

西伯利亚鲟海豚链球菌的分离鉴定及毒力基因检测

邓梦玲, 耿毅*, 刘丹, 周燕, 汪开毓,
黄小丽, 陈德芳, 余泽辉, 陈成
(四川农业大学动物医学院, 四川雅安 625014)

摘要: 2013 年 8—9 月, 四川雅安汉源湖养殖的西伯利亚鲟发生一种以体表溃疡、内脏出血和心外膜囊肿为特征的传染病。为明确其病因, 本研究从自然发病鱼的肝、脾和肾进行了病原菌的分离、人工感染、分离菌的表型特征和分子生物学特征的检测。结果从患病鱼体内分离到一株 G^+ 链状球菌 (Ab130920), 人工感染实验证实了其病原性, 生理生化特性与海豚链球菌 (ATCC29178) 基本一致; 16S rDNA 序列 (GenBank 登录号: KJ162337) 与 GenBank 中 *S. iniae* 16S rDNA 序列同源性最高, 在以 16S rDNA 序列及其 GenBank 中同源性较高的相关序列构建的系统发育树上, 分离菌与海豚链球菌聚为一支; 同时, 在基于 *S. iniae* *lctO* 基因的特异性 PCR 检测中, 从分离株基因组 DNA 扩增出预期大小的 870 bp 条带, 进而鉴定分离菌 Ab130920 为 *S. iniae*。在对 *cpsD*、*simA*、*sagA*、*pdi* 和 *scpI* 等 5 种 *S. iniae* 毒力基因的多重 PCR 检测中, 分离菌均扩增出相应大小的特异性片段, 表明其为一毒力较强的菌株, 与人工感染实验的高致病性结果相佐证; 药物敏感性检测发现其对阿莫西林、强力霉素、氟苯尼考等抗菌药物敏感, 但对新生霉素、利福平、氧氟沙星耐药。

关键词: 西伯利亚鲟; 海豚链球菌; 16S rDNA; *lctO* 基因; 毒力基因

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鲟产业作为我国新兴的冷水鱼产业, 近 20 年来取得了快速发展, 形成了包括种业、繁殖、养殖、加工和物流在内的产业技术体系和产业链, 我国已成为全球第一的鲟鱼养殖大国^[1], 主要养殖种类有施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*)、西伯利亚鲟 (*A. baerii*)、俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedtii*) 和杂交鲟等。西伯利亚鲟, 属鲟形目 (Acipenseriformes), 鲟科 (Acipenseridae), 鲟属 (*Acipenser*), 1996 年首次引入中国, 因其具有生长速度快, 适应性强, 肉厚骨软、营养丰富、味道鲜美和鱼籽酱品质高等优点, 已成为我国目前鲟鱼养殖的主导品种之一。但随着养殖规模和养殖密度扩大, 养殖环境的不断恶化, 疾病对鲟产业发展的影响日趋严重, 已有寄生虫病、细菌性病、病毒性病与非生物性病的报道, 尤以细菌性病的危害较大。目前报道的主要有嗜水气

单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[2]、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)、豚鼠气单胞菌 (*A. carvia*)、类志贺单胞菌 (*Plesimonas shigelloides*)^[3]、停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)^[4] 和海豚链球菌 (*S. iniae*)^[5] 等引起的相关疾病。

自 1958 年 Hoshina 等^[6]首次报道日本养殖虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的链球菌病以来, 链球菌病已成为全球性的严重危害多种鱼类的疾病。目前发现的鱼类主要致病性链球菌有海豚链球菌、无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 和停乳链球菌等^[7]。其中海豚链球菌隶属链球菌科 (Streptococcaceae), 链球菌属 (*Streptococcus*), 是水生动物的主要病原之一, 主要引起鱼类的脑膜脑炎及败血症等^[7]。自 1976 年从亚马逊淡水海豚 (*Inia geoffrensis*) 皮下脓肿首次分离以来, 海豚

收稿日期: 2014-07-16 修回日期: 2014-11-04

资助项目: 四川省科技支撑计划 (2014NZ0027)

通信作者: 耿毅, E-mail: gengyisicau@126.com

链球菌感染逐渐在世界范围流行,可感染多种淡水和海水养殖鱼类以及野生鱼类,如罗非鱼,虹鳟,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*),银大麻哈鱼(*O. kisutch*),红鼓鱼(*Sciaenops ocellatus*),尖吻鲈(*Lates calcarifer*)和纹腹叉鼻鲀(*Arothron hispidus* L.)等^[8],给水产养殖业造成巨大的经济损失。在我国已有罗非鱼^[9],红鼓鱼^[10]和斑点叉尾鲷^[11]等感染 *S. iniae*,并导致严重经济损失的报道。

