

病例報告：葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 之類馬爾太蟲 (*Marteilioides chungmuensis*) 感染症

吳介豪*、陳怡玟、魯懿萍、林育如

農業部獸醫研究所

摘要 類馬爾太蟲 (*Marteilioides chungmuensis*) 是一種牡蠣原蟲寄生蟲，感染可造成牡蠣生殖腺呈大小不一團塊，以及受感染牡蠣的營養消耗，進而影響經濟價值。本所 112 年 2 月於南部沿海養殖葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 檢出卵內寄生蟲 *M. chungmuensis* 感染。肉眼觀察三分之一牡蠣生殖腺外觀呈現大小不一團塊，殼表面有大量附生物，組織病理學檢查顯示卵母細胞有原蟲一級細胞及二級細胞感染，卵母細胞受原蟲擠壓變形，使用 18S rDNA 基因特異性引子進行聚合酶鏈反應檢驗，確認為類馬爾太蟲，定序結果與韓國長牡蠣 (*C. gigas*) 及日本地區近江牡蠣 (*C. ariakensis*) 感染類馬爾太蟲之基因，相似度為 100%。本病例為首次於臺灣養殖葡萄牙牡蠣檢出類馬爾太蟲感染。

關鍵字：類馬爾太蟲、牡蠣、原蟲、組織病理學、聚合酶鏈反應

緒言

類馬爾太蟲 (*Marteilioides chungmuensis*) 是一種原蟲寄生蟲，感染牡蠣可造成卵巢呈大小不一團塊，受感染牡蠣會出現產卵失敗及增加死亡等症狀，本病為亞太地區養殖中心網絡 (Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, NACA) 表列疾病，非世界動物衛生組織 (World Organisation for Animal Health, WOAH) 表列疾病，亦非人畜共通傳染病。1930 年代首次在日本廣島縣發現，長牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 卵巢有疑似類馬爾太蟲病變 [2]。韓國於 1979 年首次檢出 *Marteilioides chungmuensis*，並於 1986 年確認寄生蟲分類 [13]。1996 年之後，陸續在日本其他海灣發現卵巢異常的牡蠣，直至 2002 年 Itoh 確認日本案例係與韓國屬於相同原蟲感染 [3, 14]。目前已知感受性物種包

含長牡蠣、岩牡蠣 (*C. nippona*) 及近江牡蠣 (*C. ariakensis*) [6]，傳播途徑尚未明確，推測可能是藉由水流傳播病原，或經由其他宿主 (長牡蠣、近江牡蠣、岩牡蠣及菲律賓簾蛤等) 媒介傳播，病原由牡蠣鰓過濾水時侵入體內 [4]。本病有季節性差異 (夏天發生率高於冬天) [14]，牡蠣感染後觀察到產卵失敗及延遲產卵，並因寄生蟲孢子破壞成熟的卵母細胞而導致無法繁殖 [11]，受感染牡蠣出現營養消耗和死亡，外觀較為消瘦，因賣相不佳造成養殖戶經濟損失 [8]。文獻指出，在岩牡蠣和近江牡蠣未有明顯的結節形成，或其他明顯的臨床症狀，顯示病變具有宿主品種差異性，無法憑肉眼病變觀察到此疾病 [6]。

近年來臺南市外海養殖蚵棚牡蠣育苗率低於 3 成，截至目前尚無法知道造成這種現象的原因。該市持續於安平區、南區及安南區三區外海養殖蚵棚進行

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

監測採樣，送本所進行各種已知貝類病原之檢查，期能解決牡蠣育苗率低之問題。

材料及方法

牡蠣

臺南市動保處於 112 年 2 月 10 日，自外海葡萄牙牡蠣 (*C. angulata*) 養殖蚵棚進行採樣，送本所進行檢測，分別送檢去殼牡蠣及未開殼牡蠣，養殖戶表示該批牡蠣臨床上無明顯異常等現象。

外觀檢查

去殼牡蠣長度約 10.8 公分，重量約 4.6 公克，少部分牡蠣之生殖腺外觀呈現大小不一團塊 (圖 1)，直徑約 1-5 mm，未開殼牡蠣外殼表面有大量附生物，包含藤壺、菜蛤、石灰蟲、紅蟲、海綿等。

寄生蟲學檢查

濕壓片鏡檢：以剪刀分別取一小塊鰓及外套膜組織，置於載玻片上，覆蓋二次去離子水及蓋玻片，以光學顯微鏡進行濕壓片鏡檢。

細菌分離

對牡蠣之內臟組織，以血液培養基進行細菌分離。

組織病理學檢查

以 10% 中性福馬林固定後的組織，經修整、脫水、石蠟包埋及切片，再以蘇木紫-伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain) 進行組織病理學判讀。

分子生物學鑑定

1. **核酸萃取**：送檢牡蠣以 5 隻為一組採樣，每區檢體有 3 組，三區檢體共 9 組，以滅菌剪刀採取 200 mg 組織 (包含鰓、外套膜、生殖腺、消化腺及閉殼肌)，置入 2 mL 均質管，加入 0.7 mL 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)，將均質管置入組織均質機中均質 4 次，每次 13 秒，將均質後小管放入離心管內，以每分鐘 2,000 轉速度離心 15 分鐘。取製備好

乳劑上清液，加入 Proteinase K 均勻混合，於 56°C 下作用 16 小時，使用自動化核酸萃取儀及 MagPurix® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (ZINEXTS LIFE SCIENCE CORP.)，依其操作步驟進行萃取。

2. **巢式聚合酶鏈反應 (Nested-PCR) 檢查**：依據文獻發表之 *M. chungmuensis* 18S rDNA 基因之專一性引子進行 Nested-PCR 方法檢驗 [5]。本試驗之陽性對照樣本由陽性檢體選殖 (cloning) 而成，第一段反應之引子對序列為 OPF-2 : 5'-CCGCGTTTACACCTGTGACC-3'、OPR-2 : 5'-GACCTTCCGATTATCCGCCC-3'，預期增幅產物為 672 bp。取第一段產物作為第二段反應之核酸物質，第二段反應之引子對序列為 OPF-3 : 5'-GGCTGAATACCTCTGCC-3'、OPR-3 : 5'-CCTCTTGACGACGACAC-3'，預期增幅產物為 447 bp。第一段反應條件如下：94°C 處理 5 分鐘，再以 95°C，30 秒、59°C，30 秒、72°C，1 分鐘完成 35 個循環 PCR 反應，最後再以 72°C 反應 5 分鐘，第二段反應條件如下：94°C 處理 5 分鐘，再以 95°C，30 秒、55°C，30 秒、72°C，1 分鐘完成 35 個循環 PCR 反應，最後再以 72°C 反應 5 分鐘。第二段反應產物以 1.5% 瓊脂進行電泳分析，觀察片段大小是否與目標產物相符，並將產物送定序分析，結果與 NCBI GenBank 資料庫進行序列比對。
3. **其他病原核酸檢測**：依據 WOA 水生動物診斷手冊 [15] 及前人發表方法，進行聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 或即時聚合酶鏈反應 (Real-time PCR) 檢測潛伏之病原核酸，檢測項目包含：奧爾森派金蟲 (*Perkinsus olseni*) [9]、波納米亞蟲及牡蠣波納米亞蟲 (*Bonamia exitiosa*、*B. ostreae*) [1]、折光馬爾太蟲 (*Marteilia refringens*) [7]、牡蠣疱疹病毒第一型 (Ostreid herpesvirus type 1) [12]。

結果

肉眼病變

三分之一去殼牡蠣生殖腺外觀呈現大小不一團塊 (圖 1)，直徑約 1-5 mm，未開殼牡蠣之外殼表面有大量附生物，覆蓋牡蠣外殼，其他無明顯肉眼病變。

寄生蟲檢查

鰓絲及外套膜組織鏡檢無明顯異常。

細菌分離

Vibrio chagasii、*V. mediterranei*。

組織病理學檢查

卵巢：顯微鏡檢下，低倍 (40 倍) 可見正常卵細胞構造消失，被大量不同形狀和大小之孢子取代 (圖 2)。高倍 (400 倍) 下，卵巢內有大量血細胞浸潤，原有結構消失，大量卵母細胞 (oocytes) 有原蟲感染，卵母細胞中可見 1 至 3 顆原蟲空泡，大小約 17 至 20 μm ，呈圓形或長橢圓形，其中可見 1 或 2 顆孢子，為原蟲之二級細胞 (sporont, secondary cell) (圖 3)。部分未成熟卵母細胞之細胞質中，可見小型原蟲空泡，大小約 5 至 9 μm ，略呈圓形，內含有 1 至 3 顆孢子，為原蟲之初級細胞 (primary cell) (圖 4)。周圍有血細胞浸潤。

消化系統：消化道黏膜下層結締組織，可見大區域壞死，大量巨噬細胞和淋巴球浸潤 (圖 5)。

其他臟器：無明顯特徵性病變。

分子生物學鑑定

- 類馬爾太蟲核酸檢測：**部分牡蠣檢測結果為類馬爾太蟲核酸陽性 (圖 6)，陽性產物經定序分析。取增幅產物片段 (18S rDNA 基因) 447 bp 與 NCBI 基因庫序列比對，與近江牡蠣 (*C. ariakensis*) 及長牡蠣 (*C. gigas*) 感染 *M. chungmuensis* 之基因相似度為 100%。
- 其他病原核酸檢測：**奧爾森派金蟲、波納米亞蟲及牡蠣波納米亞蟲、折光馬爾太蟲、牡蠣疱疹病毒第一型結果均為未檢出。

討論

近年臺南市外海養殖蚵棚，漁民反映牡蠣育苗率低於 3 成，故自 110 年起持續於該市外海養殖蚵棚進行監測採樣。於 112 年 2 月在放養約 3 個月之葡萄牙牡蠣檢出類馬爾太蟲，以肉眼病變觀察，發現三分之一牡蠣有生殖腺外觀異常，病變不明顯，為黃白色生殖腺略呈團塊分布。以分子生物學方法之特異性引子檢出類馬爾太蟲，經核酸定序分析與 NCBI 基因庫序列比對，與韓國近江牡蠣及日本、韓國長牡蠣感染 *M. chungmuensis* 之基因相似度為 100%。搭配組織病理學檢查，可見牡蠣卵巢組織的卵母細胞有原蟲感染，卵母細胞中可見原蟲之二級細胞及初級細胞感染，卵細胞壞死及血細胞浸潤，其他臟器無明顯特徵性病變，其他重要病原核酸檢測，包括奧爾森派金蟲、波納米亞蟲及牡蠣波納米亞蟲、折光馬爾太蟲、牡蠣疱疹病毒第一型結果均為未檢出，本案例確診為我國首例之葡萄牙牡蠣之 *M. chungmuensis* 感染症。

本案例中，牡蠣殼表面發現大量附生物附著，附生物種類繁多，包括藤壺、菜蛤、石灰蟲、紅蟲、海綿、海鞘、甲殼類及豆蟹等，可能造成牡蠣生存及生長空間受阻、與牡蠣爭食，海綿覆蓋影響牡蠣開殼攝食等，多因素下皆可能造成牡蠣生長不良，甚至是無法開殼攝食而死亡，體表附生物影響甚鉅，附生物生長與地理環境、氣候、海流有關，在臺南外海養殖區因有颱風因素影響，若使用浮筏式蚵棚需配合 7 到 9 月停養期之規定，以防颱風造成浮筏損壞，經歷停養期後重新放養，附生物數量初期會減少，到養殖數月後附生物又會增加，建議降低飼養密度，定期以高壓水槍噴除附生物，減少附生物影響。

本案之細菌分離檢出 *Vibrio chagasii* 和 *V. mediterranei*，兩種菌皆可在海水、海洋沉積物、魚體或貝類中檢出，由於檢體來源細菌量少，牡蠣無明顯症狀或病變，推測弧菌非本病例之主要病原。

類馬爾太蟲目前發現可感染長牡蠣、葡萄牙牡蠣、近江牡蠣、岩牡蠣，主要感染飼養兩年以上雌性牡蠣，造成卵細胞破壞及產卵失敗，受感染牡蠣為再次產卵需重新產生卵細胞，導致營養消耗甚至死亡 [5]。本案例中，受感染牡蠣小於 6 月齡，可見輕度至中度肉眼病變，未見其他臨床症狀如明顯消瘦、死亡

等。本例生殖腺肉眼團塊樣結節病變不明顯，文獻中指出感染類馬爾太蟲之長牡蠣呈現明顯結節腫瘤樣生殖腺，在岩牡蠣 (*C. nippona*) 和近江牡蠣未有明顯的結節形成或其他明顯的臨床症狀，顯現病變具有宿主品種差異性 [6, 16]。另本案沒有明顯消瘦或死亡等臨床症狀，是否與感染年齡有關，需更多研究資料佐證。

類馬爾太原蟲在感染牡蠣卵細胞時期，分為初級細胞及二級細胞階段，初級細胞外觀為小型原蟲空泡，大小約 5 到 9 μm ，文獻中指出感染初期或只有初級細胞感染下，難以在抹片或組織病理切片下觀察到，若有二級細胞出現較易於觀察 [5]，因此，本病需仰賴分子生物學方法檢測。

目前尚未完全明瞭類馬爾太蟲感染葡萄牙牡蠣後造成的影響範圍，自 112 年 2 月至 113 年 3 月期間 (除停養期)，持續監測陽性場狀況，監測期間尚無發現牡蠣養殖數量異常或死亡等情形。為防治本病，建議養殖戶選用無帶病種苗，防止疾病危害。

病例報告：葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 之類馬爾太蟲 (*Marteilioides chungmuensis*) 感染症



圖 1、牡蠣生殖腺外觀呈現大小不一團塊樣(箭頭)。

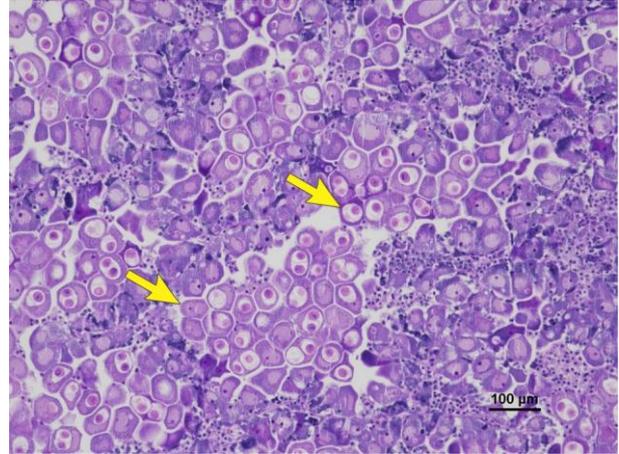


圖 2、卵巢，低倍下可見正常卵細胞構造消失被大量不同形狀和大小之孢子取代(箭頭)。(scale bar = 100 μm)

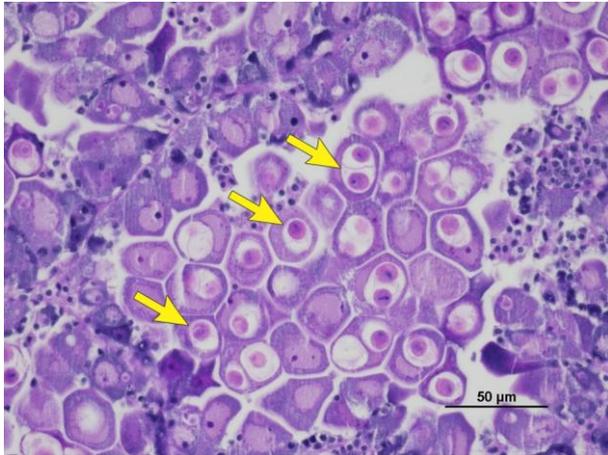


圖 3、卵巢，大量卵母細胞有原蟲之二級細胞 (secondary cell) 感染(箭頭)。(scale bar = 50 μm)

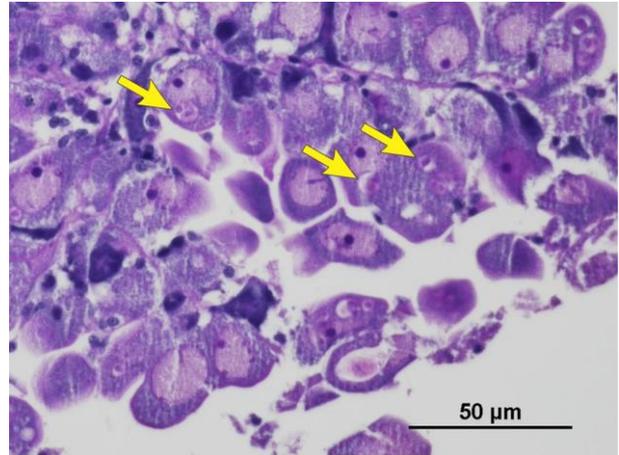


圖 4、卵巢，未成熟卵母細胞之細胞質可見小型原蟲空泡(箭頭)，為原蟲之初級細胞 (primary cell) 感染。(scale bar = 50 μm)

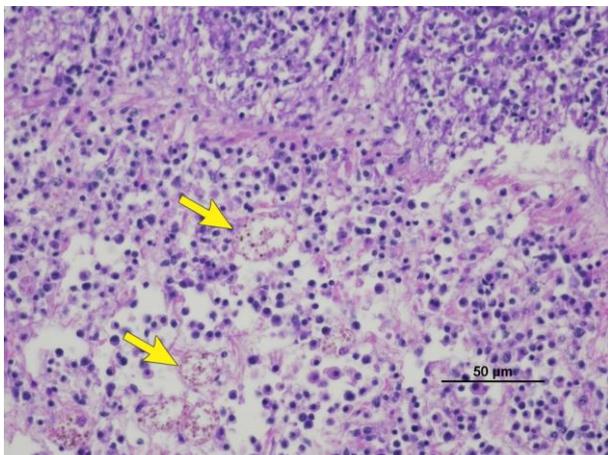


圖 5、消化腺，腸道黏膜下層結締組織可見大區域壞死(箭頭)，大量巨噬細胞和淋巴球浸潤。(scale bar = 50 μm)

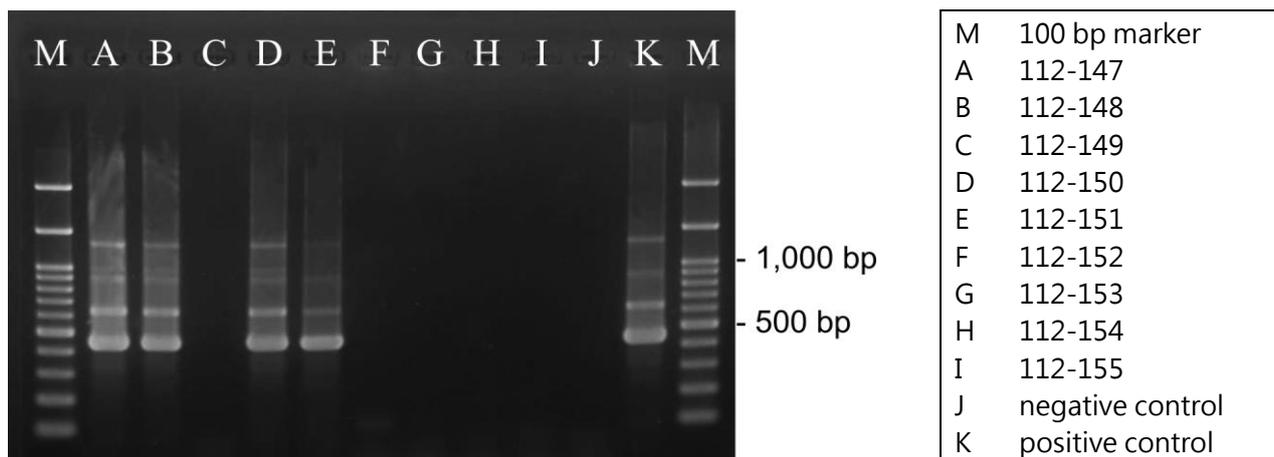


圖 6、以 *Marteilioides chungmuensis* 18S rDNA 基因第二段引子進行 Nested-PCR 方法檢驗檢查，其中 lane A、lane B、lane D 和 lane E 為檢出，有增幅 447 bp 預期片段，lane C、lane F、lane G、lane H 和 lane I 未增幅出預期片段，lane J：negative control；lane K：positive control。

參考文獻

1. Cochenne N, Le Roux F, Berthe F, Gerard A. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J Invertebr Pathol*, 76:26–32, 2000.
2. Imai T, Mori K, Sugawara Y, Tamate H, Oizumi J, Itakawa O. Studies on the mass mortality of oysters in Matsushima Bay VII. Pathogenetic investigation. *Tohoku J Agric Res*, 19:250–265, 1968.
3. Itoh N, Oda T, Ogawa K and Wakabayashi H. Identification and development of a paramyxean ovarian parasite in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Pathol*, 37:23–28, 2002a.
4. Itoh N, Oda T, Ogawa K. *Marteiloides chungmuensis* (*Paramyxea*), an intracellular parasite of the ovocyte of Pacific oyster *Crassostrea gigas*: isolation and sequencing of small subunit ribosomal DNA. In: Handbook and Abstracts, Fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 97, 2002b.
5. Itoh, N, Oda T, Yoshinaga T, Ogawa K. DNA probes for detection of *Marteiloides chungmuensis* from the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Pathol*, 38:163–169, 2003.
6. Itoh N, Tun KL, Komiyama H, Ueki N and Ogawa K. An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasite *Marteiloides chungmuensis*. *J Fish Dis*, 27:311–314, 2004a.
7. Le Roux F, Lorenzo G, Peyret P, Audemard C, Figueras A, Vivarès C, Gouy M, Berthe F. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J Euk Microbiol*, 48:449–454, 2001.
8. Meyers T. Martelliasis and marteiloidiasis of shellfish. In: Fish Health Section Blue Book. 2014 Edition. American Fisheries Society's Fish Health Section. Chapter 5.2.9, 2006.
9. Moss JA, Bureson EM, Reece KS. Advanced *Perkinus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J Shellfish Res*, 25:65–72, 2006.
10. NACA, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Retrieved from <https://library.enaca.org/Health/FieldGuide/pdf/Infection%20with%20Marteiloides%20chungmuensis.pdf>. 2007.
11. Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS. Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteiloides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ*, 56:259–267, 2003.
12. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.4 Infection with ostreid herpesvirus 1, 2019.
13. Park MS, Chun SK. On the *Marteilia* sp. infection in the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Bull Fish Res Develop Agency*, 39:105–109, 1986.
14. Tun KL, Itoh N, Ueki N, Yoshinaga T and Ogawa K. Relationship between *Marteiloides chungmuensis* infection and reproduction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*, 96:205–212, 2007.
15. WOA, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2024.
16. Yanin L, Kang HS, Hong HK, Jeung HD, Kim BK, Le TC, Kim YO, Choi KS. Molecular and histological identification of *Marteiloides* infection in Suminoe Oyster *Crassostrea ariakensis*, Manila Clam *Ruditapes philippinarum* and Pacific Oyster *Crassostrea gigas* on the southcoast of Korea. *J Invertebr Pathol*, 114:277–284, 2013.

Case report: protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis* infection of Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*)

CH Wu^{*}, IW Chen, YP Lu, YJ Lin

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract *Marteilioides chungmuensis* is a parasite of oysters that can cause nodule-like growths in the ovaries and nutritional wasting in infected female oysters, potentially affecting their marketability due to appearance changes. In February 2023, *M. chungmuensis* was detected in farmed Portuguese oysters (*Crassostrea angulata*) from the southern coastal areas of Taiwan. Clinical signs included irregular nodule-like structures in the gonads (1/3 of cases) and extensive periphyton attached to the oysters. Histological examination revealed infected oocytes containing protozoan primary and secondary cells in their cytoplasm. The ovarian follicles were filled with distorted ova containing *M. chungmuensis*. PCR screening of the tissues using specific primer pairs confirmed the presence of *M. chungmuensis*. Based on the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), the 18S rDNA gene sequence showed the closest similarity (100% identity) to *M. chungmuensis* previously discovered in *C. gigas* and *C. ariakensis*. This study represents the first report of *M. chungmuensis* infection in farmed *C. angulata* in Taiwan.

Keywords: *Marteilioides chungmuensis*, Oyster, Protozoa, Histopathology, PCR

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture