

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15127

我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征

张德锋, 刘礼辉, 任燕, 李宁求, 林强, 潘厚军, 石存斌, 吴淑勤

中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380

摘要: 2014 年海南省文昌市多个养殖场的罗非鱼出现暴发性疾病, 患病罗非鱼表现出体色发黑、打转游动、眼球突出或混浊等典型的链球菌病症状。从患病罗非鱼的肝、肾、脾、眼球和脑等组织中分离到 19 株病原菌, 即 TC-1、TC-2、BL1441~BL1448 和 WT1451~WT1459。通过形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析等方法对病原菌进行鉴定, 结果表明, 这些病原菌均为无乳链球菌。溶血试验结果表明, TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株为 β -溶血性无乳链球菌, 而 WT1451~WT1459 菌株为不溶血无乳链球菌。进一步通过 MLST、分子血清型和毒力相关基因检测等技术对这些分离菌株进行遗传特征分析, 结果表明 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株是常见的 Ia-ST7 型, 其毒力基因型为 $bac^+ bca^+ bibA^+ cfb^+ hylB^+ iagA^+ fbsB^+ lmb^- scpB^- cylE^+ gbs20186^-$ 。而 WT1451~WT1459 菌株则是 Ib-ST261 型, 其毒力基因型为 $bac^- bca^- bibA^+ cfb^+ hylB^+ iagA^+ fbsB^+ lmb^- scpB^- cylE^- gbs20186^+$ 。将分离菌株 BL1441 和 WT1451 分别对罗非鱼进行攻毒试验, 结果表明, WT1451 菌株是强毒株, 当其攻毒剂量为 4.5×10^3 CFU/mL 时, 罗非鱼累积死亡率可达 85%。本研究将为我国罗非鱼无乳链球菌的流行病学、疫苗研制以及疾病防控等研究奠定基础。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; 分子分型; 致病性

中图分类号: S941, Q938.8

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-1044-11

罗非鱼(*Oreochromis* sp.)作为世界性优良养殖品种之一, 已在我国海南、广东、广西、福建等地区广泛养殖。然而, 随着罗非鱼养殖规模的扩大以及养殖环境的恶化, 罗非鱼链球菌病频繁暴发, 严重制约着我国罗非鱼产业的健康发展^[1]。罗非鱼链球菌病在世界范围内每年造成的经济损失超过 4000 万美元^[2]。引起罗非鱼链球菌病的病原菌主要有海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)和无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。Li 等^[2]和 Chen 等^[3]认为, 我国罗非鱼链球菌病的病原在 2009 年由海豚链球菌转变为无乳链球菌。无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病主要症状是鱼打转游动, 且多数眼球突出, 因此又被称为“突眼病”。该病暴发性强,

死亡率高^[4], 对我国罗非鱼养殖业危害极大。

无乳链球菌, 又称 B 族链球菌, 作为罗非鱼的主要致病菌之一, 严重威胁罗非鱼的健康养殖。因此, 该菌的流行病学、疫苗和药物防治等一直是研究的热点。近年来我国罗非鱼无乳链球菌的分子血清型主要是 Ia 型^[5-7], 且多为 β 溶血, 同时也发现少量的 Ib 和 III 型无乳链球菌^[2]。然而, 与常见的罗非鱼溶血性无乳链球菌不同, 2012 年黎娅等^[4]在广西发现了一种罗非鱼 γ 溶血性(即不溶血)无乳链球菌。这表明我国罗非鱼无乳链球菌在分子血清型和溶血特征等方面存在多样性。为了进一步了解罗非鱼无乳链球菌的流行情况及其分子特征, 对海南省多个地区进行了罗非鱼无乳

收稿日期: 2015-04-03; 修订日期: 2015-06-08.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B02); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-46).

作者简介: 张德锋(1985-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事水产病害与免疫研究. E-mail: zhangdefeng08@126.com

通信作者: 吴淑勤(1956-), 研究员. E-mail: gzwushuqin@163.com

链球菌流行病学调查研究。2014 年 10—12 月, 海南省文昌市多个罗非鱼养殖场的罗非鱼出现了细菌性疾病, 罗非鱼发病时水温均超过 28℃, 多数患病罗非鱼表现出典型的链球菌病症状。通过对患病罗非鱼的症状观察, 病原菌的分离、鉴定以及分子分型等方法进行疾病诊断与流行病学调查, 结果发现海南省文昌市翁田镇某养殖场的患病罗非鱼感染了一种 Ib-ST261 型不溶血无乳链球菌, 这是我国第一次报道该种株型的无乳链球菌, 同时这也表明近年来我国罗非鱼无乳链球菌的株型正呈现多样化的趋势。本研究通过对海南省文昌市不同池塘患病罗非鱼链球菌病的病原进行分离、鉴定, 利用多种分子分型方法进一步研究了该地区罗非鱼源无乳链球菌的流行态势, 发现一种我国罗非鱼源无乳链球菌的新型流行株。本研究将为罗非鱼源无乳链球菌的流行病学、疫苗研制和疾病防控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病罗非鱼采自海南省文昌市罗非鱼养殖场, 体质量为 270~380 g。采样时间为 2014 年 10—12 月, 罗非鱼发病时水温为 28~32℃, 死亡率约为

20%。链球菌快速生化鉴定试验条 API 20 Strep 链球菌鉴定系统购自法国 Biomerieux 公司; BHI 培养基购自 BD 公司, 血平板购自广东环凯微生物科技有限公司; PCR 相关试剂购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 病原菌的分离与纯化

