

# 热带海洋珍珠贝类立克次体病研究 ——大珠母贝病原类立克次体包涵体的 组织学及超微结构研究\*

吴信忠 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

**提要** 于1993年11月和1994年11月在海南省临高县新盈珍珠贝养殖场采集患病或濒死的大珠母贝幼贝,采用组织切片和扫描电镜技术对其病原类立克次体(Rickettsia-like organism, RLO)的包涵体进行组织学和超微结构研究,以期找出RLO包涵体在宿主细胞内形态发生的内在规律。结果表明,RLO包涵体寄生在宿主多处内脏组织,但RLO具有明显的嗜细胞特异性,感染的靶细胞为上皮(或表皮)、结缔组织和血管内皮细胞;包涵体存在不同的发育时期,可分为颗粒前期和颗粒期,后者又可分为颗粒I—III期;包涵体是由两种颗粒外包一界膜而形成,其中小而纤细的颗粒可能为游离的RLO,大而圆形的颗粒可能是吞噬溶酶体内RLO繁殖形成的微克隆。

**关键词** 大珠母贝 类立克次体 包涵体

**学科分类号** S944.3

在养殖生产及研究中,一般认为造成养殖大珠母贝发生严重死亡的原因有海洋污染、气候影响、敌害和赤潮等(谢玉坎等,1990)。1993年中国科学院南海海洋研究所在进行热带海洋珍珠贝流行病学调查研究过程中,首次在严重死亡的大珠母贝幼贝体内发现一种称为类立克次体(RLO)的病原微生物,其寄生于宿主细胞胞质内形成包涵体(Wu *et al*, 1998)<sup>1)</sup>。本文报告对大珠母贝病原RLO包涵体的形态学特征、组织细胞特异性、发育时期及特殊染色特征等的研究结果,以期揭示RLO包涵体在宿主细胞内形态发生的内在规律及其对宿主细胞的病理作用,并为便于进行热带海洋珍珠贝RLO病的病原学诊断提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用大珠母贝(*Pinctada maxima*)

分别于1993年11月和1994年11月在海南省临高县新盈珍珠贝养殖场收集在严重

\* 中国科学院重点课题, KS85-121号。吴信忠,男,出生于1957年1月,博士,副研究员, Fax:0086-020-84451672

1) Wu X Z, Pan J P, 1998. Studies on the Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster I. The fine structure and morphogenesis of inctada maxima pathogen Rickettsia-like organism. J Invertebr Pathol(in press)

收稿日期: 1996-09-25, 收修改稿日期: 1998-05-31

死亡高峰期中和之后残存的尚未死亡或濒临死亡的幼贝,贝龄约5个月。

## 1.2 组织学研究

现场取病贝或濒死贝,将贝壳剖开,用眼科剪解剖贝体各器官,取外套膜、鳃、肝胰腺(包括胃和部分肠段)、直肠、生殖腺、闭壳肌、足、足肌、围心腔腺,分别用 Bouin's 液和 4% 中性甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋、连续切片(厚度为 5 $\mu$ m),以 Ehrlich's 苏木精-曙红常规染色,并采用革兰氏(Gram-Weigert)染色及 Wade-Fite 和 Ziehl-Neelsen 氏抗酸染色作比较。染色后中性树胶封片,置于光学显微镜下观察,测量包涵体大小并拍照。

## 1.3 扫描电镜(SEM)超微结构研究

现场取病贝或濒死贝,按前述方法解剖贝体,并用双面刀片切成 1mm<sup>3</sup> 大小的组织块,用 2% 戊二醛(pH = 7.2)现场固定;取固定的大珠母贝外套膜组织,用干净锐利双面刀片修出观察断面,用 0.1mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(pH = 7.2)漂洗标本 3 次,每次 30min,1% OsO<sub>4</sub> 后固定 1h(4 $^{\circ}$ C)。然后再用 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液漂洗 3 次,每次 20min,丙酮系列脱水,转入醋酸异戊酯 20min,临界点干燥,粘样,断面喷金,在 Hitachi S-450 型扫描电镜下观察并拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 类立克次体包涵体的一般组织学描述

在尚未破裂的鳃上皮和外套膜的表皮细胞内,极易观察到 RLO 包涵体(以下简称包涵体)有一层完整的界膜包绕,其内呈均质或颗粒状(图版 I: 1—2)。包涵体尚未失活时,其内的颗粒 H. E 染色呈嗜酸性,失活时变成嗜碱性。随着包涵体的发育,其内颗粒的革兰氏染色具有可变性,依次呈不着色、浅红或浅蓝、紫红带蓝色(图版 I: 3—5)。在 Wade-Fite 氏抗酸染色切片上,包涵体的颗粒呈亮红色(图版 I: 6)。在 Ziehl-Neelsen 氏抗酸染色切片上,包涵体颗粒呈深红或红黑色(图版 I: 7)。由于包涵体寄生于宿主体内多种组织的

表1 大珠母贝感染细胞中RLO包涵体的分布及大小

Tab 1 Distribution and size of RLO inclusion in cells infected in *P. maxima*

细胞类型		包涵体感染程度	包涵体大小( $\mu$ m)
外套膜	表皮细胞	++++	(8.66 $\pm$ 3.03) $\times$ (6.49 $\pm$ 1.77)(n=50)
	结缔组织细胞	++++	(14.29 $\pm$ 4.21) $\times$ (11.44 $\pm$ 3.38)(n=50)
鳃	纤毛上皮	+++	详见文内
	非纤毛上皮	+++	
肠	纤毛柱状上皮	+++	(11.01 $\pm$ 5.40) $\times$ (5.09 $\pm$ 1.35)(n=50)
	非纤毛复层上皮	+++	
胃	纤毛柱状上皮	+至++	
	非纤毛复层上皮	+至++	
肝胰腺	肝管纤毛柱状上皮	+	(8.43 $\pm$ 2.26) $\times$ (6.15 $\pm$ 1.51)(n=20)
	分泌型腺泡上皮	+	
生殖腺	腺泡细胞	-	
	腺管上皮	+至+++	
囊样结缔组织		++++	(13.33 $\pm$ 5.49) $\times$ (9.77 $\pm$ 3.77)(n=50)
血管内皮细胞		+至+++	

注: -: 感染阴性; +: 轻度感染; ++: 中度感染; +++: 重度感染; +++++: 严重感染

不同细胞内,且包涵体本身有不同的发育阶段,故其形态和大小也呈现较大的差异。一般而言,上皮细胞或表皮细胞内的包涵体,形态较规则,呈圆或椭圆形(图版 I: 1—2);而结缔组织细胞内形态变得不规则,呈圆、椭圆、梭形和不规则形,体积明显增大(图版 I: 4—5)。在肠粘膜纤毛柱状上皮细胞内的包涵体常呈梭状,整齐地位于细胞的刷状缘面,酷似“麦穗状”排列(图版 I: 8)。各种组织细胞内的包涵体大小见表 1。

## 2.2 类立克次体包涵体发育时期的观察结果

光镜观察结果表明,包涵体发育的主要特征是其内的颗粒从无到有,从小到大,由此引起包涵体的大小、嗜酸性强弱和革兰氏染色情况的变化,以及对宿主细胞造成的病理损害程度也不同。根据这些特征,包涵体发育可描述为下列时期。

**2.2.1 颗粒前期包涵体 (pregranular inclusion, pgi)** 受感染细胞质内的包涵体呈均质细密的弱嗜酸性,包涵体内未见颗粒或极不明显,光镜下无法辨认(图版 I: 1),革兰氏染色不着色或稍带浅蓝底色(图版 I: 3)测量鳃上皮细胞内(以下同)包涵体大小为  $(7.02 \pm 1.66) \times (5.22 \pm 0.97) \mu\text{m}$  ( $n = 25$ ),感染的宿主细胞肿大。

**2.2.2 颗粒期包涵体 (granular inclusion)** 该期又可分为 I—III 期。

**2.2.2.1 颗粒 I 期包涵体** 包涵体内嗜酸性物开始呈不均匀分布,嗜酸性略增强,呈浅红或红色,其中出现纤细杆状或细微的圆颗粒(图版 I: 1—2),革兰氏染色颗粒着浅灰红色或非常浅的蓝色(图版 I: 4);包涵体大小为  $(7.67 \pm 2.35) \times (5.80 \pm 1.52) \mu\text{m}$  ( $n = 55$ );感染的细胞进一步肿大。

**2.2.2.2 颗粒 II 期包涵体** 包涵体内嗜酸性物聚积融合形成较大的大小不等且多少不一的圆形或椭圆形颗粒,直径约为  $0.5 \mu\text{m}$ ,嗜酸性进一步增强,呈鲜红色(图版 I: 2),革兰氏染色包涵体内颗粒呈现浅蓝或蓝色(图版 I: 4);包涵体明显增大,大小为  $(8.17 \pm 2.76) \times (5.93 \pm 1.40) \mu\text{m}$  ( $n = 29$ );感染的细胞明显肿大,细胞核受压,被挤向周边并出现细胞破裂。

**2.2.2.3 颗粒 III 期包涵体** 包涵体内其颗粒呈强嗜酸性,鲜红色,数目显著增多,可多达数十个,有的甚至上百个,多呈圆形,轮廓清晰,直径约为  $1.0—4.0 \mu\text{m}$ ,平均为  $1.7 \mu\text{m}$  ( $n=50$ ),最大的可达  $6 \mu\text{m}$ (图版 I: 2),革兰氏染色呈紫红略带蓝色(图版 I: 5);包涵体极度增大,大小为  $(8.67 \pm 2.90) \times (6.33 \pm 1.76) \mu\text{m}$  ( $n = 55$ );感染细胞极度肿大,核严重受压,在周边形成月牙状或半指环状,大多数细胞被涨破,释放出颗粒(图版 I: 2、6)

## 2.3 类立克次体包涵体在组织细胞的分布特征

组织学研究表明,包涵体主要寄生于贝体的外套膜、鳃、消化道的上皮细胞及上皮下游结缔组织细胞,严重感染时,贝体内脏各组织的血管内皮系统和肝胰腺周围的囊样结缔组织 (vesicular connective tissue, VCT) 也最常受到损害,因此, VCT 内和血管周围常大片状地聚集着包涵体,往往难以计数。在肝胰腺,包涵体较大量分布于腺泡管(或称肝小叶)间的间质组织(包括血管和血窦)中,而腺上皮实质细胞,仅见极少量包涵体。

各种肌组织细胞如闭壳肌、足缩肌未见包涵体寄生,而平滑肌细胞只是在周围组织细胞严重感染时,才偶可受到侵袭。其它如生殖腺腺泡细胞、围心腔腺细胞和血细胞内也未见有包涵体寄生,但生殖腺腺管上皮细胞内可见较大量包涵体存在。包涵体在各类组织细胞的分布情况详见表 1。

## 2.4 类立克次体包涵体的扫描电镜超微结构特征

在扫描电镜下可观察到,包涵体阳性的细胞内存在两种立体构像的颗粒。一种应为微生物 RLO,游离于宿主胞质内,往往群集在一起,呈多形性即为圆球状、豆状和梭状的立体构像,微生物表面光滑,有的可见到二分裂像,有的的一端形成芽胞(图 1: a—c),大小不等,平均为  $(645.85 \pm 168.47) \times (359.09 \pm 80.20) \text{ nm}$  ( $n = 24$ ); 另一种颗粒呈大的圆球状或椭圆球状,平均大小为  $(2\ 090.93 \pm 383.64) \times (1\ 556.08 \pm 286.60) \text{ nm}$  ( $n = 6$ ),有的大颗粒,其膜表面有许多小球状或颗粒状突起,有的已经破溃且有微生物逸出(图 1: d),这种颗粒的大小和特征类似于先前在透射电镜(TEM)下观察到的吞噬溶酶体<sup>1)</sup>。

