

中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学

陆宏达

范丽萍 薛美

(上海水产大学渔业学院, 200090)

(上海市崇明县水产技术推广站, 202150)

摘要 本文对所谓“抖抖病”的中华绒螯蟹病蟹病因进行了分析研究。经电镜观察, 病蟹的心脏、腹神经节、鳃、肠和肝胰腺组织中存在着球状病毒粒子, 病毒无囊膜, 直径为 28~32nm 左右, 分布在细胞浆内, 不形成包涵体。从病毒形态和染色反应特性确定该病毒为小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 病毒。经人工注射病蟹组织浆除菌上清液, 被感染的健康蟹出现与自然发病蟹步足严重抖动等完全一样的症状, 表明病蟹中的小 RNA 病毒为该病病原。病蟹病理特征为: 细胞肿大, 核溶解或固缩, 线粒体肿大、嵴断裂、扭曲或坏死溶解。病变最严重的区域, 组织细胞坏死崩解成一片无结构的物质。

关键词 中华绒螯蟹, 小核糖核酸病毒, 组织病理学

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 养殖期死亡率较高, 其病害问题越来越受到人们的关注, 我们对病蟹进行细菌性疾病研究的同时, 发现有很大一部分病蟹分离不到致病菌, 生产单位用抗菌药物进行治疗也无效果。这些病蟹最主要的症状为在疾病充分发展期, 蟹的步足出现严重抖动现象, 许多地方称它为“抖抖病”, 该病已在江苏、浙江、上海、安徽等养蟹地区大量出现, 迫切需要确定病因等问题。经电镜观察病蟹组织内存在大量病毒颗粒, 病蟹组织浆除菌过滤后的上清液对健康蟹人工感染试验, 出现与病蟹完全相同的病症, 确定该病的发病原因是由病毒引起的。

中华绒螯蟹的病毒性疾病迄今为止国内外均未见报道。姜静颖等[1996]报道, 从大眼幼体刚变为幼蟹几天时的蟹组织匀浆离心后, 上清液经负染电镜观察发现一种球状病毒颗粒, 但未确定该颗粒归属于哪一类病毒以及该颗粒是否是造成幼蟹死亡的致病病原, 也未进行组织病理观察等工作。本研究确定中华绒螯蟹从扣蟹到成蟹出现严重抖动症状而死亡的致病原因因为病毒的报告属首次, 这对于认清中华绒螯蟹疾病的种类、减少目前许多养蟹场由于不明病因而滥用药物的现象以及进一步做好中华绒螯蟹的防病治病等工作将有极大的帮助。

1 材料和方法

1.1 实验材料

病蟹采自上海市崇明县发病蟹塘, 养蟹单位曾用抗菌药物进行治疗均无效。病蟹大小规格不等, 扣蟹养殖池以及成蟹养殖池的蟹都有发病。健康蟹采自上海市崇明县健康蟹塘, 在室内水族箱驯养一周后无异常现象。抽样进行检查和细菌分离, 未发现寄生虫和细菌。电镜检查也未发现病毒颗粒。

1.2 病蟹寄生虫检查和细菌分离

1.2.1 寄生虫检查

将病蟹体表、鳃和内脏组织制成水浸片,在显微镜下观察检查。

1.2.2 细菌分离

病蟹用清水洗刷干净后,用 75% 的酒精棉球将病蟹的外壳以及步足外表擦拭,进行体表消毒。用灭菌针筒从蟹第三步足基部抽取血淋巴液,然后迅速将 1~2 滴的血淋巴液注滴到营养琼脂平板上进行划线分离;同时还进行内脏组织致病细菌分离,病蟹体表经 75% 酒精消毒后,打开蟹的甲壳,用无菌镊子取少许肝胰腺或心脏组织在营养琼脂平板上划线分离。在 28℃ 恒温培养箱中培养 18~24 小时后,观察细菌分离结果。