选取具有典型症状的患病罗非鱼, 解剖后于无菌条件下取病鱼的肝、脾、肾和脑等组织划线接种于血琼脂平板或 BHI 平板, 28℃ 培养 1~4 d, 然后挑取单菌落再次进行平板划线, 观察菌落特点, 并将纯化为单克隆的菌落进行保种, 共纯化得到 17 株罗非鱼病原菌。病原菌 BL1441/2、BL1443/4、BL1445、BL1446/7、BL1448 菌株分别分离自 3 个池塘的 5 尾患病罗非鱼, 其中 3 号和 5 号池塘来自相同的养殖场(A 养殖场), 而 6 号池塘是位于与之相距数千米的另一个养殖场(B 养殖场)。病原菌 WT1451~WT1459 分离自同一个养殖场(C 养殖场)的 4 号和 14 号池塘的共 5 尾患病罗非鱼。A、B 和 C 养殖场之间无相同水源, 而同一养殖场的不同池塘之间有相互交换水源的情况。海南省罗非鱼源无乳链球菌 TC-1 和 TC-2 菌株为珠江水产研究所卢迈新研究员惠赠, 菌株信息详见表 1。

表 1 患病罗非鱼中分离的病原菌信息
Tab. 1 The information of the pathogens isolated from diseased tilapia

菌株 strain	分离时间 time	分离地点 area	池塘 pond	分离器官 organ
TC-1	2014-6-30	文昌潭牛 Tanniu, Wenchang city	no.1	肝 liver
TC-2	2014-6-30	文昌潭牛 Tanniu, Wenchang city	no.2	肝 liver
BL1441	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.3	肝 liver
BL1442	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.3	脾 spleen
BL1443	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.3	肝 liver
BL1444	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.3	肾 kidney
BL1445	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.3	脑 brain
BL1446	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.5	肾 kidney
BL1447	2014-10-21	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.5	脑 brain
BL1448	2014-12-1	文昌抱罗 Baoluo, Wenchang city	no.6	脑 brain
WT1451	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.4	脾 spleen
WT1452	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.4	肝 liver
WT1453	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.4	肝 liver
WT1454	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.4	脑 brain
WT1455	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.4	肝 liver
WT1456	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.14	脑 brain
WT1457	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.14	肝 liver
WT1458	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.14	肾 kidney
WT1459	2014-10-22	文昌翁田 Wengtian, Wenchang city	no.14	脑 brain

1.3 分离菌株生理生化鉴定及培养特性观察

分离菌株于血琼脂平板 28℃ 培养 1~4 d, 收集菌体, 制备成菌悬液, 然后按照说明书对分离菌株进行生理生化鉴定。无乳链球菌 XQ-1 为阳性对照菌株^[5]。然后挑选分离菌株的单菌落分别划线于血平板和 BHI 平板, 28℃ 培养 1~4 d, 观察分离菌株的溶血情况和生长状况。

1.4 分离菌株 16S rRNA 基因测序与分析

分离菌株通过细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取其基因组 DNA, 提取的细菌基因组 DNA 保存并用于 PCR 扩增模板。分离菌株 16S rRNA 基因使用引物(U8f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 U1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增^[5]。PCR 产物经测序, 然后将序列分别通过 NCBI (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的 nucleotide blast 和 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 中的 Sequence Match 进行序列同源性分析, 采用 ClustalX 1.8 软件进行序列比对, 再通过 MEGA 4.0 软件使用 N-J 法构建系统发育树。

1.5 分离菌株的分子血清型和 MLST 分型

病原菌的分子血清型检测首先参考 Imperi 等^[8]的方法进行, 然后再参考 Poyart 等^[9]的方法再进一步确认, 即 Ia 型的检测引物为 Ia-F: 5'-GGT CAGACTGGATTAATGGTATGC-3', Ia-R: 5'-GTA GAAATAGCCTATATACGTTGAATGC-3'; Ib 型的检测引物为 Ib-F: 5'-TAAACGAGAA TGGAATA TCACAAACC-3' 和 Ib-R: 5'-GAATTAACCTCAAT CCCTAAACAATATCG-3', 以分离菌株的基因组 DNA 为模板分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照, 然后回收 PCR 产物进行测序分析。

分离菌株的多位点序列分型(MLST)参考 Jones 等^[10]的方法, PCR 引物参见网站 <http://pubmlst.org/sagalactiae/>, 分别对 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkl* 等 7 个基因进行 PCR 扩增和测序。然后将这 7 个基因的序列与网上的相应等位基因序列进行比对分析, 最后查找得到相应的 ST 序列型。

1.6 分离菌株毒力相关基因的检测

通过 PCR 扩增检测分离菌株的毒力相关基因, 如 *bac*(β C 蛋白)、*bca*(α C 蛋白)、*bibA*(细菌免疫原性黏附素)、*cfb*(CAMP 因子)、*cylE*(β -溶血素/溶细胞素)、*hylB*(透明质酸酶)、*iagA*(侵袭相关基因)、*lmb*(层黏连蛋白结合蛋白)、*scpB*(C5a 肽酶)、*fbsA*(纤维蛋白结合蛋白 A) 和 *fbsB*(纤维蛋白结合蛋白 A) 等基因, 除了 *bibA* 基因的 PCR 扩增引物和扩增条件参考 Kayansamruaj 等^[11]的方法外, 其他引物和 PCR 扩增条件均参考 Godoy 等^[12]的方法。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照, 并将 PCR 产物通过测序验证。

