

文章编号: 1674-7054(2016)04-0409-08

鳊鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型的 建立与组织病理学研究

夏立群^{1 2 3}, 汪美¹, 赖杰彬¹, 陈锐敏¹, 徐亮¹, 鲁义善^{1 2 3}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088; 3. 广东省高等学校水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 鱼类诺卡氏菌病近年来在我国南方省份不断蔓延, 对水产行业造成巨大影响。鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*) 是鱼类诺卡氏菌病的主要病原, 危害约 20 种海、淡水养殖鱼类。本研究以斑马鱼为模式动物, 腹腔接种不同稀释度的强毒株鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503, 通过临床症状观察、病理剖检、病原菌分离鉴定、Kaplan-Meier 生存曲线分析、半数致死剂量(LD_{50}) 统计和组织病理学研究, 初步建立了鳊鱼诺卡氏菌-斑马鱼模型。研究发现攻毒后斑马鱼出现明显的发病症状, 鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 对斑马鱼的 LD_{50} 为 3.39×10^6 CFU/尾。斑马鱼感染后, 肾脏、肝脏、脾脏、鳃、皮肤和肌肉等组织出现明显病理学变化。结果表明, 斑马鱼是鳊鱼诺卡氏菌良好的动物感染模型, 该动物模型的建立将有助于诺卡氏菌病致病机理的研究和疫苗的研制。

关键词: 鳊鱼诺卡氏菌; 斑马鱼; 动物模型; 组织病理

中图分类号: S 941

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.04.001

鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*) 属放线菌目、诺卡氏菌科、诺卡氏菌属, 为革兰氏阳性菌^[1], 是鱼类诺卡氏菌病(fish nocardiosis)的主要致病菌之一。鱼类诺卡氏菌病是一种水产养殖中常见的、慢性系统性肉芽肿疾病。该病能在鱼体内及体表形成大量结节, 还会引起鱼类体表出血及溃疡, 严重影响鱼的正常生长发育及其商品价值^[2-3]。近年来鱼类诺卡氏菌病在我国和东南亚地区呈上升趋势, 染病的海、淡水养殖鱼种不断增加, 据不完全统计已有约 20 种^[4-5], 其中在我国南方受鳊鱼诺卡氏菌危害最严重的是乌鳢(*Channa maculata*)^[6]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[7]、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[2, 8]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[9]。随着鳊鱼诺卡氏菌危害的不断蔓延, 对其致病机理及与宿主之间的相互作用的研究亟待开展^[5]。目前对鳊鱼诺卡氏菌的研究尚不深入, 对其致病机理也不明确, 缺乏有关鱼类诺卡氏菌病发病机制的详细报道, 因而不能对诺卡氏菌病提出有效的预防和治疗方案。动物感染模型的建立, 可在揭示致病菌-宿主相互作用方面发挥关键作用, 有助于深入研究病原菌的致病机理^[10-12]。目前已经成功建立了不少鱼类致病菌感染斑马鱼的模型, 例如海分支杆菌(*Mycobacterium marinum*)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和链球菌(*Streptococcus spp.*)等感染斑马鱼的模型^[12-14]。相比于其他鱼类, 斑马鱼能便利的获得全基因组信息和遗传学信息, 加上个体小、成本低、饲养简便、易于观察等优点, 使其成为研究鱼类传染病致病机理以及免疫应答等的最适模型, 还可为鱼类病原菌的疫苗研发及预防提供重要线索^[10, 12, 15]。为此笔者进行鳊鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型的建

收稿日期: 2016-10-28

基金项目: 广东省科技发展专项资金项目(2016A050502061); 广东省教育厅特色创新项目(2014KTSCX075); 广东省团委攀登计划项目(pdjh2016b0234); “海之帆-起航计划”大学生科技创新培育专项(hzfqhjhkrx2015b03)

作者简介: 夏立群(1976-), 女, 副教授, 博士, 从事水生动物病原生物学研究。E-mail: xialq@gdou.edu.cn

通信作者: 鲁义善(1974-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 水生动物医学。E-mail: fishdis@163.com

立的研究工作,旨在为诺卡氏菌病致病机理的研究和疫苗的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及斑马鱼 鳊鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*) ZJ0503 菌株,为 2005 年 3 月从患结节病卵形鲳鲷中分离所得,由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存^[2]。健康野生型 AB 品系成年斑马鱼 500 尾,体长(3.5 ± 0.5) cm 以上,体质量(0.3 ± 0.05) g,购于广州市顺发贸易水产有限公司。参照斑马鱼饲养方法,养殖水为充分曝气的自来水,水温(28 ± 1) °C,投喂小型观赏鱼人工配合饲料,每日 3 次,投喂量以 5 min 内吃完为宜。实验鱼在水循环和增氧条件下暂养 7 d,观察斑马鱼无异常死亡(死亡率 < 2%),并抽样检测确认未受鳊鱼诺卡氏菌感染。实验前 24 h 停止喂食。

