

综述

鱼类微孢子虫的研究进展

章晋勇 吴英松 鲁义善 汪建国

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

ADVANCES IN RESEARCH OF MICROSPORA INFECTING FISH

ZHANG Jin Yong, WU Ying Song, LU Yi Shan and WANG Jian Guo

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 微孢子虫; 研究进展; 鱼类

Key words: Microspora, Research advances, Fish

中图分类号: S941.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)05-0563-06

微孢子虫(Microspora)是一类古老的细胞内专性寄生微生物, 寄主范围涉及从原生动到哺乳动物(包括人)的广泛宿主, 是许多具有经济价值的昆虫、甲壳类、鱼类、啮齿类、灵长类等动物的病原体。自1857年Nageli首次发现家蚕微孢子虫病病原生物 *Noseana bombycis* 后, 人们对其进行了大量研究, 特别是近年来, 免疫缺陷患者体内微孢子虫的发现, 更加引起了生物学界和医学界的广泛关注^[1]。其主要生物学特征概括如下: 营细胞内专性寄生; 具单细胞孢子, 孢子内含1—2个核, 或简或繁的挤出器, 不含线粒体, 原始的高尔基体, 似原核生物的核糖体^[2]。

在国内对微孢子虫的研究主要集中在昆虫, 特别是家蚕, 取得了很多重要成果。但对其引起的水生经济动物病害的研究较少, 仅有陈启鏊^[3]对四大家鱼, 陈启鏊等^[4]对斑鳢、乌鳢, 何筱洁^[5,8]对大眼鲷、麦穗鱼、长毛对虾、鳊鱼等寄生微孢子虫的初步研究。然而, 近年来在水产养殖中频发微孢子虫病, 严重威胁着一些经济水产动物的养殖^[9]。基于生产实践和基础研究的意义, 有必要开展水产动物寄生微孢子虫的研究。由于寄生于养殖甲壳类的微孢子虫与昆虫微孢子虫较为相似, 本文仅就国外近二十年来鱼类微孢子虫的相关研究作一综述, 以求为我国鱼类微孢子虫研究提供较全面的资料。

1 系统发育与分类学研究

鱼类是微孢子虫的主要宿主之一, 目前已报道的鱼类微

孢子虫有100多种, 其中在Sprague^[10]的分类系统中命名的就达90余种, 另外还有许多分类位置不明确种类及一超寄生类群。表1^[10]列出了寄生于鱼类的主要微孢子虫。从表中可以清楚的看到, 虽然种类繁多且分布十分广泛, 但相对于整个微孢子虫门, 所有鱼类微孢子虫有着较固定的分布, 表现出一定的宿主特异性。由于寄主与寄生虫的协同进化(Coevolution), 鱼类微孢子虫为适应寄主及其生活环境而较之其他微孢子虫有着明显的形态结构和系统发育上的差异, 它们彼此有着较近的亲缘关系, 是微孢子虫门中较独特的一个类群。Issi等^[11]比较了寄生于不同宿主的微孢子虫的寄生泡(Parasitophorous vacuole, PV)发现, 所有微孢子虫的PV可以分为三类, 鱼类微孢子虫的PV是一层来自宿主细胞内质网的膜状结构, 明显不同于其他宿主。另外大多鱼类微孢子虫可引起宿主细胞肥大而在寄生部位产生囊状结构, 如异瘤(Xenoma)等。Bell等^[12]通过比较多种寄生微孢子虫的核糖体基因序列(rDNA), 发现鱼类微孢子虫的rDNA高度保守, 他们与水生昆虫、陆生昆虫的种属存在显著差异。Nilesen等^[13]分析了来自4属7种鱼类微孢子虫系统发育关系, 发现微孢子虫可以分为三类, 鱼类微孢子虫除 *Nudeospora salmonis* 外均位于同一类群。同样, Dunn等^[14]应用SSU rDNA构建了人、哺乳动物、鱼类、昆虫的寄生微孢子虫系统发育树, 研究发现所有寄生于鱼类的微孢子虫有共同的起源。

