

文章编号: 1000-0615(2018)11-1817-12

DOI: 10.11964/jfc.20171211082

## 异育银鲫武汉单极虫病发生、发展、消退和消失的 病理变化与PCR分析

陆宏达\*, 任芳芳, 贾相相, 张小俊, 田全全

(上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海海洋大学国家水生动物病原库,  
上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 为探究武汉单极虫病疾病过程和病理变化等特点, 根据患病异育银鲫体表孢囊内有无成熟孢子和成熟孢子的崩溶解程度, 将该病划分为发生、发展、消退和消失4个疾病时期, 并分别进行病理变化观察和巢式PCR分析。结果发现, 发生期的病鱼体表刚形成的孢囊使鳞片 and 皮肤微微隆起, 孢囊乳白色, 孢囊内分布着正在繁育逐渐增多的营养体, 尚未出现成熟孢子; 发展期的病鱼孢囊内已出现成熟孢子, 孢囊逐渐增多增大, 其表面黑色素细胞增加而呈灰黑色, 感染强度高的病鱼出现死亡或畸形; 消退期的成熟孢子通过破裂孢囊流入水体或不同步地崩溶解而减少直至全部溶解, 孢囊随之逐渐缩小, 使得黑色素细胞更为密集, 此时期病鱼病情减轻不再出现死亡现象; 消失期的病鱼孢囊平坦, 内已无成熟孢子, 只残留逐渐减少的成熟孢子崩溶解物质, 黑色素细胞逐渐减少, 最后原孢囊部位被结缔组织取代。巢式PCR分析结果表明, 巢式第一轮和第二轮PCR在4个疾病时期都分别能扩增出1 584和853 bp的武汉单极虫目的条带, 但在消失期的后期只有巢式第二轮PCR扩增出853 bp目的条带, 说明残留的核酸物质含量逐渐减少, 10月下旬后原孢囊部位巢式PCR扩增已无条带出现。本研究不仅揭示了武汉单极虫寄生部位在4个疾病时期的病理变化特点, 而且明确了疾病消退和消失的2种方式, 孢囊内成熟孢子通过破裂孢囊进入水体的方式和首次发现的孢囊内成熟孢子通过崩溶解的方式。

**关键词:** 异育银鲫; 武汉单极虫; 病理变化; 组织病理; PCR

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是我国主要的淡水养殖鱼类之一, 主要分布在华东和华中中等养殖地区, 异育银鲫鱼苗需求量大, 已成为许多鱼苗繁育场的主产鱼苗。目前在异育银鲫养成阶段出现危害大、流行广、死亡率高和造成重大经济损失的疾病主要是鲤疱疹病毒-2型(Cyprinid herpesvirus 2)引起的病毒性疾病<sup>[1]</sup>、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)引起的细菌性疾病<sup>[2]</sup>和咽碘泡虫(*Myxobolus pharynae*)引起的粘孢子虫类寄生虫性疾病<sup>[3-4]</sup>。在异育银鲫鱼苗培育阶段最常见的疾病是武汉单极虫(*Thelohanellus*

*wuhanensis*)病, 该病具有流行广、感染率高和造成一定的累积死亡率等特点, 患病鱼苗体表出现许多孢囊, 使病鱼消瘦、畸形、游动困难, 培育池一旦出现该病, 一般每年都会发生, 给异育银鲫鱼苗繁育场带来较大的经济损失。武汉单极虫于1993年由肖从学等<sup>[5]</sup>发现并命名, 后相关研究很少, 主要报道是根据成熟孢子的特征进行武汉单极虫形态学的描述<sup>[6]</sup>和巢式PCR检测武汉单极虫方法的建立<sup>[7]</sup>, 对该疾病整个过程的系统性研究未见报道。本研究首次将武汉单极虫病疾病过程划分为发生、发展、消退及消

收稿日期: 2017-12-11 修回日期: 2018-04-23

资助项目: 水产动物遗传育种上海市协同创新中心(ZF1206)

通信作者: 陆宏达, E-mail: hdlu@shou.edu.cn

失4个时期,从疾病症状、寄生部位组织病理和巢式PCR的病原核酸检测分析等3个方面探讨疾病整个过程的变化规律和特点,尤其在疾病消失期的后期孢囊内组织病理观察不到孢子残留物的情况下,通过巢式PCR分析残留的核酸物质,对进一步探究该类寄生虫是否还存在另一生活史途径有着重要意义,同时丰富了武汉单极虫病的相关理论知识,为该病的预防与控制提供了一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

2016年5月中旬,从江苏省常州市某水产鱼苗繁育场往年发生该病的鱼苗池运回数千尾异育银鲫鱼苗,鱼苗全长为2.15~2.52 cm,体质量为0.12~0.18 g ( $n=100$ ),分养在上海海洋大学室内实验室水体为700 L的水族箱中,养殖期间连续充气,每天上午9:00和下午5:00投喂饵料,每天吸污,每3天更换约1/2的水体,养殖期间通过空调使水温保持在25~28 °C。健康鱼苗购自经肉眼和显微镜检查确定无病的鱼苗场。

### 1.2 症状和孢囊的病理变化

每天从水族箱中取出8~10尾鱼苗,用麻醉剂间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐(MS-222)麻醉,分别进行肉眼和用ZEN 2012显微图像分析软件在Carl Zeiss Stemi 2000体视显微镜下观察,拍照记录病鱼症状和孢囊等病理变化,根据疾病的分期,得出不同疾病时期病理变化的特点。

### 1.3 虫体寄生部位组织病理变化

从鱼苗体表武汉单极虫寄生部位出现可见的孢囊起,每隔4天切取带有周边组织的体表孢囊(简称孢囊组织)10~12块,除立即用作组织病理和巢式PCR分析检测材料外,余下的孢囊组织保存在100%乙醇中作为巢式PCR分析的备用材料。切取的孢囊组织,立即在波恩氏(Bouin's)液中固定,24 h后70%乙醇冲洗和保存备用,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片厚度4~5  $\mu\text{m}$ ,苏木精和伊红(H.E)染色,中性树脂封片,用NIS-Elements F 4.0软件在Nikon Eclipse 55i显微镜(日本)下观察拍照。

## 1.4 疾病分期

根据武汉单极虫寄生部位组织病理观察结果,孢囊内有无成熟孢子和成熟孢子崩溶解的程度,首次将该病划分为4个疾病时期。发生期,一般在5月中旬至6月上旬,孢囊内只有营养体等未成熟孢子;发展期,一般在6月上旬至8月上旬,孢囊内开始出现成熟孢子起至营养体等未成熟孢子全部发育为成熟孢子的时期;消退期,一般在8月上旬至9月上旬,孢囊内成熟孢子减少或成熟孢子全部崩溶解前的时期;消失期,一般在9月上旬以后,孢囊内无成熟孢子形态,只残留崩溶解后的物质。由于不同或同一条病鱼上的不同孢囊内武汉单极虫发育等变化不完全同步,即时间上略有差异,因此4个疾病时期在时间上会有部分重叠。

