



## 乌鳢诺卡氏菌病致病菌的分离、鉴定及组织病理学观察

滕建<sup>1,2</sup>, 陈红菊<sup>1</sup>, 薛良义<sup>2</sup>, 李岩<sup>1</sup>, 路广金<sup>1</sup>,  
周敏<sup>1</sup>, 张冲<sup>1</sup>, 季相山<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315832)

**摘要:** 为研究乌鳢诺卡氏菌的致病机理, 本实验通过病原分离鉴定、组织病理学和基因表达水平分析对病原菌的致病性、药物敏感性及其对乌鳢的免疫抗性进行了研究。结果显示, 患病乌鳢主要感染了命名为 SDAT 0011 病原菌, 通过菌落形态观察、革兰氏染色鉴定、生理生化鉴定、16S *rRNA* 鉴定及诺卡氏菌特异序列扩增鉴定, 结果均显示该病原菌为鳢诺卡氏菌。将分离的 SDAT 0011 感染健康乌鳢后,  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL 注射组的死亡率均为 100%, 感染乌鳢出现明显的诺卡氏菌病症状, 如内脏出血, 肝脏、脾脏和肾脏中有大量大小不等的结节, 组织病理切片进一步检测发现, 结节分界清晰, 结节中有大量的淋巴细胞、受损或死亡的组织细胞。药物敏感性实验发现, 鳢诺卡氏菌对利福平等抗生素较为敏感, 对青霉素等具有较强的抗性。基因表达分析显示, 在感染初期 (48 h) 及中后期, Toll 样受体 2 基因 (*TLR2*) 和 Toll 样受体 13 基因 (*TLR13*) 在脾脏和头肾的表达水平显著上调, 而趋化因子受体 9 基因 (*CCR9*) 在脾脏和头肾中显著下调, 这表明乌鳢 Toll 样受体和趋化因子受体信号通路可能在其抵抗鳢诺卡氏菌感染中起重要作用。本实验为乌鳢诺卡氏菌病的治疗及其致病机理研究提供了重要的基础。

**关键词:** 乌鳢; 鳢诺卡氏菌; 诺卡氏菌病; 组织病理; 免疫基因

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.) 隶属于放线菌目 (Actinomycetales) 诺卡氏菌科 (Nocardiaceae), 为革兰氏阳性菌, 部分抗酸且好氧, 非运动型致病菌, 在自然界广泛分布于土壤、污泥和水体中<sup>[1-3]</sup>。广义上讲, 诺卡氏菌病是一种由诺卡氏菌感染引起的人畜共患细菌性疾病, 主要表现为组织化脓, 坏死或形成脓肿<sup>[4]</sup>。在水产养殖中, 鱼类诺卡氏菌病通常称为结节病, 是由鳢诺卡氏菌 (*N. seriolae*)、星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*)、杀鲑诺卡氏菌 (*N. salmonicida*) 和粗形诺卡氏菌 (*N. crassostrea*)

等病原引起的一种慢性肉芽肿病。患病鱼的典型临床症状为皮肤溃疡, 在肾脏、脾脏和肝脏等处有许多直径为 0.1~0.2 cm 白色结节<sup>[5-6]</sup>。鱼类诺卡氏菌病发病周期长, 感染率和死亡率都较高, 给水产养殖业带来较大的影响<sup>[7]</sup>。鳢诺卡氏菌是鱼类诺卡氏菌病的主要致病病原<sup>[8-10]</sup>, 能感染多种鱼类, 包括五条鳢 (*Seriola quinqueradiata*)<sup>[11]</sup>、乌鳢 (*Channa argus*)<sup>[8]</sup>、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)<sup>[12]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[13]</sup>、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)<sup>[14]</sup>、暗纹东方鲀 (*Fugu*

收稿日期: 2020-12-13 修回日期: 2021-04-28

资助项目: 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC013, 2019LZGC020); 山东省“双一流”奖补资金

第一作者: 滕建 (照片), 从事水产动物免疫与病害防控研究, E-mail: tengj@sdau.edu.cn

通信作者: 季相山, 从事水产遗传育种与健康养殖研究, E-mail: xsji@sdau.edu.cn



*obscurus*)<sup>[15]</sup>、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)<sup>[16]</sup> 及牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[17]</sup> 等。

乌鳢俗称黑鱼、乌鱼、蛇头鱼,隶属于鲈形目 (Perciformes) 鳢科 (Channidae) 鳢属 (*Channa*), 分布于中国各水系中<sup>[18-19]</sup>。野生条件下的乌鳢抗病力较强,但随着乌鳢集约化养殖程度的逐步提高,尤其在高温季节,养殖池塘水质差,养殖乌鳢较易发病<sup>[5,19]</sup>。诺卡氏菌病是近年来鳢科鱼类较为常见的疾病,先前关于养殖乌鳢感染诺卡氏菌的报道主要集中在浙江、广州、四川和安徽等省份,在2019年和2020年的6—8月,微山湖地区养殖乌鳢暴发了大规模的诺卡氏菌病,平均发病率约为35%,发病死亡率高达80%以上。本研究所用的患病乌鳢取自微山湖区的养殖池塘,患病鱼主要为1龄鱼,患病后上浮,游动缓慢,解剖后可观察到肝脏、脾脏、肾脏等出现大量白色结节。本研究对患病乌鳢体内分离出的病原菌进行菌落形态观察、革兰氏染色、生理生化以及16S *rRNA* 和诺卡氏菌特异序列扩增鉴定,初步确认该致病菌为鳢诺卡氏菌。通过致病菌回归感染健康乌鳢以确定其致病性,并对致病菌药物敏感性、患病乌鳢组织病理学和免疫相关基因表达变化进行了分析,为乌鳢诺卡氏菌病的治疗提供重要的数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

病鱼样本于2019年8月采自山东省微山县特种水产养殖试验场、微山县鲁桥镇某个体养殖池塘,体质量约100 g。主要症状为腹部膨大,内脏出现白色结节。健康乌鳢采自微山县鲁桥镇某乌鳢养殖池塘,规格为(22±3) g,实验前对乌鳢进行形态、活力检测,挑选腹部大小正常、皮肤光滑、完好无损、活力好的鱼作为备选健康乌鳢,并随机选取10%的健康乌鳢解剖,取肝脏和脾脏组织进行病理学检测,确保备选乌鳢健康后用于后续实验。

### 1.2 病原菌分离

选取濒死的患病乌鳢,无菌环境剖检鱼体,用接种环从乌鳢的腹水、脾脏、肝脏和肾脏等组织中取样并平板划线,接种于脑心浸萃琼脂培养基 (BHI), 28 °C 恒温培养 7~10 d, 从形态一致的优势菌群中挑取单菌落进一步纯化培养 3 代, 分

离菌株编号为 SDAT 0011。

### 1.3 病原菌形态观察

将分离纯化后的细菌分别划线接种于 BHI 和 TSA 固体培养基中, 28 °C 恒温培养, 5 d 后在体视显微镜下观察菌落形态, 同时对纯化细菌进行革兰氏染色和观察。

### 1.4 16S *rRNA* 序列扩增及诺卡氏菌特异性引物的 PCR 扩增和分析

**16S *rRNA* 序列 PCR 扩增分析** 接种纯化后的菌株于液体培养基中, 25 °C 振荡培养 5~7 d。取菌液 2 mL, 使用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取病原菌基因组 DNA。采用细菌 16S *rRNA* 通用引物 (上游引物: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3', 下游引物: 5'-TACGGCTACCT TGTTACGAC -3'), 进行 PCR 扩增。PCR 使用 TaKaRa 公司的 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶。PCR 循环参数: 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 10 s, 循环扩增 30 次。预计扩增片段为 1 500 bp, 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将 PCR 产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

**诺卡氏菌特异性引物 PCR 扩增分析** 以提取的病原菌 DNA 为模板, 参照 Labrie 等<sup>[20]</sup> 设计的诺卡氏菌特异性引物 N5F1/N5R1 (上游引物: 5'-TGAGCCTGAACTGCATGGTTC-3', 下游引物: 5' ACGGTATCGCAGCCCTCTGTA-3'), 进行 PCR 扩增, 验证分离得到的病原菌是否为诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.)。PCR 反应体系与程序和扩增 16S *rRNA* 的相同。预计扩增片段为 1 069 bp, PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 病原菌理化特性鉴定及药物敏感性测定

按照《常用细菌系统鉴定手册》<sup>[21]</sup> 方法, 并参照已有文献<sup>[22]</sup>, 应用细菌生化鉴定管对病原菌产生的酶类、水解活性、单一碳源生长等主要理化特性进行检测。

药物敏感性测定采用纸片扩散法, 药物纸片购自青岛海博生物技术有限公司。将冻存的诺卡氏菌接种于 BHI 液体培养基, 28 °C, 80 r/min 振荡培养 5 d 后, 8 000 r/min 离心收集菌液沉淀, 收集的沉淀用液体培养基稀释并调整至 1×10<sup>7</sup> CFU/mL, 吸取 20 μL 涂布在 BHI 固体培养基上, 用镊子夹取药敏纸片贴于 BHI 琼脂培养基表面, 28 °C 恒温培养 6~7 d, 使用游标卡尺测量抑菌圈直径。

## 1.6 回归感染实验

将病原菌接种于 BHI 液体培养基, 收集培养 5 d 的菌体, 经 0.9% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液, 分别稀释成  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  和  $1 \times 10^5$  CFU/mL 4 个浓度。选取健康的体质量为  $(22 \pm 3)$  g 的乌鳢 50 尾, 随机分为 5 个组, 每组 10 尾。4 个感染组, 每尾腹腔注射 200  $\mu$ L 菌液, 1 个对照组腹腔注射等量生理盐水。实验用塑料水箱 180 L, 实验期间, 养殖水温 26  $^{\circ}$ C~28  $^{\circ}$ C, 自然光照。实验连续观察 21 d, 每天记录乌鳢发病状况, 并记录死亡数量。

## 1.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

在感染 48、96 和 144 h 后, 分别取生理盐水对照组和  $1 \times 10^7$  CFU/mL<sup>[14, 23-24]</sup> 注射组乌鳢的脾脏和头肾组织提取 RNA。用反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国) 对提取的 RNA 进行反转录反应。使用 Roche Light Cycler<sup>®</sup>96 仪器, 以 SYBR Green (TaKaRa, 中国) 作为荧光染料, 在 20  $\mu$ L 反应体积中进行 qRT-PCR 反应。引物信息: *TLR2* (上游引物: 5'-CTCATCATCATCTGTGTTGC-3', 下游引物: 5'-GGGGTTTTGGTTATCCTCTA-3'); *TLR13* (上游引物: 5'-CCTGTTTATGGTGTGTCC-3', 下游引物: 5'-AGTCTCCAGCCCTGTTCTC-3'); *CCR9*: (上游引物: 5'-AGCCATAACACGAAGAGAA-3', 下游引物: 5'-CCAGGAGA GTGGAGACAATC-3'); 内参基因  *$\beta$ -actin* (上游引物: 5'-CACTGTGC CCATCTACGAG-3', 下游引物: 5'-CCATCTCCT GCTCGAAGTC-3')。实验以  *$\beta$ -actin* 作为内参基因, 通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  的方法计算目的基因的表达变化, 数据表示为相对于对照组的倍数变化。实验数据均采用平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。使用 SPSS 22 软件进行数据分析。利用 *t* 检验进行统计学分

析。以  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 1.8 组织病理学观察

在感染后第 6 天, 分别取对照组和  $1 \times 10^7$  CFU/mL 注射组乌鳢的脾脏、肝脏、体肾和心脏组织样本, 用 Bouin's 固定液, 样品经过石蜡包埋切片, 苏木素-伊红 (H.E) 染色, 中性树脂封片, 在普通光学显微镜观察并采集和分析图像。

## 2 结果

### 2.1 分离菌株 SDAT 0011 形态特征

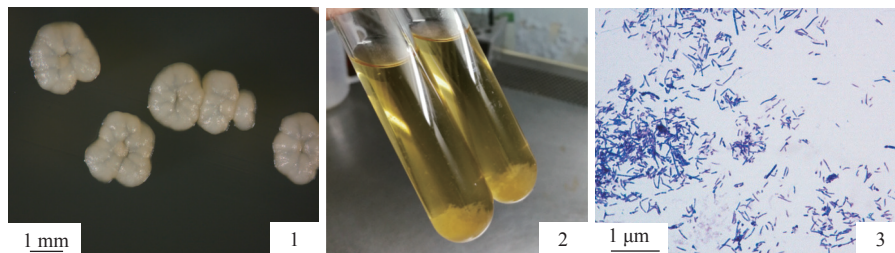
分离得到的初代病原菌生长缓慢, 在 BHI 或 TSA 固体培养基上 28  $^{\circ}$ C 培养 7 d 才有少数菌落出现。在体视显微镜下观察, 固体培养基上的菌落呈白色或淡黄色, 早期 (6~8 d) 呈沙粒状, 边缘不规则, 8 d 后菌落出现较大皱褶 (图版 I-1)。在液体培养基中菌体呈絮状沉淀, 在培养基底部, 培养基透明, 且在培养基液面出现一层菌膜 (图版 I-2)。病原菌革兰氏染色呈阳性 (蓝紫色) (图版 I-3)。

### 2.2 SDAT 0011 生理生化特征

分离的菌株 SDAT 0011 过氧化氢酶呈阳性, 氧化酶、脲酶呈阴性, 可还原硝酸盐; 可水解七叶灵, 不水解明胶、淀粉、酪素、黄嘌呤和酪氨酸; 能以柠檬酸盐为唯一碳源生长, 不能在 35  $^{\circ}$ C 及以上生长, 该菌的主要生理生化特征同参考菌株鲫诺卡氏菌 JCM3360<sup>[1]</sup> 的特征一致, 具备了诺卡氏菌属基本特征 (表 1)。

### 2.3 SDAT 0011 菌株 16S rRNA 序列及诺卡氏菌特异性引物 PCR 扩增分析

采用通用扩增病原菌 16S rRNA 的引物进行 PCR 扩增, 测序所得产物共 1 358 bp, 序列提交



图版 I SDAT 0011 生长菌落形态和革兰氏染色结果

1. BHI 固体培养基上淡黄色菌落; 2. BHI 液态培养基中菌呈絮状; 3. 菌株革兰氏染色呈阳性 (蓝紫色)

### Plate I Morphological and Gram staining result of strain SDAT0011

1. the bacterial colony was light yellow on the BHI solid medium; 2. the bacterial colonies were flocculent in the BHI liquid medium; 3. the Gram staining of the strain SDAT 0011 was positive (blue purple)



表 1 分离菌株的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biological characteristics of isolated strains

| 鉴定项目<br>items                                | 鲈诺卡氏菌<br>SDAT 0011<br><i>N. seriolea</i><br>SDAT 0011 | 鲈诺卡氏菌<br>JCM 3360<br><i>N. seriolae</i><br>JCM 3360 |
|--|---|---|
| <b>酶活性 enzymes activity</b>                  |   |   |
| 过氧化氢酶 catalase                               | +   | +   |
| 氧化酶 oxidase                                  | -   | -   |
| 脲酶 urease                                    | -   | -   |
| 硝酸盐还原 nitrate reduction                      | +   | +   |
| <b>水解活性 hydrolyzing activity</b>             |   |   |
| 七叶灵 aesculin                                 | +   | +   |
| 明胶 gelatin                                   | -   | -   |
| 淀粉 starch                                    | -   | -   |
| 酪素 casein                                    | -   | -   |
| 黄嘌呤 xanthine                                 | -   | -   |
| 酪氨酸 tyrosine                                 | -   | -   |
| <b>唯一碳源利用 growth on sole carbon sources</b>  |   |   |
| 甘露醇 mannitol                                 | -   | -   |
| 山梨醇 sorbitol                                 | -   | -   |
| 柠檬酸盐 citrate                                 | +   | +   |
| 阿拉伯糖 arabinose                               | -   | -   |
| <b>温度、pH耐受性 tolerance of temperature, pH</b> |   |   |
| 35 °C生长 growth at 35 °C                      | -   | -   |
| 40 °C生长 growth at 40 °C                      | -   | -   |

注: +, 阳性反应, - 阴性反应

Notes: "+" for positive, "-" for negative

至 NCBI 获得 GenBank 登录号为 MW063451, 序列经 Blast 比对分析, 用 Clustalx 软件包进行多重序列比对分析并用 Neighbor-joining 构建系统发育

树。结果显示, 鲈诺卡氏菌 DSM 44129 (NR 041861.1)、鲈诺卡氏菌 ATCC 43993 (NR 119103.1)、鲈诺卡氏菌 JCM3360 (NR115839.1)、鲈诺卡氏菌 ATCC 43993 (NR 117346.1) 先聚为一支。菌株 SDAT 0011 与上述菌株聚成一个集中于鲈诺卡氏菌的 rRNA 亚群 (图 1)。SDAT 0011 序列与 rRNA/ITS 数据库进行比对, 结果显示, SDAT 0011 与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近, 相似性为 96.98%~99.92%, 与鲈诺卡氏菌 ATCC43993 最为接近, 只有 7 个碱基的差异, 以此鉴定该病原菌株为鲈诺卡氏菌 (表 2)。

参照 Labrie 等<sup>[20]</sup>提出的方法, 使用鲈诺卡氏菌特异性引物对从腹水、肝脏、脾脏和中肾分离的病原菌进行 PCR 鉴定, 结果显示, 在 1 000 bp 处得到预期大小的单一条带, 表明该分离菌株为鲈诺卡氏菌 (图 2)。

## 2.4 SDAT 0011 致病力及感染 SDAT 0011 后的乌鳢组织病理学分析

回归感染实验结果发现, 对照组在 21 d 内无任何症状, 死亡率为 0。而  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL 感染组最晚到注射后第 21 天全部死亡, 但每组开始出现死亡个体及全部死亡所持续时间不同。2 个高浓度注射组 ( $1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^7$  CFU/mL), 在感染 7 d 后开始出现死亡个体,  $1 \times 10^8$  CFU/mL 组乌鳢在第 11 天全部死亡,  $1 \times 10^7$  CFU/mL 组乌鳢在第 12 天全部死亡。2 个低浓度注射组 ( $1 \times 10^6$  和  $1 \times 10^5$  CFU/mL) 较高浓度组开始出现死亡个体的时间稍晚, 全部死亡持续时间也较长,  $1 \times 10^6$  CFU/mL 组乌鳢在注射病原菌第 9 天开始出现死亡个体, 在第 15 天所有注射乌鳢全部死亡,

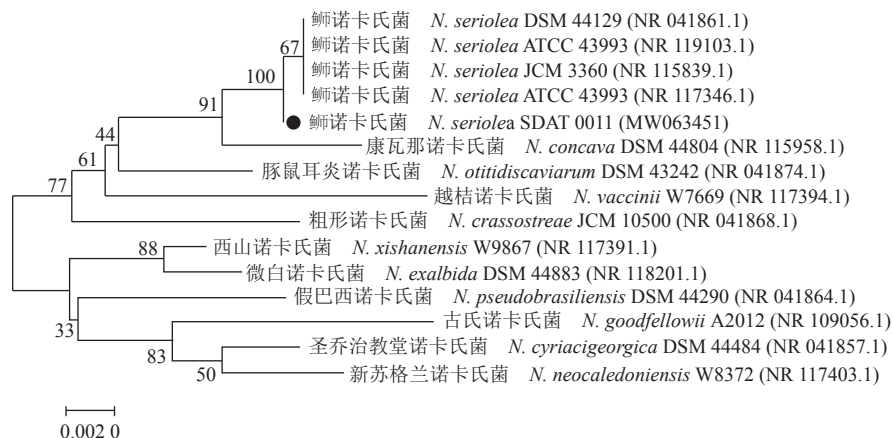


图 1 基于菌株 SDAT 0011 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of the strain SDAT 0011

表 2 SDAT 0011 与诺卡氏菌属不同菌株的序列相似性

Tab. 2 Percent identity between SDAT 0011 and different strains of *Nocardia*

| 菌株 strains                                     | 序列相似度/% percent identity |
|--|--------------------------|
| 狮诺卡氏菌 <i>N. serioleae</i> ATCC 43993           | 99.92                    |
| 狮诺卡氏菌 <i>N. serioleae</i> DSM 44129            | 99.84                    |
| 狮诺卡氏菌 <i>N. serioleae</i> JCM 3360             | 99.92                    |
| 康瓦那诺卡氏菌 <i>N. concava</i> DSM 44804            | 99.10                    |
| 豚鼠耳炎诺卡氏菌 <i>N. otitidiscaviarum</i> DSM 43242  | 98.45                    |
| 越桔诺卡氏菌 <i>N. vaccinii</i> W7669                | 97.80                    |
| 粗形诺卡氏菌 <i>N. crassostreae</i> JCM 10500        | 98.19                    |
| 西山诺卡氏菌 <i>N. xishanensis</i> W9867             | 98.29                    |
| 微白诺卡氏菌 <i>N. exalbida</i> DSM 44883            | 97.96                    |
| 新苏格兰诺卡氏菌 <i>N. neocaledoniensis</i> W8372      | 97.30                    |
| 假巴西诺卡氏菌 <i>N. pseudobrasiliensis</i> DSM 44290 | 97.54                    |
| 圣乔治教堂诺卡氏菌 <i>N. cyriacigeorgica</i> DSM 44484  | 97.62                    |
| 古氏诺卡氏菌 <i>N. goodfellowii</i> A2012            | 96.98                    |

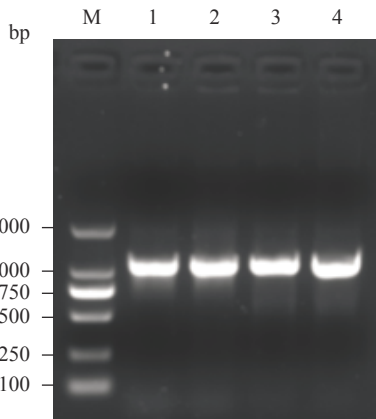


图 2 特异性引物 PCR 鉴定患病乌鳢病原菌

M. DNA 分子量标准; 1-4. 分离自然患病乌鳢腹水、肝脏、脾脏和中肾的病原菌

Fig. 2 Specific detection of the isolated bacteria from diseased *C. argus* by PCR

M. DNA Marker 2000; 1-4. bacteria isolated from abdominal ascites, liver, spleen and kidney

1 × 10<sup>5</sup> CFU/mL 注射组乌鳢在第 15 天开始出现死亡个体, 在第 21 天全部死亡 (图 3)。

回归感染的病鱼剖检后显示, 病鱼游动迟缓、体表出血、腹部膨大, 有的伴有肛门红肿, 少数病鱼眼球突出。解剖濒死的乌鳢, 发现其腹部有大量腹水; 肝脏、脾脏和肾脏肿大, 表面有出血点, 同时有典型的直径为 0.1~0.2 cm 的结节 (图版 II)。

组织切片结果显示, 健康乌鳢的脾脏组织主

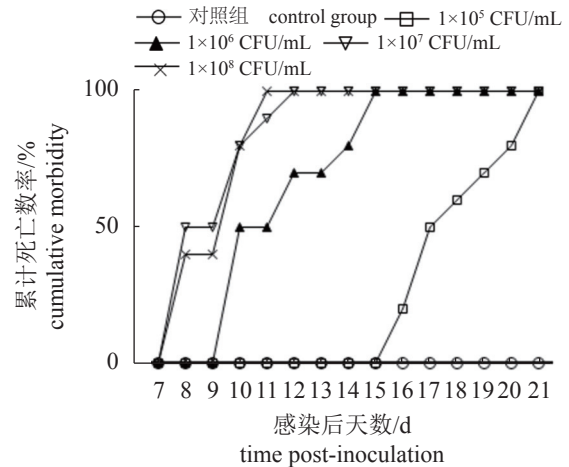


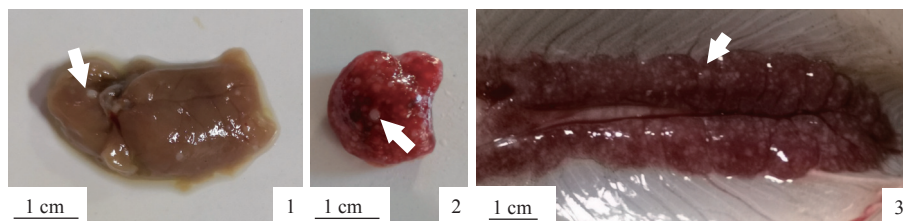
图 3 乌鳢感染狮诺卡氏菌后的累计死亡率

Fig. 3 The cumulative mortality of *C. argus* challenged with *N. serioleae*

要由淋巴细胞及大量红细胞组成, 细胞形态一致, 分布均匀 (图版 III-1); 而患病乌鳢的脾脏组织中细胞数量显著减少, 有大的结节, 结节分界清晰, 结节中有大量的淋巴细胞和受损或死亡的细胞, 且患病乌鳢的脾脏出血, 组织中有大量的血细胞 (图版 III-2)。健康乌鳢肾脏的肾小管上皮细胞排列整齐紧密, 管腔通畅 (图版 III-3); 患病乌鳢肾脏肾小管上皮细胞明显减少、散乱、脱落甚至坏死, 脱落及坏死的上皮细胞填充肾小管, 并且肾脏组织中出现明显结节, 结节形态和结构与患病乌鳢脾脏中的结节较为相似 (图版 III-4)。健康乌鳢肝脏组织中的细胞排列规则均匀, 细胞边界清晰 (图版 III-5); 患病乌鳢的肝脏组织中肝细胞严重变形, 细胞界限不清, 呈空泡样坏死, 细胞核变得较小或消失, 有大的结节, 结节界限清楚, 形态和结构与患病乌鳢脾脏中的结节较为相似 (图版 III-6)。正常心脏组织中心肌细胞排列整齐、有序 (图版 III-7); 患病乌鳢的心脏组织中心肌细胞分散、扭曲, 导致组织中出现较多间隙, 但组织中没有结节 (图版 III-8)。

### 2.5 SDAT 0011 药物敏感性分析

利用纸片法测定了分离菌株 SDAT 0011 对 15 种抗菌药物的敏感性, 结果显示, 分离菌株 SDAT 0011 对新霉素、链霉素、氯霉素、红霉素、四环素、利福平、庆大霉素、卡那霉素和阿奇霉素等抗菌药物敏感, 其中氯霉素、红霉素和利福平的抑菌直径可达 28 mm 以上。分离菌株 SDAT 0011 对青霉素、头孢拉定、氨苄西林、恩诺沙星、诺氟沙星和环丙沙星耐受 (表 3)。

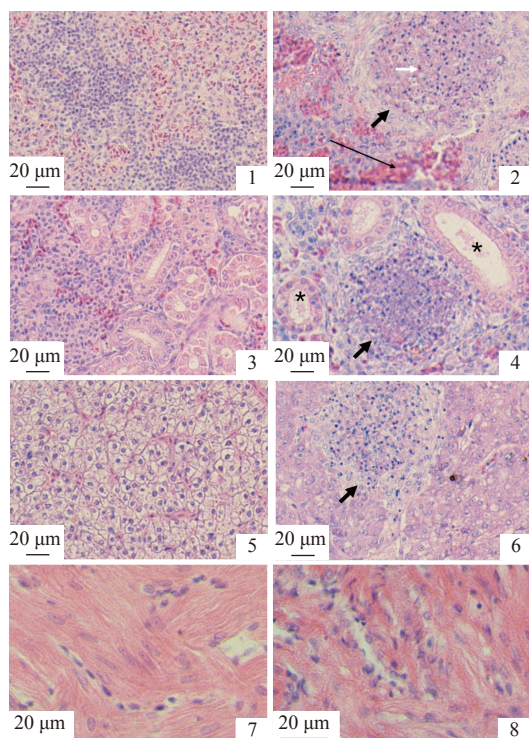


图版 II 患病乌鳢内脏结节

1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 肾脏; 内脏器官表面呈现大量的白色结节(白箭头); 比例尺=1 cm

Plate II Visceral nodules of sick *C. argus*

1. liver, 2. spleen, 3. kidney; the arrows indicate white nodules in the tissue; bar = 1 cm



图版 III 乌鳢感染诺卡氏菌后的组织病理学变化

1. 健康鱼脾脏; 2. 患病鱼脾脏, 有明显结节(黑色箭头所示), 结节内有淋巴细胞(白色箭头所示), 脾脏出血(细长黑箭头所示); 3. 健康鱼肾脏; 4. 患病鱼肾脏, 有明显结节(黑色箭头所示), 肾小管内有坏死细胞的脱落物(\*所示), 肾小管上皮细胞散乱、减少(白箭头所示); 5. 健康鱼肝脏; 6. 患病鱼肝脏, 有明显结节(黑色箭头所示); 7. 健康鱼心脏; 8. 患病鱼的心脏组织, 心肌细胞分散、扭曲

Plate III Histopathological changes of northern snakehead infected with *N. seriolae*

1. normal spleen tissue; 2. infected spleen with nodule (black arrow. nodule, white arrow. lymphocyte), splenic emorrhage (slender black arrow); 3. normal trunk kidney; 4. the nodule in trunk kidney (arrow), fragments of necrotic cells in the renal tubules (\*), renal tubular epithelial cells scattered, reduced(white arrow); 5. normal liver tissue; 6. the infected liver with nodule (black arrow); 7. normal heart tissue; 8. infected heart tissue, cardiomyocytes were scattered and twisted

## 2.6 感染诺卡氏菌后乌鳢免疫基因表达变化

本研究选取了部分乌鳢免疫基因进行了诺卡

表 3 分离菌株对抗生素的敏感性

Tab. 3 The sensitivity of the isolated SDAT 0011 to antibiotics

| 抗菌药物名称<br>antibiotic | 每片药敏片<br>含量/ $\mu\text{g}$<br>concentration | 抑菌圈直径<br>敏感性/mm<br>usceptibility |
|----------------------|---|----------------------------------|
| 青霉素 Penicillin       | 10  | 0 (R)                            |
| 新霉素 Neomycin         | 30  | 24.00 $\pm$ 1.00 (S)             |
| 头孢拉定 Cefradine       | 30  | 9.33 $\pm$ 0.10 (R)              |
| 氨苄西林 Ampicillin      | 10  | 0 (R)                            |
| 链霉素 Streptomycin     | 10  | 24.33 $\pm$ 0.58 (S)             |
| 氯霉素 Chloramphenicol  | 5   | 28.00 $\pm$ 1.00 (S)             |
| 红霉素 Erythromycin     | 15  | 31.67 $\pm$ 0.58 (S)             |
| 四环素 Tetracyclines    | 30  | 18.67 $\pm$ 0.58 (S)             |
| 利福平 Rifampicin       | 5   | 32.67 $\pm$ 0.58 (S)             |
| 庆大霉素 Gentamicin      | 10  | 22.67 $\pm$ 1.53 (S)             |
| 卡那霉素 Kanamycin       | 30  | 20.00 $\pm$ 2.00 (S)             |
| 恩诺沙星 Enrofloxacin    | 10  | 10.67 $\pm$ 0.58 (R)             |
| 诺氟沙星 Norfloxacin     | 10  | 11.33 $\pm$ 0.58 (R)             |
| 环丙沙星 Ciprofloxacin   | 5   | 0(R)                             |
| 阿奇霉素 Azithromycin    | 15  | 20.00 $\pm$ 1.00 (S)             |

注: S. 敏感, R. 耐药

Notes: S. sensitive; R. resistant

卡氏菌感染前后的表达水平变化研究, 分别是 toll 样受体基因 *TLR2* 和 *TLR13*, 趋化因子—受体信号通路基因 *CCR9*。结果显示, 诺卡氏菌感染 48、96 和 144 h 后脾脏和头肾中 *TLR2* 和 *TLR13* 表达上调, 而 *CCR9* 表达下调(图 4)。

## 3 讨论

## 3.1 诺卡氏菌感染鱼类的临床症状

研究发现, 鱼类诺卡氏菌病是由诺卡氏菌属的病原菌感染所引起的具有传染性的慢性全身性疾病, 该病主要症状为腹部膨大、出血; 在鳃、心脏、脾脏、肝脏和肾脏组织发现大量 1~2 mm



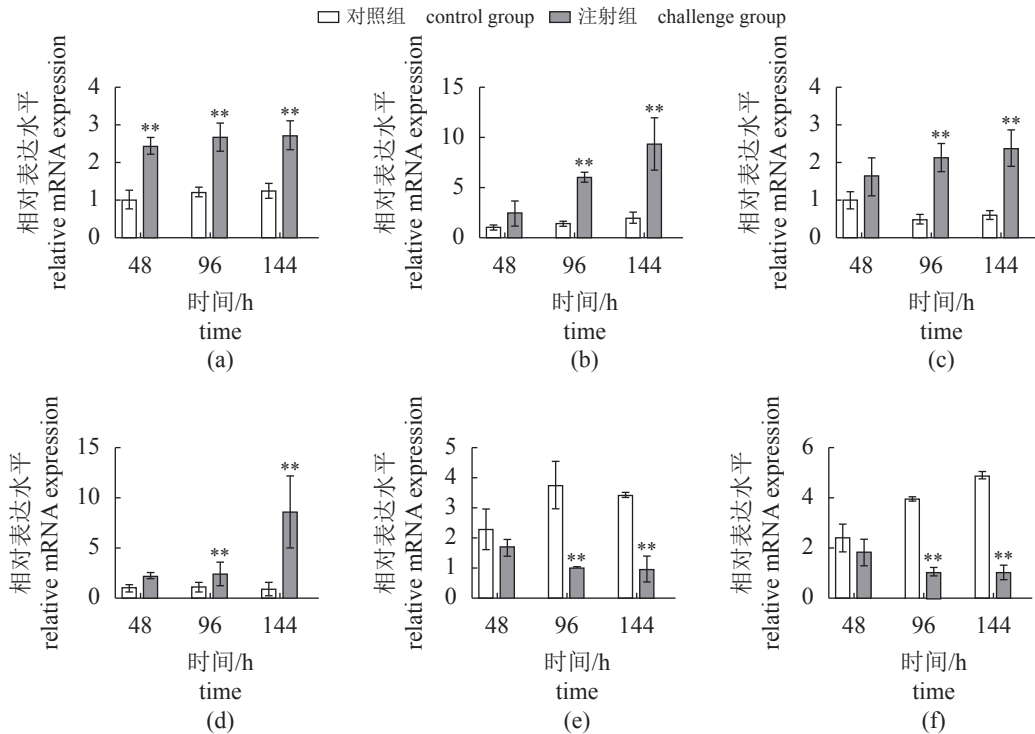


图4 荧光定量PCR分析

(a) 脾脏中 *TLR2* 的表达; (b) 头肾中 *TLR2* 的表达; (c) 脾脏中 *TLR13* 的表达; (d) 头肾中 *TLR13* 的表达; (e) 脾脏中 *CCR9* 的表达; (f) 头肾中 *CCR9* 的表达; \*\*, 极显著差异 ( $P<0.01$ )

Fig. 4 qRT-PCR analysis of selected genes

(a) *TLR2* expression in the spleen; (b) *TLR2* expression in the head kidney; (c) *TLR13* expression in the spleen; (d) *TLR13* expression in the head kidney; (e) *CCR9* expression in the spleen; (f) *CCR9* expression in the head kidney; \*\*, extremely significant differences ( $P<0.01$ )

的白色结节, 其中脾脏病变最为严重<sup>[25-27]</sup>。本研究从患病乌鳢内脏组织中分离出1株病原菌, 从菌落特征形态、生理生化特征、药物敏感性特征、16S *rRNA* 序列同源性分析可确定为鲫诺卡氏菌。回归感染健康乌鳢后, 发现其致病力较强, 实验组死亡率均为100%, 感染的乌鳢出现明显结节病症状, 肝脏、脾脏和肾脏表面有典型的直径为0.1~0.2 cm的白色结节。脾脏内结节出现最早且分布数量远多于其他组织器官, 与资料报道的杂交鳢 (*C. maculata* ♀×*C. argus* ♂)<sup>[4]</sup>、卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>、大口黑鲈<sup>[12]</sup>、大黄鱼<sup>[13]</sup>、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[25]</sup> 及海鲈<sup>[16]</sup> 等水产养殖动物感染诺卡氏菌病临床症状相似。有研究表明, 其他病原菌感染鱼类后也会产生结节症状, 但与诺卡氏菌的有所不同。杀鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella piscicida*) 感染大口黑鲈后, 临床观察显示, 在脾脏中形成的结节形状不规则, 且多个结节相连<sup>[28]</sup>。香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 也可引起鱼内脏结节病, 感染大黄鱼后, 在脾脏组织中出现白色和棕褐色结节<sup>[29]</sup>。舒氏气单胞菌 (*Aeromonas schubertii*) 感染

的病鱼, 在肝脏、脾脏和肾脏等器官形成平滑、柔软、边缘界限不清晰的白色点状坏死病灶, 可与诺卡氏菌引起的边界清晰的白色结节区分开来<sup>[30]</sup>。

### 3.2 诺卡氏菌感染鱼类的组织病理学特征

结节是诺卡氏菌进入鱼体内, 机体保护自身、吞噬外源性病原体的产物, 是一种免疫反应。但有学者认为肉芽肿的形成有利有弊: 其利为结节内的免疫细胞及免疫因子可杀伤或抑制诺卡氏菌的生长, 限制或防止诺卡氏菌的扩散; 其弊为结节的屏障结构阻挡了药物对其内细菌的作用, 诺卡氏菌则潜伏在巨噬细胞及结节内, 在合适的条件下 (如机体免疫力下降、营养不良、应激反应等) 可再活化致临床发病<sup>[14, 28, 31]</sup>。有研究发现, 鱼类感染诺卡氏菌后发病最严重的器官都是与血液循环关系最为密切的器官如脾脏、肾脏等<sup>[32]</sup>, 满其蒙等<sup>[14]</sup> 同样发现, 人工感染鲫诺卡氏菌的卵形鲳鲈发病最严重的器官是脾脏、肾脏和肝脏, 这与这些器官的生理功能密切相关, 脾脏和头肾是鱼类的造血器官和免疫器官, 肾脏是鱼类的排泄器官, 而肝脏是鱼体最大的消化腺。除这3个器

官外,心脏是鱼类血液循环系统中最重要的器官。因此,本研究做了4种器官的病理组织切片,结果发现4种器官皆发生了病理性改变,与健康乌鳢相比,患病乌鳢脾脏出血,组织中有大量的血细胞,且脾脏髓质部分细胞数量显著减少,有大的结节,结节分界清晰,结节中有大量的淋巴细胞和受损或死亡的脾脏细胞,这与大口黑鲈<sup>[31]</sup>感染诺卡氏菌后脾脏实质淋巴细胞减少,脾脏血窦扩张充血结果一致;同样,卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>感染诺卡氏菌后也存在脾脏出血、细胞坏死等现象。脾脏病变会影响机体的造血功能,导致病鱼贫血,营养不良,免疫力下降。

关于肾脏病变,在感染诺卡氏菌的卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>和斑马鱼<sup>[7]</sup>上均发现肾小管上皮细胞脱落、坏死,与基底膜完全分离,形成空腔,严重的坏死物填充肾小管,形成坏死灶,且卵形鲳鲈的肾小球萎缩、肾小囊腔相对增大。本研究亦发现患病乌鳢肾脏组织病变与二者症状类似,肾脏组织中出現明显结节,且肾小管上皮细胞明显减少、散乱、脱落甚至坏死,脱落及坏死的上皮细胞填充肾小管,但未发现有肾小球萎缩现象。这些病变使机体渗透调节功能严重失调,并且造成鱼体排泄和分泌障碍。

本研究发现,患病乌鳢的肝脏组织中肝细胞严重变形,细胞界限不清,细胞核变得较小或消失,有大的结节,结节界限清楚。但未发现如患病卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>、乌斑杂交鳢<sup>[33]</sup>样的肝脏脂肪性病变。患病鱼的肝组织受损,会引起功能障碍,解毒能力降低,导致毒素在鱼体中的积累,并且还一定程度上影响鱼体的物质代谢。关于心脏的病变,本研究发现患病乌鳢的心脏组织中心肌细胞分散、扭曲,导致组织中出現较多间隙,这与卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>感染症状一致,即心肌纤维肿胀,横纹模糊不清,严重者肌纤维排列紊乱,横纹消失甚至扭曲断裂、溶解、坏死。本研究未发现心脏组织中出現结节,与卵形鲳鲈<sup>[14]</sup>心脏结节较少和大口黑鲈<sup>[31]</sup>心脏组织多见成熟度不高的结节有所不同。

### 3.3 诺卡氏菌药物敏感性差异

诺卡氏菌不同菌株的耐药性存在差异,为了指导养殖中该病的防控,因此有必要对菌株药物敏感性进行分析。满其蒙<sup>[34]</sup>发现,卵形鲳鲈人工感染诺卡氏菌后投喂红霉素治疗效果较好。石存斌等<sup>[23]</sup>对从乌鳢和剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)

体内分离出的2株诺卡氏菌进行药物敏感性实验发现,2株分离菌对红霉素、四环素和氨苄西林高度敏感。蒋依依等<sup>[35]</sup>从患病大口黑鲈体内分离出的诺卡氏菌对氯霉素和四环素高度敏感。不同菌株的药物敏感性不同,但是,Itano等<sup>[36]</sup>对60株诺卡氏菌的药敏特性进行了研究,发现所有的菌株都对卡那霉素敏感。本研究对分离菌株的药物敏感性分析发现,分离的诺卡氏菌株SDAT 0011对利福平、氯霉素及红霉素高度敏感,具有较大的抑菌圈,对新霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素和阿奇霉素敏感,而对青霉素、头孢拉定和氨苄西林等具有耐药性。上述结果能够为诺卡氏菌的药物防治提供一定的参考依据,在疾病高发季节,可以合理使用部分药物进行预防和治疗。

### 3.4 诺卡氏菌不同感染方式对潜伏期及死亡率的影响

诺卡氏菌是一种条件致病菌,高密度的养殖条件会使水质下降,造成养殖鱼类体质虚弱、免疫力低下。加上流行季节水温适宜该菌繁殖,病原菌容易通过消化道、鳃或创伤感染鱼体<sup>[32,37]</sup>。满其蒙<sup>[34]</sup>在卵形鲳鲈上的感染实验表明,口灌、浸泡和创伤浸泡感染后的卵形鲳鲈从第13开始出现死亡个体,死亡率分别为66.7%、60.0%和73.3%,通过注射感染的方式,卵形鲳鲈在第7天开始发病死亡,在感染13天全部死亡,死亡率高达100%。本研究发现,不同浓度( $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL)诺卡氏菌注射感染乌鳢,乌鳢的死亡率均为100%,区别在于相对于高浓度组,低浓度组从感染到全部死亡时间有所延长。王国良等<sup>[19]</sup>在乌鳢上的回归感染实验也证明,注射、口灌和浸泡感染都能使健康乌鳢致病。这说明在自然养殖条件下,该菌通过鱼类损伤部位、消化道或鳃进入体内引发诺卡氏病的可能性均存在。本实验发现,不同的感染方式潜伏期不同,注射感染方式潜伏期较短,而灌服、浸泡和创伤感染方式潜伏期较长,这可能与诺卡氏菌感染鱼类的途径有关系。有资料发现,乌鳢感染后发病最严重的器官都是与血液循环关系最为密切的器官<sup>[32]</sup>,脾脏为鱼类的造血器官,与血液循环关系密切,本研究病检亦发现乌鳢脾脏中最早能观察到白色结节,随后相继在肾脏和肝脏中观察到白色结节,与先前在多种水产动物上的报道<sup>[5,32-33]</sup>一致。由此推测诺卡氏菌感染后可能进入血液循环内,而引



起鱼类全身的病变。本实验及满其蒙<sup>[34]</sup>的研究结果均发现,腹腔注射实验鱼7d后即出现死亡个体,推测病原菌通过腹腔注射途径能较快地进入血液循环系统,从而在较短的时间内对乌鳢及卵形鲳鲹造成较大的伤害。而口灌和浸泡卵形鲳鲹大约要13d后才能出现病死鱼,可能是因为病原菌通过此种感染途径需要穿过较多的免疫屏障才能进入鱼体的血液循环系统,其损伤过程相对较慢,造成的死亡率较腹腔注射组低。

### 3.5 感染诺卡氏菌对鱼类免疫基因表达变化的影响

脊椎动物中,Toll样受体是先天性免疫系统的关键组成部分,Toll样受体使机体察觉到病原体的存在并引发免疫反应<sup>[38]</sup>,在启动先天免疫和触发适应性免疫方面起着至关重要的作用。Chen等<sup>[4]</sup>利用转录组测序表明,杂交鳢感染诺卡氏菌后,外周血淋巴细胞中Toll样受体(TLR)信号通路被强烈激活,并检测到此通路中的21个基因在感染前后差异表达。Byadgi等<sup>[12]</sup>同样发现,在大口黑鲈感染诺卡氏菌后的De Novo转录组测序中,TLR信号通路被显著激活。早期有研究表明,TLR2信号的传导可诱导海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)感染的巨噬细胞凋亡,在斑马鱼中敲除TLR2,将导致分枝杆菌诱导的结节明显减少<sup>[39]</sup>。本研究中,应用qRT-PCR对乌鳢感染诺卡氏菌后脾脏和头肾组织中的TLR2和TLR13进行了分析,结果发现,在感染48h后,相较于对照组,乌鳢感染诺卡氏菌后2个TLR受体基因均表达上调,且在感染96和144h后均持续上调,由此,我们推测TLR2在感染后的持续上调可能参与了乌鳢感染诺卡氏菌后结节的形成。与哺乳动物相类似,鱼类TLR13可能参与细菌RNA的识别<sup>[40]</sup>。鳊(*Miichthys miiuy*)在注射鳃弧菌(*V. anguillarum*)后,TLR13在肝脏、脾脏和肾脏等免疫相关组织中上调表达,这表明其在防御细菌感染中存在潜在作用<sup>[41]</sup>。此外,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)23S rRNA衍生的19-寡聚核糖核苷酸刺激石斑鱼后,其脾细胞诱导了TLR13的上调表达<sup>[42]</sup>。本研究中发现,感染诺卡氏菌后乌鳢TLR13亦表达上调,与前期研究结果一致。由此可见,Toll样受体信号通路可能参与了诺卡氏菌感染后乌鳢的免疫防御作用,但具体机制仍需进一步研究。

趋化因子是一类由细胞分泌的小细胞因子或信号蛋白,具有诱导附近反应细胞定向趋化的能

力。一部分趋化因子被认为是促炎性细胞因子,可以在免疫应答过程中诱导免疫系统的细胞进入感染部位,且参与了先天和适应性免疫之间的交互作用<sup>[43]</sup>。根据大口黑鲈<sup>[12]</sup>和杂交鳢<sup>[4]</sup>感染诺卡氏菌的De novo转录组数据,发现大多数趋化因子和趋化因子受体表达下调,与前期研究结果一致。本研究同样发现,CCR9在感染48、96和144h后表达水平持续下调,说明乌鳢感染诺卡氏菌后,趋化因子及趋化因子受体基因在乌鳢免疫防御中可能起重要作用,但其表达变化与结节形成及凋亡的关系尚需进一步深入研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 王国良,徐益军,金珊.乌鳢致病诺卡氏菌的鉴定及系统发育分析[J].水产学报,2008,32(3):449-454.  
Wang G L, Xu Y J, Jin S. Identification and phylogenetic analyses of *Nocardia* in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(3): 449-454 (in Chinese).
- [2] 多甜,张超,赵晓进,等.鲫鱼诺卡氏菌研究进展[J].水产科学,2017,36(3):391-394.  
Duo T, Zhang C, Zhao X J, et al. A review of research progress of *Nocardia seriolae*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(3): 391-394 (in Chinese).
- [3] Fatahi-Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 114: 369-384.
- [4] Chen J L, Li Y Q, Wang W J, et al. Transcriptome analysis of immune-related gene expression in hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) after challenge with *Nocardia seriolae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 476-484.
- [5] 王桢,葛明峰,徐益军,等.乌鳢诺卡氏菌病的组织病理和超微病理观察[J].宁波大学学报(理工版),2015,28(2):13-18.  
Wang Z, Ge M F, Xu Y J, et al. Histopathological and ultrapathological observation on nocardiosis of *Ophiocephalus argus*[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2015, 28(2): 13-18 (in Chinese).
- [6] Manrique W G, Claudiano Gda S, de Castro M P, et al. Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* model[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121625.

- [7] 夏立群, 汪美, 赖杰彬, 等. 鲈鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型的建立与组织病理学研究[J]. 热带生物学报, 2016, 7(4): 409-416.  
Xia L Q, Wang M, Lai J B, et al. Establishment of a zebrafish model for *Nocardia seriolae* and histopathological study[J]. Journal of Tropical Biology, 2016, 7(4): 409-416 (in Chinese).
- [8] Isik K, Chun J S, Hah Y C, et al. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(2): 833-837.
- [9] Wang P C, Tsai M A, Liang Y C, et al. *Nocardia seriolae*, a causative agent of systematic granuloma in spotted butterflyfish, *Scatophagus argus*, Linn[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(38): 3441-3452.
- [10] Tomiyasu I. Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 151(2): 828-837.
- [11] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 137-141.  
Yuan S P, Wang G L, Jin S. Review of pathogenic nocardias in cultured fish[J]. Microbiology China, 2006, 33(2): 137-141 (in Chinese).
- [12] Byadgi O, Chen C W, Wang P C, et al. De novo transcriptome analysis of differential functional gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after challenge with *Nocardia seriolae*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1315.
- [13] Wang G L, Yuan S P, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson)[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(6): 339-345.
- [14] 满其蒙, 徐力文, 区又君, 等. 鲈鱼诺卡氏菌感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(21): 132-135.  
Man Q M, Xu L W, Ou Y J, et al. Histopathological study on golden pompano *Trachinotus ovatus* infected with *Nocardia seriolae*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(21): 132-135 (in Chinese).
- [15] 彭开松, 余锐萍, 祁克宗, 等. 暗纹东方鲀脂肪肝并发诺卡氏菌病[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 629-632.  
Peng K S, She R P, Qi K Z, et al. Adiposis hepatica complicating nocardiosis in obscure puffer *Fugu obscurus* (Abe)[J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 629-632 (in Chinese).
- [16] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan Province, China[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(5): 299-307.
- [17] Kudo T, Hatai K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(2): 173-178.
- [18] 肖明松, 崔峰, 康健, 等. 淮河乌鳢线粒体DNA控制区结构分析及遗传多样性研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2013, 47(1): 82-90.  
Xiao M S, Cui F, Kang J, et al. Genetic structure and variation of wild *Ophiocephalus argus* Cantor from Huaihe river based on mtDNA D-loop sequences[J]. Journal of Huazhong Normal University (Natural Sciences), 2013, 47(1): 82-90 (in Chinese).
- [19] 王国良, 徐益军, 金珊, 等. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283.  
Wang G L, Xu Y J, Jin S, et al. Research on the Nocardiosis and pathogen in reared snakehead, *Ophiocephalus argus* cantor[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 277-283 (in Chinese).
- [20] Labrie L, Ng J, Tan Z, et al. Nocardia infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia[M]//Bondad-Reantaso M G, Mohan C V, Crmlish M, et al. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 2008.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-399.  
Dong X Z, Cai M Y. Manual for systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-399 (in Chinese).
- [22] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 77-80.  
Liu Z H, Jiang C L. Modern biology and biotechnology of actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 2004: 77-80 (in Chinese).
- [23] 石存斌, 潘厚军, 常藕琴, 等. 养殖乌鳢结节病的病原分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7384-7386, 7397.  
Shi C B, Pan H J, Chang O Q, et al. Pathogen analysis on the sarcoidosis in cultured *Ophiocephalus argus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(16): 7384-7386, 7397 (in Chinese).
- [24] 王二龙, 汪开毓, 陈德芳, 等. 养殖乌鳢内脏结节病的病原分离、鉴定与药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5): 90-98.  
Wang E L, Wang K Y, Chen D F, et al. Isolation, identi-

- fication and drug sensitivity test of causative pathogen offarmed snakehead (*Channa argus*) with visceral sarcoidosis[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2015, 34(5): 90-98 (in Chinese).
- [25] Bransden M P, Carson J, Munday B L, *et al.* Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(1): 83-85.
- [26] Hoang H H, Wang P C, Chen S C. The protective efficacy of recombinant hypoxic response protein 1 of *Nocardia seriolae* in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Vaccine*, 2020, 38(14): 2925-2936.
- [27] Vu-Khac H, Duong V Q B, Chen S C, *et al.* Isolation and genetic characterization of *Nocardia seriolae* from snubnose pompano *Trachinotus blochii* in Vietnam[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(2): 173-177.
- [28] Fogelson S B, Petty B D, Reichley S R, *et al.* Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(3): 338-344.
- [29] Zhang J T, Zhou S M, An S W, *et al.* Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(2): 113-121.
- [30] Liu C, Chang O Q, Zhang D F, *et al.* *Aeromonas shuberti* as a cause of multi-organ necrosis in internal organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(10): 1529-1538.
- [31] 何晟毓, 魏文燕, 刘韬, 等. 大口黑鲈致死性结节病原的分离、鉴定及组织病理学观察[J]. *水产学报*, 2020, 44(2): 253-265.
- He S Y, Wei W Y, Liu T, *et al.* Isolation, identification and histopathological study on lethal sarcoidosis of *Micropterus salmoides*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(2): 253-265 (in Chinese).
- [32] Wang F, Wang X G, Liu C, *et al.* Transparent Tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for *in vivo* analysis of nocardial infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 67-73.
- [33] 王文基, 陈建林, 侯素莹, 等. 鲫鱼诺卡氏菌感染乌斑杂交鳊的组织病理学研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(10): 4439-4446.
- Wang W J, Chen J L, Hou S Y, *et al.* A histopathological study of *Nocardia seriolae* infection in hybrid snakehead[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(10): 4439-4446 (in Chinese).
- [34] 满其蒙. 鲫鱼诺卡氏菌致病机制的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Man Q M. Studies on pathogenic mechanism of *Nocardia seriolae*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [35] 蒋依依, 李言伟, 周素明, 等. 加州鲈诺卡菌病原的分离与鉴定[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(1): 76-81.
- Jiang Y Y, Li Y W, Zhou S M, *et al.* Isolation and identification of nocardia, a pathogen of nocardiosis in largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(1): 76-81 (in Chinese).
- [36] Itano T, Kawakami H. Drug susceptibility of recent isolates of *Nocardia seriolae* from cultured fish[J]. *Fish Pathology*, 2002, 37(3): 152-153.
- [37] Itano T, Kawakami H, Kono T, *et al.* Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel by artificial challenge[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(9): 529-534.
- [38] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [39] López M, Sly L M, Luu Y, *et al.* The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2[J]. *Journal of Immunology*, 2003, 170(5): 2409-2416.
- [40] Oldenburg M, Krüger A, Ferstl R, *et al.* TLR13 recognizes bacterial 23S *rRNA* devoid of erythromycin resistance-forming modification[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1111-1115.
- [41] Wang Y J, Bi X Y, Chu Q, *et al.* Discovery of toll-like receptor 13 exists in the teleost fish: *Miuy croaker* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 61: 25-33.
- [42] Liang Y S, Ding X, Yu X, *et al.* Identification and functional characterization of Toll-like receptor 13 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 309-317.
- [43] Sokol C L, Luster A D. The chemokine system in innate immunity[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2015, 7(5): a016303.



## Isolation, identification, and histopathological observation of pathogen causing nocardiosis in *Channa argus*

TENG Jian<sup>1,2</sup>, CHEN Hongju<sup>1</sup>, XUE Liangyi<sup>2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LU Guangjin<sup>1</sup>,  
ZHOU Min<sup>1</sup>, ZHANG Chong<sup>1</sup>, JI Xiangshan<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

**Abstract:** To explore the pathogenic mechanism of nocardiosis in *Channa argus*, we studied the pathogenicity and drug sensitivity of the pathogen and the immune resistance of *C. argus* by isolation and identification of the pathogen, histopathology and gene expression analysis. The results showed that the diseased *C. argus* was mainly infected with a pathogen strain SDAT 0011. The strain SDAT 0011 was identified as *Nocardia seriolae* using the morphologic structure and staining observation, PCR amplification of species-specific primers, sequence analysis of 16S *rRNA* gene, and physiological and biochemical tests. The challenge experiments showed that the isolated strains were pathogenic on *C. argus* and the mortality rate of the  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^8$  CFU/mL injection groups was 100%. In addition, the diseased *C. argus* exhibited numerous marked white nodules (round/ovoid), ranging from 0.1 to 0.2 cm in diameter on internal organs, especially the spleen, kidney, and liver. Histopathological observation and analysis showed that the structure of chronic granuloma was visible, with many lymphocytes, damaged or dead cells in the center. The antibiotic susceptibility assays of the strain SDAT 0011 showed that the strain was sensitive to rifampin, but resistant to penicillin, cefradine, and ampicillin, etc. Furthermore, the expression levels of toll-like receptors 2 gene (*TLR2*), toll-like receptors 13 gene (*TLR13*), and C-C chemokine receptor type 9 gene (*CCR9*) after infection were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). In our study, following *N. seriolae* challenge, *TLR2* and *TLR13* were significantly up-regulated, while *CCR9* was significantly down-regulated at all examined time points in the spleen and head kidney. These results implied that some genes of the toll-like receptor signaling pathway and the chemokine signaling pathway have been activated in the early stages of infection to resist *Nocardia* infection. The results of this study will lay a foundation for the treatment of *N. seriolae* and studying its pathogenesis.

**Key words:** *Channa argus*; *Nocardia seriolae*; Nocardiosis; histopathology; immune gene

**Corresponding author:** JI Xiangshan. E-mail: xsji@sdau.edu.cn

**Funding projects:** Agricultural Fine Breed Project in Shandong Province (2019LZGC013, 2019LZGC020); Funds from the Shandong “Double First-Class” Program