

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16007

黄河裸裂尻鱼无乳链球菌的分离鉴定与多位点序列分型

张雨薇, 耿毅, 余泽辉, 汪开毓, 李亚军, 牟维豪, 曾毅仁, 叶梦婷

四川农业大学 动物医学院, 四川 温江 611130

摘要: 2015年10月四川省雅安市某养殖场的黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi* Kessler)暴发传染病, 临床表现为神经症状, 眼球、下颌和鳃盖等出血或无明显临床表现而突然死亡, 内脏涂片见革兰氏阳性球菌。从病鱼的肝、脾和肾组织中分离到2株病原菌(ZYW151011, ZYW151012), 通过人工感染、无乳链球菌种属特异性 *cfb* 基因(GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor)的PCR检测和16S rRNA基因序列分析等方法对病原菌进行鉴定, 发现2株病原菌均为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。2株病原菌16S rRNA序列(GenBank 登录号: KU308396 和 KU308397)与GenBank中无乳链球菌16S rRNA序列同源性达99.8%。药敏试验结果表明, 2株病原菌对头孢类和喹诺酮类药物敏感, 而对强力霉素、氟苯尼考和阿莫西林等耐药。进一步通过荚膜多糖血清分型和多位点序列分型技术对病原菌进行分子特征分析, 结果表明2株病原菌荚膜多糖血清型均为致病性Ia型; 2株病原菌多位点序列分型均被鉴定为新的序列型ZST-1, 与序列型为ST-261的亲缘关系最近, 此新型ZST-1在*glnA*位点发生变异, 提交序列到MLST数据库获得新的等位基因编号81(登录ID: BIGSdb_20151110_081850_13025_35759)。

关键词: 黄河裸裂尻鱼; 无乳链球菌; 分离鉴定; 荚膜多糖血清分型; 多位点序列分型

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1217-08

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)也称为B群链球菌(Group B Streptococcus, GBS), 自Robinson等^[1]于1966年从金色美鲮(*Notemigonus crysoleucas*)体内首次分离到无乳链球菌后, 便逐渐有GBS可感染罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[2]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[3]、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)^[4]和海豚(*Tursiops truncatus*)^[5]等多种水生动物的报道。目前, GBS感染黄河裸裂尻鱼引起死亡在我国还未见报道。

黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi* Kessler)分布于高原地区黄河上游干支流和湖泊及柴达木水系, 是一种特色高原经济鱼类。该鱼不仅具有经济价值同时还具有很高的药用价值。黄河裸裂尻鱼具有性成熟迟及繁殖力低等生物学特性, 加上受栖息地的破坏、外来物种的引入和疾病等

因素的影响, 导致种群数量锐减, 栖息水域明显萎缩^[6]。近年来, 黄河裸裂尻鱼的人工养殖对该物种利用与保护起到了重要的作用, 但2015年10月在四川某黄河裸裂尻鱼养殖场暴发了一种细菌性疾病, 其发病水温均低于26℃, 多数患病的黄河裸裂尻鱼表现出典型的链球菌病症状。通过对患病鱼症状观察, 16S rRNA基因序列分析及无乳链球菌CAMP因子*cfb*基因扩增进行病原菌的鉴定、荚膜多糖血清分型和多位点序列分型研究, 发现养殖场的黄河裸裂尻鱼感染了一种Ia-ZST-1型的无乳链球菌, 这是我国首次报道该种新序列型的无乳链球菌, 也说明我国无乳链球菌的序列型呈多样化趋势。本研究从自然感染的黄河裸裂尻鱼中进行病原菌的分离鉴定, 同时进行了药物敏感性检测、病原菌荚膜多糖血清分型及多位点序

收稿日期: 2016-01-06; 修订日期: 2016-03-06.

基金项目: 四川省水产科技支撑计划项目(2014NZ0003).

作者简介: 张雨薇(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物病原学与分子生物学. E-mail: 463714019@qq.com

通信作者: 耿毅(1974-), 教授, 主要从事动物病原学与病理学研究. E-mail: gengyisicau@126.com

列分型研究,旨在为该病的防治与分子流行病学研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 病料来源和主要试剂

病鱼采自四川省雅安市汉源县某黄河裸裂尻鱼养殖场,全长为 18.0~22.6 cm;无乳链球菌(*S. agalactiae*)标准菌株 ATCC51487(美国菌种保藏中心);脑心浸液培养基(BHI)(北京欣经科生物技术有限公司);细菌 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);药敏试纸(杭州天和微生物试剂有限公司);细菌生化微量鉴定管(杭州微生物试剂有限公司);DNA Marker 和蛋白酶 K(大连 TaKaRa 公司)。

1.2 镜检及细菌分离纯化

取病鱼鳃丝、消化道内含物、体表附着物或黏液等于载玻片上,进行寄生虫压片镜检;取肝、脾、肾等组织于载玻片上涂片,革兰氏染色后油镜检查细菌;无菌条件取病鱼肝、脾、肾划线接种于 BHI 平板,28℃ 恒温培养 48 h,挑取圆形、灰白色、形态大小一致的可疑菌落于 BHI 平板做纯培养后,获得纯培养菌株,-80℃ 保存备用。

1.3 黄河裸裂尻鱼致病性试验

取-80℃ 保存的纯化分离株 ZYW151011 和 ZYW151012 在 BHI 固体培养基上 28℃ 恒温培养 48 h 后,用 0.8% 无菌生理盐水洗下,采用麦氏比浊法测定菌液浓度后稀释至 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 CFU/mL。健康黄河裸裂尻鱼(体长 17.6~25.2 cm)26℃ 暂养 7 d 后,按 10 尾/组,0.2 mL/尾腹腔注射。对照组注射等量的生理盐水。接种后每天观察记录黄河裸裂尻鱼的临床症状和死亡情况,发现有濒死状态的试验鱼,剖解观察器官病变情况,取病鱼的肝、脾和肾进行病原菌的再次分离纯化,鉴定细菌。

1.4 生化及药敏试验

无菌挑取上述纯培养菌于微量生化反应管,28℃ 培养 48 h,根据《常见细菌系统鉴定手册》^[7]对菌株进行生理生化鉴定。采用标准 Kirby-Bauer 纸片扩散法对已分离菌进行以下 10 种常用抗生

素药物的敏感性检测:阿莫西林、氧氟沙星、环丙沙星、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、强力霉素、头孢西丁、头孢曲松、氟苯尼考。具体为无菌条件下将 2 分离株挑入 MH 肉汤中,28℃ 培养 48 h 后将菌液浓度调至 1.0×10^7 CFU/mL,吸取菌液 500 μ L 均匀涂布于 MH 平板上,并将该平板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后,用游标卡尺测量纸片周围的抑菌圈直径,重复 3 次后取平均值。根据 CLSI 标准^[8]判定药敏试验结果,同时以大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株。

1.5 16S rRNA 基因测序及分析

用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA,DNA 溶于 TE 缓冲液中 4℃ 保存,作为备用模板。采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物(F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3')^[9]PCR 扩增 16S rRNA 基因,预期扩增片段大小约为 1500 bp。PCR 反应体系:PCR Master Mix(2 \times)12.5 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L,2 μ L 模板 DNA,加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环;最后,72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后,送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。测序结果用 NCBI-BLAST 进行同源性分析,用 MEGA5.02 构建系统发育树。

1.6 基于无乳链球菌 *cfb* 基因的 PCR 检测

根据文献^[10]中 *cfb* 基因的引物进行 PCR 扩增(F: 5'-AAGTACATGCTGATCAAGT-3'; R: 5'-TCTTGATCAACTTGTGTAC-3'),引物序列送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行合成,预期扩增片段大小为 600 bp。PCR 反应体系:PCR Master Mix(2 \times)12.5 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L,2 μ L 模板 DNA,加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序为:94℃ 5 min,94℃ 1 min,48℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 5 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察目的片段大小。

1.7 荚膜多糖血清分型

采用文献^[11]建立的多重 PCR 方法鉴别 2 个

分离株的荚膜多糖血清型。25 μL PCR 反应体系为: PCR Master Mix(2 \times)12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 cpsG 上下游引物各 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 cpsL 上下游引物各 1 μL , 2 μL 模板 DNA, 7.5 μL 的 ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性; 随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 15 个循环; 接着 95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。根据扩增出的条带长度确定菌株的荚膜多糖血清型。

1.8 多位点序列分型(MLST)

1.8.1 管家基因扩增与测序 根据 Jones 等^[12]的方法, 选取 7 个管家基因(*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* 及 *tkl*) 进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1, 由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: PCR Master Mix(2 \times)12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 1 μL , 2 μL 模板 DNA, 8.5 μL 的 ddH₂O。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 min, 共 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.8.2 ST 型确定与种系进化树绘制 将测序成功的管家基因序列提交至 MLST 数据库网站([http://](http://pubmlst.org/)

pubmlst.org/)BLAST 比对, 确定其等位基因编号, 7 个等位基因编号按顺序排列起来获得等位基因谱, 提交菌株的等位基因谱到 MLST 网站即可获得菌株的序列型(sequence types, STs)。用 Clustal 1.83 将菌株的 7 个管家基因的片段拼接后, 结果用 MEGA5.02 做 Neighbor- Joining 种系进化分析。

2 结果与分析

2.1 解剖和临床症状及病原菌培养特性

病鱼表现为食欲下降或丧失, 间歇性狂游或旋转游动, 眼球、鳃盖及鳍条明显充血、出血(图 1A); 腹腔内肝、肾、脾肿大, 脂肪组织充血, 出血; 肠壁变薄, 肠腔内无食物并充满淡黄色的液体(图 1B); 脑充血、出血(图 1C); 内脏压片镜检未观察到寄生虫; 内脏器官涂片, 革兰氏染色镜检见组织内有成对排列或链状的革兰氏阳性球菌(图 1D)。2 分离株在 BHI 平板上的菌落形态均为表面光滑湿润、针尖大小、边缘整齐的灰白色圆形小菌落, 两分离株在普通平板上均生长不良; 镜检可见分离株经革兰氏染色均为革兰氏阳性菌, 均为球形或卵圆形, 单个、成双或链状排列。

2.2 黄河裸裂尻鱼致病性试验

试验组黄河裸裂尻鱼攻毒后 48 h 开始表现为游动不正常, 呈旋转式游泳, 身体呈 C 行弯曲, 注射菌液 1.0×10^8 CFU/mL 浓度组 48 h 后即出现无任何明显症状的突然死亡, 72 h 后可见眼眶周围和眼球出血、鳃盖内侧充血或出血等症状, 死亡率高达 100%。注射菌液 1.0×10^7 CFU/mL 浓度组在第 3 天出现死亡, 死亡率为 70%。注射菌液 1.0×10^6 CFU/mL 浓度组在第 5 天出现死亡和类似症状, 死亡率为 20%。攻毒发病鱼表现出与自然感染发病鱼相似的症状, 而空白对照组鱼不表现任何症状。对濒死试验鱼进行病原菌的重新分离鉴定, 获得与 2 株形态与生化特性一致的细菌, PCR 检测为无乳链球菌。

2.3 病原菌的生化特性及药敏结果

2 分离菌株的生理生化特性与无乳链球菌(*S. agalactiae*) ATCC51487 一致, 为兼性厌氧菌, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 或 PH 9.6 时均不能生长, 可水解精氨酸、马脲

表 1 无乳链球菌管家基因位点的相关试验参数
Tab. 1 The relevant experimental parameters of the housekeeping gene loci of *Streptococcus agalactiae*

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	PCR 片段长度/bp fragment length of PCR
adhP	F-GGTGTGTGCCATACTGATTT	498
	R-ACAGCAGTCACAACCACTCC	
pheS	F-ATATCAACTCAAGAAAAGCT	501
	R-TGATGGAATTGAATGGCTATG	
atr	F-CGATTCTCTCAGGCTTTGTTA	501
	R-AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	
glnA	F-AATAAAGCAATGTTTGATGG	498
	R-GCATTGTTCCCTTCATTATC	
sdhA	F-AACATAGCAGAGCTCATGAT	519
	R-GGGACTTCAACTAAACCTGC	
glcK	F-GGTATCTTGACGCTTGAGGG	459
	R-ATCGTGCTTTAATGGCAGA	
tkl	F-ACACTCATGGTATGTTG	480
	R-TGACCTAGGTCATGAGCTTT	

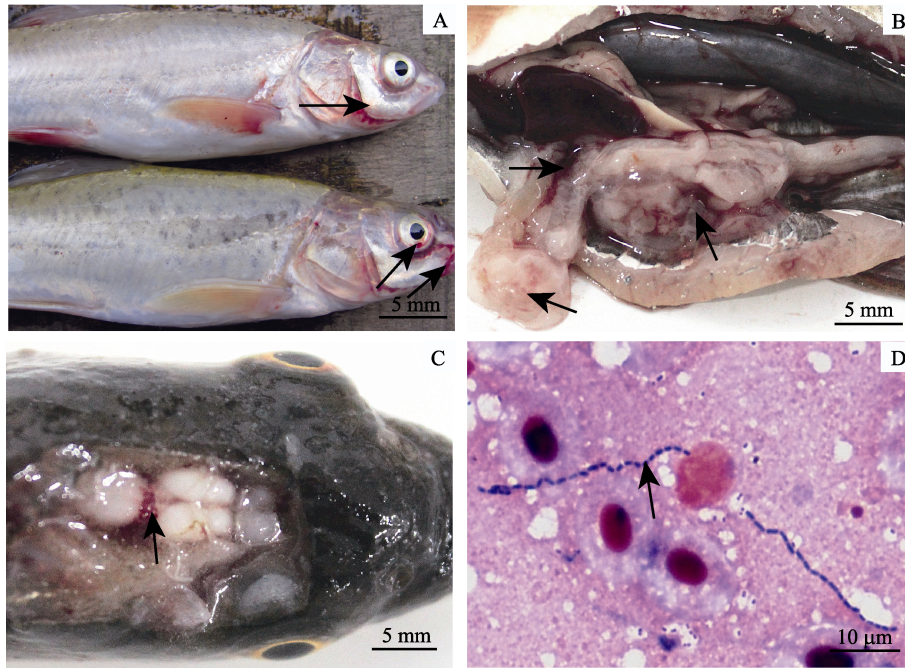


图 1 病鱼临床特征

A. 眼球、鳃盖、下颌明显充血、出血; B. 肝、脾及脂肪组织充血、出血, 伴肠炎;
C. 脑充血、出血; D. 内脏涂片见链状 G⁺细菌.

Fig. 1 Clinical signs of moribund fishes

A. Marked eyeball, operculum and jaw hyperemia and hemorrhage; B. Liver, spleen and adipose tissue hyperemia and hemorrhage accompanied by enteritis; C. Brain hyperemia and hemorrhage;
D. Chains of gram-positive bacteria appeared in visceral smear.

酸, 产生碱性磷酸酶, V-P 反应, 核糖产酸为阳性; 水解七叶苷, 产生 α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶, 葡萄糖、甘露醇、山梨醇产酸阴性。药敏试验结果显示 2 分离株对头孢曲松、头孢西丁、恩诺沙星、氧氟沙星和环丙沙星等抗生素敏感, 对强力霉素、氟苯尼考、氯霉素、阿莫西林和红霉素耐药(表 2)。

表 2 2 分离株的药物敏感试验结果
Tab. 2 The antibiotic sensitivity of 2 isolates

药物 antibiotic	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition	敏感度 sensitivity
阿莫西林 amoxicillin	0	R
恩诺沙星 enrofloxacin	36	S
强力霉素 doxycycline	0	R
氟苯尼考 florfenicol	0	R
环丙沙星 ciprofloxacin	24	S
头孢西丁 cefoxitin	19	S
头孢曲松 ceftriaxone	25	S
红霉素 erythromycin	0	R
氯霉素 chloramphenicol	0	R
氧氟沙星 ofloxacin	28	S

注: S 表示敏感; R 表示抗性。
Note: S-Sensitive; R-Resistant.

2.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

采用 16S rRNA 通用引物扩增得到的基因片段大小约为 1500 bp, 与预期相符。测序获得的序列(GenBank 登录号: KU308396 和 KU308397)与 GenBank 上已收录的相关性较高的 16S rRNA 序列比对结果表明, 它们与无乳链球菌(*S. agalactiae*) 同源性最高, 为 99.8%。利用 MEGA 5.02 软件构建 16S rRNA 序列的系统发育树(图 2), 结果表明本研究中 2 个黄河裸裂尻鱼分离株均与无乳链球菌聚为一簇。

2.5 基于无乳链球菌 *cfb* 基因的 PCR 检测

2 分离株经 PCR 扩增, 在约 600 bp 左右出现清晰的条带, 和无乳链球菌 ATCC51487 标准株的目的条带大小一致(图 3), 与预期相符。结合形态学和生化鉴定, 16S rRNA 基因序列分析及无乳链球菌 *cfb* 基因特异性检测, 结果表明 2 分离株均为无乳链球菌。

2.6 荚膜多糖血清分型

多重 PCR 扩增两分离株的基因组 DNA, 均可

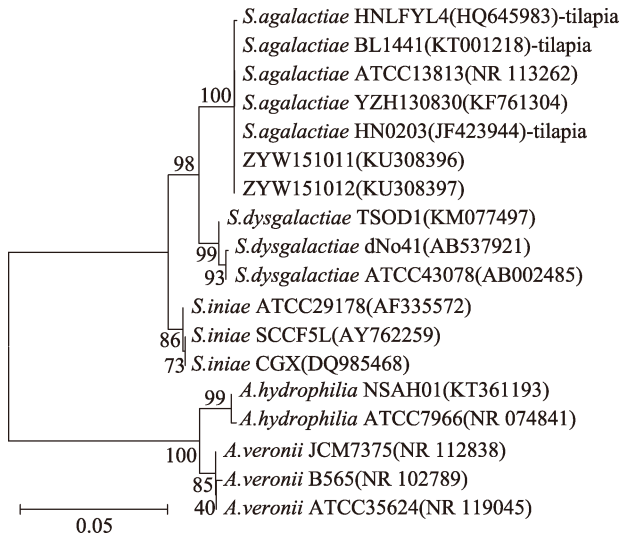


图 2 基于 2 分离株 16S rRNA 基因序列的系统发育树分叉处的数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度百分比, 标尺长度表明每个位点发生 0.05 次置换。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of 2 isolates by Neighbor-Joining method. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data(1000 replicates). The scale bar shows the number of substitutions per site.

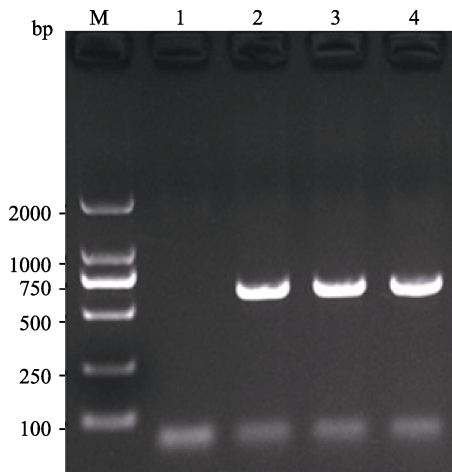


图 3 *cfb* 基因 PCR 扩增电泳图

M. DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 标准菌株(ATCC51487); 3: ZYW151011; 4: ZYW151012.

Fig. 3 The electrophoresis of *cfb* gene PCR amplification of two isolates and ATCC51487 strain

M. DL2000 Marker; 1: negative control; 2: standard strain (ATCC51487); 3: ZYW151011; 4: ZYW151012.

扩增出 272 bp 和 688 bp 两个片段, 按照文献[21]中无乳链球菌的血清分型标准, 两个分离菌株的血清型均为 Ia 型(图 4)。

2.7 多位点序列分型

2.7.1 菌株 MLST 分型结果 2 分离菌株均能扩

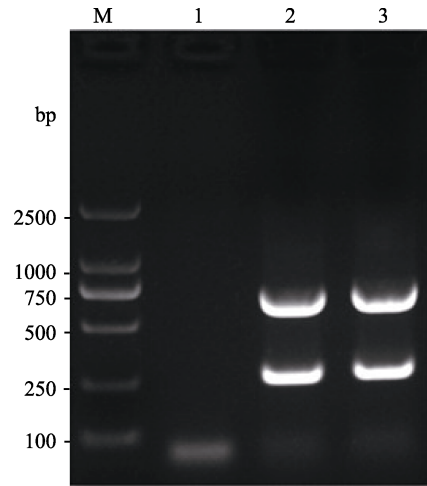


图 4 本研究两分离菌株荚膜多糖基因的扩增电泳图

M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: ZYW151011; 3: ZYW151012.

Fig. 4 The electrophoresis of capsular polysaccharide gene PCR amplification of the two isolates

M: DL2000 Marker; 1: negative control; 2: ZYW151011; 3: ZYW151012.

扩增出 7 个管家基因的特异性 PCR 产物, 扩增产物测序结果与国际 MLST 网络数据库中的无乳链球菌的序列 BLAST 比对后, 均为在数据库中未能找到的新型 ZST-1, 2 分离株的序列号相同。与新型 ZST-1 亲缘关系最近的是 ST-261, 它们只在 *glnA* 位点有所不同(表 3), ST-261 在 *glnA* 位点的等位基因值为 4, 而新型 ZST-1 在 *glnA* 位点的等位基因值在数据库中未比对成功, 将 *glnA* 管家基因序列提交到 MLST 网站数据库后, 获得新的等位基因编号 81。

表 3 无乳链球菌测序菌株与已有菌株序列型的等位基因数量信息

Tab. 3 The alleles number of the sequenced and existing bacterial strain of *Streptococcus agalactiae*

序列型 ST	位点 locus						
	<i>adhP</i>	<i>pheS</i>	<i>atr</i>	<i>glnA</i>	<i>sdhA</i>	<i>glcK</i>	<i>tkf</i>
ZST-1	54	17	31	81	26	25	19
ST-261	54	17	31	4	26	25	19
ST-246	49	17	31	4	26	25	19
ST-257	52	17	31	4	26	2	19

2.7.2 管家基因核酸序列的系统发育分析 根据国际 MLST 网络数据库中无乳链球菌序列型信息, 选取 18 株相关的菌株信息, 结合本研究得到的

新型 ZST-1 构建 Neighbor-Joining 系统进化树(图 5)。由图 5 可见, ZST-1 与 ST-261 聚为一支。图 5 中部分序列型的等位基因信息见表 3。根据表 3 内所列出的 ST 型的序列号登录到 MLST 数据库中, 进入 http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst_sagalactiae_seqdef 页面, 点击下载 MLST profiles, 即可获得相应序列号的等位基因数量信息。

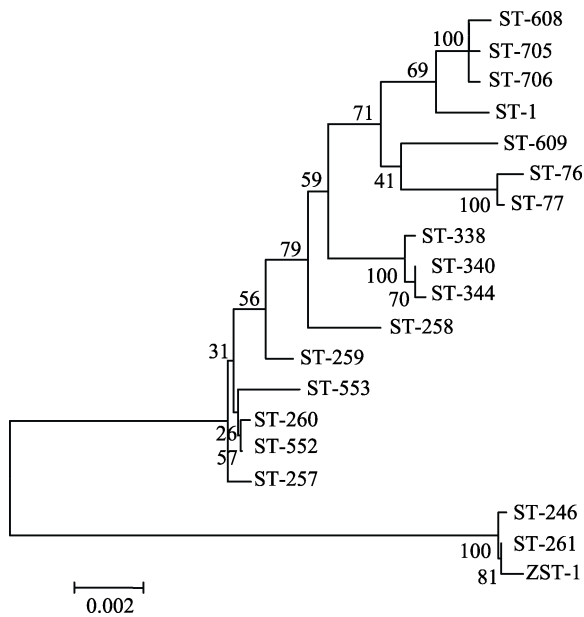


图 5 基于分离株的序列型与其他 18 个无乳链球菌序列型等位基因核心序列构建的 NJ 聚类图

Fig. 5 Neighbor-Joining tree generated by MEGA 5.0 based on alignment for allele gene sequences of the isolate and other 18 related *Streptococcus agalactiae* species

3 讨论

黄河裸裂尻鱼是一种典型的季节性冷适应性鱼类, 而无乳链球菌主要是对温水性及热带鱼类危害严重^[13]。本研究发现我国四川省某养殖场的黄河裸裂尻鱼受无乳链球菌感染发病的水温在 28℃, 探究此变化是否与 2 分离株的遗传变异有关, 需要与其他动物源性的无乳链球菌进行分子水平差异性分析。本研究对自然发病的黄河裸裂尻鱼进行病原菌分离鉴定、生化特性及分子生物学分析, 结果表明该病原菌为无乳链球菌, 其为一种危害黄河裸裂尻鱼的新病原。

本研究发现, 无乳链球菌 2 分离株对头孢类及喹诺酮类药物敏感, 而对强力霉素、氟苯尼考

和阿莫西林等耐药, 且实际处理中采用敏感药物恩诺沙星经口给药较为有效地控制了疫情。余泽辉等^[4]报道从齐口裂腹鱼分离到的无乳链球菌对强力霉素和阿莫西林等药物敏感与本研究不同; 马艳平等^[14]从罗非鱼分离的无乳链球菌对头孢类药物敏感, 但对强力霉素的耐药性与本研究相似, 由此可见, 来源于不同动物源或区域的同种细菌, 在药物敏感性上可能存在差异。因此, 在鱼类细菌性疾病的治疗中应根据药敏试验结果合理使用抗菌药物, 以提高药物使用的有效性。在本次疾病的发生期间, 养殖场曾使用强力霉素、氟苯尼考与阿莫西林等抗菌药物来控制本病, 但均无效果, 药物敏感性试验结果则很好的诠释了其中的原因。另外, 抗生素的不合理使用不仅导致病原菌的多重耐药现象越来越严重, 给鱼类细菌性疾病的治疗带来困难, 同时药物的残留也给人类健康造成威胁。

血清型的鉴定方法有很多, 包括酶联免疫测定法^[15]、免疫沉淀试验^[16]、乳胶凝集反应^[17]和协同凝集反应^[18]等, 但这些鉴定方法耗时、繁琐、准确性差。分子生物学方法具有更强的辨别能力, 可以检测更多的血清型, 根据无乳链球菌 CPS 不同将其分为 Ia、Ib、II~IV 型 10 种血清型^[11]。本研究对从自然感染发病的黄河裸裂尻鱼中分离的菌株进行荚膜多糖(CPS)基因的多重 PCR 检测鉴定, 显示 2 分离株均为致病性 Ia 型, 这与 Ye 等^[19]报道的罗非鱼源无乳链球菌荚膜多糖血清分型和任思宇等^[20]报道的家兔源无乳链球菌荚膜多糖血清分型结果相同。同时, 多位点序列分型(MLST)作为一种能够很好地分析菌株变异情况的分型方法, 能进一步对菌株进行分子水平分型, 研究其是否存在基因水平的变异情况^[21]。本研究选择了无乳链球菌 7 个管家基因的保守区域, 通过 PCR 扩增、测序后对碱基序列进行分析, 结果表明本研究从黄河裸裂尻鱼分离的 2 株无乳链球菌均为新的序列型 ZST-1, 7 个管家基因中 *glnA* 管家基因位点发生变异, 此管家基因序列在 MLST 数据库中 BLAST 不存在相应的等位基因编号, 经提交管家基因序列到 MLST 数据库中, 获得新的

等位基因编号 81。与此同时,有必要进一步对不同动物源性的无乳链球菌进行比较分析,以深入研究无乳链球菌的多样性,为研究无乳链球菌这种人-兽-鱼共患病原是否存在交叉感染的可能提供更详细的理论数据。

参考文献:

- [1] Robinson J A, Meyer F P. Streptococcal fish pathogen[J]. J Bacteriol, 1966, 92(2): 512.
- [2] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C M, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(1): 186–192.
- [3] Glibert P M, Landsberg J H, Evans J J, et al. A fish kill of massive proportion in Kuwait Bay, Arabian Gulf, 2001: the roles of bacterial disease, harmful algae, and eutrophication[J]. Harmful Algae, 2002, 1(2): 215–231.
- [4] Yu Z H, Zhang J, Geng Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from *Schizothorax prenanti*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1244–1252. [余泽辉, 张佳, 耿毅, 等. 齐口裂腹鱼无乳链球菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1244–1252.]
- [5] Evans J J, Pasnik D J, Klesius P H, et al. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)[J]. J Wildlife Dis, 2006, 42(3): 561–569.
- [6] Qi D, Guo S, Zhao X, et al. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Freshw Biol, 2007, 52(6): 1090–1104.
- [7] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Systematic Determinative Common Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 419. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 419.]
- [8] Patel J B, Cockerill F R, Alder J, et al. M100-S24: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement[M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- [9] Jensen S, Bergh Ø, Enger Ø, et al. Use of PCR RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(5): 379–386.
- [10] Wang J, Wang K Y, Xiao D, et al. Development of double PCR for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(5): 496–502. [王均, 汪开毓, 肖丹, 等. 罗非鱼源无乳链球菌双重 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 496–502.]
- [11] 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 Methods, 2010, 80(2): 212–214.
- [12] 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.
- [13] Mian G F, Godoy D T, Leal C A G, et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia[J]. Vet Microbiol, 2009, 136(1): 180–183.
- [14] Ma Y P, Li J B, Hao L, et al. Isolation, identification and pathogenicity of Tilapia *Streptococcus agalactiae* from Guangzhou[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(6): 132–135. [马艳平, 李嘉彬, 郝乐, 等. 广州市罗非鱼源无乳链球菌分离鉴定与致病性研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41(6): 132–135.]
- [15] Arakere G, Flores A E, Ferrieri P, et al. Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for serotyping of group B streptococcal isolates[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2564–2567.
- [16] Wilkinson H W, Moody M D. Serological relationships of type I antigens of group B streptococci[J]. J Bacteriol, 1969, 97(2): 629–634.
- [17] Park C H, Vandel N M, Ruprai D K, et al. Detection of group B streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 408–409.
- [18] Håkansson S, Burman L G, Henrichsen J, et al. Novel coagglutination method for serotyping group B streptococci[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(12): 3268–3269.
- [19] 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(4): 623–632.
- [20] Ren S Y, Geng Y, Wang K Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a pathogenic *Streptococcus agalactiae* in rabbit[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(8): 1247–1252. [任思宇, 耿毅, 汪开毓, 等. 1 株致病性兔无乳链球菌的分离, 鉴定与系统发育分析[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(8): 1247–1252.]
- [21] Maiden M C J, Bygraves J A, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(6): 3140–3145.

Identification of the pathogen *Streptococcus agalactiae* in *Schizopygopsis pylzovi* (Kessler) by multilocus sequence typing

ZHANG Yuwei, GENG Yi, YU Zehui, WANG Kaiyu, LI Yajun, MOU Weihao, ZENG Yiren, YE Mengting

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

Abstract: In October 2015, an infectious disease characterized by hemorrhaging from the eyeball, jaw, and operculum, along with neurological symptoms or sudden death with no other clinical symptoms emerged in farms of *Schizopygopsis pylzovi* (Kessler) culture in Ya'an, Sichuan Province, China. A Gram-positive, chain-forming coccus was found in visceral smears. Two bacterial isolates (ZYW151011 and ZYW151012) were isolated from the liver, spleen, and kidney of the diseased *S. pylzovi*, and then identified using a *S. pylzovi* pathogenic test, PCR detection of the *cfb* gene (GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor) from *Streptococcus agalactiae*, and sequence analysis of the 16S rRNA gene. Both bacterial isolates were identified as *S. agalactiae*. A 16S rRNA gene sequence analysis by BLAST in GenBank indicated that the two isolates (GenBank accession numbers KU308396 and KU308396) showed high levels of similarity to *S. agalactiae* (99.8%). Drug sensitivity test results showed that both strains were sensitive to ceftriaxone and quinolones, but were not sensitive to doxycycline, florfenicol, and amoxicillin. Serotyping and sequence typing of the two isolates was achieved using capsular polysaccharide serotyping and multilocus sequence typing (MLST), respectively. The serotype of both isolates was pathogenic type Ia. The two isolates were identified as a new sequence type (ZST-1), closely related to ST-261. The allele gene sequence has been submitted to the MLST database under the new allele number 81 (ID, BIGSdb_20151110081850_13025_35759) based on this new variation of *glnA* in the novel sequence type ZST-1.

Key words: *Schizopygopsis pylzovi* (Kessler); *Streptococcus agalactiae*; isolation and identification; capsular polysaccharide serotype; multilocus sequence typing

Corresponding author: GENG Yi. E-mail: gengyisicau@126.com