1.3 病蟹组织浆除菌上清液人工感染

光、电镜观察所需病蟹材料取样后,余下的病蟹肝胰腺、神经节和心脏用无菌生理盐水冲洗 4~5 次后称重,加入 3 倍于组织重量的无菌生理盐水,用无菌玻璃研磨管对病蟹组织进行研磨,组织细胞充分破碎后,进行 7000 转/分低温离心半小时,取上清液,用 0.22 μm 孔径大小的无菌微孔滤膜过滤,然后用灭菌针筒吸取过滤液从健康蟹第三步足基部注射到蟹的腹腔内,每只健康蟹注射 0.2ml,对照组每只蟹注射 0.2ml 无菌生理盐水,过滤液经营养琼脂平板培养,未培养出细菌。感染组蟹和对照组蟹分别养在气泵充气的水族箱(60cm × 30cm × 25cm)中,每天投喂杂鱼和人工颗粒饲料,虹吸法每天排污和换水 2 次。每次换掉 1/3 左右的原水量,试验期间水温为 28~30℃。

1.4 电镜负染

人工感染注射前,取经 0.22 μm 孔径大小的无菌微孔滤膜过滤后的上清液少许直接滴在有支持膜的铜网上,数分钟后用一片干净滤纸从网边吸去液体,稍干后用 2% 磷钨酸液染色一分钟,滤纸吸去染液后,在 JEM-100CX II 透射电镜下观察拍照。

1.5 电镜超薄切片

切取中华绒螯蟹的肝胰腺、心、肠、鳃和腹神经节组织,组织块大小约为 0.5 mm 见方,立即放入经冰箱预冷至 4℃ 左右磷酸缓冲液缓冲的 2.5% 戊二醛溶液中固定。样品经缓冲液冲洗,再用 1% 锇酸后固定 2 小时,酒精、丙酮脱水, Epon 812 树脂包埋,超薄切片机切片,用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,在 JEM-100CX II 透射电镜下观察拍照。

1.6 光镜石蜡切片

在电镜取样的同时,取中华绒螯蟹的肝胰腺、心、肠、鳃和腹神经节组织,用刀片切成 2~3 mm 见方的小块,立即放入 Bouin 氏液中固定,24 小时后冲洗,并在 70% 酒精中保存备用。经酒精进一步脱水后,石蜡包埋,切片厚度为 5~7 μm ,用苏木精-伊红(H. E.)染色,部分切片用孚尔根(Fuelgen)和过碘酸-席夫氏(PAS)染色法进行特殊染色,在 Olympus 显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 病蟹症状

病蟹在发病初期摄食量减少, 行动减慢, 手握病蟹, 病蟹的挣脱能力明显降低, 螯足的握力明显减弱, 病蟹脱壳困难。随着病情的进一步发展, 病蟹不吃食, 常伏在池底或步足呈撑着于池底的姿势, 步足出现严重抖动, 此时病蟹离水使其腹部向上后已不能自行翻身, 不久死亡。刚死时步足一般呈僵缩状态, 从病蟹出现抖动现象到死亡, 在水温 30℃左右时, 一般需 2~3 天, 少数可持续 4~5 天。病蟹的血淋巴液离体后不完全凝固或凝固时间明显延长, 甚至不凝固。心、肠、腹神经节肿大, 心跳乏力, 肠中一般无食物。肝胰腺变苍白, 大部分病蟹鳃呈浅棕色。发病蟹的大小不等, 从小的 3 克左右到大的 120 克左右, 都有发病, 症状基本一致。

2.2 病蟹寄生虫检查和细菌分离

对病蟹的体表、鳃以及内脏器官经显微镜检查没有或只在蟹甲壳外表、鳃上发现几个纤毛虫类的寄生虫, 这些少量的纤毛虫不足以引起这些蟹发病及死亡。

无论是无菌操作打开蟹甲壳取少量肝胰腺和心脏组织, 还是用灭菌针筒抽取血淋巴液, 均未分离到细菌。

2.3 病毒电镜观察

经电镜负染和电镜超薄切片观察, 病毒粒子为无囊膜的球状颗粒, 直径为 28~32nm, 其壳粒可辨(图版 I-1)。病毒分布在细胞浆内, 在细胞浆内增殖和成熟, 成熟的病毒粒子中间有一个电子密度深的核心, 病毒粒子前体是空衣壳, 这种不成熟的病毒粒子中间无电子密度深的核心(图版 I-2)。病毒在组织细胞内不形成包涵体, 病变组织细胞经 PAS 和 Fuelgsn 染色, 分布病毒的细胞浆部位均呈阴性反应, 表明该病毒的核酸组成为 RNA。

2.4 病蟹组织浆除菌上清液负染电镜观察和人工感染

负染电镜观察结果表明, 病蟹组织浆除菌上清液中存在大量病毒颗粒, 除菌上清液人工感染结果见表 1。人工感染的病蟹出现与自然发病的病蟹步足严重抖动等完全一样的病症。对照组蟹步足未出现抖动等症状。

表 1 病蟹组织浆除菌上清液人工感染注射健康蟹的试验

Tab. 1 The artificial injecting infections of filtered fluid from ground tissue of diseased *Eriocheir sinensis*

病蟹来源	病蟹大小 (g)	健康蟹大小 (g)	感染量 (mL)	死亡数/感染数	死亡顺序和时间					
					1	2	3	4	5	6
崇明新村乡	10~22	50~60	0.2	6/6	8	12	12	14	14	15(天)
崇明新民镇	70~95	50~60	0.2	6/6	8	12	13	16	16	17(天)
对照组	无菌生理盐水	50~60	0.2	0/6	40天内均成活					

2.5 显微结构病理变化

所观察的鳃、腹神经节、心脏、肝胰腺和肠 5 种组织器官,病蟹各组织器官绝大部分区域显微病变不明显,这可能由于局部区域出现严重病变尚未扩大到整个组织器官的情况下蟹已死亡的原因。

鳃:中华绒螯蟹的正常鳃是由鳃轴和向两侧发出相互平行的鳃叶构成。鳃叶的壁是由单层扁平上皮细胞以及由其分泌的极薄一层角质膜组成,由上皮细胞特化而成锥形柱细胞使鳃叶两侧壁相连,上皮细胞和柱细胞共同形成许多成网状的血腔。病变初期的鳃,鳃叶扁平上皮细胞和柱细胞肿大,部分细胞核肿大并开始溶解,部分核固缩深染,鳃叶增厚,鳃叶外覆盖较多的粘液(图版 I-3)。病变后期的鳃,鳃叶上皮细胞以及柱细胞出现坏死,细胞膜破裂,鳃叶壁由于细胞的坏死崩解而破损,鳃叶血腔裸露于外界环境,进而整个鳃叶解体后病变成一片无结构的物质(图版 I-4)。

腹神经节:正常的神经细胞的胞体内分布有均匀的尼氏颗粒。病变初期,神经细胞肿大,胞体内出现空泡变性而呈现蜂窝状(图版 I-5)。病变后期,尼氏颗粒逐渐溶解消失,出现液化性坏死,神经细胞周围的胶质细胞同样坏死崩解,病变最严重的区域,神经细胞胞体以及周围的胶质细胞液化坏死成一片无结构的物质(图版 I-6)。神经纤维部分也出现坏死解体现象。

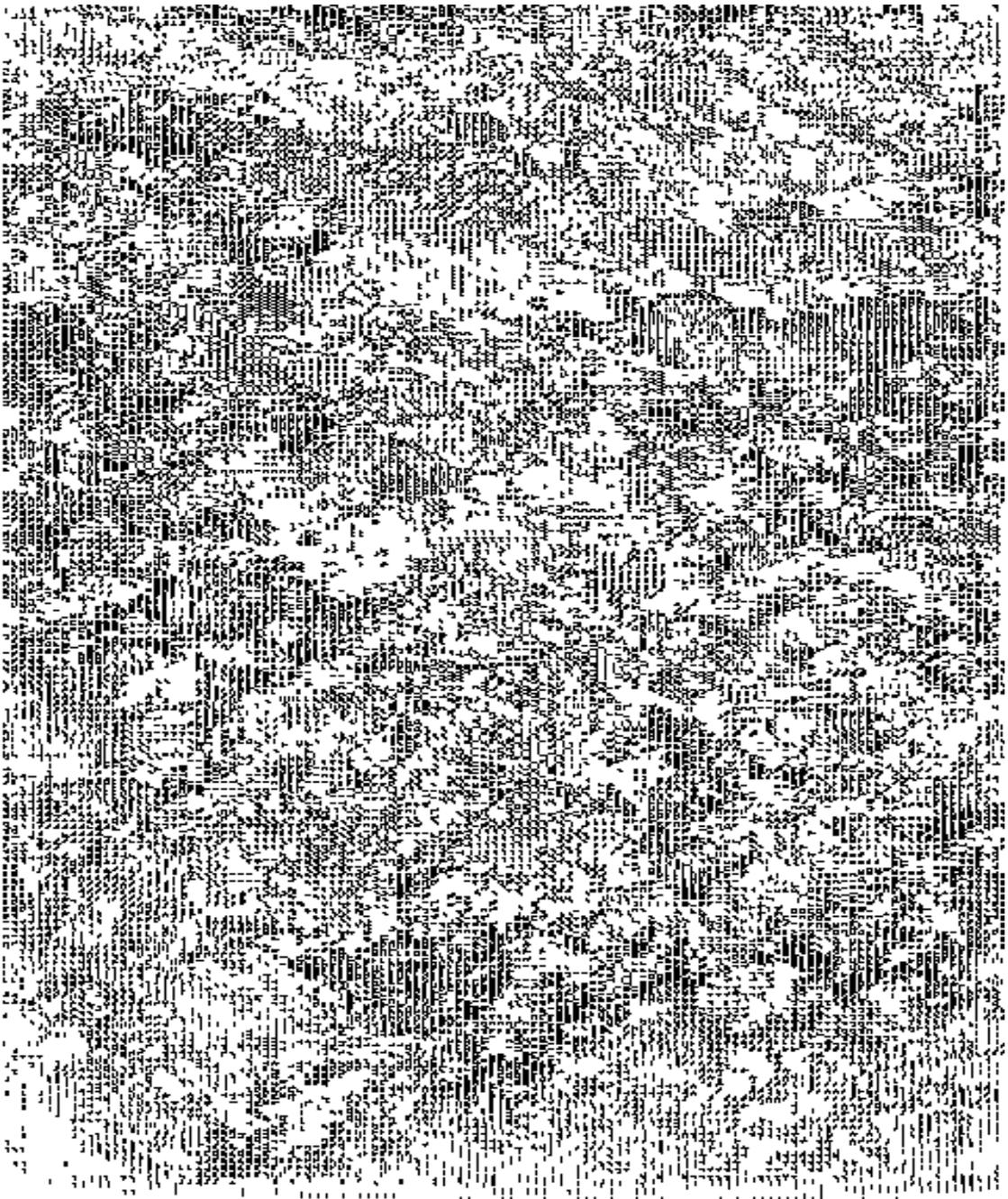
心脏:心脏水肿,心肌周围由于水肿液的蓄积而间隙增大,部分心肌纤维横纹消失,出现坏死病灶(图版 I-7)。

肝胰腺:河蟹肝胰腺的组织结构同十足目的其它种类相似,由无数肝小管组成,每一肝小管都是由位于基膜上的单层柱状上皮细胞构成。病变初期,肝小管主要表现为上皮细胞肿大,细胞间界线不明显。病变后期,细胞坏死解体,坏死细胞脱离基膜,进入肝小管管腔,肝小管内充满崩解的细胞成分(图版 I-8),随着病变的进一步发展,整个肝小管以及周围结缔组织坏死成一片无结构的物质。

肠道:肠道部分区域出现较严重的病变,肠道外膜出现水肿,水肿液积蓄在结缔组织中,并出现细胞肿大。而粘膜层坏死脱落进入肠腔,许多柱状上皮细胞坏死解体后只残留裸露的固缩核(图版 II-1)。

2.6 超微结构病理变化

电镜观察病蟹的鳃、腹神经节、心脏、肝胰腺和肠 5 种组织器官的细胞浆中都有较多的病毒侵入,尤其在鳃、心脏和腹神经节的细胞浆中堆积着大量的病毒颗粒(图版 II-2),鳃、肝胰腺和肠的细胞浆电子密度极淡,细胞器疏松,稀少而分散,而心脏和腹神经节的细胞浆中出现较多的同心圆排列的板层状髓样小体(图版 II-3),有些高度肿胀的线粒体内也出现板层状结构,嵴减少、断裂、溶解(图版 II-4)。各器官组织的细胞其它超微结构病变十分相似,细胞浆中都出现线粒体肿大、嵴断裂、扭曲或崩解消失呈空泡状。病毒可进入线粒体的内、外膜之间,并进行增殖,当达到一定数量时,内膜凹陷,并包在病毒群外围,形如吞噬作用进入线粒体内部(图版 II-5)。病毒增殖,数量不断增加,产生大量排列较为规则的病毒群(图版 II-6)。部分线粒体膜出现凹陷、弯曲,双层膜变成单层膜,甚至内、外膜都崩解而消失。细胞浆内常出现较多的吞噬体,内包含许多病毒颗粒,当达到一定数量时,膜破裂,病毒被释放到细胞浆中(图版 II-7),有相当一部分细胞核固缩成不规则形,染色质边集(图版 II-8)。



