

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16116

子二代中华鲟分枝杆菌感染及血液生理生化指标的变化

张书环¹, 聂品², 舒少武², 杜浩¹, Foo Khong Lee³, 杨月梅³, 邵纯³, 邸军¹,
黄君¹, 曾令兵¹, 危起伟¹

1. 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
2. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;
3. 香港海洋公园, 香港 999077

摘要: 鱼类分枝杆菌病是由分枝杆菌属的非结核分枝杆菌造成的长期性感染疾病。本研究发现, 养殖中华鲟(*Acipenser sinensis*)子二代可感染该病, 典型病理特征是腹水、腹膜肉芽肿、肾脏水肿、肝脏呈灰白色等。采集腹水, 通过细菌分离培养获得一株缓慢生长型的抗酸杆菌, 进一步通过 16S rDNA 和 IS2404 重复序列进行分子生物学鉴定, 发现该菌与 *Mycobacterium liflandii* 相似性最高。将 10 尾健康子二代中华鲟 3 次体检的血液参数与 4 尾分枝杆菌感染子二代中华鲟 12 次检查的血液参数进行比较, 发现在 26 项生理生化指标中, 有 9 项指标差异显著($P < 0.05$), 即中性粒细胞、淋巴细胞、钠、氯、钙、总蛋白、球蛋白、外周血白细胞总数(TWBC)和谷丙转氨酶(ALT), 其中 TWBC、中性粒细胞和 ALT 这 3 项指标显著升高, 其他指标显著下降, 说明分枝杆菌感染对鱼体肝脏和肾脏的损伤较大。采用盐酸卡纳霉素、红霉素和利福平三种抗生素联合用药进行治疗, 给药时间 75 d, 治疗后腹水明显减少, RBC、血红蛋白、PCV、MCV 和球蛋白这 5 项血液理化指标均有显著性升高($P < 0.05$), 说明药物治疗初期具有一定的效果, 但随着病程的加剧, 该尾鱼最终未能治愈。以上结果表明, 分枝杆菌在中华鲟广泛流行, 对中华鲟的危害较大, 目前尚未见有效的疫苗和药物, 因此对该病的预防、早期诊断和治疗极其重要。

关键词: 中华鲟; 人工养殖; 分枝杆菌; 血液生理生化指标; 药物治疗

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0136-10

分枝杆菌病是鱼类常见的细菌性疾病, 现有研究表明已有 160 多种鱼类感染过该病^[1-2]。鱼类的分枝杆菌病是由分枝杆菌属(*Mycobacterium*)的非结核分枝杆菌(Nontuberculosis *Mycobacteria*, NTM)造成的长期性感染疾病, 同时也是人的一种机会致病菌, 对人类尤其是渔民的健康构成威胁^[3]。在鱼类分枝杆菌中, 海分枝杆菌(*M. marinum*)、龟分枝杆菌(*M. chelonae*)和偶发分枝杆菌(*M. fortuitum*)是最常见的病原菌^[4-5]。近年来, 随着世界鲟鱼养殖业的发展, 也有一些鲟分枝杆菌病暴发和流行的报道。如 Pate 等^[6]在斯洛文尼亚

对观赏鱼病原菌调查时发现, 小体鲟(*Acipenser ruthenus*)可以感染偶发分枝杆菌。Stragier 等^[7]在比利时的杂交鲟(*Acipenser baerii*×*A. guldenstaedtii*)中分离到海分枝杆菌。从法国出口到意大利的西伯利亚鲟内脏的肉芽肿中, 以及伊朗用于做鱼子酱的鲟鱼鳃部伤口中均分离到海洋分枝杆菌^[8-9]。Antuofermo 等^[10]在养殖的俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedtii*)肿瘤样(tumor-like)皮肤中首次分离到龟分枝杆菌。2009—2010 年, 我国人工养殖的中华鲟(*A. sinensis*)、史氏鲟(*A. schrencki*)和杂交鲟(*A. baeri*×*A. gueldenstaedtii*)暴发了细菌性疾病。张德

收稿日期: 2016-04-06; 修订日期: 2016-07-05.

基金项目: 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2015JBFM27); 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(2016FB16); 国家 973 计划项目(2015CB-150700).

作者简介: 张书环(1981–), 女, 博士, 研究方向为鱼类病害及分子遗传学. E-mail: zhangshuhuan@yfi.ac.cn

通信作者: 危起伟, 研究员, 研究方向为鱼类生态与资源保护. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

锋等^[11]从 19 尾患病鲟中分离到 49 株 7 种分枝杆菌, 发现复合感染较为常见。2014 年 15 尾子二代中华鲟由太湖基地运至香港海洋公园进行保育, 子二代中华鲟进港对物种保护以及促进合作与交流都具有重要意义, 然而截至目前已经有 5 尾死亡, 其中有 4 尾由分枝杆菌感染所致。

血液病理分析是鱼类疾病诊断的重要手段, 血液中理化指标的变化可反映机体的生理变化情况。近年来, 养殖水温、重金属、饥饿、光照、盐度、产后康复等对中华鲟血液生理生化指标的影响报道较多^[12-18]。然而, 对于中华鲟感染细菌病后血液生理生化指标变化的报道较少^[19]。本研究通过对子二代中华鲟感染分枝杆菌前后以及在治疗过程中血液生理生化指标变化进行初步研究, 并与健康子二代中华鲟进行对比分析, 以期中华鲟人工养殖疾病防治, 以及中华鲟物种资源的保护提供更多的参考资料。

1 材料与方法

1.1 子二代中华鲟饲养

15 尾 3 龄子二代中华鲟饲养于香港海洋公园中华鲟馆, 全长范围 100~108 cm, 体重 7.65~15.35 kg。养殖池水体为 10 m (宽)×11 m (长)×3.8 m (高), 总水量为 420 t, 水温常年维持在 20~21℃, 水交换量 220 m³/h, 溶氧 7.0~8.4 mg/L, 饲养时间为 2014 年 2 月 1 日至 2015 年 7 月 4 日。