## 1.5 巢式PCR分析

**DNA提取** 不同疾病时期孢囊组织中武汉单极虫DNA的提取方法按Zhang等<sup>[8]</sup>的方法略作改进,用眼科剪将孢囊组织剪碎,加入500  $\mu\text{L}$  DNA提取裂解液(10 mmol/L Tris-Cl pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 1%SDS, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 蛋白酶K), 55 °C 120 r/min往复震荡温浴7 h,然后加入500  $\mu\text{L}$ 的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),上下翻转3 min, 12 000 r/min高速冷冻离心机(Eppendorf 5424R, 德国)离心2 min,取上清液,反复抽提3次后,再加入等量氯仿抽提1次;加40  $\mu\text{L}$ 预冷醋酸钠(3 mol/L, pH7.0)和800  $\mu\text{L}$ 预冷无水乙醇,混匀, 12 000 r/min离心10 min,取沉淀,加70%预冷无水乙醇400  $\mu\text{L}$ , 12 000 r/min离心2 min,留沉淀室温晾干,加29  $\mu\text{L}$ 灭菌双蒸蒸馏水和0.4  $\mu\text{L}$  RNase,所得为不同疾病时期武汉单极虫的DNA提取液。健康异育银鲫体表组织的DNA提取方法与上述方法相同,作为阴性对照。原保存于100%乙醇中含有成熟孢子的孢囊组织,剪碎后加适量灭菌双蒸蒸馏水浸洗3 h, 4 000 r/min离心,去液,重复浸洗3次去除样品中的乙醇成分,作为阳性对照。

为了确保消失期孢囊内无完整成熟孢子,进行巢式PCR分析,采取以下取材方法,消失期前期的孢囊组织,在体视显微镜下进行显微操作将其切分为二,一份作为组织病理材料,避免切面处孢囊内物质在组织病理切片制备过程中流失,用加温溶解冷却的2%琼脂胶液包裹,通过连续组织切片观察确定无成熟孢子

后, 其另一份孢囊组织用作巢式PCR分析检测材料。一般在10月下旬后病鱼康复, 原孢囊部位和周边正常组织较难分辨, 在尚有极少量肉眼可见黑色素细胞时进行了方位测定和拍照定位, 相同方法将其切分为二进行实验。

**巢式PCR扩增** 巢式第一轮PCR扩增采用Andree等<sup>[9]</sup>报道的MX5: 5'-CTGCGGACGGCT-CAGTAAATCAGT-3'和MX3: 5'-CCAGGA-CATCTTAGGGCATCACAGA-3'一对引物, 巢式第二轮PCR扩增采用柴下等<sup>[7]</sup>设计的ART13F: 5'-ACCCACTTCTGTGGCCTTTC-3'和ART13R: 5'-AATCCGACCTACAACGCTGG-3'一对引物, 巢式第一轮和第二轮PCR扩增反应体系和条件以及电泳等均按照柴下等<sup>[7]</sup>的方法进行。

**PCR产物的鉴定** 巢式PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳和分离, 分别用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化回收, 分别与载体(pMD 19 - T)连接, 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞转化、克隆, 送上海生工生物工程有限公司测序, 获得扩增片段的序列, 分别在GenBank上进行BLAST比对。

## 2 结果

### 2.1 症状和孢囊病理变化

武汉单极虫特异性地寄生于异育银鲫鱼苗有鳞片覆盖的体表表皮组织内, 发病严重的培育池中异育银鲫鱼苗的感染率可达90%以上。疾病的发生期, 孢囊刚出现时很小而肉眼不易发现, 大多数出现在鳞片下组织中, 使鳞片和皮肤微微隆起, 体视显微镜下观察孢囊表面无或有极少量的黑色素细胞分布, 呈乳白色, 椭圆形或饼形(图版 I -1a、b); 发展期, 增大的孢囊肉眼容易可见, 可见的孢囊数量也逐渐增多, 最多每尾鱼苗体表感染强度可高达40个左右, 覆盖在孢囊上的鳞片出现不同程度的竖立或弯曲, 可使鱼体出现变形、消瘦和游动困难, 部分孢囊可重叠生长在表皮的某一位置, 孢囊处表面出现较多的黑色素细胞, 随着病情的进一步发展, 黑色素细胞增多, 孢囊逐渐增大隆起, 最大直径可达4 mm左右(图版 I -2a、b、c), 严重的病鱼苗会出现畸形现象(图版 I -3a、b), 鱼苗池病鱼死亡主要发生在本期的后期, 累积死亡率一般在5%~30%左右, 最高累积死亡率可达60%

以上, 感染强度低的鱼苗还可以生长; 消退期, 孢囊逐渐缩小, 能进入本时期的病鱼一般不再出现死亡现象, 鱼苗活力、摄食和生长逐渐恢复, 逐渐缩小的孢囊使其上的黑色素细胞间距也逐渐缩短而更紧密, 缩小的孢囊相对更黑(图版 I -4a、b); 消失期, 前期的病鱼孢囊隆起已不明显, 逐渐平坦, 孢囊的缩小使黑色素细胞更为紧密, 肉眼观为深黑色(图版 I -5a、b), 后期黑色素细胞逐渐减少而呈淡黑色(图版 I -6a、b), 逐渐接近鱼体表正常颜色, 但肉眼观还可辨认出原孢囊部位的病灶, 病鱼在此时摄食、游动、生长正常, 10月下旬后一般原孢囊病灶消失, 病鱼处于康复状态。

