

· 综述 ·

## 海洋贝类细胞内寄生原核生物研究进展

刘英杰<sup>1</sup>, 潘金培<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院 渔业资源与环境中心, 北京 100039; 2. 中国科学院 南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

**摘要:**在海洋贝类中寄生的细胞内寄生原核生物主要包括立克次体(Rickettsia)和衣原体(Chlamydia), 通常寄生于宿主的鳃和消化腺上皮组织细胞的细胞质内, 一般形成嗜碱性包涵体, 可对宿主细胞造成一定的损伤, 但在一般情况下不会引起宿主的系统病理变化, 也不会导致死亡。本文对该方面国内外研究的历史、进展和现状进行了系统的总结, 对海洋贝类原核生物感染的宿主范围、危害、检测方法及存在的问题进行了阐述, 对该领域今后的发展方向进行了展望。

**关键词:**海洋贝类; 立克次体; 衣原体

**中图分类号:**S944.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)02-0170-07

细胞内寄生原核生物(Intracellular Prokaryote)是一类专性或兼性寄生于活细胞内的微生物, 常见类群包括立克次氏体(Rickettsia)、衣原体(Chlamydia)及支原体(Mycoplasma)。该类群微生物广泛寄生于多种动物类群组织细胞内, 有些可导致宿主发生疾病, 如人类的伤寒、沙眼及肺炎等<sup>[1-5]</sup>。1977年, Harshbarger等人进行美国Chesapeake湾贝类病原调查时, 在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、硬壳蛤(*Mercentaria mercenaria*)和软壳蛤(*Mya arenaria*)消化腺上皮细胞内首次发现了衣原体样生物、立克次体样生物和支原体样生物<sup>[6]</sup>, 随后该类微生物在不同贝类中的寄生不断被发现报道, 并在国际贝类病害研究领域形成一个热点<sup>[7-21]</sup>。开始时研究者不能确定该类生物的确切分类地位, 只是根据形态特征推测其应属于细胞内寄生原核生物。随着研究的深入, 人们对这类原核生物的病原生物学、宿主病理学、鉴别标准、流行规律及危害程度有了相对完整的了解<sup>[22-24]</sup>。本文通过综述各种贝类细胞内寄生原核生物的研究现状及发展趋势, 旨在对虫类流行性疾病暴发的病原确认与研究提供参考。

### 1 贝类细胞内寄生原核生物种类及其基本形态结构

有关贝类感染支原体、衣原体和立克次体的报道中<sup>[6, 23-24]</sup>, 支原体的报道相对较少, 而后两者较为常见。立克次体是专性寄生于真核细胞内部的革兰氏阴性的一类原核微生物。细胞壁外常有一层疏松的黏液层。细胞膜内侧有较为致密的核糖体样颗粒分布, 中央区为拟核, 可见丝状的DNA。以二分裂繁殖。多数种类在宿主器官上皮组织细胞质中形成嗜碱性包涵体; 衣原体具有典型的原体(Elementary body, EB)和网状体(Reticulate body, RB)或始体(Initial

body)两个形态阶段, 有些种类还存在二者之间过渡类型一中间体(Intermediate body, IB)。原体小而致密, 具侵袭性。网状体大而疏松, 细胞壁与细胞膜之间有较为清楚电子透明带。原体借助于细胞摄粒作用吸附在细胞表面, 经胞饮进入细胞形成吞噬体, 原体由致密的球形变成体积较大的网状体。网状体分裂增殖一段时间后, 形成核心致密的原体, 最后包涵体体积增大导致细胞破裂, 原体释放到外界。这两类原核生物的靶细胞多为上皮组织, 有些种类寄生于血细胞中, 具有组织细胞寄生特异性, 较易与一般的细胞器和其他病原生物区分<sup>[2]</sup>。贝类的细胞内寄生原核生物的个体以及所形成的包涵体较大, 呈较强的嗜碱性, 用普通光学显微镜较易观察<sup>[12, 15, 17, 23, 25-28]</sup>。

立克次体侵入组织细胞后, 可引起感染细胞肿胀、增生、坏死, 导致微循环障碍并伴有巨噬细胞、淋巴细胞等浸润和组织坏死。其产生的毒素可诱发立克次体-免疫系统相互反应, 使宿主细胞代谢紊乱, 对血管和肝脏受到破坏, 发生广泛的凝血坏死现象; 衣原体与宿主细胞之间可行成营养生长相互竞争、相互制约的关系。有些衣原体经巨噬细胞吞噬后可分裂增殖形成包涵体, 而宿主细胞仍保持有丝分裂特性, 直到包涵体体积增大使细胞机械损伤破裂。有些衣原体则在分裂增殖过程中产生细胞毒素, 使宿主细胞发生营养障碍和破坏, 引起死亡<sup>[1-3, 23]</sup>。

### 2 原核生物感染的海洋贝类及病原种类

#### 2.1 牡蛎类立克次体感染

Harshbarger等<sup>[6]</sup>报道在美国Chesapeake湾美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)肠上皮组织杯状细胞内和消化腺小管

收稿日期: 2003-05-29; 修订日期: 2003-10-10.

