

鱼立克次氏体的研究进展

林晓婷, 汪 岷

(中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要: 立克次氏体是鱼类及其他水生生物的重要病原之一, 有较高的感染率和死亡率。目前主要采用 Fryer 法和依照《贝格恩细菌分类手册(第二版)》标准的方法对立克次氏体进行分类, 细胞培养法、组织切片技术、PCR、核酸探针及 ELISA 等方法是广泛应用的检测手段, 研究成果表明此种病害主要通过水平和垂直方式进行传播, 而抗立克次氏体疫苗的研制也进入了商品化生产。本研究对该领域的研究成果作一综述, 旨为此种病害的研究提供借鉴及参考。

关键词: 鱼立克次氏体; 立克次氏体; 类立克次氏体

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)06-0807-11

立克次氏体(rickettsia)是一类严格细胞内寄生的原核细胞型微生物, 在形态结构、化学组成及代谢方式等方面均与细菌类似: 具有细胞壁, 以二分裂方式繁殖, 含有 RNA 和 DNA 两种核酸, 由于酶系不完整所以需在活细胞内寄生, 并对多种抗生素敏感等。自从鲑鱼立克次氏体(*Piscirickettsia salmonis*)第一个被确定为鱼类病原以来^[1], 鱼立克次氏体病及其综合症已经遍布 20 几个国家和地区, 感染十几种经济鱼种, 包括英属哥伦比亚养殖细鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus gorbuscha*)、银鲑鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[2], 加拿大养殖银鲑鱼、大鳞大麻哈鱼、挪威养殖的大西洋鲑(*Salmo salar*)^[3]以及中国台湾省养殖的石斑鱼(*Epinephelus melanostigma*)^[4]和罗非鱼(*Oreochromis nilotica*)^[5]等, 其死亡率最高可达 90%^[6]。立克次氏体或类立克次氏体(Rickettsia-like organisms, RLOs)也可感染其他海水和淡水生物, 如美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、软壳蛤(*Mya arenaria*)^[7]、紫贻贝(*Mytilus edulis*)^[8]、砗磲(*Tridacna gigas*)^[9]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[10]、牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)^[11]等。由立克次氏体引起的多种经济鱼类和贝类流行性病害, 已严重威胁到水产养殖业并已造成

巨大的经济损失。由于目前尚缺乏控制此类病害的有效药物和方法, 使鱼立克次氏体宿主范围和地理分布呈扩大态势。因此对鱼立克次氏体的深入了解和研究, 将有助于鱼抗立克次氏体疫苗的研制及建立准确高效的检测方法, 控制此类病害的流行。本研究旨为鱼立克次氏体的探索和研究提供借鉴和参考依据。

1 鱼立克次氏体病的发现

关于寄生在鱼体内的类立克次氏体的报道最早见于 1939 年^[12]。1975 年, Ozel 和 Schwanz Pfitzner^[13]研究虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)出血性败血症病毒(*Egtved virus*)时, 在 RTG-2 细胞系(虹鳟性腺细胞系)中检测到病毒的同时发现类立克次氏体。由于当时未能保存这种类立克次氏体, 因此没有确定它的致病性以及分类学地位。此后一直没有关于鱼立克次氏体的报道, 直到 1989 年, Fryer 等^[14]从大鳞大麻哈鱼的胚胎细胞系——CHSE-214 中分离到一种立克次氏体, 并且证明其为智利养殖银鲑鱼的一种流行病的病原, 并于 1992 年将其命名为鲑鱼立克次氏体。

中国也已出现了有关鱼类感染立克次氏体的报道。1992 年, 中国台湾省养殖罗非鱼感染了立克次

收稿日期: 2004-07-02; 修订日期: 2004-12-20.

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划项目(2001AA628020); 山东省自然科学基金(Y2001D10); 高等学校骨干教师资助计划项目。

作者简介: 林晓婷(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 病毒学. E-mail: lxting@163.com

通讯作者: 汪 岷. E-mail: wangmin30@hotmail.com

氏体^[5], 1995年姜明等^[15]在患真鲷(*Pagrosomus major*)病毒病的病鱼肠上皮组织中检测出类立克次氏体。2000年, Chen等^[4]报道了中国台湾养殖的石斑鱼感染了类立克次氏体。这种高致死率的病害

已使中国的海水及淡水养殖业遭受了巨大损失。目前世界许多国家和地区都已发现寄生在鱼体内的立克次氏体(表1)。

表1 鱼类体内检测或分离到的立克次氏体及类立克次氏体样微生物

Tab 1 *Rickettsia* and rickettsia-like organisms observed in and/or isolated from fish

种类 Species	地理区域 Geographical Region	年代 Year	海水/淡水 Salt/Fresh Water	分离/检测 Isolated/Observed
尼罗罗非鱼 <i>Tetraodon lineatus</i>	埃及	1939	淡水	检测 ^[6]
大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus shaw ytscha</i>	太平洋海岸	1992	海水	检测 ^[16]
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	德国	1993	海水	检测(Ozel and Schwanz Pfitzner)
	欧洲其他地区	1995	淡水	分离 ^[17]
	智利	1996	海水	分离 ^[1]
银鲑鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	智利	1990	海水	分离 ^[18]
	智利	1995	淡水	分离 ^[17]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	智利	1992	淡水	检测 ^[2]
	爱尔兰	1997	海水	检测 ^[19]
	挪威	1997	海水	检测 ^[20]
	加拿大	1998	海水	分离 ^[21]
尼罗罗非鱼 <i>Nilotica</i>	日本	1994	淡水	检测 ^[22]
罗非鱼 <i>Oreochromis nilotica</i>	中国	1994	淡水、海水	检测 ^[5]
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	法国	1996	海水	检测 ^[23]
	美国	1999	海水	检测 ^[23]
	希腊	1999	海水	检测 ^[24]
石斑鱼 <i>Epinephelus melanostigma</i>	中国台湾	2000	海水	检测 ^[4]
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	中国	1995	海水	检测 ^[15]
蓝眼隆头鲷 <i>Panaque suttoni</i>	哥伦比亚	1995	淡水	检测 ^[25]

2 鱼立克次氏体的分类

立克次氏体目(Rickettsiales)下分3个科,即立克次氏体科(Rickettsiaceae)、巴尔通氏体科(Bartonellaceae)和无形体科(Anaplasmataceae)。立克次氏体的分类学地位目前有两种不同的观点,并被同时采用,其分类学地位尚未最终确立。

2.1 Fryer J L 分类^[1]

1997年, Fryer等^[1]根据鲑鱼立克次氏体典型株 LF-89(美国菌种中心 ATCC 编号为 VR1361)在形态学、严格细胞内寄生以及基因序列的分析(图1),将其定为立克次氏体目下的新种类即立克次氏体科(Rickettsiaceae)(表2)。美国菌种中心也将鲑鱼立克次氏体归入立克次氏体科。

Fryer等^[1]对分别来自智利、英属哥伦比亚、加拿大以及挪威的银鲑鱼和虹鳟鱼、大西洋鲑的5种鱼立克次氏体分离株进行研究,发现它们在形态学上很接近,都可以与 LF-89 的多克隆抗体发生反应。利用特定单克隆抗体将这些分离株区别出来,通过 PCR 技术来测定这五种分离株的 16S 编码核糖体 DNA(rDNA),以此说明这一种群的基因的可变性和种群的复杂性。得到的结论是鱼立克次氏体与埃里希氏体(*Ehrlichia Rickettsia*)或者新立克次氏体属(*Neoricettsia*)有紧密关系(图1)。其中鱼立克次氏体,埃里希氏体属(*Ehrlichia*)和立克次氏体属(*Rickettsia*)相似度接近 80%;鱼立克次氏体、考克斯氏体属(*Coxiella*)以及沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)之间相似度为 86%~88%。

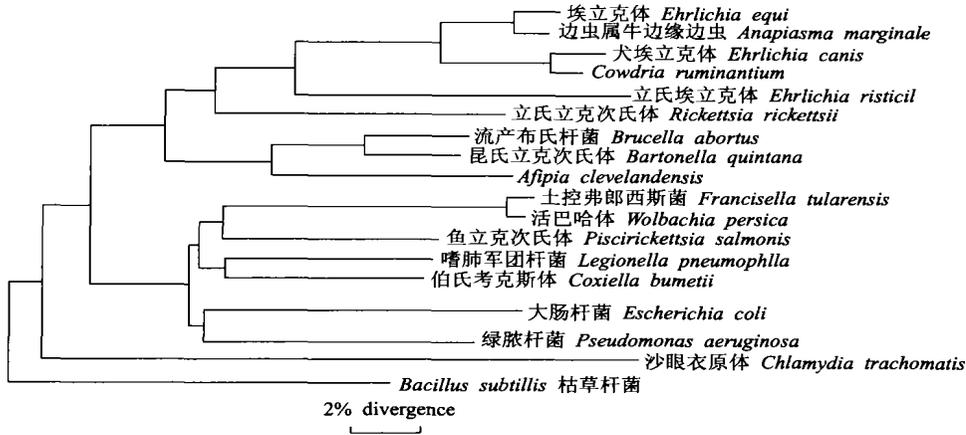


图 1 鲑鱼立克次氏体与经选择的立克次氏体和细菌系统发生学关系图^[1]

注: 进化距离的计算是根据 Jukes 和 Cantor 提供的方法, 并且忽略掉模糊的地域和不确定的同体异形关系, 比较 16S rDNA 基因上 1313 个位置而得出。

Fig. 1 Phylogenetic relationships of *Piscirickettsia salmonis*, selected rickettsiae and bacteria^[1]

Note: Evolutionary distances were calculated by the method of Jukes and Cantor. After eliminating regions of ambiguity and uncertain homology, 1 313 positions of the 16S rDNA gene were compared.

表 2 立克次氏体目分类表

Tab 2 Taxon of Order Rickettsiales

科 Family	族 Tribus	属 Genus	代表种类 Representative species	
立克次氏体科 (Rickettsiaceae)	立克次氏体族 Rickettsieae	立克次氏体属 <i>Rickettsia</i>	普氏立克次氏体	
		罗克利马氏体菌属 <i>Rochalimeae</i>	五日热罗克利马氏体菌	
		考克斯氏体属 <i>Coxiella</i>	伯氏考克斯氏体	
	埃里希氏体族 Ehrlichieae	埃里希氏体属 <i>Ehrlichia</i>	犬埃里希氏体	
		考得里氏体属 <i>Cowdria</i>	反刍类考得里氏体	
		新立克次氏体属 <i>Neorickettsia</i>	蠕虫立克次氏体属	
	沃尔巴克氏体族 Wolbachieae	沃尔巴克氏体属 <i>Wolbachia</i>	尖音库蚊沃尔巴克氏体	
		共生小体属 <i>Symbiotes</i>	臭虫共生小体	
		蟑螂杆状体属 <i>Blattabacterium</i>	丘氏蟑螂杆状体	
		立克次氏小体属 <i>Rickettsiella</i>	日本甲虫立克次氏小体	
	鱼立克次氏体科	暂未定	暂未定	鱼立克次氏体
	巴尔通氏体科 Bartonellaceae		巴尔通氏体属 <i>Bartonella</i>	杆状巴尔通氏体
格拉汉氏体属 <i>Gahamella</i>			鼯格拉汉氏体	
无形体科 Anaplasmataceae		无形体属 <i>Anaplasma</i>	边缘无形体	
		类无形体属 <i>Paranaplasma</i>	尾类无形体	
		埃及小体属 <i>Aegyptianella</i>	雏埃及小体	
		血巴通氏体属 <i>Haemobartonella</i>	鼠巴通氏体	
		血虫体属 <i>Eperythrozoon</i>	类球状血虫体	

分析这几个隔离株的内部转录区(ITS)和23S rDNA,以便进一步阐明这一物种的遗传可变性:在这些区域中没有包含tRNA基因,这些ITS序列长度大约为311 bp,且在不同隔离株中是不同的(相似度95.3%~99.7%)。其中只有一个ITS序列是这几个隔离株所共有的,说明其中有一个rRNA操纵子的存在。这一发现与其他属缓慢生长的生物体相一致。这些隔离株的23S rDNA基因,长度接近1900 bp,相似度97.9%~99.8%。5株隔离株的其中3株,即智利与挪威和加拿大的隔离株有着较为紧密的关系——ITS的相似度为99.1%~99.7%,rDNA的相似度为97.6%~98.5%。

2.2 《贝格恩细菌分类手册(第二版)》分类^[26]

根据最近的鲑鱼立克次氏体的16S rRNA序列的相似性研究^[24],《贝格恩细菌分类手册(第二版)》将鲑鱼立克次氏体定位于细菌界(Bacteria),变形细菌门(Proteobacteria),丙型变形细菌纲(Gammaproteobacteria),Thiotrichale目中一个新的科——鱼立克次氏体科(Piscirickettsiaceae)(表3)。这种分类方法被很多数据库采用,并且已被NCBI收录。相比较甲型变形细菌纲(Alphaproteobacteria)的立克次氏体(*Rickettsia*)属和埃里希氏体属(*Ehrlichia*),它的分类位置与丙型变形细菌纲(Gammaproteobacteria)的弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)、军团菌属(*Legionella*)和柯克斯氏体属(*Coxiella*)更加接近^[1]。

表3 鱼立克次氏体分类学地位

Tab 3 Taxonomic position of *Piscirickettsia*

纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
甲型变形细菌纲 Alphaproteobacteria	立克次氏体目 Rickettsiae	立克次氏体科 Rickettsiaceae	立克次氏体属 <i>Rickettsia</i> 埃里希氏体属 <i>Ehrlichia</i> 鱼立克次氏体 <i>Piscirickettsia</i>
丙型变形细菌纲 Gammaproteobacteria	(暂缺中文译名) Thiotrichales	鱼立克次氏体科 Piscirickettsiaceae	弗朗西斯氏菌属 <i>Francisella</i> 军团菌属 <i>Legionella</i> 柯克斯氏体属 <i>Coxiella</i>

3 分子生物学研究

NCBI及EMBI数据库中收录了关于鱼立克次氏体的核酸和蛋白方面的多项数据——62种核酸序列、7种蛋白质氨基酸顺序,但目前未见有关鱼立克次氏体的全基因组序列的报道。

多数鱼立克次氏体隔离株如LF-89、EM-90、NOR-92以及野生型IAFDn7、IAFDn28、IAFDn39等的16S rRNA和23S rRNA的核酸序列已经得出。1999年,Mauel^[24]等测得隔离株LF-89的16S rRNA、内部转录区、23S rRNA的核酸序列,以此对鱼立克次氏体进行系统学发生分析。1999年,Casanova等(尚未发表)测得了隔离株LF-89的16S rRNA、23S rRNA的部分序列和tRNA-Ile、tRNA-Ala基因的完整序列。其中Casanova测得的16S rRNA的部分序列比由Mauel测得的少103个碱

基,而23S rRNA部分序列少430个碱基。1999年,Kuzyk等(尚未发表)得出隔离株LF-89的丙氨酸消旋酶alr、抗原ChapS、ospA、BAX蛋白、移位酶tnpA和DNA修复酶RadA的完整序列。另外,所得的这些核酸序列中大多数是由分析鲑鱼立克次氏体而得出的,只有两个16S/23S rRNA基因间隔区序列是由Marshall和Heath等^[27]分析来源于虹鳟鱼的隔离株C3、R8而得到的。

在蛋白质水平上,1999年Kuzyk等(尚未发表)测出BAX蛋白、抗原ospA、移位酶tnpA、DNA修复酶的氨基酸顺序及功能,并且又在2003年测得丙氨酸消旋酶的氨基酸顺序及功能。

目前对鱼立克次氏体分子方面的研究虽然得到了少数基因的核酸序列,但其全基因组序列还未测出,许多基因的功能及其基因产物之间的相互作用还有待进一步研究。

4 流行病学研究

4.1 目前已报道的病例

4.1.1 鲑鱼立克次氏体性败血症 (Salmonid Rickettsial Septicaemia, SRS) 最早是在海水银鲑鱼中发现 SRS^[14, 28] 的, 随后其他海水及淡水养殖的鲑鱼种类也出现了 SRS, 如大鳞大麻哈鱼、虹鳟鱼和大西洋鲑等^[25, 29] 1), 2)。发病的地区有智利、英属哥伦比亚、加拿大、挪威和爱尔兰等国家。

病鱼症状为不活跃、厌食、身体呈黑色、有腹水, 鳃丝发白, 发病后很快死亡者在外形上完全正常。组织病理观察, 病鱼的鳃有多重上皮增生现象, 增生组织伴有轻微的坏死, 上皮增生导致鳃的片状融合; 身体皮肤有受损和出血现象, 伤口为溃疡状, 直径 0.5~2 cm, 皮肤损伤说明真皮和表皮组织的坏死, 真皮下的肌肉组织因病变而退化。大多数感染鱼的内脏也有病理变化, 主要表现在肠、肾、肝和脾等器官上有弥漫性的发炎和坏死, 肝上特别是在靠近血管的部位有独特的弹坑状的损伤^[5]; 在巨噬细胞和其他感染细胞的细胞质内可以观察到立克次氏体; 肠组织已严重坏死, 上皮细胞脱落; 炎症细胞已侵入脾脏和肾脏, 造血组织坏死并有浮肿和纤维化; 在血管组织上还出现了坏死血栓症。病鱼体内巨噬细胞增大, 并且内部含有鲑鱼立克次氏体, 组织碎片也普遍增多; 血细胞比容值低(25% 或者更低)。

另外, 智利 Gaggero 等^[17] 从淡水患病银鲑鱼和虹鳟鱼体内分离出类似于鲑鱼立克次氏体的类立克次氏体。这类类立克次氏体比鲑鱼立克次氏体小, 它的直径为 0.2~0.8 μm (鲑鱼立克次氏体的直径 0.5~1.5 μm), 形状上类似球状菌。它在鱼的脾和肾脏细胞内寄生, 并且不与鲑鱼立克次氏体的多克隆抗体发生反应。这些类立克次氏体的分类学地位还需要进一步的研究。

4.1.2 罗非鱼类立克次氏体综合症 1992 年开始, 中国台湾省海、淡水养殖的 6 种罗非鱼感染了一

种地方性的传染病^[5], 其死亡率平均在 30% 左右, 在疾病严重爆发时大于 75%, 有 37 个渔场养殖罗非鱼死亡率上升到了 95%。患病的罗非鱼, 鱼体变黑、消瘦、有不正常的游泳姿态, 皮肤上有损伤并且眼球突出。在病鱼的体内, 脾脏肿大, 大部分内脏上会出现一些分散状的白色结节。Chern 和 Chao^[5] 利用鲤鱼上皮瘤细胞系 (EPC) 和罗非鱼卵巢细胞系 (Tilapia ovary cell lines, T O₂) 分离了一种类鱼立克次氏体的微生物 (Piscirickettsia-like organisms, PLOs), 并通过人工感染实验证明此类微生物为这种病的病原。他们发现这种立克次氏体在 15 °C 的致死率要高于 30 °C 时。这类病原可以使细胞发生病变 (Cytopathic effect, CPE), 它的生长滴度为 10⁶~10⁷ TCID₅₀·mL⁻¹。通过电镜在细胞内桑椹状的包涵体中可以观察到这类病原。实验表明这类疾病是水平传播的。

感染 PLOs 的夏威夷罗非鱼的症状与台湾患病罗非鱼相似: 鳃呈现上皮增生, 脾脏、肾脏都出现病变, 但由鲑鱼立克次氏体引起的肝脏所特有的弹坑状损伤却没有检测到。利用 MaueI 等^[30] 改良过的鲑鱼立克次氏体特异性的 PCR 扩增条件对这些病变组织进行 PCR 扩增, 没有出现扩增产物; 用 Larnan 等^[31] 改良过的鲑鱼立克次氏体特异性荧光抗体对病鱼进行检测, 也没有发生荧光反应, 表明夏威夷罗非鱼体内的 PLOs 与鲑鱼立克次氏体具不同的表面抗原; 仅从上述结果还不能确定它是鱼立克次氏体新的种类还是鲑鱼立克次氏体的抗原性发生了变异。

4.1.3 鲈鱼类立克次氏体病 1996 年, 在法国东南部, Comps 等^[23] 在半死状态的养殖黑鲈的幼鱼脑中发现了 PLOs。病鱼的死亡率为 20%, 具有反常的游泳姿态, 并在水中不停打转, 脑部神经组织已经坏死。

1999 年, Athanassopoulou 等^[3] 报道, 希腊一种黑鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 也出现了 PLOs 感染, 病

1) Chen M F, Apperson J A, Gunther T, et al. Isolation and partial characterization of a rickettsia associated with largescale mortality of cultured white seabass (*Atractoscion nobilis*) in California [A]. Proceedings of the AFS/Fish Health Section Annual Meeting and Western Fish Disease Workshop, Twin Falls, Idaho, June 9- 11, 1999 (Abstract).

2) Cusack R, Groman D, Jones S. The first reported rickettsial infections of Atlantic salmon in eastern North America [A]. Proceedings of the European Association of Fish Pathologists VIIIth International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Edinburgh, Scotland, September 14- 19, 1997 (Abstract).

3) Athanassopoulou F, Sabatakou O, Groman D, et al. First incidence of rickettsia-like infections in cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Greece [A]. Proceedings of the Ninth International Conference, European Association of Fish Pathologist, Rhodes, Greece, September 19- 14, 1999 (Poster Abstract).

鱼游泳姿态古怪、毫无生气,在寒冷月份死亡率高达80%。从病鱼分离出的病原体在形态上类似鲑鱼立克次氏体。经检测发现其脑中神经组织已经坏死,病鱼的大脑膜、眼睛的视网膜、邻近的皮下组织、外皮组织和嗅觉神经上也出现病变。

1999年,Chen等^[1]报道了一个PLOs分离株,它分离自美国加利福尼亚东南部高死亡率的养殖白鲈体内。这些病鱼肾脏肿大,其中一部分病鱼的脾脏有焦点状的脓泡,肝脏变色。利用间接荧光抗体测试(IFAT)来检测这一分离株,发现它不与抗鲑鱼立克次氏体的多克隆抗体发生反应;并且在IFAT实验中,感染了鲑鱼立克次氏体的细胞与抗白鲈PLOs的兔血清也不发生强烈反应。

法国养殖黑鲈和美国养殖白鲈所感染的类立克次氏体虽然在形态上类似鲑鱼立克次氏体,但它们引起的病变却分别出现在鲈鱼的不同组织上,如黑鲈的脑和白鲈的肾脏,并且它们与鲑鱼立克次氏体抗体的血清学反应也不同。目前,尚不能确定它们是否为不同的PLOs。

4.1.4 石斑鱼类立克次氏体病 2000年,Chen等^[4]报道在中国台湾省养殖的石斑鱼感染了PLOs。其症状为:处于半死状态的鱼体表有黑色的损伤,除很容易就被捕捉到之外没有其他的反常行为;鱼体内,内脏大范围充血,脾脏、肾脏和肝脏出现坏死,脾脏肿大并有白色结节;在各个器官都可以观察到血管的血栓性损伤,造血组织有慢性弥漫性的炎症;血液呈水状并且变稀薄;血液、肾脏、脾脏、肝脏和鳃的感染细胞有变大的空泡和大量多形态、嗜碱性的细胞器;在脾脏、肾脏和肝脏中检测到PLOs;在坏死细胞和巨噬细胞中也检测到了PLOs。

Chen等^[4]进行人工回染实验,每尾试验鱼注射100 μL病鱼肾组织匀浆上清液,14 d后试验鱼出现了类似症状。将从病鱼体内分离到的PLOs接种到CHSE-214细胞中后能够观察到CPE,而且在接种4 d后可以在CHSE-214细胞的细胞质空泡中观察到PLOs。这种PLOs对脂头鲷细胞系(Fathead minnow cell lines, FHM),蓝鳃太阳鱼细胞系(Bluegill fry-2 cell lines, BF-2),牙鲆鳃细胞系(Flounder gill cell lines, FG)和罗非鱼卵巢细胞系(Tilapia ovary cell lines, TO2)等细胞系不敏感。患病石斑鱼的鳃组织和肾组织的巨噬细胞中的PLOs可以与鲑鱼立克次氏体的单克隆抗体发生阳性反

应^[17]。他们认为这种病原与PLOs类似。

4.1.5 真鲷类立克次氏体病 1995年,姜明等^[15]在患真鲷病毒病的病鱼肠上皮组织中检测出一种大量寄生于肠上皮组织微绒毛的原核样生物,并暂定其为真鲷类立克次氏体(*Pagrosomus major* Rickettsia-like organism, PMRLO)。患病鱼主要为体长9~12 cm的真鲷幼体,症状表现为游泳无方向性,身体侧翻,严重者腹部上翻且腹胀,眼睛微突,腹部及体侧表皮下有分布不均的细小出血点。在鱼体内部,前肠、中肠和后肠呈现严重的水肿及空肠状态。用透射电镜对其中肠和后肠上皮组织进行超微结构观察,发现在上皮细胞的细胞质和微绒毛中存在大量类立克次氏体样原核生物及其发生基质^[32]。这些类立克次氏体是造成肠上皮组织病变的主要病原体,在细胞质中主要以包涵体及长棒状、哑铃等形态存在。并且这种病原体只感染肠上皮组织细胞,其他组织器官未见感染。类立克次氏体感染是构成真鲷病害发生乃至流行的重要致病病原体。

4.2 传播方式

鱼立克次氏体病在自然界中的传播模式是水平的还是垂直的、是否通过载体,目前尚无定论。陆地上立克次氏体的传播均需要一个中间的宿主或者是载体,蒲纳氏科克斯氏菌(*Coxiella burnetii*)例外,可在没有宿主和载体时通过产生孢子阶段对其自身起到保护作用。迄今为止还没有检测到鲑鱼立克次氏体有孢子阶段,分析其原因可能是水中的鲑鱼立克次氏体不需要宿主或孢子阶段来维持其生存和传播。在海水中的鲑鱼立克次氏体可能有足够长的细胞外存活时间使它进行水平传播时不需要载体参与,但是在淡水中,除非鲑鱼立克次氏体有宿主细胞膜或组织分泌液的保护,否则是不可能出现水平传播的。

对鱼立克次氏体传播途径的研究较少,使得目前对其传播方式的认知仍较混乱。Garces等^[33]认为,在池塘内注射了鱼立克次氏体病原而致死的银鲑鱼和其他没有注射病原的鲑鱼之间是没有水平传播的。Cvitanich等^[34]报道,在不流动的淡水和海水低密度养殖的银鲑鱼中,注射和没有注射病原的个体之间存在水平传播。结论不同的原因可能是因为两套实验的实验条件不同,前者平均水温为10.5℃,且为流水,而后的平均水温为15℃,为不流动的水环境。但是这两个研究结果说明,在一定的环境下鱼立克次氏体病的水平传播还是有可能发生的。

因此保持养殖水体的流动性及良好的水质, 一定程度上可以控制疾病的传播。

2003 年, Larenas 等^[16] 在研究鲑鱼立克次氏体病的垂直传播时发现, 将感染和没有感染鲑鱼立克次氏体的雌雄虹鳟鱼混合养殖, 一段时间后通过间接免疫荧光技术可以在鱼的精液中检测到鲑鱼立克次氏体; 这些虹鳟鱼所繁殖的后代中没有表现出鲑鱼立克次氏体病的症状, 但在那些父母本一方或双方都感染了鲑鱼立克次氏体的幼鱼体内可以检测到病原; 用含鲑鱼立克次氏体培养基的上清液感染雌性虹鳟, 其受精卵孵化出的后代体内同样检测到了鲑鱼立克次氏体, 说明此种疾病在受精过程中也可以进行传播。

有关鱼立克次氏体的来源、健康的病原携带者监测以及疾病的传播方式仍是急需解决的重要问题。

5 检测和鉴定

5.1 细胞培养分离

对易感的鱼类细胞进行病原接种和观察是检测鲑鱼立克次氏体较为灵敏的方法^[1]。常使用的易感细胞系见表 4, 其中 CHSE-214 是最普遍采用的细胞系, 培养温度一般为 17 °C, 在接种后 7~12 d 左右细胞单层出现病变 (CPE) 的范围可达到 80% 以上, 用透射电镜对病原检测鉴定。

表 4 鲑鱼立克次氏体及 PLOs 的易感细胞系

Tab 4 Susceptible fish cell lines for detecting *P. salmonis* and PLOs

宿主 Host	立克次氏体 Rickettsia	细胞系 Cell lines	最适培养温度/ °C Optimum culture temperature
鲑鱼 ^[2, 17] Salmon	<i>P. salmonis</i>	大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系 (Chinook salmon embryo cell lines, CHSE-214)	15-18
		虹鳟鱼生殖腺细胞系 (Rainbow trout gonad cell line, RTG-2)	
		蓝鳃太阳鱼细胞系 (Bluegill fry-2, BF-2)	
罗非鱼 ^[5] Tilapia	PLOs	大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系 (Chinook salmon embryo cell lines, CHSE-214)	15-20
		鲤鱼上皮瘤细胞系 (Epithelioma papulosum cyprini cell lines, EPC)	
		罗非鱼卵巢细胞系 (Tilapia ovary cell lines, TO ₂)	
白鲈 ^[23] Sea bass	WSPSLO	大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系 (Chinook salmon embryo cell lines, CHSE-214)	15-20
		白鲈肾细胞系 (White Seabass kidney cell lines, WSBK)	
石斑鱼 ^[4] Grouper	PLOs	大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系 (Chinook salmon embryo cell lines, CHSE-214)	15-22

5.2 组织切片

利用细胞分离检测时, 所有鱼立克次氏体隔离株必须在无抗生素的培养基中或是仅含青霉素的培养基中培养, 诊断样本的收集也必须是在一个无菌的环境内, 因此, 鱼立克次氏体的初步鉴定多采用革兰氏染色、吉姆萨染色、亚甲基蓝染色、吡啶橙染色等方法。用 Bouin 氏液和 Davidson's 液等组织固定液固定病鱼病变组织, 利用组织切片法观察病鱼组织的病理变化。

5.3 PCR 检测

随着对鱼立克次氏体分子生物学的深入, PCR 技术已成为鱼立克次氏体病检测方法之一。普遍采用常规 PCR 技术和巢式 PCR 技术来进行检测。PCR 引物通常是依据鱼立克次氏体的核糖体操纵子 23S rRNA 基因序列和 ITS (内部转录区) 序列来进行设计的(图 2)^[26]。

由美国鱼类暨野生动物管理局编纂的《水生动物健康检查标准程序》中所提供的常规用于鱼立克

次氏体 PCR 检测的引物^[35]是根据鱼立克次氏体的核糖体操纵子 23S rRNA 基因序列设计的, 序列为:
引物 1: PS2S(223F) 5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCG-GCG-TTG-3'

引物 2: PS2AS(690R) 5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3'

Mauel^[30]等利用巢式 PCR 技术来检测鲑鱼立克次氏体基因组 DNA。他们采用的外部引物为:

引物 1: EubA 5'-AAG-GAG-ATG-ATG-CAN-CCR-CA-3'

引物 2: EubB 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTG-AG-3'

内部引物为:

引物 1: PS2S(223F) 5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCG-GCG-TTG-3'

引物 2: PS2AS(690R) 5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3'

巢式 PCR 比常规 PCR 精确度高。利用巢式 PCR 技术可以检测到少于一个鲑鱼立克次氏体组织培养感染量 $50 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的病原, 而普通 PCR 技术只可以检测到感染量大于 $60 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的病原。

1998 年, Marshall 等^[27]以鲑鱼立克次氏体的核糖体操纵子 16S~23S rDNA 的 ITS 区域序列来设计引物。其采用的引物为:

引物 1: 59-TGATTTTATTGTTTACTGAGAAT-GA-39; F-223

引物 2: 59-AAATAACCCTAAATTAATCAAGGA-39; R-266

引物 4: 59-ATGCACTTATTCACCTTGATCATA-39; R-459

他们的研究结果显示, 由引物 1 和引物 4 组成引物对来进行 PCR 扩增比引物 1 和引物 2 配对进行扩增的效果要好, 精确度可以达到每 $20 \mu\text{L}$ 血清检测到大约 10~100 个的鲑鱼立克次氏体个体。较先前采用的 1 步 PCR 扩增灵敏度高。

2000 年, Heath 等^[36]利用实时荧光定量 PCR 技术 (competitive PCR assay)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis)、恒变性剂凝胶电泳 (CDGE, constant denaturant gel electrophoresis) 来检测鲑鱼立克次氏体。利用实时荧光定量 PCR 技术可以检测含鲑鱼立克次氏体 DNA 较少的样品, 如样品中的 DNA 99.9% 来自鲑

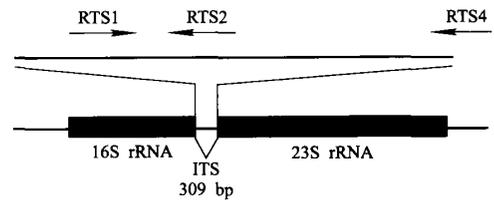


图 2 真核生物核糖体操纵子及用于鲑鱼立克次氏体 ITS 区域 PCR 扩增的引物对 RTS1-RTS2、RTS3-RTS4 位置图^[26]

注: 绘制的比例是基于鲑鱼立克次氏体 LF-89 的 ITS 序列(引物 RTS4 的 5' 末端的第 18 个核苷酸定位于 23S rRNA 基因的开始), rRNA 基因是 *E. coli* rRNA 操纵子作为比例来绘制的。

Fig. 2 Map of prokaryotic ribosomal operon and positions of primer pairs RTS1-RTS2 and RTS3-RTS4 for amplification by PCR of the *P. salmonis* ITS^[26]

Note: The map is drawn to scale for the ITS section based on the *P. salmonis* LF-89 ITS sequence (the first 18 nucleotides at the 59 end of primer RTS4 are located at the beginning of the 23S rRNA gene). The rRNA genes are drawn to a different scale, and the lengths are based on the lengths of these genes in the *E. coli* rRNA operon.

鱼, 利用荧光定量 PCR 可以检测到其中 1~10 个鲑鱼立克次氏体基因组。运用此项技术检测到患病的鲑鱼脑组织里也存在着鲑鱼立克次氏体, 说明脑组织也可能是鲑鱼立克次氏体的寄生部位, 但是脑组织中的病原含量仅为肝和肾脏含量的 1/100, 而这么低的含量利用以前的 PCR 技术是不容易检测到的。

PCR 技术具有高度的特异性和灵敏性, 虽然检测费用相对较高, 但仍是鲑鱼立克次氏体重要的检测方法。

5.4 核酸探针检测

目前尚未见利用探针来诊断鱼立克次氏体病的报道, 但核酸探针应是鱼类立克次氏体检测的重要方法。1989 年, Kenneth 等^[37]采用 16S rRNA 的核酸序列来设计探针, 通过反转录合成 cDNA, 用放射性同位素 P^{32} 等来进行标记。使用探针技术至少可以检测到 8 ng 来自立克次氏体 RNA, 并且不会与其他细菌的 RNA 发生杂交反应。这种探针设计方法对鱼立克次氏体同样适用。探针的使用可以使鱼立克次氏体病检测的速度和精确性都得到很大的提高。

5.5 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 及其他免疫学检测

2001年, Jamett等^[38]通过杂交瘤细胞技术制备了针对鲑鱼立克次氏体的单克隆抗体, 利用Western Blot筛选出IgG的6种不同的同体异形——7G4、2C1、6E2、8F5、7E5以及8B4, 建立了ELISA技术来检测鲑鱼立克次氏体。这六种抗体可以与鲑鱼立克次氏体发生反应却不与CHSE-214细胞和其他的鲑鱼病原发生免疫交叉反应。单克隆抗体相对于多克隆抗体有更强的特异性, 也不会与其他细菌抗原发生交叉反应, 并且无论是取材新鲜的样品或4℃保存6个月甚至更长时间的样品同样可以用单克隆抗体检测。