图版 I Plate I

1. 病蟹组织浆除菌上清液的负染电镜观察, 示病毒粒子, 壳粒可辨。× 100000。(横线= 100nm); 2. 病毒堆积在细胞浆内, 示成熟病毒粒子(小箭头)和空衣壳(大箭头)。× 82000。(横线= 120nm); 3. 鳃叶增厚, 细胞核肿大(小箭头), 核固缩(大箭头)。H. E., × 536; 4. 鳃叶坏死成一片无结构的物质。H. E., × 536; 5. 神经细胞体内出现空泡变性(箭头)而成蜂窝状。H. E., × 536; 6. 神经细胞出现液化灶坏死(箭头)。H. E., × 536; 7. 心肌周围由于水肿液的蓄积而间隙增大(箭头)。H. E., × 268; 8. 肝小管上皮细胞坏死, 脱离基膜, 进入管腔内。H. E., × 268。



图版 II Plate II

1. 肠粘膜上皮细胞坏死脱落, 肠腔中有许多固缩核(箭头)。H. E., $\times 268$; 2. 大量病毒粒子堆积在细胞浆内, 线粒体嵴溶解消失(箭头)。 $\times 19000$ 。(横线= 530nm); 3. 细胞浆内出现同心圆排列的板层状髓样小体。 $\times 36000$ 。(横线= 280nm); 4. 肿大的线粒体内出现板层状结构, 嵴减少, 溶解。 $\times 36000$ 。(横线= 280nm); 5. 肿大的线粒体内膜凹陷(小箭头), 包围着许多病毒颗粒(大箭头)。 $\times 48000$ 。(横线= 210nm); 6. 肿大的线粒体内出现排列较为规则外包有一层膜的病毒群(箭头)。 $\times 29000$ 。(横线= 350nm); 7. 细胞浆中吞噬体的膜破裂, 病毒释放到细胞浆内(箭头)。 $\times 19000$ 。(横线= 530nm); 8. 细胞核固缩成不规则形, 染色质边集。 $\times 19000$ 。(横线= 530nm)。

3 讨论

3.1 致病原因

小 RNA 病毒科病毒是动物病毒中最小和最简单的病毒, 由蛋白质衣壳和 RNA 核心构成, 该种病毒的种类繁多, 共有 200 多种, 而病毒的型和亚型则更多, 除危害人、猴、马、猪、狗、鸭、猫和鼠等动物外 [殷震和刘景华 1985], 对某些水产动物也有严重危害的报道, 如草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) [毛树坚等 1989]、细角对虾 (*Penaeus stylirostris*)、万氏对虾 (*P. vannamei*)、斑节对虾 (*P. monodon*) [Bell 和 Lightner 1984, Lightner 等 1983] 和美洲蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) [Johnson 1978], 得病后可引起较高的死亡率。本研究对病蟹心、肠、鳃、肝胰腺和腹神经节组织器官电镜观察和组织浆离心后除菌上清液负染电镜观察, 均存在大量病毒颗粒。从病毒形态大小以及染色反应的特性表明, 病毒属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 病毒。

除菌上清液对健康蟹人工注射感染, 感染组蟹出现与自然发病蟹步足严重抖动等完全一样的症状, 在 8~17 天内全部死亡, 死亡率达 100%, 表明病蟹中观察到的小 RNA 病毒是造成目前许多养蟹场出现所谓“抖抖病”而大批发病死亡的病因。

3.2 病理特征

病蟹的鳃、心、肠和肝胰腺在发病初期主要表现为局部组织细胞肿大, 而腹神经节中的神经细胞胞体除出现肿大外, 在胞浆内出现大量空泡。随着病变的进一步发展, 病变的局部组织细胞崩解坏死, 坏死细胞核溶解或固缩。超微结构的病理变化主要表现为线粒体病变, 病毒通过线粒体的内膜凹陷而进入线粒体内, 线粒体肿大、嵴断裂、扭曲溶解消失。而在心脏和腹神经节细胞浆中出现较多同心圆排列的板层状髓样小体, 髓样小体增多常是病毒感染靶细胞的最重要病变特征。

3.3 发病死亡的过程

许多小 RNA 病毒在其它动物中是肠道寄居者, 不引起严重的临床病症, 但如侵入心脏和中枢神经系统, 则可导致破坏性病变, 危害性极大, 如小鼠的脑心肌炎病毒和人的脊髓灰质炎病毒, 轻者残废, 重者死亡。在中华绒螯蟹病蟹上发现的小 RNA 病毒在所检查的 5 种组织器官中都存在, 尤其在鳃、心脏和腹神经节细胞浆内, 病毒大量成片聚集, 病毒侵入线粒体, 使线粒体肿大、嵴断裂、扭曲或溶解消失等严重损伤。线粒体内分布有种类繁多的酶类, 参与细胞内的生化活动, 同时细胞内各项生化活动所需的能量 ATP 大都由线粒体提供。线粒体病变受损, 直接影响机体的生命活动。心肌纤维中, 线粒体病变崩解消失, 不能或不能足量提供心肌纤维终生不断不停地进行着收缩舒张运动的 ATP 能量需要, 最终导致心律衰竭, 血淋巴液循环障碍。鳃组织细胞内线粒体病变, 鳃叶的上皮细胞坏死成一片无结构物质, 直接影响气体交换。与呼吸有关的心脏和鳃功能的丧失而导致病蟹死亡。腹神经节细胞内线粒体的病变以及神经细胞坏死分解, 不仅影响能量的供应而且影响信息传递, 神经组织的严重受损是导致病蟹步足出现严重抖动症状的主要原因。而蟹病脱壳困难可能跟病蟹不吃食处于饥饿状态以及与脱壳有关的神经系统受到破坏有关。

3.4 温度是该病发生的主要外部因素

该病在春季就有出现,但发病率很低,随着水温升高,发病率明显增加,进入夏季 7~9 月份,是该病的流行高峰期,此时水温在 28℃ 上下,发病后死亡率一般可达 70% 以上。秋季,随着水温的下降,该病的发生明显减少。该病的发生和发展,温度起着至关重要的作用。

参 考 文 献

- 毛树坚,邵健忠,杭 绮等. 1989. 草鱼出血病的病原研究. 水产学报, 3(1): 1~ 4
- 姜静颖,邢殿楼,王 斌等. 1996. 池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察. 大连水产学院学报, 11(1): 51~ 53
- 殷 震,刘景华. 1985. 动物病毒学. 北京: 科学出版社. 391~ 433
- Bell T A, Lightner D V. 1984. IHNN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 38: 185~ 194
- Lightner D V, Redman R M, Bell T A. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis(IHNN), a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. Invertebr. Pathol., 42: 62~ 70
- Johnson P T. 1978. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Mar Fish Rev, 40(10): 13~ 15

A PICORNAVIRUS DISEASE AND HISTOPATHOLOGY OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

LU Hong-Da

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

FAN Li-Ping, XUE Mei

(Fisheries Technical Advice Station of Chongming County, Shanghai, 202150)

ABSTRACT The cause of *Eriocheir sinensis* disease, which was called as “Trembling Disease” by the fish farmers, was studied. Examination by electron microscopy showed that there were a numbers of viral particles in the tissues of heart, abdominal nerve ganglion, gill, intestine and hepatopancreas and there was no envelope outside virion. The diameter of virion was approximately from 28nm to 30nm. Virions occurred in the cytoplasm and did not form the inclusion body. According to the characters of viral morphology and dyeability, the virus belonged to Picornaviridae. The healthy *Eriocheir sinensis* after injected with filtered fluid from ground tissues of diseased *Eriocheir sinensis* appeared the same symptom of legs trembling as that of the natural diseased one. This result confirmed that the picornavirus was pathogen of the disease. The histopathological changes: cells oedema, karyolysis or karyopyknosis, mitochondria oedema, mitochondria cristae broken, curved and necrolysis. The necrotic cells became the substances of no cell structure in the severe necrotic areas.

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, Picornavirus, Histopathology