基金项目: 国家“973”重点基础研究项目(G1999012001).

作者简介: 刘英杰(1963-), 男, 副研究员, 博士, 从事水生生物病害研究. E-mail: liuyj@sina.com

(diverticular)上皮细胞内发现直径10  $\mu\text{m}$ 的嗜碱性包涵体,囊腹内包涵体直径可达100  $\mu\text{m}$ 。包涵体内可见明显紧密排列的杆状个体,个体有3层外膜包围,长度可达1.19  $\mu\text{m}$ ,直径0.41  $\mu\text{m}$ ;Meyers<sup>[42]</sup>报道1975年2月至1976年10月间美国长岛养殖的幼年和成年美洲牡蛎消化系统组织细胞内的立克次体样生物感染。在成年牡蛎的肠上皮组织细胞质中有直径50  $\mu\text{m}$ 左右,内涵细颗粒的嗜碱性包涵体,感染率15/145,最高感染率在春季北部沿岸。Comps等<sup>[10-11]</sup>报道了法国南部大西洋沿岸的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)消化腺管上皮细胞内的立克次体样生物感染。Renault<sup>[29]</sup>报道了法国大西洋沿岸太平洋牡蛎鳃上皮细胞立克次体感染。在鳃上皮细胞内发现嗜碱性包涵体,直径3~5  $\mu\text{m}$ 。包涵体内有直径0.2~2.0  $\mu\text{m}$ ,长度0.4~4.0  $\mu\text{m}$ 的不规则多形原核生物。有些个体表面有纤丝状结构,以二分裂增殖。根据该原核生物形态结构特点,推测其属于立克次体,可能接近立克次体科的Wolbachia属;Azevedo等<sup>[30]</sup>1991年在西班牙北部大西洋沿岸太平洋牡蛎鳃上皮细胞表面纤毛基部发现大量细胞外寄生的立克次体样生物。该生物形态多变,长度最大可达9  $\mu\text{m}$ ,其大量寄生可造成宿主鳃上皮细胞微绒毛和纤毛消失,严重时可能造成细胞破坏解体。该原核生物可能隶属于Rickettsia属。

## 2.2 硬壳蛤和软壳蛤原核生物感染

Harshbarger等<sup>[6]</sup>和Otto<sup>[31]</sup>报道了Chesapeake湾和Chincoteague湾采集的硬壳蛤体内的衣原体样生物。Meyers<sup>[9,42]</sup>系统报道了美国纽约长岛(Long Island)Great south湾养殖硬壳蛤的调查结果,共发现4种类型不同程度嗜碱性包涵体。包涵体的数量、形状、嗜碱性程度及寄生部位随季节不同而有所差异。Fries<sup>[32-33]</sup>等报道了美国特拉华州 Rehoboth 湾和 Indian River 湾硬壳蛤鳃上皮细胞内感染的立克次体。该生物在鳃丝纤毛上皮细胞胞浆内形成嗜碱性包涵体,内有大小1.63  $\mu\text{m} \times 0.66 \mu\text{m}$ 的立克次体。包涵体常出现于相对的鳃丝细胞,相邻细胞较少见,说明该生物可能不通过血淋巴传播。包涵体内立克次体增殖可使个体挤压变形或导致宿主细胞破裂。在卵细胞中发现一种革兰氏阴性、Feulgen阳性包涵体的存在,提示该类生物可能存在垂直传播途径。

另外,美国特拉华州 Rehoboth Beach 南部的软壳蛤(*Mya arenaria*)鳃上皮细胞内也发现有立克次体感染<sup>[24]</sup>。立克次体群集在鳃纤毛上皮细胞质内形成克隆,细胞棒状,大小为(1.09  $\pm$  0.10)  $\mu\text{m} \times$  (3.56  $\pm$  0.44)  $\mu\text{m}$ ,细胞壁外有透明层包围,最外层有明显黏液层。该种类可能接近 *Rickettsia rickettsii* 和 *R. prowazekii*。

## 2.3 贻贝原核生物感染

Gulka等<sup>[18]</sup>报道,在美国 Rhode Island 的 Matunuck 潮间带的紫贻贝(*Mytilus edulis*)体内发现立克次体感染,它的寄生部位在鳃呼吸褶膜的上皮细胞内,形成嗜碱性包涵体(Basophilic inclusion),直径可达260  $\mu\text{m}$ 。包涵体中心区域为嗜碱性棒状生物,短棒状生物长3.4~4.6  $\mu\text{m}$ ,细胞壁较薄,细

胞质外层致密,中心区域电子密度较低;Cajaraville 和 Angulo<sup>[34]</sup>在西班牙 Basque 沿岸的欧洲贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)消化腺管和消化腺导管上皮细胞内发现感染的衣原体样生物(Chlamydia-like Organism)。该生物在上皮细胞内形成光镜下明显可见的嗜碱性包涵体,直径平均9  $\mu\text{m}$ 。电镜下明显可见网状始体(Reticulate initial body)和致密中间体(Condensed intermediate body)。网状体以二分裂增殖,包涵体内有许多小泡状结构。该生物对感染对宿主不形成明显的组织病理损伤。