收稿日期: 2003-04-20; 修订日期: 2004-05-30

基金项目: 中国科学院知识创新工程课题(KSCX 2-1-04)资助

作者简介: 章晋勇(1980—), 男, 江西省, 临川市人, 硕士, 主要从事鱼病学和免疫学研究

通讯作者: 汪建国 E-mail: wangjg@ihb.ac.cn

需要指出的是由于现有的微孢子虫分类系统^[10]是基于光镜、电镜对孢子形态、孢子发育、寄主与寄生虫关系的观察及生活史、寄生部位、传播方式等生物学性状差异做出的,而有证据显示包括孢子大小、形状、孢核数、极囊结构等生物学性状的差异不但存在于种间,也存在于种内,故而其中存在一些冗余的分类单元^[14]。另外,很多种形态之间的差异非常微小,尤其是营养体阶段,加之一些种的人工感染尚未成功而无法得到前孢子期的相关分类特征,很多种的分类位置依然模糊或是错误的,*Microsporidium* 群的出现就是最好的例证。近年来分子生物学方法已越来越多的应用于寄生虫的分类学研究^[15]。rDNA 序列及其他一些保守蛋白编码序列的应用为微孢子虫的分类学及系统发育研究题提供了重要的方法途径。Kent 等^[16]通过 rDNA 的序列比较在白鲑肌肉发现了一微孢子虫新种。Pomport-Castillon 等^[17]通过 rDNA 序列分析发

现根据形态特征鉴定的三种格留虫(*Gleage anomda*, *G. stephani*, *G. atherinae*)实际上是同一种,并认为 *G. americanus* 应归入 *Spraguea* 属。Leiro 等^[18]通过限制性酶切片段多态性(RFLP)分析了三种微孢子虫的 SSU rDNA,阐明了三者之间的系统发育关系。Cheny 等^[19]比较了多孢虫属各种间的最大核糖体 RNA 聚合酶II编码序列,发现现有分类位置中匹里虫属是一个多元群体,其中许多种的分类位置有待进一步确定,支持将 *P. anguillarum* 归入 *Heterosporis* 属^[20]。尽管分子生物学方法在微孢子虫的分类研究中正扮演着愈来愈重要的角色,但这并不是说传统分类方法过时了,恰恰相反,分子方法是作为传统形态分类的必要补充而发挥作用的,两者有机结合才能构建更合理的微孢子虫分类系统^[9],作者对寄生于石斑鱼腹腔一微孢子虫的超微结构的研究结果与来自分子方面的证据一致,支持将这一新种归入 *Glugea* 属的报道(作者手稿)。

表 1 鱼类微孢子虫的典型属种及地理分布			
Tab. 1 List of genus of fish infected microsporidians, typical species and geographical distribution			
寄生虫	寄主	感染部位	地理分布
Organisms	Host	Sites of infection	Geographical distribution
<i>Heterosporis anguillarum</i>	鳗鲡等	躯干肌	日本, 中国台湾, 捷克等地
<i>Ichthyosporidium giganteum</i>	杜父鱼类等	前腹部皮下相关组织	荷兰, 前苏联, 欧洲等地
<i>Nudasporea salmonis</i>	鲑鲈鱼类等	肝脏、肾脏、脾脏、胰脏, 眼等器官	北美, 法国, 智利等地
<i>Glugea plecoglossi</i>	鲤科鱼类 虹鳟等	性腺, 肝, 胆, 肠, 脾, 膀胱等	北美, 日本, 中国, 法国, 智利等地
<i>Platysphora longifilis</i>	杜父鱼, 白鲑, 麦穗鱼等	性腺、骨骼肌等	利等地 中南亚, 欧洲等地
<i>Loma salmonae</i>	鲑鲈鱼类等	鳃、心脏、肝脾脏、肾脏等均有分布	北美, 欧洲等地
<i>Pseudoloma neurophilia</i>	斑马鱼	中枢神经系统	美国等地
<i>Neonosemolides tilapiae</i>	非洲丽鱼	肌肉	塞内加尔等地
<i>Tetramicra brevifilum</i>	大菱鲆等	肌肉、肠、肝、脾等	塞内加尔等地
<i>Spraguea lophii</i>	鳉鱼类等	神经系统	英国等地
<i>Kabataia arthuri</i>	虹鳟等	躯干肌	欧洲等地
<i>Microgenma ovoidea</i>	鳗鲡等	肝脏	捷克, 东南亚等地
<i>Enterocytozoon salmonis</i>	鲑鲈鱼等	躯干肌	西班牙, 加拿大等地
<i>Microfilum lujani</i>	笛鲷	血细胞	塞内加尔等地
<i>Microsporidium balbiani</i>	鲱鱼 鲑鲈 鲤科鱼类等	肠道 肌肉 肝 肾等	北美, 欧洲, 日本等地
Hyperparasitic Microsporeans	老虎豚等	肠道寄生黏孢子虫	塞内加尔, 日本等地

