

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

卢迈新^{1*} 黎炯^{1,2} 叶星¹ 邓国成¹ 江小燕¹ 田园园¹ 赖翠玲¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广东 广州 510380)
(2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要: 从中国广东、海南罗非鱼主养区发生爆发性疾病的多个养殖场的罗非鱼病鱼体上, 分离到多株致病菌株。人工感染试验显示分离菌株具有较强的致病力, 有多株经腹部注射分离细菌浓度为 1×10^6 CFU/mL 时可使 100% 的受感染鱼死亡, 选择其中 7 株强毒株进行药物敏感性实验与鉴定。不同菌株对药物敏感性存在一定的差异但与菌株来源无相关性, 29 种抗生素中对 13 种敏感、7 种不敏感、9 种存在菌株的差异。各分离菌株均为革兰氏阳性菌, 呈 β 溶血。采用链球菌快速鉴定系统 ID 32 STREP、Lancefield 分析及多项补充生理生化鉴定结果, 初步判断为无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*。PCR 扩增 16S rRNA 基因和 GBS-specific gene *cfb* (CAMP factor) 基因的全长序列, BLAST 分析显示所有菌株的 16S rRNA 基因与 GenBank 上登录的无乳链球菌的相应序列高度同源 (> 99.8%), 各分离菌株间的 16S rRNA 基因序列也高度同源 ($\geq 99.9\%$ –100%)。各菌株 *cfb* 基因序列高度同源 (100%), BLAST 显示与已知无乳链球菌的相应序列也具有高度同源性 ($\geq 99.0\%$)。综合上述实验结果, 可判定广东与海南罗非鱼主养区 2009 年夏季发生的罗非鱼爆发性疾病的病原菌为无乳链球菌。

关键词: 罗非鱼, 无乳链球菌, 致病性, 生理生化, 16S rRNA, *cfb* 基因, 药物敏感性

Identification and Characterizations of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Tilapia Cultured in Guangdong and Hainan Provinces

LU Mai-Xin^{1*} LI Jiong^{1,2} YE Xing¹ DENG Guo-Cheng¹ JIANG Xiao-Yan¹
TIAN Yuan-Yuan¹ LAI Cui-Ling¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou, Guangdong 510380, China)
(2. College of Fisheries & Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Bacteria pathogens were isolated from diseased tilapia cultured in several farms of Guangdong

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD01A1201); 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. nycyt-48-4); 广东省农业重点项目(No. 2009B020201003); 公益性行业(农业)科研专项(No. 3-49); 农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(No. 2010-C26); 广东省海洋渔业科技推广专项(No. A200899B02); 广东省重大科技兴渔项目(No. B200701A06)

*** 通讯作者:** Tel: 86-20-81617843; Fax: 86-20-81616162; ✉: mx-lu@163.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2009-12-02; **接受日期:** 2010-01-14

and Hainan provinces. Artificial infection experiments showed that these isolates possessed strong virulence. Intraperitoneal injection ($\geq 1 \times 10^6$ CFU/mL) of some isolates caused 100% mortality of healthy tilapia. 7 bacteria strains with strong virulence were chosen for antibiotics sensitivity test and identifications. Antibiotic sensitivity assays showed that among 29 antibiotics tested 13 were sensitive, 7 were resist, while 9 items showed various reactions among strains. The isolates were all gram-positive and β -hemolysis and were identified as *Streptococcus agalactiae* by biochemistry assays of ID 32 STREP test, Lancefield test and other assays. Molecular analysis of 16S rRNA and *cfb* genes (GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor) were used for further identification. BLAST showed that 16S rRNA and *cfb* genes of all the strains possessed high similarities with their counterparts registered in GenBank, and with each other. Taken together, these experiment results showed that pathogen caused high mortality of tilapia in both provinces in 2009 was *S. agalactiae*. The result was helpful for tilapia disease control and prevention, and for development of streptococcus vaccine for tilapia.

Keywords: Tilapia, *Streptococcus agalactiae*, Virulence, Biochemical analysis, 16S rRNA, *cfb* gene, Antibiotic sensitivity

自 1976 年 Pier 等首次报道在鱼体上分离到致病链球菌以来^[1], 链球菌已成为世界性多地区、多个鱼类品种的主要病原菌。已报道的受链球菌感染的淡水海水鱼类包括虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*、斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*、牙鲆 *Paralichthys olivaceus*、平鲷 *Sparus sarba*、多耙鲮 *Liza klunzingeri* 等^[2-4], 温水性鱼类受链球菌的危害尤其严重^[5-6]。罗非鱼原产地非洲, 现已成为世界性养殖鱼类。每年世界罗非鱼养殖产量超过 260 万吨。罗非鱼也是我国淡水养殖的重要品种, 每年我国罗非鱼出口额超过 7 亿美元, 出口量超过 20 多万吨(折合活鱼近 60 万吨)。我国南方的广东、海南两省均为罗非鱼主养区, 单是广东每年罗非鱼的产量超 50 万吨^[7]。

抗病力强是罗非鱼被广泛养殖的主要因素之一, 但随着世界各地罗非鱼链球菌病的出现, 一直以来认为罗非鱼具有强抗病力、不易患病的观点已受到挑战^[8]。以色列、美国、科威特和泰国等国家均有养殖罗非鱼患链球菌病的报道^[9]。最近几年我国也有罗非鱼链球菌病的发生, 但仅局限于小范围内流行, 所导致的死亡率为 20%–30%^[10-12]。

在鱼体上分离到的链球菌有海豚链球菌 *Streptococcus iniae*、无乳链球菌 *S. agalactiae*、副乳房链球菌 *S. parauberis* 等^[13]。在罗非鱼上分离到的链球菌主要有海豚链球菌和无乳链球菌两种。从我国山东、广西的养殖罗非鱼上分离过海豚链球菌^[10-11]; 从福建的养殖罗非鱼上分离到无乳链球菌^[12]。2009 年 7–10 月份的高温季节, 广东和海南两省养殖罗非鱼发生了较大范围的爆发性病害。与

往年的发病情况比较, 本次病害发生的范围较广、罗非鱼受感染率与死亡率均较高, 个别发病率超过 50%, 发病鱼死亡率超过 95%, 因此引起社会及有关部门的高度关注。本实验室研究人员分赴广东与海南省各罗非鱼主养区, 采集多个罗非鱼养殖场的发病鱼样本, 开展病原菌的分离、理化与分子鉴定及药物敏感试验, 为快速制定安全有效的病害防控措施及下一步疫苗的研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发病罗非鱼样本分别采自广东的肇庆、高要、珠海、茂名、吴川和湛江市, 海南的文昌与琼海市等多个罗非鱼养殖场。体重 100–500 g。主要症状为体色发黑, 口腔、下颌和鳃盖充血, 单侧或双侧眼球突出、眼眶四周充血、眼角膜白浊, 肝脏与胆囊肿大, 病鱼游动不正常、打转等。各养殖场病鱼的主要症状均相同。

链球菌快速生化鉴定试验条 Rapid ID 32 Strp 为法国 Biomerieux 公司产品; Lancefield 分析试剂、BHI 培养基及其他试剂等购自广州环凯微生物有限公司或广州市科伊华生物技术有限公司。血琼脂平板为郑州安图绿科生物工程有限公司产品。无乳链球菌标准菌(CVCC 1887)购自中国兽医药品监察所。大肠杆菌 *Escherichia coli* 为本实验室保存。

人工感染用实验鱼为健康吉富品系罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GIFT strain), 由珠江水产研究所高要种质工程中心提供, 鱼体重 20–26 g; 体长

10 cm–11 cm。实验期间水温维持在 29°C–31°C。

1.2 病原菌的分离与培养

广东和海南省各罗非鱼养殖场各取 15 尾病鱼, 以无菌操作直接从脑、肝、眼组织取样, 接种血平板、BHI 琼脂平板和营养琼脂。28°C 恒温培养 24 h, 挑取占优势形态的单个菌落进行纯化培养, 纯化后的细菌用于人工感染和生理生化分析及分子鉴定。

1.3 人工回归感染实验

1.3.1 病原菌人工感染实验: 收集培养 24 h 的菌体, 经 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液。分别稀释成 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 CFU/mL 4 个浓度, 腹腔注射健康罗非鱼。注射 0.2 mL/尾, 10 尾/组。对照组注射等量无菌生理盐水。实验期间水温 29°C–31°C, 每天观察及记录实验鱼的症状和死亡情况, 连续观察 7 d。

将从上述人工回归感染出现明显症状的病鱼再次分离菌株和进行感染实验, 方法同上。

1.3.2 病鱼组织除菌液人工感染实验: 分别收集发病鱼的脑、眼球、肝脏、脾脏、肾脏组织混合, 按 1:10 (W/V) 加入 0.65% 无菌生理盐水, 冰浴中匀浆, 10000 r/min 离心 30 min, 以无菌操作取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤器过滤, 滤液用 0.65% 无菌生理盐水稀释 10、100、1000 倍 3 个浓度腹腔注射感染健康罗非鱼, 0.2 mL/尾, 20 尾/组。设重复组, 对照组注射等体积生理盐水, 水温为 29°C–31°C。

1.4 细菌分类鉴定

1.4.1 病原菌形态学与生理生化鉴定: 细菌与菌落形态观察: 取血平板和 BHI 液体培养基中 28°C 培养 24 h 后的菌体, 经涂片、固定、革兰氏染色, 显微镜下观察菌体形态。

参照 Evans 等的鉴定方法^[14], 结合参考 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed)^[15]中链球菌的鉴定方法, 确定生理生化检测项目, 包括溶

血、生长、水解活性和发酵等(表 4)。采用法国 Biomerieux 公司的 Rapid ID 32 Strp 鉴定系统及其他细菌生化微量鉴定管进行测定。

1.4.2 药敏试验: 以涂布法接种经纯化培养 24 h 的病原菌于 BHI 培养基平板上, 贴上药敏纸片 (直径 6 mm), 28°C 培养 24 h 后测抑菌圈直径, 按产品说明书判定各菌株对药物的敏感度。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4.3 分子鉴定: 根据文献[16]合成 1 对引物 (P_{LS} 和 P_{LA}), 用于扩增无乳链球菌的 16S rRNA 全长序列, 预期长度约 1500 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。将纯化细菌接种于营养肉汤培养基, 摇床 28°C 过夜培养, 4000 r/min 离心 25 min 收集 1 mL 菌体。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(广州铂尔生物科技开发有限公司产品)。具体操作步骤按照试剂盒所提供的方法进行。提取的细菌基因组 DNA 经 0.8% 琼脂糖电泳以检测基因组 DNA 的质量, Eppendorf 分光光度计确定 DNA 浓度。用上述合成引物扩增各菌株基因组 DNA。PCR 反应条件见表 1。PCR 反应结束后, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收(Omega 公司产品)。回收片段采用 pMD19-T Easy Vector Systems (TaKaRa 公司产品) 进行连接、转化大肠杆菌感受态细胞, PCR 及酶切鉴定筛选挑取阳性克隆。序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。采用 Vector NTI suite 9.0 软件和 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列同源性分析。用 MEGA 4 软件 N-J 法构建进化树, 设定 Bootstrap 1000。比较 GenBank 上登录的 GBS *cfb* 基因及其两侧序列 (GenBank accession No. NC_004116.1、NC_00743.1 和 X72754.1 等), 选取 *cfb* 外侧保守序列设计合成 1 对引物(引物序列见表 1), 以获取 *cfb* 全序列。预期扩增产物长度约 900 bp。扩增条件见表 1。PCR 扩增产物的回收、克隆等步

表 1 基因扩增使用的引物及反应条件
Table 1 Primers and reaction conditions for gene amplifications

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Amplification conditions
16S rRNA	P_{LS}	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	94°C 5 min; 94°C 1min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 31 个循环; 72°C 5 min。
	P_{LA}	TACGGCTACCTGTGTACGACTT	
<i>cfb</i>	PcfbS	CGACAGCATCACACGAAAAATACA	采用热启动方法: 96°C 5 min, 68°C 8 s; 然后再加 Taq 酶, 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min, 32 个循环; 72°C 10 min。
	PcfbA	TGACGACCTTTTGGACAAGTAGTAA	

骤同上。PCR 反应结束后, 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测与回收。回收、连接及阳性克隆鉴定等方法同上。序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。Vector NTI suite 9.0 软件和 BLAST 程序进行序列同源性分析。

2 结果

2.1 病原菌人工感染

各不同罗非鱼养殖场的病鱼样品分别在血平板、BHI 平板和营养琼脂平板上涂板培养, 在血平板和 BHI 平板上细菌生长较快、菌落较大, 而在营养培养基上则生长较慢、菌落较小。3 种平板上分离菌均较为均一。挑选优势菌进行纯化培养, 从不同地区养殖场的病鱼样品中各分离出 6–10 个菌株, 分别进行人工注射感染实验, 筛选出其中 7 个毒力较强的菌株(表 2)做进一步的检测。

人工注射感染实验中, 注射高菌液浓度 (1×10^8 、 1×10^7 和 1×10^6 CFU/mL)的试验组均出现急性死亡, 受感染鱼第 2 天开始出现死亡, 4 d 内 100%死亡率; 注射菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL 时, 感染鱼第 5 天出现死亡和显症。显症鱼体色发黑,

眼睛突出、眼角膜白浊, 肝脏出血肿大, 游动不正常、打转等与自然发病鱼相似的主要症状(图 1)。注射高浓度细菌时受试鱼短时间内死亡未出现突眼等症状, 但解剖可见肝脏出血。

从感染濒死的病鱼再次分离出的菌株均获得与初次分离的菌株相似的感染结果, 空白对照组鱼均健康存活(表 3)。各分离菌株人工感染引发的病症均相似。

表 2 分离的强毒株编号与来源 Table 2 Pathogens isolated from Tilapia in Guangdong and Hainan provinces			
编号 No.	菌株 Strains	来源 Source	采样时间 Sampling date
1	GDzl	广东肇庆莲塘	2009-08-04
2	GDmm	广东茂名	2009-09-06
3	GDzh	广东珠海平沙	2009-08-01
4	HNwf	海南文昌罗非鱼苗场	2009-08-16
5	HNwc	海南文昌二场	2009-08-16
6	HNqh	海南琼海	2009-08-18
7	HNqo	海南琼海	2009-08-18
8	CVCC 1887	中国兽医药品监察所	

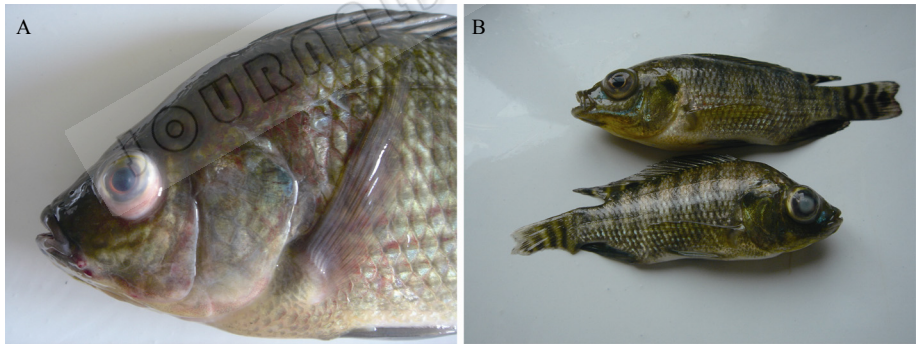


图 1 自然发病鱼(A)和人工感染发病鱼(B)显示突眼症状
Fig. 1 The diseased fish with symptom of exophthalmia

Note: A: The natural infected fish; B: The artificial infected fish.

表 3 分离菌株人工感染结果 Table 3 Artificial infection results of the isolated strains							
注射菌液浓度 Bacteria concentration (CFU/mL)	死亡数/总数(尾) Death /total (Individual)						
	菌株 Strains						
	GDzl	GDmm	GDzh	HNwf	HNwc	HNqh	HNqo
1×10^8	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1×10^7	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1×10^6	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1×10^5	14/20	15/20	14/20	13/20	16/20	12/20	15/20
Negative control	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

2.2 病鱼组织除菌液人工感染实验

实验结果显示,病鱼组织除菌液稀释 10、100、1000 倍 3 个浓度的实验组和对照组,饲养 30 d 没有发现异常,试验鱼全部正常存活。

2.3 细菌分类鉴定

2.3.1 病原菌与菌落形态:细菌分离培养结果显示,在病鱼的脑、眼、肝组织分离的菌落均一,菌落形态、颜色与大小相近。纯化的 7 个菌株在血平板培养的菌落均为白色圆形、表面润滑光滑、微隆起、边缘整齐。菌体为球形或卵形,直径 0.5 μm –2.0 μm 。在 BHI 液体培养基培养时菌体多数双个或短链状。革兰氏染色呈阳性,血琼脂平板上出现 β 溶血环。

2.3.2 药敏试验:各分离菌株对红霉素等 13 项试验

药物敏感,对链霉素等 7 项不敏感,另有 9 项药物菌株间存在敏感性差异。其中对罗红霉素、头孢氨苄等 5 项为敏感或中度敏感,对氨苄青霉素和壮观霉素等 4 项为不敏感或中度敏感。分离菌株的来源与试验药物的敏感性不存在相关性,没有任何两个分离菌株对 29 种试验药物具有完全相同的敏感性(表 4)。

2.3.3 生理生化特性:各分离菌株与标准株均具有相似的生理生化特性。各项补充生理生化检测结果均相同, ID32 Strep 中的大部分项目反应结果均与标准株的相同,只有 4 项菌株间的结果不同或有疑问。鉴定结果显示所分离的 7 个菌株均为无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*, 可信度均大于 99.0% (表 5)。

表 4 分离菌株对 29 种药物的敏感性
Table 4 Antibiotic sensitivities of the isolated strains

抗菌药物 Antibiotics	含量($\mu\text{g}/\text{片}$) Contents ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	药物敏感性 Antibiotic sensitivity							
		Standard	GDzl	GDmm	GDzh	HNwf	HNwc	HNqh	HNqo
红霉素 Erythromycin	15	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	S	S	S	S	S	S	S	S
米诺四环素 Minocycline	30	S	S	S	S	S	S	S	S
乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin	30	S	S	S	S	S	S	S	S
氟诺沙星 Norfloxacin	10	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢克洛 Cefaclor	30	S	S	S	S	S	S	S	S
苯唑青霉素 Oxacillin	1	S	S	S	S	S	S	S	S
青霉素 Penicillin	1	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢唑啉 Cefazolin	30	S	S	S	S	S	S	S	S
先锋必素 Cefobis	75	S	S	S	S	S	S	S	S
氧氟沙星 Ofloxacin	5	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢噻吩 Cefalothin	30	S	S	S	S	S	S	S	S
麦迪霉素 Midecamycin	30	S	S	S	S	S	S	S	S
罗红霉素 Roxithromycin	15	S	S	S	S	I	S	S	S
头孢氨苄 Cefalexin	30	S	S	S	S	S	S	S	I
恩诺沙星 Baytril	5	S	S	I	I	I	S	I	I
阿莫西林 Amoxicillin	10	I	S	S	I	I	S	I	S
萘啶酮酸 Nalidixic acid	30	I	I	I	I	I	S	I	I
氨苄青霉素 Ampicillin	10	I	I	I	I	I	R	I	I
壮观霉素 Spectinomycin	100	I	R	I	R	R	I	I	R
四环素 Tetracycline	30	I	I	I	I	R	R	R	I
洛美沙星 Lomefloxacin	10	R	R	R	R	R	I	R	R
链霉素 Streptomycin	10	R	R	R	R	R	R	R	R
卡那霉素 Amikacin	30	R	R	R	R	R	R	R	R
新霉素 Necmycin	30	R	R	R	R	R	R	R	R
妥布霉素 Tobramycin	10	R	R	R	R	R	R	R	R
庆大霉素 Gentamicin	10	R	R	R	R	R	R	R	R
依诺沙星 Enoxacin	10	R	R	R	R	R	R	R	R
氟罗沙星 Fleroxacin	5	R	R	R	R	R	R	R	R

表 5 ID 32 Strep 及补充生理生化鉴定结果
Table 5 Identification of the isolated strains by ID 32 Strep and other biochemical assays

项目 Item ID 32 STREP test	菌株 Strain		补充检测项目 Items complement reaction	菌株 Strain	
	CVCC1877	Isolated strain		CVCC1877	Isolated strain
d-甘露醇 MAN	-	-	革兰氏 Gram's stain	+	+
丙氨酸苯丙氨酸脯氨酸芳胺酶 APPA	+	-/+	β-溶血 β-hemolysis	+	+
d-棉籽糖 RAF	-	-	4°C 生长 Growth at 4°C	-	-
焦谷氨酸芳胺酶 PYRA	-	-	10°C 生长 Growth at 10°C	-	-
β-N 乙酰葡萄糖胺 βNAG	-	-	45°C 生长 Growth at 45°C	-	-
碱性磷酸酶 PAL	+	+	6.5%氯化钠 Growth in 6.5%NaCl	-	-
β 葡萄糖醛酸酶 βGUR	+	-	pH 值 4 生长 Growth in pH 4	-	-
β-葡萄糖苷酶 βGLU	-	-	pH 值 9.6 生长 Growth in pH 9.6	-	-
d-松三糖 MLZ	-	-	pH 值 10 生长 Growth in pH10	-	-
β-甘露醇 βMAN	-	-	40%胆汁 Growth in 40% bile salts	+	+
甲基-β-D 葡萄糖吡喃苷 MβDG	+	?/+/-	马尿酸 Hippurate	+	+
β-半乳糖苷酶 β-GAR	-	-	七叶苷 Esculin	-	-
尿素酶 URE	-	-	水杨苷 Salicin	+	+
d-麦芽糖 MAL	+	+	MR 试验 Methyl red (MR)	+	+
糖原 GLYG	-	-	菊糖 Inulin	-	-
甘氨酸色氨酸芳胺酶 GTA	-	-	过氧化氢酶 Catalase test	-	-
精氨酸双水解酶 ADH	+	+	氧化酶 Oxidase test	-	-
VP 试验 VP	+	+	兰氏血清 Lancefield	B	B
d-海藻糖 TRE	+	+			
d-山梨醇 SOR	-	-			
d-核糖 RIB	+	+			
α-半乳酸苷酶 αGAL	-	+/-/?			
β-半乳糖苷酶 β-GAL	-	-			
乳糖 LAC	-	-			
环式糊精 CDEX	-	-			
d-塔格糖 TAG	-	-			
D-阿拉伯醇 DARL	-	-			
蔗糖 SAC	+	+			
d-密二糖 MEL	-	-			
支链淀粉 PUL	+	+/-/?			
马尿酸盐 HIP	+	+			
L-阿拉伯糖 LARA	-	-			

Note: +: Denotes positivity; -: Denotes negativity; ?: Uncertained.

2.4 16S rRNA 与 *cfb* 基因与系统发育分析

使用引物 P_{LS} 和 P_{LA} 扩增各分离菌株的 16S rRNA 基因, 均可获得长度 1471 bp (不含引物部分) 的特异条带。测序结果显示所检测的 7 个菌株间的 16S rRNA 基因具有高度同源性(99.9%–100%), 全序列中只有 1 个碱基(碱基序列的第 1011 位上, T/C) 的差异, 且 7 菌株分成两个类型, 其中 GDzl、

GDmm、HNwf、HNwo 株以及标准株为 T, 而 HNwc 等其余 3 株则为 C。两种类型的代表株(GDzl 和 HNwc)的 16S rRNA 序列已分别登录 GenBank (Accession No. GU217535, GU217531)。BLAST 分析显示分离菌株与 GenBank 上登录的无乳链球菌 *S. agalactiae* 的 16S rRNA 基因高度同源(≥99.9%–100%), 与海豚链球菌 *S. iniae* 的同源性为 95.1%–96.9%, 与

停乳链球菌 *S. dysgalactiae* 的同源性为 97.5%–97.6%。根据 16S rRNA 基因序列与 GenBank 已登录的其他链球菌相应序列建立系统进化树, 无乳链球菌、海豚链球菌及化脓性链球菌 *S. pyogenes* 各形成独立分支(图 2)。

使用引物 PcfbS 和 PcfbA 扩增各分离菌株的 *cfb* 基因, 均可获得长度约 830 bp 的清晰条带。测序结果显示, *cfb* 基因 ORF 为 763 bp, 各菌株间序列高度同源(100%), 分离株 GDzl 作为代表菌株, 其 *cfb* 基因

序列已登录 GenBank (Accession No. GU217532)。BLAST 分析显示所克隆到的 *cfb* 序列与已登录的无乳链球菌相应序列(CP000114.1、AL766855.1、AE009948.1、X72754.1 和 EF694027.1)高度同源(99.0%), 而与乳房链球菌 *S. uberis* (SUU34322)、化脓性链球菌 *S. pyogenes* (AF079502)等的同源性则较低, 分别为 66.1%和 63.6%。因此根据 16S rRNA 基因和 *cfb* 基因的序列分析结果可进一步判断所检测的分离菌株均为无乳链球菌。

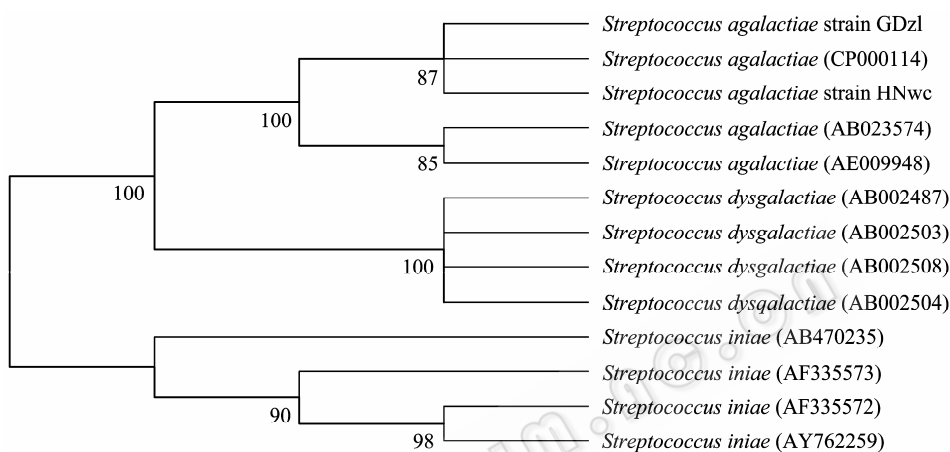


图 2 根据无乳链球菌等的 16S rRNA 基因构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of *Streptococcus agalactiae* and others

注: 括号内的数字为 GenBank 序列号; 结点处数字为 Bootstrap 值。

Notes: Numbers in parenthesis represented GenBank accession No.. Numbers at the branch points indicated the bootstrap values.

3 讨论

2009 年夏季高温期广东与海南两省罗非鱼爆发性病害发生的地域范围广, 罗非鱼感染率与死亡率都高于往年, 给罗非鱼养殖业造成了严重的损失。本研究首次报道了引发此次病害的病原菌的分离、鉴定及药敏试验结果, 为制定养殖罗非鱼链球菌有效的防控措施、正确合理用药, 以及对疫苗的研制奠定了基础。

广东和海南各罗非鱼养殖场病鱼的主要病症极为相似, 最典型的是突眼、口腔与鳃盖出血、游动不正常、打转等。从广东和海南不同罗非鱼养殖场分离到的 7 株菌的人工感染, 及从感染濒死的病鱼再次分离出的菌株进行回归感染实验均获得与自然感染相似的症状。因此可认为引发广东和海南此次罗非鱼爆发病的病原为细菌性病原。

通过 API 32 Strep 及其他补充生理生化项目鉴

定 7 株分离菌, 初步判定分离菌株为无乳链球菌。进一步通过 16S rRNA 基因和 *cfb* 基因对这些分离株进行分子鉴定。16S rRNA 基因因进化上具有高度的保守性而被广泛地应用于细菌鉴定, 适用于属及属以上分类单位的亲缘关系鉴定, 对于亲缘关系较近的细菌则常因分辨率不够而较难区分^[17]。本研究结果显示各分离菌株间 16S rRNA 基因序列高度同源性(99.9%–100%), 与 GenBank 上登录的无乳链球菌的同源性也极高(99.8%–99.9%)。与停乳链球菌、海豚链球菌的同源性则相对较低些, 但也达 95.1%–97.6%, 为此选用 *cfb* 基因再做进一步鉴定。

cfb 基因为 B 群链球菌特有基因 (GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor-specific gene), 它编码一种膜外蛋白称 CAMP 因子或溶血促进因子 Cohemolysin, 能与金黄色葡萄球菌分泌的 B 溶血毒素 β -toxin (神经磷脂酶 sphingomyelinase) 共同作用, 促进绵羊红细胞的溶血及胞膜成分的溶解, 即呈 CAMP 反

应^[18-19]。CAMP 因子的共溶血现象已被作为临床诊断、鉴别无乳链球菌的一个重要指标之一。同时 CAMP 因子被认为是一种强毒力因子, 在细菌入侵宿主细胞与抗吞噬作用等方面起重要作用。但最新的研究发现, *cfb* 基因敲除的 GBS 在抵抗吞噬作用、入侵宿主细胞、突破血脑屏障和毒力等方面与野生型菌株相比并没有明显的差异, 在引发败血症与致死方面也没有显著不同, 因此 CAMP 因子的功能尚需进一步的确定^[19], 但 CAMP 因子在 GBS 菌株间的高保守性说明在细菌生态大环境中该毒素具有进化上的优势。CAMP 类似因子在 A、C 和 G 群链球菌中也有发现, 但它们的编码基因同源性较低, 因此 CAMP 因子编码基因 *cfb* 可用于 GBS 的分子鉴别。本研究获得各分离株的 *cfb* 完整的编码框, BLAST 分析显示它们与 GenBank 上登录的无乳链球菌的 *cfb* 序列高度同源(均为 99%), 而与乳房链球菌、化脓性链球菌的同源性为 66.1%–63.6%, 因此根据 *cfb* 基因可进一步确定这些分离菌株为 GBS。本研究结果也说明, *cfb* 基因比 16S rRNA 基因具有更强的分辨能力, 更适合于无乳链球菌的鉴定。综合生理生化 and 分子鉴定结果, 以及分离菌株回归感染实验结果可确定引发 2009 年夏季高温期间广东和海南主养区罗非鱼爆发病的病原菌为无乳链球菌。

本研究在采样调查过程中发现, 出现爆发病的罗非鱼养殖场处于不同的地理位置, 比如肇庆、湛江分别位于粤西与粤南, 珠海位于广东东南部, 相互间相隔数百公里, 广东与海南距离更远且被琼州海峡所分隔, 但各地爆发病的发生几乎是在同一时间, 正是两省持续高温的时期, 病鱼的症状基本相同, 体色发黑, 单侧或双侧眼球突出, 严重者病鱼眼角膜白浊, 病鱼口腔、下颌、鳃盖充血, 肠壁明显变薄透明, 肝脏、胆囊肿大, 濒死病鱼游动不正常、打转等。从不同地点分离到的菌株, 均具有相近的生理生化特性。药敏试验显示不同菌株对于药物的敏感性存在一定的差异。在生产实际中也发现同一药物对于不同池塘的养殖罗非鱼的治疗控制效果不同, 这可能是与不同菌株间药物敏感性的差别有关, 也因此增加了罗非鱼链球菌病防治的难度, 且易造成滥用药物引发药物残留的风险和隐患。这提示不同菌株间可能存在不同的血清型或者具有不同的耐药因子。王丽平等检测了猪源链球菌对 32 种抗菌药

物的敏感性, 结果显示临床分离的 65 株猪源链球菌株以耐药菌为主, 且 96.6% 的菌株呈多重耐药^[20]。研究表明, 动物源性大肠杆菌的耐药谱普遍较人源大肠杆菌的耐药谱广泛, 且耐药强度也较人源大肠杆菌强^[21]。作为重要的经济鱼类, 在罗非鱼病害的药物防控过程中应特别关注正确合理的用药, 以确保养殖产品的食用安全。进一步开展病原菌的致病因子、耐药基因和抗原基因的研究, 将有助于高效疫苗的开发, 实现对链球菌病的有效防控, 保证我国罗非鱼养殖产业的健康可持续发展。

参 考 文 献

- [1] Pier GB, Madin SH. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic Streptococcus isolated from an Amazon Freshwater Dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int J Syst Bacteriol*, 1976(26): 545–553.
- [2] Eldar A, Lawhon S, Frelief PF, et al. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rDNA and of whole rRNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **151**(2): 151–162.
- [3] Park YK, Nho SW, Shin GW, et al. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vet Microbiol*, 2009, **136**(1/2): 76–81.
- [4] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析. 中山大学学报自然科学版(*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*), 2007, **46**(2): 68–71.
- [5] Perera RP, Johnson SK, Collins MD, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids. *J Aquat Anim Health*, 1994(6): 335–340.
- [6] Zhou SM, Xie MQ, Zhu XQ, et al. Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China. *Journal of Fish Diseases*, 2008, **31**(11): 869–875.
- [7] 卢迈新, 黄樟翰. 罗非鱼遗传育种研究. 上海水产大学学报(*Journal of Shanghai Fisheries University*), 2005, **14**(2): 186–191.
- [8] Streptococcus in Tilapia. 2006. <http://www.thefishsite.com/articles/190>.
- [9] 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? *Aquaculture*, 2008(284): 35–40.
- [10] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴

- 定. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2002, **24**(1): 18–20.
- [11] 甘西, 陈明, 余晓丽, 等. 罗非鱼海豚链球菌 16S rRNA 基因的序列测定和系统进化分析. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2007, **31**(5): 618–623.
- [12] 张新艳. 罗非鱼无乳链球菌的分子鉴定. 福建水产 (*Journal of Fujian Fisheries*), 2007, **4**(4): 5–8.
- [13] Mata AI, Gibello A, Casamayor A, *et al.* Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(5): 3183–3187.
- [14] Evans JJ, Pasnik DJ, Klesius PH, *et al.* First report of *Streptococcus agalctiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 2006, **42**(3): 561–569.
- [15] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994: 195–256.
- [16] Messick JB, Berent LM, Cooper SK. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemophilus* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clinical Microbiology*, 1998, **36**(2): 462–466.
- [17] Stackbrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: A Willey-Interscience publication, 1991: 115–175.
- [18] Jurgens D, Sterzik B, Fehrenbech FJ. Unspecific binding of group B streptococcal corydysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J Exp Med*, 1987, **165**(3): 720–732.
- [19] Mary EH, Darin Q, Chia-Jun H, *et al.* CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B streptococcus. *Microb Pathog*, 2008, **44**(1): 84–88.
- [20] 王丽平, 陆承平, 唐家琪. 32 种抗菌药物对临床分离猪源链球菌的体外抗菌活性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, **44**(6): 794–799.
- [21] 雷连成, 江文正, 韩文瑜, 等. 致病性大肠杆菌的耐药性监测. 中国兽医杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 2001, **37**(1): 12–13.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部简介

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 E-mail 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>