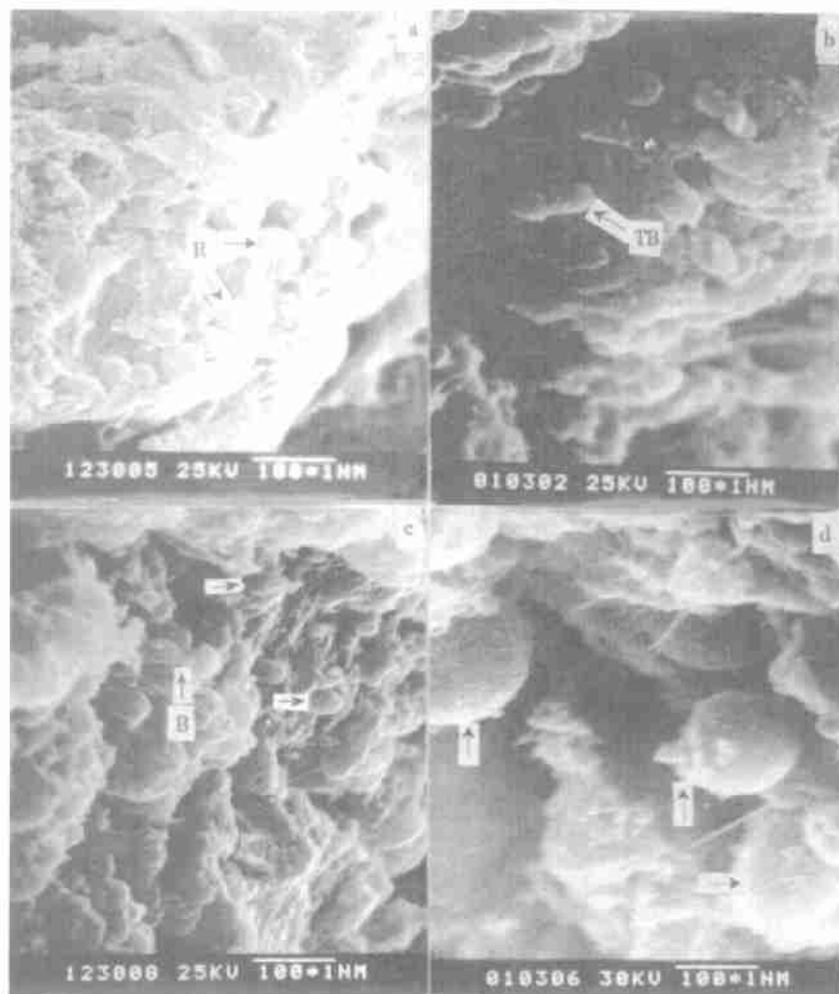


图1 大珠母贝RLO包涵体的扫描电镜超微结构

Fig.1 Scanning electron ultrastructures of RLO inclusions in *P. maxima*

a—c. 示外套膜组织细胞内聚集的游离状RLO(R)SEM图,有的正在二分裂(TB)和芽胞生殖(B);  
d. 示外套膜组织细胞内大型颗粒体的SEM图(箭头)

1) 同第73页脚注。

### 3 讨论与结语

#### 3.1 RLO 包涵体的含义

关于 RLO 包涵体的报道时有差异,并且对其描述也没有统一的定义。一般认为 RLO 包涵体是 RLO 在宿主细胞内寄生时所产生的、大多报告呈嗜碱性(或少数报告呈弱嗜酸性)的小体,光镜观察包涵体内部含有许多纤细的或较粗大的杆状或圆形的颗粒,包涵体革兰氏染色为阴性,孚尔根染色为阳性(表 2);但也有学者认为,包涵体是 RLO 在细胞内繁殖形成的克隆(Mialhe *et al.*, 1987; Wen *et al.*, 1994; Renault *et al.*, 1994);而许多作者认为光镜下见到的包涵体内的颗粒就是 TEM 下的 RLO(Gulka *et al.*, 1983; Elston, 1986; Mialhe *et al.*, 1987; Norton *et al.*, 1993a, b; Wen *et al.*, 1994)。

表2 海洋双壳贝类RLO包涵体的大小及染色特征

Tab.2 Size and staining characteristics of RLO inclusion of marine bivalve molluscs

