

## 虹鳟肠炎红嘴病病理模型的构建

张 泉<sup>1,2</sup>, 王 菽<sup>1,3</sup>, 卢彤岩<sup>1</sup>, 曹永生<sup>1</sup>, 刘红柏<sup>1</sup>, 李绍戊<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 为探讨鲁氏耶尔森菌感染虹鳟的致病机制, 本实验建立了鲁氏耶尔森菌感染虹鳟引起的肠炎红嘴病的病理模型, 制定相应的临床症状及组织病理学评分系统, 并对该模型进行研究。将43尾平均体质量约为12 g的健康虹鳟随机分成5组: 3个实验组(n=30)、对照组(n=10)和哨兵组(n=3)。3个实验组分别采用 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^7$ 和 $2.0 \times 10^8$  CFU/mL的鲁氏耶尔森菌感染浓度, 通过腹腔注射方式进行人工感染试验。对感染鲁氏耶尔森菌的虹鳟肠、肝脏、脾脏和肾脏组织进行镜检及临床症状、剖检病变判断, 结合细菌学检测, 按制定的评分系统评价各组肠炎红嘴病造模效果, 确定最佳造模方案。结果显示, 各攻毒组虹鳟感染后72 h均出现不同程度死亡, 临床症状表现为红嘴、肛门红肿、鳃(胸鳃、腹鳃、臀鳃)等出现不同程度充血, 下颌部、腹部出现出血点等。组织病理学可见肝脏、脾脏、肾脏及肠组织均有炎性细胞浸润现象出现, 肝细胞、肠上皮细胞和肾小管上皮细胞等实质细胞变性、坏死, 脾脏部位淋巴细胞减少、红细胞死亡堆积。综合各组得分发现,  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL组的鲁氏耶尔森菌感染虹鳟造模效果最佳, 患病虹鳟的临床症状显著且组内差异较小, 病程迁延较长, 便于研究。研究表明, 对体质量约12 g的虹鳟幼鱼腹腔注射0.1 mL浓度为 $2.0 \times 10^7$  CFU/mL的鲁氏耶尔森菌可成功构建肠炎红嘴病病理模型。

**关键词:** 虹鳟; 鲁氏耶尔森菌; 肠炎红嘴病; 病理模型

**中图分类号:** S 941.42

**文献标志码:** A

作为蛋白质、脂肪酸、维生素、矿物质和微量元素的主要来源之一, 鱼类已成为人类膳食中不可或缺的重要营养来源<sup>[1-2]</sup>。在水产品产量和产业规模不断提升的同时, 水产动物的各种病害也随之暴发, 进而导致食品及环境安全问题。鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)又称红嘴细菌(redmouth bacterium), 是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠炎红嘴病(enteric redmouth diseases, ERM)的病原菌<sup>[3-5]</sup>。1966年, Ross等<sup>[4]</sup>首次从发病虹鳟病灶分离得到该菌, 目前在北美洲、南美洲、欧洲、南非、中东以及澳大利亚和中国都有相关报道<sup>[5-8]</sup>。此外, 也有学者从鱼类以外的

动物中分离出鲁氏耶尔森菌, 如麝(*Moschus moschiferus*)、茶隼(*Falco tinnunculus*)、海鸥(*Larus canus*)、海龟(*Chelonia mydas*)等<sup>[6, 9-10]</sup>。鲁氏耶尔森菌可感染多种鱼类, 患病鱼行为异常, 如贴近水面、非正常游动和食欲不振等; 体表症状表现为眼球突出、鳍条充血、皮肤变黑、口咽腔周围皮下出血等<sup>[4-5]</sup>。该菌对所有生长阶段的鱼类均可造成不同程度的危害, 其中对幼鱼影响较大, 成鱼感染后发病缓慢<sup>[3-4, 11]</sup>。

目前, 鲁氏耶尔森菌引起的虹鳟肠炎红嘴病的致病机理仍不清晰。本实验选取不同浓度的鲁氏耶尔森菌, 通过腹腔注射方式对虹鳟幼

收稿日期: 2017-03-20 修回日期: 2017-07-11

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD1009); 黑龙江省自然科学基金(C2017081)

通信作者: 李绍戊, E-mail: lishaowu@hrfri.ac.cn

鱼进行攻毒, 监测其临床症状、发病率和死亡率, 并对人工感染实验鱼的内脏器官进行组织病理学观察, 以期建立虹鳟肠炎红嘴病的病理模型, 为该病的临床诊断及进一步研究鲁氏耶尔森菌感染虹鳟的致病机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

非免疫状态下健康虹鳟100尾[体质量(12±1)g], 购于辽宁本溪某养殖场, 实验鱼置于室内循环水族箱内流水暂养15 d, 期间投喂虹鳟专用饲料, 日投喂2次(9:00和16:00), 投饲量为鱼体质量的1%~3%, 水温(16±1)℃, 溶解氧保持在10 mg/L以上。实验前随机采集5尾鱼进行检测, 确认其未受鲁氏耶尔森菌感染。鲁氏耶尔森菌BH1206株由本实验室分离、鉴定并保存<sup>[12]</sup>。将BH1206株接种于TSA培养基中, 28℃恒温培养24 h, 挑取单菌落于TSB培养基中, 28℃120 r/min振荡培养14~16 h, 菌悬液经4000 r/min离心5 min后收集菌体, 用PBS溶液(pH 7.4)调节菌浓度分别为 $2\times 10^8$ 、 $2\times 10^7$ 和 $2\times 10^6$  CFU/mL。

### 1.2 肠炎红嘴病模型的构建

选取暂养后的43尾供试鱼, 随机分为5组: 对照组(n=10)、3个实验组(每组n=10)和哨兵组(n=3)(哨兵是指为查明某一特定环境中某传染因子的存在状况, 有意识地暴露在该环境中的易感动物<sup>[13]</sup>)。3个实验组根据预实验进行不同剂量感染, 分别为 $2\times 10^6$ 、 $2\times 10^7$ 和 $2\times 10^8$  CFU/mL。实验组虹鳟每尾腹腔注射菌悬液100 μL, 同时在每个实验组中放入1尾未注射菌悬液且标记过的虹鳟用作哨兵。对照组每尾注射100 μL PBS溶液。所有水箱关闭供水系统, 温度维持在(16±1)℃, 溶解氧保持在10 mg/L以上, 每日换水量约1/3。连续观察并记录实验鱼的行为动作、体表变化及存活率, 及时对濒死或已死的实验鱼进行解剖取样。

### 1.3 临床症状观察

每2~4 h监测1次实验鱼, 评价其行为动作及体表变化。预实验结果发现, 实验鱼感染鲁氏耶尔森菌后游动行为发生明显变化, 且其鳍条、吻部、体表均有异常情况出现, 为了更简单、直观地对染病虹鳟的行为及体表变化进行描述和评价, 参考崔静雯等<sup>[14]</sup>制定的临床观察评

分标准, 根据本实验中受试虹鳟异常状况出现的不同程度, 制定了量化打分系统, 并按照以下评分标准打分, (1)行为变化: 正常游动记0分, 侧游、竖游、旋游等异常游动记1分; (2)鳍条变化: 胸鳍、腹鳍、臀鳍均未出现充血症状记0分, 胸鳍、腹鳍、臀鳍其中1种鳍条出现充血症状记1分, 2种鳍条出现充血记2分, 3种鳍条都出现充血记3分; (3)吻部变化: 吻部无充血症状记0分, 不明显记1分, 吻部有明显充血症状记2分, 吻部充血特别严重记3分; (4)体表变化: 肛门红肿或鱼腹部有出血点记1分, 二者均出现出血点记2分, 无上述症状记0分。

### 1.4 细菌检测

对濒死的虹鳟用30 mg/L MS-222麻醉, 采集肝脏、脾脏和肾脏组织。将肝拭子、脾拭子和肾拭子涂抹接种于TSA培养基上, 置于28℃过夜培养, 观察菌落形态及特征, 将培养的细菌用鲁氏耶尔森菌特异性引物进行PCR鉴定, 引物序列: YRI-F 5'-GGCGGTTGGTATTTGAC-3', YRI-R 5'-ACTGACCCAGCAGGATG-3'。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 凝胶成像观察结果。

### 1.5 组织病理学观察

选取出现典型性吻部及鳍条充血、肛门红肿外突、游动缓慢、抓取时挣扎微弱的濒死实验鱼, 肉眼观察其剖检后的内脏器官病理变化, 并将肝脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠及胃等组织用波恩氏液固定, 48 h后取出进行组织学包埋, 制成石蜡切片(5~6 μm), 用苏木精和伊红(H.E)进行染色。显微镜观察各组织病理变化, 参照Baums等<sup>[15]</sup>病理组织学评分体系(表1)对病理变化进行评分。每尾虹鳟组织得分(α), 为各个组织的分数之和除以4; 每组得分(β)由该组的组织得分(α)的总和除以该组虹鳟数量(哨兵除外)。

## 2 结果

### 2.1 临床症状

经观察, 供试鱼中对照组和3个实验组的哨兵临床症状均无异常变化。注射8 h后, 感染鲁氏耶尔森菌的各组虹鳟均出现不同发病症状, 如体色加深等, 部分染病鱼非正常游动。在攻毒浓度为 $2\times 10^8$  CFU/mL组中, 10 h后供试鱼出现

表1 组织病理学评分系统

Tab. 1 Histopathological scoring system

炎症的程度和范围 degree and extent of inflammation	得分 score
轻度, 局灶性 mild, focal	1
轻度, 多灶性或弥漫性 mild, multifocal or diffuse	2
轻度至中度, 局灶性 mild to moderate, focal	2
轻度至中度, 多灶性或弥漫性 mild to moderate, multifocal or diffuse	3
中度, 局灶性 moderate, focal	3
中度, 多灶性或弥漫性 moderate, multifocal or diffuse	4
轻度, 局灶性坏死 mild, focal with necrosis	4
中度至重度, 多灶性或弥漫性 moderate to severe, multifocal or diffuse	5
轻度至中度, 多灶性或弥漫性坏死 mild to moderate, multifocal or diffuse with necrosis	5
重度, 多灶性或弥漫性 severe, multifocal or diffuse	6
重度的局灶性坏死 severe, focal with necrosis	6
中度至重度, 多灶性或弥漫性坏死 moderate to severe, multifocal or diffuse with necrosis	6
重度的, 多灶性或弥漫性坏死 severe, multifocal or diffuse with necrosis	7

鳍条充血、肛门红肿(图1-a), 14 h时嘴部出血, 下颌处及腹部有出血点(图1-b)。

攻毒20~24 h后, 仅 $2 \times 10^8$  CFU/mL浓度组出现死亡, 52 h后该组死亡率达到100%;  $2 \times 10^7$  CFU/mL组中, 12 h后供试虹鳟鳍条充血, 12~16 h出现红嘴、肛门红肿的症状, 下颌处及腹部有出血点, 28 h后实验鱼开始死亡, 68 h后全部死亡;  $2 \times 10^6$  CFU/mL浓度组在24 h时, 供试虹鳟有部分出现鳍条充血, 26~28 h时实验鱼肛门红肿、吻端充血, 下颌部和腹部出现出血症状, 36 h时有

2尾死亡, 至72 h仍有2尾存活, 且其中1尾无异常症状(图2)。按照拟定的肠炎红嘴病临床症状评分系统, 对各组进行临床症状评分(表2)。

## 2.2 病理解剖检查

各感染组实验鱼均出现不同程度病理变化, 肠道内充有淡黄色液体, 脾脏肿大, 颜色变暗(图3-a), 部分实验鱼肝脏有血块凝集(图3-b)或出血点(图3-c), 挤压腹部可见液体从肛门处流出, 肠道充血严重甚至部分呈液质化(图3-d)。

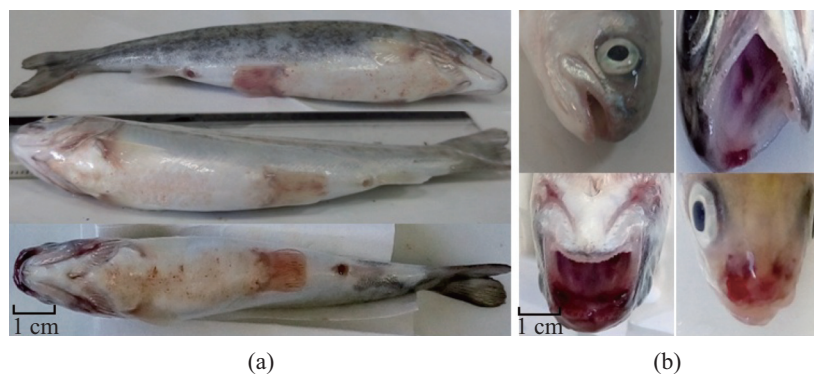


图1 鲁氏耶尔森菌感染虹鳟的临床症状

(a) 受感染的虹鳟肛门红肿、鳍条充血、腹部有出血点; (b) 受感染的虹鳟嘴部和下颌表现出不同程度充血

Fig. 1 Clinical signs of *O. mykiss* infected by *Y. ruckeri*

(a) the swelling anal, congestion of fins, bleeding points in abdomen of infected *O. mykiss*; (b) the mouth and lower jaw in the infected *O. mykiss* showed varying degrees of congestion

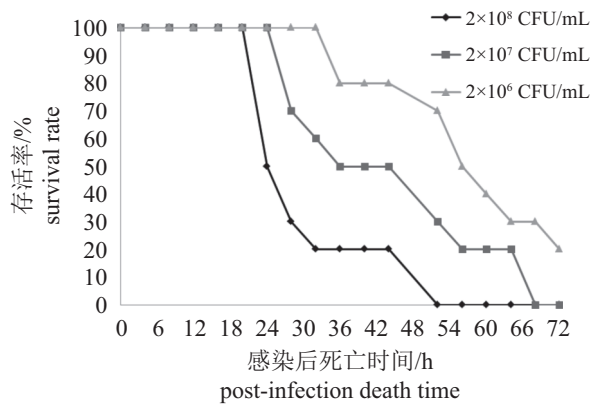


图 2 3个不同剂量组鲁氏耶尔森菌侵染的虹鳟生存曲线

Fig. 2 Survival curves of *O. mykiss* after *Y. ruckeri* challenge at three different concentrations

### 2.3 细菌学检查

对照组 (n=10) 和哨兵 (n=3) 采样拭子接种

表 2 各组虹鳟的临床评分系统

Tab. 2 Clinical scores of *O. mykiss* in each group

浓度组/(CFU/mL) groups	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	总和 sum	均值 mean	标准差 SD
$2 \times 10^6$	5	5	7	5	4	7	8	5	2	3	51	5.1	1.853
$2 \times 10^7$	7	6	8	6	5	7	6	5	8	5	63	6.3	1.160
$2 \times 10^8$	5	7	5	8	6	9	6	8	7	6	67	6.7	1.337

注: 虽然每2~4 h对实验鱼进行检测, 但仍不排除个别虹鳟表现出的典型临床症状未被检测到; F代表每一尾鱼, 3个实验组每组各有10尾鱼用F1~F10表示

Notes: although the fish was tested every 2-4 hours, it was not ruled out that individual *O. mykiss* showed typical clinical signs which were not detected; F means each fish in the three experimental groups, F1-F10 was marked in each fish, respectively

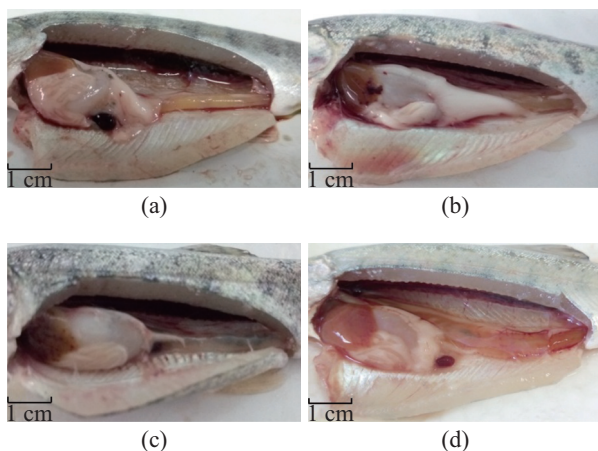


图 3 虹鳟解剖检查

(a) 脾脏肿大, 肠道内充有淡黄色液体; (b) 肝脏出现凝集血块; (c) 肝脏有充血点; (d) 肠道液质化且充有淡黄色液体, 充血

Fig. 3 Anatomy inspection of *O. mykiss*

(a) spleen enlargement, intestine filled with light yellow liquid; (b) agglutination of blood clots in the liver; (c) congestion points in the liver; (d) liquefaction and congestion of intestine filled with light yellow liquid

TSA平板培养, 未见细菌生长。各组实验虹鳟均分离得到表面光滑、边缘整齐、有光泽的白色菌落, 革兰氏染色结果为阴性。对分离菌株进行纯化培养, 并提取其基因组DNA进行鲁氏耶尔森菌 *rupA* 基因的PCR特异性扩增, 成功获得192 bp的目的片段(图4)。

各实验组虹鳟体内均不同程度分离出鲁氏耶尔森菌, 其中 $2 \times 10^6$  CFU/mL组有2尾肝脏及脾脏组织未检出鲁氏耶尔森菌, 其中1尾肾脏也未分离到该菌(表3)。

### 2.4 肠炎红嘴病病理组织学变化

选取 $2 \times 10^7$  CFU/mL注射组实验虹鳟为代表进行组织切片观察, 镜检结果显示, 感染鲁氏耶尔森菌的实验鱼各组织均出现不同程度病变, 具体表现如下。

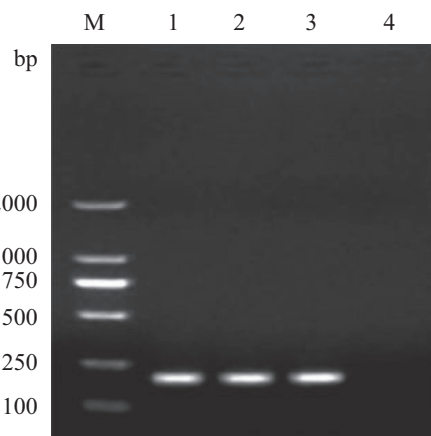


图 4 各个部位分离株的PCR检测

M. DNA Marker DL2000; 1. 肝脏组织分离细菌; 2. 脾脏组织分离细菌; 3. 肾脏组织分离细菌; 4. 阴性对照

Fig. 4 PCR detection of isolated strains from different tissues

M. DNA Marker DL2000; 1. strain isolated from liver; 2. strain isolated from spleen; 3. strain isolated from kidney; 4. negative control



表 3 组织内分离出鲁氏耶尔森菌的各组虹鳟数量

Tab. 3 Number of fish infected by *Y. ruckeri* in each group

浓度组/ (CFU/mL) groups	数量/尾 no.	分离出鲁氏耶尔森菌的虹鳟尾数 no. of fish infected by <i>Y. ruckeri</i>	特定部位分离出鲁氏耶尔森菌的虹鳟数量/组内虹鳟总数 no. of fish with <i>Y. ruckeri</i> isolated from specific tissues/total number of <i>O. mykiss</i> within each group					
			肝脏 liver		脾脏 spleen		肾脏 kidney	
对照组 control	13*	0/13	0/13		0/13		0/13	
2.0×10 <sup>6</sup>	10	10/10	8/10		8/10		9/10	
2.0×10 <sup>7</sup>	10	10/10	10/10		10/10		10/10	
2.0×10 <sup>8</sup>	10	10/10	10/10		10/10		10/10	

注: \*表示13尾中的3尾虹鳟是哨兵, 10尾作为对照, 下同

Notes: \* means that 3 of the 13 *O. mykiss* are sentinels, 10 fish are used as control, the same below

胃 固有层和黏膜下层结缔组织坏死、解体, 绒毛崩解、消失(图版-1)。

前肠 上皮细胞肿胀, 细胞核结构破坏, 出现大量空泡, 杯状细胞坏死甚至凋亡(图版-2)。

中肠 黏膜层、黏膜下层及肌层结缔组织中有大量中性粒细胞及炎性细胞浸润, 固有层淋巴细胞增多, 可见充血(图版-3)。

后肠 微绒毛变短、变小, 出现脱落、断裂、溶解, 更严重者有完整上皮细胞游离于肠腔(图版-5)。

肝脏 轻度病变为肝细胞肿胀, 部分细胞空泡化, 肝血窦扩张; 严重病变表现为肝细胞结构模糊, 细胞空泡化严重, 炎症细胞浸润(图版-6)。

脾脏 淋巴细胞集中区域, 可见大量空泡变性的淋巴细胞, 红细胞大量死亡堆积(图版-7)。

肾脏 肾小球肿胀, 上皮细胞颗粒变性, 肾间质出血, 少量巨噬细胞、中性粒细胞及炎性细胞浸润, 轻微间质性肾间质细胞坏死、甚至溶解、消失, 部分区域网状内皮细胞增生; 肾小管上皮细胞空泡变性、崩解, 细胞

碎片脱落于管腔内(图版-8)。

对照组和哨兵组组织结构正常, 未见明显病变。按照系统评分(表1)对4个组织(肝脏、脾脏、肾脏、肠)评分, 记录每个组织得分情况, 2.0×10<sup>6</sup>、2.0×10<sup>7</sup>和2.0×10<sup>8</sup> CFU/mL 3组的β得分分别为2.325、2.9和3.375; 对照组则为0(表4)。

### 3 讨论

本实验构建了虹鳟ERM疾病的病理模型。有研究表明, 自然条件下鲁氏耶尔森菌需突破虹鳟鳃部及皮肤的防御机制才能对其成功感染, 经由血液扩散到其他组织<sup>[16-17]</sup>, 而血源性感染的细菌通常选用腹腔注射、肌肉注射或静脉注射等方式建模<sup>[14, 18]</sup>。因此, 本实验选取绕过体表防御机制的腹腔注射方式, 使用鲁氏耶尔森菌BH1206株感染虹鳟构建ERM病理模型。

通过预实验, 本研究选用3种不同浓度感染建模, 结果发现, 浓度为2×10<sup>7</sup>与2×10<sup>8</sup> CFU/mL组的致死率达100%, 而2×10<sup>6</sup> CFU/mL组在72 h时致死率为80%, 且在存活虹鳟肝脏内未分离到鲁氏耶尔森菌, 疑似侵染的病原菌最终未能突破虹鳟免疫机制, 该组建模不成功, 因此2×10<sup>7</sup>与

表 4 各个组织病理学评分

Tab. 4 Histopathological scores of each group

浓度组/(CFU/mL) groups	肝脏 liver			脾脏 spleen			肾脏 kidney			肠 intestinal			β得分 β score
	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	
对照 control	13/13*	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	0
2.0×10 <sup>6</sup>	2/10	5/10	3/10	2/10	7/10	3/10	2/10	4/10	4/10	1/10	6/10	3/10	2.325
2.0×10 <sup>7</sup>	2/10	4/10	4/10	0/10	5/10	5/10	2/10	5/10	3/10	1/10	5/10	4/10	2.900
2.0×10 <sup>8</sup>	1/10	6/10	3/10	0/10	6/10	4/10	1/10	3/10	6/10	0/10	8/10	2/10	3.375

$2 \times 10^8$  CFU/mL组具备建立虹鳟肠炎红嘴病模型的可行性。3个实验组均在36 h之前首次出现死亡, 比Avci等<sup>[19]</sup>攻毒实验首次死亡时间提前1 d, 一方面与本次实验选择鱼龄小有关, 鱼龄越小越易受到侵染, 另一方面可能与本实验选择强毒性菌株有关, BH1206菌株由患典型ERM症状的虹鳟病灶分离, 因此由该菌株侵染虹鳟表现出的临床症状越加明显。

本研究中, 已致死鱼可见典型肠炎红嘴病临床症状, 如脾脏肿大, 肝脏带有淤血点, 胃内充满大量黏液, 胃壁充血, 肠道充血并伴有黄色黏稠状液体等, 这些病理变化与相关研究描述的一致<sup>[3-4, 16]</sup>。Press等<sup>[20]</sup>对硬骨鱼免疫系统研究发现, 后肠是肠道主要抗原摄取和免疫应答部位, 而前、中肠主要是执行消化功能部位。结合已有研究<sup>[6, 16, 21]</sup>, 本实验选取肝脏、脾脏、肾脏和后肠组织进行病理评分, 用于研究ERM引起的组织病理学变化。鲁氏耶尔森菌侵染后虹鳟的各组织病理学切片结果显示, 肝脏中肝细胞边界不明, 排序混乱, 细胞萎缩, 细胞质呈疏松状态且炎性细胞浸润; 脾脏中红细胞死亡堆积, 出现大量炎性细胞; 肾脏中肾小管上皮细胞变性, 肾间质细胞坏死, 巨噬细胞增多。有研究发现鲁氏耶尔森菌可存活于巨噬细胞中<sup>[22-23]</sup>, 因此巨噬细胞数量的增多进一步表明, 该菌可在机体内大量繁殖并对机体造成持续性损伤。根据Toback等<sup>[16]</sup>对患肠炎红嘴病的虹鳟肾脏病理组织切片的研究, 黑色块状区域疑似黑色素瘤细胞聚集(图版-8), 本实验虹鳟的肾脏组织病理切片中同样观察到类似的黑色块状区域, 但未见清晰细胞结构, 是否为聚集的黑色瘤细胞有待进一步研究。后肠中固有层萎缩且与上皮细胞分离, 肠绒毛溶解。上述结果说明, 鲁氏耶尔森菌侵入鱼体后产生溶血素等毒素, 可造成虹鳟主要脏器的组织细胞变性坏死, 甚至是一些组织器官大面积变性坏死以及出血, 从而最终导致被感染虹鳟表现出相应临床症状直至死亡。

本研究构建的虹鳟肠炎红嘴病病理模型完整地复制了该病发生时患病鱼的典型症状, 且病程迁延较长, 便于后期相关研究。本研究选取 $2 \times 10^7$ 和 $2 \times 10^8$  CFU/mL 2个浓度的鲁氏耶尔森菌, 通过腹腔注射方式感染虹鳟, 实验鱼表现出典型的肠炎红嘴病临床症状, 并在肝脏、脾

脏、肾脏组织中分离到鲁氏耶尔森菌, 成功建立了虹鳟ERM病理模型。结合临床症状、组织病变程度和范围评价各感染组ERM模型状况, 发现注射浓度为 $2 \times 10^7$  CFU/mL组可成功建立该病理模型, 临床症状明显且组内差异较小, 病症适中, 适合研究。综上所述, 通过本实验建立的虹鳟肠炎红嘴病病理模型, 可为虹鳟的ERM防治提供参考, 并为该病免疫防控提供研究基础。

#### 参考文献:

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture[R]. Rome: FAO, 2014: 40-41.
- [2] Moffitt C M, Cajas-Cano L. Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture[J]. Fisheries, 2014, 39(11): 552-553.
- [3] Barnes A C. Enteric redmouth disease (ERM) (*Yersinia ruckeri*)[M]//Woo P T K, Bruno D W. Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2nd ed. Walingford, UK: CABI, 2011: 484-511.
- [4] Ross A J, Rucker R R, Ewing W H. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1966, 12(4): 763-770.
- [5] Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, et al. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish[J]. Veterinary Research, 2015, 46(1): 103.
- [6] Toback E, Decostere A, Hermans K, et al. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish[J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(5): 257-268.
- [7] 范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 862-868.  
Fan F L, Wang K Y, Geng Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 862-868(in Chinese).
- [8] Li S W, Wang D, Liu H B, et al. Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised Amur sturgeon *Acipenser schrencki* in China[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2013, 25(1): 9-14.
- [9] Willumsen B. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*[J]. Journal of Fish Diseases, 1989, 12(3): 275-277.

- [10] Farmer III J J, Davis B R, Hickman-Brenner F W, *et al.* Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 21(1): 46-76.
- [11] Ewing W H, Ross A J, Brenner D J, *et al.* *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1978, 28(1): 37-44.
- [12] 连浩淼, 卢彤岩, 刘红柏, 等. 虹鳟肠炎红嘴病病原菌的确定及其生长特性研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(5): 498-504.
- Lian H M, Lu T Y, Liu H B, *et al.* Isolation, identification and growth of pathogenic bacterium in enteric redmouth disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(5): 498-504(in Chinese).
- [13] 李雨函, 魏强. 哨兵动物概述[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10): 72-75.
- Li Y H, Wei Q. A brief introduction of laboratory sentinel animals[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2012, 22(10): 72-75(in Chinese).
- [14] 崔静雯, 汪开毓, 贺扬, 等. 无乳链球菌感染尼罗罗非鱼的脑膜炎模型[J]. *水产学报*, 2015, 39(12): 1883-1893.
- Cui J W, Wang K Y, He Y, *et al.* *Oreochromis niloticus* model of meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(12): 1883-1893(in Chinese).
- [15] Baums C G, Hermeyer K, Leimbach S, *et al.* Establishment of a model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2013, 149(1): 94-102.
- [16] Tობბაკი E, Decostere A, Hermans K, *et al.* Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 84(3): 219-228.
- [17] Fouz B, Zarza C, Amaro C. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(6): 339-346.
- [18] Feliciano J, Teper E, Ferrandino M, *et al.* The incidence of fluoroquinolone resistant infections after prostate biopsy—are fluoroquinolones still effective prophylaxis[J]. *Journal of Urology*, 2008, 179(3): 952-955.
- [19] Avci H, Birincioglu S S. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29(6): 1321-1328.
- [20] Press C M, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 309-318.
- [21] Liu T, Wang K Y, Wang J, *et al.* Genome sequence of the fish pathogen *Yersinia ruckeri* SC09 provides insights into niche adaptation and pathogenic mechanism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 557.
- [22] Stave J W, Cook T M, Roberson B S. Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes to strains of *Yersinia ruckeri*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1987, 10(1): 1-10.
- [23] Ryckaert J, Bossier P, D'Herde K, *et al.* Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 648-655.

## Construction of pathological model of ERM disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

ZHANG Xiao<sup>1,2</sup>, WANG Di<sup>1,3</sup>, LU Tongyan<sup>1</sup>, CAO Yongsheng<sup>1</sup>, LIU Hongbai<sup>1</sup>, LI Shaowu<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

3. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

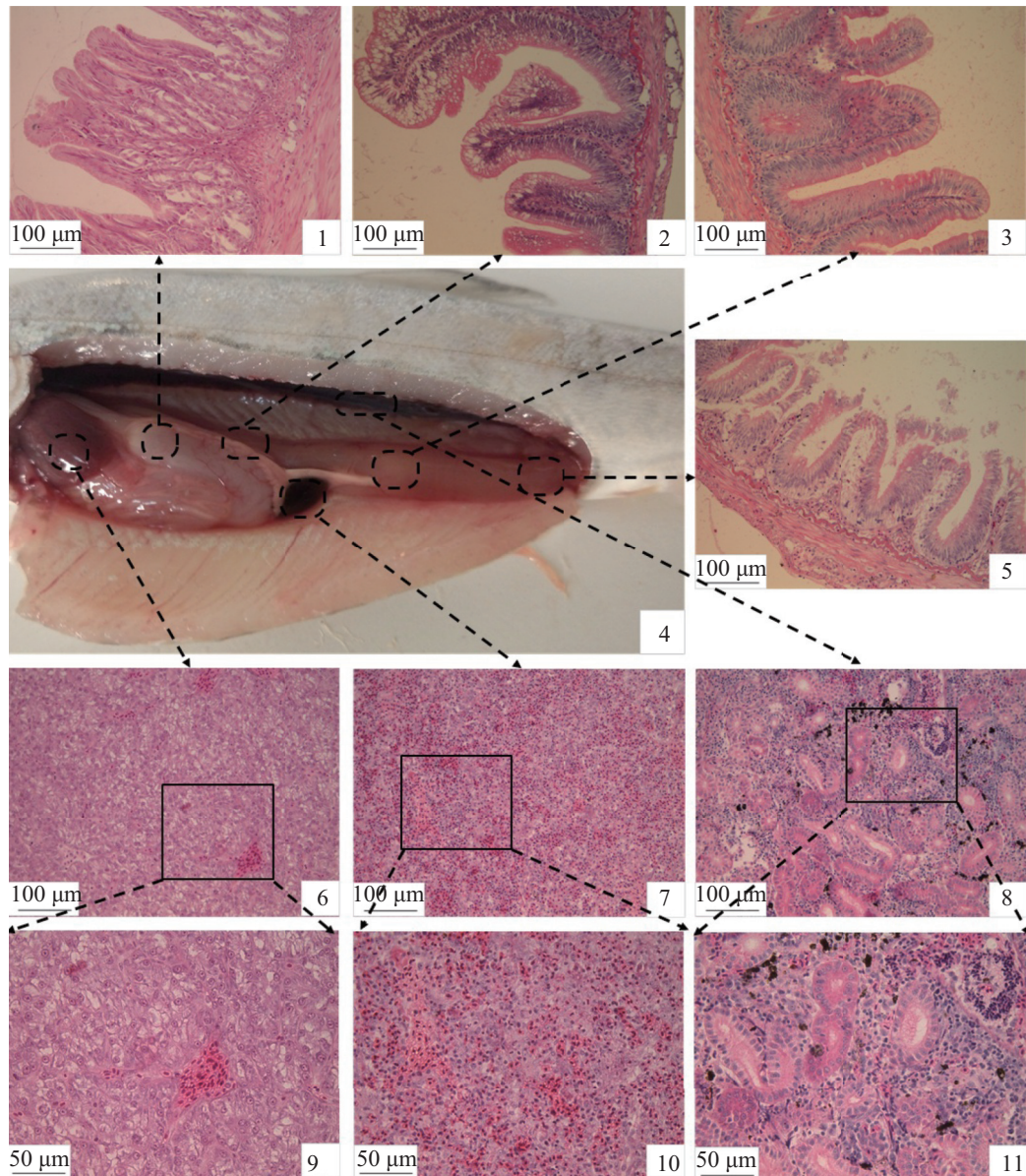
**Abstract:** To study the pathogenicity of *Yersinia ruckeri* to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), this paper established a pathological model of enteric redmouth disease (ERM) and developed the corresponding scoring system of the clinical signs and histopathology. 43 healthy *O. mykiss* with the average weight of 12 g were randomly divided into 5 groups: three experimental groups (n=30), control group (n=10) and sentinel group (n=3). The fish in three experimental groups were intraperitoneally injected with *Y. ruckeri* at a concentration of  $2.0 \times 10^6$ ,  $2.0 \times 10^7$  and  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL, respectively. The clinical signs and pathological changes of intestine, liver, spleen and kidney in the infected fish were determined. Bacteriological test was also used to evaluate the effect of the infection model. The challenged fish presented different degrees of death in 72 h and showed some clinical signs such as red mouth, anal swelling, different degrees of congestion in fins (pectoral, pelvic, anal fins), obvious blood spots in lateral line and abdomen. Histopathology indicated that the infiltration, hyperemia and hemorrhage of cells in the liver, spleen, kidney and intestine were observed. Degeneration and necrosis were found in the liver cells, intestinal epithelial cells, renal tubular epithelial cells and other parenchymal cells. In spleen, the number of lymphocytes decreased and the red blood cells heaped up to death. The results showed that the best disease model could be constructed by *Y. ruckeri* at a concentration of  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL for *O. mykiss* and the clinical signs were significant with little differences and the disease was in a slow progress. The pathological model of the enteric red mouth disease was successfully established by intraperitoneal injection of 0.1 mL *Y. ruckeri* at a concentration of  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL for *O. mykiss* juveniles with the body weight of about 12 g.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*; *Yersinia ruckeri*; enteric redmouth disease; pathological model

**Corresponding author:** LI Shaowu. E-mail: lishaowu@hrfri.ac.cn

**Funding projects:** Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD1009); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2017081)





图版 鲁氏耶尔森菌感染虹鳟后各组织病理学变化(H.E染色)

1.胃:固有层和黏膜下层结缔组织坏死,部分绒毛崩解;2.前肠:上皮细胞核结构被破坏,出现大量空泡,杯状细胞凋亡;3.中肠:大量中性粒细胞及炎性细胞浸润;4.剖解感染鲁氏耶尔森菌的虹鳟;5.后肠:肠绒毛脱落、断裂、溶解,游离于肠腔;6.肝脏:肝细胞空泡化,肝血窦扩张,炎性细胞浸润;7.脾脏:淋巴细胞空泡化,红细胞死亡堆积;8.肾脏:肾间质出血,肾小管上皮细胞崩解,巨噬细胞和炎性细胞浸润;9、10、11:分别为6、7、8局部放大图,组织病变情况更加明显

**Plate Histopathological changes in different tissues of *O. mykiss* infected by *Y. ruckeri* (H.E staining)**

1. stomach: necrosis of connective tissues in lamina propria and submucosa, part of the villus disintegration; 2. foregut: the structure of epithelial nuclear was destroyed, a large number of vacuoles appeared and goblet cells apoptosis; 3. midgut: a large number of neutrophils and inflammatory cell infiltration; 4. anatomy of rainbow trout infected by *Y. ruckeri*; 5. hindgut: intestinal villi was falled off, broken, dissolved and free in the intestine; 6. liver: cell vacuolization, expansion of hepatic sinusoids and inflammatory cell infiltration; 7. spleen: lymphocyte vacuolization and red blood cells overrided to death; 8. kidney: renal interstitial hemorrhage, tubular epithelial cell disintegration, macrophage and neutrophil inflammatory cell infiltration; 9, 10 and 11. partial enlarged views of plate 6, 7 and 8, respectively, the obvious pathological changes were found in liver, spleen and kidney