2013 年 8—9 月,四川雅安汉源湖养殖的西伯利亚鲟发生一种以体表溃疡、内脏出血和心外膜上囊肿为特征的传染性疾病,累计死亡率达 40% 以上,给养殖户造成严重的经济损失。本研究从自然发病鱼体内进行了病原菌的分离,并通过表型特征测定、16S rDNA 序列分析和乳酸氧化酶基因(*lctO*)特异性 PCR 检测鉴定其为海豚链球菌,首次报道了海豚链球菌对西伯利亚鲟的自然感染致病;同时进行了病原菌药物敏感性及其毒力基因的检测,以期为该病的有效防治与致病机制探讨提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

患病西伯利亚鲟,体质量 500~1 000 g,由四川雅安汉源湖某养殖场送检;健康西伯利亚鲟,体质量(152±6.7)g,购于四川峨眉某西伯利亚鲟养殖场。

1.2 主要试剂

脑心浸液培养基(BHI),MH 培养基;细菌生化微量鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 病原菌的分离与人工感染

无菌条件下,从病鱼肝、脾和肾取样划线接种于脑心浸液琼脂平板(BHIA),28℃ 培养 24~48 h,挑取形态大小一致的单个优势菌落在 BHI 平板上再次划线,获得纯培养的菌株。将纯化菌株转接到脑心斜面培养基于 4℃ 保存备用。

将获得的优势纯培养菌株 Ab130920 接种于 BHI 平板,28℃ 恒温培养 36 h,用 0.8% 无菌生理盐水洗下,麦氏比浊法调整细菌浓度为 1.5×10^8 , 1.5×10^7 , 1.5×10^6 和 1.5×10^5 CFU/mL。健康西伯利亚鲟经实验室暂养 7 d 后,采用腹腔注射

的方式,分别注射各浓度菌液 0.2 mL,10 尾/组。对照组注射等量生理盐水。接种后观察鱼的症状和发病死亡情况,对死亡鱼及时剖检和致病菌再次分离,并参照 Mata 等^[12]的方法,设计合成一对特异性扩增 *S. iniae lctO* 基因的引物(上游引物:5'-AAGGGGAAATCGCAAGTGCC-3',下游引物:5'-ATATCTGATTGGGCCGT-CTAA-3'),进行特异性 PCR 检测(参照 1.6)。

1.4 分离菌的表型特征与药物敏感性检测

观察分离菌的菌落形态,革兰氏染色与磷钨酸负染观察细菌形态。同时挑取单个菌落接种于微量生化反应管,28℃ 培养 48 h,观察结果,根据《伯杰氏系统细菌学手册》^[13]对菌株进行初步鉴定。药敏实验参照 NCCLS 抗微生物药物敏感性实验执行标准^[14],采用纸片法进行。分离菌接种 BHI 液体培养基,28℃ 震荡培养 24 h,麦氏比浊法调整菌液浓度为 1.0×10^8 CFU/mL,将菌液均匀涂布 MH 平板,贴上药敏纸片,28℃ 培养 24 h,测量抑菌圈大小并判定结果。

1.5 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

取对数生长期的新鲜菌液,离心收集菌体,用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA。采用一对扩增细菌 16S rRNA 基因的通用引物(上游引物:5'-AGAGTTTGTATCCTGGC-TCAG-3';下游引物:5'-TACGGCTACCTTGTT-ACGAC-3')^[15]。PCR 反应体系:12.5 μL mix, 8.5 μL ddH₂O, 2 μL primer, 2 μL 模板 DNA。循环条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后,72℃ 延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的大小。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后,送生工生物工程(上海)有限公司测序。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析,调出与该序列相关性较高的核酸序列,采用 DNA star 软件的 Multiple Sequence Alignment 程序进行多序列比对,用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.6 *S. iniae lctO* 基因的 PCR 鉴定

参照 Mata 等^[12]的方法,设计合成一对特异性扩增 *S. iniae lctO* 基因的引物(上游引物:5'-AAGGGGAAATCGCAAGTGCC-3',下游引物:5'-ATATCTGATTGGGCCGTCTAA-3'),对 *S. iniae lctO* 基因进行检测,预期扩增片段大小为 870 bp。

PCR 反应体系:12.5 μL mix,8.5 μL ddH₂O,2 μL primer,2 μL 模板 DNA。循环条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 5 μL 扩增产物,1% 的琼脂糖凝胶,在恒压 100 V 下电泳,置于凝胶成像系统观察 PCR 扩增结果。

1.7 *S. iniae* 主要毒力基因多重 PCR 检测

参照 Baums 等^[16]的方法设计合成分别扩增 *S. iniae* 5 个毒力基因 *scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA* 和 *pdi* 的引物(表 1),对分离株这些毒力基因进行多重 PCR 扩增。PCR 体系:25 μL mix, *simA* 和 *sagA* F/R primer 各 0.6 μL ,*scpI* F/R primer 各 0.5 μL ,*sagA* 和 *cpsD* F/R primer 各 0.3 μL ,2 μL 模板 DNA,ddH₂O 补足至 50 μL 。循环条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,共 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 min,1 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。取 10 μL PCR 扩增产物,1% 的琼脂糖凝胶,在恒压 100 V 下电泳,置于凝胶成像系统观察 PCR 扩增结果。

2 结果

2.1 解剖及临床症状观察

病鱼表现为食欲减退或丧失,消瘦,体色发黑,游动失去平衡,甚至出现间隙性旋转状游动;

腹部膨大,腹部皮肤发黄,点状出血,胸鳍基部出血,部分病鱼体表出现溃疡,发病后 3~7 d 发生死亡,累积死亡率达 40% 以上。病死鱼解剖见腹腔内有一定的血样腹水;胰腺弥漫性出血(图 1-a);脾脏出血,呈暗紫色(图 1-b);肝脏发白,弥散性点状出血,呈花斑状(图 1-c);肾脏明显肿大,出血,呈紫黑色;心包积液,心外膜上出现大量米粒样大小,泡样囊状物(图 1-d);鳃和消化道未见明显病变。

表 1 *S. iniae* 相关毒力基因的引物序列

Tab.1 The primer sequences of related virulence gene of <i>S. iniae</i>		
引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence	目标条带/bp product size
<i>scpI</i> -F	GCAACGGGTTGT CAAAAATC	822
<i>scpI</i> -R	GAGCAAAAGGAGTTGCTTGG	
<i>simA</i> -F	AATTCGCTCAGCAGGTCTTG	994
<i>simA</i> -R	AACCATAACCGCGATAGCAC	
<i>pdi</i> -F	TTTCGACGACAGCATGATTG	381
<i>pdi</i> -R	GCTAGCAAGGCCTTCATTG	
<i>sagA</i> -F	AGGAGGTAAGCGTTATGTTAC	190
<i>sagA</i> -R	AAGAAGTGAATTACTTTGG	
<i>cpsD</i> -F	TGGTGAAGGAAAGTCAACCAC	534
<i>cpsD</i> -R	TCTCCGTAGGAACCGTAAGC	

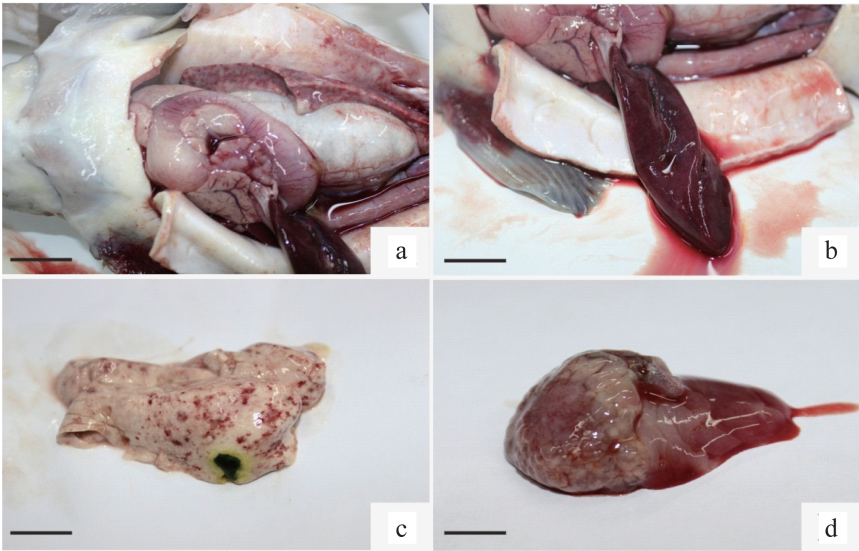


图 1 病鱼的临床特征

(a) 腹腔内血样腹水,胰腺弥漫性点状出血;(b) 脾脏明显出血;(c) 肝发白,弥散性点状出血;(d) 心外膜出现大量泡样的囊状物,标尺 = 4 mm

Fig.1 Clinical signs of moribund fish

(a) bloody ascites in abdomen, petechial hemorrhage in pancrea; (b) splenomegaly with congestion and hemorrhage; (c) petechial hemorrhage in pale liver; (d) numerous grain size nodules on epicardium; bar = 4 mm

2.2 病原菌分离与人工感染实验

从具有典型症状而未死亡的病鱼肝脏、脾脏和肾脏分别取样于 BHI 平板上划线,经 28 ℃ 恒温培养 24 h 获得单一优势菌株 Ab130920。分离菌 Ab130920 腹腔注射人工感染健康西伯利亚鲟,攻毒后 6 h,实验鱼安静伏于缸底;攻毒后 16 h,部分西伯利亚鲟鳍条基部充血、出血,或在水中无方向性窜游;攻毒后 24 h,高浓度组开始发病死亡,其他组实验鱼也多在 3 ~ 7 d 内发病死

亡。发病鱼表现出与自然感染发病鱼相似的症状与病变,而对照组鱼不表现任何症状(表 2)。根据各实验组的死亡率,采用寇氏法计算得分离菌株 Ab130920 对西伯利亚鲟的 LD₅₀ 为 6.4 × 10⁵ CFU/尾,显示其对西伯利亚鲟有较强致病力。从人工感染发病死亡的鱼体内再次分离细菌,获得与菌株 Ab130920 形态特征一致,*S. iniae* *lctO* 基因特异性 PCR 检测为阳性的菌株。

表 2 菌株 Ab130920 的人工感染实验结果
Tab.2 Artificial infection results of the strain Ab130920

组别 group	病原浓度/(CFU/mL) concentration	数量 number	累积死亡数/尾 accumulative death number							死亡率/% mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
1	1.5 × 10 ⁵	10	0	0	0	1	1	1	1	10
2	1.5 × 10 ⁶	10	0	0	1	2	4	4	5	50
3	1.5 × 10 ⁷	10	0	1	3	4	7	8	8	80
4	1.5 × 10 ⁸	10	0	2	5	8	10	10	10	100
对照 control	0.8% NaCl	10	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 分离菌株表型特征与药物敏感性

分离菌在 BHI 平板上形成淡黄色、表面光滑、针尖大小、微隆起、边缘整齐、表面湿润的菌落;普通平板上生长不良。光学显微镜下观察分离菌为 G⁺ 球菌,成链状或成对排列(图 2);电镜下菌株也呈链状排列(图 3)。菌株 Ab130920 的生理生化特征与 *S. iniae* ATCC29178 生理生化特性基本一致(表 3)。分离菌 Ab130920 对 β-内酰胺类、头孢类、大环内酯和四环素类等抗生素敏感,对新生霉素、利福平及氧氟沙星等耐药(表 4)。

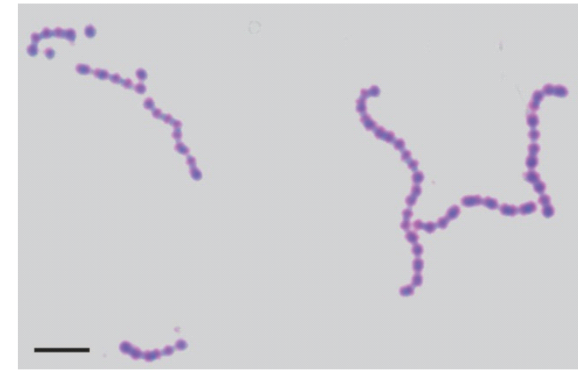


图 2 菌株 Ab130920 的革兰氏染色形态
(标尺 = 10 μm)
Fig.2 Micrograph of strain Ab130920 in Gram staining(bar = 10 μm)

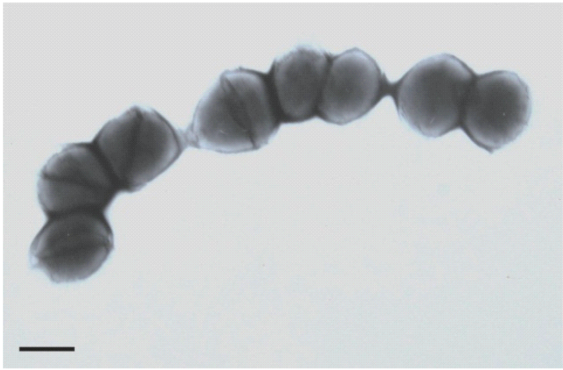


图 3 菌株 Ab130920 负染电镜图,
(标尺 = 1 μm)
Fig.3 Negatively stained electron micrographs of strain Ab130920(bar = 1 μm)

表 3 分离株 Ab130920 的生理生化特性
Tab.3 Biochemical and physiological characteristics of isolated strain Ab130920

项目 item	菌株 strain	
	Ab130920	<i>S. iniae</i> ATCC29178
生长 growth		
pH 9.6	-	-
6.5% NaCl	-	-
8.0% NaCl	-	-
10 ℃	+	+
45 ℃	-	-

续表 3		
项目 item	菌株 strain	
	Ab130920	<i>S. iniae</i> ATCC29178
水解 hydrolysis	-	
精氨酸 arginine	-	-
七叶苷 esculin	+	+
马尿酸 hippurate	-	-
氧化酶 oxidase	-	-
过氧化氢酶 catalase	-	-
产酸 acid from		
阿拉伯糖 arabinose	-	-
菊糖 inulin	-	-
乳糖 lactose	-	-
甘露醇 mannitol	-	+
棉籽糖 raffinose	-	-
核糖 ribose	-	-
山梨醇 sorbitol	-	-
V-P 实验 V-P test	-	-

注:“+”为阳性,“-”为阴性
Notes:“+”. positive;“-”. negative

2.4 16S rRNA 基因序列及系统发育分析

分离菌 Ab130920 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增后获得预期大小约 1 500 bp 的片段,纯化回收的 PCR 产物经生工生物工程(上海)有限公司测序,GenBank 登录号为 KJ162337。分离菌 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 比对后,结果显示分离菌与 GenBank 上 *S.*

iniae 的 16S rRNA 基因序列的同源性最高。在以分离菌 16S rDNA 序列及 GenBank 中其他链球菌属细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树上(图 4),分离菌与 *S. iniae* 聚为一支,同源性达 99.7% 以上。

表 4 分离株 Ab130920 的药物敏感性 Tab.4 Antibiotics sensitivities of the isolated strain Ab130920			
药物 drugs	含药量/ (μg/片) contents	抑菌圈直径/mm diameter of inhibitory zone	Ab130920
阿莫西林 amoxicillin	10	20	S
氨苄青霉 ampicillinum	10	31	S
头孢噻肟 claforan	30	29	S
强力霉素 doxycycline	30	38	S
卡那霉素 kanamycin	30	21	S
新生霉素 novobiocin	30	8	R
克林霉素 clindamycin	2	22	S
阿奇霉素 azithromycin	10	32	S
四环素 tetracycline	30	34	S
氧氟沙星 ofloxacin	5	9	R
诺氟沙星 norfloxacin	10	21	S
罗美沙星 lomefloxacin	18	23	S
恩诺沙星 enoxacin	10	25	S
氟苯尼考 florfenicol	30	32	S
利福平 rifampicin	30	13	R
复方新诺明 SMZ	23.75	8	R

注:“R”为耐药;“S”为敏感
Notes:“R” = resistant;“S” = sensitive

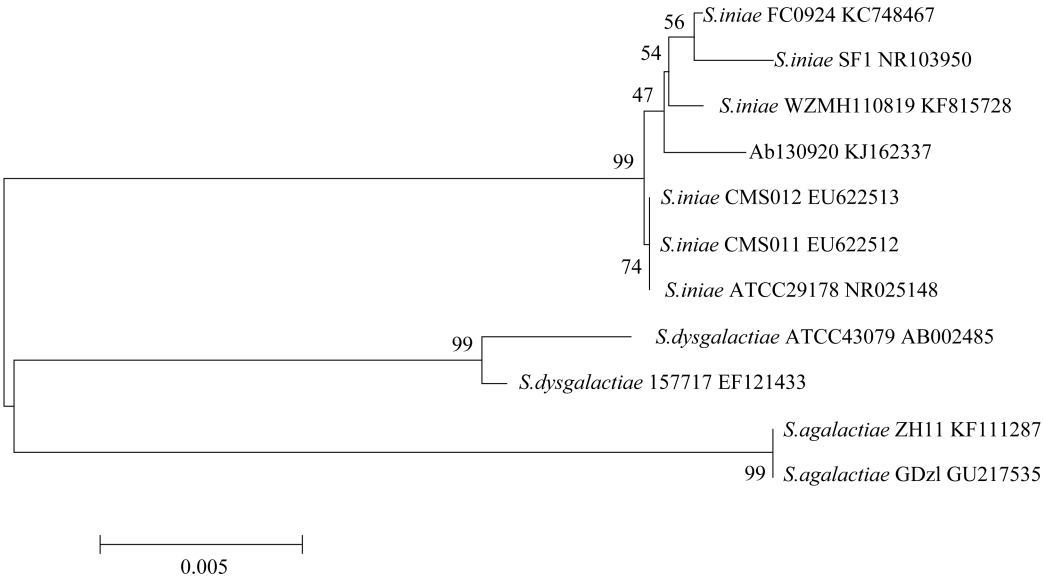


图 4 菌株 Ab130920 16S rRNA 基因序列与相关菌株的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of Ab130920 16S rRNA gene sequence and its relatives

2.5 *S. iniae* *lctO* 基因的 PCR 检测

将 *S. iniae* *lctO* 基因的 PCR 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 5),发现分离株和 *S. iniae* ATCC29178 的基因组 DNA 均特异性扩增出大小约为 870 bp 的条带,与预期大小一致。结合形态学和生理生化鉴定,16S rRNA 基因序列分析及 *S. iniae* *lctO* 基因特异性检测结果,鉴定分离菌 Ab130920 为 *S. iniae*。

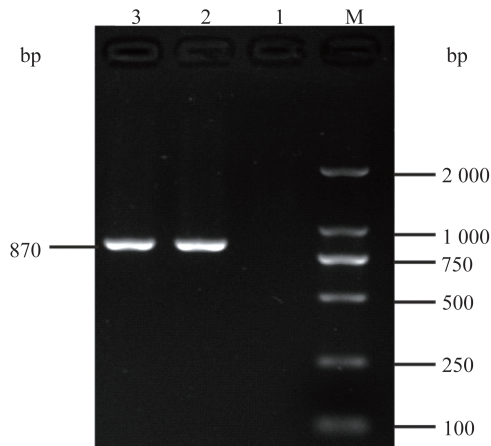


图 5 分离菌 Ab130920 与 *S. iniae* ATCC 29178 *lctO* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

M. DNA 分子质量标准; 1. 阴性对照; 2. *S. iniae* 阳性对照; 3. Ab130920

Fig. 5 The electrophoresis of *lctO* gene PCR amplification of the isolate Ab130920 and *S. iniae* ATCC 29178

M. DL 2000 DNA Marker; 1. negative control; 2. positive control; 3. Ab130920

2.6 *S. iniae* 毒力基因的多重 PCR 检测

对分离株 Ab130920 的 *scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA* 和 *pdi* 5 种毒力基因进行多重 PCR 检测,均扩增出了预期大小的片段(图 6),表明分离株含有这 5 种主要的毒力基因,也进一步证实了该分离株为 *S. iniae*,并从分子水平上确认其致病性,与人工感染实验高致病性的结果相佐证。

3 讨论

目前,已报道的鲟细菌性疾病病原大多属于革兰氏阴性菌,潘厚军等^[4]证实 *S. dysgalactiae* 能够感染西伯利亚鲟并致病,最近在我国养殖的杂交鲟也有 *S. iniae* 感染的报道^[5],预示着链球菌这类革兰氏阳性菌也可能成为危害鲟健康养殖的重要病原。本研究从自然感染患病的西伯利亚鲟体

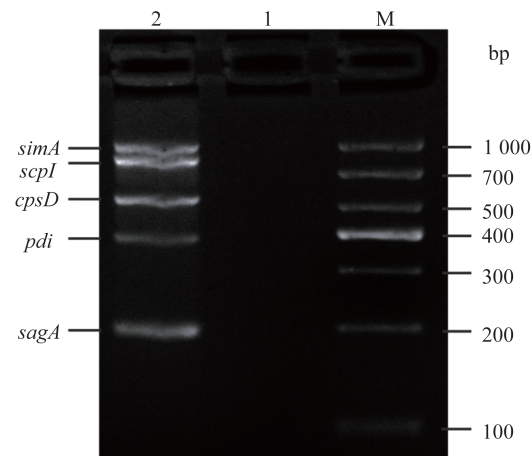


图 6 分离株毒力基因的多重 PCR 检测

M. DNA 分子质量标准; 1. 阴性对照; 2. Ab130920

Fig. 6 The electrophoresis of multiplex PCR for all five virulence factors test

M. DL 1000 DNA Marker; 1. negative control; 2. Ab130920

内分离到病原菌,并通过表型与分子生物学特性鉴定其为 *S. iniae*,表明 *S. iniae* 可自然感染西伯利亚鲟并引起严重的危害。有研究表明,*S. iniae* 感染不同的宿主所引起的临床症状不尽相同,在海豚主要表现为多灶性皮下脓肿^[7];在人类常引起蜂窝织炎,关节炎等;在鱼类则可表现为全眼球炎、脑膜炎和败血症等^[8]。本研究中发现 *S. iniae* 感染西伯利亚鲟主要表现为全身性多器官出血、变性、坏死和脑炎为病变特征的败血症表现,与鱼类 *S. iniae* 感染基本一致^[8],但本次发病鲟心脏外膜出现大量米粒样大小的泡状囊肿的特征性病变,类似的现象在西伯利亚鲟停乳链球菌、维氏气单胞菌感染及在营养缺乏的基础上发生细菌继发感染中也有报道^[5,17-18],而在其他种类的鲟未见报道,究其发生的病理机制是否与西伯利亚鲟的种属特异性有关还有待进一步的研究。

由于 *S. iniae* 不同的地理株系在生理生化特性上存在一定差异,如不同株在精氨酸双水解酶活性、乳糖、水杨苷发酵能力上有不同,存在 α 和 β 2 种溶血类型等,*S. iniae* 最初也被错误地鉴定为 *S. shiloi*。而且目前很多商品化生化鉴定系统如 BioMerieux Vitek, Microscan, APICH 50 和 ATB Expression System 等并未将 *S. iniae* 列入其中,因此仅靠传统的细菌鉴定方法不能准确鉴定 *S. iniae*。随着分子生物学的不断发展,16S rDNA 序列分析已经成为研究细菌亲缘关系的常用方法之一,但因 16S rDNA 的保守性较高,且包含的信息

量较少,对亲缘关系较近的细菌区分能力有限,有时不能将鱼类的 *S. iniae* 和 *S. agalactiae* 分开^[11]。乳酸盐氧化酶基因(*lctO*)是 *S. iniae* 具有较高保守性的一段序列,比 16S rDNA 具有更强的特异性^[11],为此,本研究在测定分离菌 Ab130920 形态学以及生理生化特性的基础上,同时开展了 16S rDNA 序列分析与 *lctO* 基因的特异性检测,从分离菌的表型特征与分子生物学特性上鉴定其为 *S. iniae*,确定了此次引起西伯利亚鲟发病的病原为 *S. iniae*。

与水生动物大多数条件致病菌如嗜水气单胞菌和温和气单胞菌(*A. sobria*)等不同,*S. iniae* 为非条件致病菌,侵袭力强,但也并非所有 *S. iniae* 都是致病株,存在不致病的共生菌株,因此分析其毒力基因对于致病菌的鉴定与致病机制的探讨均尤为重要。据报道,*cpsD*、*simA*、*sagA*、*pdi* 和 *scpI* 是 *S. iniae* 主要的毒力基因,其中 *cpsD* 编码的荚膜多糖是 *S. iniae* 重要的致病因子,它能协助其逃避宿主细胞的清除作用^[19]; *sagA* 编码的细胞溶血素能够使宿主红细胞发生溶血,并破坏正常细胞的细胞膜,导致多组织器官的损伤^[20]; *pdi* 编码的脱乙酰基酶,可增强菌体对溶菌酶的抵抗力,逃避血液免疫和增强菌体对上皮细胞的黏附和入侵^[21]; *simA* 编码的 M 样蛋白不仅能够保护细菌免受巨噬细胞的吞噬,还能占据免疫球蛋白的 Fc 表位,使其失去免疫活性^[22]。总之,这些毒力基因在细菌的侵入、体内移行、繁殖和免疫逃避中起重要作用。本研究中针对 *S. iniae* 的这 5 种毒力基因的多重 PCR 检测中,均扩增出了相应大小的条带,表明其同时具备这 5 种 *S. iniae* 主要的毒力基因,其为一毒力较强的致病菌株,与人工感染实验对西伯利亚鲟高致病性的结果相佐证,同时也进一步从分子水平证实分离菌 Ab130920 为 *S. iniae*。

药物敏感性检测发现, *S. iniae* 分离株 Ab130920 对 β -内酰胺类、头孢类、大环内酯类和四环素类等多数抗菌药物敏感,与人类和多种鱼类中分离到的 *S. iniae* 的药物敏感性基本一致^[13,23],且在本次西伯利亚鲟 *S. iniae* 感染中推荐使用强力霉素与阿莫西林使疫情也得到了有效控制。但抗生素使用带来的诸如耐药性、环境污染和药物残留等负面影响已受到人们的高度关注,其在防控鱼类细菌性疾病上的应用必将受到

限制。为此,疫苗在鱼类 *S. iniae* 感染的防治中成为重要的防治策略之一,国内外学者先后开展了灭活菌苗、灭活 ECPs 苗和减毒活疫苗等的研究^[13];与此同时,营养素在增强鱼类抗 *S. iniae* 感染能力和降低环境因素对鱼类对 *S. iniae* 易感性的影响等方面的研究也逐渐受到人们的重视^[24-25],开展了维生素 A、维生素 E 和硒对鱼类抗 *S. iniae* 感染能力,以及水体中氨氮、亚硝酸盐和养殖密度等环境因子对鱼类 *S. iniae* 易感性的影响,相信随着这些研究的深入与研究成果的不断应用,将会降低单一依赖抗菌药物防治鱼类 *S. iniae* 感染所带来的负面影响。

参考文献:

- [1] Liu X L, Li S S, Zhao M L. Strategy thinking on the development of sturgeon aquaculture industry in China [J]. Chinese Fisheries Economics, 2013, 31 (6): 69 - 76. [刘晓勇, 李鹭鹭, 赵明军. 中国鲟鱼养殖产业发展战略思考. 中国渔业经济, 2013, 31 (6): 69 - 76.]
- [2] Li Y Y, Cao H P, He S, et al. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* strain X1 from *Acipenser baerii* and its antibiotic sensitivity [J]. Microbiology, 2008, 35 (8): 1186 - 1191. [李圆圆, 曹海鹏, 何珊, 等. 鲟源致病性嗜水气单胞菌 X1 的分离鉴定与药敏特性研究. 微生物学通报, 2008, 35 (8): 1186 - 1191.]
- [3] Cao H P, Yang X L, Gao P, et al. Preliminary study of the pathogens isolated from bacterial septicaemia syndrome of sturgeons [J]. Freshwater Fisheries. 2007, 37 (2): 53 - 56. [曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 等. 鲟细菌性败血综合征致病菌的初步研究. 淡水渔业, 2007, 37 (2): 53 - 56.]
- [4] Pan H J, Liu X Y, Chang O Q, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* from *Acipenser baerii* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 891 - 904. [潘厚军, 刘晓勇, 常藕琴, 等. 西伯利亚鲟停乳链球菌的分离, 鉴定与致病性. 中国水产科学, 2009, 16 (6): 891 - 904.]
- [5] Wang X L, Xu L P, Wang J B, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Streptococcus iniae* from hybrid sturgeons (*Husodauricus* female $\times$ *Acipenser schrenckii* male) [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54 (4): 442 - 448. [王小亮, 徐立蒲, 王静波, 等. 杂交鲟海豚链球菌的分离、鉴定及药

- 物敏感性. 微生物学报, 2014, 54(4): 442 - 448.]
- [6] Hoshina T, Sano T, Morimoto Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish [J]. Journal of the Tokyo University of Fisheries, 1958, 44: 57 - 68.
- [7] Woo P T K, Leatherland J F, Bruno D W. Fish diseases and disorders [M]. Volume 3 ed. CABI, 2011.
- [8] Agnew W, Barnes A C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1 - 2): 1 - 15.
- [9] Zhang J, Zhou S M, Li A X. The survey of *Streptococcus iniae* infection of *Oreochromis* spp., *Late olabraxjaponicus* and *Lates calcarifer* from Guangxi [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 161 - 166. [张俊, 周素明, 李安兴. 广东省养殖罗非鱼、海鲈、尖吻鲈海豚链球菌感染调查. 中国水产科学, 2012, 19(1): 161 - 166.]
- [10] Chen D F, Wang K Y, Geng Y, et al. *Streptococcus iniae* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China [J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2011, 63: 593 - 600.
- [11] Mmamba F P, Zhou S, Zhang J, et al. Massive mortality associated with *Streptococcus iniae* infection in cage-cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Eastern China [J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(16): 1722 - 1729.
- [12] Mata A I, Blanco M M, Dominguez L, et al. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value [J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101(2): 109 - 116.
- [13] Whiley R A, Hardie J M. Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL [J]. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009, 3: 655 - 711.
- [14] Wikler M A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 9th ed. Clinical Laboratory Standards Institute, 2009.
- [15] Jensen S, Bergh Ø, Enger Ø, et al. Use of PCR RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(5): 379 - 386.
- [16] Baums C G, Hermeyer K, Leimbach S, et al. Establishment of a Model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Comparative Pathology, 2013, 149(1): 94 - 102.
- [17] Ma Z H, Yang H, Li T L, et al. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* from *Acipenser baerii* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009(10): 1289 - 1294. [马志宏, 杨慧, 李铁梁, 等. 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)致病性维氏气单胞菌的分离鉴定. 微生物学报, 2009(10): 1289 - 1294.]
- [18] Chang O Q, Liu X Y, Pan H J, et al. Histopathological and pathogenicity preliminary research on mulberry heart of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(6): 904 - 911. [常藕琴, 刘晓勇, 潘厚军, 等. 西伯利亚鲟桑葚心病理组织学和病因的初步研究. 水产学报, 2014, 38(6): 904 - 911.]
- [19] Locke J B, Colvin K M, Datta A K, et al. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1279 - 1287.
- [20] Locke J B, Colvin K M, Vark N, et al. *Streptococcus iniae* beta-hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 76(1): 17 - 26.
- [21] Milani C J, Aziz R K, Locke J B, et al. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae* [J]. Microbiology, 2010, 156(2): 543 - 554.
- [22] Locke J B, Aziz R K, Vicknair M R, et al. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2824.
- [23] Facklam R, Elliott J, Shewmaker L, et al. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(2): 933 - 937.
- [24] Lim C, Yildirim A M, Li M H, et al. Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge [J]. Aquaculture, 2009, 298(1 - 2): 76 - 82.
- [25] Guimarães I G, Lim C, Yildirim-Aksoy M, et al. Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* [J]. Animal Feed Science and Technology, 2014, 188: 126 - 136.

Isolation, identification and detection of virulence genes of *Streptococcus iniae* from *Acipenser baerii*

DENG Mengling, GENG Yi*, LIU Dan, ZHOU Yan, WANG Kaiyu,
HUANG Xiaoli, CHEN Defang, YU Zehui, CHEN Cheng
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: During August and September of 2013, a serious infectious disease characterized by body ulcer, internal organs haemorrhage and nodules showing on epicardium occurred in *Acipenser baerii* in Hanyuan Lake, Ya'an, Sichuan Province. To elucidate the aetiology, the bacteria isolated from the livers, spleens and kidneys, and artificial infection, physiological and biochemical analysis and molecular analysis of the isolate were conducted. The results showed that a Gram-positive, chain-forming coccus (Ab130920) was isolated and the strain was lethal to *A. baerii*. Physiological and biochemical characteristics were consistent with *Streptococcus iniae* (ATCC29178); the 16S rRNA gene sequencing analysis by Blast in GenBank indicated that the isolate (KJ162337) showed high levels of similarity to *S. iniae* (99%); A phylogenetic tree was constructed based on the 16S rDNA sequences of the isolate and the homologous sequences of other strains of *Streptococcus*, and the strain and other *S. iniae* strains formed a tight cluster; Meanwhile, expected segment of 870 bp was yielded in the specific PCR detection of *S. iniae* based on *S. iniae* *lctO* gene. As expected, the strain Ab130920 was positive by multiplex PCR for all five virulence genes (*cpsD*, *simA*, *sagA*, *pdi* and *scpI*) test, showing amplification products of the expected sizes, which was further identical the isolate to *S. iniae* and confirmed the pathogenicity of it, and consistent with the result of artificial infection. The drug sensitivity results showed the isolate was sensitive to amoxicillin, doxycycline and florfenicol, etc. but resistant to novobiocin, ofloxacin, rifampicin.

Key words: *Acipenser baerii*; *Streptococcus iniae*; 16S rDNA; *lctO* gene; virulence genes

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