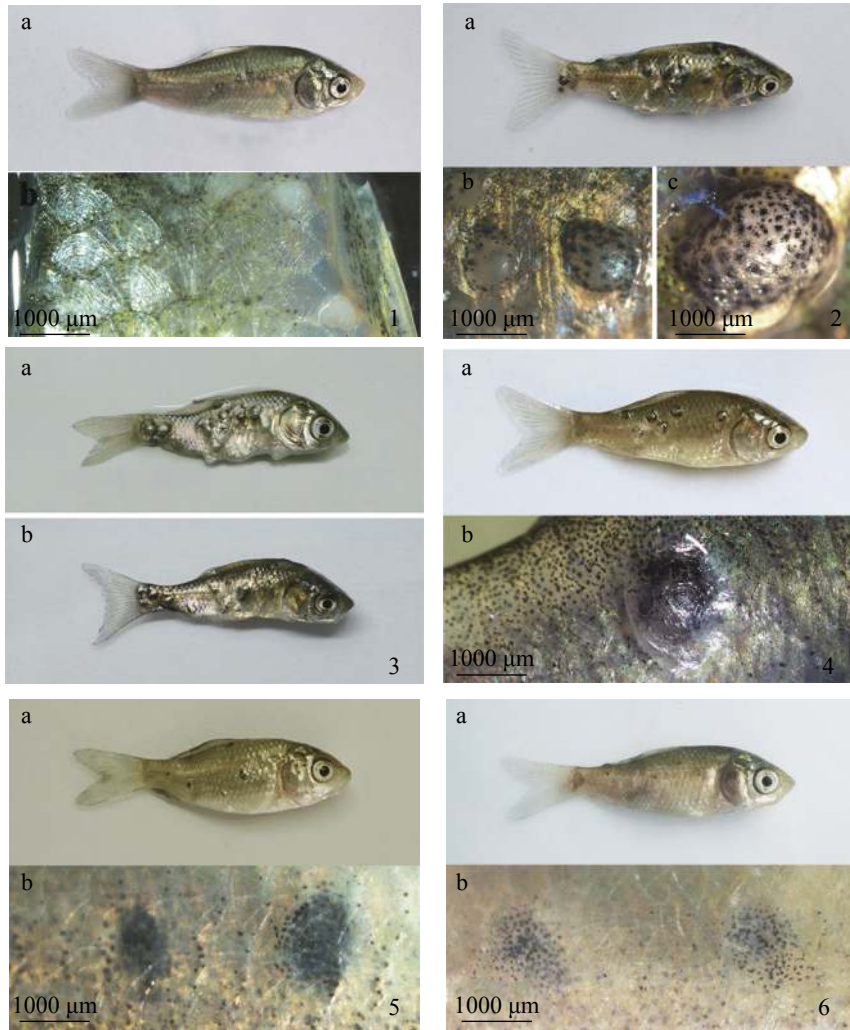
### 2.2 武汉单极虫寄生部位组织病理变化

异育银鲫皮肤由数层上皮细胞的外层表皮和内层的真皮构成, 真皮层由疏松结缔组织和靠近肌肉层的致密结缔组织组成, 鳞片呈覆瓦状排列在疏松结缔组织中。武汉单极虫寄生后形成的孢囊绝大多数分布在鳞片下的疏松结缔组织中, 但不会寄生于没有鳞片覆盖的各种鳍条、鳃盖、口腔等皮肤部位和鳃组织中。

**发生期** 武汉单极虫还处于繁育阶段的未成熟孢子状态, 寄生部位受到许多成纤维细胞的包围, 逐渐形成孢囊膜, 孢囊膜呈嗜伊红性, 包围着靠近孢囊膜具有分裂增殖能力的营养体(trophozoites)和其他不同发育阶段的未成熟孢子, 孢囊切面形状一般为椭圆形, 孢囊使鳞片轻微隆起, 随着营养体进一步的分裂增殖, 其数量增多和发育过程中体积增大, 孢囊也随之逐渐增大, 孢囊膜逐渐增厚, 较早分裂出的个体越靠近孢囊中心区, 孢囊外围组织中无或只有少量的黑色素细胞(图版 II -1)。

**发展期** 发展期跨越时间比较长, 其前期, 靠近孢囊中心区已有成熟孢子出现, 而靠近孢囊膜处的营养体继续分裂增殖, 随着分裂出的营养体逐渐发育, 从孢囊膜至孢囊中心依次分布着营养体、生殖细胞(generative cells)、泛孢子母细胞(pansporoblasts)和双产孢体(double sporonts)的未成熟孢子以及成熟孢子, 未成熟孢子的进一步发育, 成熟孢子在孢囊中心越来越多(图版 II -2, 3), 孢囊越来越大, 孢囊外的鳞片隆起更为凸出, 甚至竖起, 分布在孢囊膜外围的黑色素细胞明显增多; 发展期的后期, 营养





图版 I 不同疾病时期病鱼症状和孢囊变化

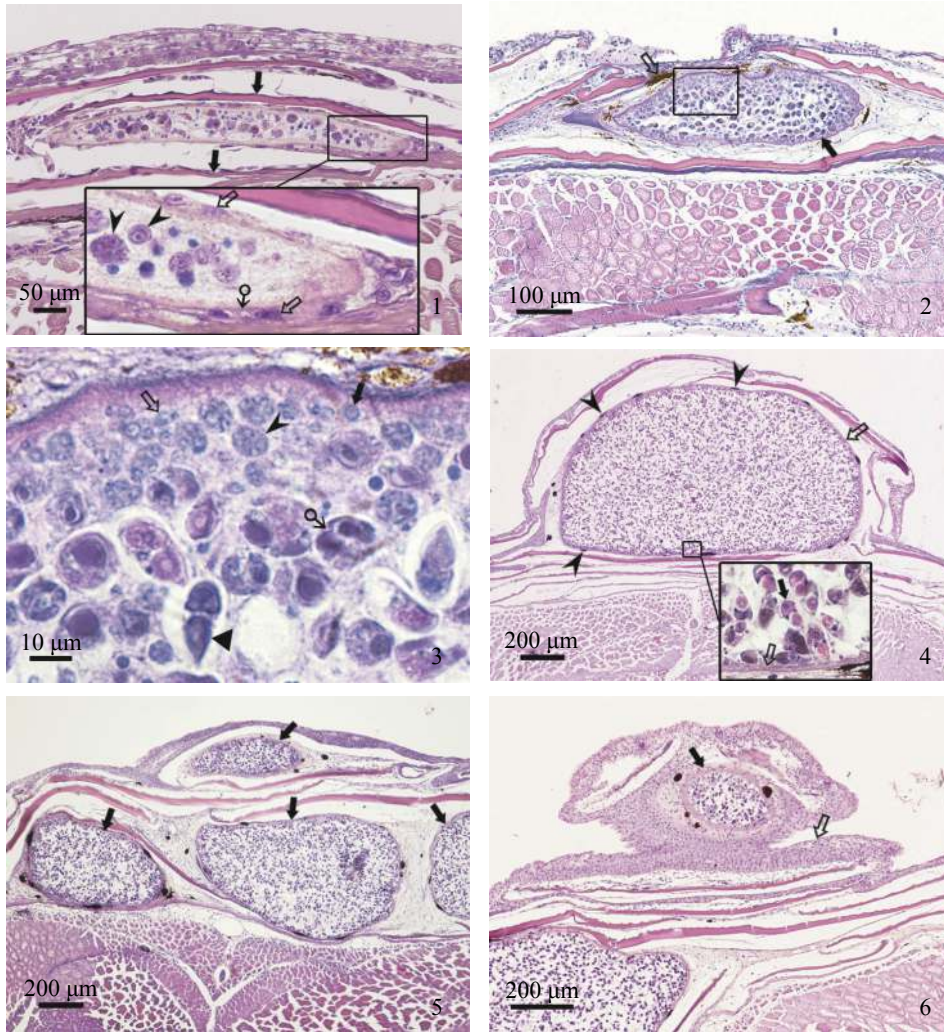
1.发生期: a.病鱼体表肉眼隐约可见皮肤微微隆起的孢囊. b.孢囊呈椭圆形或饼形, 乳白色, 孢囊外无黑色素细胞; 2.发展期: a.病鱼体表出现许多凸起的孢囊. b.前期, 孢囊体积增大, 分布较多的黑色素细胞. c.后期, 黑色素细胞进一步增多, 孢囊达到最大; 3.发展期: a和b.严重的病鱼苗出现畸形; 4.消退期: a.病鱼体表孢囊逐渐缩小. b.萎缩的孢囊; 5.消失期: a.前期病鱼体表孢囊隆起不明显. b.前期平坦的孢囊, 黑色素细胞更为密集; 6.消失期: a.中后期病鱼体表孢囊肉眼不易观察. b.中后期黑色素大量减少

Plate I Symptoms of diseased fish and pathological changes of cysts in the different periods of disease

1. period of occurrence: a. slightly uplifted cysts were faintly visible in diseased fish by naked eyes. b. cysts were oval or pie and milk white on which there were no melanocytes; 2. period of development: a. many cysts appeared in diseased fish. b. cysts enlarged and melanocytes increased in the early stages. c. melanocytes further increased and cyst reached maximum in the late stage; 3. period of development: a and b. deformed fish; 4. period of fade: a. cysts were shrinkage gradually in diseased fish. b. shrunken cyst; 5. period of disappearance: a. cyst uplift was not obvious in diseased fish. b. flattened cyst and melanocytes were more dense in the early stage. 6. period of disappearance: a. cysts were uneasily observed by naked eyes in diseased fish. b. melanocytes decreased in the middle and late stages

体分裂增殖结束, 全部发育为成熟孢子, 孢囊达到最大, 孢囊膜相对变薄, 孢囊外分布着大量的黑色素细胞(图版 II -4), 感染强度越高的鱼苗, 孢囊数目也越多, 绝大多数孢囊出现在有鳞片分布的致密结缔组织层至表皮间, 几个孢囊可紧邻在一起, 但由各自的孢囊膜包围分开, 互相独立(图版 II -5), 极少数孢囊出现在表皮的上皮细胞层内或之上(图版 II -6)。

消退期 孢囊随着成熟孢子的减少而逐渐缩小, 成熟孢子减少有2种方式, 其一是成熟孢子通过破裂的孢囊膜进入水体(图版 III -1), 其二是成熟孢子在未破裂孢囊膜的孢囊内不同步地崩溶解, 孢壳消失, 失去成熟孢子形态, 崩溶解的物质、破碎孢子核和极囊核以及未崩溶解的成熟孢子混杂在一起(图版 III -2), 有些孢囊同时既有孢囊膜破裂产生缺口成熟孢子流出又有



图版 II 发生期和发展期武汉单极虫寄生部位的组织病理变化

1.发生期: 鳞片(♣)间许多成纤维细胞(∩)包围未成熟孢子(▲)形成孢囊膜(δ), H.E; 2.发展期: 前期随着营养体增殖和未成熟孢子的发育, 孢囊(♣)增大和黑色素细胞(∩)增多, H.E; 3.图2框中的放大, 营养体(♣)、生殖细胞(∩)、泛孢子母细胞(▲)、双产孢体(δ)和成熟孢子(▲), H.E; 4.发展期: 后期孢囊内全部为成熟孢子(♣), 孢囊膜变薄(∩)和其外分布许多黑色素细胞(▲), H.E; 5.发展期: 几个互相独立的孢囊(♣)紧邻在一起, H.E; 6.孢囊(♣)分布在上皮细胞层(∩)之上, H.E

Plate II Histopathology on the infected sides in the periods of occurrence and development

1.period of occurrence: immature spores (▲) were surrounded by many fibroblasts (∩) to form the cyst membrane (δ) between scales (♣), H.E; 2. period of development: the proliferation of trophozoites and growth of the immature spores caused cyst (♣)enlargement and melanocytes (∩)appearance in the early stage, H.E; 3. the amplification of pane in Fig. 2: trophozoite (♣), generative cells (∩), pansporoblasts (▲), double sporonts (δ) and mature spore (▲) were showed, H.E; 4.period of development: mature spores (♣) in the cyst and the cyst membrane thinned (∩) outside of which many melanocytes (▲)distributed in the late stage, H.E; 5.period of development: several cysts were next to each other independently (♣), H.E; 6. the cyst (♣) appeared on the epithelium (∩), H.E

成熟孢子崩溶解, 而使孢囊逐渐缩小(图版 III-3)。当孢囊内成熟孢子全部流出或崩溶解, 孢囊进一步缩小, 原鳞片竖起或隆起程度也进一步减小, 此时期黑色素细胞一般不再增多。

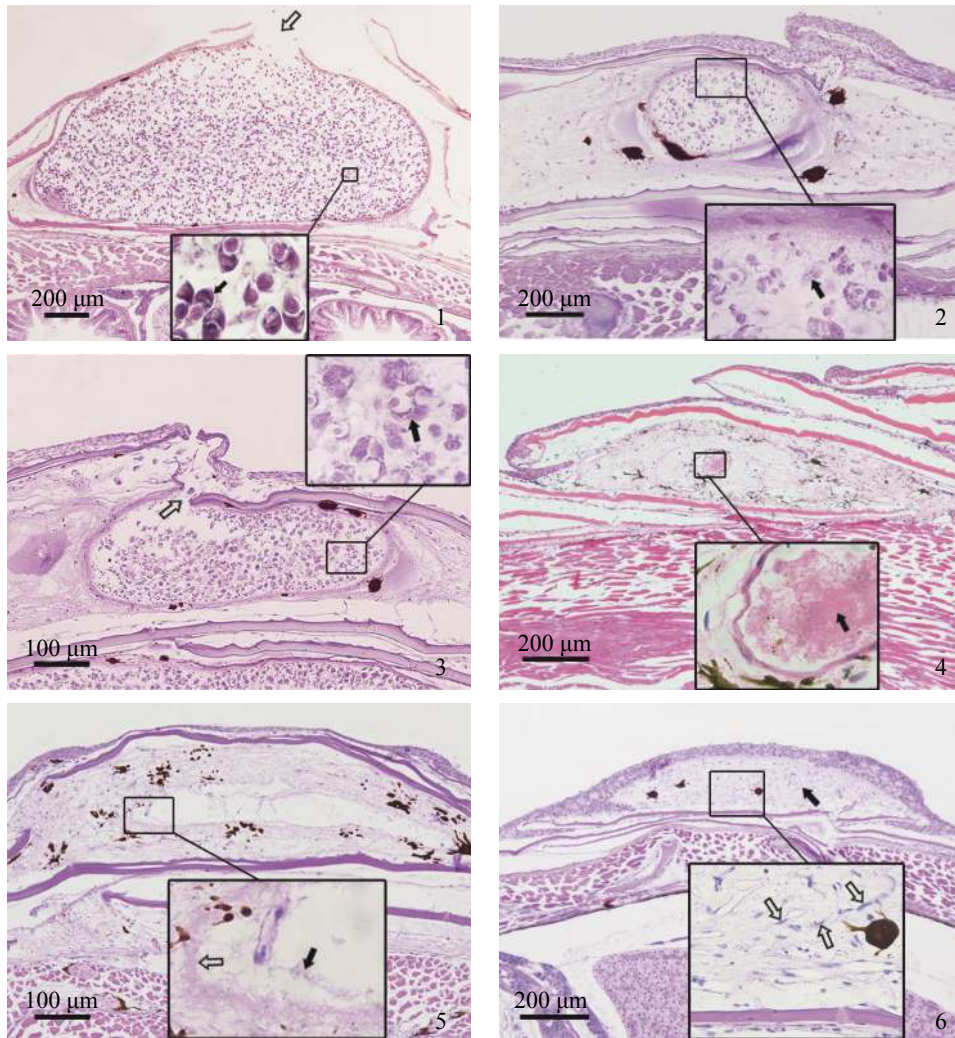
消失期 孢囊内无成熟孢子形态, 其前期只残留孢子崩溶解后的嗜伊红性等物质(图版 III-4), 中期嗜伊红性溶解物质逐渐减少, 孢囊膜开始模糊, 孢囊内只有少量的H.E可染物质, 呈现空

腔状, 黑色素细胞逐渐减少(图版 III-5), 后期原孢囊部位逐渐被结缔组织替代, 出现大量的成纤维细胞, 孢囊膜消失(图版 III-6)。

2.3 巢式PCR分析

疾病的发生期, 体表孢囊组织中提取的DNA经巢式PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳结果见图版 IV-a, 巢式第一轮和第二轮PCR分别扩增出





图版 III 消退期和消失期武汉单极虫寄生部位的组织病理变化

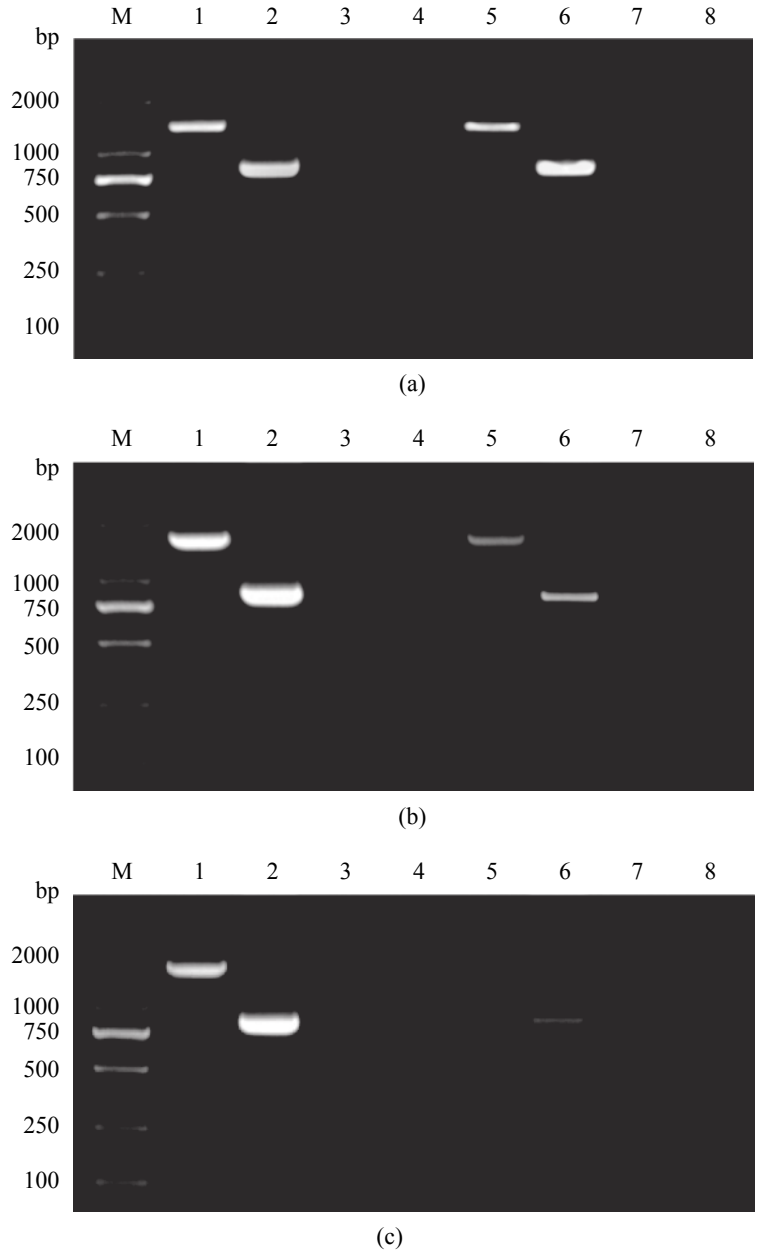
1. 消退期：包着成熟孢子(♣)的孢囊膜破裂产生缺口(♠)，成熟孢子流出，H.E；2. 消退期：不破裂孢囊内成熟孢子崩溶解后的物质(♣)，H.E；3. 消退期：孢囊内既有成熟孢子崩溶解(♣)又出现孢囊膜破裂产生缺口(♠)，H.E；4. 消失期：前期孢囊内无成熟孢子的形态，只残留孢子崩溶解的物质(♣)，H.E；5. 消失期：中期孢囊内崩溶解物质(♣)减少，空腔状，孢囊膜(♠)开始模糊，H.E；6. 消失期：后期原孢囊部位被结缔组织(♣)替代而分布着大量的成纤维细胞(♠)，孢囊膜消失，H.E

Plate III Histopathology on the infected sides in the periods of fade and disappearance

1. period of fade: ruptured cyst with mature spores (♣) appeared the gap (♠), mature spores outflow, H.E; 2. period of fade: materials (♣) after degeneration of mature spores in the unruptured cyst, H.E; 3. period of fade: ruptured cyst appeared the gap (♠) and degenerated spores (♣) appeared in the same cyst, H.E; 4. period of disappearance: no mature spores existed and only residual materials (♣) remained in the cysts in the early stage, H.E; 5. period of disappearance: degenerated materials (♣) reduced in the cavity of cyst and cyst membrane (♠) gradually degenerated in the middle stage, H.E; 6. period of disappearance: the original part of cyst was replaced by connective tissue (♣) distributed with numerous fibroblasts (♠) and cyst membrane disappeared in the late stage, H.E

1 584和853 bp目的条带，条带整齐，条带位置同阳性对照组一致。疾病的发展期和消退期经巢式PCR扩增后电泳和测序结果与发生期完全一致，条带整齐明亮。疾病消失期的前期，巢式PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳结果见图版IV-b，巢式第一轮和第二轮PCR扩增后能分别扩增出与阳性对照组对应的1 584和853 bp目的条带，但条带亮度比阳性对照组相对较弱，消失期的后期，

巢式第一轮PCR扩增后无1 584 bp目的条带出现，第二轮PCR扩增后能扩增出与阳性对照组对应的853 bp目的条带，但条带暗淡(图版IV-c)。不同时期扩增出的条带测序后，均进行BLAST比对，结果显示1 584 bp DNA序列和853 bp DNA序列分别与GenBank登录号为JQ088179和KJ813820的武汉单极虫DNA序列完全一致。10月下旬后原孢囊部位病灶，无论巢式第一轮PCR还



图版 IV 发生期(a)、消失前期(b)和消失后期(c)巢式PCR产物电泳图

M: Marker DL2000; 1和2: 分别为巢式第一轮和第二轮PCR的阳性对照组; 3和4: 分别为巢式第一轮和第二轮PCR空白对照组; 5和6: 分别为巢式第一轮和第二轮PCR的疾病组; 7和8: 分别为巢式第一轮和第二轮PCR的阴性对照组

Plate IV Electrophoresis of nested PCR productions in the periods of occurrence (a) and disappearance (b:early stage) (c: late stage)

Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1 and 2: positive controls in the first and second runs of nested PCR respectively. Lane 3 and 4: no templates in the first and second runs of nested PCR respectively. Lane 5 and 6: diseased groups in the first and second runs of nested PCR respectively. Lane 7 and 8: negative controls in the first and second runs of nested PCR respectively

是第二轮PCR扩增后均无目的条带出现, 检测不到武汉单极虫的核酸物质。

3 讨论

粘孢子虫(Myxosporea)主要寄生于水生脊椎

动物尤其是鱼类<sup>[10]</sup>, 其种类繁多, 早在2010年已发现粘孢子虫种类超过2 200种<sup>[11]</sup>。1984年Wolf等<sup>[12]</sup>首次发现寄生在寡毛类环节动物正颤蚓(*Tubifex tubifex*)体内的放射孢子虫(Actinosporean)与寄生在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)上的脑粘体虫

(*Myxobolus cerebralis*)是同一物种,在正颤蚓体内发育至放射孢子虫后释放入水体,再进入虹鳟鱼体内发育至成熟孢子,成熟孢子进入水体后在正颤蚓体内发育,明确了脑粘体虫的生活史需要脊椎动物和无脊椎动物两个交替寄主完成生活史的循环。以后相继又发现了近150种粘孢子的放射孢子虫<sup>[13]</sup>。武汉单极虫隶属粘体动物门、粘孢子纲、双壳目、单极虫科、单极虫属,2016年通过分子生物学分析明确了其与寄生在苏氏尾鳃蚓(*Branchiura sowerbyi*)体内的橘瓣放射孢子虫(*Aurantiactinomoxon* type LY)属于同一物种,因此武汉单极虫生活史中需要异育银鲫和苏氏尾鳃蚓2个寄主完成生活史循环<sup>[14]</sup>,推测除在寄主种类和寄生部位方面不同外,与寄生在虹鳟鱼上的脑粘体虫生活史循环相似。在已明确需要2个寄主完成生活史的孢子虫报道中,生活史中的许多具体细节等问题还不十分清楚<sup>[15]</sup>,武汉单极虫生活史也是如此。本研究对已感染橘瓣放射孢子虫的异育银鲫鱼苗,通过不同疾病时期病理变化和PCR分析,弄清了未成熟孢子在异育银鲫上的发育过程和成熟孢子去向等与生活史相关的问题,并掌握了武汉单极虫病疾病过程中的病理特点,不仅丰富了理论知识,而且在该病防控上也具有指导意义。

单极虫属有些种类对鱼类寄主和寄生部位都没有特异性,如罗非单极虫(*Thelohanellus talipiae*)既可在红鲤(*Cyprinus carpio rubrofuscus* Lacepède)的肠道寄生,又可在莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的鳃部寄生,鲮单极虫(*Thelohanellus rohita*)既可在鲤(*Cyprinus carpio*)的体表、鼻腔和输尿管等部位寄生,又可以在鳊(*Parabramis pekinensis*)的肠道寄生<sup>[16]</sup>;有些种类对寄主有特异性而对寄生部位无特异性,如*Thelohanellus hovorkai*寄生在鲤体内鱼鳔和鳃弓的结缔组织中,形成0.3~0.5 mm的孢囊,也可寄生在鳃盖和鼻周围,不寄生于同池养殖的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙(*Aristichthys nobilis*)<sup>[17]</sup>;单极虫属对寄主无特异性而只对寄生部位有特异性的种类目前还未见报道;有些种类对寄主和寄生部位都具有特异性,如*Thelohanellus kitauei*只寄生在鲤肠壁上形成约3~8 mm大小的孢囊<sup>[18]</sup>,*Thelohanellus nikolskii*只寄生在鲤鱼鳍条上形成约1~2 mm的孢囊<sup>[19]</sup>,武汉单极虫则属于这类寄生虫之一,特异性地

寄生于异育银鲫的体表表皮形成孢囊,不感染其他鱼类和其他组织器官。

患病异育银鲫病理变化和PCR检测结果表明,该病具有明显的发生、发展、消退和消失的疾病过程。肉眼和体视镜观察,孢囊从发生期的形成到发展期逐渐增大至最大,然后进入消退期逐渐减小,在消失期孢囊逐渐消失;孢囊外的黑色素细胞随着孢囊的增大而增多,消退期黑色素细胞不再增加,孢囊的缩小使得黑色素细胞分布更为密集,消失期黑色素细胞逐渐减少至消失。组织病理变化显微观察,在发生期,武汉单极虫营养体主要寄生在鳞片下的真皮疏松结缔组织中,由结缔组织成纤维细胞包围形成主要由胶原纤维成分组成的孢囊膜,在孢囊膜周围无明显增多的血管分布;在发展期,孢囊膜进一步增厚,随着营养体等未成熟孢子发育为成熟孢子的数量不断增加,孢囊进一步增大,孢囊膜又逐渐变薄,孢囊外结缔组织中除黑色素细胞增多外无充血和白细胞浸润现象,营养体全部发育为成熟孢子时孢囊最大;在消退期,孢囊随着成熟孢子的逐渐减少而逐渐缩小,成熟孢子通过2种方式逐渐减少,一种为部分成熟孢子通过破裂的孢囊进入水体,另一种为部分成熟孢子在不破裂的孢囊内不同步地崩溶解,孢囊逐渐缩小;在消失期,成熟孢子全部崩溶解,孢囊内只残留崩溶解的物质,并逐渐减少。巢式PCR检测结果也同样表明有这样的过程,发生期、发展期和消退期以及消失期的前期都能扩增出1 584和853 bp目的条带,但消失期的前期目的条带亮度明显减弱,而消失期的后期只在第二轮巢式PCR才扩增出暗淡的853 bp目的条带,说明残留的武汉单极虫核酸物质逐渐减少,10月下旬后无论是第一轮还是第二轮巢式PCR都没有出现目的条带,是由于核酸物质已全部消失还是由于巢式PCR灵敏度的问题有待于进一步证实,核酸物质的存在,对进一步探讨孢子虫是否还存在另一生活史途径有着重要意义。通过病理变化和巢式PCR方法系统地探讨疾病整个过程,尤其消退期和消失期的疾病过程在其他粘孢子虫上未见报道,本研究发现了武汉单极虫只有部分成熟孢子进入水体参与生活史循环,并首次发现了另一部分成熟孢子在孢囊内通过崩溶解的方式而逐渐消退和消失,从病理变化结果中还可得出消退期



和消失期的病鱼都处于自身的康复过程中。

武汉单极虫寄生形成的孢囊, 不是由许多小孢囊组合而成, 而是由各自的孢囊膜包裹分开, 互相独立, 为单孢囊型孢囊。与咽碘泡虫形成的孢囊完全不同, 咽碘泡虫寄生后, 营养体周围的成纤维细胞大量聚集, 包裹着营养体等未成熟孢子, 逐渐形成纤维和成纤维细胞组合成网状结构的孢囊膜, 进入疾病发展期孢囊由许多小孢囊组合而成, 是多孢囊型孢囊, 小孢囊间的孢囊膜中有丰富的血管分布<sup>[4]</sup>, 龟形单极虫(*Thelohanellus testudineus*)形成的孢囊也属于多孢囊型孢囊, 孢囊大小可达到1.4~3.2 cm<sup>[20]</sup>。

机体的炎症反应是一种防御反应, 炎症反应的程度与寄生部位和寄生的组织类型有关。一般寄生于神经系统、性腺、鳍条、体腔膜等部位都是只形成孢囊的轻微炎症反应, 如寄生在鲤鳍条上的*Thelohanellus nikolskii*<sup>[19]</sup>和寄生于异育银鲫心脏心肌组织中的心碘泡虫(*Myxobolus hearti*)只形成孢囊的炎症反应<sup>[21]</sup>。严重的炎症反应除形成孢囊外, 还会出现炎性细胞浸润等现象, 如*Ceratomyxa shasta*寄生于硬头鲮(*Salmo gairdneri* Richardson)肠道黏膜下层中引起淋巴细胞浸润的炎症反应<sup>[22]</sup>, 龟形单极虫寄生于异育银鲫体表形成孢囊, 其周围也有淋巴细胞浸润的炎症反应<sup>[20]</sup>。本研究的武汉单极虫寄生部位未见有充血、淋巴细胞或其他白细胞浸润以及吞噬细胞吞噬等现象, 只形成成纤维细胞包裹的孢囊膜和黑色素细胞增多的炎症反应, 属于一种轻微的炎症反应。

不同种类的粘孢子虫对鱼类的危害程度有很大差异, 主要取决于感染时鱼的大小、感染强度、感染部位、形成的孢囊大小和结构。由于武汉单极虫感染部位在体表表皮和真皮层、形成的孢囊小和寄生部位没有血管增多的组织病理结构特点, 在消退期孢囊膜即使破裂也不会引起致命性的出血现象, 因此患病异育银鲫死亡率取决于受感染时的鱼大小和感染强度高, 鱼越小、感染强度越高的鱼苗死亡率越高。异育银鲫在江浙地区一般在4—5月份产卵孵化出鱼苗, 据习丙文等<sup>[14]</sup>报道, 5月份采集的苏氏尾鳃蚓在实验室暂养一周内就释放了橘瓣放射孢子虫, 如果有些自然繁殖池塘刚孵化出的异育银鲫鱼苗或刚人工繁殖出的鱼苗下塘时刚好遇到橘瓣放射孢子虫的释放, 被感染的鱼

苗就很小, 相反有些池塘橘瓣放射孢子虫释放时鱼苗已很大, 此时被感染的鱼苗就很大, 因此经观察有些池塘鱼苗1.5 cm左右时就出现大量的孢囊, 有些池塘鱼苗5.0 cm左右时才出现孢囊, 另外不同池塘橘瓣放射孢子虫的释放量不同而感染强度不同, 有些池塘每尾鱼最多孢囊数目可达40个左右, 这些因素都会导致不同池塘鱼苗死亡率有很大差异, 患病鱼累积死亡率一般在5%~30%左右, 最高累积死亡率可达60%左右, 死亡一般都出现在疾病发展期的后期。高死亡率的咽碘泡虫病与武汉单极虫病有很大区别, 它特异性地寄生于咽部, 形成多孢囊型的大孢囊, 阻碍摄食等作用使病鱼在孢囊还未破裂时就有大量死亡现象, 小孢囊间的孢囊膜中有大量血管分布的组织病理特点, 孢囊膜破裂后大量孢子流出的同时, 伴随着更为致命性的大量出血, 加速病鱼死亡, 死亡率可达90%以上<sup>[4]</sup>。

已有报道烟曲霉素(fumagillin)长期口服后防治粘孢子虫病才具有一定效果, 该药水溶性差和药残等问题, 认为其较适用于观赏鱼<sup>[23]</sup>, 此药物长期口服后影响虹鳟生长、食欲和造成死亡<sup>[24]</sup>以及引起硬头鲮肾脏造血组织减少<sup>[25]</sup>等负面影响, 目前在食用鱼类养殖生产中还没有得到广泛的应用, 因此可通过非药物途径对粘孢子虫病进行综合性防控, 达到减少疾病发生和发展的目的, 武汉单极虫病也如此。首先该病的中间寄主苏氏尾鳃蚓生活在池塘底泥中<sup>[14]</sup>, 杀灭苏氏尾鳃蚓达到切断生活史的方法是控制该病发生的最有效途径, 其次加强异育银鲫亲本强化培育等养殖管理措施, 使亲本的性腺提早发育成熟, 提前产卵孵化出鱼苗, 在橘瓣放射孢子虫释放前鱼苗已经达到较大的规格, 即使被感染也可减少疾病发展期的死亡率, 最后利用武汉单极虫只特异性地寄生于异育银鲫的特点, 采用苗种池轮养的方式, 出现武汉单极虫病的苗种池轮养几年其他如四大家鱼鱼种, 释放的橘瓣放射孢子虫没有异育银鲫特异性寄主, 无法完成生活史循环, 该病会减少或消失。该病进入消退期和消失期时, 病理变化显示孢囊逐渐消退和消失, 病原对鱼体损伤作用逐渐减小, 此时鱼苗一般不再有死亡现象, 不采取任何措施患病鱼也可自愈。

