



中华绒螯蟹“水瘪子”病的主要体征指标

冯 杨¹, 黄小丽¹, 汪开毓^{2*}, 陈 辉³, 王晶晶³

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130;

3. 江苏省渔业技术推广中心, 江苏 南京 210036)

摘要: 中华绒螯蟹的“水瘪子”病是一种以肝胰腺发白萎缩为主的多症状疾病, 本研究旨在评估“水瘪子”病的主要体征指标, 为科研人员和临床工作者进一步规范诊断标准提供参考。通过采集江苏兴化和盐城健康或疑似“水瘪子”病的中华绒螯蟹样本, 测量评定了11个体征指标并进行了系统聚类、主成分回归以及多重对应分析。通过分析共获得“水瘪子”病的5个体征指标, 并评估了“水瘪子”病的5个症状变化, 分别为活力差, 遇应激时无逃跑、爬动等运动现象; 较低壳硬度, 剥离头胸甲时头胸甲部分区域破碎; 步足肌肉萎缩, 可能出现积水; 肝胰腺呈淡黄、白或灰白色; 肝胰腺指数低(2%~9%)。同时, 分析结果显示, 体质量降低、鳃和肝胰腺颜色加深等一些症状表现与“水瘪子”病的常规症状无明显相关。研究表明, 活力、壳硬度、肌肉饱满度、肝胰腺颜色和肝胰腺指数等指标可能成为“水瘪子”病评估中的主要体征指标。

关键词: 中华绒螯蟹; “水瘪子”病; 主要体征指标; 聚类分析; 主成分回归分析; 多重对应分析

中图分类号: S 945

文献标志码: A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、弓蟹科(Varunidae)。由于人们喜爱食用中华绒螯蟹的“蟹黄”和“蟹膏”(即肝胰腺和性腺), 因此其在我国拥有极大的市场前景和价值^[1]。目前, 中华绒螯蟹作为我国主要经济蟹类, 在江苏、安徽、湖南、湖北等多省大规模养殖^[2]。然而, 随着高密度、集约化养殖的发展, 疾病日益凸显, 如弧菌病^[3-4]、颤抖病^[5]、孢子虫病^[6]等严重影响着中华绒螯蟹的养殖产业健康发展。二十一世纪初, 养殖中华绒螯蟹出现以肝胰腺发白萎缩为主要表现的疾病, 使蟹无“黄”可吃, 严重丧失经济价值^[7]。由于病蟹看起来外形干瘪, 养殖户称其为“水瘪子”病^[8]。2015年, 江苏省出现“水瘪子”病大暴发,

其中兴化市80%以上池塘出现该病, 单个池塘发病率达到30%~40%^[9]。此后, “水瘪子”病的患病范围逐渐扩大, 累计造成数十亿元的经济损失^[10]。

“水瘪子”病最初被命名为“中华绒螯蟹肝胰腺白化症”^[11-12], 2015年随着疾病暴发, 被改为“中华绒螯蟹肝胰腺坏死综合征(hepatopancreatic necrosis disease, HPND)”^[13]。由于难以评判肝胰腺病变是否以坏死为主, 被行业内定为“中华绒螯蟹肝胰腺病变综合征”(文中以“水瘪子”病表示)。然而, 除了解“水瘪子”病的病变靶器官为肝胰腺外, 目前对“综合征”三字的症状总结却不尽人意。虽然“水瘪子”病是一种综合性疾病, 但对其发病症状并无统一的诊断标准。陆宏达等^[14]认为“水瘪子”病蟹的临床表现为食欲减退、上岸

收稿日期: 2018-11-21 修回日期: 2019-09-26

资助项目: 江苏省水产三新工程项目(D2017-4)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

频繁、离水易死, 剖检时可见甲壳颜色加深、肝胰腺发白萎缩、附肢中空、肌肉萎缩等; 周日东等^[15]认为“水瘪子”病蟹表现为肝胰腺发白萎缩、附肢空瘪不坚硬; 杨先乐^[16]认为“水瘪子”病蟹的症状为肝胰腺颜色变化(发白、发灰或发红)及萎缩坏死、蟹腿空壳无肉、鳃丝发白且脆(偶见黑鳃); 宋学宏等^[12]认为“水瘪子”病蟹肌肉松弛萎缩、剖开头胸甲有异臭味、肝胰腺发白呈糜烂状、鳃丝发黑; 此外, 杨宗英等^[8]认为“水瘪子”病蟹症状表现为肝胰腺呈淡黄或土黄色、鳃丝水肿发黑、附肢发软, 以及肌肉萎缩等。除此外, 养殖户通常还认为“水瘪子”病蟹具有体质量降低的变化。可以发现, 虽然研究者普遍将上岸频繁、甲壳变薄、肝胰腺颜色发白萎缩, 以及附肢空瘪无肉等作为“水瘪子”病的症状, 但部分研究者也认为体质量降低、肝胰腺颜色变深、鳃丝发黑等病变是“水瘪子”病的常规症状。

由于缺乏诊断标准, 使研究者难以采集到“真实的‘水瘪子’病蟹”样品, 干扰实验结果真实性, 同时容易影响养殖户的正确判断, 误将肝炎或其他肝胰腺疾病诊断为“水瘪子”病, 引起治疗与防控失败。因此, 弄清与“水瘪子”病相关

的主要症状, 统一诊断标准, 并简化诊断过程, 不仅有利于中华绒螯蟹“水瘪子”病因追踪, 同时为建立该病正确有效的防控措施提供基础参考。本实验拟采用系统聚类、主成分回归以及多重对应等数学分析方法, 从11个常见“水瘪子”病病征指标中筛选并预测该病的主要体征指标, 旨在为科研人员和临床工作者统一“水瘪子”病的诊断标准提供参考借鉴。

1 材料与方 法

1.1 制定评分标准

设立性别、活力、体质量、体宽、壳硬度、肌肉饱满度、血淋巴颜色、鳃颜色及肝胰腺颜色、质量和指数11个可能与“水瘪子”病存在关联的指标并制定相应评分标准。其中, 性别为定义类数据, 雄蟹定义为“1”, 雌蟹定义为“2”; 活力、壳硬度(图1-a)、肌肉饱满度(图1-b)、血淋巴颜色(图1-c)、鳃颜色(图1-d)及肝胰腺颜色(图1-e)为分类变量, 采用评分制(所有评分均由1人完成, 采用目视评分法, 颜色评级参考潘通色卡); 体质量、体宽、肝胰腺质量和肝胰腺指数[为肝胰腺质量(g)/体质量(g)×100%]为连续变