大小(μm)	染色特征					颗粒	宿主细胞	文献
	H.E	Gr	F	ZN	WF GMS			
未报告	嗜碱					+	<i>Mya arenaria</i> 肝胰腺细胞	Harshburger等(1977)
10.00(肠)	嗜碱					+	<i>Crassostrea virginica</i> 消化道上皮和肝	Meyers(1981)
100.00(肝)							胰腺上皮	
22.00—44.00	嗜碱					+	<i>Mercenaria mercenaria</i> 鳃、外套膜上皮	Meyers(1981)
23.00	嗜酸					+	<i>Mercenaria mercenaria</i> 肾上皮细胞	Meyers(1981)
未报告	嗜碱					+	<i>Argopecten irradians</i> 肾上皮细胞	Morrison等(1983)
45.00	嗜碱					+	<i>Placopecten magellanicus</i> 鳃上皮细胞	Gulka等(1983)
35.00×55.00	嗜碱					+	<i>Tapes japonica</i> 和 <i>Patinopecten yessoensis</i> 鳃上皮	Elston(1986)
5.00	嗜碱					+	<i>Siliqua patula</i> 肝胰腺上皮	Elston等(1984)
未报告		-				-	<i>Tridacna gigas</i> 外套膜上皮	Norton等(1993a)
48.00(幼贝)	多数嗜碱	-				+	幼龄和成龄 <i>Hippopus hippopus</i> 鳃上皮	Norton等(1993b)
110.00(成贝)	少数嗜酸					-		
40.00×90.00(鳃)	嗜碱和	-	+			+	<i>Meretrix lusoria</i> 鳃、肝胰腺上皮	Wen等(1994)
22.00(肝)	嗜酸							
未报告	嗜碱					+	<i>Crassostrea gigas</i> 鳃上皮	Renault等(1994)
见表1	嗜酸	-	深红亮红			+	<i>Pinctada maxima</i> (细胞类型见表1)	本文

注: Gr: 革兰氏染色; F: 孚尔根染色; ZN: Ziehl-Neelsen氏抗酸染色; WF: Wade-Fite氏抗酸染色; GMS: Gomori 氏甲胺银染色

本研究在光镜下亦见到包涵体内含有大小不一的颗粒,颗粒经革兰氏染色一般为阴性,抗酸染色为阳性,说明包涵体内的 RLO 具有革兰氏阴性细菌的特征,这与上述研究结果基本一致。但不同的是大珠母贝体内的 RLO 包涵体,当尚未失活时其内的颗粒均呈明显的嗜酸性,只有失活时才呈嗜碱性。另外不同的是,本实验在对各发育时期的包涵体进行观察时,发现包涵体内颗粒的形态和大小呈现极其明显的变异,说明在光镜下见到的包涵体颗粒并不都是在 TEM 下见到的单个 RLO。为此,本实验采用扫描电镜(SEM)来观察

包涵体内的颗粒,第一种是呈杆状或梭状,圆球或椭圆球状的小颗粒,游离或集聚于胞质内,有的正在二分裂和芽胞生殖,其形态和大小及在细胞内的定位都符合 Wu 等(1998)<sup>1)</sup> 先前在 TEM 下见到的 RLO,对照鸡胚成纤维细胞内感染的普氏立克次体(*R. prowazekii*)的 SEM 立体的构像(Silverman *et al.*, 1980),也证明这种小颗粒为 RLO;第二种颗粒,大,呈圆球状和椭圆球状,有的表面破溃,其内有 RLO 样微生物正在逸出,有的表面突起有许多小球状颗粒。这些大颗粒的形态和大小与本研究在光镜下见到的颗粒 III 期包涵体内的圆形或椭圆形大颗粒相符,同时也符合 Wu 等(1998)<sup>1)</sup> 在 TEM 下观察到的包含有 RLO 的吞噬溶酶体的形态和大小(平均大小 $1\ 881.75 \times 1\ 671.25\text{nm}$ )。上述实验证据和分析说明,光镜下 RLO 包涵体内的颗粒实际上应为两种:在发育早期的包涵体内最易见到的纤细杆状或细小圆状的小颗粒可能为 TEM 下见到的 RLO;而在颗粒期特别是颗粒 III 期包涵体内见到的圆形或椭圆形大颗粒可能应为 TEM 和 SEM 下见到的包含有 RLO 的吞噬溶酶体。本研究的光镜观察表明,较完整的包涵体外有一层界膜包绕着,其内有颗粒,利用 SEM 可更清晰地观察到包绕许多颗粒体的这种界膜。

综上所述,可以认为,包涵体是 RLO 繁殖形成的克隆,而且根据本实验的结果似应进一步认为包涵体是由一界膜包绕的许多 RLO 微克隆(microcolonies)和游离于胞质中的 RLO 组成。其中每一微克隆就是 TEM 和 SEM 下见到的包含有许多 RLO 的吞噬溶酶体(也应包括吞噬体)。

### 3.2 类立克次体包涵体的发育时期

有关贝类宿主体内寄生的 RLO 包涵体存在不同发育时期的现象,目前尚未见报道。而对 RLO 包涵体发育时期的研究有助于更好地理解 RLO 包涵体在宿主细胞内形态发生的内在规律,亦有助于对类立克次体病的病原学进行诊断。本研究在对 RLO 包涵体进行组织学研究时发现,RLO 包涵体不仅随组织细胞类型不同而有较大差异,而且它们存在明显的发育时期的变异。处在不同发育时期的包涵体,除了大小有差别外,包涵体内的颗粒也在发育变化。本文在观察了大量的组织切片的基础上,根据包涵体内颗粒的这种发育变化特征,结合颗粒的革兰氏染色和宿主细胞肿胀破裂及核变化情况,首次将 RLO 包涵体划分为颗粒前期和颗粒期,其中后者又可分为颗粒 I—III 期。实际上在观察中常看到各期之间还存在着过渡形式,这进一步说明了包涵体存在不同的发育时期。

另外,根据本文扫描电镜和先前透射电镜研究的结果<sup>1)</sup>,可以认为包涵体内颗粒的发育变化是与包涵体内微生物 RLO 的生长、发育和繁殖(包括繁殖形成微克隆)密切相关的。而包涵体内的颗粒体革兰氏染色具有可变性,说明包涵体内颗粒的化学成分甚或菌体的成分在包涵体的发育过程中可能发生改变,包涵体发育过程中其生理、生化和组织化学的变化情况有待于进一步研究。

### 3.3 类立克次体的嗜细胞特异性

包涵体组织细胞分布的研究显示,包涵体虽可见于多种组织,但寄生的细胞类型却是特异的。这表明包涵体内的微生物 RLO 对细胞的感染具有明显的嗜细胞特异性。其感染的靶细胞(target cells)是上皮(或表皮)细胞、结缔组织细胞和小血管内皮细胞,而对横

1) 同第73页脚注

纹肌和平滑肌细胞、生殖腺滤泡细胞、围心腔腺细胞和血细胞不易感染。在肝胰腺, RLO 主要感染的细胞是肝胰腺的间质细胞, 而对肝胰腺的腺上皮实质细胞仅轻度感染。RLO 的这种嗜细胞特异性尤其是对血管内皮系统的感染, 类似于感染人体的立克次体属的微生物 (Freeman, 1985)。另外, 各种组织细胞内的包涵体形态和大小有差异, 一般上皮 (或表皮) 细胞内的包涵体呈圆形或椭圆形, 较小, 而结缔组织细胞内的呈多形性 (polymorphic), 较大 (表 1), 这种现象可能与包涵体寄生的组织细胞的结构特性有关, 如结缔组织细胞一般比较疏松且不规则。

### 参 考 文 献

- 谢玉坎, 林碧萍, 张 德等, 1990. 大珠母贝及其养殖珍珠. 北京: 海洋出版社, 85—89
- Elston R, 1986. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in two bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yessoensis*, with comments on their significance. *J Fish Dis*, 9:69—71
- Elston R A, Peacock M G, 1984. A rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. *J Invertebr Pathol*, 44:84—96
- Freeman B A, 1985. *Burrows Textbook of Microbiology*. Twenty-second edition. Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company, 653—674
- Gulka G, Chang P W, Marti K A, 1983. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J Fish Dis*, 6:355—364
- Harshbarger J C, Chang S C, Otto S V, 1977. Chlamydiae (with phage), mycoplasma and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science*, 196:666—668
- Meyers T R, 1981. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). *Aquaculture*, 22:305—330
- Mialhe E, Chagot D, Boulo V *et al*, 1987. An infection of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) by *Rickettsia*. *Aquaculture*, 67(1/2):258—259
- Morrison C, Shum G, 1983. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J Fish Dis*, 6:537—541
- Norton J H, Shepherd M A, Prior H C, 1993a. Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas*. *J Invertebr Pathol*, 62: 204—206
- Norton J H, Shepherd M A, Abdon-Naguit M R *et al*, 1993b. Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms. *J Invertebr Pathol*, 62:207—209
- Renault J, Cochenne N, 1994. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*, 64:160—162
- Silverman D J, Wisseman Jr C L, Waddell A, 1980. In vitro studies of Rickettsia-host cell interactions: ultrastructural study of *Rickettsia prowazekii*-infected chicken embryo fibroblasts. *Infect Immun*, 29:778—790
- Wen C M, Kou G H, Chen S N, 1994. Rickettsiaceae-like microorganisms in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* Rooding. *J Invertebr Pathol*, 64:138—142

STUDIES ON THE RICKETTSIA-LIKE ORGANISM DISEASES  
OF TROPICAL MARINE PEARL OYSTER  
—THE MORPHOLOGY, MORPHOGENESIS AND ULTRASTRUCTURE  
OF RLO INCLUSIONS, AN AGENT FOR *PINCTADA MAXIMA*

WU Xin-zhong, PAN Jin-peì

(South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301)

**Abstract** The morphology, morphogenesis and ultrastructure of Rickettsia-like organism (RLO) inclusion in 5-month-old diseased or moribund pearl oysters, *Pinctada maxima*, collected from the Xinying Bay, Hainan Island in November 1993 and November 1994 were described. For a histological examination the mantle, gills, hepatopancreas (including parts of stomach and intestine), rectum, adductor muscle, foot muscle and keber's organ were dissected and fixed in Bouin's fixative and 4% neutral formalin fixative. Sections were stained with routine Ehrlich's H.E procedure and special methods including Gram-Weigert's staining and Ziehl-Neelsen and Wade-Fite for acid-fast staining. For scanning electron microscopy (SEM) analysis fresh specimens were fixed in 2% glutaraldehyde. The selected small pieces ( $1\text{mm}^3$ ) of mantle tissues were shaved with a doubleedged razor blade and washed with a sodium cacodylate buffer (three time, 30min/time). Dried tissues with the shaved surfaces exposed were sputtercoated with gold-palladium. The characteristics of RLO inclusion distributions in tissues showed that all kinds of epithelial, connective tissue and endothelial cells are the target cells for RLO infection. The morphology and size of inclusions from different tissues are different. The inclusions are Gramnegative but variable with developing inclusions, Acid-fast-positive in which bright red when stained with Wade-Fite's stain and reddish black when stained with Ziehl-Neelsen's stain. Pregranular and granular stages of developing inclusions were noted under light microscopic examination. The granular stage may be distinguished from stage I to stage III ( $gs_I$  to  $gs_{III}$ ). At the pregranular stage ( $pgi$ ) the inclusions do not contain granules. Gram stain was poor and host cell has slightly hypertrophied. From granular stage I to stage III, inclusions contain developing granules which became more (tens up to 100) and larger ( $1.0\text{--}4.0\mu\text{m}$  as measured in  $gs_{III}$  inclusions). Gram stain varied from pale red or pale blue to purplish red with blue and host cell becoming much more hypertrophied, at last ruptured. Ultrastructurally, two stereo-structure granules, small granules (average  $645.85 \times 359.09\mu\text{m}$ ) and large granules (average  $2\,090.93 \times 1\,556.08\mu\text{m}$ ), in inclusionpositive host cells were observed under SEM, in which some small granules were undergoing transverse binary fission (Fig. 1:b) and budding division (Fig. 1:c), and the large granule was undergoing ruptured with organism escaping (Fig. 1:d). Combined the present results observed by light and SEM with previous transmission electron microscopy, it is suggested that RLO inclusions consist of two different granules surrounded by a membrane-bound, in which the fine granules may be free individual RLO and the large granules may be RLO microclonies involved in phagolysosomes.

**Key words** *Pinctada maxima* Rickettsia-like organism Inclusions

**Subject classification number** S944.3