## 2.4 砗磲(*Tridacna gigas*)和 *Hippopus hippopus* 立克次体样生物感染

Norton等<sup>[25-26]</sup>分别报道了在澳大利亚养殖的砗磲和 *Hippopus hippopus* 鳃和外套膜上皮细胞内寄生的立克次体样生物。在 *Tridacna gigas* 寄生的立克次体样生物长度为4~7  $\mu\text{m}$ ,可侵入皮下相邻组织,通常伴随颗粒细胞炎症,引起感染细胞膨大造成损伤,损伤周围伴有不同程度细胞浸润。*Hippopus hippopus* 中感染的立克次体样生物形成细胞质内包涵体,长度可达110  $\mu\text{m}$ ,内含密集排列的立克次体样生物,形态单一。两个种类一同养殖,立克次体样生物在 *Hippopus hippopus* 形成嗜碱性包涵体,不导致宿主细胞损伤,而在砗磲不形成包涵体,但对宿主细胞造成一定的损伤。推测后者可能是前者的进一步发育阶段。立克次体样生物仅见于幼年个体,低温期寄生较为严重。

## 2.6 扇贝原核生物感染

Morrison 和 Shum<sup>[36]</sup>报道了1980年11月在加拿大 Prince Edward Island 的海湾扇贝肾上皮细胞内发现的立克次体。包涵体呈嗜碱性,有膜性结构包围,内有典型的立克次体样生物;Leibovitz<sup>[22]</sup>报道了海湾扇贝消化腺上皮细胞内发现的衣原体样生物感染。在成年和幼年贝的消化上皮细胞内发现了嗜碱性包涵体,但没有与之相对应的细胞病理变化和宿主的大量死亡;幼体和稚贝的消化管上皮细胞内发现衣原体感染,感染细胞肿大,形成空泡,上皮组织破裂,细胞脱落,仅剩下裸露的基膜。感染幼体活力降低,死亡率可达80%~100%,稚贝死亡率可达40%~60%。本结果初步说明衣原体对成年扇贝的生长存活没有明显的影响,而对幼体和稚贝则可能有较大的危害。

作者<sup>[28,37]</sup>在对山东沿海海湾扇贝病原调查时,在幼体、稚贝和成贝的消化腺上皮细胞的细胞质内发现衣原体感染。该衣原体形成圆形或椭圆形的嗜碱性包涵体,具有网状体(reticular body)、原体(elementary body)和中间体(intermediate body)3种形态。人工感染证实该衣原体寄生可造成幼体死亡,对成贝则没有明显的危害。

Gulka等<sup>[15,16]</sup>报道了1979~1980年和1981~1983年秋冬季节美国罗德岛的 Narragansett 湾自然死亡的大西洋深水扇贝(*Placopecten magellanicus*)立克次体的感染情况。研究证明,感染 *P. magellanicus* 的立克次体对宿主危害性较低,只有寄生强度很严重时会导致机体生理代谢受到影响时并有



可能产生危害。感染实验证明立克次体可通过水体传播感染其他健康扇贝个体。Le Gall 等<sup>[39,40]</sup>报道了 1985 - 1989 年大扇贝 (*Pecten maximus*) 立克次体感染调查、纯化及人工感染实验结果。人工感染实验证明大扇贝立克次体不存在垂直传播途径,但存在水平传播途径。

作者<sup>[36-37]</sup>对导致栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 大规模死亡的可疑病原进行了系统的调查,在栉孔扇贝生长不同时期的个体检出立克次体 (*Rickettsia organism*) 嗜碱性包涵体。该立克次体包涵体存在于鳃、消化腺、外套膜及生殖腺包膜上皮组织细胞内,较疏松的包涵体其内部立克次体单体清晰可见,亦呈嗜碱性。栉孔扇贝立克次体感染率在水温较低时相对较高,平均在 80% 以上。在水温较高的 7 月中旬至 8 月中旬,养殖栉孔扇贝群体大规模死亡,累计死亡率可达 95% 以上,立克次体感染率反而较低,不到 10%。以上结果表明立克次体感染与栉孔扇贝大规模死亡无因果关系。人工感染结果表明,立克次体可感染栉孔扇贝幼贝和成贝,感染率 75% - 80%,但不造成宿主明显的组织病理变化和死亡,这一点与自然调查结果相吻合。

## 2.8 鲍鱼的立克次体感染

王文兴等<sup>[25]</sup>在山东长岛等地养殖和自然生长的不同阶段的皱纹盘鲍消化道、鳃、腹足和外套膜的上皮组织和结缔组织内发现有立克次体包涵体存在,包涵体在胞浆中呈弥散状,感染细胞肿大。感染该生物的个体,消化道组织细胞损伤,消化吸收功能下降,腹足无力,最后死亡。该病可导致鲍苗死亡 70% - 80%。

Gardner 等<sup>[40]</sup>报道了 1991 - 1993 年美国加利福尼亚的 San Clemente 和 San Nicolas 黑鲍 (*Haliotis cracherodii*) 患萎缩病的样品体内发现的立克次体感染。在病鲍样品的食道、胃、肠、盲肠和消化腺壶腹上皮细胞内发现游离的颗粒状嗜碱性包涵体。超微结构呈典型的立克次体特征。感染个体外套膜萎缩,消化腺和肠上皮细胞被感染后消化酶分泌功能下降或丧失,引起营养代谢失调。腹足无力,肌纤维和结缔组织呈现退行性病变,吞噬细胞浸润,肌肉功能丧失最后导致死亡。

Moore 等<sup>[41-42]</sup> (2000) 报道了 1997 - 1998 年引起红鲍 (*Haliotis rufescens*) 萎缩病的立克次体感染。18 °C 水温下进行的注射感染实验结果显示,感染组个体感染率和发病率很高,死亡率达 80%。说明立克次体可能是引起红鲍萎缩病并导致死亡的病因。Finley 等<sup>[43]</sup>对美国加利福尼亚北部红鲍立克次体的寄生情况进行了地理分布调查。Caceres Martinez<sup>[44]</sup>对墨西哥 California 半岛沿岸养殖及自然分布的红鲍、蓝鲍 (*Haliotis fulgens*) 和黄鲍 (*Haliotis corrugata*) 感染细胞内寄生原核生物的情况进行了研究。

以上为已报道的原核生物感染的主要贝类种类及病原类型。宿主涉及软体动物门瓣鳃纲和腹足纲的 5 个目 10 个科,而病原主要为衣原体样生物和立克次体样生物。表 1 为贝类原核生物感染情况。

## 3 贝类原核生物感染的检测方法

### 3.1 传统检测方法

贝类立克次体和衣原体大多形成光学显微镜下可见的嗜碱性包涵体,HE 染色包涵体呈不同程度的兰色或兰紫色,内部可见嗜碱性颗粒,较大个体还可辨别单体大致结构。该方法虽然传统,但操作相对简便,目前仍是鉴别原核生物的必不可少的步骤。电子显微镜超薄切片可准确的观察原核生物的细微结构,对病原的确认分类具有不可替代的作用<sup>[45]</sup>。以上两种方法结合是目前病原病理研究的基本手段之一。由于立克次体和衣原体具有较为特殊的细胞壁组分,具有特殊染色的特异性。常用的有 Gimenez 染色、Macchiavello 染色、Giemsa 染色、碘染色和吡啶橙染色法。染色对象可以是切片,也可能是组织细胞涂片,多用于病原的快速鉴别。Gimenez 染色后,立克次体呈暗红色,衣原体呈红色,背景绿色。Macchiavello 染色立克次体染色呈红色,背景淡紫,衣原体包涵体也染成红色。Giemsa 染色立克次体呈紫红色,衣原体始体呈淡兰色,原体呈红紫色。碘染色可使衣原体包涵体呈红褐色,在显微镜下较易观察。上述方法简便易行,便于快速鉴别立克次体和衣原体<sup>[2-3,23,46]</sup>。对于贝类有些组织如消化腺,染色干扰较大,有时较难判定结果。Meyers<sup>[9]</sup>利用衣原体牛抗血清对硬壳蛤 (*Merccenaria mercenaria*) 采用直接和间接荧光抗体方法进行了鉴定。Elston<sup>[17]</sup>研究表明,荚膜立克次体与 5 种原核生物抗原抗体反应阴性。Le Gall 等<sup>[40,47]</sup>利用大扇贝 (*Pecten maximus*) 立克次体鼠抗血清对不同地区的扇贝个体进行了病原的检测。贝类中寄生的原核生物由于尚未建立细胞培养体系,大量获取纯度较高的病原体较为困难,血清学检验手段尚处于尝试阶段。

### 3.2 现代生物学检测方法

Le Gall<sup>[39]</sup>与 Mialhe 等<sup>[48]</sup>从大扇贝的鳃中分离纯化立克次体并制备了单克隆抗体,为病原特异性诊断提供了有效的手段。Kellner - Cousin 等<sup>[49]</sup>提取了大扇贝立克次体基因组 DNA 约 1 500 bp 的片段并进行了克隆,建立了特异性过氧化物酶标记的探针,合成了 PCR 引物,通过 Southern 杂交可检测最低为 100 fg 的立克次体 DNA,为扇贝病原快速特异诊断提供了灵敏的方法。Antonio 等<sup>[50]</sup>制备了黑鲍地高辛标记的分子探针,利用原位杂交技术 (ISH) 对引起黑鲍萎缩病的立克次体早期感染进行了诊断。利用该探针同时进行的原位杂交实验表明,红鲍和墨西哥的粉红鲍 (pink abalone) 感染的立克次体与黑鲍的立克次体可能同属一个类群,与感染 Geoduck Clam 和太平洋牡蛎的立克次体关系较远。这为病原体分类地位的确定及不同种类间遗传距离分析提供了手段。Meyers<sup>[9]</sup>利用衣原体牛抗血清对硬壳蛤 (*Merccenaria mercenaria*) 采用直接和间接荧光抗体方法进行了鉴定。Elston<sup>[17]</sup>研究表明,荚膜立克次体与 5 种原核生物抗原抗体反应阴性。Le Gall 等<sup>[39,47]</sup>利用大扇贝立克次体鼠抗血清对不同地区的扇贝个体进行了病原的检测。贝类中寄生

的原核生物由于尚未建立细胞养体系,大量获取纯度较高的病原体较为困难,血清学检验手段尚处于尝试阶段。

随着该领域研究的深入,现代生物技术越来越多的应用

于贝类病原检测、病理诊断等方面,对贝类病害防治、营养免疫研究和抗病品种或 SPF 品种的选育起着重要的作用。

表1 海洋贝类原核生物感染情况  
Table 1 Prokaryotes infection in marine shellfish

| 宿主<br>Host                            | 病原<br>Pathogen | 地理区域<br>Location              | 报告者<br>Reporter            |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|
| 美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>     | R              | 美国 New York<br>美国 Gulf Coast  | Meyers<br>Couch            |
| 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>        | R              | 法国南部大西洋沿岸<br>美国 Alaska<br>西班牙 | Comps<br>Meyers<br>Azevedo |
| <i>Cerastoderma edule</i>             | R/C            | 法国 Brittany                   | Auffret                    |
| 欧洲扁牡蛎 <i>Ostrea edulis</i>            | R              | 法国大西洋沿岸                       | Comps                      |
| 樱蛤 <i>Tellina tenuis</i>              | R              | 苏格兰                           | Buchanan                   |
| 葡萄牙牡蛎 <i>Crassostrea angulata</i>     | R              | 葡萄牙                           | Comps                      |
| <i>Sacrobicularia piperata</i>        | C              | 法国大西洋沿岸                       | Comps                      |
| 截形斧蛤 <i>Donax tunculus</i>            | R              | 法国地中海沿岸                       | Comps                      |
| 硬壳蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i>      | R/C/M          | 美国 Chesapeake 湾               | Harshbarger                |
|                                       | R              | 美国 Chincoteague 湾             | Otto                       |
|                                       | R/C            | 美国长岛 Great south 湾            | Meyers                     |
|                                       | R              | 美国 Rehoboth 湾和 Indian River 湾 | Fries                      |
| 软壳蛤 <i>Mya arenaria</i>               | R              | 美国 Rehoboth Beach             | Fries                      |
| 紫贻贝 <i>Mytilus edulis</i>             | R              | 美国 Rhode Island               | Gulka                      |
| <i>Mytilus californianus</i>          | R/C            | 美国太平洋沿岸                       | Yevich                     |
| 欧洲贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i> | R              | 西班牙 Basque                    | Cajaraville 和 Angulo       |
| 菱蚌 <i>Siliqua patula</i>              | R              | 美国华盛顿州海岸                      | Elston 和 Peacock           |
| 日本缢锦蛤 <i>Tapes japonica</i>           | R              | 美国 Willapa Bay                | Elston                     |
| 缢锦蛤 <i>Tapes pullastra</i>            | R/C            | 法国布列塔尼                        | Auffret                    |
| 虾夷扇贝 <i>Pinctada yessoensis</i>       | R              | 日本 Mutsu Bay                  | Elston                     |
| 砗磲 <i>Tridacna gigas</i>              | R              | 澳大利亚                          | Norton                     |
| <i>Tridacna crocea</i>                | R              | 澳大利亚                          | Goggin                     |
| <i>Hippopus hippopus</i>              | R              | 澳大利亚                          | Norton                     |
| 文蛤 <i>Meretrix lusoria</i> Roding     | R              | 中国台湾<br>中国河北                  | Wen<br>任素莲                 |
| 海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>      | C              | 美国                            | Morrison 和 Shum            |
|                                       | R              | 加拿大 Prince Edward Island      | Morrison 和 Shum            |
|                                       | C              | 美国大西洋沿岸                       | Leibovitz                  |
|                                       | C              | 中国山东<br>中国山东、河北沿海             | 王文兴<br>刘英杰                 |
| <i>Chlamys varia</i>                  | R              | 法国                            | Le Gall                    |
| <i>Chlamys operculari</i>             | R              | 法国                            | Le Gall                    |
| 大扇贝 <i>Pecten maximus</i>             | R              | 法国和欧洲北部海岸                     | Le Gall                    |
| 栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>           | R              | 中国山东                          | 刘英杰                        |
| 黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>        | R              | 美国 San Clemente 和 San Nicolas | Gardner                    |
| 红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>          | R              | 美国 Channel Islands            | James                      |
| 皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus</i>           | R              | 中国山东                          | 王文兴                        |

R: 立克次体; C: 衣原体; M: 支原体

#### 4 贝类细胞内寄生原核生物的危害性、问题及展望

有关寄生原核生物对贝类的危害的研究,不同研究者<sup>[13-19, 21-23, 25-26, 36-37, 41, 43, 51-52]</sup>结论差异较大。寄生原核生物虽包括支原体、立克次体和衣原体,但从目前已报道的贝类原核生物感染情况看,主要为后两者,支原体仅见于 Harshbarger<sup>[6]</sup>的报道,后来虽有一些报告,但尚欠充足证据。

无法确认结果。对该类生物危害性的研究结论之所以有较大差异,一方面是由于多数的研究仅限于病原的形态描述及一般性的报道,多数双壳类宿主对原核生物感染的病理反应仅表现为感染细胞膨大、细胞变形,不形成大面积的组织炎症及坏死现象,没有系统的病原病理对应关系。另一方面,有些贝类大量死亡又常伴有一定程度的原核生物感染,幼年个体感染后死亡情况相对严重。目前普遍观点认为,双壳贝



类原核生物寄生是一种普遍现象,对成年个体健康尽管有一定影响,但由于感染强度较低,成体抵抗力较强,一般不造成明显损害<sup>[23]</sup>,对幼体可能有较大的危害<sup>[22]</sup>。已报道的伴有原核生物感染的双壳类贝类大规模死亡,一般都有低水温或养殖密度过高等不良因素相伴<sup>[17,38]</sup>。人工感染试验<sup>[19,36,39]</sup>证实,通过与阳性个体共同饲养、病原浸浴或注射等方式,可以使健康个体感染原核生物,但并不伴随死亡的发生。自然感染个体死亡可能另有原因<sup>[19]</sup>,与原核生物感染并无直接关系。细胞内寄生原核生物对鲍鱼则在一定条件下可能有相对严重的影响<sup>[24,41~44]</sup>。水温与贝类原核生物感染有显著的相关关系,大多数双壳类感染高峰发生于低水温时期,而红鲍由水温 14℃ 升至 18℃ 培育一段时间后可持续立克次体感染率升高<sup>[42]</sup>。

目前这方面的研究主要存在以下问题:1)缺乏长期系统的流行病学调查研究资料,无法确立原核生物感染与宿主病理变化和死亡之间的确切关系以及与环境因子的相互作用关系,人工感染实验与自然条件差别较大,导致研究结果有较大差异。2)原核生物感染对贝类宿主病理生理指标变化(如血清各种酶的变化、血淋巴离子浓度变化等)方面的研究较少,仅从轻度的病原病理形态变化关系无法解释宿主死亡现象的发生,而有些研究甚至判定标准模糊,导致结果的客观性,可信度降低,甚至得出错误结论。值得注意的是,在贝类上皮细胞中普遍存在着嗜酸性颗粒,这是正常的细胞结构,与立克次体与衣原体感染形成的病理性嗜碱性包涵体有着本质的区别。另外,由于立克次体具有革兰氏阴性菌的一般结构特点,若没有包涵体结构作为参照,仅凭零散的单体,在形态和超微结构上很难与感染的一般细菌相区别。3)有些报道<sup>[31~32]</sup>由于研究条件的限制,对贝类宿主死亡原因没有进行全面系统的探讨,对可能致病的生物因子及环境因素没有进行详细的排查和系统的研究。有些死亡现象表面显示与原核生物感染有关,但实际可能另有原因,如大西洋深水扇贝的死亡可能与水温或敌害动物有关<sup>[19]</sup>,栉孔扇贝的死亡则主要由病毒感染引起<sup>[33~36]</sup>。

水生动物感染细胞内寄生原核生物具有普遍性,目前已在鱼类、甲壳类的多个种类体内发现了这类生物,其寄生可导致宿主发生系统组织病理变化甚至引起死亡<sup>[37~40]</sup>。在海洋贝类中尽管其感染的危害程度尚无确切结论,但由于贝类对于水产养殖的重要性以及目前我国贝类养殖面临问题的紧迫性<sup>[46~48]</sup>,今后有必要在病原生物学、宿主范围、宿主感染的组织病理变化等方面进行更加深入的研究,以期对该类生物的流行病学规律有一较为全面的了解,以减小和避免其可能造成的危害。