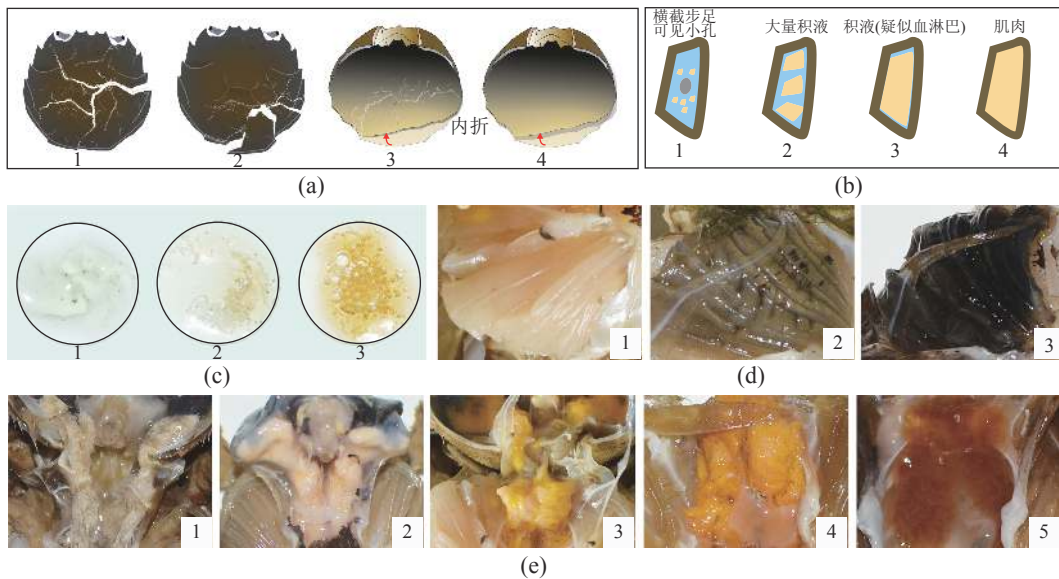


图 1 中华绒螯蟹的各指标评判标准示例

(a) 根据易破碎程度评判头胸甲甲壳硬度, 为4个阶段; (b) 根据第三步足肌肉占据横截面积及积液含量评判肌肉饱满度, 为4个阶段; (c) 血淋巴根据不同颜色划分为3个阶段; (d) 鳃根据不同颜色划分为3个阶段; (e) 肝胰腺根据不同颜色划分为5个阶段

Fig. 1 Evaluation criteria of clinical indicators for *E. sinensis*

(a) the hardness of the shell is divided into 4 stages according to the degree of fragility of the head breastplate; (b) the muscles are divided into 4 stages according to the cross-sectional area of the muscles and the effusion content; (c) the hemolymph is divided into 3 stages according to different colors; (d) the gills are divided into 3 stages according to different colors; (e) the hepatopancreas are divided into 5 stages according to different colors

量, 采用直接测量(或计算), 具体标准见表1。为“1”, 6月为“2”, 7月为“3”, 8月为“4”, 9月为此外, 研究中收集数据时间跨度较大, 因此采取“5”)以减少时间无关变量的影响。
取纳入法(根据样本采集的时间进行定义: 5月

表1 中华绒螯蟹各指标评判标准

Tab. 1 Indicators for *E. sinensis*

项目 item	数据类型 type	评定级别 level	分组标准 criteria
性别 sex	分类变量	1	雄性, 腹脐呈尖形
		2	雌性, 腹脐呈圆钝形
活力 vitality	分类变量	0	死亡
		1	活力低下, 捉起后放下时无明显爬行现象或爬行能力弱
		2	较低活力, 爬行能力中等, 触摸、捕捉等动作造成其有逃跑倾向
		3	中活力, 爬行速度快, 逃跑能力强, 但捉起时无明显挣脱倾向
体质量 body weight	连续变量	4	高活力, 捉起后有明显挣脱、攻击倾向等
			中华绒螯蟹身体湿重
			中华绒螯蟹头胸甲最后一排侧齿间距离
			中华绒螯蟹头胸甲最后一排侧齿间距离
壳硬度 shell hardness	分类变量	1	最低硬度, 捕捉时头胸甲破碎、或轻压/剥离时头胸甲破碎、基本无法剥离等(图1-a ₁)
		2	较低硬度, 无法完整剥离头胸甲, 部分区域破碎(图1-a ₂)
		3	中等硬度, 可完整剥离头胸甲, 以食指为支点内折头胸甲尾部边缘出现破裂(图1-a ₃)
		4	高壳硬度, 可完整剥离头胸甲, 以食指为支点内折头胸甲尾部边缘未破裂(图1-a ₄)
肌肉饱满度 muscle fullness	分类变量	1	最低饱满度, 揉捏附肢明显柔软有水分, 剪开步足后, 横截面可观察到大量积液, 且步足肌严重萎缩, 肌肉中部内陷成小孔(图1-b ₁)
		2	较低饱满度, 揉捏附肢柔软有水分, 剪开步足后, 横截面可观察到大量积液, 有肌肉萎缩现象, 但步足肌未内陷为小孔(图1-b ₂)
		3	中等饱满度, 揉捏附肢时感觉饱满, 剪开步足后, 横截面可见肌肉与甲壳之间明显积液(图1-b ₃)
		4	高饱满度, 揉捏附肢时感觉饱满, 剪开步足后, 横截面可见肌肉饱满, 无明显积液, 轻轻挤压时有少量血淋巴流出(图1-b ₄)
血淋巴颜色 hemolymph color	分类变量	1	抽取血淋巴后30 s内, 目检血淋巴颜色呈淡蓝色或无色透明(图1-c ₁)
		2	抽取血淋巴后30 s内, 血淋巴颜色呈淡黄色(图1-c ₂)
		3	抽取血淋巴后30 s内, 血淋巴颜色呈黄色、混浊(图1-c ₃)
鳃颜色 gill color	分类变量	1	鳃呈白色/轻微偏红(图1-d ₁)
		2	鳃颜色呈灰/棕/红色(图1-d ₂)
		3	鳃颜色呈黑/褐色, 鳃表面有大量杂质(图1-d ₃)
肝胰腺颜色 hepatopancreas color	分类变量	1	肝胰腺呈白色/灰白色(图1-e ₁)
		2	肝胰腺呈淡黄色, 或黄色间夹带白色(图1-e ₂)
		3	肝胰腺呈黄色(图1-e ₃)
		4	肝胰腺呈橙黄色(图1-e ₄)
		5	肝胰腺呈褐/黑色(图1-e ₅)
肝胰腺质量 hepatopancreas weight	连续变量		单只中华绒螯蟹体内肝胰腺总质量
肝胰腺指数 hepatopancreas index	连续变量		肝胰腺质量与体质量的比值

