]认为二尖梅奇酵母(*Metschnikowia bicuspidata*)是引起辽宁地区中华绒螯蟹(*E. sinensis*)“牛奶病”的病原；血卵涡鞭虫(*Hematodinium sp.*)是导致锯缘青蟹(*Scylla serrata*)“牛奶病”的主要病原[15]。本文前期研究基础证实二尖梅奇酵母是本案例“牛奶病”的病原，二尖梅奇酵母感染是引起此养殖场中华绒螯蟹在暂养期间大量死亡的病因。

既有研究表明，二尖梅奇酵母为单细胞真核生物，隶属于 *Metschnikowiaceae* 科，梅奇酵母属(*Metschnikowia*)，进行无性繁殖和有性繁殖[16]，广泛存在于表层海水[17]和多种甲壳动物，能够感染多种无脊椎动物，如丰年虫(*Artemia salina*) [18]、水蚤(*Daphnia magna*) [18]、三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*) [19]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) [20]和中华绒螯蟹(*E. sinensis*)等[3] [21]，甚至能够感染脊椎动物，如大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*) [22]。二尖梅奇酵母能够引起宿主以坏死为主的器质性病变，造成机体细胞肿胀、变性、坏死，细胞核破碎、崩解，最终导致宿主死亡[20] [23]。

针对中华绒螯蟹“牛奶病”的组织病理研究能够详细阐释各组织出现生理性病变的内在原因。中华绒螯蟹患“牛奶病”后在较长时间内出现持续性死亡，组织病理学变化显示其以肝胰腺、肠、肌组织为主的组织细胞变性、坏死，呈现肝胰腺受损伤程度最为严重、肠次之的不同程度损伤病变，组织结构被破坏，最终导致蟹体死亡。

中华绒螯蟹肝胰腺中有一对肝管通过中肠与后肠相连接，是其消化系统重要组成，是营养物质消化、吸收代谢及脂类等物质储存的主要场所，担负许多重要而复杂的生理生化功能，被视为蟹体健康状况的重要标志[24]。中华绒螯蟹感染二尖梅奇酵母后进入全身各处，病蟹肝胰腺组织大部分坏死，细胞排列紊乱，多数细胞核固缩、溶解，存在大量空泡及嗜碱性菌体聚集、堆积。这些变化可能引起了肝胰腺消化、吸收功能的降低，实质细胞大面积坏死，肝胰腺小管上皮细胞异常、空泡变性，导致肝胰腺功能衰竭，直至死亡。

肠道是食物消化的主要场所，也是营养物质吸收的主要场所。在本实验组织病理分析中，可以清楚观察到病蟹部分肠粘膜脱落并游离于肠腔，组织结构疏松、变厚，存在大量嗜碱性菌体堆积。这些变化严重影响了肠道的消化、吸收功能，使病蟹摄食能力降低，甚至丧失。

当中华绒螯蟹受到胁迫时，机体耗氧率会增加，机体所需能量会增加，面对不断增加的能量需求，肝胰腺和骨骼肌最先响应[25]。而中华绒螯蟹肌组织主要分布在步足、螯和头胸部，是典型的骨骼肌[26]。病蟹肌组织病变相对较轻，肌纤维排列紊乱，呈结构性肿胀断裂、溶解、坏死，部分细胞完全溶解消失，肌纤维束排列松散、不规则。推测蟹体肌组织受到病原体感染后，肌组织呈现结构性损伤，导致肝胰腺中肝糖原降解葡萄糖供能、肌糖原异化供能的过程受阻，最终受损肌组织影响蟹体摄食能力减少或停止，活动能力降低。

综上所述，通过对患“牛奶病”中华绒螯蟹主要组织病理观察可知，病蟹虽维持生命状态，但主要组织结构表现出明显病态，以上主要组织结构的异常与其进行生命活动息息相关，而各种组织结构的破坏，必定对其生理功能的正常调节在一定程度上产生影响，并危及中华绒螯蟹的正常生命活动。

## 基金项目

本研究受中央财政资金项目——水产绿色健康养殖技术推广“五大行动”(12000021SGX5LA06PX8P3)和天津市财政专项资金(202100046011)共同资助。

## 参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2020[G]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [2] 马红丽, 孙娜, 陆晓岑, 等. 辽宁地区中华绒螯蟹“牛奶病”的病原分离与鉴定[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(5): 714-718.
- [3] Bao, J., Jiang, H., Shen, H., *et al.* (2021) First Description of Milky Disease in the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis* Caused by the Yeast *Metschnikowia bicuspidata*. *Aquaculture*, **532**, Article ID: 735984. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735984>
- [4] 王文. 虾蟹新型病原螺原体的发现和研究[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2016, 39(1): 1-13.
- [5] Yano, Y., Kaneniwa, M., Satomi, M., *et al.* (2006) Occurrence and Density of *Vibrio parahaemolyticus* in Live Edible Crustaceans from Markets in China. *Journal of Food Protection*, **69**, 2742-2746. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2742>
- [6] Yang, Q.Z., Yang, Z.J., Zhang, Y., *et al.* (2014) Molecular Characteristic and Expression Analysis of Collagenolytic Serine Protease from the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis* with Defense Response to *Vibrio anguillarum* Challenge. *Genetics & Molecular Research*, **13**, 3885-3894. <https://doi.org/10.4238/2014.April.29.1>
- [7] Ding, Z., Meng, Q., Liu, H., *et al.* (2016) First Case of Hepatopancreatic Necrosis Disease in Pond-Reared Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*, Associated with Microsporidian. *Journal of Fish Disease*, **39**, 1043-1051. <https://doi.org/10.1111/jfd.12437>
- [8] Wu, H. and Feng, M. (2004) Mass Mortality of Larval *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae) Population Bred under Facility Conditions: Possible Role of *Zoothamnium* sp. (Peritrichida: Vorticellidae) Epiphyte. *Journal of Invertebrate Pathology*, **86**, 59-60. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.03.010>
- [9] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, Chichester, 115-175.
- [10] 唐玲, 刘平, 黄瑛, 等. 酵母的分子生物学鉴定[J]. 生物技术通报, 2008(5): 84-87.
- [11] 刘群, 王菁, 刘桐山, 等. 锦鲤昏睡病(KSD)的实验室诊断分析[J]. 科学养鱼, 2021(5-6): 50-53.
- [12] 许文军, 徐汉祥, 金海卫. 梭子蟹“乳化疗”病原的研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2003(3): 1-5.
- [13] 施慧, 许文军, 徐汉祥, 等. 引起三疣梭子蟹“牛奶病”的酵母菌 18S rRNA 序列测定与分析[J]. 渔业科学进展, 2008, 29(4): 34-38.
- [14] 王高学, 黄增荣, 袁明. 三疣梭子蟹牛奶病病原的分离鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007(6): 37-41.
- [15] 夏小安. 汕头牛田洋锯缘青蟹病害研究[D]: [硕士学位论文]. 汕头: 汕头大学, 2008.
- [16] J.A.巴尼特, R.W.佩恩, D.亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 42.
- [17] 池振明, 居靓, 王祥红, 等. 在海洋环境中的酵母菌分布与多样性[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 955-960, 1024.
- [18] Codreanu, R. and Codreanu-Balcescu, D. (1981) On Two *Metschnikowia* Yeast Species Producing Hemocoelic Infections in *Daphnia magna* and *Artemia salina* (Crustacea, Phyllopoða) from Romania. *Journal of Invertebrate Pathology*, **37**, 22-27. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90049-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90049-5)
- [19] Wang, X., Chi, Z., Yue, L., *et al.* (2007) A Marine Killer Yeast against the Pathogenic Yeast Strain in Crab (*Portunus trituberculatus*) and an Optimization of the Toxin Production. *Microbiological Research*, **162**, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.09.002>
- [20] Chen, S.C., Chen, Y.C., Kwang, J., *et al.* (2007) *Metschnikowia bicuspidata* Dominates in Taiwanese Cold-Weather Yeast Infections of *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **75**, 191-199. <https://doi.org/10.3354/dao075191>
- [21] Zhang, H.Q., Chi, Z., Liu, G.L., *et al.* (2021) *Metschnikowia bicuspidata* Associated with a Milky Disease in *Eriocheir*

- sinensis* and Its Effective Treatment by *Massoia lactone*. *Microbiological Research*, **242**, Article ID: 126641. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126641>
- [22] Moore, M.M. and Strom, M.S. (2003) Infection and Mortality by the Yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *Bicuspidata* in Chinook Salmon Fed Live Adult Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, **220**, 43-57. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00271-5)
- [23] Chen, S.C., Chen, T.H., Wang, P.C., *et al.* (2003) *Metschnikowia bicuspidata* and *Enterococcus faecium* Co-Infection in the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **55**, 161-167. <https://doi.org/10.3354/dao055161>
- [24] 何杰, 吴旭干, 龙晓文, 等. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)野生和养殖蟹种对池塘养殖成蟹可食率和营养品质的影响研究[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 140-150.
- [25] Harris, J.O., Maguire, G.B., Edwards, S., *et al.* (1998) Effects of Ammonia on the Growth Rate and Oxygen Consumption of Juvenile Greenlip Abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. *Aquaculture*, **160**, 259-272. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00249-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00249-4)
- [26] 杨宗英. 中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合症发病原因及致病机理初步研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2018.