#### 参考文献:

- [1] 周德庆. 微生物学教程[M]. 第1版. 北京:高等教育出版社,1991.
- [2] 魏曦等. 医用立克次体学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984.
- [3] 徐在海. 实用传染病病理学[M]. 北京:军事医学科学出版社,2000.
- [4] 谢念铭. 医学细菌电镜图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1994.
- [5] Weiss E. Growth and physiology of Rickettsiae[J]. Bacteriological Review, 1973(9): 259-283.
- [6] Harshbarger J C, Chang S C, Otto S V. Chlamydiae (with phage), mycoplasma and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves[J]. Science, 1977, 196: 666-668.
- [7] Buchanan J S. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa) [J]. J Fish Dis, 1978, 1: 27-43.
- [8] Comps M, Raimbault R. Infection rickettsienne de la glande digestive de *Donax trunculus* Linné [J]. Science et Pêche Bull Inst Pêche Marit, 1978, 281.
- [9] Meyers T R. Preliminary studies on a chlamydial agent in the digestive diverticular epithelium of hard clams *Mercenaria mercenaria* (L.) from Great South Bay, New York [J]. J Fish Dis, 1979, 2: 179-188.
- [10] Comps M, Deltreil J P. Un microorganisme de type rickettsien chez l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk [J]. Compte Rendue Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences de Paris, 1979, 289: 169-171.
- [11] Comps M, Tigé G, Duthoit J L, et al. Micro-organismes de type rickettsien chez les huîtres *Crassostrea gigas* Th. et *Ostrea edulis* L [J]. Haliotis, 1979, 8: 317-321.
- [12] Meyers T R. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) [J]. Aquaculture, 1981, 22: 305-330.
- [13] Morrison C, Shum G. Chlamydia-like organisms in the digestive gland of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk) [J]. Fish Dis, 1982, 5: 173-184.
- [14] Comps M. Etude morphologique d'une infection rickettsienne de la palourde *Ruditapes philippinarum* Adam et Reeves [J]. Rev Trav Inst Pêches Marit, 1983, 46: 141-145.
- [15] Gulka G, Chang P W. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. J Fish Dis, 1983, 6: 355-364.
- [16] Morrison C, Shum G. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. J Fish Dis, 1983, 6: 537-541.
- [17] Elston R, Peacock M G. A Rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, *Siliqua patula* [J]. J Invertebr Pathol, 1984, 44: 84-86.
- [18] Gulka G, Chang P W. Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* L [J]. J Fish Dis, 1984, 8: 319-323.
- [19] Gulka G, Pei W C. Pathogenicity and infectivity of a rickettsia -

- like organism in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. J Fish Dis, 1984, 8: 309-318.
- [20] Elston R. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in two bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yessoensis*, with comments on their significance [J]. J of Fish Dis, 1986, 9: 69-71.
- [21] Le Gall G, Chagot D, Mialhe E, et al. Branchial rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop, *Pecten maximus* [J]. Dis Aquat Org, 1988, 4: 229-232.
- [22] Leibovitz. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. J Fish Dis, 1989, 12: 126-136.
- [23] Fryer J L, Lannan C N. Rickettsial and Chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves and crustacean [J]. Zoological Studies 1994, 33: 95-107.
- [24] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究 [M]. 济南: 山东科技出版社, 1999, 114-130.
- [25] 王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究 [J]. 海洋科学, 1998, 3: 23-25.
- [26] 刘英杰, 王崇明, 朱绍壮, 等. 栉孔扇贝类立克次体自然感染调查及人工感染试验 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 346-352.
- [27] Liu Y J et al. Rickettsia-like organism (RLO) infection in the scallop *Chlamys farreri* (Jones & Preston) from the coast of Shandong peninsula in China [J]. J Fisheries Science of China, 2003, 10(7): 61-71.
- [28] 刘英杰, 宋微波, 王崇明, 等. 海湾扇贝类衣原体寄生及人工感染试验 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 137-142.
- [29] Renault T, Cochenne N. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 160-162.
- [30] Azevedo C, Villaba A. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia) [J]. J Invertebr Pathol, 1991, 58: 75-81.
- [31] Otto S V, Harshbarger J C, Chung S C. Status of selected unicellular eucaryotes pathogens and prevalence and histopathology of inclusions containing obligate procaryote parasites in commercial bivalve molluscs from Maryland Estuaries [J]. Haliotis, 1979, 8: 285-293.
- [32] Fries C R, Grant D M. Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* [J]. J Invertebr Pathol, 1991, 57: 166-171.
- [33] Fries C R, Grant D M. Ehrlichia-like microorganisms in hemocytes in the gills of the marine bivalve, *Mercenaria mercenaria* [J]. J Invertebr Pathol, 1992, 59: 210-211.
- [34] Cajaraville M P, Angulo E. Chlamydia-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast [J]. J Invertebr Pathol, 1991, 58: 381-386.
- [35] Norton J H, Shepherd M A, Prior H C. Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas* [J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 204-206.
- [36] Norton J H, Shepherd M A, Abdou - Naguit M R, et al. Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms [J]. J Invertebr Pathol 1993b, 62: 207-209.
- [37] 刘英杰, 吴信忠, 王崇明, 等. 海湾扇贝衣原体生物超微结构观察 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 492-495.
- [38] Le Gall G, Mialhe E, Chagot H, et al. Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus* [J]. Dis Aquat Org, 1991, 10: 139-145.
- [39] Le Gall G, Chagot D, Mialhe E. Purification of Rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization [J]. Dis Aquat Org, 1992, 12: 215-220.
- [40] Gardner G R. Association of procaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii* [J]. J Invertebr Pathol, 1991, 66: 111-120.
- [41] Moore J D, Robbins T T, Friedman C S. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like procaryote [J]. J Aqu Anim Health, 2000, 12: 26-34.
- [42] Moore J D, Robbins T T, Friedman C S. The role of a rickettsia-like procaryote in withering syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens* [A]. The 4th International Abalone Symposium [C]. Cape Town: University of Cape Town. 2000. 38.
- [43] Finley C A, Friedman C S. Examination of the geographic distribution of a Rickettsia-like procaryotes in red abalone, *Haliotis rufescens*, in Northern California [A]. The 4th International Abalone Symposium, Cape Town: University of Cape Town. 2000. 70.
- [44] Caceres Martinez. Rickettsia-like procaryotes in cultured and natural populations of the red abalone *Haliotis rufescens*, blue abalone *Haliotis fulgens* and the yellow abalone *Haliotis corrugata* from Baja California, Mexico [A]. The 4th International Abalone Symposium [C]. Cape Town: University of Cape Town. 2000. 9-10.
- [45] Wen C M, Kou G H, Chen S N. Rickettsiaceae-like micromicroorganisms in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* Roding [J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 138-142.
- [46] 王伯云. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [47] Le Gall G, Bachere E, Mialhe E. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms [J]. Dis Aquat Org, 1991, 11: 181-186.
- [48] Mialhe E. Monoclonal antibodies: a tool for molluscan pathology [J]. Amer Fish Soc Spec Publ, 1988, 18: 310-315.
- [49] Kellner - Cousin K. genomic DNA cloning of rickettsia-like organisms (RLO) of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*: evaluation of procaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labeled probe and by polymerase chain reaction [J]. Dis Aquat Org, 1991, 15: 145-152.



- [50] Antonio D B, Andree K B, Moore J D, et al. Detection of Rickettsia-like Prokaryotes by in situ hybridization in black abalone, *Haliotis cracherodii*, with withering syndrome [J]. J Invertebr Pathol, 2000, 75: 180-182.
- [51] Wu X Z, Pan J P. Studies on Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster I. Fine structure and morphogenesis of *Pinetada maxima* pathogen Rickettsia-like organism [J]. J Invertebr Pathol, 1999, 73: 162-172.
- [52] Wu X Z, Pan J P. An intracellular prokaryotic microorganism associated with the lesion of the oyster *Crassostrea ariakensis* Gould [J]. J Fish Dis, 2000, 23(6): 409-414.
- [53] 王崇明, 王秀华, 宋小玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察 [J]. 水产学报, 2002, 26(2): 180-184.
- [54] 王秀华, 王崇明, 李 筠, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡流行病学调查 [J]. 水产学报, 2002, 26(2): 149-156.
- [55] 刘英杰, 吴信忠, 宋洛壮, 等. 栉孔扇贝球形病毒的超微结构及细胞病理学观察 [J]. 热带海洋学报, 2002, 21(40): 76-79.
- [56] 贺桂珍, 李 筠, 宋微波, 等. 栉孔扇贝病原感染与病害发生关系探讨 [J]. 水产学报, 2003, 27(3): 273-277.
- [57] Bonami J R Pappalardo. Rickettsial infection in marine crustacea [J]. Experimentia, 1980, 36: 180-181.
- [58] Johnson P T. A rickettsia of the blue king crab, *Paralithodes platypus* [J]. J Invertebr Pathol, 1984, 44: 112-113.
- [59] Kniel R M, Hawkins W E, Overstreet R M. Rickettsia and mollusc infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. J Invertebr Pathol, 1991, 59: 362-370.
- [60] Cvitanich J D, Garaten O, Smith C E. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality on Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate [J]. J Fish Dis, 1991, 14: 121-145.
- [61] Frelter P F, Loy J K, Kruppenbach B. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* [J]. J Invertebr Pathology, 1993, 61: 44-48.
- [62] Almendras F E, Fuentetaja I C, Jones S R M, et al. Experimental infection and horizontal transmission of *Placirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. J Fish Dis, 1997, 20: 409-418.
- [63] 杨季芳. 中国对虾枝原体形态结构及主要超微病理变化 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(2): 134-137.
- [64] 姜 明, 真桐 (*Pagrosomus major*) 肠上皮组织中类立克次体的超微形态与细胞病理学的初步研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 129-134.
- [65] Tan C K, Qwens L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Dis Aquat Org, 2000, 41: 115-122.
- [66] 齐钟彦, 马绣同. 黄渤海软体动物 [M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [67] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学 [M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993.
- [68] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展 [J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449-454.
- [69] 王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770-774.
- [70] 张朝霞, 王 军, 苏永全, 等. 九孔鲍爆发性流行病的病原及病理 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2001, 40(4): 949-956.

## Intracellular prokaryote in marine shellfish - A review

LIU Ying-jie<sup>1</sup>, PAN Jin-pei<sup>2</sup>

(1. Fishery Resource and Environment Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China; 2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** The intracellular prokaryotes infecting marine shellfish mainly include Rickettsia and Chlamydia, which usually live in the cytoplasm of epithelial cell of gill and digestive gland and form basophilic intracytoplasmic inclusions. The hosts included oyster, clam, mussel, scallop and abalone. In general opinion, intracellular prokaryotes living in marine shellfish is a normal phenomenon and is harmful to the host. But in fact, only under certain conditions, the infection can bring about some damages to target cells and may lead to systematic pathogenic changes and death of host. The present paper made a review on research history, proceedings and previewed of the further study in the area so to provide some evidences and ideas for the researchers who are engaged in disease control and prevention research on shellfish.

**Key words:** marine shellfish; Rickettsia; Chlamydia

\* This study is supported by the National Basic Research 973 Project (No. G1999012001).