

文章编号: 1000-0615(2019)04-1154-08

DOI: 10.11964/jfc.20180111133

## 框镜鲤肠管单极虫病的组织病理学分析及分子鉴定

叶彩燕<sup>1</sup>, 汪开毓<sup>1,2\*</sup>, 何琦瑶<sup>1</sup>, 杨倩<sup>1</sup>, 刘韬<sup>1</sup>, 余泽辉<sup>1</sup>,  
谢恒<sup>1</sup>, 何晟毓<sup>1</sup>, 何洁<sup>1</sup>, 赵武义<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川成都 611130;

2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川成都 611130)

**摘要:** 2017年6月, 四川德阳某养殖场的框镜鲤患病且大量死亡。主要症状为腹部膨大, 肠管有大小不等的肿物。为明确其死亡病因, 进行了细菌学、寄生虫形态学观察, 组织病理学和PCR检测。细菌学检查为阴性; 病理组织学观察发现肠道的损伤最为严重, 表现为有大量寄生虫样孢囊突出于肠管。寄生虫形态学观察可见孢子长约23~30 μm, 宽10~15 μm, 极囊长11~15 μm, 呈长卵圆形, 约占孢子长的1/3~1/2, 孢子外面被有一层无色透明的薄膜, 前端孢子质中有一个大核和两个小核, 与单极虫形态一致; 针对吉陶单极虫的18S SSUrRNA基因进行巢式PCR检测, 扩增出大小为716 bp的目的片段(命名为TKF-1), 目的条带的测序和序列分析结果表明其为吉陶单极虫。根据组织病理特点及PCR检测结果确认框镜鲤的死亡是感染吉陶单极虫所致。

**关键词:** 框镜鲤; 吉陶单极虫; 组织病理; PCR检测

**中图分类号:** S 941.51<sup>+3</sup>

**文献标志码:** A

框镜鲤(*Cyprinus carpio* var. *specularis*)又称镜鲤或裸框镜鲤, 隶属于辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲤属(*Cyprinus*)。原产于欧洲, 是一种易驯养、肉质鲜美、生长快的杂食性鱼类。自20世纪80年代引入我国后, 现已成为我国北方重要的淡水养殖品种之一。但因其抗逆性差, 疾病时有发生<sup>[1-2]</sup>。

吉陶单极虫(*Thelohanellus kitauei*)属粘孢子纲(Myxosporozoa)、双壳目(Bivalvulida)、单极虫科(Thelohanellidae)、单极虫属(*Thelohanellus*), 通常在寄主肠腔内形成肉眼可见的灰白色孢囊。通过光学显微镜对新鲜孢子进行形态测量发现, 该虫体的新鲜孢子基本形态呈囊形或梨形, 后端钝圆, 向前一端逐渐尖细。壳面光滑无皱褶。孢子长约29.8~35 μm, 宽约7~12.3 μm。典型为1个极囊, 极囊内部为螺旋状, 极囊长19~25 μm、宽为7 μm。孢质中有一个大核和两个小核, 孢子中部有一个嗜碘泡<sup>[3-4]</sup>。20世纪80年代, 日本学者

首次在黑鲤肠道中发现吉陶单极虫<sup>[5]</sup>, 随后韩国、中国等亚洲国家也有该病的零星报道。近期, Ye等<sup>[6]</sup>报道了四川雅安地区框镜鲤感染吉陶单极虫的案例。

2017年6月, 四川德阳某养殖场的框镜鲤患病, 该病具有传染性并造成大量死亡, 发病鱼多为成鱼, 使用抗生素等药物几乎无效。养殖户自行解剖发病鱼发现肠道有许多肿块, 疑似“怪病”。本研究中心前往现场诊断, 随机采集患病框镜鲤, 大体观察发现部分鱼腹部膨大, 剖开腹腔可见肠壁上有一些大小不一的肿块, 肿物表面有完整包膜, 且有血管分布。肿物呈灰白色、质地柔软, 易与肠壁分离。此病例十分少见, 从初步分析怀疑为增生或肿瘤等。为进一步确诊, 进行了肿物压片涂片观察、病原学及病理学诊断。通过病理学诊断, 在光学显微镜下观察到了大量寄生虫孢囊, 高倍油镜下可见寄生虫, 形态似单极虫, 最后进行了单极虫

收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-05-07

资助项目: 四川省科技厅应用基础项目(2014JY0143); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

特异性分子鉴定,结果为阳性。初步判定框镜鲤的死亡系由吉陶单极虫感染所致。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象及主要试剂