1.7 分离菌株的致病性

分别选取 BL1441 和 WT1451 菌株对(40±5) g 健康罗非鱼进行人工感染试验, 研究其对罗非鱼的致病性。BL1441 和 WT1451 菌株于血琼脂平板上 28℃ 培养 36 h, 然后用无菌 PBS 制备成菌悬液, 测定其 OD₆₀₀ 和活菌数。分别制备成 4.5×10⁸ CFU/mL、4.5×10⁷ CFU/mL、4.5×10⁶ CFU/mL、4.5×10⁵ CFU/mL、4.5×10⁴ CFU/mL、4.5×10³ CFU/mL、4.5×10² CFU/mL 浓度的菌悬液, 每个浓度组菌悬液分别腹腔注射 20 尾健康罗非鱼, 每尾注射 0.2 mL。空白对照组(20 尾)腹腔注射 0.2 mL 无菌 PBS。水温控制在(29±1)℃, 观察并记录每个试验组罗非鱼的发病死亡情况, 连续观察 15 d。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的培养特征

从患病罗非鱼的内脏器官和脑等组织中分离的病原菌均为单一形态的菌落。TC-1、TC-2 菌株和 BL1441~BL1448 菌株在血琼脂平板和 BHI 平板上均生长良好, 为乳白色、圆形、隆起的菌落, 且呈 β 溶血。而相同的条件下, 相对于 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株, WT1451~WT1459 菌株在血琼脂平板和 BHI 平板上生长缓慢, 菌落较小, 且不溶血。WT1451~WT1459 菌株在血平板上 28℃ 培养 40 h 后, 菌落为乳白色、圆形、隆起。菌落划线在 BHI 平板上, 28℃ 培养 40 h, 形成灰白色、针尖大小、微隆起的圆形菌落。

2.2 分离菌株的生理生化特征

BL1441~BL1448 菌株生理生化鉴定结果表明为无乳链球菌。WT1451~WT1459 菌株的生理生化特征与常见的无乳链球菌有些不同, 其中核糖和海藻糖发酵为阴性, 且不溶血(表 2), 而 Evans

等^[13]研究发现鱼源无乳链球菌 ATCC51487 为不溶血, 海藻糖发酵阴性, 但是核糖发酵为阳性。因此, WT1451~WT1459 菌株与常见的溶血性无乳链球菌不同, 该菌株的鉴定需要采用分子生物学方法进一步确定。

表 2 分离菌株的生理生化特征
Tab.2 The physiological and biochemical characteristics of the isolates

项目 item	菌株 strain		
	BL1441	WT1451	XQ-1
VP 试验 V-P test	+	+	+
马尿酸盐水解 hippurate hydrolysis (HIP)	+	+	+
七叶灵 esculin (ESC)	—	—	—
吡咯烷酮芳胺酶 pyrrolidone arylamidase (PYRA)	—	—	—
α -半乳糖苷酶 α -Galactosidase (α -GAL)	—	—	—
β -葡萄糖醛酸酶 β -Glucuronidase (β -GUR)	+	+	+
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase (β -GAL)	—	—	—
碱性磷酸酶 alkaline phosphatase (PAL)	+	+	+
亮氨酸芳胺酶 leucine arylamidase (LAP)	+	+	+
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase (ADH)	+	+	+
核糖 ribose (RIB)	+	—	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose (ARA)	—	—	—
甘露醇 mannitol (MAN)	—	—	—
山梨醇 sorbitol (SOR)	—	—	—
乳糖 lactose (LAC)	—	—	—
海藻糖 trehalose (TRE)	+	—	+
菊糖 inulin (INU)	—	—	—
棉子糖 raffinose (RAF)	—	—	—
淀粉 starch (AMD)	—	—	—
糖原 glycogen (GLYG)	—	—	—
溶血活性 haemolysis	+	—	+

注: +表示阳性; —表示阴性。
Note: + denotes positive; — denotes negative.

2.3 16S rRNA 基因测序与系统发育分析

PCR 扩增 WT1451~WT1459 菌株和 BL1441~BL1448 菌株的 16S rRNA 基因, 获得约 1500 bp 大小的预期片段。PCR 产物经过纯化并测序, 序列比对结果显示, WT1451~WT1459 菌株间 16S rRNA 基因序列相似性为 100%(GenBank 序列号 KT001225~KT001229), 通过 Blastn 和 RDP 在线比对, 结果表明与无乳链球菌 2-22、2603V/R 和 ATCC 13813 菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%。而 BL1441~BL1448 菌株的 16S rRNA 基

因序列(GenBank No.: KT001218~KT001222)与无乳链球菌 A909、YZF905 和 HNwc 菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%。16S rRNA 基因的系统发育树结果表明, WT1451~WT1459 和 BL1441~BL1448 菌株分别属于两个分枝, 但是这些菌株均与无乳链球菌聚为一类(图 1), 这表明这些菌株为无乳链球菌。

2.4 分离菌株的分子血清型

病原菌分子血清型检测参考 Imperi 等^[8]的方法, 检测结果表明 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448

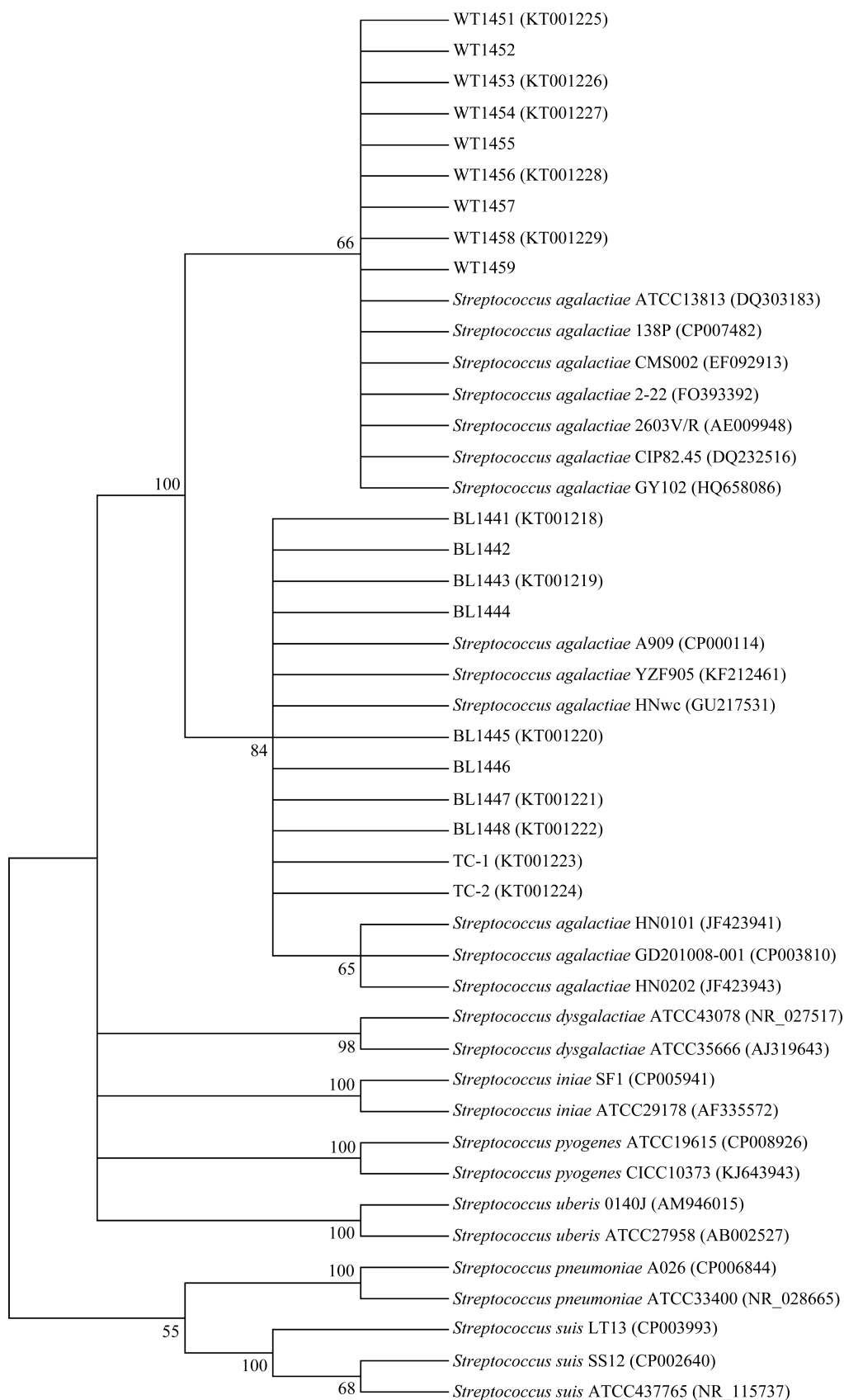


图 1 应用邻近法构建的菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the sequences of the 16S rRNA genes by Neighbor-Joining method

菌株 PCR 扩增出 2 条带, 与 Ia 型的条带相似, 而 WT1451~WT1459 菌株 PCR 扩增出 3 个条带, 与 Ib 型的条带相似。参考 Poyart 等^[9]的检测结果也表明 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株为 Ia 型 (521 bp), 而 WT1451~WT1459 为 Ib 型 (PCR 产物片段大小 770 bp) (图 2)。

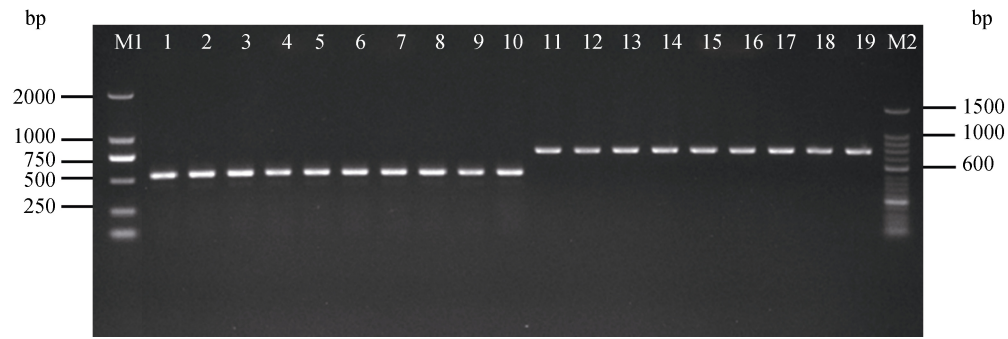


图 2 无乳链球菌的分子血清型 PCR 电泳图谱
1-10 号电泳条带为 TC-1、TC-2、BL1441~BL1448 菌株; 11-19 号电泳条带为 WT1451~WT1459 菌株. M1: Marker 2000 (TaKaRa), M2: Marker 50 (TaKaRa).
Fig.2 Molecular serotype assays of *Streptococcus agalactiae* strains by gel electrophoresis
Lane 1-10: TC-1, TC-2, BL1441~BL1448 strains; Lane 11-19: WT1451~WT1459 strains. Lane M1: Marker 2000 (TaKaRa); Lane M2: Marker 50 (TaKaRa).

2.5 分离菌株的 MLST 分型

分离菌株 WT1451~WT1459 的 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkt* 等 7 个管家基因测序分析结果表明, 这 7 个等位基因类型分别为 54、17、31、4、26、25 和 19。再根据这些等位基因的类型查找其相应的 ST 型, 结果表明 WT1451~ WT1459 菌株为 ST261 型。同样的方法, 结果表明 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株的分子血清型为 ST7 型。

2.6 分离菌株的毒力基因型

分离菌株的毒力基因检测结果表明, TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株的毒力基因型为 *bac*⁺-*bca*⁺-*bibA*⁺-*cfb*⁺-*hylB*⁺-*iagA*⁺-*fbsB*⁺-*lmb*⁻-*scpB*⁻-*cylE*⁺-*gbs20186*⁻。而 WT1451~WT1459 菌株的毒力基因型为 *bac*⁻-*bca*⁻-*bibA*⁺-*cfb*⁺-*hylB*⁺-*iagA*⁺-*fbsB*⁺-*lmb*⁻-*scpB*⁻-*cylE*⁻-*gbs20186*⁺。无乳链球菌的 11 个毒力基因中 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株与 WT1451~WT1459 菌株有 4 个毒力基因存在差异, 即 *bac*、*bca*、*cylE* 和 *gbs20186* 基因, 这也表明它们属于两种不同的毒力基因型(表 3)。

2.7 分离菌株的致病性

人工感染罗非鱼实验中, BL1441 菌株腹腔注射 4.5×10^8 CFU/mL、 4.5×10^7 CFU/mL、 4.5×10^6 CFU/mL、

4.5×10^5 CFU/mL、 4.5×10^4 CFU/mL 和 4.5×10^3 CFU/mL 浓度组的罗非鱼累积死亡率分别为 65%、15%、5%、0、0 和 0, 该菌株攻毒 4 d 后罗非鱼即可出现眼球突出或混浊症状。WT1451 菌株攻毒浓度为 4.5×10^8 CFU/mL、 4.5×10^7 CFU/mL、 4.5×10^6 CFU/mL、 4.5×10^5 CFU/mL、 4.5×10^4 CFU/mL 和 4.5×10^3 CFU/mL 时罗非鱼累积死亡率分别为 100%、100%、95%、95%、90%和 85%, WT1451 菌株攻毒后, 罗非鱼在 2 d 之后即出现眼球突出或混浊现象, 而且攻毒浓度为 4.5×10^8 CFU/mL 的实验组在 24 h 内出现急性死亡, 其死亡率可达 95%。垂死的罗非鱼表现出游动异常、脾和胆囊肿大、眼球突出或混浊等症状。将攻毒感染后垂死的罗非鱼进行病原菌分离, 均可以分离到无乳链球菌。对照组罗非鱼在 15 d 观察期内均未出现死亡。

3 讨论

3.1 患病罗非鱼无乳链球菌的分子分型

近年来, 罗非鱼链球菌病在我国南方罗非鱼养殖地区呈现暴发性流行, 给罗非鱼养殖产业造成巨大的经济损失。研究表明, 2009 年之后我国罗非鱼链球菌病的病原菌主要是无乳链球菌^[2-3, 14]。

表 3 分离菌株的毒力基因检测
Tab. 3 Detection of the virulence-related genes in the isolates from diseased tilapia

菌株 strain	毒力基因 virulence gene										
	<i>bac</i>	<i>bca</i>	<i>bibA</i>	<i>cfb</i>	<i>hylB</i>	<i>iagA</i>	<i>fbsB</i>	<i>lmb</i>	<i>scpB</i>	<i>cylE</i>	<i>gbs20186</i>
TC-1	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
TC-2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1441	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1442	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1443	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1444	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1445	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1446	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1447	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
BL1448	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
WT1451	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1452	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1453	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1454	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1455	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1456	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1457	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1458	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
WT1459	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+

注: +表示阳性; —表示阴性。
Note: + denotes positive; — denotes negative.

而无乳链球菌可以感染罗非鱼^[14]、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)^[15]、银鲳(*Pampus argenteus*)^[15]、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[14]、金头鲷(*Sparus auratus*)^[15]、金体美鲮(*Notemigonus crysoleucas*)^[15]、大底鲮(*Fundulus grandis*)^[16]、宝石鲈(*Scortum barcoo*)^[17]、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[16]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和牛蛙(*Rana catesbeiana*)^[18]等多种水生经济动物。本研究对 2014 年海南省文昌市罗非鱼养殖场的患病罗非鱼进行病原的分离、鉴定及其分子特征分析。结果表明 BL1441~BL1448 和 WT1451~WT1459 菌株为无乳链球菌。这表明目前无乳链球菌仍然是海南省文昌市罗非鱼链球菌病的病原菌。

虽然本研究对海南省文昌市患病罗非鱼链球菌病的调查研究发现其病原为无乳链球菌,但是分离菌株的生理生化特征和分子生物学特征均表明,这些无乳链球菌属于不同株型。病原菌的溶血活性结果表明 WT1451~WT1459 菌株为 γ 溶血,