1.2 子二代中华鲟分枝杆菌感染

2014 年 4 月至 2015 年 4 月, 共计发现有 4 尾子二代中华鲟感染分枝杆菌, 编号分别为: 004#、068#、515#和 894#, 其中 068#、515#和 894#号鱼发病后, 在无法治愈的情况下对其施行安乐死。子二代中华鲟 004#鱼于 2015 年 4 月 18 日出现严重腹水, 抽取腹水采用抗酸染色并进行显微镜镜检。解剖后采集病死鱼各个组织、器官和体液等的样本, 进行 PCR 扩增, 扩增片段为 16S rDNA 序列(上下游引物序列分别为 5'-TGCACACAGG-CCACAAGGGA-3'和 5'-GAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')和 IS2404 序列(上下游引物序列分别为 5'-GGCAGGCTGCAGATGGCAT-3'和 5'-GGCAGTTACTTCACTGCACA-3')。此外, 将 50 μL

腹水涂布于 Löwenstein-Jensen medium 和 Middelbrook 7H10 agar (购自 BD 公司)固体培养基中, 25℃培养 1 个月。

1.3 感染鱼药物治疗

对 004#鱼在抗结核药物利福平的基础上给予盐酸卡那霉素和红霉素进行治疗。分枝杆菌感染后该鱼不主动进食, 因此将利福平(6 mg/次)和红霉素(250 mg/次)混于食物中进行灌胃给药。盐酸卡那霉素采用腹腔注射, 50 mg/次, 3 种抗生素均两天给药 1 次。治疗时间为 2015 年 4 月 19 日至 7 月 3 日, 共计约 75 d。最终该尾鱼未能治愈, 于 2015 年 7 月 4 日对其施行安乐死。

1.4 血液采集及生理生化指标测量

分别于 2014 年 5 月 16 日、2014 年 10 月 7 日和 2015 年 7 月 2 日对 10 尾健康子二代中华鲟进行体检, 并抽取血液进行生理生化指标测量。同时对分枝杆菌感染子二代中华鲟 068#、515#和 894#进行血液采集, 采集时间为 2014 年 5 月 16 日和 22 日; 004#由于发病时间晚, 病程持续时间长, 因此血液采集次数较多, 采血时间分别为 2014 年 5 月 16 日、2014 年 9 月 23 日、2014 年 10 月 9 日、2015 年 4 月 11 日、2015 年 4 月 19 日、2015 年 6 月 21 日。

实验中测定的 26 项生理生化指标包括: 红细胞(red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin)、红细胞压缩体积(packed-cell volume, PCV)、红细胞平均容量(mean corpuscular volume, MCV)、红细胞平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、外周血白细胞总数(peripheral white blood cells, TWBC)、中性粒细胞(neutrophil)、淋巴细胞(lymphocyte)、单核细胞(monocyte)、嗜酸性粒细胞(eosinophil)、钠(sodium)、钾(potassium)、氯(chloride)、钙(calcium)、磷(phosphorus)、总蛋白(total protein)、白蛋白(albumin)、球蛋白(globulin)、白/球比(albumin/globulin, A/G ratio)、葡萄糖(glucose)尿素(urea)、肌酸酐(creatinine)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、尿酸(uric acid)。血清生化指标测定: 用 10 mL

无菌注射器尾静脉取血, 置 2 mL 离心管中, 4℃ 下放置 3 h, 待血清析出后, 经 5000 r/min 离心 15 min, 收集血清。所有生化指标均在 HITACHI 7600-110 生化自动分析仪上完成。数据统计分析采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件完成。用 t 检验对健康鱼和感染鱼的各项指标进行差异显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P \leq 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 子二代中华鲟感染症状、细菌分离和鉴定

患病初期, 鱼体未见明显的症状, 患病后期, 停止进食、游动缓慢, 腹水、鳃盖或体表等部位溃烂穿孔。经镜检检查, 患病个体鳃、体表、鳍均未见寄生虫, 鳃外观淡红色。解剖检查发现, 病鱼腹腔充满乳白色腹水, 腹膜存在肉芽肿, 肾脏水肿, 肝脏呈灰白色, 心包积液, 有些个体出现胸腔积液和胸腔肉芽肿等(图 1)。对体表肌肉病灶组织进行病理切片及抗酸染色发现, 在肌纤维中

可见大量染成红色的抗酸杆菌(图 2)。抽取病鱼腹水细菌分离培养发现, 在罗氏培养基和 7H10 琼脂培养基上, 25℃ 培养 4 周后分别长出肉眼可见菌落, 属于缓慢生长型分枝杆菌(SGM)。该病原菌表现出分枝杆菌属的细菌生理生化特征: 需氧、不运动、生长缓慢、有黏性、Ziehl-Neelsen 染色阳性、在有光的条件下产生色素等(图 3)。16S rDNA 和 IS2404 测序结果显示, 该细菌属于非结核分枝杆菌, 并与 *Mycobacterium liflandii* 遗传距离最近。

2.2 健康鱼与分枝杆菌感染鱼血液生理生化指标的比较

与健康子二代中华鲟相比较, 分枝杆菌感染中华鲟在 26 项血液理化指标中有 7 项指标差异极显著($P \leq 0.01$), 包括中性粒细胞、淋巴细胞、钠、氯、钙、总蛋白、球蛋白; 2 项指标差异显著($P < 0.05$), 即 TWBC 和 ALT (表 1)。其中分枝杆菌感染后显著升高的指标是 TWBC、中性粒细胞和