1.2 菌液的准备 将 -80 °C 保存的鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 划线接种于改良固体培养基(葡萄糖 20 g · L⁻¹,酵母粉 15 g · L⁻¹, K₂HPO₄ 0.75 g · L⁻¹, NaCl 5 g · L⁻¹, 琼脂 20 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.2 g · L⁻¹, pH(6.5 ± 0.2)^[16],于 25 °C 恒温倒置培养 3 d,挑取单菌落接种于改良液体培养基中,25 °C,130 r · min⁻¹ 条件下培养 4 d。菌液经 8 000 r · min⁻¹ 离心 15 min 收集菌体, PBS(NaCl 8 g · L⁻¹, KCl 0.2 g · L⁻¹, Na₂HPO₄ 1.42 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 0.27 g · L⁻¹, pH 7.4) 重悬清洗 1 次后,再次离心收集菌体并加入适量 PBS,用微量组织混匀器打匀制成菌悬液,菌悬液浓度经平板菌落计数测定浓度为 1.26 × 10¹⁰ CFU · mL⁻¹。取 1 mL 菌悬液用 PBS 液依次稀释,稀释度为 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 备用于注射攻毒。

1.3 斑马鱼攻毒实验 实验组共 3 组,50 尾 · 组。用微量注射器将菌浓度分别为 1.26 × 10⁸, 1.26 × 10⁹, 1.26 × 10¹⁰ CFU · mL⁻¹ 菌悬液,腹腔注射 3 组斑马鱼,注射部位为斑马鱼胸鳍基部,注射体积为 10 μL · 尾。对照组(50 尾)接种 10 μL 的 PBS 液。分组饲养于不同的水族箱,观察斑马鱼的发病和死亡情况。

1.4 LD₅₀测定 攻毒后连续观察 21 d,统计死亡数量,进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析。斑马鱼半数致死量(LD₅₀)用 Reed-Muench 方法^[17-18]进行计算,其计算公式如下:

$$\lg LD_{50} = r(50 - b) + n,$$
$$r = (m - n) / (a - b),$$

式中: r 为死亡率每增加 1 个百分点,剂量对数的增加值; a 为大于 50% 的累计死亡率; m 为大于 50% 的累计死亡率所对应的剂量对数; b 为小于 50% 的累计死亡率; n 为小于 50% 的累计死亡率对应的剂量对数。

1.5 细菌的分离与鉴定 实验组随机取数条濒死斑马鱼、对照组随机取数条斑马鱼,无菌解剖斑马鱼,用灭菌接种针搅捣头肾组织数次后,划线接种于罗氏固体培养基中,28 °C 恒温倒置培养,定期观察是否有淡黄色沙粒状菌落生长。取肝脏,用组织基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen)提取 DNA;挑取罗氏固体培养基分离到的细菌,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen)提取 DNA,根据蒋依依等人^[7]的方法进行鳊鱼诺卡氏菌特异性 PCR 检测,PCR 引物为: Noc-f: 5'-CACCTACGAAAATCCCATTGTTG-3', Noc-r: 5'-CATCGGATTGGATTCAAGGACCTTGA-3'。

1.6 解剖检查 实验组随机取数条濒临死亡斑马鱼,MS222 麻醉处死并进行剖检,观察斑马鱼的临床及病理变化。

1.7 组织病理学检查 参照袁广明^[19]、郑伟^[20]的方法,将斑马鱼去除尾部后,将头、躯干部平展地浸泡于 4% 中性多聚甲醛固定溶液中,于摇床上慢速摇动 24 h。固定好的样品脱水、透明、包埋,制备石蜡切片(5 μm),并用苏木素和伊红染色(hematoxylin and eosin, H. E)。显微镜观察肾脏、肝脏、胰脏、鳃、肌肉、表皮等各部位病理变化。

1.8 动物回归试验 用攻毒斑马鱼肾脏组织中分离所得细菌制备菌悬液(3 × 10⁸ CFU · mL⁻¹),以腹腔注射感染健康斑马鱼(50 尾),注射量为 10 μL · 尾,进行动物回归试验。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼临床症状 斑马鱼在接种鳊鱼诺卡氏菌 12 h 后陆续出现病变,主要表现为反应迟钝、鱼缸底部徘徊、打转、身体失去平衡而侧游;食欲下降甚至拒绝摄食,残留饵料变多。取死鱼观察,鱼腹部膨胀(图 1);剖开发病斑马鱼腹腔,发现其中充满了淡黄色液体,病鱼的肝脏、胰脏、肾脏等器官出现白色结节。部分死鱼体表出现溃疡,腹部出血。

2.2 鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 感染斑马鱼 LD₅₀ 鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 对斑马鱼攻毒的实验结果(表 1)表明,接种细菌 12 h 后,各攻毒组斑马鱼陆续出现上述肉眼可辨的症状,死亡数量随着稀释度递减而减少。注射攻毒 1.26×10^8 CFU · 尾 ($n = 50$) 实验组斑马鱼在第 1 天、第 2 天出现大幅度死亡,并在感染后第 3 天死亡率达到 88%,此后不再增加。注射攻毒 1.26×10^7 CFU · 尾 ($n = 50$) 实验组在第 1 天开始出现死亡,第 2 ~ 4 天死亡速率较快,在第 4 天死亡率达到 72%,之后死亡速率变缓,第 9 天后死亡不再增加。注射攻毒 1.26×10^6 CFU · 尾 ($n = 50$) 实验组斑马鱼死亡集中在第 4 ~ 9 天,之后存活率保持在 60%、不再下降(图 2)。Reed-Muench 法计算鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 对斑马鱼的 LD₅₀ 为 3.39×10^6 CFU · 尾。

2.3 细菌学检查与鉴定 将感染斑马鱼肝脏组织提取 DNA,进行鳊鱼诺卡氏菌特异性 PCR 鉴定,结果显示攻毒组斑马鱼肝脏和 *N. seriolae* ZJ0503 阳性对照中都可以检测到 156 bp 的特异性条带,证明斑马鱼被鳊鱼诺卡氏菌感染;而 PBS 对照组斑马鱼的肝脏组织未检测到阳性条带(图 3)。对照组 ($n = 50$) 斑马鱼头肾组织拭子接种罗氏固体培养基后未见细菌生长。各实验组斑马鱼均分离到淡黄色颗粒状菌落,革兰氏染色后,菌体呈短杆状、分枝状,为革兰氏阳性菌,经特异性 PCR 鉴定为鳊鱼诺卡氏菌。将分离到的颗粒状菌落制备菌悬液后注射斑马鱼,发生死亡、病症与 2.1 描述一致,将回归的感染斑马鱼的头肾组织拭子接种罗氏固体培养基后培养,亦可分离得到颗粒状革兰氏阳性菌,经特异性 PCR 鉴定为鳊鱼诺卡氏菌。

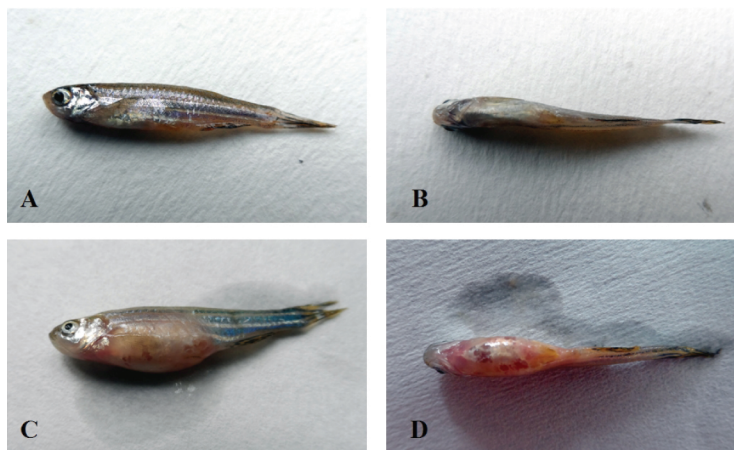


图 1 鳊鱼诺卡氏菌感染引起的斑马鱼外观变化

A, B 为正常斑马鱼的侧面和腹面; C, D 为发病斑马鱼的侧面和腹面

Fig. 1 Appearance changes of zebrafish infected with *N. seriolae* ZJ0503

A, B: the lateral and ventral surface of the normal zebrafish; C, D: the lateral and ventral surface of the infected zebrafish

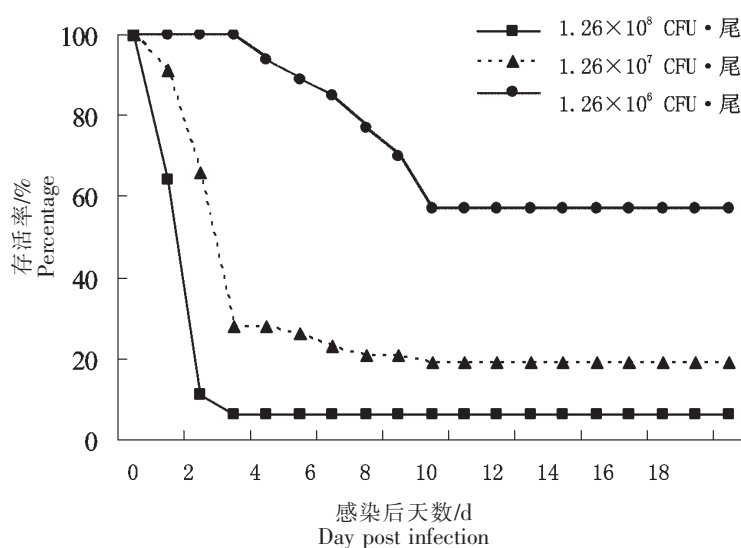


图 2 3 个不同剂量组鳊鱼诺卡氏菌 (ZJ0503) 感染斑马鱼的生存曲线

Fig. 2 Kaplan-Meier survival curve of zebrafish challenged with *N. seriolae* (ZJ0503) at 3 different doses

表 1 鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 对斑马鱼攻毒的实验结果
Tab.1 The condition of the zebrafish after challenged by *N. seriolae* ZJ0503

细菌稀 释度 Dilution	接种剂量/ CFU/尾 Dose (CFU/fish)	剂量 对数 Logarithmic dose	接种数 量/尾 Zebrafish challenged	存活 数/尾 Fish alive	死亡 数/尾 Fish dead	累计存 活数/尾 Total alive	累计死 亡数/尾 Total dead	死亡比例 Rate of death	累计死 亡率(%) Cumulative mortality
10^0	1.26×10^8	10.1	50	6	44	6	102	102/108	94.4
10^{-1}	1.26×10^7	9.1	50	12	38	18	58	58/76	76.3
10^{-2}	1.26×10^6	8.1	50	30	20	48	20	20/68	29.4
PBS 对照 PBS negative control	0	—	50	50	0	—	—	—	—

2.4 组织病理变化 通过组织病理观察,发现鳊鱼诺卡氏菌 ZJ0503 攻毒后,发病斑马鱼的肾脏、肝脏、胰脏、鳃、肌肉和皮肤多种组织器官都发生较严重的病变(图版 I ~ II)。

2.4.1 斑马鱼肾脏的病理变化 如图版 I-B 所示,肾小管上皮细胞坏死,与基底膜完全分离,但是基底膜还保留着肾小管的形状的空腔(图版 I-C)。严重的坏死物碎片(红色的是嗜酸性细胞质碎片)填充肾小管,形成坏死灶。肾脏间质出血,并有大量炎性细胞增生;局部肾间质中还有黑素-巨噬细胞沉着。实质细胞坏死,肾脏细胞离散(图版 I-B)。图版 I-A 为正常肾细胞。

2.4.2 斑马鱼肝脏的病理变化 如图版 I-F 小箭头所指,肝脏中央静脉出现淤血。肝细胞膨胀,出现结节(图版 I-E);如图版 I-F 2 个大箭头所示,肝脏表层出现大面积纤维素样变性、坏死,有结节;由外及内,肝脏组织结构消失,变为一块块周界不清的颗粒状或短棒状的团块状物质,呈强嗜酸性红染。图版 I-D 为正常肝细胞。

2.4.3 斑马鱼胰脏的病理变化 与正常胰腺的图版 I-G 对比,图版 I-H 中,胰腺空泡变性、坏死;如图版 I-I 所示,胰脏表皮细胞坏死、细胞离散,胰脏表面结构消失,变为一堆周界不清晰的颗粒状、小条或团状结构,呈强嗜酸性红染,纤维素样变性坏死,有结节。

2.4.4 斑马鱼鳃的病理变化 如图版 II-K, L 所示,鳃丝短小扭曲,鳃丝软骨排列凌乱;鳃小片排列不齐、弯曲或皱缩,局部鳃小片增生严重。毛细血管扩张、充血;上皮增生,与毛细血管分离,形成空隙(图版 II-L 小箭头);鳃丝基部有炎性细胞增生。图版 II-J 为正常鳃。

2.4.5 斑马鱼皮肤的病理变化 如图版 II-N 所示,部分病鱼皮肤出现糜烂溃疡等症状;显微镜下观察表皮细胞可见到细胞变性、坏死、脱落;局部有炎性细胞浸润(图版 I-O)。图版 II-M 为正常皮肤。

2.4.6 斑马鱼肌肉的病理变化 如图版 II-Q, R 图中大箭头所示,肌肉纤维之间有疑似细菌团形成,空泡变性(小箭头),肿胀、断裂、溶解、坏死。图版 II-P 为正常肌肉。

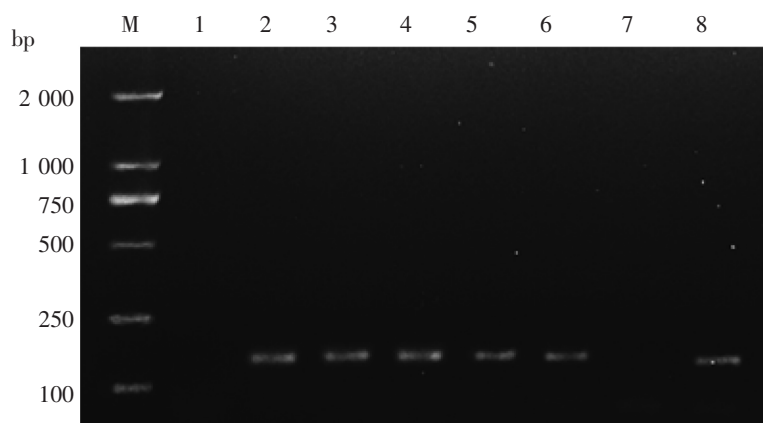
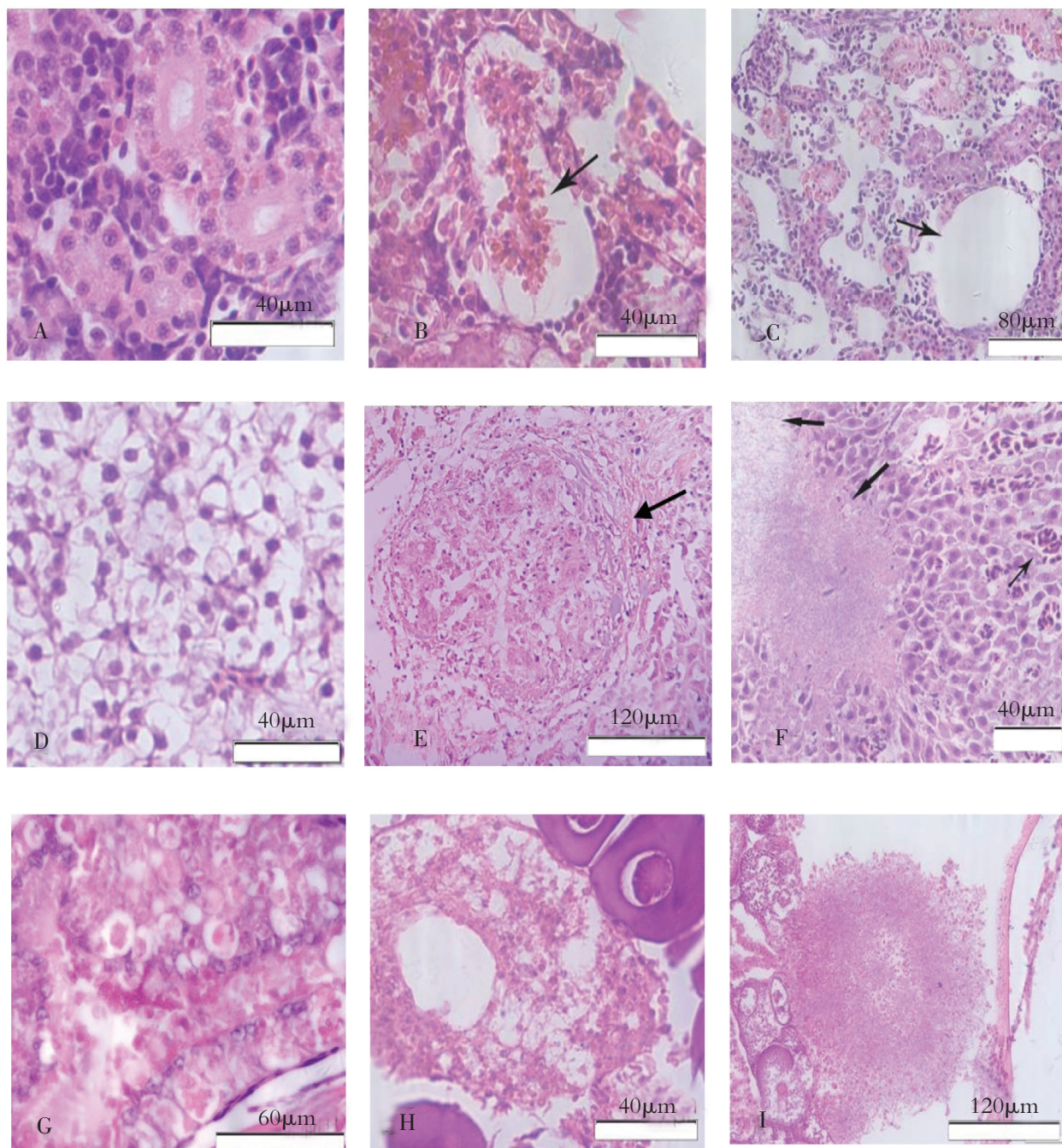


图 3 鳊鱼诺卡氏菌的 PCR 检测
M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照斑马鱼肝脏组织; 2~6: 攻毒斑马鱼肝脏组织;

7: 阴性对照(ddH₂O); 8: 阳性对照(*N. seriolae* ZJ0503)

Fig. 3 Detection of the *N. seriolae*
M: DNA Marker DL2000; 1: Liver of the negative control zebrafish; 2~6: Liver of the infected zebrafish; 7: ddH₂O control; 8: Positive control (*N. seriolae* ZJ0503)

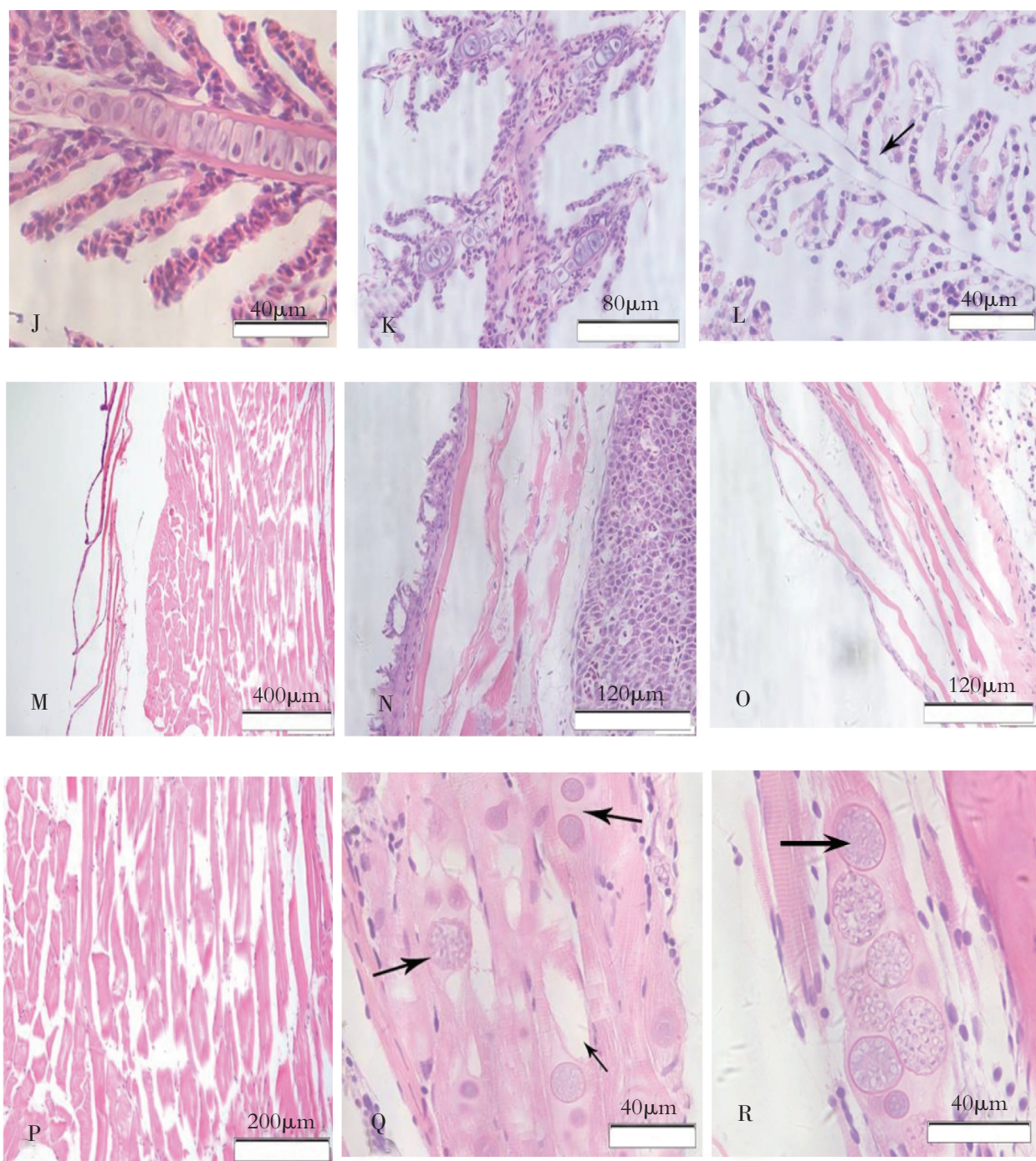


图版 I 鳊鱼诺卡氏菌感染斑马鱼的组织病理学变化(H. E.)

A: 正常肾组织; B: 肾小管坏死灶(箭头), 基底膜保留肾小管空腔; C: 肾组织出现空洞(箭头), 细胞离散; D: 正常肝组织; E: 结节; F: 肝组织出现淤血(短箭头), 结节、纤维素变性(长箭头); G: 正常胰腺; H: 胰腺组织空泡变性、坏死; I: 胰腺组织纤维素变性、坏死。

Fig. 4 Histopathological changes of zebrafish infected with *N. seriolae* (H. E.)

A: Normal kidney tissue; B: Renal tubular necrosis (arrow), basement membrane preserved renal tubular cavity; C: Void (arrow) in the renal tissue, cell dispersion; D: Normal liver tissue; E: Granulomas in liver; F: Liver tissue congestion (small arrow), nodule, cellulose degeneration (big arrow); G: Normal pancreas tissue; H: Pancreatic tissue degeneration and necrosis; I: Cellulose degeneration and necrosis in pancreas



图版 II 鲫鱼诺卡氏菌感染斑马鱼的组织病理学变化(H. E.)

J: 正常鳃组织; K: 鳃丝短小扭曲、弯曲或皱缩, 鳃条软骨排列错乱不整齐; L: 鳃上皮增生, 与毛细血管分离, 形成空隙(箭头); M: 正常皮肤; N: 皮肤变性坏死, 脱落; O: 皮肤坏死, 变性, 局部有炎性细胞浸润; P: 正常肌肉组织; Q: 肌肉组织出现细菌团(长箭头), 细小空洞(短箭头), 溶解, 断裂; R: 肌肉组织出现细菌团(箭头)

Fig. 4 Histopathological changes of zebrafish infected with *N. seriola* (H. E.)

J: Normal gill tissue; K: Gill filament short, twisted or shrunk, and gill cartilage irregularly arranged; L: Epithelial hyperplasia happened in gill, epithelial cells separated with blood capillary and formed a gap (arrow); M: Normal skin tissue; N: Skin necrosis, degeneration and shedding; O: Skin necrosis, degeneration, inflammatory cell infiltration; P: Normal muscle tissue; Q: Bacterial groups observed in muscle (big arrow), muscle fiber dissolved and fractured, form small cavity (small arrow); R: Bacterial groups observed in muscle (arrow)

3 讨 论

迄今为止,对鳊鱼诺卡氏菌的研究,大多集中于病原分离、鉴定、快速检测等方面^[8,11-12]。鳊鱼诺卡氏菌疫苗的研究进展缓慢,尚未研制出成功的商品化疫苗^[20]。鳊鱼诺卡氏菌的致病机理还未完全明确,而鳊鱼诺卡氏菌感染水产动物造成的危害却在不断上升。因此,建立鳊鱼诺卡氏菌感染动物模型,是研究其致病机理和疫苗研制不可或缺的一环。近年来,对鳊鱼诺卡氏菌感染模型的研究时有报道。王国良等^[6]用分离到的鳊鱼诺卡氏菌回归感染乌鳢,采用腹腔注射、口灌、创伤浸泡(20 min)和浸泡(20 min)4种方式攻毒,攻毒后18 d都达到100%死亡率。满其蒙等^[8]用鳊鱼诺卡氏菌感染卵形鲳鲹,采用腹腔注射、口灌、浸泡(40 min)、创伤浸泡(40 min)4种方式,感染22 d后累计死亡率分别达到93.3%、66.7%、60.0%和73.3%。组织病理学结果发现,发病卵形鲳鲹在肝脏、脾脏、肾脏等器官中形成了肉芽肿结节,脾脏出血,肾小管上皮细胞变性、坏死,肝脂肪变性,鳃小片上皮细胞增生,相互融合在一起棒状化。在本研究中,感染鳊鱼诺卡氏菌的斑马鱼,其组织病理变化与卵形鲳鲹颇为类似:发病的斑马鱼在肝脏、胰脏等器官中形成了肉芽肿结节,在肾脏、肝脏、胰脏、皮肤和肌肉等组织出现了细胞变性、坏死等病理变化,同时鳃小片增生严重、毛细血管扩张,充血。乌鳢和卵形鲳鲹体型较大、成本高、不易大量养殖,特别是卵形鲳鲹,需要海水养殖且喜集群大范围游动,更难于实验室养殖。而斑马鱼易于在实验室内进行大批量养殖,是良好的模式生物。此外斑马鱼已被研究的非常透彻,有不少商品化抗体,其全基因组测序已经完成^[22],还可以通过斑马鱼模式生物数据库 ZFIN (ZebraFish Information Network <http://zfin.org/>)等途径很便利的获得斑马鱼的遗传学和基因组研究信息,方便开展鳊鱼诺卡氏菌感染致病和疫苗免疫过程中的免疫基因变化规律等相关研究。笔者将鳊鱼诺卡氏菌腹腔注射攻毒感染斑马鱼。结果发现腹腔注射12 h后斑马鱼开始出现死亡,症状明显,死亡率随注射浓度的增加而增加,LD₅₀为 3.39×10^8 CFU·尾,揭示了鳊鱼诺卡氏菌感染斑马鱼的剂量依赖性。实验结果表明,通过腹腔注射途径,会导致斑马鱼发生多器官系统性疾病病变、形成结节,与自然发病的鱼症状类似,可作为较理想的斑马鱼-鳊鱼诺卡氏菌动物模型,用于进一步研究鳊鱼诺卡氏菌的致病机理、毒力评估和疫苗研制,对水产养殖业具有重要意义。

参考文献:

- [1] 张建丽,刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 513-517.
- [2] 黄郁葱,简纪常,吴灶和,等. 卵形鲳鲹结节病原的分离与鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 49-53.
- [3] 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.
- [4] Labrie L, Ng J, Tan Z, et al. Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia [G]//Bondad-Reansanto M, Mohan C V, Crumlish M, Subasinghe R. Diseases in Asian aquaculture VI. Fish Health Section. Philippines: Asian Fisheries Society, 2008: 297-312.
- [5] 夏洪丽,鲁义善,汤菊芬,等. 鱼类致病杀鲑诺卡氏菌(*Nocardia salmonicida*)特异性PCR检测方法的建立[J]. 广东海洋大学学报, 2014, 34(4): 56-61.
- [6] 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.
- [7] 蒋依依,李安兴. 鳊诺卡菌特异性PCR快速检测方法的建立[J]. 南方水产科学, 2011, 7(6): 47-51.
- [8] 满其蒙,徐力文,区又君,等. 鳊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, 21: 132-135.
- [9] 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.
- [10] Saralahti A, Piippo H, Parikka M, et al. Adult zebrafish model for pneumococcal pathogenesis [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 42(2): 345-353.
- [11] Sanders J L, Zhou Y, Moulton H M, et al. The zebrafish *Danio rerio* as a model for *Toxoplasma gondii*: an initial description of infection in fish [J]. Journal of Fish Diseases, 2015, 38(7): 675-679.
- [12] Con S, Carol H K. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(4): 341-350.
- [13] Harrieff M J, Bermudez L E, Kent M L. Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum*

- and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection [J]. *Journal of Fish Diseases* 2007 30: 587–600.
- [14] Miller J D , Neely M N. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis [J]. *Acta Tropica* 2004 91: 53–68.
- [15] 柯翎 林晨帽 龚晖. 斑马鱼作为模式动物在鱼类病原学中的研究进展 [J]. *福建农业科技* 2012(5) : 77–80.
- [16] 夏立群 王蓓 夏洪丽 等. 鳊鱼诺卡氏菌培养条件及培养基的优化 [J]. *南方水产科学* 2013 9(3) : 51–56.
- [17] Reed L J , Muench H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. *American Journal of Epidemiology* 1938 27(3) : 493–497.
- [18] 董雪红 田敏 季策, 等. 两种 LD_{50} 计算方法对副溶血性弧菌毒力的比较研究 [J]. *上海海洋大学学报* 2016 25(1) : 86–96.
- [19] 袁广明 胡黎平 李燕 等. 成年斑马鱼石蜡连续切片的制作和苏木精–伊红染色 [J]. *解剖学研究* 2006 28(1) : 73–75.
- [20] 郑伟, 严继舟. 斑马鱼组织石蜡切片质量的优化 [J]. *江苏农业科学* 2013 41(11) : 260–263.
- [21] Itano T , Kawakami H , Kono T et al. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata* [J]. *Aquaculture* 2006 261(4) : 1175–1180.
- [22] Howe K , Clark M D , Torroja C F et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature* 2013 496(7446) : 498–503.

Establishment of a Zebrafish Model for *Nocardia seriolae* and Histopathological Study

XIA Liqun^{1 2 3} , WANG Mei¹ , LAI Jiebin¹ , CHEN Ruimin¹ , XU Liang¹ , LU Yishan^{1 2 3}

(1. College of Fisheries , Guangdong Ocean University , Zhanjiang , Guangdong 524088 , China; 2. Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals , Zhanjiang , Guangdong 524088 , China; 3. Guangdong Higher Education Institutions Key Laboratory for Controlling of Diseases of Aquatic Economic Animals , Zhanjiang , Guangdong 524088 , China)

Abstract: Fish nocardiosis has been spread in the south of China in recent years and has a huge adverse effect on the fishery industry. *Nocardia seriolae* is a leading cause of fish nocardiosis and has been reported in about 20 fish species. Zebrafish (*Danio rerio*) were infected with a strong virulent? strain of *N. seriolae* ZJ0503 at different concentrations through intraperitoneal injection. A zebrafish model for *N. seriolae* was established through the observation of clinical symptoms , pathologic autopsy , pathogen isolation , 50% lethal dose (LD_{50}) analysis and histopathological studies. The results show that an obvious infection happened in the zebrafish after challenged with *N. seriolae* ZJ0503. The LD_{50} of *N. seriolae* ZJ0503 was 3.39×10^8 CFU/fish. Obvious pathological changes were observed in the zebrafish tissues , such as kidney , liver , pancreas , gill , skin and muscle. This study provides evidence that the zebrafish can be used as a model for *N. seriolae* infection , and the model is useful to study the pathogenic mechanism of fish nocardiosis for development of *N. seriolae* vaccine.

Keywords: *Nocardia seriolae*; zebrafish; animal model; histopathology