

文章编号: 1000-0615(2019)05-1308-09

DOI: 10.11964/jfc.20180311213

## BALB/c小鼠用于评价尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的研究

刘 灵, 徐 俊, 马 盼, 李安兴\*

(中山大学生命科学学院, 生物防治国家重点实验室,  
广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东广州 510275)

**摘要:** 实验采用BALB/c小鼠作为实验动物, 旨在建立尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力测定的BALB/c小鼠模型。BALB/c小鼠经腹腔注射尼罗罗非鱼源无乳链球菌建立感染模型, 比较了尼罗罗非鱼源无乳链球菌分别感染尼罗罗非鱼和小鼠的LD<sub>50</sub>差异, 分别测定了不同毒力尼罗罗非鱼无乳链球菌对尼罗罗非鱼和小鼠的毒力。结果显示, 小鼠经腹腔注射无乳链球菌, 在24 h内出现死亡现象, 且对小鼠脑、肝脏、脾脏、肾脏等组织造成损伤。3次测定尼罗罗非鱼无乳链球菌TFJ0901对尼罗罗非鱼和小鼠LD<sub>50</sub>分别为 $7.7 \times 10^7$ 、 $2.2 \times 10^8$ 、 $3.5 \times 10^9$  CFU/mL和405、361、419 CFU/只。将无乳链球菌TFJ0901和THN0901感染尼罗罗非鱼( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL)和小鼠(100 CFU/只), 尼罗罗非鱼和小鼠存活率分别为100%、 $6.7\% \pm 5.8\%$ 和100%、0, 其存活率都具有显著性差异。将无乳链球菌TFJ0901和TFJ-F感染尼罗罗非鱼( $3.0 \times 10^8$  CFU/mL)和小鼠(2 500 CFU/只), 尼罗罗非鱼的存活率分别为 $73.3\% \pm 11.5\%$ 和 $80.0\% \pm 10.0\%$ , 存活率差异不显著, 小鼠存活率分别为 $13.3\% \pm 11.5\%$ 和100.0%, 存活率具有显著性差异。研究表明, 本实验成功建立了BALB/c小鼠作为尼罗罗非鱼源无乳链球菌毒力测定的稳定模型, 测定不同毒力的尼罗罗非鱼源无乳链球菌对小鼠毒力与对尼罗罗非鱼毒力一致, 且该模型能够区分尼罗罗非鱼模型难以区分的毒力相近的无乳链球菌。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; BALB/c小鼠; 毒力测定模型

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)具有生长速率快、繁殖能力强、适应性广等优点, 被联合国粮农组织列为世界优良养殖鱼种之一。近年来, 随着养殖密度的加大, 养殖环境的恶化, 导致尼罗罗非鱼链球菌频频大面积暴发<sup>[1]</sup>, 2008年之前, 尼罗罗非鱼病害报道较少, 并且主要是海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)。2009年, 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)首次在海南大面积暴发<sup>[2]</sup>, 此后无乳链球菌成为危害我国尼罗罗非鱼产业的主要病原菌, 发病率和死亡率一直居高不下, 严重影响着整个行业的发展。目前, 尼罗罗非鱼无乳链球菌病已经成为我国乃至全

世界重要的细菌性疾病之一。

无乳链球菌是一种人畜共患的病原菌, 属于链球菌属(*Streptococcus*), 菌体呈卵球形或球形, 直径为0.5~2.0 μm, 常呈对状或链状排列, 有荚膜, 是一种兼性厌氧的革兰氏阳性菌, 具有α、β或γ溶血性<sup>[3]</sup>, 根据Lancefield氏血清学分类法将其归为B群, 又称为B族链球菌。无乳链球菌依据荚膜多糖抗原不同分为10种血清型<sup>[4]</sup>, 其中I a型是感染尼罗罗非鱼的主要血清型<sup>[5]</sup>。

目前, 评价鱼源无乳链球菌毒力的方法主要是通过比较鱼源无乳链球菌对鱼的半数致死剂量。Pridgeon等<sup>[6]</sup>将鱼源无乳链球菌在不同浓

收稿日期: 2018-03-21 修回日期: 2018-06-02

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47-18); 广东省渔港建设和渔业发展专项(2014, 2016)

通信作者: 李安兴, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

度抗生素下传代, 获得了具有耐药性的突变菌株, 在相同感染剂量下, 野生株对尼罗罗非鱼的致死率为100%, 而突变株则不能造成鱼的死亡。Li等<sup>[7]</sup>将鱼源无乳链球菌自然传代获得突变株, 通过感染尼罗罗非鱼后产生的死亡率来判断毒力的强弱。无乳链球菌的毒力会随外界环境的变化而改变, 如不同温度下培养能够使无乳链球菌转录组发生改变, 从而导致无乳链球菌的形态、代谢和毒力产生变化<sup>[8]</sup>。鱼类属于变温动物, 生活在复杂的水环境中, 温度、溶解氧、养殖密度、氨氮盐含量和其他微生物都会影响尼罗罗非鱼对无乳链球菌的敏感程度<sup>[9]</sup>。鱼类对环境的高敏感性使得在无乳链球菌毒力测定实验时需严格控制实验条件, 但国内外对于水生实验动物的养殖系统没有统一的标准, 不同养殖系统中获得的实验结果可能会有较大的差异, 并且鱼的个体差异及复杂的遗传背景也可能导致实验结果不同。小鼠作为模型动物被广泛地应用, 包括使用小鼠测定人源无乳链球菌毒力<sup>[10]</sup>。本实验采用BALB/c小鼠作为鱼源无乳链球菌毒力测定的标准实验动物, 希望能够建立鱼源无乳链球菌毒力测定的标准动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

实验所用菌株为3株尼罗罗非鱼源无乳链球菌, 2株为野生菌株: TFJ0901和THN0901, 其中TFJ0901是天然弱毒株, 分离自中国福建某养殖场暴发链球菌病的尼罗罗非鱼; THN0901是强毒株, 分离自海南某渔场。无乳链球菌TFJ-F由天然弱毒TFJ0901株通过抗生素传代再致弱获得的菌株, 由本实验室保存。

### 1.2 实验动物

BALB/c系封闭群清洁级小鼠: 雌雄各半, 6周龄大小, 体质量约为18 g, 购买于中山大学东校区实验动物中心。实验动物购买后, 室温下暂养1周, 若无异常情况, 即可用于实验。健康全雄尼罗罗非鱼体质量在20~30 g, 购买于广东省尼罗罗非鱼良种场。购买后在水族箱中暂养1周, 水温30℃, 随机选取10尾尼罗罗非鱼解剖, 于内脏进行微生物分离, 若没有分离到无乳链

球菌即可用于实验。

### 1.3 攻毒及组织切片制备

将20只BALB/c小鼠随机分为2组, 每组10只, 实验组经腹腔注射 $1.0 \times 10^5$  CFU天然弱毒TFJ0901株, 以注射等量的PBS缓冲液作为对照。取濒死的小鼠血液、脑、肝脏、脾脏及肾脏组织进行平板划线, 确定小鼠的死亡是由无乳链球菌感染引起。取濒死小鼠的脑、肝脏、脾脏及肾脏组织于10%的甲醛溶液进行固定, 将组织修剪碎, 水洗30 min后酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后切片, 厚度为4~7 μm, 脱蜡和复水后用苏木精-伊红(H.E)染色, 随后用中性树脂胶进行封片, 光学显微镜下观察组织病理病变。

### 1.4 尼罗罗非鱼模型稳定性测定

实验采取不同时间、不同批次的尼罗罗非鱼进行了3次半数致死剂量的测定。每次实验将40尾尼罗罗非鱼随机分成4个组, 每组10尾。3个实验组分别注射0.1 mL不同浓度天然弱毒TFJ0901株菌液, 以注射等量的PBS缓冲液作为对照组。观察并记录尼罗罗非鱼活动状态及死亡情况, 直至尼罗罗非鱼不再出现死亡, 对死亡的尼罗罗非鱼进行组织平板划线, 确定尼罗罗非鱼的死亡是由无乳链球菌感染而引起。

### 1.5 BALB/c小鼠模型稳定性测定

实验采取不同时间、不同批次的BALB/c小鼠进行了3次半数致死剂量的测定。每次实验将40只小鼠随机分成4个组, 每组10只(雌雄各半)。3个实验组分别注射0.1 mL不同浓度天然弱毒TFJ0901株, 以注射等量的PBS缓冲液作为对照组。观察并记录小鼠的活动状态及死亡情况, 直至小鼠不再出现死亡。对濒死的小鼠进行组织平板划线, 确定小鼠的死亡是由无乳链球菌感染而引起。

### 1.6 2个模型测定天然弱毒TFJ0901株与强毒THN0901株的毒力

以BALB/c小鼠和尼罗罗非鱼分别为实验动物模型测定天然弱毒TFJ0901株与强毒THN0901株的毒力。将90尾尼罗罗非鱼分为3个组, 每组30尾, 每个平行10尾鱼, 3个组的尼罗罗非鱼分别经腹腔注射0.1 mL PBS缓冲液、天然弱毒

TFJ0901株和强毒THN0901菌液,注射浓度为 $1.0 \times 10^7$  CFU/尾,观察并记录死亡情况;将45只BALB/c小鼠分为3个组,每组3个平行,每个平行5只小鼠。3个组分别注射0.1 mL PBS缓冲液、天然弱毒TFJ0901株和强毒THN0901株菌液,注射浓度为100 CFU/只,观察并记录死亡情况。

### 1.7 2个模型比较天然弱毒TFJ0901株与再致弱毒TFJ-F株的毒力

以BALB/c小鼠和尼罗罗非鱼分别为实验动物模型测定天然弱毒TFJ0901株与无乳链球菌致弱株TFJ-F的毒力。将90尾尼罗罗非鱼分为3个组,每组3个平行,每个平行10尾鱼,3个组分别经腹腔注射0.1 mL PBS缓冲液、天然弱毒TFJ0901株和再致弱毒TFJ-F株菌液,注射浓度为 $3.0 \times 10^8$  CFU/尾,观察并记录死亡情况;将45只BALB/c小鼠分为3个组,每组3个平行,每个平行5只小鼠。3个组分别注射0.1 mL PBS缓冲液、天然弱毒TFJ0901株和再致弱毒TFJ-F菌液,注射浓度为2 500 CFU/只,观察并记录死亡情况。

### 1.8 数据处理

实验采用Bliss法计算无乳链球菌对BALB/c小鼠的半数致死剂量,采用SPSS 19.0软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way, ANOVA),差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。采用GraphPad Prism 5.0软件绘图。

## 2 结果

### 2.1 攻毒反应及病理组织切片分析

BALB/c小鼠经腹腔注射感染致死剂量的天然弱毒TFJ0901株后3天内全部死亡,对照组小鼠饮食和行为均无异常;感染后的小鼠均呈现急性死亡。对濒死小鼠的血液、脑、肝脏、脾脏及肾脏组织进行平板划线,将分离得到的细菌进行菌落形态学观察以及革兰氏染色确定为无乳链球菌。取感染后濒死小鼠的脑、肝脏、脾脏、肾脏等组织进行病理切片观察(图版-1),BALB/c小鼠感染天然弱毒TFJ0901株后,脑部出现大面积的细胞溶解,形成大空洞,在未溶解的区域有大量的炎症细胞浸润,小胶质细胞增生;脑膜出现充血、出血的现象(图版-2)。肝脏严重充血,大量细胞空泡化,血管中伴随着少量的炎症细胞

(图版-4)。脾脏细胞连成一片,出血、坏死、淋巴滤泡面积减少,部分淋巴区域坏死(图版-6)。肾脏部分区域充血,肾小球急性炎症肿胀,肾小管上皮脱落(图版-8)。

### 2.2 尼罗罗非鱼模型稳定性测定

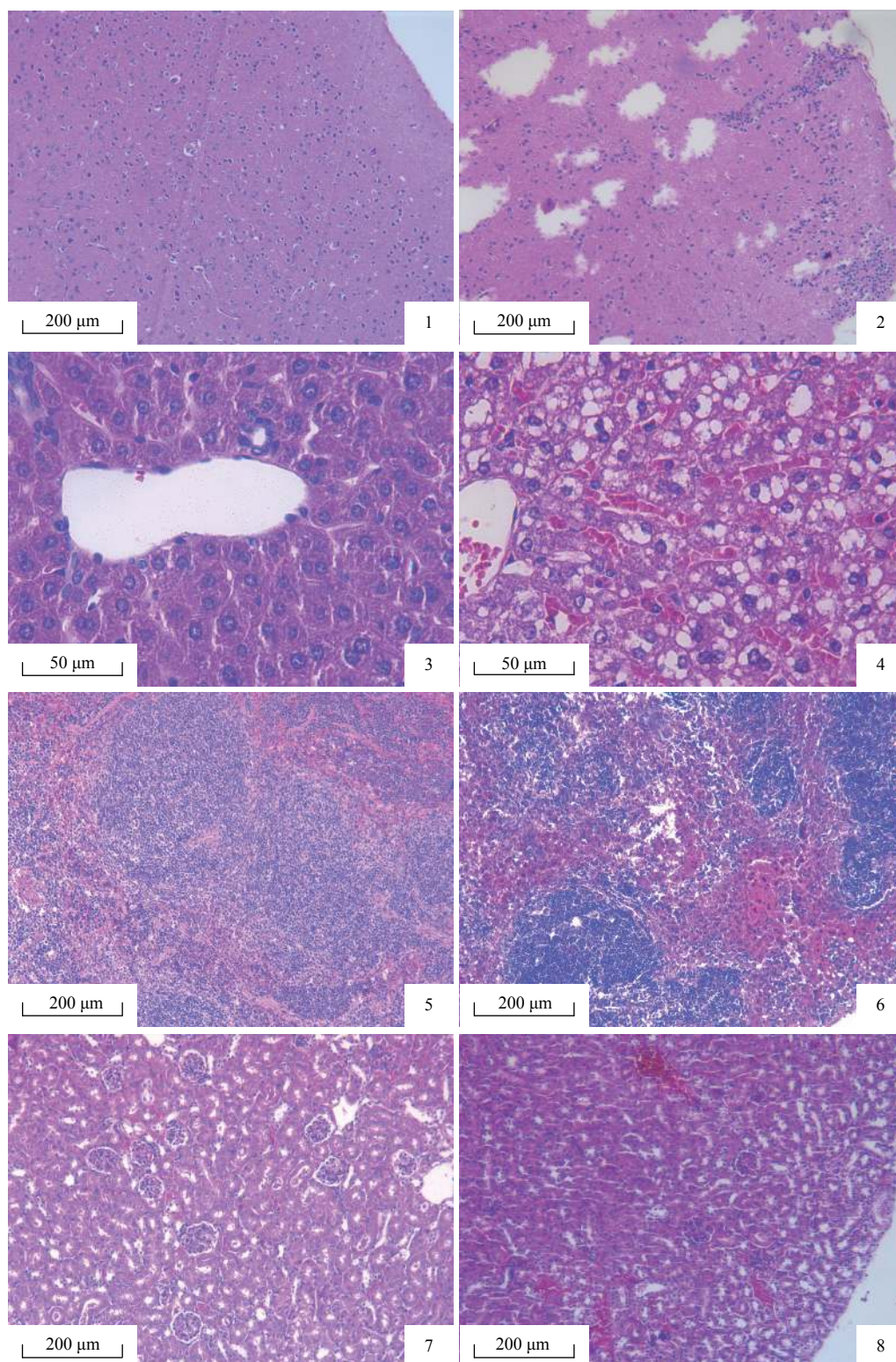
在测定天然弱毒TFJ0901株对尼罗罗非鱼毒力的3次实验过程中,第1次实验结果显示,当感染剂量分别为 $2.0 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 和 $8.0 \times 10^7$  CFU/尾时,尼罗罗非鱼死亡率分别为10%、30%和50%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为 $7.7 \times 10^7$  CFU/尾, $LD_{50}$  95%的可信限为 $4.5 \times 10^7 \sim 6.9 \times 10^8$  CFU/尾(图1-a);第2次实验结果,当感染剂量为 $1.0 \times 10^8$ 、 $2.0 \times 10^8$ 和 $4.0 \times 10^8$  CFU/尾时,尼罗罗非鱼死亡率分别为20%、50%和70%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为 $2.2 \times 10^8$  CFU/尾, $LD_{50}$  95%的可信限为 $9.9 \times 10^7 \sim 8.6 \times 10^8$  CFU/尾(图1-b);第3次实验结果显示,当感染剂量分别为 $1.0 \times 10^9$ 、 $2.0 \times 10^9$ 和 $4.0 \times 10^9$  CFU/尾时,尼罗罗非鱼的死亡率分别为10%、40%和50%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为 $3.5 \times 10^9$  CFU/尾, $LD_{50}$  95%的可信限为 $2.0 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$  CFU/尾(图1-c)。

### 2.3 BALB/c小鼠模型稳定性测定

在测定天然弱毒TFJ株对BALB/c小鼠毒力的3次实验过程中,第1次实验结果显示,当感染剂量分别为450、675和900 CFU/只时,小鼠的死亡分别为50%、90%和80%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为405 CFU/只, $LD_{50}$  95%的可信限为302~580 CFU/只(图1-d);第2次实验结果显示,当感染剂量分别为196、384和768 CFU/只时,小鼠的死亡分别为20%、50%和90%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为361 CFU/只, $LD_{50}$  95%的可信限为225~546 CFU/只(图1-e);第3次实验结果显示,当感染剂量分别为186、372和744 CFU/只时,小鼠的死亡分别为30%、40%和70%,通过Bliss法得出半数致死剂量 $LD_{50}$ 为419 CFU/只, $LD_{50}$  95%的可信限为243~567 CFU/只(图1-f)。

### 2.4 2个模型测定天然弱毒TFJ0901株与强毒THN0901株毒力的结果

在尼罗罗非鱼模型中,分别感染天然弱毒TFJ0901株和强毒THN0901株后,尼罗罗非鱼存活率



图版 BALB/c小鼠感染天然弱毒TFJ0901株后病理切片图

1、3、5及7分别代表正常小鼠脑、肝脏、脾脏及肾脏组织切片图; 2、4、6及8代表感染无乳链球菌后小鼠脑、肝脏、脾脏及肾脏组织切片图

**Plate Pathological section of BALB/C mice after infection with natural attenuated strain TFJ0901**

1, 3, 5 and 7 represent the brain, liver, spleen and kidney histological sections of normal mice, respectively; 2, 4, 6 and 8 represent the brain, liver, spleen and kidney histological sections of *S. agalactiae* infection mice, respectively

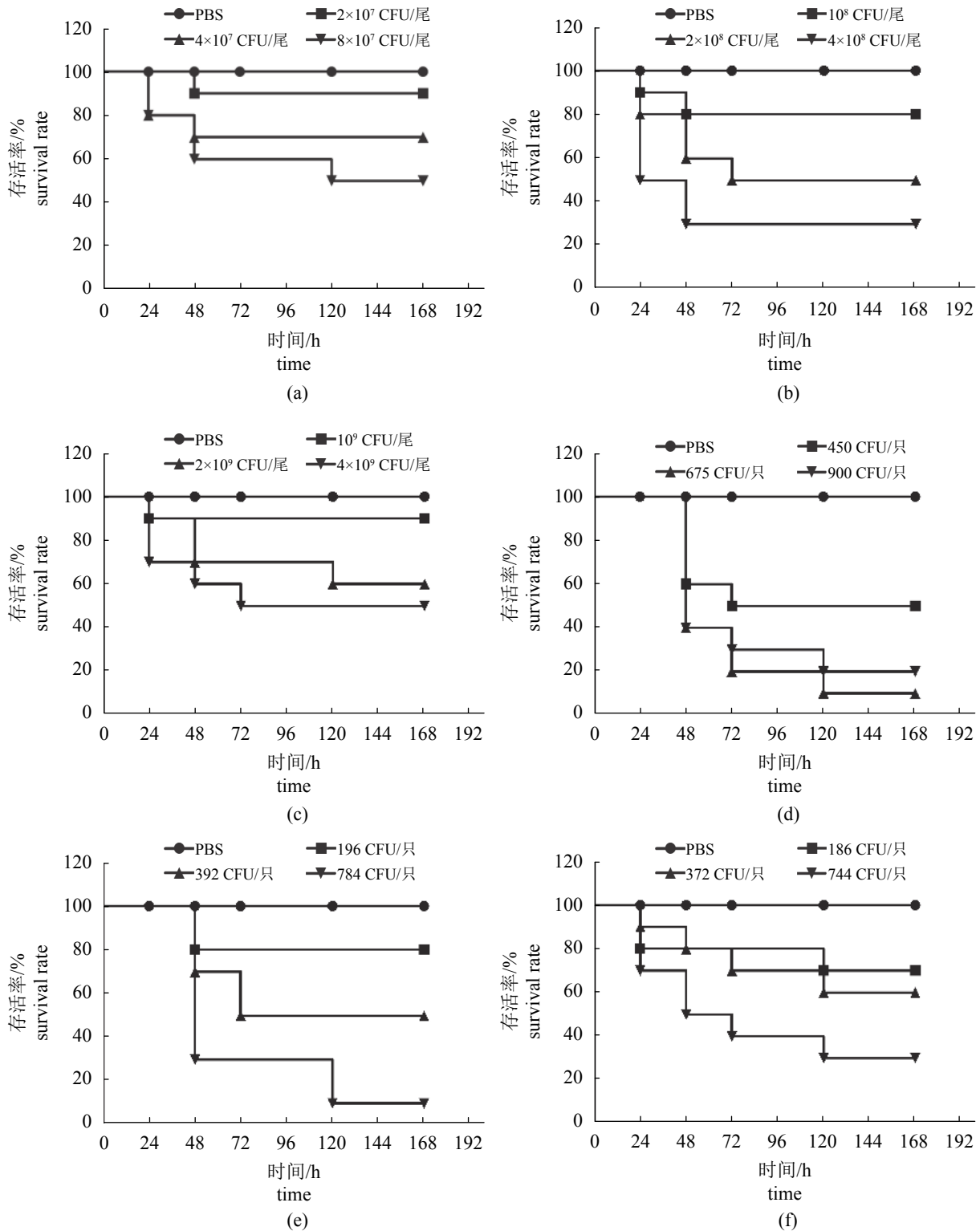


图 1 尼罗罗非鱼模型和BALB/c小鼠模型感染天然弱毒TFJ0901株一周内的存活曲线图

(a), (b), (c) 表示尼罗罗非鱼模型感染天然弱毒TFJ0901株的存活曲线图; (d), (e), (f) 表示BALB/c小鼠模型感染天然弱毒TFJ0901株的存活曲线图

Fig. 1 The survival curves of the *O.niloticus* and the BALB/c mouse after infection with the natural attenuated strain TFJ0901 in a week

(a), (b) and (c) show the survival curves of the *O. niloticus* after infection with the natural attenuated strain TFJ0901; (d), (e) and (f) show the survival curves of BALB/c mouse after infection with the natural attenuated strain TFJ0901

分别为100.0%和6.7%±5.8%，2株菌对尼罗罗非鱼毒力具有显著性差异( $P<0.05$ )；在BALB/c小鼠模型中，感染天然弱毒TFJ0901株后，小鼠的存活率为100.0%，而感染强毒THN0901株后，小鼠全部死亡，2株菌对BALB/c小鼠毒力具有显著性差异( $P<0.05$ )(图2)。

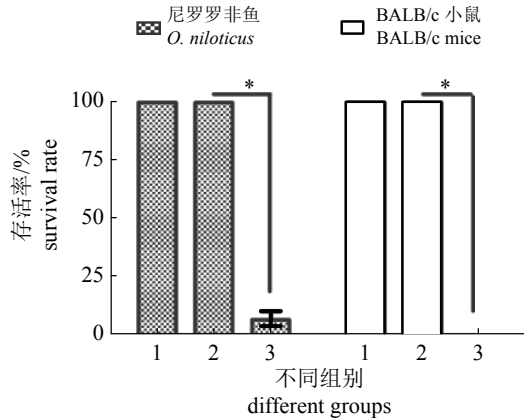


图2 BALB/c小鼠和尼罗罗非鱼感染天然弱毒TFJ0901株和强毒THN0901株后存活情况

1.对照组, 2.无乳链球菌TFJ0901, 3.无乳链球菌THN0901; “\*”显著性差异,  $P<0.05$ ; 下同

Fig. 2 Survival rate of the *O. niloticus* and the BALB/c mouse after infection with the native attenuated strain *S. agalactiae* TFJ0901 and the virulent strain *S. agalactiae* THN0901, respectively

1. PBS, 2. *S. agalactiae* TFJ0901, 3. *S. agalactiae* THN0901; “\*” significant difference; the same below

### 2.5 2个模型比较天然弱毒TFJ0901株与再致弱毒TFJ-F株的毒力

在尼罗罗非鱼模型中，分别感染无乳链球菌TFJ0901和TFJ-F后，尼罗罗非鱼存活率分别为73.3%±11.5%和80.0%±10.0%，2株菌对尼罗罗非鱼毒力差异不显著( $P>0.05$ )，在BALB/c小鼠模型中，感染天然弱毒TFJ0901株后，小鼠的存活率为13.3%±11.5%，而感染再致弱毒TFJ-F株后，小鼠存活率为100.0%，2株菌对BALB/c小鼠毒力差异显著( $P<0.05$ )(图3)。

### 3 讨论

尼罗罗非鱼是中国重要的经济养殖鱼类，近年来，无乳链球菌是中国南方大面积暴发尼罗罗非鱼链球菌病的主要病原<sup>[11]</sup>。不同菌株毒力可能存在不同，判断无乳链球菌毒力强弱最直

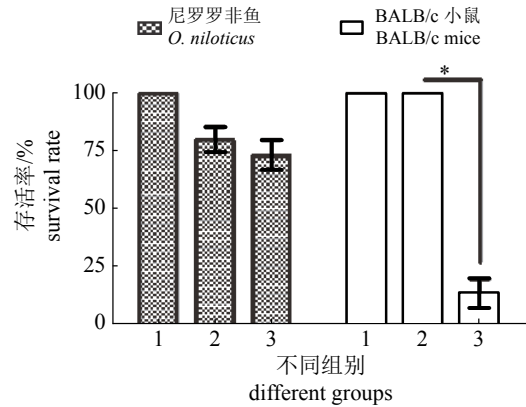


图3 BALB/c小鼠和尼罗罗非鱼感染天然弱毒TFJ0901株和再致弱毒TFJ-F株后存活情况

1.对照组, 2.无乳链球菌TFJ-F, 3.无乳链球菌TFJ0901

Fig. 3 Survival rate of the *O. niloticus* and the BALB/c mouse after infection with the native attenuated strain *S. agalactiae* TFJ0901 and the re-attenuated strain *S. agalactiae* TFJ-F, respectively

1. PBS, 2. *S. agalactiae* TFJ-F, 3. *S. agalactiae* TFJ0901

接的方式是动物感染实验，通过实验动物对无乳链球菌敏感程度来评定菌株毒力的强弱。

鱼作为一种低等变温脊椎动物，其免疫系统受到环境中各种因素的影响，如温度、溶解氧等<sup>[12]</sup>。温度的升高能够提高挪威舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)及尼罗罗非鱼的抗体水平<sup>[13-15]</sup>。在对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的研究中，每天水温升高3 °C，从16°C升高至28 °C后，一些先天性免疫相关因子表达量升高，从而提高先天性免疫<sup>[16]</sup>。对在不同温度下感染无乳链球菌的尼罗罗非鱼转录组数据分析发现，不同温度条件下溶解氧的不同使得尼罗罗非鱼对无乳链球菌的易感程度不同<sup>[9]</sup>。有研究报道，在缺氧条件下免疫尼罗罗非鱼会导致鱼体血清中特异性抗体下降和抗体产生时间的延迟<sup>[17]</sup>。

鱼类对环境的高敏感性使得在使用鱼类作为无乳链球菌毒力测定的实验动物时需要严格控制实验条件，但是国内外对于水生实验动物的养殖系统没有统一的标准，不同养殖系统中得出的实验结果可能会有较大的差异，并且不同种类的尼罗罗非鱼对无乳链球菌抵抗能力具有差异。祝璟琳等<sup>[18]</sup>将无乳链球菌感染4种罗非鱼，发现奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂)抗无乳链球菌能力最强，罗非鱼属内易种间杂交，不同的杂交种间表现差异

不明显,可能是导致无乳链球菌对尼罗罗非鱼致病力差异的原因。本实验结果显示,使用鱼类作为测定无乳链球菌毒力时,实验结果存在不稳定和重复性差的问题。

用致死剂量的无乳链球菌TFJ0901感染BALB/c小鼠,对感染后濒死小鼠组织进行平板划线,结果显示,小鼠的血液和内脏中均分离到大量的无乳链球菌,说明感染鱼源无乳链球菌能够引起小鼠败血症,组织病理学切片分析,显示罗非鱼无乳链球菌能够对小鼠内脏造成严重的急性损伤,同时伴随着脑膜炎。这些临床症状与小鼠感染人源无乳链球菌后症状类似<sup>[19]</sup>,说明尼罗罗非鱼无乳链球菌感染BALB/c小鼠模型构建成功。相比于尼罗罗非鱼,BALB/c小鼠属于近交系,其个体遗传差异较小,是理想的动物实验模型<sup>[20-21]</sup>。本实验中,3次实验的半数致死剂量都在其95%可信限,表明BALB/c小鼠模型测定无乳链球菌毒力结果稳定。

小鼠作为比较人源无乳链球菌毒力强弱的实验动物模型的研究较多。将无乳链球菌野生株和突变株静脉注射到小鼠体内,72 h后野生株能造成50%的小鼠死亡,而注射突变株的小鼠全部存活<sup>[10]</sup>。将无乳链球菌*bsC*基因敲除后,腹腔注射不能使小鼠死亡,野生株则能导致70%的小鼠死亡<sup>[22]</sup>。但是尼罗罗非鱼源无乳链球菌对尼罗罗非鱼毒力与对小鼠毒力是否一致的研究鲜有报道,本实验使用尼罗罗非鱼模型和BALB/c小鼠模型测定天然弱毒TFJ0901株和强毒THN0901株毒力,结果显示,当感染剂量为 $1.0 \times 10^7$  CFU/尾时,天然弱毒TFJ0901株不能导致尼罗罗非鱼死亡,感染强毒THN0901株后尼罗罗非鱼的存活率为 $6.7\% \pm 5.8\%$ ,表明尼罗罗非鱼模型中强毒THN0901株毒力强于天然弱毒TFJ0901株;使用BALB/c小鼠模型测定时,当感染剂量同为100 CFU/只时,感染天然弱毒TFJ0901株的小鼠全部存活,而感染强毒THN0901株的小鼠全部死亡,结果显示BALB/c小鼠模型中,强毒THN0901株毒力强于天然弱毒TFJ0901株。以上结果表明,尼罗罗非鱼无乳链球菌对尼罗罗非鱼模型和BALB/c小鼠模型的毒力强弱具有一致性。

使用尼罗罗非鱼模型和BALB/c小鼠模型测定天然弱毒TFJ0901株和再致弱TFJ-F株毒力的实验结果显示:在尼罗罗非鱼模型中,注射剂量同为 $3.0 \times 10^8$  CFU/尾时,感染天然弱毒TFJ0901株和再致弱TFJ-F株后尼罗罗非鱼的存活率分别为 $73.3 \pm$

$11.5\%$ 和 $80.0\% \pm 10.0\%$ ,组间不存在显著性差异;在BALB/c小鼠模型中,注射剂量同为2 500 CFU/只时,感染天然弱毒TFJ0901株和再致弱TFJ-F株后小鼠的存活率分别为 $13.3\% \pm 11.5\%$ 和 $100.0\%$ ,组间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。表明BALB/c小鼠模型能够精准地区分尼罗罗非鱼源无乳链球菌毒力,将尼罗罗非鱼模型难以区分毒力的菌株区分开来。相比于鱼类,小鼠具有更加完善的免疫系统,这可能是小鼠模型对尼罗罗非鱼源无乳链球菌更加敏感,并且能够更加精确地将不同毒力的菌株区分开来的原因。

本次实验首次使用BALB/c小鼠作为尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力强弱的实验动物,克服了鱼类作为实验动物不稳定性的缺点,其毒力强弱结果与鱼作为实验动物的结果一致。BALB/c小鼠模型能够将尼罗罗非鱼模型难以区分毒力的菌株区分开来,具有更高的精确性。

#### 参考文献:

- [1] 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.  
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(in Chinese).
- [2] 祝璟琳,杨弘,邹芝英,等. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596.  
Zhu J L, Yang H, Zou Z Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *streptococcus* from tilapias *Oreochromis niloticus* cultured in Hainan[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(4): 590-596(in Chinese).
- [3] Naccari C, Niutta P P, Trombetta D, et al. Pharmacokinetics and efficacy of teicoplanin against intramammary infections in sheep[J]. *Veterinary Record*, 2009, 165(1): 19-22.
- [4] Amundson N R, Flores A E, Hillier S L, et al. DNA macrorestriction analysis of nontypeable group B streptococcal isolates: clonal evolution of nontypeable and type V isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(2): 572-576.
- [5] 汪开毓,付希,肖丹,等. 罗非鱼源无乳链球菌*cpsE*基因的克隆和分子特性分析[J]. 水产学报, 2011, 35(5):

- 660-667.
- Wang K Y, Fu X, Xiao D, *et al.* Cloning and molecular characterization of *cpsE* gene of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(5): 660-667(in Chinese).
- [ 6 ] Pridgeon J W, Klesius P H. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparfloracin[J]. *Vaccine*, 2013, 31(24): 2705-2712.
- [ 7 ] Li L P, Wang R, Liang W W, *et al.* Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 955-963.
- [ 8 ] Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green N M, *et al.* Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2785.
- [ 9 ] Wang L, Liu P, Wan Z Y, *et al.* RNA-Seq revealed the impairment of immune defence of tilapia against the infection of *Streptococcus agalactiae* with simulated climate warming[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 679-689.
- [10] Seo H S, Mu R, Kim B J, *et al.* Binding of glycoprotein Srr1 of *Streptococcus agalactiae* to fibrinogen promotes attachment to brain endothelium and the development of meningitis[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10): e1002947.
- [11] 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.
- 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(in Chinese).
- [12] Tort L. Stress and immune modulation in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1366-1375.
- [13] Chen W H, Sun L T, Tsai C L, *et al.* Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 126(1): 90-100.
- [14] Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M, *et al.* Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1-4): 491-500.
- [15] Varsamos S, Flik G, Pepin J F, *et al.* Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(1): 83-96.
- [16] Huang Z H, Ma A J, Wang X A. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(8): 619-627.
- [17] Gallage S, Katagiri T, Endo M, *et al.* Influence of moderate hypoxia on vaccine efficacy against *Vibrio anguillarum* in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 271-281.
- [18] 祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 四个罗非鱼选育品种抗链球菌病能力差异研究[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1232-1241.
- Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, *et al.* Study on resistant difference among four bleeding species of tilapia *Oreochromis* spp. following *Streptococcus agalactiae* challenge[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1232-1241(in Chinese).
- [19] van Sorge N M, Quach D, Gurney M A, *et al.* The group B streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199(10): 1479-1487.
- [20] 刘一, 隋丽华, 曾林, 等. BALB/c小鼠感染大肠杆菌O127模型的建立及TGF- $\beta$ 1因子的荧光定量检测[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2): 13-16.
- Liu Y, Sui L H, Zeng L, *et al.* Establishment of a mouse model of *Escherichia coli* O127 infection and real-time PCR detection of TGF- $\beta$ 1 expression[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2013, 21(2): 13-16(in Chinese).
- [21] von Kockritz-Blickwede M, Rohde M, Oehmcke S, *et al.* Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *Staphylococcus aureus* infection in the mouse model[J]. *The American Journal of Pathology*, 2008, 173(6): 1657-1668.
- [22] Buscetta M, Papasergi S, Firon A, *et al.* FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(30): 21003-21015.



## Virulence evaluation of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) using BALB/c mice

LIU Ling, XU Jun, MA Pan, LI Anxing\*

(State Key Laboratory of Biocontrol, Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** *Streptococcus agalactiae* is one of the major pathogens of tilapia (*Oreochromis niloticus*). At present, the virulence of strains was evaluated mainly by comparing the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) to tilapia. However, tilapia as experimental animals for evaluation of the virulence of *S. agalactiae* was often unstable. In this experiment, BALB/c mice were used as experimental animals, in order to establish a method for the determination of virulence of *S. agalactiae*. BALB/c mice were injected intraperitoneally with tilapia *Streptococcus agalactiae* to establish an infection model. The LD<sub>50</sub> of *Streptococcus agalactiae* to tilapia and mice were tested 3 times and the virulence of different *Streptococcus agalactiae* to tilapia and mice was determined. Results show that: by intraperitoneal injection, *S. agalactiae* can cause the death of mice within 24 hours. *S. agalactiae* could damage brain, liver, spleen, kidney and other tissues in mice. The LD<sub>50</sub> of *S. agalactiae* to tilapia and mice 3 times was  $7.7 \times 10^7$ ,  $2.2 \times 10^8$ ,  $3.5 \times 10^9$  CFU and 405, 361, 419 CFU, respectively. When *S. agalactiae* TFJ0901 and THN0901 infected tilapia ( $1.0 \times 10^7$  CFU) and mice (100 CFU), the survival rates of tilapia and mouse were 100.0%,  $6.7\% \pm 5.8\%$ , and 100.0%, 0%, respectively, both of which were significantly ( $P < 0.05$ ) different. When *S. agalactiae* TFJ0901 and TFJ-F infected tilapia ( $3.0 \times 10^8$  CFU) and mice (2 500 CFU), the survival rates of tilapia were  $73.3\% \pm 11.5\%$  and  $80.0\% \pm 10.0\%$ , respectively, which were not significantly ( $P > 0.05$ ) different from each other, while the survival rates of mice were  $13.3\% \pm 11.5\%$  and 100.0%, respectively, which were of significant ( $P < 0.05$ ) difference. Taken together, BALB/c mice were successfully established as a stable model for virulence determination of *S. agalactiae* in tilapia. The determination of the virulence of different *S. agalactiae* in mice is consistent with tilapia, and this model was able to distinguish *S. agalactiae* with similar virulence that was difficult to be distinguished by using tilapia model.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; BALB/c mice; virulence model

**Corresponding author:** LI Anxing. E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

**Funding projects:** China Modern Agricultural Industry Technology System (The Control of Parasites Infection on Marine Fish, CARS-47-18); Special Science Projects for Fish Diseases Control from the Oceanic and Fishery Administration of Guangdong Province (2014, 2016)