1.2 现场调查与样品采集

江苏兴化和盐城为中华绒螯蟹主养区,也是“水瘪子”病暴发最为严重的地区,本次现场调查和样品采集的地点位于兴化市8个乡镇和盐城市4个乡镇共52个采样点(图2,表2)。采集方式主要为地笼以及捕捉夜晚上岸蟹,以肝胰腺病变、鳃丝腐烂黑、软壳、上岸活力低下等标准

收集疑似“水瘪子”病蟹。此外,对症状如肠炎、四肢颤抖、僵硬等未表明与“水瘪子”病相关病症的样本予以剔除。蟹捕捉后1 h内完成各指标的测定。本次样品采集时间为2017年5月—2018年9月,每月样品采集时间控制在1周内,共收集数据515份,剔除指标不完整的数据(表2)。

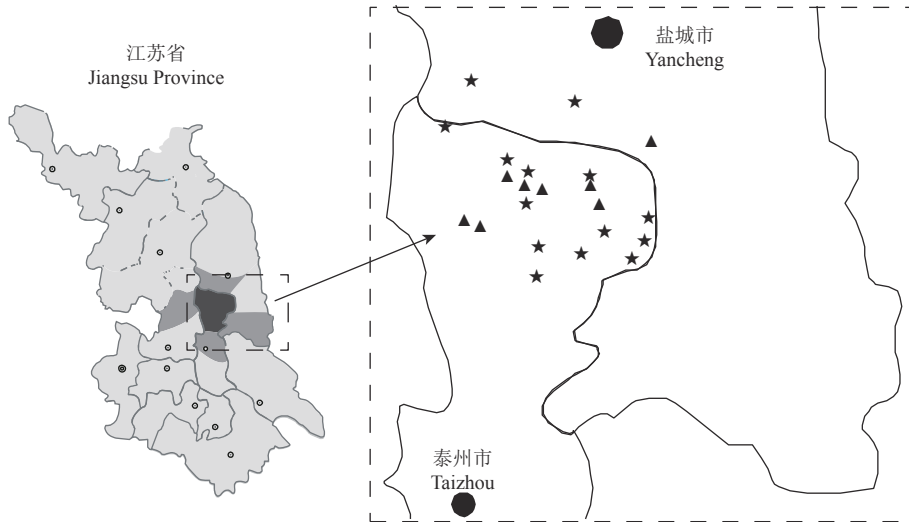


图2 中华绒螯蟹采集地点

▲ 2017年样品采集地点; ★ 2018年样品采集地点

Fig. 2 Collecting sites of *E. sinensis*

▲ collecting site in 2017; ★ collecting site in 2018

表2 样品采集统计

Tab. 2 Sample collection statistics

采样时间 sample time		采样池塘/口 sample pond	采样地点 sample sites	样品数量/只 number of samples
年份 year	月份 month			
2017	4	18	兴化海南镇(18)	176
	6	8	兴化城东镇(5)、老圩镇(1)、徐杨镇(1); 盐城便仓镇(1)	72
	9	2	兴化城东镇(1)、新垛镇(1)	29
2018	5	14	兴化海南镇(3)、草堰镇(4)、合陈镇(1)、安丰镇(1); 盐城郭猛镇(2)、大纵湖镇(2)、义丰镇(1)	113
	8	10	兴化海南镇(2)、草堰镇(2)、安丰镇(2)、合陈镇(3)、大垛镇(1)	125

1.3 数据分析

汇总所有指标信息用于“水瘪子”病的主要体征指标的统计分析。

数据标准化 由于本次研究中各评价指标的性质不同,且具有不同的量纲和数量级,因此,为了保证结果的可靠性,需要对原始指标数据进行标准化处理。本研究采用Z-score标准

化法,将各指标数据按比例缩放到特定区间[-3, 3]。

聚类分析 采用Pearson相关性分析进行指标间的相关性分析,构建相关系数矩阵。聚类方法选用R型因子聚类分析方法,使用Euclidean距离计算聚类距离,最后采用质心聚类法进行系统聚类并构建聚类树。样本间聚类采用ward法进行聚类分析。

共线性诊断 采用线性回归分析进行指标间共线性诊断, 诊断标准为方差膨胀因子 ≥ 10 。

主成分(PC)回归分析 采用协方差矩阵法提取主成分, 使用KMO和Bartlett球形法对所抽取的主成分进行检验。采用公式(PC系数=特征向量/ $\sqrt{\text{特征值}}$)计算主成分表达模型。此外, 采用逐步回归分析抽取“水瘪子”病主要体征指标。

多重对应分析 对以上分析筛选的指标进行多重对应分析, 计算各指标类别的因子负荷值, 以研究“水瘪子”病的症状特征。

数据检验 使用Cruskal-Walli方法进行本次研究中的差异显著性检验, 显著性差异水平为显著($P < 0.05$), 极显著($P < 0.01$)和极其显著

($P < 0.001$)。

2 结果

2.1 指标相关性分析

聚类分析结果显示, 指标之间相关性差异较大, 共聚为3大类(图3)。其中, 体质量、体宽和肝胰腺质量与时间相关性较高, 聚为一类; 活力、肝胰腺颜色、壳硬度、肝胰腺指数、血淋巴颜色和肌肉饱满度聚为一类; 而性别、鳃颜色和其他指标间相关性较低而被聚为一类, 且两个指标间亦无明显相关。聚类结果表明, 性别和鳃颜色可能与“水瘪子”病的体征变化无明显关系。

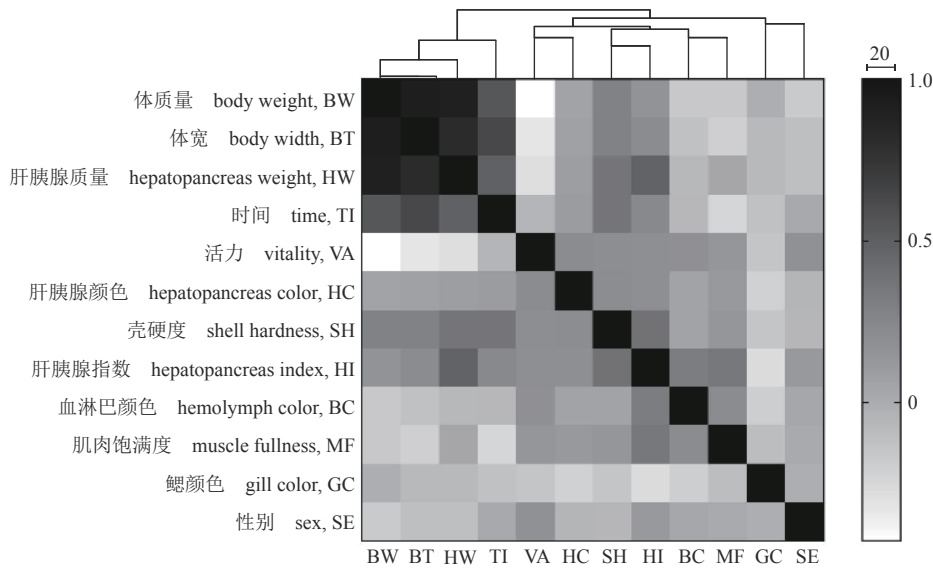


图3 中华绒螯蟹指标间的聚类分析结果

Fig. 3 Results of cluster analysis of the indexes of *E. sinensis* (n=264)

2.2 预测“水瘪子”病主要体征指标

共线性诊断显示体质量、体宽与肝胰腺质量存在多重共线性。为避免分析模型估计失真或不稳定, 运行主成分回归分析法做多重共线性处理。本次主成分分析共获得12个主成分

(PC₁~PC₁₂), 其中PC₁~PC₅的累计贡献率占到74.667%(表3)。因此, 提取相关主成分进行后续研究, 以预测主要体征指标。由协方差贡献比率(表3)以及规格化特征向量分析(表4)结果生成主成分变量表达模型。

表3 协方差矩阵的特征分析
Tab. 3 Analysis of covariance matrix(n=264)

项目 items	PC ₁	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	PC ₇	PC ₈	PC ₉	PC ₁₀	PC ₁₁	PC ₁₂
特征值 characteristic value	3.282	2.133	1.115	1.066	0.927	0.808	0.699	0.472	0.413	0.378	0.103	0.018
比率/% ratio	28.752	18.685	9.764	9.341	8.124	7.082	6.121	4.133	3.616	3.313	0.906	0.162
累计贡献率/% cumulative contribution rate	28.752	47.438	57.202	66.543	74.667	81.749	87.871	92.004	95.620	98.932	99.838	100

表 4 规格化特征向量的分析结果

Tab. 4 Analysis results of normalized feature vectors(n=264)

变量 variable	PC ₁	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅
体质量 body weight	0.921	-0.258	-0.109	0.028	-0.018
体宽 body width	0.918	-0.191	0.017	0.046	-0.085
活力 vitality	-0.293	0.578	0.415	-0.125	0.201
时间 time	0.720	-0.004	0.398	0.025	-0.061
血淋巴颜色 hemolymph color	-0.095	0.554	-0.248	0.229	-0.467
壳硬度 shell hardness	0.492	0.439	0.115	-0.121	0.391
鳃颜色 gill color	-0.163	-0.505	-0.126	0.214	0.613
肝胰腺颜色 hepatopancreas color	0.171	0.441	0.173	-0.622	0.109
肝胰腺质量 hepatopancreas weight	0.911	0.012	-0.189	0.145	0.066
肌肉饱满度 muscle fullness	-0.113	0.569	-0.548	0.147	0.331
性别 sex	-0.154	0.174	0.585	0.645	0.073
肝胰腺指数 hepatopancreas index	0.412	0.687	-0.116	0.296	0.051

$$PC_1=0.51X_1+0.51X_2-0.16X_3+0.40X_4-0.05X_5+0.27X_6-0.09X_7+0.09X_8+0.50X_9-0.06X_{10}-0.09X_{11}+0.23X_{12}$$

$$PC_2=-0.18X_1-0.13X_2+0.40X_3-0.002X_4+0.38X_5+$$

$$0.3X_6-0.35X_7+0.3X_8+0.008X_9+0.39X_{10}+0.12X_{11}+0.47X_{12}$$

$$PC_3=-0.10X_1+0.02X_2+0.39X_3+0.38X_4-0.23X_5+$$

$$0.11X_6-0.12X_7+0.16X_8-0.18X_9-0.52X_{10}+0.55X_{11}-0.11X_{12}$$

$$PC_4=0.03X_1+0.04X_2-0.12X_3+0.02X_4+0.22X_5-$$

$$0.12X_6+0.21X_7-0.60X_8+0.14X_9+0.14X_{10}+0.62X_{11}+0.29X_{12}$$

$$PC_5=-0.02X_1-0.09X_2+0.21X_3-0.06X_4-0.49X_5+$$

$$0.41X_6+0.64X_7+0.11X_8+0.07X_9+0.34X_{10}+0.08X_{11}+0.05X_{12}$$

式中, X_1 为体质量, X_2 为体宽, X_3 为活力, X_4 为时间, X_5 为血淋巴颜色, X_6 为壳硬度, X_7 为鳃颜色, X_8 为肝胰腺颜色, X_9 为肝胰腺质量, X_{10} 为肌肉饱满度, X_{11} 为性别, X_{12} 为肝胰腺指数。

根据主成分变量表达模型计算样本的主成分变量, 并进行逐步回归分析, 生成中华绒螯蟹个体回归模型: $Y_1=-0.160PC_1-0.110PC_3-0.142PC_5$, 以及影响健康状态的回归模型: $Y_2=0.067PC_2+0.082PC_4$ 。代入主成分变量表达模型进入 Y_2 中, 得到最终回归模型:

$$Y=0.017X_3+0.044X_5+0.010X_6-0.029X_8+0.037X_{10}+0.059X_{11}+0.055X_{12}$$

根据生成的回归模型, 结合聚类分析结果, 本次共预测得到6个体征指标可能与中华绒螯蟹“水瘪子”病相关, 分别为活力、壳硬度、肌肉饱满度、血淋巴颜色、肝胰腺颜色和肝胰腺