另外还可以利用其他免疫学方法——免疫荧光^[26]和免疫组织化学^[39], 来进行立克次氏体检测和鉴定。间接免疫荧光检测(IFAT)通常是用异硫氰酸(FITC)作为荧光素标记兔抗鲑鱼立克次氏体抗体, 用山羊抗鼠的抗体IgG作为二抗, 通过抗原抗体反应, 在特定条件下, 细胞内的鲑鱼立克次氏体会产生荧光反应, 得到较好的检测结果。

虽然目前已有多种检测方法对鲑鱼立克次氏体进行诊断, 但检测方法的特异性和敏感性仍有待于进一步提高。快速准确的诊断方法, 将有效控制鱼立克次氏体病的传播, 因此, 检测方法的研究也将是今后的研究重点之一。

6 疾病的防治

鲑鱼立克次氏体对链霉素、庆大霉素、土霉素、富美隆TM、恶喹酸、沙拉沙星、克拉霉素敏感; 对青霉素、林肯霉素有抗性^[35, 40]。目前采用鱼类口服抗生素治疗鲑鱼立克次氏体病, 效果不是很好。如每条试验鱼口服剂量为30~50 mg/kg的土霉素虽然可以降低感染PLOs后的死亡率, 但却不能达到最理想的效果^[5], 原因可能是抗生素在宿主细胞内不能达到有效的浓度, 不能阻止鲑鱼立克次氏体的复制; 也可能是因为鲑鱼立克次氏体对抗生素出现抗性或者是海水中阳离子对抗生素有抑制作用。因此自20世纪90年代以来, 患鱼立克次氏体病的鲑鱼死亡率还在不断升高^[31]。

Microtek国际公司曾经采用SRS灭活疫苗来进行鱼免疫, 这种疫苗含有较高的细菌量, 但保护效果不好, 有时还会出现RPS负值的情况即对鱼有高风险的抑止免疫反应, 同时这种疫苗费用较高。由

于没有进行渔场试验(field trial), 因此该公司很快就放弃研究这种灭活疫苗。

目前鲑鱼立克次氏体疫苗的研究重点为重组亚单位疫苗, 这种疫苗没有毒性, 不产生免疫抑制反应。Kuzyk等^[41]使用多克隆兔血清检测到4种鲑鱼立克次氏体的蛋白质抗原, 分子量分别为51 kD、54 kD、60 kD和65 kD, 以及两种分子量为16 kD和11 kD的糖类抗原。2001年, Kuzyk等^[42]又利用免疫反应检测到鲑鱼立克次氏体几个克隆, 其中一个克隆编码分子量为17 kD外部脂蛋白O_{spA}, 可以诱生鱼体产生中和抗体, 将O_{spA}导入大肠杆菌中表达后来免疫试验鱼, 试验鱼的成活率达到了59%, 而RPS值达到35%。

Microtek国际公司研制的鲑鱼立克次氏体性败血病(SRS)重组亚单位疫苗已进行商业化的生产。该疫苗对虹鳟鱼、银大麻哈鱼和大西洋鲑活体试验的RPS值分别达到了100%、92%和85%, 而对照组死亡率分别为92%、78%和82%, 这表明这种疫苗有良好的免疫效果, 将控制鲑鱼立克次氏体性败血病在全球范围的传播, 同时, 也为其他鱼立克次氏体病的防治提供了可行性的方法。

参考文献:

- [1] Fryer J L, Mauel M J. The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish[J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3: 137- 144.
- [2] Brocklebank J R, Speare D J, Armstrong R D, et al. Septicemia suspected to be caused by a rickettsia-like agent in farmed Atlantic salmon [J]. Can Vet J, 1992, 33: 407- 408.
- [3] Evelyn T P T. Salmonid rickettsial septicemia[A]. Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific Northwest [C]. Can Spec Pub Fish Aquat Sci, 1992, 116: 18- 19.
- [4] Chen S C, Wang P C. A Piscirickettsia salmonis-like organism in grouper, *Epinephelus melanostigma*, in Taiwan [J]. J Fish Dis, 2000, 23: 415- 418.
- [5] Chern R S, Chao C B. Outbreaks of a disease caused by a rickettsia-like organism in cultured tilapia in Taiwan [J]. Fish Pathol, 1994, 29: 61- 71.
- [6] Mauel M J, Miller D L. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review [J]. Veterinary Microb, 2002, 87: 279- 289.
- [7] Harshbarger J, Chang S C, Otto S V. Chlamydiae (with phage), mycoplasma and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves [J]. Science, 1977, 196: 666- 668.
- [8] Gulka, Chang P W. Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. J Fish Dis, 1984, 8: 319- 323.
- [9] Norton J H, Shepherd M A, Prior H C. Intracellular bacteria

- associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigus* [J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 204–206.
- [10] 贺桂珍. 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.
- [11] 张其中, 吴信中, 潘金培. 近江牡蛎类立克次体的分离纯化及形态特点 [J]. 高技术通讯, 2002, 12: 90–92.
- [12] Mohamed A. The discovery of a rickettsia in a fish [J]. Technical Science Service, Veter Sect Bull, 1939, 214: 1–6.
- [13] Ozel M, Schwanz-Pfützner I. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rhabdoviren pflanzlicher und tierischer Herkunft: III. Egtveð-Virus (VHS) der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und Rickettsienähnliche Organismen [J]. Zentralblatt fuer Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, 1975, 230: 1–14.
- [14] Fryer J L, Lannan C N. Rickettsial infections of fish [J]. Ann Rev Fish Dis, 1996, 6: 3–13.
- [15] 姜明, 范瑞青. 真鲷肠上皮组织中类立克次氏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) II: 129–134.
- [16] Larenas J J, Bartholomew J, Troncoso I O, et al. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum [J]. Dis Aqu Organ, 2003, 56: 25–30.
- [17] Gaggero A, Castro H, Sandino A M. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle [J]. J Fish Dis, 1995, 18: 277–279.
- [18] Fryer J L, Lannan C N, Garces L H, et al. Isolation of a rickettsia-like organism from diseased coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Chile [J]. Fish Pathol, 1990, 25: 107–114.
- [19] Lannan C N, Fryer J L. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis* [J]. J Fish Dis, 1994, 17: 545–548.
- [20] Wilson K, Rhonda Blitchington. Probe directed at a segment of Rickettsia rickettsia rRNA amplified with polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(12): 2692–2696.
- [21] Lannan C N, Fryer J L. Recommended methods for inspection of fish for salmonid rickettsia [J]. Bull Eur Ass Fish Path, 1991, 11: 135–136.
- [22] Mael M J, Giovannoni S J, Fryer J L. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing [J]. Dis Aquat Org, 1999, 35: 115–123.
- [23] Comps M, Raymond J C, Plassiart G N. Rickettsia-like organism infecting juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1996, 16: 30–33.
- [24] Mael M J, Giovannoni S J, Fryer J L. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing [J]. Dis Aquat Org, 1999, 35(2): 115–123.
- [25] Boone D R, Castenholz R W. Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 2nd Edition [M]. New York: Springer, 2001. 155–166.
- [26] Khoo L, Dennis P M, Lewbart G A. Rickettsia like organisms in the blue-eyed plecostomus, *Panaque suttoni* [J]. J Fish Dis, 1995, 18: 157–164.
- [27] Marshall S, Heath S, Henriquez V, et al. Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3066–3069.
- [28] Bravo S. *Piscirickettsiosis* in freshwater [J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1994, 14: 137–138.
- [29] Khoo L, Dennis P M, Lewbart G A. Rickettsia like organisms in the blue-eyed plecostomus, *Panaque suttoni* (Eigenmann and Eigenmann) [J]. J Fish Dis, 1995, 18: 157–164.
- [30] Mael M J, Giovannoni S J, Fryer J L. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis* [J]. Dis Aquat Org, 1996, 26: 189–195.
- [31] Lannan C N, Ewing S A, Fryer J L. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids [J]. J Aquat Ani Health, 1991, 3: 229–234.
- [32] 魏曦. 医用立克次氏体学 [M]. 上海: 上海科学教育出版社, 1984.
- [33] Garces L H, Larenas J J. Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon [J]. Dis Aqu Organ, 1991, 11: 93–7.
- [34] Cvitanich J D, Garate N O, Smith C E. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate [J]. J Fish Dis, 1991, 14: 121–145.
- [35] U. S. Fish Health & Wildlife Service. Handbook of Standard Procedures for Aquatic Animal Health Inspections [EB/OL]. <http://www.fws.gov/ fisheries/ FHC/ Handbook. htm>, 2004–05–09.
- [36] Heath S, Pak S, Marshall S, et al. *Piscirickettsia salmonis* by denaturing gel electrophoresis and competitive PCR [J]. Dis Aqu Organ, 2000, 41: 19–29.
- [37] Kenneth H W, Rhonda B, Pinak S. Probe directed at a segment of rickettsia rickettsia rRNA amplified with polymerase chain reaction. [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(12): 2692–2696.
- [38] Jamett A, Aguayo J, Miquel A. Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis* [J]. J Fish Dis, 2001, 24: 205–216.
- [39] Alday-Sanz V, Rodger H, Turnbull T, et al. An immunohistochemical diagnostic test for rickettsial disease [J]. J Fish Dis, 1994, 17: 189–191.
- [40] Mael M J, Giovannoni S J, Fryer J L. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing [J]. Dis Aquat Org, 1999, 35: 115–123.
- [41] Kuzyk M A, Thomson J C, Kay W W. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* [J]. Infect Immun, 1996, 64: 5205–5210.
- [42] Kuzyk M A, Burian J, Machander D. An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis* [J]. Vaccine, 2001b, 19: 2337–2344.

Research progress of piscirickettsia

LIN Xiaoting, WANG Min

(Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Rickettsia is one of the most significant pathogens in aquaculture of the world, and will cause high mortality (sometimes above 90%) and serious loss. *Piscirickettsia salmonis* is the first rickettsia which was confirmed as the pathogen of fish. Nowadays, Piscirickettsiosis and Piscirickettsiosis-like syndromes have been detected in about 20 countries and areas. In this review, the important characteristics of the Piscirickettsiosis including the emergence, taxonomic position, transmission, diagnosis, and current approaches for prevention and treatment have been discussed.

Key words: piscirickettsia; rickettsia; rickettsia-like organism

Corresponding author: Wang Min. E-mail: wangmin30@hotmail.com

海洋出版社图书征订目录—海洋法律法规部分

图书代号	ISBN 号 (7-5027)	书 名	单价	出版日期	开本	作者
	6397- X	国际海洋法的新发展	48.00	2005-08	16开	高之国等
		海洋石油共同开发的法律基础	20.00	2005-10		编委会
H005700	6097-0	海洋环境保护法规文件汇编	180.00	2005-03	16开	
H005380	6106-3	国际海洋组织议事规则选编(上、中、下)	120.00	2004-06	大32开	国家海洋局 国际合作司
H002861	5125-4	国外海洋管理法规选编	50.00	2001-01	大32开	
H002101	4546-7	中华人民共和国海洋法规选编	30.00	1998-06	32开	
H003031	5267-6	中华人民共和国海域使用管理法	3.00	2001-11	32开	
H002102		中华人民共和国海洋法规选编 (光盘)	70.00	1998-06	32开	
H002940	5275-7	中华人民共和国海洋法规选编(第三版)	45.00	2001-06	32开	
H004550	5664-7	学习贯彻《海域使用管理法》座谈会材料汇编	16.00	2002-06	32开	孙志辉
H004210	5360-5	国际海洋法法庭研究	28.00	2001-12	16开	吴 慧
H002860	5125-4	国外海洋管理法规选编	50.00	2001-03	大32开	
H000490	4189-5	中国海商法	22.00	1996-11	32开	陈宪民等

海洋出版社发行部账户:

户名: 海洋出版社发行部 开户行: 农信海淀联社营业部 账号: 041303-01-0300-0002719

以上图书零售及邮购需另加 15% 邮费。购买 50 册以上免收邮费, 批销 100 册以上折扣优惠。

联系人: 刘禹明 电话: 010-62147016 传真: 010-62173651

地址: 北京市海淀区大慧寺路 8 号海洋出版社发行部 邮编: 100081