2 生活史及传播方式

生活史不但是微孢子虫分类的一个重要依据而且是微孢子虫病防治研究的一个重要内容。所有微孢子虫的生活史均起始于成熟孢子在适当环境下极丝挤出, 释放具有侵染性的孢原质, 发育过程包括孢原质期(Sporoplasmodium)、裂殖

期(Merogony)、产孢期(Sporogony)、成熟孢子(Spore) 四个阶段, 其间裂殖体的增殖方式、孢核数目及形态变化、产孢体生成的孢母细胞数等构成了微孢子虫多样性^[10], 鱼类微孢子虫也不例外, 但对虫体如何进入鱼体内, 孢子在何种器官或组织释放孢原质及极丝挤出的环境条件和机制, 以及影响孢子发育的理化因子, 虫体在宿主体内移行过程等一系列问题,

人们还未彻底搞清楚,这也是近年来研究的热点。Baxa 和 Antonio 等^[21]通过感染实验发现健康大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)感染 *Enterocytozoon salmonis* 的几种可能的途径:或通过直接接触感染的病鱼,或间接接触附着有孢子的网箱等器械,或直接吞食海水中的孢子。Shaw 等^[22]较系统研究了 *Loma salmonae* 的传播模式,他设计了 6 组实验,第一组,经口传播;第二组,皮下(IP)注射;第三组,肌肉(IM)注射;第四组,血管内(IV)注射;第五组,共栖感染;第六组,直接接触。结果前五组均感染成功,而将孢子直接放于鱼鳃上,感染失败,这说明鱼吞食孢子是其主要的自然感染途径,孢子进入鱼体后在胃、幽门盲囊或前肠释放孢原质并进入这些器官的上皮细胞开始其孢子发育,然后进入血液循环,最后到达靶器官,即成熟孢子寄生的部位,这也是心脏、脾脏、肾脏等器官发现前孢子(Pre spore)和孢子的原因。另外他还认为鳃皮层是 *L. salmonae* 最佳生存部位,但如果感染方式变化或循环感染其他器官皮层也能产生异瘤,一旦这些异瘤破裂,将导致严重的自体感染(Autoinfection)。另外,很多学者认为巨噬细胞对孢子的吞噬作用的不完全是微孢子虫在鱼体内发生机会性感染的一种重要方式,可能的原因是孢子被吞噬细胞吞噬后逃避了溶酶体的溶解而侵染相应组织^[23]。故而人们认为,不同种或不同的感染途径都可能存在不同的传播模式,不同的萌发机制,不同的体内移行途径及发育过程,表现出很强的机会性致病力。再之,一些与垂直传播相关的特征如卵巢中微孢子虫的存在^[24],使人们怀疑鱼类微孢子虫是否存在垂直传播的可能性,但至今未见鱼类微孢子虫寄生引起“雄性自杀”或宿主雌性化等与垂直传播有关的典型特征报道。可见,鱼类微孢子虫以水平传播为主,但这可能是由于取材的局限性造成的假象,彻底搞清楚鱼类微孢子虫的传播模式及发育过程还需扩大所检对象^[15]。现代生物学技术的应用为此提供了便利。Lee 等^[25]利用原位杂交(*In situ* Hybridization, ISH)检测到微孢子虫各发育阶段在鱼体内各组织的分布。Sanchei 等^[23]通过 PCR 检测发现 *L. salmonae* 生活史的完成需要经历较长时间的心脏内发育过程。