#### 参考文献:

- [1] Xu J, Zeng L B, Zhang H, et al. Cyprinid herpesvirus 2

- infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1-2): 138-144.
- [2] 操艮萍, 陆宏达, 李振伟, 等. 引起混养塘中异育银鲫和鲢发病死亡病原及组织病理[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 428-444.
- Cao G P, Lu H D, Li Z W, *et al.* Etiology and histopathology of diseased *Carassius auratus gibelio* and *Hypophthalmichthys molitrix* in polyculture ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 428-444(in Chinese).
- [3] 陆宏达, 蔡水局, 竹攸汀, 等. 引起池养异育银鲫高死亡率的粘孢子虫新种咽碘泡虫形态和分子分析[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(4): 406-416.
- Lu H D, Cai S J, Zhu Y T, *et al.* Morphological and molecular analysis of *Myxobolus pharynae* n. sp. (Myxosporea) causing high mortality of *Carassius auratus gibelio* in pond aquaculture, China[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(4): 406-416(in Chinese).
- [4] 李振伟, 陆宏达, 操艮萍, 等. 异育银鲫咽碘泡虫病理组织病理与病理生理[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6): 1339-1350.
- Li Z W, Lu H D, Cao G P, *et al.* Histopathology and pathophysiology of *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxobolus pharynae*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1339-1350(in Chinese).
- [5] 肖从学, 陈启鏊. 淡水鱼类寄生粘孢子虫两新种[J]. *鱼病学研究论文集*, 1993, 10(1): 83-86.
- Xiao C X, Chen Q L. Descriptions of two new species of Myxosporidia from *Carassius auratus gibelio*[J]. *Transactions of Researches on Fish Disease*, 1993, 10(1): 83-86(in Chinese).
- [6] 竹攸汀, 陆宏达, 蔡水局. 武汉单极虫(粘体门, 双壳目)的重描述及基于18S rDNA序列系统发育分析[J]. *动物分类学报*, 2012, 37(4): 681-686.
- Zhu Y T, Lu H D, Cai S J. Redescription of *Thelohanellus wuhanensis* Xiao *et* Chen (Myxozoa, Bivalvulida) infecting allogynogenetic crucian carp(*Carassius auratus gibelio*) and phylogenetic analysis based on 18S rDNA sequence[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2012, 37(4): 681-686(in Chinese).
- [7] 柴下, 陆宏达, 刘俊杰, 等. 武汉单极虫巢式聚合酶链反应检测方法的建立与优化[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(4): 556-563.
- Chai X, Lu H D, Liu J J, *et al.* Establishment of nested PCR assay for detection of *Thelohanellus wuhanensis* in allogynogenetic crucian carp[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(4): 556-563(in Chinese).
- [8] Zhang J Y, Yokoyama H, Wang J G, *et al.* Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii* Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp: redescription of *M. wulii* from China and Japan[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(1): 57-68.
- [9] Andree K B, Székely C, Molnár K, *et al.* Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences[J]. *The Journal of Parasitology*, 1999, 85(1): 68-74.
- [10] Bartholomew J L, Atkinson S D, Hallett S L, *et al.* Myxozoan parasitism in waterfowl[J]. *International Journal for Parasitology*, 2008, 38(10): 1199-1207.
- [11] 索栋, 赵元著. 尼氏单极虫(粘体门, 双壳目)重描述及基于18S rDNA系统地位分析[J]. *动物分类学报*, 2010, 35(1): 90-95.
- Suo D, Zhao Y J. Morphological redescription of *Thelohanellus nikolskii* Achmerov, 1995(Myxozoa, Bivalvulida) and phylogenetic analysis of *Thelohanellus nikolskii* inferred from 18s rDNA[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(1): 90-95(in Chinese).
- [12] Wolf K, Markiw M E. Biology contravenes taxonomy in the myxozoa: New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts[J]. *Science*, 1984, 225(4669): 1449-1452.
- [13] Székely C, Borkhanuddin M H, Cech G, *et al.* Life cycles of three *Myxobolus* spp. from cyprinid fishes of Lake Balaton, Hungary involve triactinomyxon-type actinospores[J]. *Parasitology Research*, 2014, 113(8): 2817-2825.
- [14] 习丙文, 李鹏, 陈凯, 等. 武汉单极虫生活史中放射孢子虫的发现及鉴定[J]. *水产学报*, 2016, 40(4): 644-651.
- Xi B W, Li P, Chen K, *et al.* The life cycle of *Thelohanellus wuhanensis* from *Carassius auratus* involving an Aurantiactinomyxon-type actinospore[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 644-651(in Chinese).
- [15] Yokoyama H. A review: Gaps in our knowledge on Myxozoan parasites of fishes[J]. *Fish Pathology*, 2003, 38(4): 125-136.
- [16] 陈启鏊, 马成伦. 中国动物志: 粘体动物门, 粘孢子纲[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 576-603.

- Chen Q L, Ma C L. Fauna Sinica: Myxozoa, Myxosporea[M]. Beijing: Science Press, 1998: 576-603(in Chinese).
- [17] Molnár K, Kovács-Gayer E. Biology and histopathology of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (Myxosporea, Myxozoa), a protozoan parasite of the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 1986, 34(1-2): 67-72.
- [18] Liu Y, Whipps C M, Liu W S, et al. Supplemental diagnosis of a myxozoan parasite from common carp *Cyprinus carpio*: Synonymy of *Thelohanellus xinyangensis* with *Thelohanellus kitauei*[J]. Veterinary Parasitology, 2011, 178(3-4): 355-359.
- [19] Molnar K. Biology and histopathology of *Thelohanellus nikolskii* Achmerov, 1955(Myxosporea, Myxozoa), a protozoan parasite of the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Zeitschrift Für Parasitenkunde, 1982, 68(3): 269-277.
- [20] Liu Y, Jia L, Huang M J, et al. *Thelohanellus testudineus* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida) infecting the skin of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(6): 535-542.
- [21] Ye L T, Li W X, Wang W W, et al. Updated morphology, histopathology and molecular phylogeny of *Myxobolus hearti*, cardiac myxosporea in gibel carp, *Carassius gibelio* (Bloch)[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(1): 11-20.
- [22] Bartholomew J L, Smith C E, Rohovec J S, et al. Characterization of a host response to the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques[J]. Journal of Fish Diseases, 1989, 12(5): 509-522.
- [23] Yokoyama H, Liyanage Y S, Sugai A, et al. Efficacy of fumagillin against haemorrhagic thelohanellosis caused by *Thelohanellus hovorkai* (Myxosporea: Myxozoa) in coloured carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Journal of Fish Diseases, 1999, 22(3): 243-245.
- [24] Wishkovsky A, Groff J M, Lauren D J, et al. Efficacy of fumagillin against proliferative kidney disease and its toxic side effects in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings[J]. Fish Pathology, 1990, 25(3): 141-147.
- [25] Laurén D J, Wishkovsky A, Groff J M, et al. Toxicity and pharmacokinetics of the antibiotic fumagillin in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1989, 98(3): 444-453.



## Pathology and PCR assay of *Thelohanellus wuhanensis* disease in Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in the periods of occurrence, development, fade and disappearance

LU Hongda\*, REN Fangfang, JIA Xiangxiang, ZHANG Xiaojun, TIAN Quanquan

(Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding; National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals; National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to explore the process and pathology of *Thelohanellus wuhanensis* diseased Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), the disease was divided into four periods of occurrence, development, fade and disappearance according to whether there were mature spores and the degenerated degree of them or not. Pathological observation and analysis of nested PCR were made respectively. Results showed that in the period of occurrence, formed cysts on diseased fish were small and a little uplifted. The cysts were milk white in colour. Trophozoites increased by profilication and no mature spores appeared in the cysts. In the period of development, mature spores appeared in the cysts. Number and size of cysts increased. The cysts were gray black in the colour due to the increase of melanocytes. Diseased fish with higher infection would show death or deformity. In the period of fade, mature spores reduced by flowing out into water through the ruptured gap of cysts or by degenerating gradually until all of them degenerated. At the same time, cysts shrunk and melanocytes were more dense gradually. Diseased fish did not die in the present period due to relieved symptoms. In the period of disappearance, no mature spores and only degenerated materials were left in the flattened cysts. Melanocytes reduced gradually. Finally, the original part of cysts was replaced by connective tissue. Nested PCR analyses showed that the 1 584 bp and 853 bp in the first and second runs of nested PCR were respectively obtained in all of four periods of disease. However, in the late stage of the period of disappearance only 853 bp in the second run of nested PCR was obtained, which illustrated that its quantity reduced. No bands were obtained after late October. Present study not only revealed the pathology of *T.wuhanensis* infected sides in the four periods of disease, but also defined two ways of the disease fade and disappearance. One way was flow out of mature spores from ruptured cysts into water and another way discovered for the first time was degeneration of mature spores in the cysts.

**Key words:** *Carassius auratus gibelio*; *Thelohanellus wuhanensis*; pathology; histopathology; PCR

**Corresponding author:** LU Hongda. E-mail: hdlu@shou.edu.cn

**Funding projects:** Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding (ZF1206)