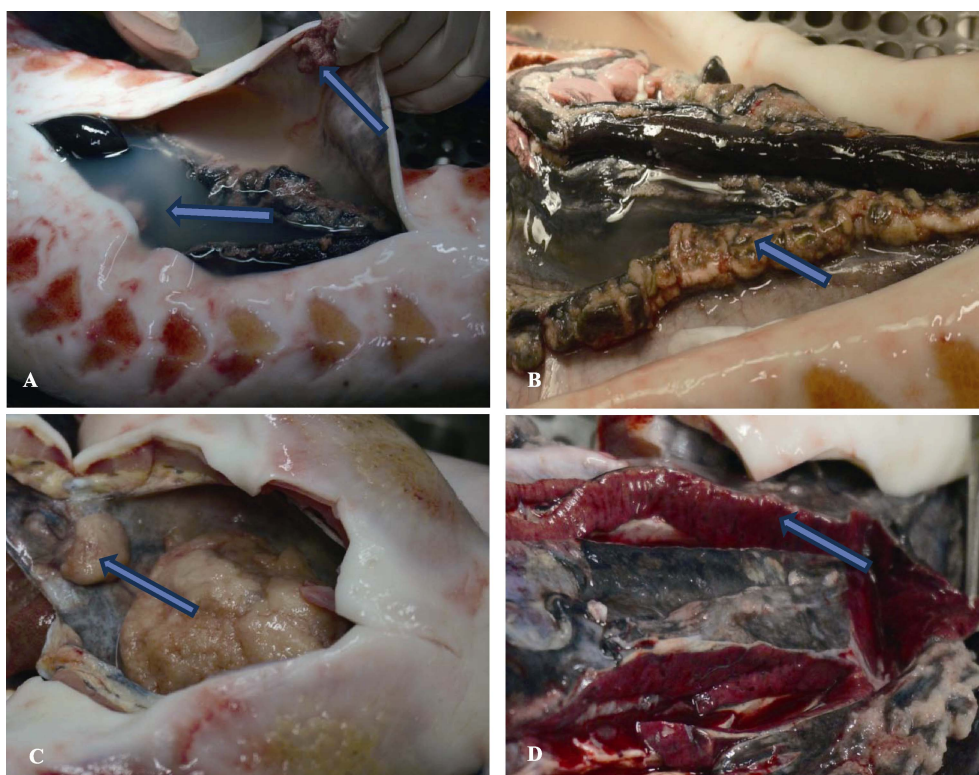


图 1 分枝杆菌感染子二代中华鲟

A. 腹水和腹膜肉芽肿; B. 性腺糜烂; C. 胸腔囊肿; D. 中肾水肿。

Fig. 1 F₂ generation *Acipenser sinensis* infected by *Mycobacterium*

A. Ascites and granuloma in peritoneum; B. Erosion in gonad; C. Cyst in chest; D. Edema in kidney.

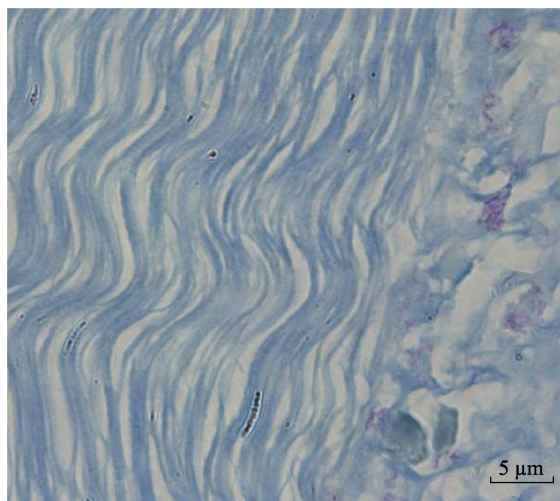


图 2 患病中华鲟肌肉组织的抗酸染色病理切片(40×)

Fig. 2 Ziehl-Neelsen staining of muscle ulceration in *Acipenser sinensis* (40×)

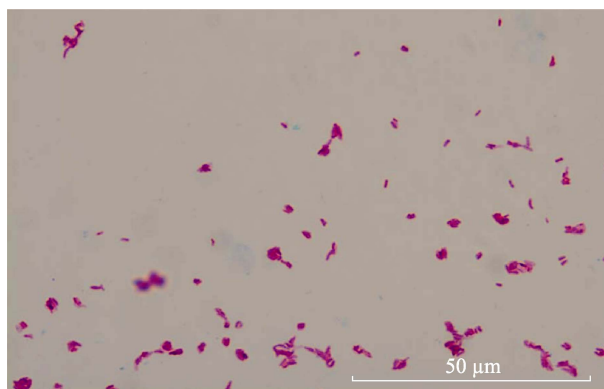


图 3 患病中华鲟腹水中分离到的分枝杆菌

Fig. 3 Mycobacteria of ascetic fluid in infectious *Acipenser sinensis*

ALT, 平均值分别升高 1.7 倍、2.5 倍和 2.5 倍; 分枝杆菌感染后显著降低的指标有淋巴细胞、钠、氯、钙、总蛋白和球蛋白, 平均值分别降低至原来的 70%、80%、80%、90%、70%和 70%。在差异显著的 9 项指标中, TWBC、淋巴细胞、中性粒细胞、总蛋白、球蛋白和 ALT 存在较大的个体差异, 无论在健康子二代中华鲟还是分枝杆菌感染中华鲟中均存在较大的波动, 而钠、氯、钙 3 项电解质指标波动幅度较小。其余 17 项指标虽有一定的波动, 但是差异不显著($P>0.05$)。

2.3 治疗过程中血液生理生化指标变化

采用三种抗生素联合用药治疗过程中, 治疗的早期阶段, 腹水明显减少。通过对 004#鱼感染

前 3 次血液参数和感染后 3 次血液参数比较分析结果显示, 在 26 项生理生化指标中有 5 项指标差异显著($P<0.05$), 包括 RBC、血红蛋白、PCV、MCV 和球蛋白(表 2)。在差异显著的各项指标中, RBC 数量在感染分枝杆菌后显著下降, 抗生素治疗后, 该指标呈回升趋势, 并达到与未感染时基本一致; PCV 和血红蛋白在分枝杆菌感染后突然下降, 并始终维持较低水平(图 4); MCV 和球蛋白在细菌感染初期在血液中的含量降低, 药物治疗的初期 3 个指标均不同程度回升, 但随着病程加剧均呈下降趋势并保持在较低水平(图 4)。在其他血液指标中, 单核细胞在细菌感染后期持续升高, 达到检测的最高值 10% (表 2, 图 4); 淋巴细胞在疾病感染初期显著降低, 药物治疗后有所回升, 但随着疾病进程加剧急剧下降, 达到检测的最低值 31%(表 2)。