3 水产动物微孢子虫病的危害、诊断与防治

3.1 危害与诊断

微孢子虫的寄生引起的微孢子虫病给水产养殖业造成了巨大的经济损失。其危害主要体现在以下两个方面:一是对寄主的危害。主要表现在影响宿主的生长发育、降低宿主抗病能力、造成寄生部位病变,严重时使水产动物失去商品价值,甚至引起宿主的死亡。Wongtawat 等^[26]发现 *E. salmonis* 感染严重抑制了大麻哈鱼的免疫功能,表现在对其他病原体的抵抗力明显降低。二是对生态系统的影响。微孢子虫病引起宿主大量死亡,从而破坏了宿主区系原有的生态平衡。Ieshko 等^[27]报道了由于 *Glugea hertwigi* 的寄生导致欧洲胡瓜鱼(*Osmerus eperlanus*)的大量死亡,引起胡瓜鱼的种群结构改变,破坏了原有的生态平衡。

在微孢子虫的诊断方面,传统的方法有目检,镜检(包括光镜、电镜),荧光检测法,血清学检测法等,但这些方法都存在这样或那样的不足,如光镜难以检测到早期发育阶段,电

镜又费时费力,荧光法只适用检测某些特定种等。近年来,随着分子生物学、免疫学的发展,一些灵敏度高、特异性强的诊断方法先后被建立,其中基于微孢子虫核糖体 RNA 序列的 PCR 及 PCR 衍生技术(如套式 PCR, RFLP 等),原位杂交技术和单克隆抗体(McAb)技术等无疑是应用最广泛的。Docker 等^[24]根据核糖体 RNA 序列设计了一套引物评价了 PCR 技术在检测大麻哈鱼感染 *L. salmonae* 的灵敏性和特异性,发现该技术能检测到相当于一个孢子的 DNA 量的水平,而该引物不能扩增出对照组的微孢子虫 DNA,具有很高的灵敏度和较强的特异性。Georgiadis 等^[28]现场评价了巢式 PCR(Nested PCR)对检测感染 *Nuledospora salmonis* 的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的灵敏性和特异性,发现其灵敏性高达 99.99%,特异性达 99.87%。Lee 等^[25]比较了几种检测方法,发现 ISH 较免疫组织化学和荧光染色都要灵敏的多,表现在 ISH 检测到前孢子期要比后两者要早几周。Pompoit Castillon 等^[29]论证了单克隆抗体对于鱼类微孢子虫诊断的作用。但应该清楚的看到这些检测方法目前大部分还停留在实验阶段,当务之急,应该尽快将这些方法应用到生产实践中去。

3.2 预防与治疗

长期以来人们对如何有效防治鱼类微孢子虫病做了积极的探讨。先后建立了香鱼(*Plecoglossus altivelis*)和虹鳟两个实验模型。由于微孢子虫与黏孢子虫一样,成熟孢子具有一层坚韧的几丁质外壳,至今尚未筛选出能杀灭它的有效药物,所以一旦形成孢子,要控制其危害将是非常困难的。国内外学者普遍认为通过药物或其他手段阻断微孢子虫的传播途径及发育过程以减少异瘤的形成和适宜的养殖管理是控制微孢子虫病的关键^[30]。前者是通过减少微孢子虫病对养殖鱼单位商品价值的影响起作用,后者是为了减少交叉感染,控制其流行而引起爆发性危害。药物治疗方面,研究发现烟曲霉素(Fumagillin)及其类似物^[31-33]、地巴唑(Bendazole)、苯并咪唑(Benzimidazole)及其类似物^[34]、奎宁氢氯化物(Quinine hydrochloride)^[35]、莫能菌素(Monensin)^[36]、消毒剂,如碘液^[37]等都对控制微孢子虫病有一定的作用,表现在用药后异瘤数明显减少,发病时间显著推迟等。但是,这些药物都不能杀死孢子,停药后存活的孢子依然可以感染宿主引起爆发性微孢子虫病。另外,由于微孢子虫的萌发受到很多环境因子的影响,通过改变其萌发条件可以有效控制微孢子虫病的爆发,水温就是其中一个重要影响因子。Beaman 等^[38]发现感染 *L. salmonae* 的虹鳟其异瘤形成有一个温度范围(9—29℃),超出此范围,该病原体发育停止,不再形成异瘤。Takahashi 等^[39]也证实了在感染 *Glugea plecoglossi* 后 10—20d 内,提高养殖水体温度能有效控制微孢子虫病的发生。但对于提高水温控制微孢子虫的原因尚存在争议。Beaman 等发现经过异瘤形成温度范围外的感染鱼当重新回到该温度范围内后获得了抵抗同种微孢子虫再感染的能力(免疫保护力),认为这是由于温度影响了孢子萌发或是抑止了前孢子期的发育,而鱼体在孢子侵入鱼体后就诱导了鱼体产生特异性免疫的结果^[38]。而 Kim 等^[40]认为提高水温防治微孢子虫

