

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16246

中国罗非鱼主养区无乳链球菌的分子流行特征及其传播方式

张德锋¹, 袁伟^{1,2}, 可小丽¹, 刘志刚¹, 曹建萌¹, 卢迈新¹, 王淼¹, 衣萌萌¹

1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为分析 2007—2015 年中国罗非鱼主养区无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的分子特征和流行情况, 分离并收集了 248 株罗非鱼源无乳链球菌。通过分子血清型、MLST、毒力基因和前噬菌体等分型方法对 248 株无乳链球菌进行了分子遗传特征分析。结果表明, 229 株无乳链球菌(92.3%)的分子血清型是 I a 型, 其余 19 株均是 I b 型(7.7%)。MLST 分析结果表明, 所有 I a 型无乳链球菌都是 ST7 型, 所有 I b 型无乳链球菌都是 ST261 型。毒力基因检测结果发现, 229 株 I a-ST7 型无乳链球菌的毒力基因型相同, 即 V1 型; 19 株 I b-ST261 型无乳链球菌的毒力基因型相同, 即 V2 型。前噬菌体检测结果表明, I a-ST7 型无乳链球菌可分为两种前噬菌体基因型, 分别是 P1 型(36 株)和 P2 型(193 株); I b-ST261 型无乳链球菌的 10 个前噬菌体基因都是阴性, 即 P3 型。根据以上 4 种分子分型方法可将 248 株无乳链球菌分为 3 种基因型, 即 I a-ST7-V1-P1 型、I a-ST7-V1-P2 型和 I b-ST261-V2-P3 型。2010—2011 年主要流行菌株由 I a-ST7-V1-P1 型转变为 I a-ST7-V1-P2 型, 其中 I a-ST7-V1-P1 型是 2011 年之前的主要流行菌株, I a-ST7-V1-P2 型在 2011 年及之后成为主要流行菌株。研究表明, 近年来我国罗非鱼源无乳链球菌发生了明显的遗传变异, 同时, 根据我国罗非鱼主养区无乳链球菌的流行特点, 推测我国罗非鱼源无乳链球菌是通过苗种或水体等介质进行传播的, 属于输入性传播方式。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; 分子血清型; MLST; 毒力基因; 前噬菌体

中图分类号: Q941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0606-09

罗非鱼作为淡水优良养殖品种之一, 在中国南方如广东、广西和海南等地区已大规模人工养殖。据农业部渔业局统计数据^[1], 2014 年我国罗非鱼养殖产量约 170 万 t, 总产量居全球第一。然而, 近年来链球菌病严重制约了我国罗非鱼产业的健康可持续发展。自 2009 年起, 我国多个地区的养殖罗非鱼连年暴发链球菌病, 其累积死亡率为 30%~80%, 而且 90% 以上的临床菌株是无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)^[2]。无乳链球菌是鱼类重要的病原菌, 可感染多种经济鱼类, 如银鲳(*Pampus argenteus*)、金鲳(*Trachinotus blochii*)、金头鲷(*Sparus auratus*)、胭脂鱼(*Liza klunzingeri*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、齐口裂腹鱼

(*Schizothorax prenanti*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)和宝石鲈(*Scortum barcoo*)等^[3-4], 其中对罗非鱼的危害尤为严重。迄今为止, 世界多个国家和地区养殖的罗非鱼均有感染无乳链球菌的报道, 如中国、泰国、印度尼西亚、美国、巴西、洪都拉斯、哥伦比亚、哥斯达黎加和厄瓜多尔等^[5-11]。由于我国罗非鱼养殖产量大, 因此, 链球菌病的危害也最为严重。我国南方地区罗非鱼主养区每年均有大规模的链球菌病暴发, 造成的经济损失高达数亿元^[12]。

研究表明, 近年来我国罗非鱼源无乳链球菌株型之间发生了遗传变异^[13-14]。血清型研究表明我国流行 3 种分子血清型的无乳链球菌, 其中 I a

收稿日期: 2016-08-15; 修订日期: 2016-09-22.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-49); 广东省鱼病防治专项(2016); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项(201508020046).

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

通信作者: 卢迈新, 研究员. E-mail: mx-lu@163.com

型是主要流行株型^[13]。MLST 分型结果表明主要流行菌株为 ST7 型^[15-16]。PFGE 分型结果表明主要流行菌株的 PFGE 基因型存在多样性^[12]。目前, 无乳链球菌常用的分型方法主要有分子血清型、MLST (multilocus sequence typing)、毒力基因型、PFGE (pulsed-field Gel electrophoresis)、前噬菌体 (prophage) 分型和 MGE (mobile genetic elements) 等^[5, 14, 16-17]。考虑到分子血清型、MLST、毒力基因型和前噬菌体基因型等分型方法的结果便于世界各国不同实验室进行数据的比较分析, 因此, 本研究选用这 4 种分型方法对我国罗非鱼源无乳链球菌进行分子分型分析。选取 2007—2015 年的 248 株罗非鱼源无乳链球菌作为代表菌株, 分析其分子特征及流行规律, 为罗非鱼链球菌病的疫苗研制和综合防治防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌

本实验室收集并保存了来自广东、海南、广西、云南和福建等罗非鱼主养区的无乳链球菌 360 余株, 其中包括广西水产科学研究院惠赠的 7 株, 海南大学惠赠的 4 株。本研究于每口发病池塘中选取 1~2 株, 每个养殖场最多选取 5 株(如大型养殖场), 共计选取 248 株无乳链球菌作为代表菌株进行分子分型研究(其中选取分离自海南、广东、广西、云南和福建的菌株分别为 115 株、116 株、15 株、1 株和 1 株)。所有菌株均分离自患病罗非鱼的肝、肾、脾、脑、眼球或腹水, 并且进行了多次划线培养, 获得单克隆培养物, 然后分别加入终体积分数为 15% 的甘油, 于 -80℃ 冰箱中保存备用。病原菌的鉴定参考文献^[18], 所有病原菌都进行了 16S rRNA 基因测序, 结果表明病原菌的 16S rRNA 基因序列与无乳链球菌 GD201008-001 株的 16S rRNA 基因序列同源性为 99%~100%。此外, 进行了病原菌 *cfb* 基因的特异性 PCR 检测, 结果表明所有菌株均为阳性。

1.2 细菌基因组 DNA 提取

挑取无乳链球菌单克隆接种至液体 BHI (BD 公司) 培养基中, 28℃ 摇床培养过夜, 收集菌体, 用于基因组 DNA 的提取。基因组 DNA 的提取使

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行, 提取的基因组样品经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测和 DNA 浓度测定, 基因组 DNA 电泳条带完整、清晰, DNA 浓度达到 30 ng/μL 以上视为符合本研究要求, 将符合要求的基因组 DNA 保存于 -20℃ 冰箱中备用。

1.3 MLST 分型

多位点序列分型(MLST)是通过 PCR 分别扩增无乳链球菌的 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkl* 等 7 个管家基因, 然后对 PCR 产物分别进行测序, PCR 扩增条件和引物序列参考 Jones 等^[19]的方法。然后, 将这 7 个基因序列与已提交的无乳链球菌相应的等位基因序列进行比对分析, 获得这些等位基因的序列型别, 再根据 7 个等位基因的序列型别查找相应的 ST 序列型号。

1.4 分子血清型检测

首先, 通过多重 PCR 检测初步判定无乳链球菌的分子血清型^[20], 即将 19 条引物按照比例混合, 然后进行多重 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 根据电泳条带确定病原菌的分子血清型。其次, 根据此 PCR 结果并参考 Poyart 等^[21]的方法再次确认, 即 I a 型无乳链球菌的检测引物为: I a-F, 5'-GGTCAGACTGGATTAATGG-TATGC-3', I a-R, 5'-GTAGAAATAGCCTATA-TACGTTGAATGC-3'; I b 型无乳链球菌的检测引物为: I b-F, 5'-TAAACGAGAATGGAATAT-CACAAACC-3'和 I b-R, 5'-GAATTAACCTCAA-TCCCTAAACAATATCG-3'。以无乳链球菌基因组 DNA 作为 PCR 模板, PCR 反应条件参考 Poyart 等^[21]。由于本研究中 I a 型检测使用的是 1 对引物进行 PCR 扩增, 因此, 阳性 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测只会出现 1 条带(521 bp)。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察、拍照, 然后根据 PCR 产物条带大小判定分子血清型。

1.5 毒力基因检测

通过 PCR 扩增检测分离菌株的毒力相关基因, 如 *cspA* (丝氨酸蛋白酶基因)、*bibA* (细菌免疫原性黏附素基因)^[21]、*bac* (βC 蛋白基因)、*bca* (αC 蛋白基因)、*cylE* (β-溶血素/溶细胞素基因)、*iagA*

(侵袭相关基因)、*lmb* (层黏连蛋白结合蛋白基因)、*scpB* (C5a 肽酶基因)^[23]、*cfb* (CAMP 因子基因)、*hylB* (透明质酸酶基因)、*fbsA* (纤维蛋白结合蛋白 A 基因)和 *sip*(表面免疫相关蛋白基因)等(表 1)。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照记录。

1.6 前噬菌体 DNA 检测

研究表明罗非鱼无乳链球菌 GD201008-001 与人源的 A909 菌株在基因组水平上亲缘关系较近^[24], 而且 A909 菌株的基因组 PHAST 在线分析 (<http://phast.wishartlab.com/>)结果表明, A909 菌株的基因组上有 3 个区段含有前噬菌体基因。因此, 本研究根据 A909 基因组上的前噬菌体基因, 选取 10 个具有代表性的前噬菌体基因作为目标检测基因, 设计引物(表 1), 用于无乳链球菌的前噬菌体基因分型。

2 结果与分析

2.1 MLST 分型

MLST 测序结果表明, 229 株无乳链球菌的 7 个等位基因 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkl* 的型别分别是 10、1、2、1、3、2 和 2, 根据等位基因的型别获得的 ST 型号为 7。同样, 19 株无乳链球菌的 7 个等位基因 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkl* 的型别分别是 54、17、31、4、26、25 和 19, 其对应的 ST 型号为 261。

2.2 分子血清型

参考 Imperi 等^[20]的检测方法, 无乳链球菌有两种电泳条带类型, 与文献[20]中的 I a 型和 I b 型图谱相同, 这表明 248 株无乳链球菌为两种分子血清型: I a 型(229 株)和 I b 型(19 株)。参考 Poyart 等^[21]方法的确认结果与上述多重 PCR 方法检测结果一致, 即 229 株 I a 型无乳链球菌的 PCR

表 1 本研究中使用的引物
Tab. 1 The primers used in this study

引物 primer	上游引物序列(5'-3') forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列(5'-3') reverse primer sequence (5'-3')	长度/bp length	退火温度/°C annealing temperature
<i>scpB</i>	CCTGCTAAAACCTGCTGATAC	CATAAGCATAGTCGTAAGCC	853	54
<i>lmb</i>	CCGTCTGTAAATGATGTGGC	GAAATACCCGAGATACCAAG	473	54
<i>hylB</i>	CACCAATCCCCACTCTACTA	TGTGTCAAACCATCTATCAG	570	56
<i>bca</i>	CTACAATTCAGGGAGTGCA	ACTTTCTCCGTCCTTAG	383	53
<i>bac</i>	AAGCAACTAGAAGAGGAAGC	TTCTGCTCTGGTGTGTTTAGG	479	53
<i>cylE</i>	CATTGCGTAGTCACCTCCC	GGGTTCCACAGTTGCTTGA	399	54
<i>fbsA</i>	AGAGCCAAGTAGGTCAACTTATAG	TTCATTGCGTCTCAAACCG	290	54
<i>cfb</i>	AAGCGTGTATTCCAGATTCC	AGACTTCATTGCGTGCCAAC	348	56
<i>iagA</i>	CGGGATTGATCTAAGTCGCT	CCATCAACATCAGTCGCTAA	459	53
<i>bibA</i>	AACCAGAAGCCAAGCCAGCAACC	AGTGGACTTGCGGCTTCACCC	127	58
<i>espA</i>	GGTCGCGATAGAGTTTCTCCGC	AACGCCTGGGGCTGATTGGC	104	58
<i>sip</i>	TCTCTCAATACAATTTCGGAAG	GTGGTCATAGTGGTTGGCAGT	867	54
SAK_0610	TCATTTATCTTCATTCCCCGTC	AGTGAGCTATCTAGAAAAGTTGGC	294	55
SAK_0635	GACTAGGACATCAAATGGAGGTC	GGATAAACAGTCAATAGCCTCAA	577	55
SAK_0748	AAACGTAACGCTGCTTGGGCTCA	GTAGAACGAGTTTCCCATCCAC	1138	56
SAK_0762	CTCTCAATCAAGGGTTACTTCC	TGACACTGGTCTTAAACTTCCGT	303	56
SAK_1326	TTTCCACTTGAATTGAACGCCATCT	GCGGTCACCTATCGGACTGCTC	571	56
SAK_1943	AACTCTGAACGATGCCTCTTA	GCCTAGTAATAGAAGTGATGTGAC	711	55
SAK_2079	TCGTAGTACCAACTTTGACTTCTG	ACTAAAAGAGTTTCATAGATGGCAA	291	56
SAK_2083	AGCCCTTTGTCTTATTTCCACC	AGAGCGCCTACCTTATCCCTG	588	54
SAK_2090	TGTCTTAACTGTTAATGGTTTCAA	CCGATTTGTAGAGCACCAGGCG	261	56
SAK_2094	ACATACCGTAAAATACAATACTCAGC	GCCTATATTCGATACATTTGCTCT	739	56

产物片段大小为 521 bp; 19 株 I b 型无乳链球菌的 PCR 产物大小为 770 bp。

2.3 毒力基因型

毒力基因检测结果表明, 248 株无乳链球菌可分为两种毒力基因型, 其中 229 株 I a 型无乳链球菌的毒力基因型相同, 即 V1: $bac^+ - bca^+ - bibA^+ - cfb^+ - hylB^+ - iagA^+ - fbsB^+ - lmb^- - scpB^- - cyle^+ - sip^+$ 。19 株 I b 型无乳链球菌的毒力基因型相同, 即 V2: $bac^- - bca^- - bibA^+ - cfb^+ - hylB^+ - iagA^+ - fbsB^+ - lmb^- - scpB^- - cyle^- - sip^+$ 。I a 型和 I b 型无乳链球菌有 3 个毒力基因 (bac 、 bca 和 $cyle$) 存在差异, I a 型无乳链球菌的毒力基因阳性率(9/11, 81.8%)高于 I b 型无乳链球菌的阳性率(6/11, 54.5%)。

2.4 前噬菌体 DNA 分型

前噬菌体 DNA 检测结果表明, 248 株无乳链球菌可分为 3 种基因型: P1 (SAK_0748-SAK_0762-SAK_1326-SAK_1943)、P2 (SAK_0748-SAK_0762-SAK_1326-SAK_1943-SAK_2079-SAK_2083-SAK_2090-SAK_2094)和 P3 (表 2)。其中 P1 型的无乳链球菌 36 株; P2 型 193 株; P3 型 19 株。P1 型和 P2 型的无乳链球菌其分子血清型均为 I a 型, 而 P3 型无乳链球菌的分子血清型为 I b 型 (表 2)。

表 2 罗非鱼源无乳链球菌的前噬菌体基因型

Tab. 2 The prophage DNA patterns of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from tilapia

前噬菌体 prophage	分子血清型 I a (数量) molecular serotype I a (number)		分子血清型 I b (数量) molecular serotype I b (number)
	P1 (36)	P2 (193)	P3 (19)
SAK_0610	-	-	-
SAK_0635	-	-	-
SAK_0748	+	+	-
SAK_0762	+	+	-
SAK_1326	+	+	-
SAK_1943	+	+	-
SAK_2079	-	+	-
SAK_2083	-	+	-
SAK_2090	-	+	-
SAK_2094	-	+	-

2.5 无乳链球菌的分子分型统计

由分子血清型结果可知, 248 株无乳链球菌可分为两种分子血清型: I a 和 I b 型。进一步 MLST 分型结果表明, I a 型无乳链球菌都是 ST7 型, 即 I a-ST7 型; I b 型无乳链球菌都是 ST261 型, 即 I b-ST261 型。毒力基因分型的结果表明, I a-ST7 型无乳链球菌的毒力基因型为 V1 型, 即 I a-ST7-V1 型; I b-ST261 型无乳链球菌的毒力基因型为 V2 型, 即 I b-ST261-V2 型。再根据前噬菌体的分型结果可知, I a-ST7-V1 型无乳链球菌可分为 I a-ST7-V1-P1 型(36 株)和 I a-ST7-V1-P2 型(193 株), 而 I b-ST261-V2 型无乳链球菌为 I b-ST261-V2-P3 型(19 株)。研究表明, 2010 年和 2011 年是无乳链球菌流行株出现分化的重要时间点, 即 I a-ST7-V1-P1 型无乳链球菌主要在 2011 年之前流行(57.1%~100%), 2011 年之后, 该型菌株的比例显著降低(0~9.1%), 处于较低水平流行。到 2011 年, I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌成为主要流行株(70.4%), 而且 2012—2015 年, I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌占有绝对的主导优势(86.2%~100%) (表 3)。2010—2015 年, I b-ST261-V2-P3 型无乳链球菌属于小规模流行, 而且本研究中的分子分型结果表明, 该型菌株尚未出现明显的遗传变异。

3 讨论

3.1 分子血清型和 MSLT 分型分析

迄今, 已报道的鱼类无乳链球菌有 3 种血清型, 分别是 I a、I b 和 III 型^[25]。本研究结果显示, 248 株罗非鱼源无乳链球菌中有 229 株的分子血清型为 I a 型(92.3%), 其余 19 株均为 I b 型(7.7%), 尚未发现 III 型无乳链球菌, 这可能是由于 III 型无乳链球菌的流行时间短、范围小, 亦或是本研究中选取的菌株数量不够多。相似的研究结果表明, 我国 I a 型无乳链球菌长期广泛流行, 主要在广东、广西、海南、福建和云南等地区; 而 I b 型无乳链球菌主要在局部地区流行, 如广东、广西和海南等部分地区; III 型无乳链球菌的流行时间短(2012 年)、范围小, 如广西局部地区^[5, 13-14]。目前, 罗非鱼源 I a 型无乳链球菌在世界范围广

表 3 2007—2015 年不同株型罗非鱼无乳链球菌的数量及比例

Tab. 3 The number and proportion of tilapia *Streptococcus agalactiae* strains in different molecular types from 2007 to 2015

株型 type	年份 year									合计(比例) total (ratio)
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
I a-ST7-V1-P1	1	1	9	12	8		1	4		36 (36/229, 14.5%)
I a-ST7-V1-P2				8	19	13	10	50	93	193 (193/248, 77.8%)
I b-ST261-V1-P3				1				4	14	19 (19/248, 7.7%)
合计 total	1	1	9	21	27	13	11	58	107	248

泛流行, 包括中国、泰国、越南、美国和巴西等国家^[6, 22, 26-27]。同样, 罗非鱼源 I b 型无乳链球菌在中国、洪都拉斯^[28]、厄瓜多尔^[8]、比利时^[10, 26]、巴西^[29]、哥伦比亚^[9]、哥斯达黎加^[10]等国家均有流行记录。罗非鱼源 III 型无乳链球菌在泰国、越南也有发现^[10, 27, 30]; 在泰国, 目前已报道的主要流行菌株是 I a 型, 其次是 III 型^[25]。

MLST 分型结果表明, 我国所有 I a 型罗非鱼源无乳链球菌都是 ST7 型, 而所有 I b 型无乳链球菌都是 ST261 型。同样, I a-ST7 型无乳链球菌在泰国的养殖罗非鱼中也是流行菌株, I b-ST261 型无乳链球菌在比利时养殖罗非鱼中也有发现, ST261 型无乳链球菌在印度尼西亚的罗非鱼非常流行^[10-11]。而且, 与 I b-ST261 型无乳链球菌亲缘关系相近的 I b-ST260 型菌株在洪都拉斯、哥伦比亚和哥斯达黎加等国家的罗非鱼中流行^[10]。据报道, 在泰国养殖的罗非鱼中还发现了其他 ST 类型, 如 ST500、ST283 型无乳链球菌; 在越南养殖的罗非鱼中发现了 ST491 型无乳链球菌^[10]。综上可知, 我国主要流行的罗非鱼源无乳链球菌在其他国家和地区也同样流行, 这似乎表明 I a-ST7 型和 I b-ST261/ST260 型无乳链球菌在世界范围内都是罗非鱼易感株型, 这或许是因为该株型无乳链球菌更适应其宿主罗非鱼及其养殖环境。我国尚未发现如 ST260、ST491、ST500 和 ST283 型罗非鱼源无乳链球菌, 这表明当前我国罗非鱼源无乳链球菌的分子遗传多样性尚处于较低水平。

3.2 毒力基因特征分析

罗非鱼源无乳链球菌毒力基因检测结果表明, I a 型无乳链球菌的毒力基因携带率(81.8%)高于 I b 型无乳链球菌的携带率(54.5%)。所有 I a 型

无乳链球菌的毒力基因型都相同, 11 个毒力基因中仅有 *ScpB* 和 *lmb* 基因为阴性。此外, 由于本实验室菌株保存和使用等原因, 极少数 *scpB* 阳性菌株未成功活化, 因此本研究中未使用这些菌株^[31]。值得注意的是, 这一结果与泰国学者的研究结果相似, 即 95% 的罗非鱼源和环境源无乳链球菌不携带 *ScpB* 和 *lmb* 基因, 其中 33 株罗非鱼源无乳链球菌中仅有 1 株的 *ScpB* 和 *lmb* 基因为阳性^[22]。基因组测序分析结果表明与人源、牛源无乳链球菌不同, 罗非鱼源 I a 型无乳链球菌的基因组中没有 *ScpB* 和 *lmb* 基因序列^[7, 24]。将 *ScpB* 和 *lmb* 基因序列与目前已公布的罗非鱼源基因组序列(HN016 株、GD201008-001 株、GX026 株、GX064 株和 ZQ2010 株)进行比对分析, 结果也未发现有与 *ScpB* 和 *lmb* 基因相似的序列。然而, 研究表明我国罗非鱼源无乳链球菌 *ScpB* 基因阳性率为 32.99%^[32], 甚至更高(68.24%)^[15]; 同时还发现这些菌株的 *cfb* 基因阳性率仅有 67.81%, 甚至更低(60.59%), 然而 *cfb* 基因是鉴定无乳链球菌时的特异基因。因此, 对于这一结果, 仍需要进一步研究。本研究中 I a 型和 I b 型无乳链球菌的毒力基因型都比较单一, 原因可能是本研究中选取的毒力基因数量有限, 仅仅通过这些毒力基因不能满足进一步分型的需要; 也可能是因为我国罗非鱼源无乳链球菌的分子遗传多样性本身较低, 即 92.3% 的流行菌株是 I a-ST7 型, 其余的菌株都是 I b-ST261 型, 相同株型无乳链球菌的毒力基因尚未发生显著变化。与此不同的是, 人源和牛源无乳链球菌的分子血清型和 ST 型都十分丰富^[33-35], 这也可能是其毒力基因型比较丰富的原因之一^[36-37]。

此外, 研究表明 I b (ST261) 无乳链球菌不携带 *bac*、*bca* 和 *cylE* 这 3 个基因, 而且 I b 型(ST260)

无乳链球菌的 *cyIE* 基因存在缺失突变, 是不完整的^[28]。然而, I b 型无乳链球菌对罗非鱼是强致病性的, 甚至强于 I a 型无乳链球菌^[28, 38]。这表明 *bac*、*bca* 和 *cyIE* 毒力基因可能不是无乳链球菌致病相关的必需毒力基因, 这也暗示着 I a 型和 I b 无乳链球菌可能存在不同的致病机制^[39]。

3.3 前噬菌体基因分型分析

研究发现前噬菌体基因约占无乳链球菌菌株特异基因的 10%, 并且不同株系无乳链球菌前噬菌体具有丰富的遗传多样性^[40]。无乳链球菌的前噬菌体分型结果表明, I a 型无乳链球菌可分为两种前噬菌体基因型, 即 P1 型和 P2 型; I b 型无乳链球菌不存在所检测的 10 个前噬菌体基因, 为 P3 型, 这表明前噬菌体分型灵敏度高于分子血清型、MLST 和毒力基因型。同时, 也表明前噬菌体分型可作为罗非鱼源无乳链球菌的一种分子分型方法。P1 型和 P2 型无乳链球菌含有前噬菌体基因的数量不同, P2 型无乳链球菌拥有更多的前噬菌体基因, 但是目前尚不清楚这种差异有何种具体的生物学功能。

3.4 流行趋势分析

我国罗非鱼源无乳链球菌的分子分型结果表明, 2007—2015 年主要流行菌株有 3 种基因型, 即 I a-ST7-V1-P1 型、I a-ST7-V1-P2 型和 I b-ST261-V2-P3 型。I a-ST7 型是最主要的流行菌株, 该型菌株比例通常可达到当年菌株总数的 86.9%~100%; 而 I b-ST261 型菌株在局部地区流行, 该型菌株最流行时仅为当年菌株总数的 13.1% (2015 年)。值得注意的是, I a-ST7-V1-P1 型和 I a-ST7-V1-P2 型菌株在 2010 年和 2011 年两年间出现了大的转变, 即 2007—2009 年, 仅发现 I a-ST7-V1-P1 型菌株, 2010 年该菌株为当年菌株总数的 57.1%。然而, 2011 年该菌株的比例迅速下降, 仅为 29.6%, 此后, 该菌株的比例均未超过当年流行菌株总数的 10%, 取而代之的是 I a-ST7-V1-P2 型菌株。I a-ST7-V1-P2 型菌株从 2010 年开始流行, 其比例从当年的 38.1% 上升到 2011 年的 70.4%, 此后每年的比例均不低于 86.2%。已有研究表明, 无乳链球菌可以随着苗种或水体传播到新的罗非鱼养殖场^[41], 如果罗非鱼苗种(或水

体)携带无乳链球菌^[41-43], 无乳链球菌新的株型会随着罗非鱼苗种(或水体)短时间内被大规模引入至新的养殖环境, 进而造成罗非鱼链球菌病在不同地区同时暴发。考虑到我国不同地区放养的罗非鱼苗有春苗或秋苗, 因此, 新的株型也将会在当年或翌年被分离到, 即新株型的发现会有滞后现象。这种现象符合本研究结果, 即 2010 年出现 I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌时其比例较低 (38.1%), 到 2011 年达到 70.4%, 之后更是高于 86.2%。这一过程中为何 I a-ST7-V1-P1 型无乳链球菌不再流行? 推测原因可能是该型菌株的环境适应能力、入侵宿主能力或者致病能力等弱于后者 I a-ST7-V1-P2 型菌株; 随着时间推移, 该型菌株逐渐被取代。综合以上结果和分析, 推测我国罗非鱼源无乳链球菌可能存在输入性的传播方式, 即某地区罗非鱼养殖场中本来不存在 I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌, 在某一段时间, I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌随着种苗或者水体等介质被引入至该养殖场, 导致该型菌株在此养殖场的传播与扩散。基于此, 可以解释为何有相同水源的同一养殖场, 由于 2014 年和 2015 年的罗非鱼苗种来源不同, 结果是 2014 年的患病罗非鱼流行 I b-ST261 型无乳链球菌, 到 2015 年却同时流行 I b-ST261 型(2014 年的苗种, 为大罗非鱼)和 I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌(2015 年的苗种, 为小罗非鱼)。如果是罗非鱼在养殖过程中感染自然水体中的无乳链球菌, 那么 I a-ST7-V1-P1 型和 I a-ST7-V1-P2 型无乳链球菌之间的转变将是一个缓慢的过程, 即 2010 年和 2011 年, 在我国罗非鱼主养区将不会出现这两种株型的快速转变, 因为人为造成的环境选择压力短时间内难以在不同区域促使这种株型的突然转变。例如, 在哥伦比亚, 相同株型的罗非鱼源无乳链球菌(I b-ST260 型)在当地的流行时间可长达 8 年之久^[9], 这可能是因为该地区这些年尚无新的无乳链球菌株型输入。

本研究通过对我国罗非鱼链球菌病多年的跟踪、调查以及分子分型, 结果表明, 我国罗非鱼链球菌病的病原是无乳链球菌, 其主要流行菌株是 I a-ST7 型, 其中 I a-ST7-V1-P2 型是当前主要流行菌株。分子流行病学分析结果表明, 我国罗

非鱼源无乳链球菌在 2010 年和 2011 年两年间出现明显的遗传变异, 但是我国罗非鱼无乳链球菌的分子遗传多样性尚处于较低水平, 并推测我国罗非鱼源无乳链球菌的传播方式主要是输入性传播。本研究也提示, 对于罗非鱼链球菌病的防控应该更加重视苗种或相关水源是否携带病原菌, 做好罗非鱼苗种质量安全对于罗非鱼链球菌病的防控至关重要。

参考文献:

- [1] Fishery Administration Bureau, Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015. [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.]
- [2] Li L P, Wang R, Liang W W, et al. Biological characteristics and immunization of live attenuated *Streptococcus agalactiae* strain for tilapia with parent[J]. Southeast China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(5): 2316–2322. [李莉萍, 王瑞, 梁万文, 等. 罗非鱼无乳链球菌弱毒株与其母源株部分生物学特性及免疫原性比较研究[J]. 西南农业学报. 2015, 28(5): 2316–2322.]
- [3] Zamri-Saad M, Amal M N A, Siti-Zahrah A, et al. Control and prevention of streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a review[J]. Pertanika J Trop Agric Sci. 2014, 37(4): 389–410.
- [4] Huang M Z, Li J, Pan Z C, et al. Isolation identification and drug susceptibility analysis of *Streptococcus agalactiae* in scortum barcoo[J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41(10): 247–251. [黄木珍, 黎炯, 潘忠超, 等. 宝石鲈无乳链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医. 2014, 41(10): 247–251.]
- [5] Zhang D F, Li A H, Guo Y J, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China[J]. Aquaculture. 2013, 412–413: 64–69.
- [6] 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.
- [7] Kayansamruaj P, Pirarat N, Kondo H, et al. Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains[J]. Infect Genet Evol, 2015, 36: 307–314.
- [8] Soto E, Wang R, Wiles J, et al. Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf Coast, Latin America, and Thailand[J]. J Aquat Anim Health, 2015, 27(2): 123–134.
- [9] Barato P, Martins E R, Melo-Cristino J, et al. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years[J]. J Fish Dis, 2015, 38(12): 1083–1087.
- [10] Delannoy C M, Crumlish M, Fontaine M C, et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 41.
- [11] Lusastuti A M, Textor M, Seeger H, et al. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia[J]. Aquac Res, 2014, 45(7): 1260–1263.
- [12] Li L P, Wang R, Huang T, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of *Streptococcus* clinical isolates from tilapia in Guangxi[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 927–935. [李莉萍, 王瑞, 黄婷, 等. 广西罗非鱼链球菌病流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 927–935.]
- [13] Li L P, Wang R, Huang T, et al. Serotype of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in China from 2007 to 2012[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 9(5): 469–475. [李莉萍, 王瑞, 黄婷, 等. 2007–2012 年中国罗非鱼无乳链球菌流行菌株血清型分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 9(5): 469–475.]
- [14] Li L P, Wang R, Liang W W, et al. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. Vet Microbiol, 2013, 167(3–4): 719–724.
- [15] Fang W, Liang Y H, Ning D, et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* in tilapia in Guangdong[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016, 55(2): 97–101. [方伟, 梁宇恒, 宁丹, 等. 广东地区感染养殖罗非鱼的无乳链球菌分子分型研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2016, 55(2): 97–101.]
- [16] 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.]
- [17] Kong F, Martin D, James G, et al. Towards a genotyping system for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus): use of mobile genetic elements in Australasian invasive isolates[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 4): 337–344.
- [18] Lu M X, Li J, Ye X, et al. Identification and characteriza-

- tions of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hianan provinces[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 766–774. [卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766–774.]
- [19] 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.
- [20] Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*[J]. J Microbiol Meth, 2010, 80(2): 212–214.
- [21] Poyart C, Tazi A, Reglier-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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Liu G J, Zhang W, Lu C P. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909[J]. BMC Genom, 2013, 14: 775.
- [25] Dangwetngam M, Suanyuk N, Kong F, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from infected cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand: Nine-year perspective[J]. J Microbiol Meth, 2016, 65: 247–254.
- [26] Delannoy C M J. Host adaptation of aquatic *Streptococcus agalactiae*[D]. Scotland: University of Stirling, 2013.
- [27] Areechon N, Kannika K, Hirono I, et al. Draft Genome sequences of *Streptococcus agalactiae* serotype I a and III isolates from tilapia farms in Thailand[J]. Genom Announc, 2016, 4(2): e00122–16.
- [28] Delannoy C M J, Zadoks R N, Crumlish M, et al. Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish[J]. J Fish Dis, 2016, 39(1): 13–29.
- [29] de Pádua Pereira U, dos Santos A R, Hassan S S, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks[J]. Stand Genom Sci, 2013, 8(2): 188–197.
- [30] Suanyuk N, Kong F, Ko D, et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates?[J]. Aquaculture, 2008, 284: 35–40.
- [31] Li Q Y, Ke X L, Lu M X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of C5a peptidase (ScpB) of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 169–179. [李庆勇, 可小丽, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶(ScpB)的原核表达及其免疫原性[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 169–179.]
- [32] Sun J, Fang W, Ke B, et al. Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26319.
- [33] Sadeh M, Firouzi R, Derakhshandeh A, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from pregnant and non-pregnant women at Yazd University hospital, Iran[J]. Jundishapur J Microb, 2016, 9(2): e30412.
- [34] Wang P, Tong J J, Ma X H, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China[J]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0120035.
- [35] Wang Y H, Lu C C, Chiu C H, et al. Genetically diverse serotypes III and VI substitute major clonal disseminated serotypes I b and V as prevalent serotypes of *Streptococcus agalactiae* from 2007 to 2012[J]. J Microbiol Immunol, 2015, 49(5): 672–678.
- [36] Dutra V G, Alves V M, Olendzki A N, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 323.
- [37] Beigverdi R, Jabalameli F, Mirsalehian A, et al. Virulence factors, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2014, 61(4): 425–434.
- [38] Zhang D F, Liu L H, Ren Y, et al. Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 22(5): 1044–1054. [张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1044–1054.]
- [39] 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.
- [40] Salloum M, van der Mee-Marquet N, Valentin-Domelier A S, et al. Diversity of prophage DNA regions of *Streptococcus*

- agalactiae* clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease[J]. PLoS ONE, 2011, 6(5): e20256.
- [41] Amal M N, Zamri-Saad M, Siti-Zahrah A, et al. Transmission of *Streptococcus agalactiae* from a hatchery into a newly established red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) x *Oreochromis mossambicus* (Peters), farm[J]. J Fish Dis, 2013, 36(8): 735–739.
- [42] Pradeep P J, Suebsing R, Sirthammajak S, et al. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.)[J]. Aquac Rep, 2016, 3: 58–66.
- [43] Iregui C A, Comas J, Vasquez G M, et al. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp.[J]. J Fish Dis, 2016, 39(2): 205–215.

Molecular characteristics and transmission of *Streptococcus agalactiae* in a major tilapia culturing area of China

ZHANG Defeng¹, YUAN Wei^{1,2}, KE Xiaoli¹, LIU Zhigang¹, CAO Jianmeng¹, LU Maixin¹, WANG Miao¹, YI Mengmeng¹

1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Streptococcosis in cultured tilapia (*Oreochromis* spp.) caused by *Streptococcus agalactiae* has increased during the past decade in China. In this study, a total of 248 *S. agalactiae* strains were isolated from diseased tilapia, collected in the major tilapia-culturing area of China, during 2007–2015. The aim of the study was to analyze the characteristics of the 248 tilapia *S. agalactiae* strains. In molecular characterization assays, four genotypic categories comprised of molecular serotype, multilocus sequence typing (MLST), virulence genes profiling patterns and prophage genotype, were used to analyze the genotypic diversity of these *S. agalactiae* strains. The results showed that 229 of the 248 *S. agalactiae* strains were of molecular serotype Ia, and the remaining 19 were of type Ib. MLST revealed that all the serotype Ia strains were ST7, and all the serotype Ib strains were ST261. The results of virulence genes detection indicated that the 229 Ia-ST7 *S. agalactiae* strains have the same genotype of virulence genes (V1), which carried 9 virulence genes (9/11: 81.8%), except that *scpB* and *lmb* virulence genes were negative for them. The 19 Ib-ST261 *S. agalactiae* strains have the same genotype of virulence genes (V2), which possessed 6 virulence genes (6/11: 54.5%) detected by PCR. Prophage detection suggested that the 229 Ia-ST7 *S. agalactiae* strains could be divided into two genotypes: type P1 (36 strains) and P2 (193 strains). All the Ib-ST261 strains were negative for 10 prophage genes, and they belonged to type P3. According to the four molecular typing methods, all 248 *S. agalactiae* strains could be divided into three genotypes: namely, Ia-ST7-V1-P1, Ia-ST7-V1-P2, and Ib-ST261-V2-P3. Notably, the predominant strains of *S. agalactiae* in China had shifted from type Ia-ST7-V1-P1 to type Ia-ST7-V1-P2 during 2010–2011. In addition, the type Ia-ST7-V1-P1 strain was predominant before 2011, and the type Ia-ST7-V1-P2 strain predominated thereafter. In conclusion, the *S. agalactiae* strains collected from tilapia in China showed low genetic diversity. Through analyses of the characteristics of the *S. agalactiae* strains isolated from deceased tilapia in the major tilapia-culturing area of China, we can deduce that the transmission of *S. agalactiae* relies on the import of either new tilapia stock or culture water.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; molecular serotype; multilocus sequence typing; virulence gene; prophage

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com