即不溶血无乳链球菌。而 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株为 β 溶血。根据已有文献,目前我国罗非鱼源无乳链球菌主要为 β 溶血,而 α 溶血和 γ 溶血的无乳链球菌报道甚少^[4, 14]。本研究在海南省文昌市罗非鱼养殖场中发现了 β 溶血和 γ 溶血的无乳链球菌,这表明该地区同时流行两种溶血活性的无乳链球菌。分子血清型研究表明 WT1451~WT1459 菌株为 Ib 型,而 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株为 Ia 型。这表明 2014 年海南省文昌市的患病罗非鱼中同时出现了 Ia 型和 Ib 型无乳链球菌。目前,我国罗非鱼源无乳链球菌的分子血清型多为 Ia 型^[5, 7],而 Ib 和 III 型无乳链球菌较少发现,仅见 Li 等^[2]在海南省临高县某罗非鱼养殖场发现了 Ib 型无乳链球菌的报道,然而,本研究发现的 Ib 型无乳链球菌却在距临高县 100 多千米的文昌市翁田镇,这些 Ib 型无乳链球菌是否为相同来源,值得进一步深入调查研究。病原菌 MLST 分型研究表明 WT1451~WT1459 菌

株为 ST261 型, TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株为 ST7 型。目前, 我国罗非鱼源无乳链球菌主要为 ST7 型, 以及与 ST7 型同属一个克隆复合物的新型 NST1 和 NST2 型(目前这两种类型尚无对应的 ST 型号)^[19]。本研究在海南省文昌市罗非鱼中发现的 ST261 型无乳链球菌为我国首次报道该 ST 型的无乳链球菌。目前, 本研究结果表明, 这两种类型(Ia-ST7 型溶血和 Ib-ST261 型不溶血)的无乳链球菌尚未在同一养殖场或同一池塘的患病罗非鱼中发现, 因而 Ib-ST261 型不溶血无乳链球菌在我国的流行特征更值得关注。病原菌的分型研究结果表明, 我国海南省文昌市地区同时流行两种株型的无乳链球菌, 这将为我国罗非鱼链球菌病的流行病学研究和防治提供理论依据。

3.2 罗非鱼无乳链球菌的毒力基因分型

无乳链球菌 TC-1、TC-2、BL1441~BL1448 和 WT1451~WT1459 菌株的毒力基因检测结果表明, 它们分别属于不同的毒力基因型, 即 bac^+ - bca^+ - $bibA^+$ - cfb^+ - $hylB^+$ - $iagA^+$ - $fbsB^+$ - lmb^- - $scpB^-$ - $cylE^+$ - $gbs20186^-$ 和 bac^- - bca^- - $bibA^+$ - cfb^+ - $hylB^+$ - $iagA^+$ - $fbsB^+$ - lmb^- - $scpB^-$ - $cylE^-$ - $gbs20186^+$ 。毒力基因检测结果表明 TC-1、TC-2、BL1441~BL1448 和 WT1451~WT1459 菌株都缺失与入侵相关的基因 *lmb* 和 *scpB*, 这也表明这两种毒力基因不是罗非鱼源无乳链球菌的主要毒力基因。TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株缺失与黏附相关的 *gbs2018-6* 基因^[13]。WT1451~WT1459 菌株的表面抗原蛋白基因 *bac* 和 *bca* 均为阴性, 而我国流行的 Ia-ST7 型无乳链球菌 *bac* 和 *bca* 基因均为阳性^[5, 7]。Rosinski-Chupin 等^[20]在无乳链球菌基因组水平上的研究发现, 同为 Ib-ST261 型的鳟源无乳链球菌 2-22 和蛙源无乳链球菌 SS1218 菌株缺失两个可移动遗传元件: (1)可编码表面抗原蛋白 Alpha 样蛋白或 Rib 蛋白的顺式可移动元件; (2)编码 C5a 多肽酶 (*ScpB*)和层黏连蛋白结合蛋白 (*Lmb*)的复合转座子。因此, WT1451~WT1459 菌株在基因组水平上缺失了基因, 如 *lmb*、*scpB*、*bac* 和 *bca* 基因。此外, WT1451~WT1459 菌株还缺失与组织损伤相

关的基因 *cylE*。然而, WT1451~WT1459 菌株的黏附相关毒力基因(*bibA*、*gbs2018-6*和*fbsB*)比 TC-1、TC-2 和 BL1441~BL1448 菌株的多, 这或许会增强该型菌株对宿主细胞的黏附能力。

3.3 罗非鱼无乳链球菌的致病性分析

本研究表明 Ib-ST261 型 WT1451 菌株是强毒株。人工感染罗非鱼试验结果表明 BL1441 菌株为弱毒株, 而 WT1451 菌株为强毒株, 其中 WT1451 菌株对罗非鱼的致病性显著强于 BL1441 菌株。WT1451 菌株对罗非鱼的毒力也高于黎娅等^[4]发现的具有 γ 溶血活性的无乳链球菌 YZF905 的毒力。WT1451 菌株感染罗非鱼的浓度为 4.5×10^3 CFU/mL 时, 死亡率为 85%, 而 YZF905 菌株的感染浓度为 1×10^5 CFU/mL 时, 其死亡率为 40%^[4]。进一步研究发现 YZF905 菌株的生理生化反应中 VP 试验为阴性, 而 WT1451 菌株 VP 试验为阳性, 同时 16S rRNA 系统发育树也表明 WT1451~WT1459 菌株与 YZF905 菌株分别属于两个分枝(图 1), 因此, WT1451~WT1459 菌株与 YZF905 菌株为不同基因型的无乳链球菌, 尽管 YZF905 菌株也是不溶血无乳链球菌。研究发现, ST261 和 ST260 型无乳链球菌均属于 CC552 克隆复合群(clonal complexes)^[21], Delannoy 等^[22]发现 ST260 型罗非鱼源无乳链球菌 STIR-CD-17 具有强致病性, 罗非鱼腹腔注射浓度为 10^2 CFU/尾该菌株时可致死。而无乳链球菌 WT1451~WT1459 也属于 CC552 克隆复合群, 同时也是强致病性无乳链球菌。本研究结果提示罗非鱼源 Ib-ST261 型无乳链球菌比 Ia-ST7 型无乳链球菌的致病性更强。因此, 深入调查研究 ST261 型无乳链球菌在我国罗非鱼中的流行与分布具有十分重要的现实意义。

Rosinski-Chupin 等^[20]研究发现, ST261 型鳟源无乳链球菌 2-22 的基因组为 1.8 Mb, 比常见的 ST7 型菌株如 COH1(2.0Mb)和 FSL3-026(2.4 Mb)的基因组小 10%~25%, 并认为这在进化上是一种退化行为。研究还表明 ST260-261 型无乳链球菌的碳源运输系统(ABC 转运器和磷酸烯丙酮酸盐/碳水化合物磷酸转移酶系统)和降解多糖相关酶

(淀粉酶、胞外酶、熊果苷降解酶)等基因出现缺失或失活,导致其丧失不同碳源的利用能力。此外,由于磷酸转乙酰酶基因的缺失导致其丙酮酸盐/醋酸盐转换的发酵途径改变,使其相关代谢也发生变化。这或许解释了为何 WT1451~WT1459 菌株的生理生化指标中许多碳源利用为阴性。ST261 型菌株由于碳源利用能力的降低,开始过渡到专性病原体的生活方式。ST261 型无乳链球菌的这种进化方式或许是导致其具有强致病性的原因之一。因此,lb-ST261 型无乳链球菌对我国罗非鱼养殖产业的危害性可能会更大,更应引起研究者的高度重视。

综上所述,本研究在海南省文昌市罗非鱼养殖场的患病罗非鱼中分离到两种不同株型的无乳链球菌,即 la-ST7 型溶血和 lb-ST261 型不溶血无乳链球菌。而 lb-ST261 型不溶血无乳链球菌的生理生化特征、毒力基因型和致病性等均不同于我国常见的 la-ST7 型溶血无乳链球菌。随着近年来 lb 型无乳链球菌在越来越多的地区被发现,该型无乳链球菌的流行病学应引起更多关注,而且 lb-ST261 型不溶血无乳链球菌具有强致病性,因此,深入研究该型菌株在我国的流行与分布以及致病机理具有重要意义。本研究在我国首先报道了罗非鱼源 lb-ST261 型不溶血无乳链球菌的分子生物学特征及其致病性,这将为我国罗非鱼链球菌病的防控、疫苗研发以及流行病学等研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Liu Z G, Ke X L, Lu M X, et al. Effect of temperature on the virulence of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(11): 1733–1741.[刘志刚, 可小丽, 卢迈新, 等. 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1733–1741.]
- [2] Li L, Wang R, Liang W. et al. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. Vet Microbiol, 2013, 167: 719–724.
- [3] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. Vet Microbiol, 2012, 159: 526–530.
- [4] Li Y, Luo F G, Zuo Y, et al. Isolation and identification of γ -hemolytic *Streptococcus agalactiae* from tilapia[J]. Freshwater Fisheries, 2014, 44(4): 63–76.[黎娅, 罗福广, 左跃, 等. 罗非鱼源 γ 溶血性无乳链球菌的分离鉴定[J]. 淡水渔业, 2014, 44(4): 63–76.]
- [5] Guo Y J, Zhang D F, Fan H P, et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in southern China[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 399–406.[郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 399–406.]
- [6] Ye X, Li J, Lu M, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China[J]. Fish Sci, 2011, 77: 623–632.
- [7] Zhang D, Li A, Guo Y, et al. molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China[J]. Aquaculture, 2013, 412–413: 64–69.
- [8] Imperi M, Pataracchia M, Alfaroni G, et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*[J]. J Microbiol Methods, 2010, 80(2): 212–214.
- [9] Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1985–1988.
- [10] Jones N, Bohnsack J F, Takahashi S, et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2530–2536.
- [11] Kayansamruaj P, Pirarat N, Katagiri T, et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand[J]. J Vet Diagn Invest, 2014, 26(4): 488–495.
- [12] Godoy D T, Carvalho-Castro G A, Leal C A G, et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*[J]. Lett Appl Microbiol, 2013, 57(6): 476–483.
- [13] Evans J J, Bohnsack J F, Klesius P H, et al. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan[J]. J Med Microbiol, 2008, 57: 1369–1376.
- [14] Ke X L, Lu M X, Li Q Y, et al. Identification and phylogenetic analysis of tilapia *Streptococcus agalactiae* based on *cfb* and 16S rRNA gene[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(20): 52–62.[可小丽, 卢迈新, 李庆勇,

- 等. 罗非鱼无乳链球菌鉴定及基于 *cfb* 和 16S rRNA 基因同源性分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(20): 52–62.]
- [15] Geng Y, Wang K Y, Huang X L, et al. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured Ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China[J]. Transbound Emerg Dis, 2012, 59: 369–375.
- [16] Liu L, Li Y W, He R Z, et al. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China[J]. J Fish Dis, 2014, 37: 1067–1072.
- [17] Huang T, Li L P, Wang R, et al. Pathogenic bacteria *Streptococcus agalactiae* and *S. iniae* in diseased ovate pompano *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(2): 161–166.[黄婷, 李莉萍, 王瑞, 等. 卵形鲳鲹感染无乳链球菌与海豚链球菌的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(2): 161–166.]
- [18] Hang X Y, Zhou D R, Ye X P, et al. Isolation and identification on the pathogen of bullfrog *Streptococcus* disease[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(2): 361–364.[杭小英, 周冬仁, 叶雪平, 等. 牛蛙无乳链球菌病原的分离鉴定[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 361–364.]
- [19] Wang B, Li Y, Chen H, et al. Molecular epidemiology of pathogen *Streptococcus agalactiae* from tilapia in southern China[J]. Fisheries Science, 2014, 33(12): 741–749.[王蓓, 黎源, 陈贺, 等. 我国华南地区罗非鱼源无乳链球菌分子流行病学研究[J]. 水产科学, 2014, 33(12): 741–749.]
- [20] Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, et al. Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage[J]. BMC Genom, 2013, 14: 252.
- [21] Delannoy C M J, Crumlish M, Fontaine M, et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 41.
- [22] Delannoy C M, Zadoks R N, Crumlish M, et al. Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish[J]. J Fish Dis, 2014 Nov 15. doi: 10.1111/jfd.12319.

Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China

ZHANG Defeng, LIU Lihui, REN Yan, LI Ningqiu, LIN Qiang, PAN Houjun, SHI Cunbin, WU Shuqin

Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China

Abstract: A Streptococcosis outbreak in cultured tilapia caused by *Streptococcus agalactiae* occurred in Wenchang, Hainan Province, China in 2014. In this study, the moribund tilapias were collected from different farms for bacteria isolation. Most of the moribund tilapias displayed typical clinical signs, such as melanosis, corneal opacity, and swimming abnormalities. A total of 19 isolates (TC-1, TC-2, BL1441–BL1448, and WT1451–WT1459) were isolated from the liver, kidney, spleen, eye, and brain of the diseased tilapia; then, these isolates were identified by morphological observation, physiological, and biochemical characteristics, and sequence analysis of the 16S rRNA gene. All of the isolates were identified as *S. agalactiae*, and the WT1451–WT1459 strains grew slowly and could not utilize trehalose and ribose. In addition, TC-1, TC-2, and BL1441–BL1448 isolates were positive for β -hemolysis on sheep's blood agar plates, but WT1451–WT1459 isolates did not exhibit hemolysis. The genetic characteristics of these isolates were analyzed by multilocus sequence typing (MLST), molecular serotyping, and virulence-related gene sequencing. The results indicated that TC-1, TC-2, and BL1441–BL1448 isolates were common types of Ia-ST7 *S. agalactiae* in tilapia in China. However, the WT1451–WT1459 isolates were rare types of Ib-ST261 *S. agalactiae* in tilapia worldwide. PCR revealed that the virulence-related genes *bac*, *bca*, *bibA*, *cfb*, *hylB*, *iagA*, *fbsB*, and *cylE* were present in TC-1, TC-2, and BL1441–BL1448 isolates, and the virulence-related genotype of these strains was *bac*⁺-*bca*⁺-*bibA*⁺-*cfb*⁺-*hylB*⁺-*iagA*⁺-*fbsB*⁺-*lmb*⁻-*scpB*⁻-*cylE*⁺-*gbs20186*⁻. However, the WT1451–WT1459 isolates were positive for *bibA*, *cfb*, *hylB*, *iagA*, *fbsB*, and *gbs20186*, and the virulence-related genotype was *bac*⁻-*bca*⁻-*bibA*⁺-*cfb*⁺-*hylB*⁺-*iagA*⁺-*fbsB*⁺-*lmb*⁻-*scpB*⁻-*cylE*⁻-*gbs20186*⁺. Despite the fact that the number of the virulence-related genes of the WT1451 strain was less than that of the BL1441 strain, the former was more virulent than the latter in tilapia. In this study, the virulence tests were conducted by intraperitoneal injection of the BL1441 and WT1451 strains in tilapia. The results of the challenge experiments showed that the WT1451 strain possessed stronger pathogenicity to tilapia than that of BL1441 strain. The WT1451 strain caused 85% mortality in tilapia at a dose of 4.5×10^3 CFU/mL. The BL1441 strain showed weak virulence in tilapia, with cumulative mortality of 65% at a dose of 4.5×10^8 CFU/mL postchallenge. In summary, the 19 *S. agalactiae* strains isolated from tilapia in Wenchang were divided into two genotypes based on physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequences, hemolysis activity, molecular serotyping, and PCR screening of virulence-related genes. Although reports on the Ib-ST261 *S. agalactiae* strains in tilapia are rare worldwide, these strains were highly virulent in tilapia. Therefore, it is very important to obtain data on the epidemiology of Ib-ST261 *S. agalactiae* strains in tilapia in China. To the best of our knowledge, this is the first report on the hypervirulent Ib-ST261 strain of *S. agalactiae*, which was isolated from tilapia in China. This study provides a framework for the exploration of epidemiological analysis, vaccine development, prevention, and treatment of *S. agalactiae* in tilapia.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; molecular typing; pathogenicity

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: gzwushuqin@163.com