的效果是暂时的,因为它并不能诱导保护性免疫,而只是通过提高鱼体的抵抗力(非特异性保护)而起作用的,建议在防治过程中应反复升高温度以达到防治目的。

有效药物的缺乏及环境保护的要求,通过免疫途径防治鱼类微孢子虫无疑是一条出路。普遍认为微孢子虫感染能引起鱼体产生特异性的免疫保护,这为微孢子虫的免疫防治奠定了理论基础。Leiro 等^[41]报道了感染微孢子虫的鱼体的吞噬细胞存在明显的呼吸激增反应(Respiratory burst response)。Kent 等^[42]认为巨嗜细胞吞噬 *L. Salmonae* 孢子后,可能囤积在肾脏,这些孢子在逃避巨嗜细胞溶酶体作用后刺激鱼体产生免疫保护作用。Shaw 等^[43]体外研究了大西洋鲑(*salmon salar*)和大鳞大麻哈鱼前肾巨嗜细胞及其他吞噬细胞对 *L. Salmonae* 孢子的吞噬作用,发现血浆因子作为调理作用因子能明显增强其吞噬作用。Leiro 等^[44]进一步发现血浆中的几丁质降解酶和蛋白降解酶在虹鳟脾脏巨嗜细胞吞噬感染的微孢子虫中起着重要作用,并认为抗体和补体的调理作用也扮演重要角色,并报道了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的脾细胞、前肾吸附细胞对微孢子虫孢子有显著的非特异性免疫反应。Kim 等^[45]发现香鱼头肾巨嗜细胞吞噬 *G. plecoglossi* 孢子是通过凝集素糖蛋白相互作用产生的,当用外原凝集素处理孢子后,吞噬作用显著降低。Hung 等^[46]通过免疫印迹(Immunoblotting)和酶联免疫吸附(ELISA)在感染 *Pleistophora anguillarum* 的成鳗和幼鳗的血清和黏液中均发现特异性抗体,并用亲和层析纯化了该免疫球蛋白(Ig)。Kim 等^[47]在感染 *G. plecoglossi* 的香鱼血清中也发现特异性抗体,但感染强度(以孢囊数计)与抗体水平并不相关,认为鱼体在感染前期已经发生了特异性免疫应答,后期可能是因为严重感染抑制了鱼体的免疫保护力。Sanche 等^[48]报道了用毒力较低的 *L. salmonae* 孢子作为疫苗预防微孢子虫病取得很好的效果。作者在寄生于石斑鱼腹腔一格留虫的自然感染宿主血清中也检出了较高效价的特异性抗体,但与 Kim 等结果一致,感染强度与抗体水平不相关,作者推测体液免疫在抗微孢子虫可能并不起关键作用,而细胞免疫起主导作用(手稿,待发表)。可见,通过免疫途径防治微孢子虫病是可行的,但距实际应用还有很长的一段路程。

4 展望

20 世纪初,鱼类寄生微孢子虫就引起了国内外鱼病学家的高度重视,取得了一些成果,但应该清楚的看到不仅鱼类微孢子虫病远没有得到有效的控制,而且包括病原体的分类位置、生活史、传播方式、寄生虫与寄主相互关系等一些基础问题依然没有得到完全解决,建议今后应加强以下几个方面研究:第一,有关鱼类微孢子虫的系统地位问题的研究。尽管鱼类微孢子虫作为一个独立类群得到大多数人的认同,但是仍有一些问题不能得到很好的解释。如免疫缺陷患者体内一微孢子虫(*Trachipleistophora hominis*)与寄生于鱼类的匹里虫有着十分密切的亲缘关系^[49],寄生于鱼的 *Glugea atherinae* 与艾滋病患者体内的微孢子虫 *Encphalitozoon cuniculi*

存在共同抗原表位等^[50],这就让人怀疑鱼类微孢子虫究竟和寄生于人的微孢子虫存在怎样的系统发育关系或鱼类是否是人类微孢子虫的中间宿主?第二,搞清楚微孢子虫是否存在期特异性抗原、种特异性抗原、循环抗原等问题。这对于利用免疫方法检测微孢子虫、免疫治疗微孢子虫病都是有必要的。第三,升高温度控制微孢子虫病的原因。众所周知成熟孢子对外界环境是极其耐受的,显然升温不能杀死孢子,那么它是通过抑制孢子萌发还是阻断前孢子的发育来控制微孢子虫病的发生,其作用机理又如何呢?结合流行病学研究给出温度控制微孢子虫病时的最佳时期,是运用温度调节成功控制鱼类微孢子虫病的关键。第四,孢子萌发的机制及前孢子的耐受因子的研究。已有研究表明,寄生于人的微孢子虫的孢子萌发是借助孢子内外离子浓度差提供动力的,且萌发前后多氨及总糖等物质浓度变化较大,但鱼类微孢子虫这方面的研究几乎是空白。如果能抑制孢子萌发或阻断前孢子发育过程中某些主要营养物质的代谢,那么治疗鱼类微孢子虫病就指日可待了。第五,现代生物技术在水产微孢子虫研究中的应用。无疑,生物技术的飞速发展鱼类微孢子虫及其病害防治的研究提供了便利。核酸杂交及 PCR 技术的应用将为人们最终搞清楚孢子的体内发育及迁行过程、传播模式等问题,脉冲场凝胶电泳(PAGE)、差减杂交技术为发现致病基因提供了可能,单克隆抗体技术、噬菌体展示技术等的应用将有利于人们寻找主要抗原表位,进而进行特异性疫苗的设计,真正实现鱼类微孢子虫病的免疫防治。

参考文献:

- [1] Desportes Livage I. Human microsporidiosis and AIDS[J]. *Recent advance Parasite*, 1996, 3: 107—113 Sheng Y F, Wang J G. Protozoology [M]. Beijing: Science Press. 1999[沈慧芬,汪建国. 原生动物学[2]. 北京: 科学出版社. 1999]
- [3] Cheng Q L. The study of parasitic protozoan infecting black carp, *Mylopharyngodon piceus*; grass carp, *Ctenopharyngodon idella*; black silver carp, *Aristichthys nobilis* and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* II. Protozoan parasiting black carp, *Mylopharyngodon piceus* [J]. *Acta Hydrobiologica sinica*, 1956, (1): 19—24[陈启鏊. 青、鲢、鳙、鳊等四种家鱼寄生原生动物的研究 II. 寄生青鱼的原生动物. 水生生物集刊, 1956, (1): 19—24]
- [4] Cheng Q L, Xing X R. The study of spora parasiting Taiwan snakehead, *Channa maculata* and northern snakehead, *Channa argus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1960, (2): 171—196, [陈启鏊, 谢杏人. 斑鳢和乌鳢寄生孢子虫的研究. 水生生物集刊, 1960, (2): 171—196]
- [5] He X J. A study on the pleistophorosis of *Priacanthus tayenus*, with description of a new species [J]. *Journal of Fishery of China*, 1982, 6 (2): 97—106[何筱洁. 大眼鲷匹里虫病及其病原体的研究——包括匹里虫一新种的描述. 水产学报, 1982, 6(2): 97—106]
- [6] He X J. A new microsporidian parasiting stone moroko, *Pseudorasbora parva* [J]. *Acta Taxonomy of Zoology*, 1985, 10(3): 234—238[何筱洁. 麦穗鱼微孢子虫一新种(孢子纲:微孢子目). 动物分类学报, 1985, 10(3): 234—238]

- [7] He X J. A study on microsporidiosis of *penaeus pericillatus* [J]. *Tropic Ocean*, (1): 102—105 [何筱洁. 长毛对虾特汉虫病的研究. 热带海洋, (1): 102—105]
- [8] He X J, Cheng M, Zhou X J. Disease of plistophora of european eel, *Anguilla japonica* [J]. *Transactions of Researches of Fish Diseases II*: 94—97. 何筱洁, 陈莹, 周小娟. 鳗鲡四里虫病的研究. 鱼病学研究论文集 II. 94—97. 海洋出版社. 1995]
- [9] Wu H B, Wu Y S, Wu Z H. Occurrence of a new microsporidium in the abdominal cavity of *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Hydrobiologica sinica*, 2004, 28, in press. [吴后波, 吴英松, 吴灶和. 寄生于石斑鱼腹腔一微孢子虫种的描述及分子鉴定 [J]. 水生生物学报, 2004, 28. 待刊]
- [10] Sprague V, Becnel J J, Hazard E I. Taxonomy of phylum microspora [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1992, 18(5/6): 286—395
- [11] Issi I V, Sokolova Y Y, Voronin V N. On the parasitophorous vacuole of microsporidians [J]. *Parazitologiya*, 2001, 35(1): 45—49 (In Russian)
- [12] Bell A S, Aoki T, Yokoyama H. Phylogenetic relationships among microsporidia based on rDNA sequence data, with particular reference to fish infecting *Microsporidium* Balbiani, 1884 species [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2001, 48(3): 258—265
- [13] Nilsen F. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia with particular reference to genera that infect fish [J]. *Journal of Parasitology*, 2000, 86(1): 128—133
- [14] Dunn A M, Judith E. Smith. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission [J]. *Microbs and Infection*, 2001, 3: 381—388
- [15] Kent M L, Hervio, D M L, Docher M F, *et al.* Taxonomy studies and diagnostic tests for myxosporean and microsporidian pathogens of salmonid fishes utilizing ribosomal DNA sequence [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1996, 43(5): 988—998
- [16] Kent M L, Docher M F, Khattra J. *et al.* A new microsporidium. sp. (microsporidia) from the musculature of the mountain white fish *protopium williamsoni* from British Columbia: morphology and phylogeny [J]. *Journal of Parasitology*, 1999, 85(6): 1114—1119
- [17] Pomport Castillon C, Johan F De Jonckheere, Rinestad B. Ribosomal DNA sequences of *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* and *Spraguea lophill* (Microsporidia): phylogenetic reconstruction [J]. *Diseases Aquatic Organisms*, 2000, 40: 125—129
- [18] Leiro J, Siso M I G, Parama A *et al.* RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA for three fish microsporidian species [J]. *Parasitology*, 2000, 120(2): 113—119
- [19] Chery S A, Lafranchi Tristem N J, Bourges D, *et al.* Relationships of microsporidian genera, with particular emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2001, 48(1): 111—117
- [20] Lom J, Dykova I, Wang C H, *et al.* Ultrastructural justification for the transfer of *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1959 to the genus *Heterosporis* Schubert, 1969 [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 43: 225—231
- [21] Banxar Antonio, D. Experimental horizontal transmission of *Enterocytozoon salmonis* to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Journal of protozoology*, 1992, 39(6): 699—702
- [22] Shaw R W, Kent M L, Adamson M L. Models of transmission of *Loma salmonae* (Microsporidia) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 33(2): 151—156
- [23] Sanchez J G, Speare D J, Markham R J F. Nomal and aberrant tissue distribution of *Loma salmonae* (Microspore) within rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following experimental infection at water temperature boundaries [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(4): 235—242
- [24] Docker M F, Devlin R H, Richard J, *et al.* Sensitive and specific polymerase chain reaction assay for detection of *Loma salmonae* (Microspore) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, 29(1): 41—48
- [25] Lee Surr Joung & Hiroshi Yokoyama. *In situ* hybridization for detection of the microsporidian parasite *Glugea pleuroglossi* by using rainbow trout as an experimental infection model [J]. *Fish Pathology*, 2000, 35(2): 79—84
- [26] Wongtawat Chai J, Conrad P A, Hedrick R. P Effect of the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* on the immune response of Chinook salmon [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 48(3): 367—374
- [27] Ieshko E P, Evseeva, AV. Role of parasites in freshwater ecosystems with an example of parasites of the European smelt (*Osmerus eperlanus*) [J]. *Parazitologiya*, 2000, 34(2): 118—124
- [28] Georgiadis M P, Gardner I A, Hedrick R P Field evaluation of sensitivity and specificity of a polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Nudeospora salmonis* in rainbow trout [J]. *Journal of Aquatic Animals Health*, 1998, 10(4): 372—380
- [29] Pomport Castillon C C, Gasc C and Romestand B. Development, characterization and future prospects of monoclonal antibodies against spores of *Glugea atherinae* (protozoan microsporidian fish parasites) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1997, 44(6): 643—648
- [30] Woo P T K. Fish diseases, Disorders [M]. CAB International, Wallingford, 1995
- [31] Kent M L & Dawe S C. Efficacy of fumagillin DCH against experimentally induced *Loma salmonae* (Microspore) infections in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1994, 20: 231—233
- [32] Higgins M J, Kent M L, Moran J D W, *et al.* Efficacy of the fumagillin analog TNP-470 for *Nucleospora salmonis* and *Loma salmonae* infections in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 34: 45—49
- [33] Speare D J, Athanassopoulou F, Daley J, *et al.* A preliminary investigation of alternatives to fumagillin for the treatment of *Loma salmonae* infection in rainbow trout [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1999, 121(3): 241—248
- [34] Schmanhl G & Benini J. Treatment of fish parasites. 11. Effects of different benzimidazole derivatives (alendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. *Parasitology Research*, 1998, 84(1): 41—49
- [35] Speare D J, Ritter G, Schmidt H. Quinine hydrochloride treatment of

- lays xenoma formation and dissolution in rainbow trout challenged with *Loma salmonae* [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1998, **119**: 459—465
- [36] Spear D J, Daley J, Dick P, *et al.* Ionophore mediated inhibition of xenoma expression in trout challenged with *Loma salmonae* (Microsporida) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, **23**: 231—233
- [37] Shaw R W, Kent M L, Adamson M L. Iodophor treatment is not completely efficacious in preventing *Loma salmonae* (Microsporida) transmission in experimentally challenged Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, **22**: 311—313
- [38] Beaman H J & Spear D J. Regulatory effects of water temperature on *Loma salmonae* (Microsporida) development in rainbow trout [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, **46**(5): 237—245
- [39] Takahashi S & Ogawa, K. Efficacy of elevated water temperature treatment of ayu infected with microspidian *Glugea plecoglossi*. *Fish Pathology*, 1997, **32**(4): 195—198
- [40] Kim J H, Ogawa K, Takahashi S, *et al.* Elevated water temperature treatment of ayu infected with *Glugea plecoglossi*: apparent lack of involvement of antibody in the effect of the treatment. *Fish pathology*, 1997, **32**(4): 199—204
- [41] Leiro J, Iglesias R, Parama A, *et al.* Effect of *Tetramira brevifilum* (Microsporida) infection on respiratory burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, **11**(7): 639—652
- [42] Kent M L, Dawe S C, Speare D J. Resistance to reinfection in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* to *Loma salmonae* (Microsporida) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, **37**(3): 205—208
- [43] Shaw R W: Kent M L, Adamson M L. Phagocytosis of *Loma salmonae* (Microsporida) spores in Atlantic salmon (*salmon salar*), a resistant host, and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) a susceptible host [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, **11**(1): 91—100
- [44] Leiro J, Ortega M, Siso M L G, *et al.* Effects of chitinolytic and proteolytic enzymes on *in vitro* phagocytosis of microsporidians by spleen macrophages of turbot, *Scophthalmus Maximus* L [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997, **59**(1/2): 171—180
- [45] Kim J-H, Ogawa K, Wakabayashi H. Lectin reactive components of the microspidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1999. **39**: 59—63
- [46] Hung H W, Lo G F, Tseng G C, *et al.* Humoral immune response of Japanese eel, *Anguilla japonica* Temmink & Schlegel, to *pleistophora anguillarum* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1996, **19**: 243—250
- [47] Kim J-H, Yokoyama H, Ogawa K. *et al.* Humoral immune response of ayu, *plecoglossus altivelis* to *Glugea plecoglossi* (protozoa: Microsporida) [J]. *Fish Pathology*, 1996, **31**(4): 215—220
- [48] Sónche Z J G & Speare D J. Experimental vaccination of rainbow trout against *Loma salmonae* using a live low virulence variant of *L. salmonae* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, **59**(2): 442—448
- [49] Cheny S A, Lafanchi Tristen N J, Canning E U. Phylogenetic relationships of pleistophora like microsporeidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the sources of *Trachipleistophora hominis* infections [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2000, **47**(3): 280—287
- [50] Delhac F, Duffieux F, David D, *et al.* Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporida, with emphasis on extrusion apparatus [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998, **45**(2): 224—231