

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.15200

津冀地区养殖三疣梭子蟹大量死亡的病原和病理分析

王印庚^{1,2}, 杨洋^{1,2}, 张正², 李彬², 廖梅杰², 邓威³, 孟繁林⁴

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221;
4. 青岛中仁动物药品公司, 山东 胶州 266300

摘要: 2014 年 7 月, 津冀沿海地区池塘养殖三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)暴发疾病, 导致大量死亡。患病梭子蟹有两种不同表现症状: 一种症状为停止摄食, 空胃、空肠, 行动迟缓; 肌肉白浊、不透明, 最后乳化呈牙膏状; 该病死亡率达 60%~70%, 称之为“肌肉白浊病”。另一种症状为壳软, 停止摄食, 行动迟缓; 肌肉变白浊、水样变化、萎缩; 体腔液及组织坏死液化后从组织中大量渗出, 不凝固; 死亡率可达 90%以上, 称之为“牛奶病”。通过疾病流行特征、组织病理、病原超微结构等分析, 初步判断肌肉白浊病由一种微孢子虫感染而致, 虫体大小(1544 ± 250) nm, 呈椭球形, 极丝圈数 8~9 圈, 具孢壁[厚(130 ± 22) nm], 纤毛(长 120~500 nm)、极体[(726 ± 200) nm]、极管、固定盘、质膜、核等结构; 牛奶病则是由一种血卵涡鞭虫(*Hematodinium* sp.)感染而致, 虫体大小 8~10 μm , 卵圆形, 体表多皱褶、凸起, 由细胞壁、多核、纤毛等组成。两种患病蟹的肌肉组织病变明显不同: 患肌肉白浊病的蟹肌纤维断裂、溃散、浆质化, 肌束减少并被团状集聚的寄生虫充斥、占据。电镜观察显示肌纤维细胞破碎、融合, 出现大量空泡结构; 肌纤维细胞的线粒体、内质网等细胞器解体、消失。患牛奶病的蟹肌束间隙变大, 大量血卵涡鞭虫或充斥在间隙中或附着在肌纤维上, 导致肌纤维断裂、离散解体, 甚至溶解性坏死, 组织呈水样变化。电镜观察也证实这两种寄生虫可同时感染三疣梭子蟹个体的同一组织; 当肌纤维细胞破碎融合后, 两种寄生虫均能寄生在融合后的胞浆中。从发病史来看, 肌肉白浊病和牛奶病的发生有蔓延趋势, 死亡率趋向更高, 已逐步成为三疣梭子蟹养殖的重要疾病。

关键词: 三疣梭子蟹; 肌肉白浊病; 牛奶病; 微孢子虫; 血卵涡鞭虫; 溶解性坏死

中图分类号: S941 **文献标志码:** A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0596-10

2014 年 7 月中旬, 河北黄骅、唐山以及天津等地的三疣梭子蟹养殖场发生疾病导致大量死亡, 养殖单产量从过去 $1500 \text{ kg}/\text{hm}^2$ 降至 $150 \text{ kg}/\text{hm}^2$, 较多池塘绝产。病蟹表现为行动迟缓, 停止摄食, 逐渐消瘦, 体重下降; 肌肉呈现白浊、乳黄色病变; 部分病蟹打开背甲后可见大量黄白色、蓝白色液体, 空肠、空胃。

该症状与许文军等^[1-2]、王元^[3]描述的“肌肉白浊病”、“牛奶病”极为相似。据调查, 这两种病

于 2005 年前后开始发现, 早期多发生在江浙沿海一带。其病蟹蟹体消瘦, 肌肉白浊, 打开背甲可见乳白色至乳黄色液体, 有轻微刺鼻气味, 内脏和生殖腺萎缩, 颜色变浅, 结构松散。Li 等^[4]报道, 2012 年山东省烟台、潍坊一带养殖三疣梭子蟹也有类似症状发生, 自然感染率仅占 10%。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是河北省、天津市沿海一带的主要海水养殖品种之一, 该地区虾蟹混养面积近 7000 hm^2 , 已有 10 余年的

收稿日期: 2016-07-13; **修订日期:** 2017-01-16.

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD17B03); 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205); 山东省海洋经济创新发展区域示范项目——山东省海水养殖重要疾病高效专用药物研发及产业化项目.

作者简介: 王印庚(1963-), 博士, 研究员, 主要从事水产动物疾病防控、刺参养殖技术研究. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn. 杨洋, 共同第一作者.

养殖历史。近3年来, 上述病症连续发生, 而养殖者对此病却了解甚少, 盲目用药往往加剧蟹的死亡, 带来更严重的经济损失。笔者采集津冀地区发病池塘的三疣梭子蟹和混养的日本对虾, 开展了流行病学、病原学和组织病理学研究, 初步判定分别是微孢子虫和血卵涡鞭虫寄生引起了“肌肉白浊病”和“牛奶病”, 研究成果可为梭子蟹疾病防控和健康养殖提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源

2014年9月10日, 分别从河北省黄骅市、河北省唐山市、天津市大港区4家养殖场取患病三疣梭子蟹样品, 每家20只, 体重150~200 g, 同时采集健康无病症三疣梭子蟹, 经充氧运输, 活体带回黄海水产研究所实验室。一并采集养殖池塘池水供水质分析。

黄骅市某镇共有40口池塘, 每个养殖池塘大小3~4 hm², 梭子蟹放养密度约8000只/hm²; 仅大潮期更换新水, 换水量不足, 水色浓绿, 池水面黏附物较多; 患病前投喂低值贝类和小杂鱼。发病期间, 8—9月养殖池塘平均水温25.4℃, 盐度29.9, 溶氧6.3 mg/L, pH 7.9, 无增氧设施。唐山、天津地区的养殖条件基本相似。

1.2 主要仪器和试剂

日产E800光学显微镜, JEM-1200EX透射显微镜, 包括脱水机、包埋机、组织切片机、全自动染色机的德国Leica组织切片系统, 超薄组织切片机(Leica)等仪器。无水乙醇、二甲苯、戊二醛和多聚甲醛等化学试剂从青岛国药集团化学试剂公司购进。

1.3 活体检测

每个样品取病蟹20只, 察看蟹的活动力、体表色泽及其附着物; 解剖后, 肉眼检查体腔液、鳃、肌肉组织、性腺的颜色、结构、病灶变化, 并取其少量组织经过亚甲基蓝染色后制成水浸片, 在显微镜下镜检, 对细菌、霉菌、寄生虫等有害生物进行排查。

1.4 细菌分离

取病症明显的病蟹5只, 打开背甲后, 分别

剪取少许肌肉、性腺组织, 用0.9%的生理盐水分别冲洗, 将其肌肉组织、性腺组织分别混合后剪碎混匀, 再用接种环挑取少量组织样品, 分别在TSB和TCBS固体培养基上划线培养, 培养条件为温度27℃, 24 h。另外, 取体腔液进行细菌分离培养时, 打开背甲后用1 mL注射器吸取0.5 mL体腔液, 直接放入培养基上涂布。

1.5 石蜡切片制备与观察

分别取病蟹和健康蟹的鳃、肌肉、性腺等组织, 剪成体积不超过0.5 cm³的小块, 保存于Davidson's AFA固定液中, 24 h后将固定液换成70%乙醇。经酒精梯度脱水、二甲苯、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、染色, 封片, 进行组织病理的显微观察。

1.6 电镜样品的制备与观察

扫描电镜: 将病蟹的血淋巴用体积比2.5%戊二醛, 在4℃下固定, 采用临界点干燥法对样品进行干燥处理, 采用离子溅射镀膜法对样品进行导电处理, 最后进行扫描电镜观察。

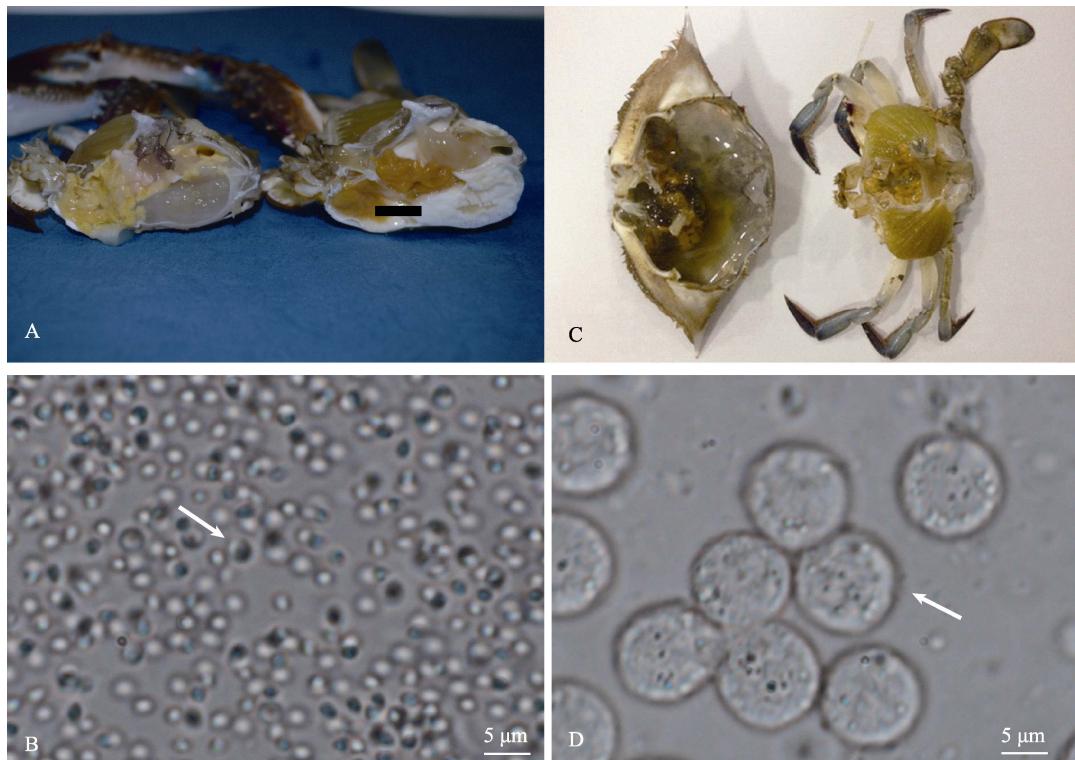
透射电镜: 取新鲜病蟹和健康蟹的肌肉组织, 迅速放入含磷酸缓冲液的体积比2.5%戊二醛保存液中, 4℃保存, 经1%锇酸固定, 用梯度浓度的乙醇脱水, 样品块用环氧树脂包埋后制备半薄切片(1 μm)和超薄切片(70 nm)。透射电镜80 kV电压下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 流行病学特征

经过现场调查和实验室组织病理分析, 导致三疣梭子蟹大批死亡的是两种不同的疾病, 这两种疾病表现为不同的症状, 具有不同的病原。

一种病蟹表现为: 体表附着物增多, 壳变软, 体重略减轻, 附肢关节处呈乳白色; 鳃变暗浊; 肝胰腺、性腺萎缩, 呈红褐色; 肌肉呈乳白色、不透明, 棉絮状, 有蓬松感; 打开背甲有浅黄色透明体腔液流出、不凝固。严重的病蟹可见肌肉白浊, 乳化呈牙膏样(图版I-A), 故称“肌肉白浊病”或“牙膏蟹”。患病蟹摄食下降直至停止摄食, 空胃、空肠, 行动迟缓易捕捉, 严重的病蟹爬到养殖池边后死亡。患病严重的池塘蟹的死亡率可达60%~70%。



图版 I 三疣梭子蟹患病症状与寄生虫显微观察

- A. 健康蟹(左侧)与患肌肉白浊病蟹(右侧)的肌肉对比; B. 肌肉白浊蟹病变肌肉的涂片检查, 可见视野中有大量椭圆形 1~2 μm 原虫(箭头, $\times 1000$); C. 打开牛奶蟹背甲, 体腔液及组织浆液大量渗出(左侧); 鳃丝土黄色, 肌肉及内脏萎缩、模糊(右侧); D. 牛奶蟹病变肌肉的涂片检查, 显示多个 8~10 μm 的卵圆形寄生虫(箭头, $\times 1000$).

Plate I Crab illness symptoms and microscopic parasite features

A. A healthy crab (left) and a diseased crab with whitish muscle symptom (right); B. The whitish muscle smear examination, showed numerous spherical parasitic protozoa with size of 1–2 μm (arrow, $\times 1000$); C. After opening the shell of crab with MD, the coelomic fluid and deteriorated watery tissues leaked from the body (left); The gills changed to be yellowish opaque, while the muscle and viscera became shrink and fuzzy (right); D. The milky muscle smear examination showed many round-shape parasitic protozoa with size of 8–10 μm (arrow, $\times 1000$).

另一种病俗称“牛奶病”或因病蟹重量极度减轻称之为“塑料蟹”。其体表附着物增多, 壳变软, 附肢透明或粉红色, 肌肉消瘦, 体重严重下降。打开背甲, 体腔液及组织浆液大量渗出, 呈洁白、蓝白或土黄色, 不凝固; 肌肉萎缩、结构模糊呈水样化变化, 黄白或乳白色; 鳃呈土黄色或黑浊; 肝胰腺萎缩、模糊呈乳黄色(图版 I-C)。患病蟹停止摄食, 行动迟缓, 多数病蟹死于池塘边, 患病严重的池塘蟹的死亡率达 80%~90%, 甚至绝产。

发病区池塘中肌肉白浊病发病率约为 20%~30%, 从发现病症到死亡高峰约需 30 d; 牛奶病发病率约为 70%~80%, 从发现病症到死亡高峰约需 20~30 d; 相比较而言, 牛奶病的发生更普遍, 致病力更强, 死亡率更高。这两种疾病的发生都具有明显的季节性, 6 月下旬仅见少量发病个体,

7 月中旬急剧增加, 8 月至 9 月上旬死亡严重, 至 9 月中旬所剩无几。

将濒死的肌肉白浊蟹、牛奶蟹切块后分别投喂给健康梭子蟹, 大约 5~7 d 相继出现典型症状, 10 d 后开始出现死亡。

2.2 水浸片检查及病菌分离

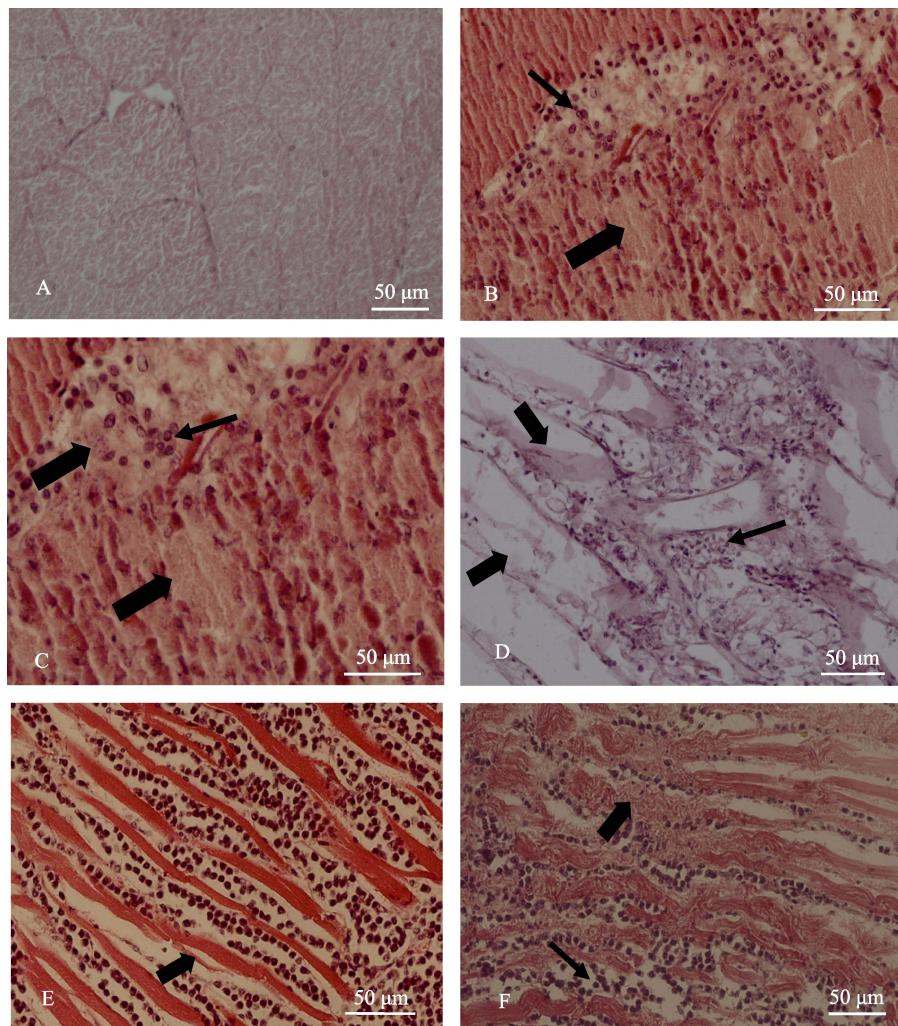
水浸片观察发现, 患“肌肉白浊病”梭子蟹的肌肉病样中可见大量椭圆形的寄生性原虫, 其大小 1~2 μm (图版 I-B)。患“牛奶病”梭子蟹肌肉呈水样变化, 病样中可见大小为 8~10 μm 卵圆形寄生性原虫, 胞内有颗粒样小体(图版 I-D)。在血淋巴涂片中极少见淋巴细胞。

另外, 取病蟹的血淋巴、肌肉和性腺组织进行细菌分离, TSB 和 TCBS 培养基上均未见较多的细菌和真菌菌落。

2.3 显微病理分析

经 HE 染色后, 肌肉白浊病蟹肌束间空隙显著增大, 其间充满着大量寄生的原虫。寄生原虫个体小, 但数量极大。寄生虫大量寄生导致肌丝

溃烂、断裂、溃散, 着色模糊; 甚至肌束结构被大面积破坏, 肌束大大减少或呈无序排列; 肌丝溃烂后被团状集聚的寄生虫充斥; 病灶组织周围有大量血细胞浸润(图版 II -B、C)。鳃、性腺、肝胰



图版 II 病蟹组织 HE 染色结果

A. 示三疣梭子蟹正常肌肉组织, 肌束整齐、排列有序; B-D 是肌肉白浊病样品; B. 示肌束断裂, 溃散呈无序排列, 肌束减少且被团状集聚的寄生虫充斥(粗箭头); 病灶组织周围有大量血细胞浸润(细箭头, HE); C. 示 B 图的局部放大, 大面积肌束浆质化, 被集聚的寄生虫占据而着色较浅(粗箭头); 肌束间组织间隙增大, 血细胞浸润现象明显(细箭头, HE); D. 示鳃轴充血明显(细箭头), 鳃上皮细胞水肿变性, 鳃叶结构模糊、组织脱落(粗箭头, HE); E-F. 牛奶病样品; E. 纵切显示肌束间隙增大并充满寄生虫(细箭头), 大量原虫侵损肌束膜, 导致肌束断裂(粗箭头, HE); F. 大量寄生虫(细箭头)侵损肌束组织, 肌纤维断裂、离散解体(粗箭头, HE).

Plate II HE staining of the tissues from diseased crabs

A. Normal muscle tissues from a health crab, muscle bundles (MB) keep orderly arrangement; B-D: Muscular changes associated with Whitish Muscle Disease (WMD). B. MB ulceration, rupture, collapsing, causing MB reduced and disordered in large area. Massive parasites occupied among MB (thick arrow). Meanwhile, haemolymph infiltration was clearly shown (thin arrow); C. A partial enlarged diagram of photo B, most MBs were destroyed as the numerous parasites occupied and surrounded among them (thick arrows). The gap between MBs was increased, haemolymph infiltration significantly shown (thin arrow); D. Photo showed gill congestion (thin arrow), gill epithelial cell edema and degeneration, even loss of gill structure (thick arrows); E-F: Muscular changes associated with the milky disease (MD); E. Longitudinal section of the muscle. Bundle gaps increased and fulled with the numerous parasites (thin arrow), parasite infection resulted in MB fracture (thick arrow); F. A large number of parasites (thin arrow) invaded MBs, resulting the muscle fibers rupture, disintegration or necrosis (thick arrow).

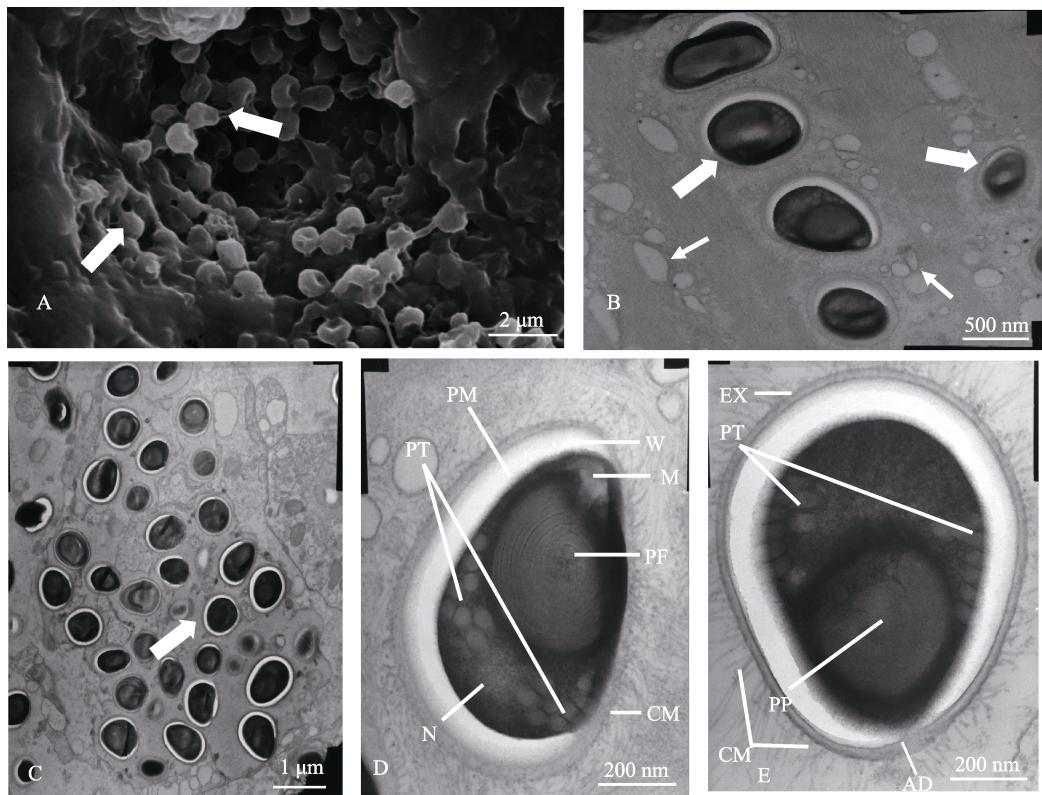
腺等组织也出现病变现象。病蟹鳃叶最初表现为充血，其后鳃上皮细胞水肿变性，结构模糊甚至组织坏死脱落(图版 II -D)。鳃组织中发现有寄生虫，但未见大量聚集现象。性腺、肝胰腺组织模糊不清，溃烂、脱落，直至大面积坏死、萎缩。

牛奶蟹肌肉纵切可见，肌束间隙增大并充满寄生性原虫，大量寄生原虫侵损肌束膜，破坏肌束结构，造成肌束断裂和萎缩(图版 II -E)。大量寄生虫侵损肌束组织，可见肌纤维断裂、离散解体，甚至溶解性坏死，造成组织着色模糊(图版 II -F)。

2.4 超微病理分析

肌肉白浊蟹样品的肌肉横切面扫描电镜显示，肌纤维多有断裂、排列疏松，肌束之间有明显空

腔，且充满大量寄生虫(图版 III -A)。透射电镜观察显示，肌肉白浊蟹样品的肌纤维细胞融合，并出现大量空泡结构(图版 III -B)。肌纤维细胞膜界限模糊不清，大部分线粒体、内质网等细胞器解体、消失(图版 III -C)。破坏的组织中充满大量微孢子虫，虫体大小(1544 ± 250) nm，呈椭圆形，电子密度高(图版 III -B、C)。从单个微孢子虫电镜照片可以清晰的看到，成熟孢子具孢壁、质膜、固定盘、极管、极体、核、后极泡等结构，形似微孢子虫。特别提到的是，该孢子虫孢外壁上有大量周生纤毛(图版 III -D、E)。其中，孢壁厚(130 ± 22) nm，极体(726 ± 200) nm，极丝圈数 8~9 圈，纤毛长度 120~500 nm。