病鱼为四川德阳某养殖场自然发病濒死框镜鲤(体长21 cm左右,体质量800 g),用于剖检观察、采集病料、病原分离鉴定等。LB培养基购自青岛海博生物技术有限公司;动物基因组DNA提取试剂盒及DNA Marker DL2000均购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR及相关试剂均购自成都擎科梓熙生物技术有限公司。

### 1.2 细菌检测

按无菌操作要求,对病鱼进行体表消毒后,用接种环从肝、脾、肾及肿块等组织取样,并接种LB琼脂培养基,于28 °C培养箱中培养24 h。

### 1.3 病理组织学检查

取病鱼进行病理剖检,观察各脏器组织的眼观病理变化。并采集病鱼的鳃、肝脏、脾脏、肾脏、脑等组织,重点采集发病鱼肠道及肿物组织,100 mL/L中性福尔马林固定,石蜡包埋切片,切片厚度为5 μm。苏木素伊红(H.E)染色,树胶封片,Nikon55i显微镜观察组织病变并拍照。

### 1.4 PCR检测及系统发育树分析

扩增18S rRNA基因的通用引物:5'-ACCT-GGTTGATCCTGCCAG-3'/5'-CTTCCGCAGGTTCA-CCTACGG-3',针对单极虫18S SSUrRNA基因的特异性引物:5'-GCCAGTAATCTACTATTC-GACG-3'/5'-GCTATTGATCTGTAAATCCTATC-3'<sup>[7]</sup>,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。按照动物组织基因组提取试剂盒操作提取肠道肿物组织DNA,以其为模板,进行真核生物通用18S rRNA基因扩增。反应参数:94 °C 5 min;94 °C 30 s、58 °C 1 min、72 °C 90 s,30个循环;72 °C 10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳后,在紫外凝胶成像系统下观察结果。将第一次PCR扩增产物作为模板进行单极虫特异性18S SSUrRNA基因PCR扩增。反应参数:94 °C 5 min;94 °C 30 s、51 °C 1 min、72 °C 90 s,30个循环;72 °C 10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,并由成都擎科生物有限公司测序。

将测得的DNA序列通过NCBI核酸数据库中的BLAST与GenBank中已报道的DNA序列进行同源性比对,下载同源性较高的序列,采用MEGA 6.06软件中的Neighbor-Joining建立系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 患病鱼临床症状与剖检变化

发病鱼精神萎靡,食欲减退或停食,游动时常浮在水面,身体失去平衡,侧游,浮边。死亡多发于清晨,死亡率低(5%/d~10%/d)但持续出现死亡,造成的累积死亡率>50%。死亡鱼腹部轻微膨胀(图版 I -1)。剖检可见肠管上有肿物,肿物主要生长在肠壁外层,随着肿块的增大逐渐向肠腔内突入(图版 I -2),因此在剪开肠管时可见肠腔内也有许多大小不一的肿块,肿物直径2 cm左右,大的肿物可达3 cm×4 cm(图版 I -3),有的肠段肠腔甚至被肿块堵塞(图版 I -4)。肿物表面黏腻,颜色为灰白色,有完整包膜,表面有血管分布(图版 I -5)。肿物呈椭圆形或圆形,有的肿块与肠壁之间仅有一细颈结构相连,形似梨状(图版 I -6)。剖开单个肿物,内部为实心,切面灰白色,纹理细致呈石蜡样(图版 I -7)。

### 2.2 细菌学检查

从肝、脾、肾及肿块等组织取样,并接种LB琼脂培养基,于28 °C培养箱中培养24 h后未见细菌生长。

### 2.3 孢子形态观察

取肠道肿物新鲜触片可见大量虫体,在光学显微镜下可以观察到虫体呈“泪滴状”,孢子长23~30 μm,宽10~15 μm,极囊长11~15 μm,呈长卵圆形,约占孢子长的1/3~1/2(图版 II -1),与吉陶单极虫形态极为相似;吉陶单极虫孢子一般较大,呈梨形或囊形;新鲜孢子触片结晶紫染色观察可见孢子中部有一个圆形液泡(图版 II -2);组织切片H.E染色观察发现孢子外面覆有一层无色透明的薄膜,虫体孢质中有1个大核和2个小核,极囊内呈缠绕状(图版 II -3);综合图版 II -1、II -2、II -3及参考文献<sup>[5]</sup>可绘制虫体的模式图(图版 II -4)。

### 2.4 组织病理学检查

各器官组织切片经H.E染色后,可见病变主



图版 I 患病框镜鲤

1. 腹部膨胀；2. 肿块突入肠腔(→)；3. 大小不一的肿块(→)；4. 肠腔被肿块堵塞(→)；5. 肿物表面黏腻，颜色灰白，有完整包膜，表面有血管分布；6. 肿块与肠壁之间仅有一细颈结构相连，形似梨状(→)；7. 肿物切面纹理细致呈石蜡样

Plate I Sick *C. carpio* var. *specularis*

1. abdominal distention; 2. masses noted in intestine lumen(→); 3. swellings in different sizes(→); 4. swelling blockade the intestinal lumen(→); 5. the swelling is gooey, gray, completely enveloped and has a vascular distribution on the surface; 6. one pear-shaped slender neck structure connection between swelling and intestine (→); 7. swelling section as meticulous as paraffin

要集中在肠道。低倍镜下观察，肠壁有向肠腔生长的实心肿块，肿块内有大量密集分布的细粒状物质，外面有一层包膜，肿块与肠壁相连(图版 III-1)；中倍镜下，肿块内充满了大量小管状结构，称为营养体(vegetative)(图版 III-2)，成熟和未成熟的营养体均有完整的管壁(图版 III-3)，营养体内部充满大量不同发育阶段的孢子(spores)，

成熟的孢子即为单极虫(图版 III-4)。高倍油镜下观察到寄生虫孢子呈“泪滴状”，有一个极囊，孢质中有2个小核和1个大核(图版 III-5)。肿块最外层多为肠上皮细胞覆盖(图版 III-6)，肿块所在处的肠组织受压萎缩，有的地方仅残留肠上皮组织(图版 III-7)。肿块周边残存的肠绒毛发生不同程度的萎缩，变短、变细、参差不齐，有的发生断裂，肿块周围的炎症反应不明显(图版 III-8)。有的肿块发展到一定程度出现破溃(图版 III-9)，肿块内的大量营养体释放入肠腔，肠腔内可见大量的孢子。

## 2.5 PCR检测及系统发育树分析

以肠道肿物组织提取的DNA为模板，第一次PCR扩增片段长度约为2 000 bp (图1-a)，第二次PCR扩增片段约为700 bp (图1-b)。经测序验证表明特异性片段为18S SSUrRNA (命名为TKF-1)。采用MEGA 6.06以18S SSUrRNA基因构建系统发育树，结果显示TKF-1与吉陶单极虫聚为一支(图2)，同源率为100%。

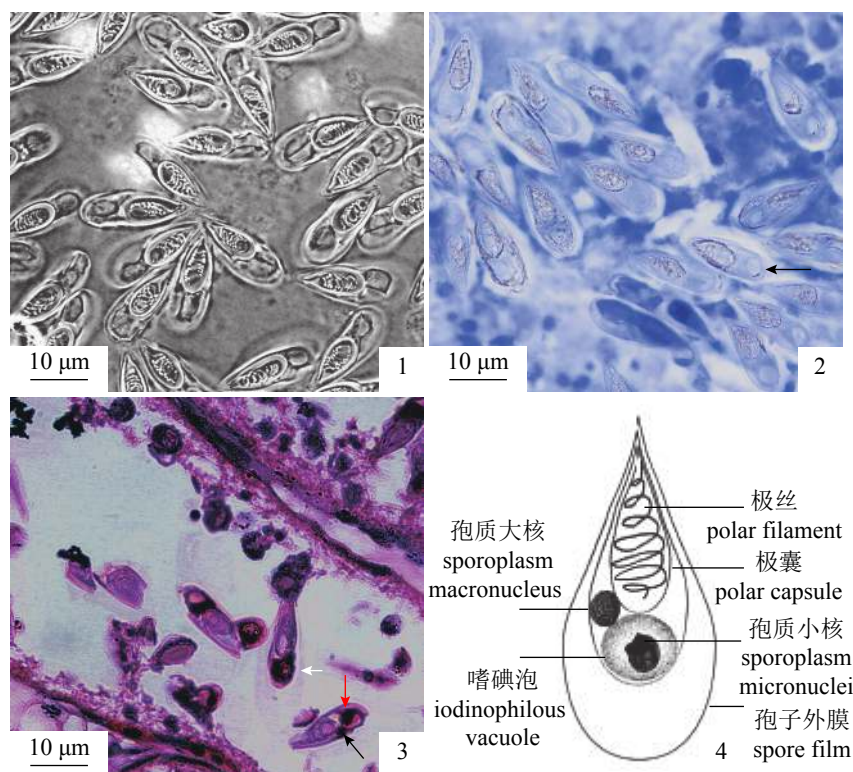
综合形态学、组织学和18S SSUrRNA基因序列的系统发育分析结果，判定TKF-1为吉陶单极虫。

## 3 讨论

吉陶单极虫常感染鲤，该病最初于1978年被确认发生在日本鹿儿岛县。此后，在日本九州、本州各地鲤养殖场及野生的鲤均有此病发生。直到1980年该病趋于停止，且本病被确认只发生于日本黑鲤。发病鱼一般为1龄以上的大鱼，初夏和盛夏时节发病较多。有报告指出，该虫在鲤群的寄生率为23%，其中死亡率可达40%(死亡率占整个鱼群的9%)<sup>[8]</sup>。病鱼主要症状为肠管上形成数量不等的肿物(即所谓孢囊)，此次患病框镜鲤的发病症状与感染吉陶单极虫的症状相近，且发病条件基本一致。

寄生虫形态学观察，可见孢囊内的寄生虫与吉陶单极虫也极为相似，初步怀疑框镜鲤的病因与其有关。但传统的形态学分类往往存在争议，且粘孢子虫某些属的寄生虫具有几乎一致的形态结构，如圆形碘泡虫(*Myxobolus rotundus*)和丑陋圆形碘泡虫(*M. turpisrotundus*)。另一方面，相同的基因型也会有不同的形态特征，利用普通的形态学方法很难区分<sup>[9]</sup>。近年来，随着分





图版 II 吉陶单极虫孢子形态观察

1. 新鲜孢子触片油镜下观察; 2. 新鲜孢子触片结晶紫染色观察见圆形液泡(→); 3. 孢子外面覆有一层无色透明的薄膜(白色→), 孢质中有1个大核(黑色→)和2个小核(红色→)(H.E); 4. 孢子模式图

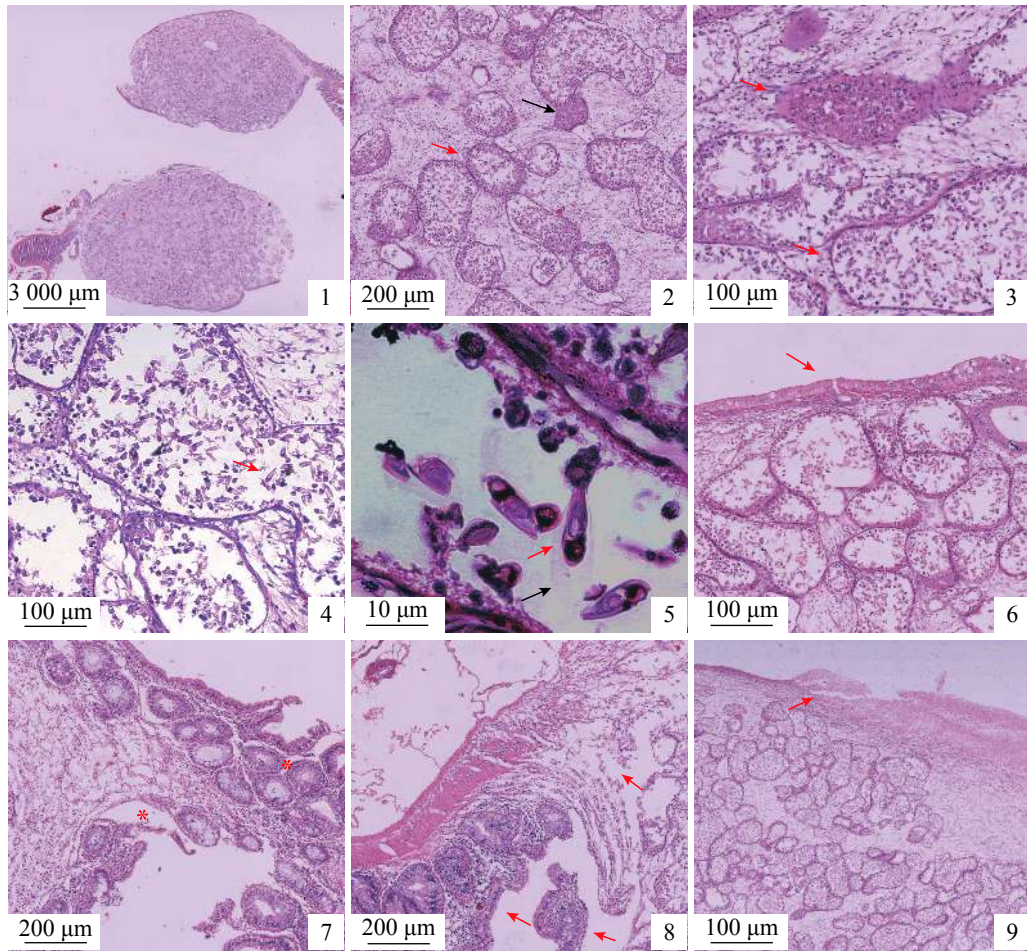
#### Plate II Sporomorphological observation of *T. kitauei*

1. fresh spores observed under oil immersion and photographed using light microscopy; 2. one round vacuole was observed under oil immersion using crystal violet staining (arrow); 3. one sack (white arrow), one macronucleus (black arrow) and two nuclei (red arrow) were observed in the sporoplasm under oil immersion (hematoxylin and eosin staining); 4. spores of *T. kitauei*

子生物学的迅速发展, 学者们利用18S SSUrRNA 序列分子分类方法对粘孢子虫进行了更为准确的分类。rRNA基因(rDNA)在生物进化的过程中相对保守, 且为多拷贝基因, 其拷贝数可达几十甚至几千, 为公认的真核生物“持家基因”, 在生物的基因分类鉴定中应用广泛<sup>[10]</sup>。吉陶单极虫小亚单位核糖体核糖核酸(SSUrRNA)编码基因不同于其他真核生物, 由于在不同种属的单极虫间存在差异且在虫体内含量非常丰富, 是理想的吉陶单极虫核酸诊断靶基因<sup>[9]</sup>。本研究为进一步确认该分离虫株的分类地位, 故进行吉陶单极虫18S SSUrRNA基因的特异性PCR检测, 结果为阳性。系统进化树显示该序列与中国四川雅安株(登录号: JQ690367)、韩国株(登录号: HM62-4024)、中国武汉株(登录号: KU664644)的吉陶单极虫聚为一支, 三株宿主分别为框镜鲤、以色列鲤、苏氏尾鳃蚓(*Branchiura sowerbyi*)。暗示

隶属无脊椎动物寡毛纲(Oligochaeta)的苏氏尾鳃蚓可能为吉陶单极虫的中间宿主。

目前, 有4种单极虫属的单极虫生活史已被阐述。即光滑单极虫(*T. hovorka*)、尼氏单极虫(*T. nikolskii*)、汪氏单极虫(*T. wangi*)、吉陶单极虫<sup>[11-13]</sup>, 且这些单极虫的发育阶段均与寡毛纲相关。Zhao等<sup>[14]</sup>应用形态学和分子技术将寡毛纲体内的吉陶单极虫孢子体分为两种类型: 放射孢子体1型和2型。其生活史: 吉陶单极虫在无脊椎动物苏氏尾鳃蚓体内繁殖出放射孢子体, 感染性放射孢子体感染脊椎动物如框镜鲤后, 在鱼体内发育为成虫, 随后成熟的营养体破溃后经鱼体排出成虫, 成虫再次在无脊椎动物苏氏尾鳃蚓体内繁殖为感染性放射孢子体。本研究病理组织学观察发现, 成熟的营养体破溃, 孢子释放入肠腔, 随后经鱼体排泄物进入水体并在底泥中的宿主体内发育, 进而感染其他鱼类。因此, 及



图版 III 框镜鲤吉陶单极虫感染的组织病理学变化

1. 肠道黏膜下层组织坏死，被肿物所取代；2. 大型的肿物内有許多管状结构，含成熟营养体(黑色→)和发育中的营养体(红色→)；3. 营养体均含有管壁(→)；4. 单个营养体内充满大量孢子；5. 寄生虫孢子呈泪滴状，有一个极囊(红色→)，外有一层薄膜(黑色→)；6. 肿块最外层多为肠上皮细胞覆盖(→)；7. 肿块所在处的肠组织受压萎缩，有的地方仅残留肠上皮组织(\*)；8. 肿块周边的肠绒毛发生不同程度的萎缩，变短、变细，有的发生断裂，炎症反应不明显(→)；9. 成熟营养体外缘破溃(→)

**Plate III Histopathological changes of *C. carpio* var. *specularis* infected by *T. kitauei* (H.E×100, ×200, ×400, ×1 000)**

1. the intestinal submucosa necrosis invaded by part of the section of a giant swelling; 2. large cystic structures filled up with matured single tubular vegetative forms (red →) and immature vegetative forms (black →); 3. all vegetative forms have walls; 4. the single plasmodia is infiltrated by amount of parasites; 5. the teardrop-shaped spore has a polar capsule (red →) and a sack (black →); 6. the outer layer of the large vegetative is surrounded by pseudostratified epithelial cell (→); 7. the intestinal tissues are atrophied near the lumps and left epithelium in some area(\*); 8. the intestinal villi near the mass are atrophied, got short and thinner and some of them ruptured but inflammation is not obvious(→); 9. the mature vegetative is broken(→)

时清理池塘底泥，以清除中间宿主保持养殖环境卫生是预防框镜鲤吉陶单极虫病的重要措施。

吉陶单极虫具有严格的宿主且寄生部位专一，曾报道感染的宿主有以色列鲤、框镜鲤等淡水鱼类<sup>[15]</sup>，其感染淡水鱼后主要寄生在肠道组织。本研究病理组织学观察发现，吉陶单极虫仅寄生在框镜鲤肠黏膜组织，肿物邻近的肠道组织受压萎缩，仅残留部分肠上皮组织，炎症反应不明显，且其他组织未见寄生。一般认为，该病引起鲤死亡是因为大型孢囊造成肠闭塞，

阻碍了宿主对营养的吸收，进而引起宿主营养缺乏甚至死亡。耐过的鱼可能康复，但尚不清楚详细过程。此外，本研究发现患病框镜鲤脑膜水肿充血，推测肠道的大量囊肿物压迫组织器官，引起血液循环障碍，从而导致脑部病变。

准确、快速、特异性地检测出吉陶单极虫是有效诊断和防治该病的关键。本研究结合形态学、病理学诊断方法和PCR方法对吉陶单极虫引起框镜鲤的疾病进行了确诊，其特异性强。为该病的防治提供了实验依据。



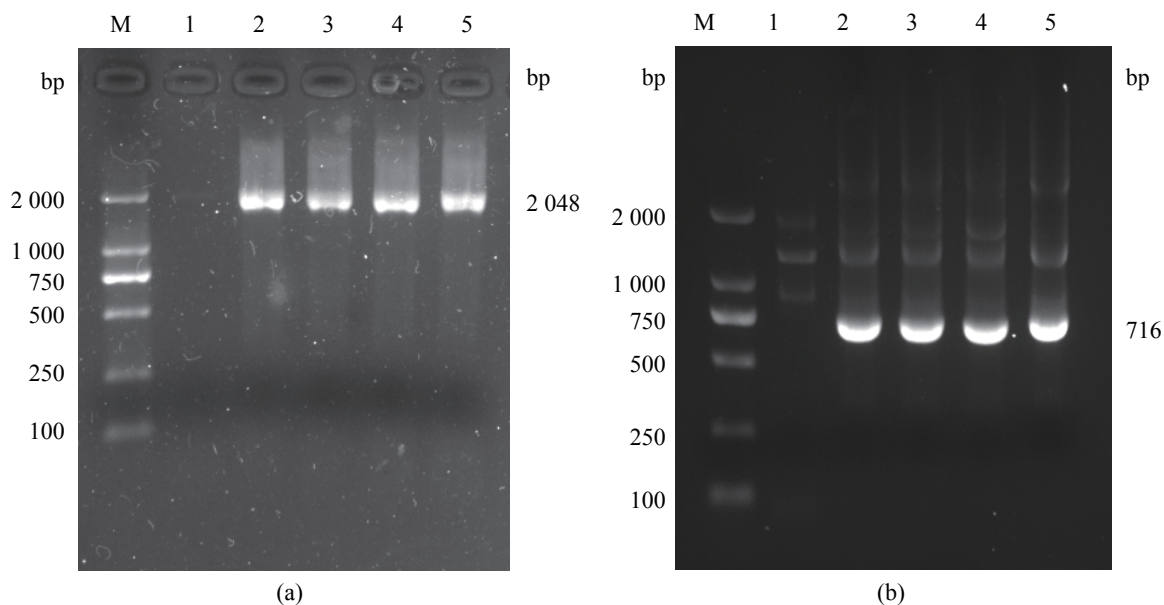


图 1 框镜鲤吉陶单极虫感染后肠道肿物DNA 18S rRNA基因的PCR (a) 及吉陶单极虫 18S SSUrRNA特异性PCR (b)检测结果

M. DL2000 DNA分子质量标准; 1. 阴性对照; 2~5. 肠道肿物DNA

Fig. 1 The results of the intestinal nodular tissue DNA 18S rRNA gene PCR (a) and the 18S SSUrRNA specific PCR (b)

M. DL2000 DNA Marker; 1. negative control; 2~5. the intestinal nodules tissue DNA

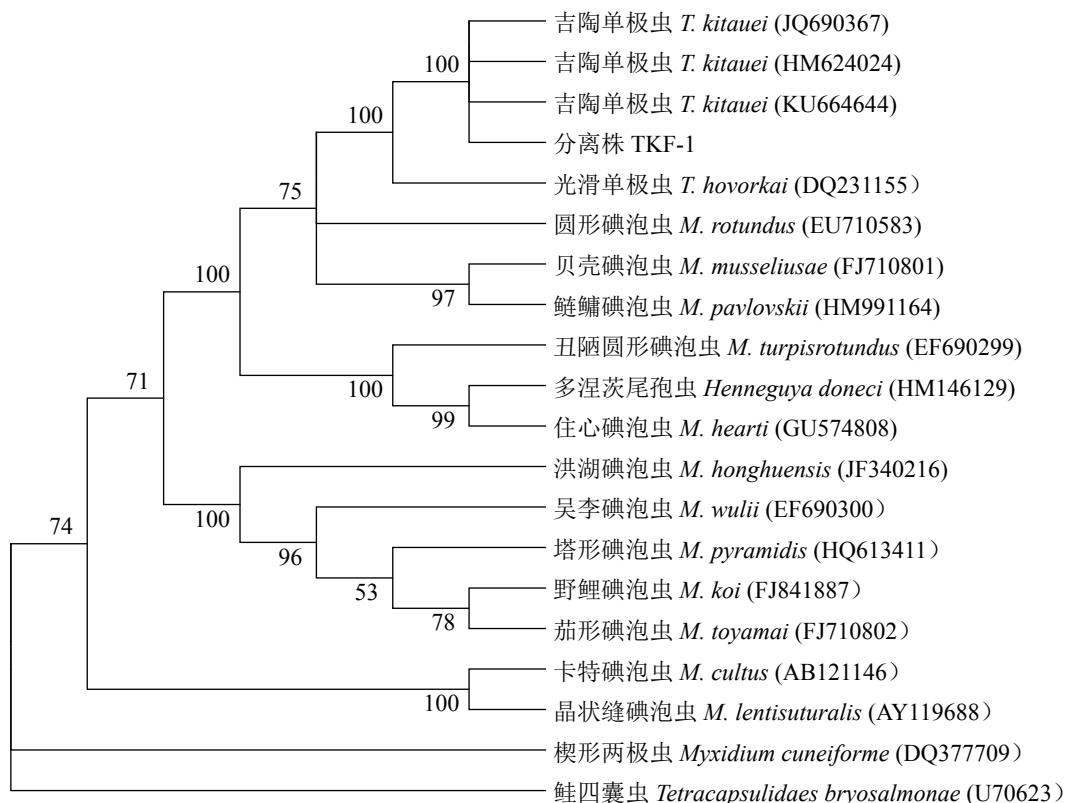


图 2 SSUrRNA基因的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of SSUrRNA gene

## 参考文献:

- [1] 龚倩, 高淑琴, 单晓枫, 等. 框镜鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(12): 981-983.
- Gong Q, Gao S Q, Shan X F, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* from *Cyprinus carpio*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(12): 981-983(in Chinese).
- [2] 吕大成, 单晓枫. 框镜鲤嗜水气单胞菌的分离鉴定[J]. *畜牧与饲料科学*, 2011, 32(8): 15-16.
- Lü D C, Shan X F. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from *Cyprinus carpio carpio*[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2011, 32(8): 15-16(in Chinese).
- [3] 张剑英, 邱兆祉, 丁雪娟. 鱼类寄生虫与寄生虫病[G]. 北京: 科学出版社, 1999.
- Zhang J Y, Qiu Z Z, Ding X J. Parasites and Parasitic Diseases of Fishes[G]. Beijing, China: Science Press, 1999(in Chinese).
- [4] Lom J, Arthur J R. A guideline for the preparation of species descriptions in *Myxosporea*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1989, 12(2): 151-156.
- [5] Egusa S, Nakajima K. A new myxozoa *Thelohanellus kitauei*, the cause of intestinal giant cystic disease of carp[J]. *Fish Pathology*, 1981, 15(3-4): 213-218.
- [6] Ye L T, Lu M M, Quan K Y, *et al.* Intestinal disease of scattered mirror carp *Cyprinus carpio* caused by *Thelohanellus kitauei* and notes on the morphology and phylogeny of the myxosporean from Sichuan Province, southwest China[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2017, 35(3): 587-596.
- [7] Seo J S, Jeon E J, Kim M S, *et al.* Molecular identification and real-time quantitative PCR (qPCR) for rapid detection of *Thelohanellus kitauei*, a myxozoan parasite causing intestinal giant cystic disease in the Israel carp[J]. *The Korean Journal of Parasitology*, 2012, 50(2): 103-111.
- [8] 畑井喜司雄, 小川和夫. 新鱼病图谱[M]. 任晓明, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
- Hatakai K, Ogawa K. New Atlas of Fish Diseases[M]. Ren X M, Trans. Beijing: China Agricultural University Press, 2007(in Chinese).
- [9] Eszterbauer E, Marton S, Rácz O Z, *et al.* Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification[J]. *Systematic Parasitology*, 2006, 65(2): 97-114.
- [10] 高世同, 张仁利, 黄晓燕, 等. 间日疟原虫孢子期 SSUrRNA 基因扩增、鉴定及其诊断应用[J]. *中国热带医学*, 2007, 7(2): 179-181.
- Gao S T, Zhang R L, Huang X Y, *et al.* Amplification of specific SSUrRNA gene sequence and its application in diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria[J]. *China Tropical Medicine*, 2007, 7(2): 179-181(in Chinese).
- [11] Yokoyama H. Transmission of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960(Myxosporea: Myxozoa) to common carp *Cyprinus carpio* through the alternate oligochaete host[J]. *Systematic Parasitology*, 1997, 36(2): 79-84.
- [12] Székely C, El-Mansy A, Molnár K, *et al.* Development of *Thelohanellus hovorkai* and *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporea: Myxozoa) in oligochaete alternate hosts[J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(3): 107-114.
- [13] Xi B W, Zhou Z G, Xie J, *et al.* Morphological and molecular characterization of actinosporeans infecting oligochaete *Branchiura sowerbyi* from Chinese carp ponds[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 114(3): 217-228.
- [14] Zhao D D, Borkhanuddin M H, Wang W M, *et al.* The life cycle of *Thelohanellus kitauei* (Myxozoa: Myxosporea) infecting common carp (*Cyprinus carpio*) involves aurantiactinomaxon in *Branchiura sowerbyi*[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(11): 4317-4325.
- [15] Rhee J K, Kim J O, Park B K. Prophylactic and therapeutic studies on intestinal giant-cystic disease of the Israel carp caused by *Thelohanellus kitauei*. II. Effects of physical and chemical factors on *T. kitauei* spores *in vitro*[J]. *The Korean Journal of Parasitology*, 1990, 28(4): 241-252.

## Pathohistological analysis and PCR detection of intestinal thelohanellosis in mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*)

YE Caiyan<sup>1</sup>, WANG Kaiyu<sup>1,2\*</sup>, HE Qiyao<sup>1</sup>, YANG Qian<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1</sup>,  
YU Zehui<sup>1</sup>, XIE Heng<sup>1</sup>, HE Shengyu<sup>1</sup>, HE Jie<sup>1</sup>, ZHAO Wuyi<sup>1</sup>

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province,  
Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In order to identify the pathogen which caused mass mortality in farmed *Cyprinus carpio* var. *specularis* in Deyang district of Sichuan Province, China, the pathogen of this event was determined following bacteriology, parasite morphological observation, histopathology and PCR detection. The results showed that bacteriological examination was negative whereas parasite was positive with *Thelohanellus kitauei*. Histologically, intestinal damage is the most serious, where a large number of parasitoid cysts were noted. Morphological observation showed that the total length and width of the spores were about 23–30  $\mu\text{m}$  and 10–15  $\mu\text{m}$ , respectively. In addition, the polar capsule was 11–15  $\mu\text{m}$  long and ovaellipsoidal, which accounted for about 1/3–1/2 of spores. The outer layer of the spores covered with a thin colorless and transparent film. One pyriform macronucleus was in the upper part and two globular micronuclei near the iodophilous vacuole. Tissue DNA from infected intestine was identified as *T. kitauei* (TKF-1) by nest polymerase chain reaction amplification of the 18S SSUrRNA gene and the sequenced 18S SSUrRNA gene of TKF-1 has a homology up to 100% with *T. kitauei* in GenBank. According to the results we confirmed that the death of *C. carpio* var. *specularis* in this region was caused by *T. kitauei*.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *specularis*; *Thelohanellus kitauei*; pathological observation; PCR detection

**Corresponding author:** WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

**Funding projects:** Sichuan Science and Technology Agency Application Foundation Project (2014JY0143); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848)