指数。此外, 上述分析分别剔除了性别、鳃颜色、体质量、体宽和肝胰腺质量这5个指标。

2.3 “水瘪子”病的症状评估

使用活力、壳硬度、肌肉饱满度、血淋巴颜色、肝胰腺颜色和肝胰腺指数6个体征指标对中华绒螯蟹样本进行多重对应分析, 以评估相关指标在“水瘪子”病诊断中的适用性。结果显示, 本次多重对应分析模型共分为两大维数, 其信息携带量分别为0.420和0.321, 可信度检验显示该模型的alpha系数为90% (表5), 分析结果可信。根据多重对应图分析, 各类别指标主要分散于维数2周围, 受维数1的影响较大。其中, 血淋巴颜色不趋向于维数1和2, 对相关指标予以剔除。根据结果分析, 中华绒螯蟹样本的不同的指标间差异较大, 主要分为5类: 第Ⅰ类中华绒螯蟹以中至高活力(3~4)、中至高壳硬度(3~4)、高肌肉饱满度(4)、黄色至橙黄色肝胰腺(3~4)以及高肝胰腺指数(9%~22%)为主; 第Ⅱ类中华绒螯蟹以低至中等活力(2~3)、较低壳硬度(2)、低至中肌肉饱满度(1~3)、淡黄色肝胰腺(2)以及较低肝胰腺指数(6%~9%)为主; 第Ⅲ类中华绒螯蟹表现为更低的壳硬度(1)、白/灰白色肝胰腺(1), 以及低肝胰腺指数(2%~6%)为主; 第Ⅳ类中华绒螯蟹主要表现为低活力(1); 第Ⅴ类中华绒螯蟹主要表现为肝胰腺颜色呈黑/褐色(5) (图4)。根据多重对应分析结果结合临床分析, Ⅱ类及Ⅲ类中华绒螯蟹症状与“水瘪子”病症

状相似。因此，使用活力、壳硬度、肌肉饱满度、肝胰腺颜色和肝胰腺指数等指标基本能用于“水瘪子”病评估，而其不同指标程度也能用于评估“水瘪子”病的不同状态。此外，本研究还发现，肝胰腺颜色加深(黑/褐色)与其他指标类别无明显相关，因此其可能与“水瘪子”病无明显相关性。

表 5 多重对应分析模型的可信度检验

Tab. 5 Credibility test of multiple correspondence analysis models

维数 dimension	克隆巴哈系数 Cronbach's alpha	解释 interpretation	
		总计(特征值) total(eigenvalue)	惯量 inertia
1	0.919	7.568	0.420
2	0.876	5.776	0.321
总计 total		13.344	0.741
均值 mean	0.900 ^a	6.672	0.371

注: a. 总克隆巴哈系数基于平均特征值

Notes: a. total Cronbach's alpha is based on average eigenvalues

使用上述5个体征指标对中华绒螯蟹样本进行样本间聚类分析，得到了与多重对应分析类

似的结果(表6)。其中，C型蟹与第 I 类健康状态相似，主要表现为高活力(>3)、高壳硬度(>3)、肝胰腺颜色呈黄色至橙黄色(3~4)、肌肉饱满度高(>3)、肝胰腺指数高(>10%)；D型蟹与第 II 类健康状态相似，其表现为活力低下(1~2)、壳硬度较低(2~3)、肝胰腺发白(2~3)、肌肉饱满度较低(2~3)、肝胰腺指数低(<8%)；E型蟹与D型蟹相比，其拥有更低的肌肉饱满度(1~2)；B型蟹与第 V 类健康状态相似，主要症状为肝胰腺颜色加深(4~5)；然而，A型蟹主要表现为肌肉饱满度低(1~2)以及肝胰腺指数较低(约7%)，与第 IV 类健康状态存在些许出入。根据多重对应分析及样本聚类分析结果，均得到对“水瘪子”类似的评估症状，轻症“水瘪子”病症：① 活力差，遇应激时无逃跑、爬动等运动现象；② 较低壳硬度，剥离头胸甲时头胸甲部分区域破碎；③ 步足肌肉可能出现积水；④ 肝胰腺呈淡黄色；⑤ 肝胰腺指数较低(6%~9%)。重症“水瘪子”病症：在轻症的基础上，① 壳硬度进一步降低，壳软，按压、剥开头胸甲等部位时易出现碎壳现象；

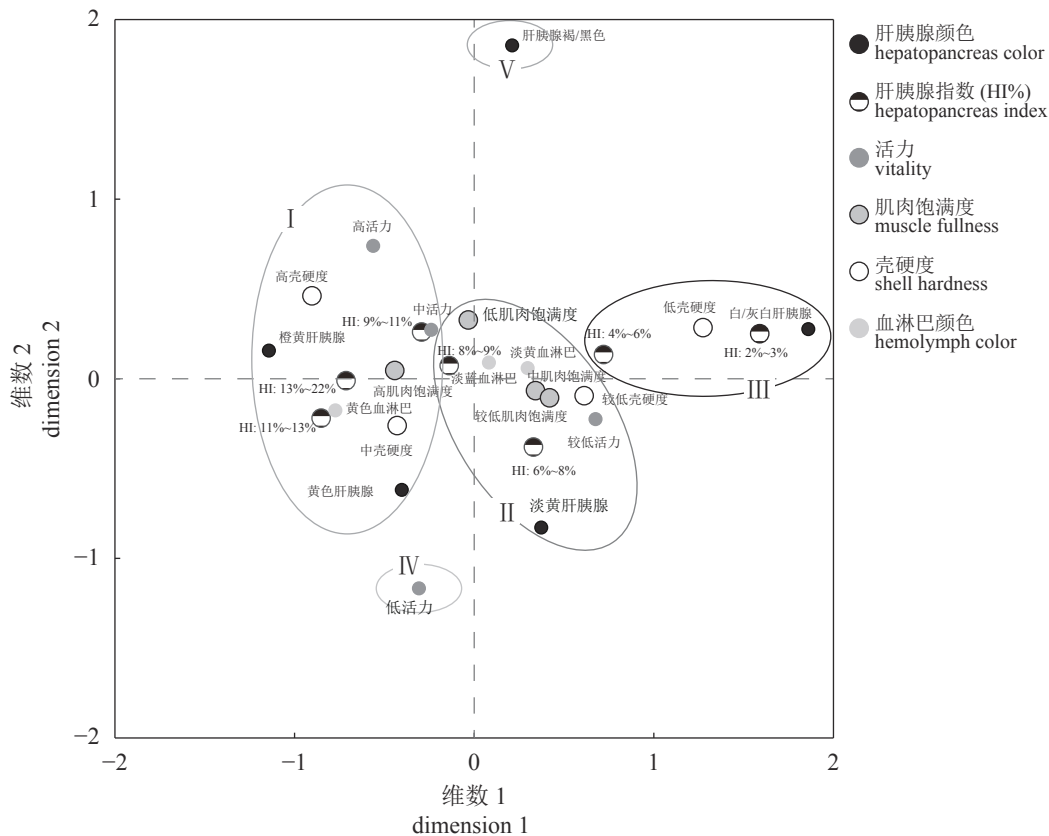


图 4 “水瘪子”病相关六指标的多重对应分析图

Fig. 4 Multiple correspondence analysis of six indicators of HPND

表 6 使用“水瘪子”病主要体征指标的样本聚类分析结果

Tab. 6 Cluster analysis of main indicators of HPND

类型 type	活力 vitality	壳硬度 shell hardness	肌肉饱满度 muscle fullness	肝胰腺颜色 hepatopancreas color	肝胰腺指数 hepatopancreas index
A型	2.39+1.32 ^b	3.89+0.31 ^a	1.39+0.49 ^c	3.29+1.31 ^a	0.07+0.03 ^b
B型	4.00+0.00 ^a	1.67+0.47 ^c	1.33+0.47 ^c	4.67+0.47 ^a	0.09+0.01 ^{ab}
C型	3.10+0.88 ^a	3.21+0.58 ^b	3.29+0.67 ^a	3.34+1.13 ^a	0.10+0.03 ^a
D型	1.28+1.22 ^c	2.31+0.69 ^c	2.62+0.54 ^b	2.08+0.66 ^b	0.08+0.03 ^b
E型	1.47+0.78 ^c	2.24+0.64 ^c	1.24+0.42 ^c	2.71+0.96 ^b	0.07+0.02 ^b

注: 数据以平均值±标准差表示, 并使用Cruskal-Walli法进行类别间的差异性显著检验; 不同小写字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)

Notes: significant differences between different categories in each variable were tested using the Cruskal-Walli method; different lowercase letters indicating significant differences ($P < 0.05$)

② 步足肌肉萎缩积水; ③ 肝胰腺呈白/灰白色;
④ 肝胰腺指数进一步下降(2%~6%)。

2.4 主要体征指标验证

根据上述研究结果, 筛选健康蟹和“水瘪子”病蟹样本, 以比较两种类型的中华绒螯蟹各指标间的差异, 验证主要体征指标的有效性。由于不同时间中华绒螯蟹处于不同生长阶段, 因此候选样本为同一蜕壳阶段样本。结果显示, 健康蟹与“水瘪子”病蟹的活力、壳硬度、肌肉饱满度以及肝胰腺颜色的差异均为极显著 ($P < 0.01$)。此外, “水瘪子”病蟹的鳃颜色深于健康蟹, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$); “水瘪子”病蟹的体质量和肝胰腺质量低于健康蟹, 其差异具有显著性 ($P < 0.05$); “水瘪子”病蟹与健康蟹之间的性别、体宽、血淋巴颜色无明显差异(图5)。

本次验证过程中, 两项指标与之前结果存在差异。首先, “水瘪子”病蟹的肝胰腺指数在统计学中并未显著低于健康蟹, 而鳃颜色却显著深于健康蟹。虽然在统计学上与上述结果有差异, 但“水瘪子”病蟹的肝胰腺指数的数值明显低于健康蟹, 造成这种现象可能是因为用于验证的“水瘪子”病蟹样本量过少($n=13$), 且主要来源于4个采样点导致。此外, 鳃颜色受水环境影响较大, 病理学观察发现, 鳃颜色深主要与鳃上藻类等其他杂物的附着有关, 可能导致鳃颜色差异显著。故本次验证结果仍坚持原假设, 即活力、壳硬度、肌肉饱满度、肝胰腺颜色和肝胰腺指数为“水瘪子”病的主要体征指标。

3 讨论

“水瘪子”病是一种影响中华绒螯蟹养殖与

经济价值的重大疾病。虽然该病的致死率较低, 但患有“水瘪子”病的中华绒螯蟹往往“无膏”、“无肉”, 成为无经济价值的“废蟹”。随着“水瘪子”病的影响不断加剧, 诊断标准的缺乏成为了“水瘪子”病研究过程中的一大阻碍^[17]。不同的研究人员或养殖户往往拥有对“水瘪子”病诊断的不同见解^[8, 16], 肝胰腺坏死病、肝炎等疑似疾病被作为“水瘪子”病进行处理, 干扰了该病病因的探索以及防控措施的制定。本研究从江苏兴化和盐城两大最主要的“水瘪子”病暴发区域收集中华绒螯蟹样本的体征指标数据, 并通过数学分析预测, 评估了“水瘪子”病5个主要体征指标, 分别为活力、壳硬度、肌肉饱满度, 以及肝胰腺颜色和指数, 旨在帮助研究人员明确“水瘪子”病的患病特征, 并为进一步规范疾病的诊断标准提供借鉴。

目前对“水瘪子”病的评判多从临床症状出发, 病蟹在胸腔及附肢间出现大量积液(疑似血淋巴)^[13], 陆宏达等^[14]通过对不同发病阶段“水瘪子”病蟹胸腔积液进行测量时, 发现随着病情加重, 腔液/蟹重比有明显上升的趋势。因此, 胸腔积液常被用于作为“水瘪子”病的评判标准。然而, 本研究在收集数据阶段发现, 蟹具有较大的鳃腔^[18], 在解剖过程中鳃腔中的水分极易影响对蟹头胸甲积液的判断, 采用上岸捕捉和地笼捕捉等不同捕捉方式, 或者捕捉蟹后的不同解剖时间均会对其产生影响。因此, 为方便预测并评估“水瘪子”病的主要体征指标, 减少无关因素的影响, 本实验并未引入对胸腔积液指标的探究。

目前, 对“水瘪子”病的大体病理研究较少, 因此大多数研究者多凭经验诊断“水瘪子”

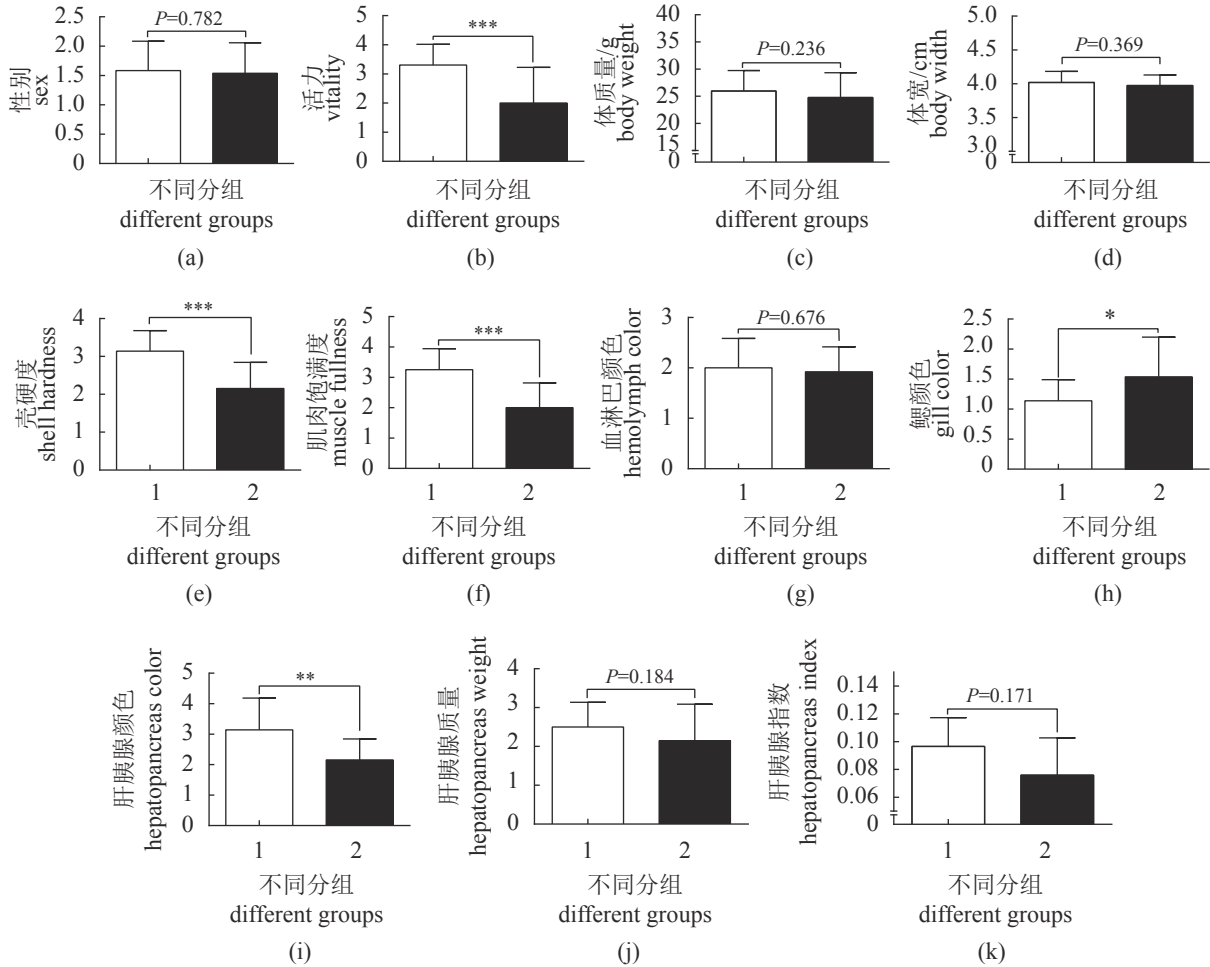


图 5 健康蟹与“水瘪子”病蟹各指标的差异比较

1. 健康蟹, 2. “水瘪子”病蟹; 使用Cruskal-Walli方法进行各变量间的差异性显著检验, *. $P<0.05$, **. $P<0.01$, ***. $P<0.001$ ($n_{\text{健康蟹}}=36$, $n_{\text{“水瘪子”病蟹}}=13$)

Fig. 5 Comparison of different indicators between healthy and HPND crabs

1. healthy crab, 2. "HPN" carb; Cruskal-Walli method was used to test the significant difference among the variables, *. $P<0.05$, **. $P<0.01$, ***. $P<0.001$ ($n_{\text{healthy crabs}}=36$, $n_{\text{HPND crab}}=13$)

病。有研究认为鳃颜色是评判“水瘪子”病的重要指标^[13, 16]。然而本研究结果发现, 鳃颜色与“水瘪子”病相关性不强, 通过对病蟹的组织病理学观察发现, 鳃颜色过深主要与鳃上藻类等其他杂物的附着有很大关系, 说明鳃颜色的变化可能与养殖水质有关, 因此鳃颜色不作为评判“水瘪子”病的主要指标。此外, 部分研究将肝胰腺颜色加深作为“水瘪子”病的可能病理症状, 然而本研究结果显示, 肝胰腺颜色加深与其他指标类别不聚为一类, 并与“水瘪子”病相关症状距离较远, 表明肝胰腺颜色加深与“水瘪子”病无明显相关性, 因此不能用于相关疾病的评估。此外, 生产中有养殖者指出“水瘪子”病蟹的体质量明显有降低的情况。然而, 本实验结果表明,

“水瘪子”病蟹的体质量虽然较健康蟹低, 但统计学结果表明二者之间并无显著差异。同时, 本研究结果还发现, “水瘪子”病蟹的体宽和肝胰腺质量也较健康蟹低, 但统计学结果表明二者之间的两个指标同样无显著差异。

“水瘪子”病作为一种以肝胰腺病变为主的多器官病变疾病, 使用更少的指标进行诊断能节省疾病诊断时间, 加速对疾病的防控并提供指导意见。根据多重对应及样本聚类分析结果, 中华绒螯蟹样本被分为5大类, 其中, II和III型蟹的5个指标均出现显著变化, 其症状符合临床“水瘪子”病的表现^[19], 表现为活力差, 遇应激时无逃跑、爬动等运动现象; 较低壳硬度, 剥离头胸甲时头胸甲部分区域破碎; 步足肌肉

萎缩, 可能出现积液; 肝胰腺呈淡黄、白、灰白色; 肝胰腺指数低(2%~9%)。因此, 将其评定为“水瘪子”病症状, 本研究根据壳硬度、肌肉饱满度、肝胰腺颜色及指数的程度不同还分为轻症“水瘪子”和重症“水瘪子”病, 说明5个指标在评估“水瘪子”病中可能具有较好的适用性。然而在该病的发病早期或极早期, 以上5个指标可能并不会同时出现, 因此, 本实验评估该病的主要体征更适用于疾病充分发展期, 而关于该病早期或极早期的疾病体征还有待进一步研究。此外, 本实验通过数学分析法所得到的结果还需要在临床实践中进一步验证。

参考文献:

- [1] 陈蓝荪, 王武, 陈再忠. 从河蟹市场分析看中华绒螯蟹养殖的发展方向[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(1): 81-85.
Chen L S, Wang W, Chen Z Z. Culture tendency of *Eriocheir sinensis* by market analysis[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(1): 81-85(in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [3] 胡守奎, 李樵年, 余为一. 蟹源致病性拟态弧菌的黏附及侵袭特性[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 541-546.
Hu S K, Li J N, Yu W Y. Adhesion and invasion of pathogenic *Vibrio mimicus* isolated from *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(5): 541-546(in Chinese).
- [4] 王金霞, 李士虎, 王笃彩, 等. 中华绒螯蟹苗种生产中副溶血性弧菌病的诊断与防治[J]. 淮海工学院学报, 2003, 12(1): 52-54.
Wang J X, Li S H, Wang D C, et al. Diagnosis, prevention and curing of *Vibrio parahaemolyticus* in the production of river crab larvae[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology, 2003, 12(1): 52-54(in Chinese).
- [5] Wang W, Wen B H, Gasparich G E, et al. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Microbiology*, 2004, 150(9): 3035-3040.
- [6] 孙梦玲, 黄桦, 刘洪岩, 等. 江苏省河蟹主养区河蟹微孢子虫感染率调查与研究[J]. 水产养殖, 2017, 38(12): 40-42.
Sun M L, Huang H, Liu H Y, et al. Investigation and study on the infection rate of microsporidia in *Eriocheir sinensis* of Jiangsu province[J]. *Journal of Aquaculture*, 2017, 38(12): 40-42(in Chinese).
- [7] Ding Z, Meng Q, Liu H, et al. First case of hepatopancreatic necrosis disease in pond-reared Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, associated with microsporidian[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(9): 1043-1051.
- [8] 杨宗英, 曾柳根, 王玉兰, 等. 中华绒螯蟹“水瘪子”病超微病理和病理生理研究[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(7): 1137-1148.
Yang Z Y, Zeng L G, Wang Y L, et al. Ultramicroscopical histopathology and pathophysiology of "Shuibiezi" disease of *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(7): 1137-1148(in Chinese).
- [9] 杨宗英, 张一柳, 刘力硕, 等. 2015-2016年河蟹“水瘪子”病发病情况[J]. 科学养鱼, 2016(10): 54-55.
Yang Z Y, Zhang Y L, Liu L S, et al. Incidence of "Shuibiezi" disease in *Eriocheir sinensis* from 2015 to 2016[J]. *Scientific Fish Farming*, 2016(10): 54-55(in Chinese).
- [10] 刘力硕, 杨宗英, 张一柳, 等. 2016年河蟹“水瘪子”疫情及病理研究进展[J]. 科学养鱼, 2017(4): 61-62.
Liu L S, Yang Z Y, Zhang Y L, et al. Research progress on the epidemic situation and pathology of "shuibiezi" disease of *Eriocheir sinensis* in 2016[J]. *Scientific Fish Farming*, 2017(4): 61-62(in Chinese).
- [11] 宋学宏, 朱茂晓, 王永玲, 等. 中华绒螯蟹肝胰腺白化症组织病理变化[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 257-263.
Song X H, Zhu M X, Wang Y L, et al. The histopathological changes in tissues of *Eriocheir sinensis* with hepatopancreas albinism[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(2): 257-263(in Chinese).
- [12] 宋学宏, 程建新, 朱茂晓, 等. 中华绒螯蟹肝胰腺白化症的病因研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 762-769.
Song X H, Cheng J X, Zhu M X, et al. Pathogenic factors of albinism in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 762-769(in Chinese).
- [13] 杨宗英, 张一柳, 胡鲲, 等. 中华绒螯蟹肝胰腺坏死综

- 合征病原及病理学研究[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(1): 17-25.
- Yang Z Y, Zhang Y L, Hu K, *et al.* Etiological and histopathological study on hepatopancreatic necrosis syndrome in *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(1): 17-25(in Chinese).
- [14] 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[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1242-1250.
- 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(in Chinese).
- [15] 周日东, 王松刚, 张凤翔. 河蟹水瘪子病的发生与应急措施[J]. *科学养鱼*, 2016(4): 92.
- Zhou R D, Wang S G, Zhang F X. Occurrence and emergency measures of "Shuibiezi" disease in *Eriocheir sinensis*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2016(4): 92(in Chinese).
- [16] 杨先乐. 从河蟹"水瘪子"谈我国水产动物病害研究的导向[J]. *科学养鱼*, 2015(10): 1.
- Yang X L. Research orientation of aquatic animal diseases in China: discussed from the "Shuibiezi" disease in *Eriocheir sinensis*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2015(10): 1(in Chinese).
- [17] 孙修云, 宫子慧. 浅析中华绒螯蟹“肝胰腺坏死”病与“水瘪子”病的异同[J]. *水产养殖*, 2017, 38(12): 43-45.
- Sun X Y, Gong Z H. A brief analysis on the similarities and differences between "hepatopancreas necrosis" and "shuibiezi" disease in *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2017, 38(12): 43-45(in Chinese).
- [18] 顾志峰, 王文, 杜开和, 等. 中华绒螯蟹鳃的组织及超微结构[J]. *湖泊科学*, 2000, 12(2): 182-184.
- Gu Z F, Wang W, Du K H, *et al.* Histological and ultrastructural studies on the gill in *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2000, 12(2): 182-184(in Chinese).
- [19] 张凤翔, 陈辉, 邱军强, 等. 2017年江苏省兴化市河蟹“水瘪子”症状流行病学调查思考及对策[J]. *中国水产*, 2017(11): 62-64.
- Zhang F X, Chen H, Qiu J Q, *et al.* Epidemiological investigation and countermeasures of "shuibiezi" disease in *Eriocheir sinensis* in Xinghua City, Jiangsu Province, 2017[J]. *China Fisheries*, 2017(11): 62-64(in Chinese).

Evaluation of the leading physical indicators of hepatopancreatic necrosis disease of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

FENG Yang¹, HUANG Xiaoli¹, WANG Kaiyu^{2*}, CHEN Hui³, WANG Jingjing³

(1. College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. Fisheries Technology Extension Center of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China)

Abstract: Hepatopancreatic necrosis disease (HPND) of *Eriocheir sinensis* is a multi-symptomatic disease, characterized by white color and atrophy of hepatopancreas. This study aims to evaluate the main symptoms of HPND, hoping for provide a reference for researchers and clinicians to further unite the diagnosis. In this study we collected 11 individual indicators of *E. sinensis* in health or suspected HPND in criteria Xinghua and Yancheng Cities, Jiangsu Province. Systematic cluster analysis, principal component regression, and multiple correspondence analysis were conducted in this study. Our study dertermined calculated five leading indicators of HPND, including vitality, shell hardness, muscle fullness, hepatopancreas color, and hepatopancreas index. Further, the symptoms were evaluated as poor vitality, lower shell hardness, atrophy and effusion of pereopoda, the pale yellow of hepatopancreas color, and the low hepatopancreas index (2%-9%). Besides, the analysis showed that the reduction of body weight, and the darkness of hepatopancreas color and gill color might not be related to the typical symptoms of HPND. The results showed five indicators, i.e. vitality, shell hardness, muscle fullness, hepatopancreas color and index, might be the leading indicators in the disease assessment of HPND.

Key words: *Eriocheir sinensis*; hepatopancreatic necrosis disease; leading physical indicators; cluster analysis; principal component regression analysis; multiple correspondence analysis

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Three-Side Innovation Projects for Aquaculture in Jiangsu Province (D2017-4)