3 讨论

中华鲟是一种大型溯河产卵的江海洄游性鱼类, 为我国国家一级重点保护野生动物, IUCN 极危级(CR)物种^[20-21]。自 2013 年以来, 已经连续 3 年未监测到中华鲟的自然繁殖。尽管 2013 年和 2015 年在长江口监测到降河的中华鲟幼鱼^[22], 但不可否认该物种的野外种群量已经达到了极其濒危的程度。人工保种已经成为延续该物种的重要途径。然而近年来发现人工养殖的中华鲟病害频发, 为物种的保护蒙上一层阴影。

鱼类分枝杆菌病是由非结核分枝杆菌引起的一种慢性疾病。疾病早期诊断在预防过程中具有极为重要的作用。然而, 感染初期鱼体免疫力下降, 但不呈现显著的病理特征。随着病程的发展, 到了疾病的中期或者后期, 病理特征开始表现出来。本研究发现, 分枝杆菌感染的子二代中华鲟最显著的外观特征是腹水, 这与先前张德锋等^[11]的报道较为一致。解剖后发现, 腹膜存在肉芽肿, 肾脏水肿, 肝脏呈灰白色, 心包积液, 有些个体存在胸腔积液和胸腔肉芽肿等。组织切片观察发现, 患病中华鲟的病灶肌肉中含有大量 Ziehl-Neelsen 染色为阳性的杆状细菌, 这些符合鱼类分枝杆菌病的相关特征^[3]。

表 1 中华鲟子二代健康鱼和分支杆菌感染鱼血液生理生化指标比较
Tab. 1 Comparison of blood physiological and biochemical indices of healthy and *Mycobacterium* infected F₂ *Acipenser sinensis*

指标 blood index	健康鱼(3 龄, n=10) healthy fish				分支杆菌感染鱼(3 龄, n=3) <i>Mycobacterium</i> infected fish				$\bar{x} \pm SD$	P
	2014-05-16	2014-10-07	2015-07-03	894	068	004				
红细胞($10^{12} \cdot L^{-1}$) RBC	0.37±0.06	0.47±0.12	0.39±0.09	0.23±0.05	0.36±0.14	0.45±0.05			0.15	
血红蛋白($g \cdot L^{-1}$) hemoglobin	48.60±2.41	41.21±3.10	21.30±3.52	22.83±2.44	38.68±2.43	40.91±4.3			0.18	
红细胞压积/% PCV	25.07±3.12	21.30±5.43	14.38±3.35	13.00±1.80	20.00±0.00	23.33±5.69			0.11	
红细胞平均容量/ μm^3 MCV	682.50±83.80	458.47±62.65	373.50±57.30	578.00±56.04	602.00±236.17	518.40±86.79			0.37	
红细胞平均血红蛋白浓度/ $(g \cdot L^{-1})$ MCHC	134.63±28.25	88.51±16.99	54.73±21.95	100.33±15.18	119.85±64.98	90.23±17.84			0.10	
外周血白细胞总数/ $(cell \cdot \mu L^{-1})$ TWBC	15987.50±3834.89	31053.00±5193.42	36808.75±4542.39	82906.67±41294.67	42930.00±7269.06	29223.3±3924.06			0.02*	
中性粒细胞/% neutrophils	13.83±7.63	20.00±15.58	15.75±9.74	90.33±6.03	35.50±3.54	15.00±1.00			0.00**	
淋巴细胞/% lymphocytes	66.50±24.79	70.60±15.29	76.50±7.85	6.33±4.51	59.00±0.00	80.00±3.00			0.01**	
单核细胞/% monocytes	4.83±5.98	3.20±1.60	2.50±2.52	3.00±1.00	5.50±3.54	2.33±0.58			0.22	
嗜酸性粒细胞/% eosinophils	9.83±7.33	6.20±4.58	5.25±2.63	0.33±0.58	0.00±0.00	2.67±2.08			0.28	
钠/ $(mmol \cdot L^{-1})$ sodium	135.33±3.08	141.60±1.02	150.00±3.16	127.33±2.89	133.50±3.54	135.67±7.51			0.01**	
钾/ $(mmol \cdot L^{-1})$ potassium	3.25±0.36	3.27±0.12	3.17±0.20	3.09±0.43	4.79±1.88	3.17±0.61			0.10	
氯/ $(mmol \cdot L^{-1})$ chloride	115.17±5.34	119.60±1.62	125.50±2.89	112.67±2.08	113.50±6.36	116.00±7.00			0.01**	
钙/ $(mmol \cdot L^{-1})$ calcium	1.81±0.15	1.86±0.03	1.99±0.08	1.61±0.09	1.91±0.03	1.78±0.06			0.00**	
磷/ $(mmol \cdot L^{-1})$ phosphorus	2.36±0.19	2.71±0.15	2.99±0.32	2.52±0.24	2.51±0.16	2.42±0.15			0.19	
总蛋白/ $(g \cdot L^{-1})$ total protein	19.98±4.55	29.08±2.00	24.20±1.09	6.53±2.84	26.60±0.42	23.30±6.32			0.01**	
白蛋白/ $(g \cdot L^{-1})$ albumin	6.60±1.84	12.95±1.11	8.37±0.69	1.57±0.90	10.10±0.99	9.67±3.88			0.19	
球蛋白/ $(g \cdot L^{-1})$ globulin	13.38±3.07	16.13±1.52	15.83±0.95	4.97±1.94	16.50±0.57	13.63±2.48			0.00**	
白球比 A/G ratio	0.50±0.11	0.81±0.11	0.53±0.06	0.30±0.08	0.61±0.08	0.69±0.18			0.06	
葡萄糖/ $(mmol \cdot L^{-1})$ glucose	1.52±0.93	2.58±0.07	1.88±0.57	0.35±0.35	1.40±0	1.57±0.61			0.27	
尿素/ $(mmol \cdot L^{-1})$ urea	0.57±0.15	0.66±0.17	1.38±0.36	0.83±0.12	0.50±0.14	0.83±0.12			0.13	
肌酐/ $(\mu mol \cdot L^{-1})$ creatinine	16.55±13.51	1.83±1.13	3.73±3.51	6.43±8.38	0.10±0	3.50±0			0.21	
谷草转氨酶/ $(U \cdot L^{-1})$ AST	245.83±105.72	210.80±41.00	113.75±25.51	142.00±44.24	550.00±104.65	183.33±28.22			0.38	
谷丙转氨酶/ $(U \cdot L^{-1})$ ALT	56.67±26.64	56.20±7.52	21.25±3.50	79.00±29.72	163.50±28.99	42.67±10.69			0.03*	
肌酸激酶/ $(\mu mol \cdot L^{-1})$ CK	4957.67±4503.16	4685.40±4050.18	2406.75±860.27	528.33±705.64	3851.00±1057.83	3474.67±2952.22			0.08	
尿酸/ $(g \cdot dL^{-1})$ uric acid	7.18±5.26	13.96±2.96	17.50±3.19	2.95±1.91	2.15±2.76	8.27±4.10			0.07	

注: P 表示子二代中华鲟健康鱼和分支杆菌感染鱼在该项血液指标中 t 检验差异显著度. *表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P \leq 0.01$).
Note: P value stands for t-test significance of blood physiological and biochemical indices in healthy and *Mycobacterium* infected F₂ Chinese sturgeon. * denotes significant difference ($P < 0.05$); ** denotes very significant difference ($P \leq 0.01$).

表 2 004#病鱼治疗前后血液生理生化指标变化

Tab. 2 Change of blood physiological and biochemical indices of infected *Acipenser sinensis* 004# before and after treatment

指标 blood index	发病前 premorbid			治疗期 treatment period				P
	140516	140923	141009	150419	150511	150603	150621	
红细胞 RBC ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	0.38	0.46	0.49	0.39	0.26	0.31	0.42	0.02*
血红蛋白/($g \cdot L^{-1}$) hemoglobin	48.6	46.9	48.5	27.2	29.9	28.6	27.7	0.00**
红细胞压缩体积/% PCV	25	28	25	17	15	16	14.5	0.00**
红细胞平均容量/ μm^3 MCV	658	609	510	436	577	516	345	0.03*
红细胞平均血红蛋白浓度/ $g \cdot L^{-1}$ MCHC	127.9	102.0	99.0	69.7	115.0	92.3	66	0.06
外周血白细胞总数/ $cell \cdot \mu L^{-1}$ TWBC	21065	24695	31350	31625	23540	24530	15895	0.26
中性粒细胞/% neutrophil	12	14	16	15	48	9	57	0.12
淋巴细胞/% lymphocyte	81	83	77	80	51	79	31	0.08
单核细胞/% monocyte	2	2	2	3	1	5	10	0.16
嗜酸性粒细胞/% eosinophil	5	1	5	2	0	7	2	0.43
钠/($mmol \cdot L^{-1}$) sodium	125	127	140	140	130	122	120	0.23
钾/($mmol \cdot L^{-1}$) potassium	3.60	2.50	3.31	3.7	2.55	3.13	2.84	0.30
氯/($mmol \cdot L^{-1}$) chloride	102	108	121	119	110	98	104	0.24
钙/($mmol \cdot L^{-1}$) calcium	1.81	1.72	1.83	1.8	1.7	1.71	1.67	0.08
磷/($mmol \cdot L^{-1}$) phosphorus	2.41	2.54	2.47	2.25	2.16	2.54	2.03	0.11
总蛋白/($g \cdot L^{-1}$) total protein	20	27	26.9	16	18.4	20.1	10.8	0.10
白蛋白/($g \cdot L^{-1}$) albumin	5.5	11.6	12.2	5.2	8.3	9.0	3.4	0.24
球蛋白/($g \cdot L^{-1}$) globulin	14.5	15.4	14.7	10.8	10.1	11.1	7.4	0.02*
白球比 A/G ratio	0.38	0.75	0.83	0.48	0.82	0.81	0.46	0.43
葡萄糖/($mmol \cdot L^{-1}$) glucose	ND	1.7	2.1	0.9	2.5	2.9	1.9	0.30
尿素/($mmol \cdot L^{-1}$) urea	1.1	0.7	0.9	0.9	0.9	2.0	0.8	0.28
肌酸酐/($\mu mol \cdot L^{-1}$) creatinine	ND	ND	3.5	ND	5.6	4.6	9.0	—
谷草转氨酶/($U \cdot L^{-1}$) AST	220	203	196	151	346	174	120	0.46
谷丙转氨酶/($U \cdot L^{-1}$) ALT	25	52	45	31	100	44	45	0.24
肌酸激酶/($\mu mol \cdot L^{-1}$) CK	1005	6816	2389	1219	6256	459	678	0.40
尿酸/($g \cdot dL^{-1}$) uric acid	9.9	4.2	12.4	8.2	19.3	17.4	11.7	0.11

注: P 表示 004#分枝杆菌治疗前后血液指标 t 检验结果. *表示 t 检验差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P\leq 0.01$).

Note: P value stands for t-test significance between before and after treatment in 004#. * denotes significant difference ($P<0.05$); ** denotes very significant difference ($P\leq 0.01$).

分枝杆菌属细菌大多生长缓慢,以形态和生理生化特征为依据的传统分类鉴定方法,耗时较长,一般 2~3 个月。因此,对该属细菌进行分类鉴定的最为快速、准确的方法是分子生物学方法。本研究首先选用 16S rDNA 进行属的鉴定,并进一步采用 IS2404 重复片段序列进行种的鉴定,该片段最早被认为是溃疡分枝杆菌(*M. ulcerans*)特有的重复序列^[23],但随后发现其在少数其他非结核分枝杆菌中也存在,如 *M. shottsii*^[24]和 *M. liflandii*^[25]。通过 16SrDNA 和 IS2404 重复片段序列比对分析,发现该菌与 *M. liflandii* 相似性最高。*M. liflandii* 最早是 Trott 等^[25]在热带爪蟾(*Xenopus*

tropicalis)中发现的一种新的病原。随后发现其在热带爪蟾的个别品系中广泛流行^[26-27]。本研究是首次在鱼类中发现该种细菌的感染,在本研究基础上将进一步对该种细菌的基因组、细菌生化特性、药物敏感性、灭活疫苗的制备等进行深入研究。

血液中理化指标的变化可反映机体的生理变化情况。本研究发现分枝杆菌感染鱼体后有 9 个血液理化指标差异显著($P<0.05$)。其中 TWBC、中性粒细胞均显著升高,这主要与白细胞的功能相关。白细胞是一类具有吞噬功能的细胞,是机体防御系统的重要防线,细菌感染程度往往与白细胞数量升高成正比。其他的 7 项差异显著的指

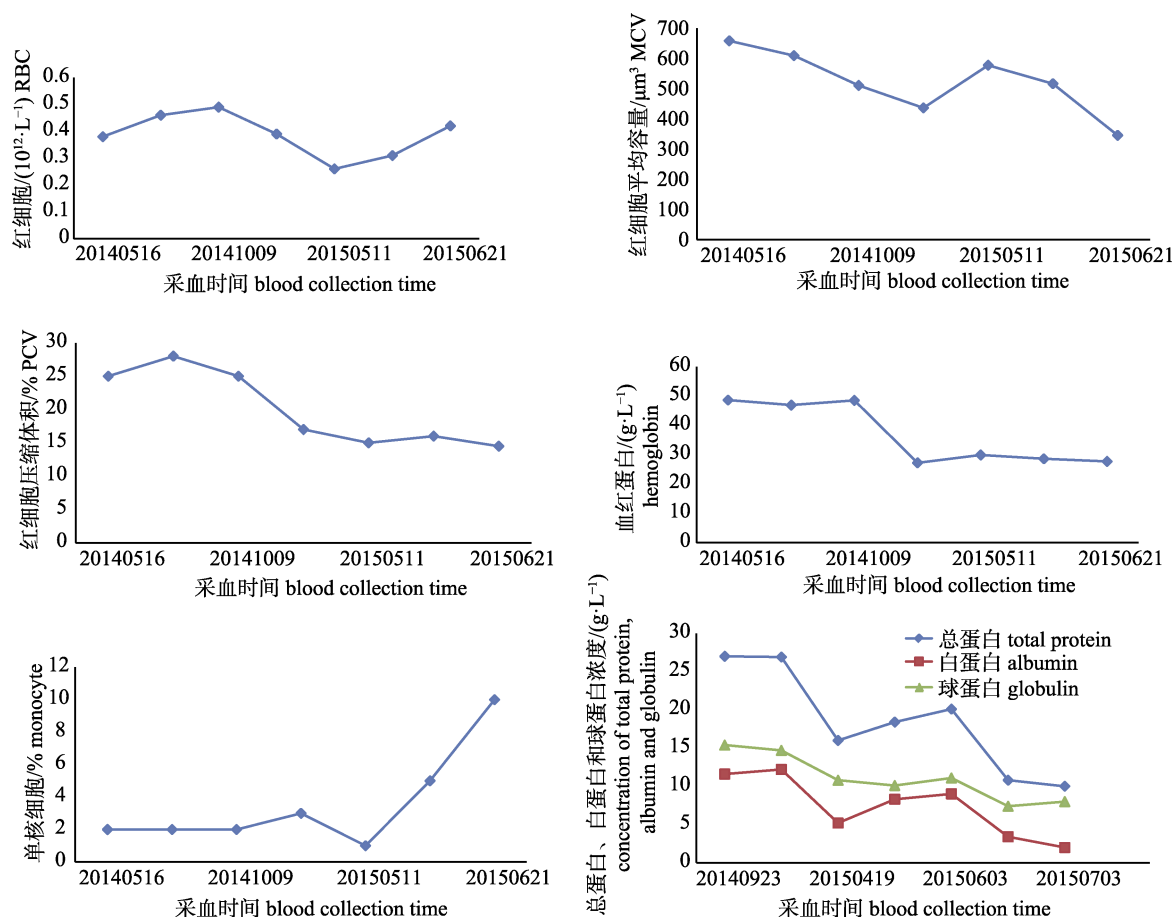


图 4 004#病鱼治疗前后血液生理生化指标变化趋势

Fig. 4 Change of blood physiological and biochemical indices of infected *Acipenser sinensis* 004# before and after treatment

标间接反映了鱼体的肝脏和肾脏功能损伤严重。其中,感染前后 ALT、白蛋白和球蛋白 3 项指标的显著性差异,表明鱼体的肝脏功能受损严重。同时,血清中钠、氯和钙三项指标显著降低,说明分枝杆菌感染后鱼体电解质出现紊乱,酸碱失衡,进一步说明肾脏机能减弱,该结果与病理解剖结果一致,解剖后发现病鱼的肾脏前、中、后段均水肿严重,肾脏厚度是健康鱼的 3~4 倍(图 1)。本研究将为进一步建立健康中华鲟的血液理化指标的范围和标准提供基础资料。

鱼类易感的分枝杆菌主要为非结核分枝杆菌,对一类和二类抗结核药物具有广泛的耐受性,截至目前还没有分枝杆菌感染鱼类后成功治愈的例子。对于养殖的经济鱼类,一经发现分枝杆菌感染后,便将感染鱼捕杀消毒掩埋并彻底清塘消毒^[28]。然而,该种方式并不适合濒危鱼类。由于本病不易早期发现,一旦发现后,疾病进程已经达到中

后期,因此治愈率低。本研究采用 3 种抗生素联合用药的治疗方案,治疗时间为 75 d。治疗的早期阶段,发现腹水明显减少,同时发现治疗后 5 项血液理化指标均有显著性升高($P < 0.05$),即 RBC、血红蛋白、PCV、MCV 和球蛋白,说明药物治疗初期具有一定的效果,但随着病程的加剧,鱼体的多个器官衰竭,最终未能治愈。分析未能治愈的原因主要有三点: (1) 该种分枝杆菌对所选择的 3 种抗生素具有耐药性; (2) 抗生素的剂量非最佳剂量; (3) 错过治疗的最佳时期。本研究对分枝杆菌感染鱼的治疗尚属于摸索阶段,因此今后有必要进一步开展鱼类易感分枝杆菌的药物敏感性、药物剂量以及药物对中华鲟的副作用等的相关研究,以期为患者中华鲟给予有效的治疗。

综上所述,本研究在中华鲟子二代中发现分枝杆菌的感染,感染主要症状为腹水。成功分离到一株分枝杆菌,该菌与 *Mycobacterium liflandii*

相似性最高。通过血液理化指标反映了分枝杆菌感染后对中华鲟肝脏和肾脏的损害严重。通过多种抗生素联合用药治疗分枝杆菌感染中华鲟, 发现治疗的初期具有一定的效果, 但目前还未有治愈的成功例子。早期诊断在预防本病非常重要, 可通过分子生物学方法定性或定量检测鱼体表黏液和血液中分枝杆菌的有无或含量来判断。此外, 还可以通过监测环境中分枝杆菌的含量, 特别是水源地中是否存在分枝杆菌以达到预防本病的目的。疫苗是控制本病最为重要的方法, 因此今后有必要深入开展鱼类分枝杆菌疫苗的相关研究。

参考文献:

- [1] Nigrelli R F, Vogel H. Spontaneous tuberculosis in fishes and other cold-blooded vertebrates with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions[J]. Zoologica, 1963, 48: 131–143.
- [2] Kaattari I, Rhodes M W, Kaattari S L, et al. The evolving story of *Mycobacterium tuberculosis* clade members detected in fish[J]. J Fish Dis, 2006, 29: 509–520.
- [3] Gauthier D T, Rhodes M W. Mycobacteriosis in fishes: A review[J]. Vet J, 2009, 180: 33–47.
- [4] Lescenko P, Matlova L, Dvorska L, et al. Mycobacterial infection in aquarium fish[J]. Vet Med-Czech, 2003, 48 (3): 71–78.
- [5] Jacobs J M, Stine C B, Baya A M, et al. A review of mycobacteriosis in marine fish[J]. J Fish Dis, 2009, 32: 119–130.
- [6] Pate M, Jencic V, Zolnir-Dovc M, et al. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 64(1): 29–35.
- [7] Stragier P, Hermans K, Stinear T, et al. First report of a mycolactone-producing *Mycobacterium* infection in fish agriculture in Belgium[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 286(1): 93–95.
- [8] Manfrin A, Prearo M, Alborali L, et al. Mycobacteriosis in sea bass, rainbow trout, striped bass and Siberian sturgeon in Italy[M]//Program, Abstracts and Report of EAFP Workshop “Zoonotic Infections From Fish and Shellfish”. Prague: Czech Republic, 2009: 5.
- [9] Ghaemi E O, Ghazesaed K, Nasab F F, et al. *Mycobacterium marinum* infection in caviar fishes and fisherman’s in a Caspian Sea province in North of Iran[J]. J Biol Sci, 2006, 6: 1150–1152.
- [10] Antuofermo E, Pais A, Nuvoli S, et al. *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. BMC Vet Res, 2014, 10: 18.
- [11] Zhang D F, Li A H, Gong X N. Research on the mycobacteriosis and its pathogen in sturgeons[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3): 465–504. [张德锋, 李爱华, 龚小宁. 鲟分枝杆菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 465–504.]
- [12] Hou J L, Zhuang P, Feng L, et al. Effects of lead on activity of ALT and AST in serum of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(5): 1669–1673. [侯俊利, 庄平, 冯琳, 等. 铅暴露与排放对中华鲟幼鱼血液中 ALT、AST 活力的影响[J]. 生态环境学报, 2009, 18(5): 1669–1673.]
- [13] Zhang L Z, Wang Y, Zhuang P, et al. The influences of illumination on growth, haematological and biochemical indices of juvenile Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(2): 141–147. [章龙珍, 王好, 庄平, 等. 光照对中华鲟幼鱼生长及血液生化指标的影响[J]. 海洋渔业, 2010, 32(2): 141–147.]
- [14] Feng G P, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Effects of water temperature on biochemical parameters of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) blood[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(10): 1973–1978. [冯广朋, 庄平, 章龙珍, 等. 温度对中华鲟幼鱼血液生化指标的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(10): 1973–1978.]
- [15] Feng G P, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Changes of enzyme activity in blood and liver of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) during starvation[J]. Marine Fisheries, 2011, 33(2): 165–171. [冯广朋, 庄平, 章龙珍, 等. 饥饿期间中华鲟幼鱼血液与肝脏酶活力的变化[J]. 海洋渔业, 2011, 33(2): 165–171.]
- [16] Zhang L Z, Yao Z F, Zhuang P, et al. Effects of dissolved copper in water body on serum biochemical indices of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(11): 2516–2522. [章龙珍, 姚志峰, 庄平, 等. 水体中铜对中华鲟幼鱼血液生化指标的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(11): 2516–2522.]
- [17] Zhao F, Zhang T, Hou J L. Changes in blood moisture, osmolality and ion concentration of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze Estuary[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12): 1795–1800. [赵峰, 张涛, 侯俊利, 等. 长江口中华鲟幼鱼血液水分、渗透压及离子浓度的变化规律[J]. 水产学报, 2013, 37(12): 1795–1800.]
- [18] Zhang X Y, Du H, Wei Q W, et al. The post-spawned recovery of cultured Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(4): 705–713. [张晓雁, 杜

- 浩, 危起伟, 等. 养殖中华鲟的产后康复[J]. 水生生物学报, 2015, 39(4): 705–713.]
- [19] Zheng Y P, Liu J, Chen J H, et al. Study on the blood biochemistry indices of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* suffered from “mad swimming symptom”[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(5): 85–88. [郑跃平, 刘健, 陈锦辉, 等. “狂游症”中华鲟幼鱼血液生化指标初步研究[J]. 淡水渔业. 2013, 43(5): 85–88.]
- [20] Wei Q W, Ke F, Zhang J M, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. Environ Biol Fish, 1997, 48(1–4): 241–255.
- [21] Wang J H, Wei Q W, Zou Y C. Conservation strategies for the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs[J]. J Appl Ichthyol, 2011, 27(2): 176–180.
- [22] Zhang S H, Yang H C, Xin M M, et al. External morphology and molecular identification of wild juvenile *Acipenser sinensis* newly found in the Jiangsu Xupu section of the Yangtze River[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 1–9. [张书环, 杨焕超, 辛苗苗, 等. 长江江苏溱浦段 2015 年发现中华鲟野生幼鱼的形态和分子鉴定[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 1–9.]
- [23] Stinear T, Ross B C, Davies J K, et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1018–1023.
- [24] Martha W R, Howard K, Alan M, et al. *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*)[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 1139–1147.
- [25] Trott K A, Stacy B A, Lifland B D, et al. Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*)[J]. Comp Med, 2004, 54: 309–317.
- [26] Suykerbuyk P, Vleminckx K, Pasmans F, et al. *Mycobacterium liflandii* infection in European colony of *Silurana tropicalis*[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(5): 743–746.
- [27] Fremont-Rahl J J, Ek C, Williamson H R, et al. *Mycobacterium liflandii* outbreak in a research colony of *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs[J]. Vet Pathol, 2011, 48(4): 856–867.
- [28] Hatai K, Ogawa K. New Atlas of Fish Disease[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 146. [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: 146.]

Mycobacteriosis in cultured F₂ generation Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and relevant blood physiological and biochemical indices

ZHANG Shuhuan¹, NIE Pin², SHU Shaowu², DU Hao¹, Foo Khong Lee³, YANG Yuemei³, SHAO Chun³, DI Jun¹, HUANG Jun¹, ZENG Lingbing¹, WEI Qiwei¹

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
3. Ocean Park, Hong Kong 999077, China

Abstract: Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, is an ancient and large anadromous fish in the family Acipenseridae (Acipenseriformes, Actinopterygii) and has been classified as Critically Endangered on the IUCN. Hydroelectric dam construction, including the Gezhouba Dam and the Three Gorges Dam on the upper Yangtze River has resulted in a sharp decline in the wild populations of *A. sinensis*, indicating that cultured stocks may serve as the only source for species conservation. Many rehabilitation efforts, as well as controlled reproduction, have been undertaken to prevent this endangered species from becoming extinct. However, Chinese sturgeons in captivity are exposed to a range of stressors, including variable temperatures and water quality and potential pathogens. Non-tuberculous mycobacteria (NTM) causes cutaneous lesions and spreads to internal organs via the circulatory or lymphatic systems. In this study, a cultured F₂ generation of Chinese sturgeon was infected with NTM, and developed typical symptoms of ascites, peritoneal granulomas, kidney edema, and a grey white liver. An acid-fast *Bacillus* was obtained in the ascites and had the closest similarity with *Mycobacterium liflandii* identified by 16S rDNA and IS2404 sequence analyses. Nine blood indices were significantly different between ten healthy and four NTM-infected F₂ Chinese sturgeon ($P < 0.05$). Total white blood cell count, neutrophils, and alanine aminotransferase levels were significantly elevated but the other indices decreased significantly, including lymphocytes, sodium, chlorine, calcium, total protein, and globulin, suggesting that the liver and kidney were badly damaged by NTM. An infected F₂ Chinese sturgeon with serious ascites was treated for 75 days with a combination of rifampicin, erythromycin, and amikacin. The ascites decreased significantly early in the treatment, and five blood indices increased significantly ($P < 0.05$), including red blood cell count, hemoglobin, packed cell volume, mean corpuscular volume, and globulin, indicating that the antibiotics were effective. However, fish condition deteriorated over time and they were eventually euthanized. These results show that mycobacteriosis is a widespread and extremely harmful zoonosis of Chinese sturgeon. It is essential to promote research on a vaccine, drug susceptibility of isolated strains, medication dosing, and side effects in Chinese sturgeon to reduce endangering the health of the population. Furthermore, early supervision and diagnosis of this disease is required. We detected mycobacteria in the skin mucus of all infected Chinese sturgeon and in apparently normal individuals, indicating that sampling skin mucus is a good indicator of the distribution of the pathogen. Additionally, the isolated strain was found in water where infected Chinese sturgeon were held; therefore, it is important to monitor mycobacteria in water and in the fish population. How and where the Chinese sturgeon became infected with mycobacteria remain unknown. Further monitoring studies are necessary to evaluate the pathogenic potential of this strain in China for susceptible and receptive fish hosts and for mammals. This information will be useful to predict future epidemics and to implement adequate preventive and control measures.

Key words: *Acipenser sinensis*; F₂ generation; mycobacteria; blood physiological and biochemical indices; drug therapy

Corresponding author: WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn