

DOI: 10.12264/JFSC2021-0081

肌肉注射感染嗜冷黄杆菌虹鳟的组织嗜性与动态分布

柴静茹^{1,2,3}, 王荻^{1,2}, 陈福广^{1,2}, 曹永生^{1,2}, 卢彤岩^{1,2}, 李绍戊^{1,2}

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. 黑龙江省水生动物病害与免疫重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要:嗜冷黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)是鲑鳟类细菌性冷水病(bacterial cold water disease, BCWD)的病原菌, 该病的发生和流行严重制约了鲑鳟产业的健康发展。本研究分析嗜冷黄杆菌肌肉注射感染虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)后病原菌的动态组织分布情况, 以期 BCWD 的防控提供理论支撑。以 1.0×10^8 CFU/mL 浓度的嗜冷黄杆菌 CH06 菌株液肌肉注射感染实验虹鳟, 感染后 12 h、24 h、96 h 观察虹鳟临床症状及组织病变, 并利用 qPCR Taqman 探针法检测各组织病原载量。患病鱼的临床病征表现为体色发黑、游动缓慢或不动、食欲不振, 尾柄部注射处肌肉溃烂, 鳃苍白, 脾脏肿大, 伴有腹水。组织病理观察显示, 嗜冷黄杆菌感染后实验鱼注射处肌纤维断裂、溶解; 脾窦扩张, 其内充满红细胞; 肾脏组织含铁血黄素增加, 出现大量空泡变性, 肾小管上皮细胞变性、坏死, 肾间质炎性细胞浸润。qPCR 检测结果表明, 肌肉注射感染 12 h 后即可在脾脏、肝脏、肾脏、肠道、鳃、注射处肌肉、脑和尾鳍中检出嗜冷黄杆菌, 注射处肌肉病原载量最高为 $(5.85 \pm 2.11) \times 10^5$ copy/ μ L。感染后 24 h, 脾脏、脑中病原载量较 12 h 时上升最多, 其他组织病原载量与感染 12 h 时水平一致, 注射处肌肉病原载量为 $(6.48 \pm 2.07) \times 10^5$ copy/ μ L, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。感染 96 h 后脾脏中的病原载量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 达到 $(1.15 \pm 0.58) \times 10^7$ copy/ μ L; 肝脏、肾脏、脾脏中的病原载量较 24 h 时上升最多。所有被检组织中病原菌载量随时间延长均呈上升趋势。另外, 3 个时间点注射处肌肉的病原平均载量最高, 其次为脾脏, 然后是肾脏和鳃。嗜冷黄杆菌人工感染虹鳟后, 注射处肌肉、脾脏是细菌的重要增殖场所。综上, 嗜冷黄杆菌可随着血液循环进入虹鳟各组织, 并表现出对注射处肌肉、脾脏、肾脏和鳃较强的组织嗜性, 而对肝脏、尾鳍、肠道和脑组织的嗜性相对较弱; 感染时间和病变程度与组织中的病原载量呈正相关。

关键词:嗜冷黄杆菌; 虹鳟; 致病性; 组织嗜性; 动态分布

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1426-10

嗜冷黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)是鲑科鱼类细菌性冷水病(bacterial cold water disease, BCWD)的致病菌, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)尤其易感^[1]。自 1948 年首次从美国患病银鲑的肾脏中分离到嗜冷黄杆菌以来, 该菌在丹麦、挪威、瑞典、法国、英国、日本、韩国、澳大利亚、加拿大、美

国、智利和秘鲁等多个国家和地区的集约化鲑鳟主养区均有报道^[2]。BCWD 的典型临床症状包括尾柄部溃烂、鳍条腐烂、鳃苍白, 伴有脾脏肿大、肠炎等^[3], 通常在 4~15 °C 的水温时发生, 10 °C 及以下流行普遍且危害严重^[4], 可造成患病鲑鳟 10%~90% 死亡率^[5], 严重制约了鲑鳟产业的健康发展。

收稿日期: 2021-02-24; 修订日期: 2021-05-17.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201902Q); 中国水产科学研究院冷水性鱼类病害防控创新团队项目(2020TD43).

作者简介: 柴静茹(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类病害防控.

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

目前, 国内外对嗜冷黄杆菌的研究多集中在分子流行病学、检测方法、耐药性、致病性和免疫防控技术等方面^[6-9]。嗜冷黄杆菌的致病机制复杂且尚不够清晰, 其菌株毒力与黏附系统、外毒素、脂多糖和分泌系统等相关^[3]。最新研究表明, 嗜冷黄杆菌具有很强的弹性蛋白水解活性, 可降解鱼皮肤、肌肉和软骨的成分^[10]。该菌利用 IX 型分泌系统(T9SS)分泌多种蛋白到细胞表面和其他地方, 如细胞表面黏附素、肽酶、核酸酶和其他水解酶等^[11]。该菌无鞭毛或菌毛, 却能产生滑动运动, T9SS 分泌运动性黏附素到细胞表面, 这是滑动运动所必需的^[12]。嗜冷黄杆菌的侵染途径包括水平和垂直传播两种^[13], 该菌对上皮组织表面的黏附使它能够侵入宿主, 鳃是最常附着的部位, 其次是鳃、皮肤^[14]。Papadopoulou 等^[14]评估了嗜冷黄杆菌对虹鳟鱼苗鳃、皮肤和鳃黏膜表面的附着力, 这种黏附性受到组织和时间的显著影响, 他们同时发现该菌能少量侵入虹鳟的脾脏和肾脏, 这可能在 BCWD 的发病机制中起着至关重要的作用。但是关于该病原在鱼体内不同组织中的增殖和分布情况仍不清楚。

本课题组前期首次报道了国内养殖虹鳟源嗜冷黄杆菌的分离鉴定和生物学特性研究^[15], 通过肌肉注射感染健康虹鳟表明, 分离菌株对实验鱼具有较高的致病性, 肝脏、脾脏和肌肉组织病变明显。为进一步阐明嗜冷黄杆菌对虹鳟的致病机制, 本研究利用 qPCR 方法开展嗜冷黄杆菌在肌肉注射感染虹鳟过程中的组织嗜性及动态分布研究, 以期有效防控 BCWD 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、动物及所用试剂

嗜冷黄杆菌 CH06 株(全基因组序列 GenBank 登录号: CP046374.1)由本实验室分离、鉴定并保藏, 其 MLST 基因型为 ST12 型, 血清型为 Fd 型^[15]。健康虹鳟购自辽宁本溪艾格莫林实业有限公司, 平均体重 20~30 g, 开展实验前于水族箱中暂养 1 周并进行细菌学检测, 以确保其处于健康状态且不携带嗜冷黄杆菌。

实验用胰蛋白胨和酵母提取物购自 OXOID 公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、组织基因组 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司, 2×Taq PCR Master Mix 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 2×GoldStar Probe Mixture 购自北京康为世纪生物科技有限公司, 引物和探针委托吉林省库美生物科技有限公司合成。

1.2 细菌培养和制备菌悬液

取冻存于-80 °C 的 CH06 株划线接种于胰蛋白胨酵母提取物(tryptone yeast extract salts, TYES)琼脂平板上, 15 °C 恒温培养 72~96 h。挑取单菌落接种于 TYES 肉汤培养基中, 15 °C 150 r/min 振荡培养 72 h, 使用生理盐水清洗菌液 3 次并重悬, 10 倍系列稀释重悬后的菌液, 采用平板计数法计算菌液浓度。

1.3 人工感染实验

将实验虹鳟随机分为 2 组, 实验组和空白对照组各 15 尾。攻毒前利用 MS222 麻醉虹鳟, 实验组用 1×10^8 CFU/mL CH06 株菌悬液按 0.1 mL/尾在虹鳟尾柄部进行肌肉注射, 空白对照组注射等体积生理盐水。

1.4 临床症状与组织病理损伤观察

感染 12 h、24 h、96 h 后详细观察和记录实验组和对对照组虹鳟的临床症状, 同时分别取注射处肌肉、脾脏和肾脏, 用 4%多聚甲醛固定 48 h (中间换液), 样品经包埋切片、切片脱蜡至水化、苏木素染色、盐酸乙醇分化、自来水返蓝、伊红染色、脱水、透明、封片步骤处理后, 利用尼康 EclipseCi-L 显微镜观察和拍照。

1.5 qPCR 检测病原菌的组织分布

1.5.1 样品采集 分别选择 12 h、24 h、96 h 3 个时间点检测虹鳟各组织载菌量, 研究嗜冷黄杆菌对虹鳟的组织嗜性。感染 12 h、24 h、96 h 后随机捞取 2 组中各 3 尾鱼进行样品采集, 包括肝脏、脾脏、肾脏、肠道、鳃、注射处肌肉、脑和尾鳍, 立即冻存于-80 °C 中备用。

1.5.2 qPCR 标准曲线的建立 取 1.0 mL CH06 株菌悬液于 1.5 mL 离心管中, 10000 r/min 离心

3 min, 弃去上清, 按照试剂盒说明书进行细菌基因组 DNA 提取并检测其浓度和纯度。以 CH06 株基因组 DNA 为模板, 使用引物^[16]*F. psychro_P1F*(5'-GAAGATGGAGAAGGTAATTTAGTTGAT ATT-3')和 *F. psychro_P1R*(5'-CAAATAACATCTC CTTTTCTACAACCTTGA-3')进行 PCR 扩增嗜冷黄杆菌 *rpoC* 基因目的片段。PCR 反应体系(50 μ L)如下: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 扩增条件^[4]: 96 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 96 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物纯化后, 进行测序比对分析及 DNA 浓度定量检测。根据公式^[16]计算拷贝数: 拷贝数 (copy/ μ L)= 纯化产物的 DNA 浓度 (ng/ μ L)/(1.797 $\times 10^{-7}$)(pg/copy)。

参照 Strepparava 等^[16]建立的嗜冷黄杆菌 qPCR 检测方法, 将纯化的 PCR 产物进行 10 倍系列稀释作为模板, 使用 TaqMan 探针 (5'-FAM-AAACGGGTATTCTTCTTGCTACA-3'BHQ1) 和引物 *F. psychro_P1F*/*P1R* 进行 TaqMan qPCR 扩增。反应体系(10 μ L)如下: GoldStar Probe Mixture 5 μ L, 引物各 0.2 μ L, TaqMan 探针 0.2 μ L, ROX 0.2 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 3.7 μ L。反应条件^[4]: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 s, 40 个循环; 40 $^{\circ}$ C 延伸 10 s。所有样本进行 3 次重复, 同时设立阴性对照。按上述体系及条件进行 qPCR 反应, 得到标准曲线。

1.5.3 组织中嗜冷黄杆菌的定量检测 取 30 mg 冻存的各组织按照试剂盒说明书进行组织基因组 DNA 的提取, 检测纯度和浓度后置于一20 $^{\circ}$ C 保存备用。以提取的各组织基因组 DNA 为模板, 按照 1.5.2 中的方法进行 qPCR 检测, 所有样本进行 3 次重复, 同时设立阴性对照。应用已构建的标准曲线计算虹鳟各组织病原载量。

1.6 嗜冷黄杆菌分离培养和鉴定

从实验组和对照组中各采样 3 尾虹鳟, 在脾脏、肾脏等组织取样划线接种于 TYES 琼脂培养基上, 15 $^{\circ}$ C 恒温培养 72~96 h 后对分离菌株进行形态特征和理化特性分析。同时, 参照方法 1.5.2

提取细菌基因组 DNA, 利用嗜冷黄杆菌特异性引物 *F. psychro_P1F*/*P1R* 扩增 *rpoC* 基因进行测序比对分析。

1.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 多重比较采用 Duncan's 法, 结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 嗜冷黄杆菌感染虹鳟的临床症状和病理剖检

人工感染后 12 h, 注射处肌肉略微肿胀, 此时解剖无组织异常; 感染后 24 h, 虹鳟精神不振, 游动缓慢或不动, 厌食, 此时解剖可见注射处肌肉小面积溃烂, 脾脏肿大不明显; 感染后 96 h, 虹鳟体色发黑, 尾柄部溃烂, 此时剖检可见有鳃苍白, 脾脏肿大, 肝脏有出血点和腹水现象, 注射部位肌肉溃烂严重, 部分个体甚至出现脊柱畸形(图 1)。对照组虹鳟仅在注射处出现肌肉略微肿胀现象, 剖检未见组织异常情况, 且始终无死亡。

2.2 虹鳟感染嗜冷黄杆菌的组织病理学变化

注射处肌肉: 感染后 12 h, 注射处肌肉组织无病理变化(图 2A); 感染后 24 h, 肌纤维断裂、溶解(图 2B); 感染后 96 h, 肌纤维大量断裂、溶解, 伴有大量炎性细胞浸润(图 2C)。

脾脏: 感染后 12 h, 脾脏组织无病理变化(图 2D); 感染后 24 h, 脾窦扩张, 其内充满红细胞(图 2E); 感染后 96 h, 脾脏组织充满大量红细胞, 残存的脾髓呈岛屿状漂浮其中(图 2F)。

肾脏: 感染后 12 h, 肾脏组织无病理变化(图 2G); 感染后 24 h, 肾脏组织部分肾小管上皮脱离基底膜, 肾小球肿胀(图 2H); 感染后 96 h, 肾脏组织含铁血黄素增加, 出现大量空泡变性, 肾小管上皮细胞变性、坏死, 肾间质许多炎性细胞浸润(图 2I)。

2.3 标准曲线的建立

设置浓度在 $2.7 \times 10^8 \sim 2.7 \times 10^2$ copy/ μ L 范围的标准品进行 qPCR 扩增。以每个浓度标准品拷贝数的 lg 值为横坐标, 以出现的 C_t 值结果为纵坐标, 获得基于检测 *rpoC* 基因 qPCR 方法的标准曲线

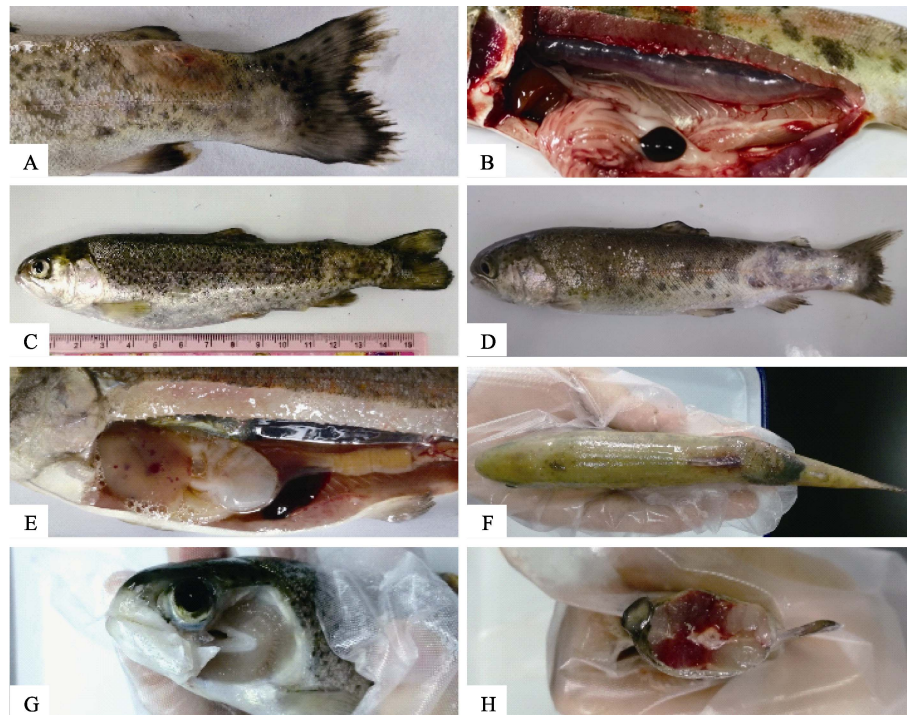


图 1 患病虹鳟临床病征及病理解剖

A. 第 24 小时, 注射处肌肉小面积溃烂; B. 第 24 小时, 脾脏略微肿大; C. 第 96 小时, 体色发黑; D. 第 96 小时, 尾柄部溃烂; E. 第 96 小时, 脾脏肿大、肝脏有出血点; F. 第 96 小时, 脊柱畸形; G. 第 96 小时, 鳃苍白; H. 第 96 小时, 注射部位肌肉溃烂。

Fig. 1 Clinical signs and pathological anatomy of diseased rainbow trout

A. Small area of muscle ulceration at injection site at 24 h; B. Slightly enlarged spleen at 24 h; C. Blacken body at 96 h; D. Erosion of the caudal peduncle at 96 h; E. Splenomegaly and liver bleeding at 96 h; F. Spinal deformity at 96 h; G. Pale gills at 96 h; H. Muscle ulceration at the injection site at 96 h.

(图 3)。标准曲线方程为 $y = -4.1213x + 43.551$, 截距为 43.551, 斜率为 -4.1213, 相关系数 $R^2 = 0.9997$, 表明标准品拷贝数 $\lg$ 值与 C_t 值线性关系良好。

2.4 组织中嗜冷黄杆菌定性检测

以提取的实验组和对照组虹鳟组织基因组 DNA 为模板, 利用常规 PCR 方法扩增嗜冷黄杆菌 *rpoC* 基因。结果表明, 实验组成功获得大小约为 164 bp 的目的基因片段, 其与预期目的片段大小相符(图 4), 而对照组 PCR 结果为阴性。BLAST 比对分析显示, PCR 产物序列与嗜冷黄杆菌 *rpoC* 基因的同源性为 100%。

2.5 嗜冷黄杆菌的组织嗜性和动态分布

以感染 CH06 株后不同时间点虹鳟各组织 DNA 为模板进行 qPCR TaqMan 探针检测, 结果显示在整个感染过程中, 脾脏、肝脏、肾脏、肠道、鳃、注射处肌肉、脑和尾鳍中均可检出嗜冷黄杆菌; 同时, 常规微生物分离培养结果显示,

从脾脏、肾脏等组织中可以分离到该病原。对照组既不能从各组织中分离到嗜冷黄杆菌, 也不能通过 qPCR 检测到该病原。

通过病原载量的多少判定嗜冷黄杆菌的组织嗜性强弱。结果表明(图 5), 嗜冷黄杆菌对虹鳟的注射处肌肉、脾脏、肾脏和鳃具有较强的组织嗜性, 为细菌增殖的重要场所, 对肝脏、尾鳍、肠道和脑的组织嗜性相对较弱。感染后 12 h, 注射处肌肉病原载量最高为 $(5.85 \pm 2.11) \times 10^5$ copy/ μ L, 其次是鳃和肾脏, 其病原载量分别达到 $(1.62 \pm 0.28) \times 10^3$ copy/ μ L 和 $(1.30 \pm 0.23) \times 10^3$ copy/ μ L。感染后 24 h, 脾脏和脑中的病原载量分别为 $(1.26 \pm 0.37) \times 10^4$ copy/ μ L 和 $(1.72 \pm 0.31) \times 10^3$ copy/ μ L, 与其他组织相比, 较上一时间点上升最多, 分别是 12 h 时的 17.05 倍和 13.30 倍。肾脏、鳃、脑中的病原载量维持在 10^3 水平, 而肝脏、肠道、尾鳍中的病原载量维持在 10^2 水平。注射处肌肉病原载量为

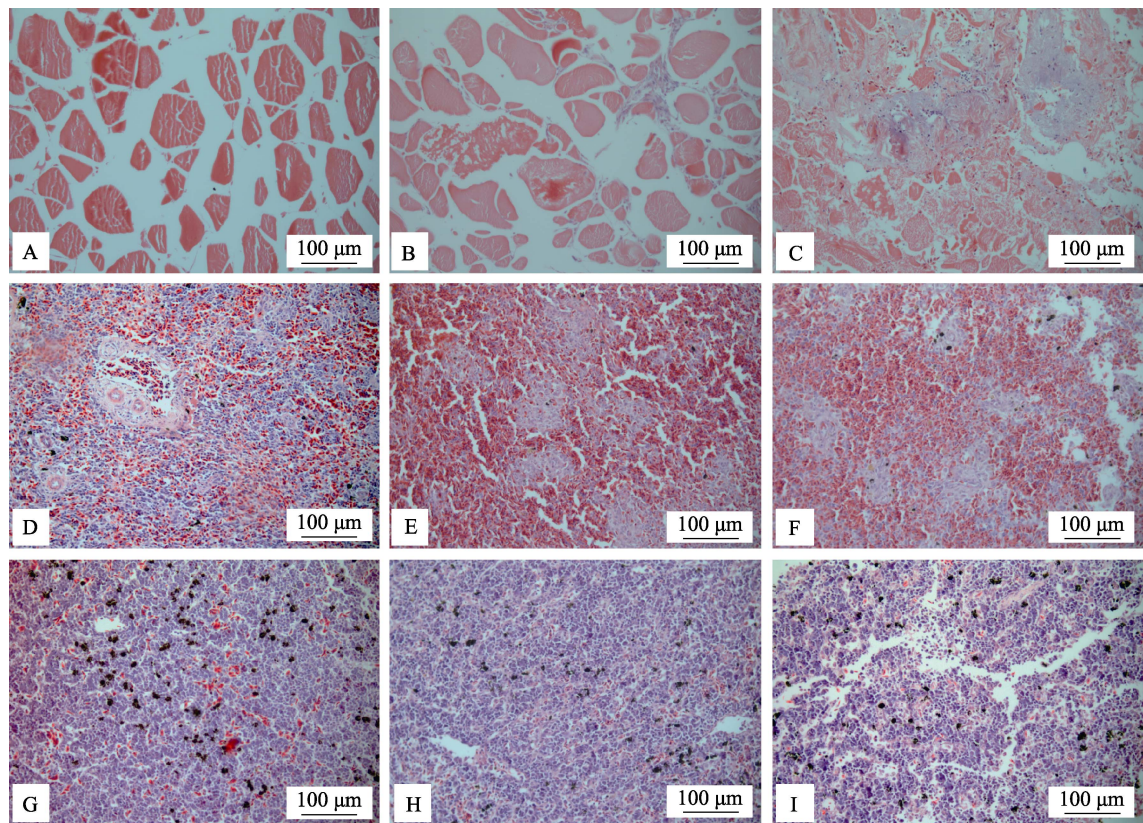


图 2 嗜冷黄杆菌感染虹鳟的组织病理损伤(HE)

A~C. 分别为感染 12 h、24 h 和 96 h 后虹鳟注射处肌肉组织病变情况; D~F. 分别为感染 12 h、24 h 和 96 h 后虹鳟脾脏组织病变情况; G~I. 分别为感染 12 h、24 h 和 96 h 后虹鳟肾脏组织病变情况.

Fig. 2 Histopathological changes of rainbow trout infected by *Flavobacterium psychrophilum* (HE)
A~C. Histopathological changes in intramuscular injection site at 12 h, 24 h and 96 h; D~F. Histopathological changes in spleen tissues at 12 h, 24 h and 96 h; G~I. Histopathological changes in kidney tissues at 12 h, 24 h and 96 h.

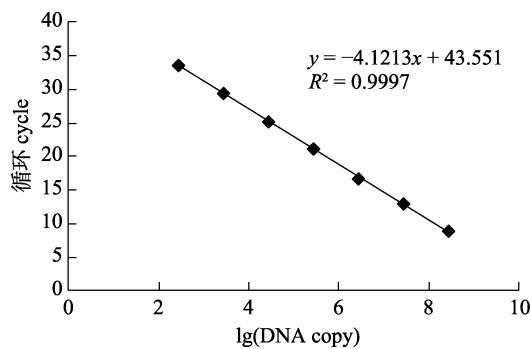


图 3 荧光定量 PCR 扩增标准曲线

Fig. 3 Real-time PCR amplification standard curves

$(6.48\pm2.07)\times10^5$ copy/ μ L, 显著高于其他组织($P<0.05$)。感染后 96 h, 所有被检组织病原载量均上升, 脾脏中的病原载量为 $(1.15\pm0.58)\times10^7$ copy/ μ L, 显著高于注射处肌肉病原载量($P<0.05$), 注射处肌肉病原载量为 $(7.21\pm1.77)\times10^6$ copy/ μ L, 显著高

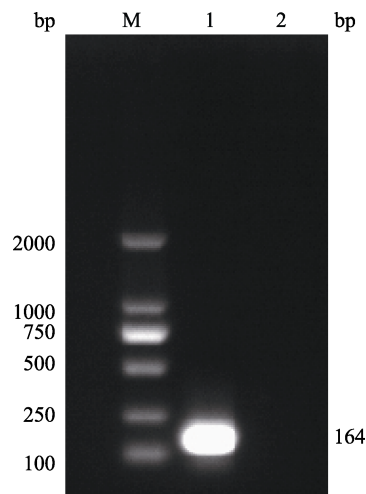


图 4 *rpoC* 基因的 PCR 扩增

M: DNA Marker DL2000; 1: *rpoC* 基因片段; 2: 阴性对照.

Fig. 4 Amplification of *rpoC* gene by PCR
M: DNA Marker DL2000; 1: *rpoC* gene fragment;
2: negative control.

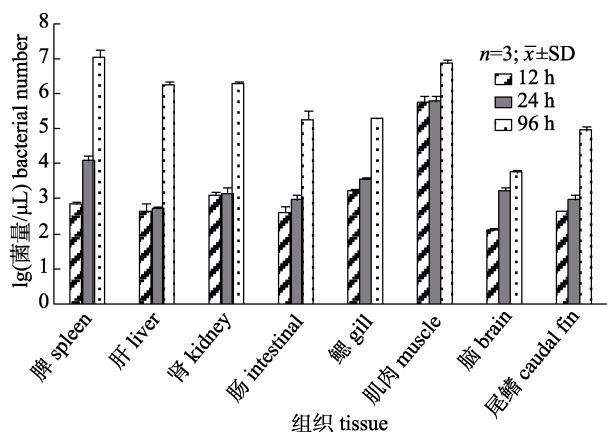


图 5 虹鳟感染嗜冷黄杆菌后各组织中病原载量的变化分析

*表示相同感染时间不同组织差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Analysis of bacterial load in different tissues of rainbow trout infected by *Flavobacterium psychrophilum*

* means significant differences ($P<0.05$) among different tissues at the same time.

于其他组织($P<0.05$)。肝脏、肾脏和脾脏中的病原载量分别为 $(1.75\pm 0.45)\times 10^6$ copy/ μ L、 $(2.00\pm 0.22)\times 10^6$ copy/ μ L 和 $(1.15\pm 0.58)\times 10^7$ copy/ μ L, 与其他组织相比, 较上一时间点上升最多, 分别是 24 h 时的 3243.34 倍、1336.96 倍和 916.94 倍。

所有被检组织中嗜冷黄杆菌的载量随感染时间增加均呈上升趋势, 其中, 注射处肌肉和脾脏中的病原载量最高, 其次为肾脏、鳃、肝脏、尾鳍、肠道和脑。嗜冷黄杆菌对注射处肌肉和脾脏的嗜性最强, 其次为肾脏和鳃, 其对肝脏、尾鳍、肠道、脑组织嗜性相对较弱。

3 讨论

3.1 感染方式、感染浓度与感染时间的选择

鱼类人工感染细菌的方法包括浸浴、肌肉注射、腹腔注射或通过口腔、生殖孔感染。嗜冷黄杆菌感染虹鳟主要采用浸浴法或注射法, 在虹鳟的早期生命阶段(<5 g), 浸浴感染是首选方法, 因为此时虹鳟容易感染, 且这种感染方法不会绕过黏液、表皮、鳃和肠道的内在防御机制, 模拟了自然感染途径^[17-18]。然而浸浴感染的缺点是可重复性低, 由病原菌导致的死亡率低, 感染过程较长。较大的虹鳟(5~10 g)通常对嗜冷黄杆菌浸浴感染不易感, 本研究所用虹鳟体重较大为 20~

30 g^[19]。在水生环境中, 虹鳟通常会接触异质传染病原体。然而, 即使自然界中经常发生此类感染, 虹鳟的共同感染也很少受到关注^[20]。比如大西洋鲑三代虫(*Gyrodactylus salaris*)的附着和摄食破坏了虹鳟鳃和表皮的完整性, 导致其抵抗细菌及病毒的能力下降^[21]; 鱼虱(*Caligus rogercresseyi*)以虹鳟的黏液、表皮组织和血液为食, 损伤体表造成机械损伤^[21]; 寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*)感染虹鳟致使其患部皮肤缺失, 露出真皮^[22]; 鲑疱疹病毒 II 型(salmonid herpesvirus2, SaHV2)感染虹鳟致使其体表糜烂、溃疡^[22]; 这些感染都有极大可能导致机会性病原体的入侵和继发感染, 肌肉注射感染正是模仿了这些情况发生后的继发感染。Decostere 等^[19]使用嗜冷黄杆菌浸浴和通过口腔、生殖孔这 3 种方法感染虹鳟, 在实验组和对照组中, 均未发现虹鳟表现出临床症状或死亡, 在虹鳟皮肤、鳃、肾脏、脾脏和大脑的组织学检查中未发现嗜冷黄杆菌, 也没有从检查的任何器官中分离出该菌。Holt^[23]的研究表明对于嗜冷黄杆菌感染虹鳟和其他鲑科鱼类, 通过肌肉注射感染比腹腔注射感染更有效; Garcia 等^[24]证明利用嗜冷黄杆菌诱导虹鳟幼鱼感染, 肌肉注射感染的死亡率高于腹腔注射感染; Fredriksen 等^[25]用浓度为 5.0×10^7 CFU/mL 的嗜冷黄杆菌腹腔注射虹鳟, 死亡率为 0, 用浓度为 5.0×10^7 CFU/mL、 5.0×10^6 CFU/mL、 5.0×10^5 CFU/mL 的嗜冷黄杆菌肌肉注射虹鳟, 死亡率为 75%~100%。这些实验均证明肌肉注射感染可行性比腹腔注射感染可行性更高。同时, 嗜冷黄杆菌能分泌弹性蛋白酶, 这是一种能降解鱼类结缔组织如皮肤和肌肉的胞外蛋白酶, 采用在尾柄部肌肉注射 CH06 的方法正与自然感染嗜冷黄杆菌虹鳟在尾柄部出现皮肤溃疡、肌肉溃烂这一临床症状相似。所以本实验采用肌肉注射法进行人工感染实验。

感染预实验分别以 CH06 菌株悬液 1.0×10^8 CFU/mL 组、 1.0×10^7 CFU/mL 组、 1.0×10^6 CFU/mL 组 3 个浓度按 0.1 mL/尾在虹鳟尾柄部进行肌肉注射。虽然各浓度组都能感染成功, 但 1.0×10^6 CFU/mL 组死亡率只有 60%, 与其他两组相比, 96 h 观察虹鳟未出现死亡情况且尾柄部未出

现溃疡灶,说明此浓度略低,死亡过慢,未能达到理想的感染状态; 1.0×10^7 CFU/mL 组死亡率为 90%,死亡率高,96 h 观察虹鳟出现 1 例死亡,解剖发现皮下肌肉已出现溃烂但尾柄部仍未出现溃疡灶,也未能达到理想的感染状态; 1.0×10^8 CFU/mL 组死亡率为 100%,死亡率高,72 h 出现第 1 例死亡,96 h 死亡 4 尾,在 96 h 就能达到 50%死亡率,死亡鱼中有 80%都出现了典型的尾柄部溃疡灶,脾脏肿大的比例也达 60%,该组典型症状出现比例最高,综合考虑最终选用 1.0×10^8 CFU/mL 浓度的 CH06 肌肉注射感染虹鳟作为正式实验感染条件,并将该浓度组出现 50%死亡率的时间点作为采样的终止时间。注射等体积生理盐水的对照组虹鳟无明显临床病症且无死亡。

3.2 虹鳟细菌性冷水病的临床症状

黄杆菌属包含多种细菌,地理范围呈世界性分布,能在淡水、土壤甚至寒冷环境中生存,其中对鱼类具有致病性且危害严重的包括嗜冷黄杆菌、嗜鳃黄杆菌(*Flavobacterium branchiophilum*)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)和约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsoniae*)^[26]。鱼类黄杆菌病的临床症状主要表现为体色发黑,食欲下降,游泳异常,皮肤溃疡。也会出现其他临床症状,如虹鳟感染嗜鳃黄杆菌会出现鳃丝肿胀、颜色暗淡等症状^[27];黄颡鱼感染柱状黄杆菌会出现鳃丝发白、不整齐,腹腔积水,肠道系膜充血等症状^[28];草鱼感染约氏黄杆菌会出现烂鳃、鳍条和鳍条基部溃烂等症状^[29]。嗜冷黄杆菌作为一种对鲑鳟类养殖业产生严重威胁的病原菌,在国外具有较长的研究历史。本研究以 1.0×10^8 CFU/mL 的 CH06 肌肉注射于虹鳟,成功感染虹鳟,其人工感染的临床表现与自然感染相同,主要有虹鳟精神不振,游动缓慢或不动,厌食,体色发黑,尾柄部溃烂,鳃苍白,脾脏肿大,肝脏有出血点和腹水,其中尾柄部溃烂比较典型,可以作为临床上诊断虹鳟嗜冷黄杆菌感染的一个示病表现。

3.3 嗜冷黄杆菌动态分布与组织嗜性分析

病原体的快速检测和定量,对于疾病监测至关重要,是流行病学研究的重要组成部分。实时荧光定量 PCR (qPCR)已用于多项研究中,以提高

病原检测和定量方法的敏感性。陈成等^[30]使用 qPCR 技术定量检测拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)浸浴感染黄颡鱼后在体内的动态分布,结果表明皮肤、鳃和肠道是病菌的入侵位点,并在体内多组织、器官分布。刘丹等^[31]使用 qPCR 技术定量检测大鲵蛙病毒(Chinese giant salamander ranavirus, CGSRV)人工感染大鲵后在不同组织中的动态分布,结果显示 CGSRV 在肺、肠、肝脏、脾脏、肾脏和皮肤肌肉中含量高,表明 CGSRV 具有广泛的组织分布特征。本研究基于 *rpoC* 基因开展 qPCR 定量检测。每个细菌细胞可能含有数量不等的 16S rRNA 基因拷贝,以单拷贝基因为靶点,可以更直接更准确地量化病原体,一个基因拷贝对应一个细菌细胞。此外,*rpoC* 的变异性可以提供嗜冷黄杆菌靶序列的特异性扩增,使 *rpoC* 成为 qPCR 的良好候选^[16]。Jarau 等^[4]通过 *rpoC* qPCR 法和平板计数法计算受感染鱼组的 96 个脾脏样品的菌落数,发现两种计数方法之间存在非常强的正相关性($R^2 = 0.915$, $P < 0.05$),证明 *rpoC* qPCR 法计算出的菌落数可以反映活菌数。平板计数法非常耗时且劳动强度大,*rpoC* qPCR 法具有速度快和易于操作的优点。本研究发现,在人工感染虹鳟的脾脏、肝脏、肾脏、肠道、鳃、肌肉、脑和尾鳍中均能检测到嗜冷黄杆菌,且随着感染时间的延长,所有被检组织中的病原载量持续增加。其中,由于采用肌肉注射感染的原因,注射处肌肉病原载量始终较高,在感染后 12 h、24 h 显著高于其他组织($P < 0.05$),在感染后 96 h 略低于脾脏病原载量,而高于其他组织。与感染初期相比,感染嗜冷黄杆菌 96 h 后虹鳟的肝脏、肾脏、脾脏中病原载量显著上升,说明肌肉、肝脏、肾脏和脾脏是嗜冷黄杆菌的重要增殖场所。组织病变观察与 qPCR 检测结果相比,可见组织病变出现的时间与病原载量的多少呈现较高的一致性。Ekman^[32]研究结果显示,嗜冷黄杆菌在感染虹鳟过程中,脾脏病变明显,脾脏出血、坏死并存在大量游离细菌;肾脏表现出肾小管上皮和造血组织坏死的病变。也有研究发现,嗜冷黄杆菌感染虹鳟后可在患病鱼的鳃、皮肤、内脏器官和伤口上检测到该病原菌^[33]。Jarau 等^[4]研究发现,人工感染

3 d 后可在虹鳟脾脏中检测出嗜冷黄杆菌。这些研究结果都与本研究得到的嗜冷黄杆菌感染组织的结果一致。

本研究利用 qPCR 技术探究嗜冷黄杆菌肌肉注射感染虹鳟后细菌在鱼体内的增殖分布规律和组织嗜性, 为进一步研究嗜冷黄杆菌的致病机制及有效防控 BCWD 奠定重要基础。

参考文献:

- [1] Rochat T, Fujiwara-Nagata E, Calvez S, et al. Genomic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* serotypes and development of a multiplex PCR-based serotyping scheme[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1752.
- [2] Hoare R, Ngo T P H, Bartie K L, et al. Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss* L.)[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 43.
- [3] Chai J R, Wang D, Lu T Y, et al. Research progress on *Flavobacterium psychrophilum* and bacterial coldwater disease: A review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(5): 755-761. [柴静茹, 王荻, 卢彤岩, 等. 嗜冷黄杆菌及细菌性冷水病的研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(5): 755-761.]
- [4] Jarau M, Di Natale A, Huber P E, et al. Virulence of *Flavobacterium psychrophilum* isolates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(10): 1505-1514.
- [5] Barnes M E, Brown M L. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment [J]. *The Open Fish Science Journal*, 2011, 4: 40-48.
- [6] Saticioglu I B, Duman M, Wiklund T, et al. Serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from farmed salmonids in Turkey[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(12): 1899-1908.
- [7] Madetoja J, Wiklund T. Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(2): 259-266.
- [8] Van Vliet D, Loch T P, Smith P, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the Great Lakes Basin, Michigan[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2017, 23(6): 791-798.
- [9] Gómez E, Méndez J, Cascales D, et al. *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: A difficult task[J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(5): 414-423.
- [10] Rochat T, Pérez-Pascual D, Nilsen H, et al. Identification of a novel elastin-degrading enzyme from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(6): e02535-18.
- [11] Barbier P, Rochat T, Mohammed H H, et al. The type IX secretion system is required for virulence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e00799-20.
- [12] Pérez-Pascual D, Rochat T, Kerouault B, et al. More than gliding: Involvement of GldD and GldG in the virulence of *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2168.
- [13] Duchaud E, Rochat T, Habib C, et al. Genomic diversity and evolution of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 138.
- [14] Papadopoulou A, Dalsgaard I, Lindén A, et al. *In vivo* adherence of *Flavobacterium psychrophilum* to mucosal external surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(10): 1309-1320.
- [15] Chai J R, Wang D, Lu T Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* from *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(6): 929-939. [柴静茹, 王荻, 卢彤岩, 等. 虹鳟源嗜冷黄杆菌的分离鉴定及致病性[J]. *水产学报*, 2021, 45(6): 929-939.]
- [16] Strepparava N, Wahli T, Segner H, et al. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 105.
- [17] Lorenzen E, Brudeseth B E, Wiklund T, et al. Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 440-444.
- [18] Aoki M, Kondo M, Kawai K J, et al. Experimental bath infection with *Flavobacterium psychrophilum*, inducing typical signs of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 67(1-2): 73-79.
- [19] Decostere A, Lammens M, Haesebrouck F. Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges[J]. *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(2): 165-169.
- [20] Ma J, Bruce T J, Oliver L P, et al. Co-infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with infectious hematopoietic necrosis virus and *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Journal*

- of Fish Diseases, 2019, 42(7): 1065-1076.
- [21] Tang J J, Li S Y, Li A X. Research progress and prospects of parasitic diseases in salmon and trout[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 200-210. [唐嘉嘉, 李诗钰, 李安兴. 鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 200-210.]
- [22] Kishio H, Kazuo O. New Atlas of Fish Diseases[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 16, 28. [畑井喜司雄, 小川和夫. 新鱼病图谱[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 16, 28.]
- [23] Holt R A. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold water disease in salmonid fish[D]. Corvallis: Oregon State University, 1987: 117.
- [24] Garcia C, Pozet F, Michel C. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 42(3): 191-197.
- [25] Fredriksen B N, Furevik A, Gauthier D, et al. Intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with two Norwegian field strains of *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 595-598.
- [26] Loch T P, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review[J]. Journal of Advanced Research, 2015, 6(3): 283-300.
- [27] Starliper C E, Schill W B. Flavobacterial diseases: columnaris disease, coldwater disease and bacterial gill disease[M]//Fish Diseases and Disorders. Wallingford: CABI, 2011: 606-631.
- [28] Zhang Y L, Zhao L J, Zhou W D, et al. Characterization and pathogenicity of a strain of *Flavobacterium columnare* isolated from *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(2): 83-89. [张玉蕾, 赵丽娟, 周伟东, 等. 黄颡鱼源柱状黄杆菌的分离鉴定及其对翘嘴鲃的致病性[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 83-89.]
- [29] Liu L H, Fu X Z, Lin Q, et al. Isolation, identification of a *Flavobacterium johnsoniae* from the bacterial gill rot disease of grass carp and histopathological observation[J]. Pearl River Fisheries Science, 2018(2): 76-82. [刘礼辉, 付小哲, 林强, 等. 草鱼烂鳃病病原约氏黄杆菌的分离与鉴定及组织病理观察[J]. 珠江水产科学, 2018(2): 76-82.]
- [30] Chen C, Geng Y, Wang K Y, et al. Dynamic distribution of *Vibrio mimicus* in infected yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and its hispathological changes[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(1): 10-18. [陈成, 耿毅, 汪开毓, 等. 拟态弧菌感染黄颡鱼的动态病理损伤及病原分布研究[J]. 南方水产科学, 2017, 13(1): 10-18.]
- [31] Liu D, Geng Y, Wang K Y, et al. Dynamic pathological lesions and tissue distribution of Chinese giant salamanders infected with CGSRV[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 146-155. [刘丹, 耿毅, 汪开毓, 等. 大鲵蛙病毒感染大鲵的动态病理损伤及病原的组织分布[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 146-155.]
- [32] Ekman E. Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003: 47.
- [33] Henriksen M M M. *Flavobacterium psychrophilum*-Experimental challenge and immune response[D]. Copenhagen: Technical University of Denmark, 2013: 16.

Tissue tropism and dynamic distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intramuscular injection

CHAI Jingru^{1,2,3}, WANG Di^{1,2}, CHEN Fuguang^{1,2}, CAO Yongsheng^{1,2}, LU Tongyan^{1,2}, LI Shaowu^{1,2}

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

2. Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Immune Technology of Heilongjiang Province, Harbin 150070, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Flavobacterium psychrophilum* is the pathogen of bacterial cold water disease (BCWD). Its prevalence and occurrence seriously restrict the healthy development of the salmon and trout industry. This study explored the tissue and dynamic distribution of *F. psychrophilum* in fish after intramuscular injection of infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to provide theoretical support for the prevention and control of BCWD. Experimental rainbow trout was infected intramuscularly with 1.0×10^8 CFU/mL concentration of *F. psychrophilum* CH06 strain. The clinical symptoms of rainbow trout were observed at 12 h, 24 h and 96 h after infection, and real-time PCR was performed using the Taqman probe method to detect the dynamic distribution of pathogens in different tissues of fish. The clinical symptoms of the CH06 strain infection fish are blackening of body surface, slow or immobile swimming, loss of appetite, muscle ulceration at the injection site of the tail handle, pale gills, splenomegaly, and ascites. Histopathological observations showed that the muscle fibers were broken and dissolved in experimental fish. The splenic sinuses were dilated and filled with erythrocytes. There was an increase in haemosiderin in the kidney, with massive vacuolar degeneration, necrosis of the renal tubular epithelium and infiltration of many inflammatory cells in the renal interstitium. qPCR results showed that after 12 h of intramuscular injection, *F. psychrophilum* could be detected in the spleen, liver, kidney, intestine, gills, muscle at the injection site, brain and caudal fin. The highest load of muscle pathogen at the injection site was $(5.85 \pm 2.11) \times 10^5$ copy/ μ L. After 24 h of infection, the pathogen load in the spleen and brain increased most compared to 12 h of infection. The load of pathogens in liver, kidney, intestine, gills, muscle at the injection site and caudal fin was consistent with the level at 12 h of infection. The load of muscle pathogen at the injection site was $(6.48 \pm 2.07) \times 10^5$ copy/ μ L, significantly higher than spleen, liver, kidney, intestine, gills, brain and caudal fin ($P < 0.05$). After 96 h of infection, the pathogen load in the spleen was significantly higher than liver, kidney, intestine, gills, muscle at the injection site, brain and caudal fin ($P < 0.05$), reaching $(1.15 \pm 0.58) \times 10^7$ copy/ μ L; the pathogen load in the liver, kidney, and spleen increased most than at 24 h of infection. The pathogenic bacterial load in all tested tissues showed an upward trend with time. In addition, the average pathogen load of the muscle at the injection site was highest at the three time points, followed by the spleen, kidneys, and gills. After artificially infecting rainbow trout with *F. psychrophilum*, the muscle at the injection site and spleen are important proliferation sites for bacteria. In summary, the pathogen entered various tissues along with blood circulation, and exhibited strong tropism to the muscle at the injection site, spleen, kidney and gills tissue, but exhibited weak tropism to liver, caudal fin, intestine and brain tissue. The infection time and pathological changes were positively correlated with the pathogen load in tissues.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*; *Oncorhynchus mykiss*; pathogenicity; tissue tropism; dynamic distribution

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