图版 III 肌肉白浊病的病原形态与超微结构

A. 扫描电镜下患肌肉白浊病蟹的肌肉样品，肌肉横断面上显示肌束间隙被大量寄生虫充斥，肌纤维表面也附着大量微孢子虫(粗箭头); B. 透射电镜下肌肉组织中出现大量空泡结构(细箭头)，肌纤维间隙有大量微孢子虫(粗箭头); C. 当肌纤维细胞融合后，细胞器消失；大量微孢子虫(粗箭头)寄生在破坏的胞浆中。D-E. 透射电镜下单独一个的微孢子虫。AD: 固定盘；CM: 纤毛；EX: 胞外壁；M: 柄状体；N: 细胞核；PM: 质膜；PF: 极丝；PP: 极体；PT: 极管；W: 胞壁。

Plate III Pathogenic morphology and ultrastructural pathology of whitish muscle disease (WMD) pathogen

Scan electron microscopy (SEM) of the cross section of whitish muscle associated with WMD. A cavity is clearly shown, where a large number of parasitic microsporidian occupied (thick arrows); B. Transmission electron microscope (TEM) of the whitish muscle sample associated with WMD. A large number of vacuoles (small arrows) appeared and a lot of microsporidian surrounded (thick arrows); C. A large number of microsporidian (thick arrow) existed within a fused cell, and the organelles disappeared. D-E. TEM section of whitish muscle sample to show a single microsporidian morphology; AD: anchoring disk; CM: cilium; EX: exospore; M: manubrium; N: nuclear; PM: plasma membrane; PF: pole filament; PP: polaroplast; PT: pole tube; W: spore wall.

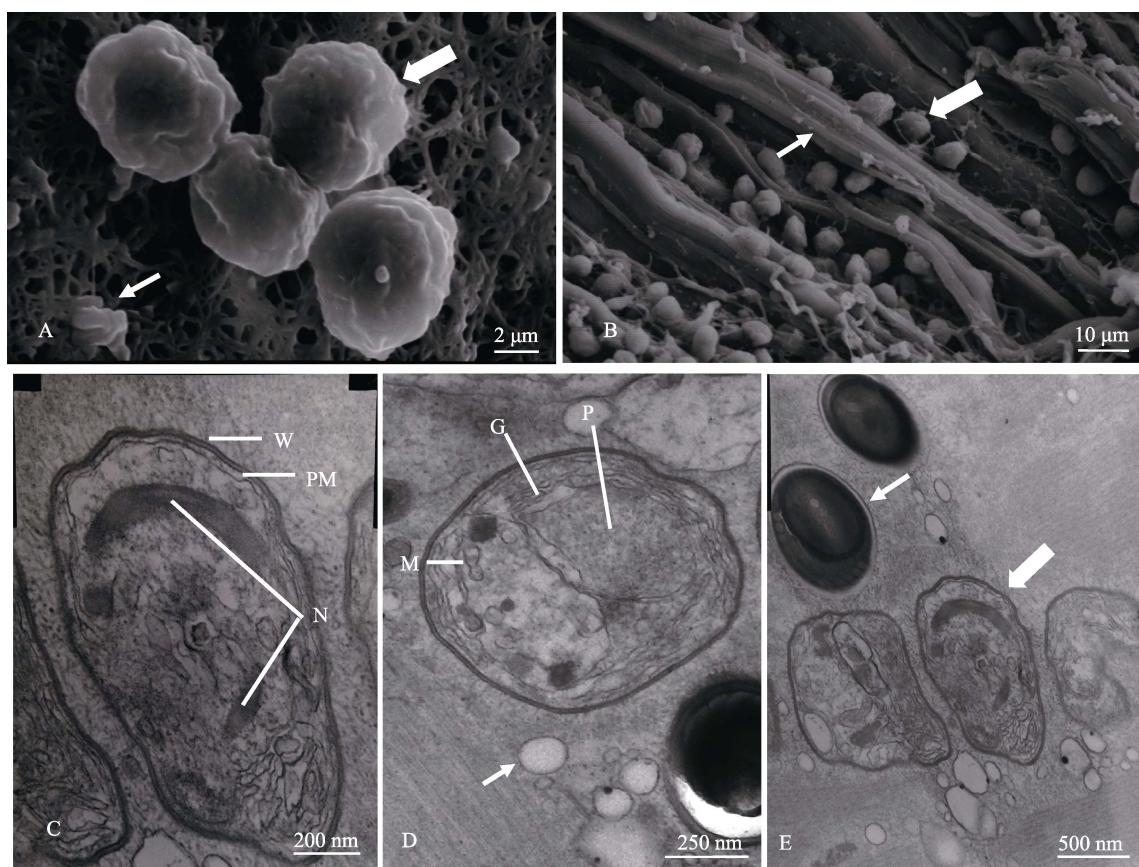
扫描电镜下, 牛奶蟹体腔液中血淋巴细胞极少, 却存在大量血卵涡鞭虫(图版 IV-A)。肌肉样品的肌纤维之间可见大量附着的寄生虫, 肌纤维溃散、无序排列, 肌肉结构严重破坏(图版 IV-B)。透射电镜下, 大量寄生虫寄生在肌纤维细胞外或者细胞融合后的浆质中, 它的结构呈卵圆形、大小8~10 μm, 由细胞壁、多核、纤毛等组成, 体表多皱褶、凸起, 形似血卵涡鞭虫营养体(图版 IV-C)。肌纤维细胞膜界限模糊不清, 线粒体、内质网等细胞器解体, 胞内空泡数量增多(图版

IV-D)。

部分病蟹肌肉样品中也发现, 肌束组织中有微孢子虫和涡鞭虫两种寄生虫同时存在(图版 IV-E)。透射电镜观察结果表明, 肌肉白浊蟹、牛奶蟹两种样品组织中均未发现细菌及病毒粒子。

3 讨论

通过细菌分离, 未发现优势度高的细菌和霉菌; 在电镜下也尚未发现病毒颗粒, 由此排除了病毒、细菌和霉菌感染的可能性。通过疾病流行



图版IV 牛奶病的病原形态和超微结构

A. 扫描电镜下体腔液样本, 细箭头示体腔液中组织碎屑, 粗箭头示体腔液中血卵涡鞭虫, 虫体表面有明显皱褶和凸起; B. 扫描电镜下肌肉样品, 大量血卵涡鞭虫(粗箭头)附着在肌纤维上(细箭头), 肌纤维结构受损; C. 透射电镜下肌肉样品中的涡鞭虫营养体, 胞壁外侧似有纤毛状结构, N: 核; W: 胞壁; PM: 质膜; D. 透射电镜显示肌纤维细胞融合后出现较多空泡结构(箭头), 涡鞭虫在肌纤维细胞融合的胞浆质中寄生, G: 高尔基体; M: 线粒体; P: 囊泡; E. 透射电镜下肌肉样品中同时寄生两种寄生虫, 微孢子虫(细箭头)和血卵涡鞭虫(粗箭头)。

Plate IV Pathogenic morphology and ultrastructural pathology of the milky disease (MD) pathogen

A. SEM of the coelomic fluid sample. Thick arrow pointing parasitic *Hematodinium* sp. in coelomic fluid; Thin arrow pointing the tissue debris in coelomic fluid; B. SEM of the muscle associated with MD. Numerous *Hematodinium* sp. (thick arrow) fixed on muscle fibers (thin arrow); C. TEM photography of the trophozoite, there were many cilium-like structures. N: nuclear; W: cell wall; PM: plasma membrane; D. There were many vacuoles as the muscular cell fused, and *Hematodinium* parasited in the fused cellular plasma, G: Golgi complex; M: mitochondrion; P: vesicle; E. Two kinds of parasites existed within the same tissue in a diseased crab, thin arrow pointing a parasitic microsporidian, and thick arrow pointing a parasitic *Hematodinium* sp.

特征、组织病理学、超微结构、人工感染实验分析, 初步判断肌肉白浊病由一种微孢子虫感染而致, 而牛奶病则是由一种血卵涡鞭虫感染所致。将濒死的患肌肉白浊病和牛奶病的蟹切块后分别投喂给健康三疣梭子蟹, 5~7 d 出现典型症状, 10 d 后开始出现死亡。说明这两种寄生虫都具有传染性和致病性。从发病率和死亡率等流行参数来看, 牛奶病的发生率高, 致病力和死亡率更大。

迄今发现的微孢子虫种类超过 1200 种, 分类主要根据孢子的形态、超微结构、宿主域、寄主组织特异性、生活史二型性、寄生虫-寄主细胞关系、血清学关系以及分子生物学信息^[5~9]。在我国, 仅见王元^[3]报道江苏启东地区微孢子虫感染养殖三疣梭子蟹, 其他感染种类有中国对虾(*Penaeus Chinensis*)^[10~11]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[12]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[13]、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)^[14]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[15]。本病例研究发现, 孢子虫大小约 1544 nm, 呈椭球形, 具孢壁、质膜、固定盘、极管、极体、核、后极泡等结构。从形态学上具有微孢子虫典型特征, 但本例孢子虫具有明显的纤毛, 与表 1 中前 6 者报道存在较大的形态差异; 而与王元^[3]报道的较为相似, 其不同点有: (1)王元报道的孢子虫描述有纤毛, 但其电镜图片显示不足; 而本例微孢子虫的纤毛十分明显, 长而丛密。(2)本研究报道了黄渤海地区微孢子虫感染养殖三疣梭子蟹的病例, 且死亡率和规模远远高于王元的报道。目前已知的微孢子虫均为专性细胞内寄生, 无纤毛、纤毛微管结构^[8~9], 此次发现的微孢子虫在电镜下可见明显的周生纤毛。从系统发

育树分析来看, 王元所发现的微孢子虫是 *Amesone* 属的一个分支, 尚未定种。本例微孢子虫是否与王元报道的相同, 今后尚需从两个虫体的二型性、SSU rRNA 序列分析等信息来确定。

血卵涡鞭虫是一类危害海水甲壳类的寄生性甲藻。自 1931 年 Chatton 等^[16]首次在法国绿蟹中发现涡鞭虫感染以来, 世界范围内 20 多种螃蟹、1 种对虾、1 种龙虾和 10 余种端足类中相继被发现感染该寄生虫, 对渔业生产具有严重的威胁性^[2, 17~19]。在我国, 浙江舟山地区梭子蟹养殖场 2004 年首次报道牛奶病, 死亡率 60%, 致病原确定为血卵涡鞭虫^[1], 2005 年在浙江三门湾附近养殖场发现锯缘青蟹感染此病^[20]; 2012 年又在山东省潍坊、烟台地区养殖的梭子蟹和锯缘青蟹中也发现该寄生虫感染^[4]。此次, 在津冀地区沿岸发现的感染病例, 其病症、病原形态与许文军等^[20~21]报道的由血卵涡鞭虫感染的牛奶病极为相似(表 2)。但其死亡率更高(90%以上), 规模也远远大于以往报道; 由此说明, 近年来牛奶病的发生有蔓延趋势, 死亡率趋向更高。从产业意义上讲, 牛奶病已成为梭子蟹养殖的重要疾病之一。

从组织病理学分析来看, 肌肉白浊病和牛奶病这两种病蟹的肌肉组织病变有明显不同: (1)两者的病原截然不同, 前者是微孢子虫, 而后者则是血卵涡鞭虫。(2)肌肉白浊蟹的肌纤维被侵染造成组织浆质化, 而后被团状集聚的寄生虫充斥而使组织呈现蓬松、白色牙膏状; 牛奶蟹的肌肉组织则呈现水样化病变并渗出组织, 使得肌肉组织极度消瘦、体重严重下降。相同的特点是, 这两种寄生虫一般附着在肌纤维表面或充斥在肌束

表 1 我国养殖虾蟹类感染微孢子虫病概况

Tab. 1 The affect outline of cultured shrimps and crabs infected with microsporidian in China

发病年份 year	宿主种类 host species	发病地点 epidemic region	发病情况 incidence	纤毛 cilium	参考文献 reference
1982	中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	青岛海捕 Haibu, Qingdao	-	无 no	[10]
1991	中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	辽宁营口 Yingkou, Liaoning	-	无 no	[11]
2001	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	-	-	无 no	[12]
2002	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	-	仅携带 only carry	无 no	[13]
2009	凡纳滨对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	80%~90%(死亡率 mortality rate)	无 no	[14]
2012	脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>	江苏启东 Qidong, Jiangsu	5%~8%(感染率 infection rate)	无 no	[15]
2012	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	江苏启东 Qidong, Jiangsu	-	有 yes	[3]

表 2 我国养殖虾蟹类感染血卵涡鞭虫病概况

Tab. 2 The affect outline of cultured shrimps and crabs infected with *Hematodinium* sp. in China

发病年份 year	宿主种类 host species	发病地点 epidemic region	发病情况 indidence	参考文献 reference
2004.7~9	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang	>60%(死亡率 mortality rate)	[9]
2006.7~9	锯缘青蟹 <i>Scylla serrata</i>	浙江三门湾、象山海域 Sanmenwan, Zhejiang	60%~70%(死亡率 mortality rate)	[20] [21]
2008.9	脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang	-	[22]
2012	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	山东潍坊、烟台 Weifang and Yantai, Shandong	10%(自然感染率 natural infection rate) 60%(注射死亡率 infection rate by injection)	[4]

间隙中, 当肌纤维细胞被破坏融合后, 它们均能在融合后的胞浆中寄生。更值得注意的是, 患病蟹的组织中同时发现大量微孢子虫和血卵涡鞭虫, 证明三疣梭子蟹可同时感染这两种寄生虫。由此, 病蟹的症状可能将兼有肌肉白浊和水样化变化两种重要特征, 在外观上容易造成混淆, 对疾病的诊断造成困难。

在疾病防治方面, 因研究积累不足, 缺乏专用药物, 因此要以预防为主。微孢子虫的传播方式有水平传播和垂直传播两种^[22]; 血卵涡鞭虫的传播方式包括同类相食、水体传播和垂直传播^[23], 通过孢子传播是这两种寄生虫传播的主要途径。经过本案疾病调查, 在所有发病池塘中, 梭子蟹感染寄生虫造成大批死亡, 养殖产量从过去的1500 kg/hm²降至150 kg/hm², 甚至绝产。而奇怪的是, 与发病三疣梭子蟹混养的日本对虾却没有发病, 收获产量与往年持平, 可达375~600 kg/hm²。与前期报道相比, 虾蟹混养出现疾病感染的结果不尽相同, 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)与混养三疣梭子蟹, 有多次感染的报道^[3, 15, 22]。针对这一现象, 建议在疾病流行区域, 重点尝试进行日本对虾养殖或开展梭子蟹与日本对虾混养等养殖模式, 避免单一养殖梭子蟹的风险。其他综合防控措施包括: 蟹苗检疫, 防止带病苗种进入养殖系统; 降低放养密度, 减少发病风险; 投喂配合饲料, 杜绝饲用小杂鱼(包括虾蟹), 以切断食物源的感染。

微孢子虫、血卵涡鞭虫在水产养殖方面的研究仍有较大不足, 不仅种属鉴定工作缺乏, 对其宿主、生活史、致病机理、感染途径方面的研究

更少, 专用药物研发和防控技术研究基本属于空白, 这些内容将是今后研究的重要任务和方向, 为有效防治寄生虫病提供理论基础和技术保障。

参考文献:

- [1] Xu W J, Xu H X, Shi H, et al. Diagnoses of hematodinium of *Portunus trituberculatus* (Miers) and countermeasure for comprehensive prevention and treatment[J]. Modern Fisheries Information, 2006, 21(11): 27~28. [许文军, 徐汉祥, 施惠, 等. 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (Miers) 血卵涡鞭虫病诊断与综合防治措施[J]. 现代渔业信息, 2006, 21(11): 27~28.]
- [2] Xu W J, Shi H, Xu H X, et al. Preliminary study on the *Hematodinium* infection in cultured *Portunus trituberculatus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(5): 27~32. [许文军, 施慧, 徐汉祥, 等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 27~32.]
- [3] Wang Y. The pathogen and pathology of microsporidiosis in ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicaud* and swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [王元. 脊尾白虾与三疣梭子蟹微孢子虫病的病原和病理[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [4] Li C W, Song S Q, Liu Y, et al. *Hematodinium* infections in cultured Chinese swimming crab, *Portunus trituberculatus*, in northern China[J]. Aquaculture, 2013, 396~399: 59~65.
- [5] Lu X M, Jin W. Recent advances in taxonomy of phylum microspora[J]. Bulletin of Science and Technology, 1999, 15(2): 119~125. [鲁兴萌, 金伟. 微孢子虫分类学研究进展[J]. 科技通报, 1999, 15(2): 119~125.]
- [6] Wang J Y, Huang K W. Origin, taxonomy and biological research of Microsporidia[J]. Science of Sericulture, 2000, 26(S1): 42~49. [王见杨, 黄可威. 微孢子虫的起源、分类及生物学研究进展[J]. 蚕业科学, 2000, 26(S1): 42~49.]
- [7] Luo B, Liu H D, Pan G Q, et al. Morphological and molecular studies of *Vairimorpha necatrix* BM, a new strain of the microsporidium *V. necatrix* (microsporidia, burenellidae)

- recorded in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Exp Parasitol* NLM, 2014, 143: 74–82.
- [8] Wang T C, Nai Y S, Wang C Y, et al. A new microsporidium, *Triwangia caridinae* gen. nov., sp. nov. parasitizing fresh water shrimp, *Caridina formosae* (Decapoda: Atyidae) in Taiwan[J]. *J Invertebr Pathol*, 2013, 112: 281–293.
- [9] Dong S N, Zhu F, Xu L, et al. Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of seven Microsporidia[C]. The Sixth Youth Conference Proceedings of Chinese Society of Sericultural Science, Shaanxi Province, China, 2009: 305–318. [董世楠, 朱峰, 徐莉, 等. 七种微孢子虫核糖体小亚基基因(SSU rRNA)的克隆及其系统发育分析[C]. 中国蚕学会, 中国蚕学会第六届青年学术研讨论文集, 陕西, 2009: 305–318.]
- [10] Hao B, Mou R P. Preliminary study of the parasite microsporidian from the Chinese prawn *Penaeus orientalis*[J]. *Marine Science*, 1984, 8(2): 47–48. [郝斌, 牟仁朴. 中国对虾体内寄生微孢子虫的初步研究[J]. 海洋科学, 1984, 8(2): 47–48.]
- [11] Guo J X, Wang L X, Li W Q, et al. Electron microscopic study on microsporidia disease of *Penaeus Chinensis*[J]. *Marine Science*, 1995(2): 67–70. [国际翔, 王丽霞, 李文清, 等. 中国对虾微孢子虫病的电镜观察[J]. 海洋科学, 1995(2): 67–70.]
- [12] Wang W N, Wang A L, Chen L, et al. Ultrastructure of the Microsporidian from *Peneus monodon*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(S1): 78–81. [王维娜, 王安利, 陈丽, 等. 斑节对虾体内微孢子虫的超微结构[J]. 动物学报, 2001, 47(S1): 78–81.]
- [13] Wang W, Chen J X, Du K H. Ultrastructure of the virus infects gill epithelial cells from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2004, 23(4): 347. [王文, 陈建秀, 杜开和. 中华绒螯蟹腮上皮细胞病毒侵染的超微结构观察[J]. 电子显微学报, 2004, 23(4): 347.]
- [14] Wu X T. The prevention methods of Microsporidiosis from the *Penaeus vannamei*[J]. *Oceanic and Fisheries*, 2010(6): 41–42. [吴兴泰. 南美白对虾微孢子虫病的防治方法[J]. 海洋与渔业, 2010(6): 41–42.]
- [15] Wang Y, Fang W H, Zhou J F, et al. Pathogenic and pathological analysis of the muscular microsporidiasis of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 726–733. [王元, 房文红, 周俊芳, 等. 脊尾白虾肌肉微孢子虫病的病原和病理分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 726–733.]
- [16] Chatton E, Poisson R. Sur l'existence, dans le sang des crabes, de peridiniens parasites: *Hematodinium perezi* n. g., n. sp. (Syndinidae)[J]. *Compte Rendu Séances Soc Biol Paris*, 1930, 105: 553–557.
- [17] Gretchen A M, Jeffrey D S. Epizootiology of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in the American blue crab *Callinectes sapidus*[J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 43: 139–152.
- [18] Kersten W, Jeffrey D S, David M T. Pathology of *Hematodinium* infections in snow crabs (*Chionoecetes opilio*) from Newfoundland, Canada[J]. *J Invertebr Pathol*, 2007, 95: 93–100.
- [19] Li C W, Xu W J. Review on parasitic dinoflagellates *Hematodinium* spp. in major marine Crustaceans[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(1): 1–10. [李才文, 许文军. 海水甲壳类寄生性病原血卵涡鞭虫(*Hematodinium* spp.)研究进展[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(1): 1–10].
- [20] Xu W J, Shi H, Xu G Q, et al. The pathogen research and comprehensive prevention-control of the grasserie in *Scylla serrata*[J]. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*, 2006(8): 54–56. [许文军, 施慧, 徐广庆, 等. 锯缘青蟹黄水病病原研究及综合防控初报[J]. 鱼病诊治, 2006(8): 54–56.]
- [21] Xu W J, Sheng X Z, Xu H X, et al. *Dinoflagellates Hematodinium* sp. parasitizing the mud crab *Scylla serrata*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(6): 916–920. [许文军, 绳秀珍, 徐汉祥, 等. 血卵涡鞭虫在养殖锯缘青蟹中的寄生[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(6): 916–920.]
- [22] Xu W J, Xie J J, Shi H, et al. Infection of *Hematodinium* sp. in farmed ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(3): 396–401. [许文军, 谢建军, 施慧, 等. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 396–401.]
- [23] Wang F W, Lu X M. Microsporidiosis in insects[J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40(1): 5–8. [汪方炜, 鲁兴萌. 昆虫的微孢子虫病[J]. 昆虫知识, 2003, 40(1): 5–8.]

Etiological and pathological analyses of massive mortality in cultured crab *Portunus trituberculatus* along the coasts of Tianjin and Hebei, China

WANG Yingeng^{1,2}, YANG Yang^{1,2}, ZHANG Zheng², LI Bin², LIAO Meijie², DENG Wei³, MENG Fanlin⁴

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China;

3. Tianjin Aquatic Animal Disease Prevention and Control Center, Tianjin 300221, China;

4. Qingdao Zhongren Animal Health Product Company, Jiaozhou 266300, China

Abstract: In July 2014, the widely cultured pond crab *Portunus trituberculatus* (commonly called Chinese swimming crab) had a disease outbreak along the coasts of Tianjin and Hebei provinces, China, resulting in massive mortalities. Symptoms of two different illnesses appeared in the crabs. One was white muscle disease (WMD), with its symptoms being anorexia, slowed movement, and the muscles turning opaque white and finally emulsifying into a toothpaste-like consistency. Mortality among the crabs displaying WMD was 60%–70%. The other was milky disease (MD), which displayed as a softened carapace, cessation of feeding, slowed movement, and the muscles similarly turning opaque white but then becoming watery ('milky') and finally shrinking; the coelomic fluid and the deteriorated tissue leaked from the body and had not coagulated. Mortality among the crabs displaying MD exceeded 90%. According to the characteristics of the epidemic, and histopathological and ultrastructural analyses, the supposed cause of WMD was infection with a microsporidian. The parasite was ellipsoid, measured (1544±250) nm, and had the following structure: pole filament (8 or 9 laps), spore wall [thickness (130±22) nm], cilium (length 120–500 nm), polaroplast [(726±200) nm], pole tube, anchoring disk, plasma membrane and nucleus. The MD outbreak was caused by *Hematodinium* sp., a monad, sized 8–10 μm, with an oval shape, and wrinkled and raised surface; its basic structure was a cell wall, multiple nuclei, cilium and other structures. Histopathological examination showed that the two kinds of diseased crabs had significantly different muscle lesions. The crabs associated with WMD had many microsporidia adhering to their muscle fibers, causing the fibers to break, collapse and necrosis, finally reducing them to muscle bundles. SEM observations showed that the muscle cells became fused and acquired a large number of vacuoles, while the mitochondria and endoplasmic reticulum disintegrated and disappeared. In comparison, the gap in the muscle bundles was bigger in cases of MD, in which numerous parasites occupied or adhered to the muscle fibers, resulting in the fibers rupture, disintegration, and resolvable necrosis. Electron microscopy also confirmed that the two different parasites could infect the same tissue in the same crab, and both parasites could enter the disintegrated cytoplasm after muscle cell fusion. Since the initial epidemic of these diseases, other occurrences of WMD and MD have tended to cause a higher level of mortality, causing concern as significant diseases currently effecting the crab-farming industry.

Key words: *Portunus trituberculatus*; white muscle disease; milky disease; microsporidian; *Hematodinium* sp.; resolvable necrosis

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn