

文章编号:1000-0615(2008)05-772-08

## 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究

张新艳, 樊海平, 钟全福, 卓玉琛, 林煜, 曾占壮

(福建省淡水水产研究所, 福建福州 350002)

**摘要:** 从患暴发性流行病罗非鱼的肝脏中分离获得一株细菌 TL60829NA, 将 TL60829NA 对罗非鱼进行人工感染致病性试验, 试验感染罗非鱼表现出自然发病症状, 确认分离菌株为罗非鱼暴发性流行病的致病菌。分离菌株经形态学观察、Bio Merieux Vitek 全自动微生物分析系统 GPI 测定卡分析和 16S rRNA 特异性基因序列与 NCBI 中收录的其它引起罗非鱼病害的链球菌的 16S rDNA 序列构建的系统发育进化树显示, 分离细菌与其它无乳链球菌的 16S rDNA 序列构成一个进化分支, 而海豚链球菌则构成另一分支, 确定分离菌株为无乳链球菌 (*Streptococcus agalaciate*)。分离菌株对氨苄西林、青霉素 G、卡那霉素等 28 种试验药物敏感, 对妥布霉素、复方新诺明、环丙沙星等 15 种试验药物不敏感。由无乳链球菌引起的罗非鱼暴发性流行病的主要病理变化为鳃小片结构崩解, 鳃上皮增生、融合; 心肌纤维变性、肌间白细胞浸润; 肝脏颗粒变性和脂肪变性; 肠道粘膜上皮变性、坏死、脱落、固有膜炎性白细胞浸润; 肾脏组织大量嗜中性白细胞浸润, 肾小管上皮细胞核固缩, 小动脉血管壁玻璃样变性; 眼睛的脉络膜和眶骨膜组织炎性坏死, 晶状体纤维断裂和脱离。

**关键词:** 罗非鱼; 无乳链球菌; 致病性; 细菌鉴定; 药物敏感; 组织病理

**中图分类号:** S941.42

**文献标识码:** A

近年在福建、广东、海南等省的养殖罗非鱼中暴发一种流行病, 病鱼主要症状为: 体色发黑, 临死前于水面打转或间隙性窜游, 部分病鱼眼球突出或混浊发白, 腹部体表具点状或斑块出血或溃疡, 鳃盖内侧出血, 肝脏、胆囊、脾脏肿大, 严重时糜烂, 肠道和胃积水或积黄色粘液。流行于春、夏和秋季, 流行高峰为 5-9 月, 流行水温 25~37℃, 主要危害亲鱼及 100 g 以上的幼鱼和成鱼, 传染性强, 发病率达 10%~30%, 死亡率达 25%~80%, 造成了严重的经济损失。此暴发性流行病的主要症状和流行情况与国内报道的罗非鱼海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 病相似<sup>[1-3]</sup>, 但国外报道罗非链球菌病的病原主要有无乳链球菌 (*S. agalaciate*) 和海豚链球菌<sup>[4]</sup>。本文报道由

无乳链球菌引起的养殖罗非鱼暴发性流行病的病原菌分离、鉴定和致病性等研究结果。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料

**试验用鱼** 2006 年 8 月, 自广州鹭业水产公司狮岭罗非鱼养殖场采集具暴发性流行病典型症状的病鱼; 试验用健康罗非鱼取自福建省淡水水产研究所融桥中试基地的健康罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*), 体质量为 (150±10) g。塑料袋充氧运回实验室, 于水族箱暂养 5 d, 暂养期间不投饵, 连续充气, 水温 25~28℃, 稳定 1 周后供人工感染用。

培养基、试剂、药敏纸片 营养肉汤培养

收稿日期: 2007-11-28

资助项目: 福建省海洋与渔业科技项目(闽海渔科 06214 号)

作者简介: 张新艳(1980-), 女, 福建永泰人, 硕士, 从事水产养殖动物病害研究。Tel: 0591-83732002; E-mail: swallowz47@163.com

通讯作者: 樊海平, Tel: 0591-83796968; E-mail: fanhaiping@tom.com

基、脑心浸液培养基(BHI)购自北京陆桥公司产品;血琼脂、胰蛋白胨、酵母浸粉、琼脂糖购自厦门泰京生物技术公司;Taq酶、10×PCR缓冲液、dNTP、pMD-18T载体、DNA Marker DL2000购自大连宝生物(Takara)公司;胶回收试剂盒、DH5 $\alpha$ 感受态细胞、无Dnase/Rnase水购自TIANGEN公司;引物fD<sub>1</sub>(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), rD<sub>1</sub>(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')由上海鼎安测序公司合成;药敏纸片购自北京天坛中国药品生物制品检定所。

## 1.2 试验方法

**涂片检查病原体** 以无菌器具解剖病鱼,分别取鳃、肝脏、肾脏、脾脏、性腺、眼球等器官的小块组织,于洁净载玻片涂片,风干后,革兰氏染色,于Olympus CX41油镜下检查。

**病原菌的分离、纯化** 取活的具典型症状的病鱼,无菌生理盐水冲洗体表三遍,无菌解剖后,无菌接种环自肝脏、肾脏和体表溃疡处取样,BHI培养基平板划线涂布,28℃恒温培养36~48h后,挑取形态一致的优势单菌落进一步划线纯化,直至获得纯培养物后,接种营养肉汤液体培养基,28℃恒温培养48h,加无菌甘油后,-80℃保存备用。

**人工感染试验** 取-80℃保存的试验用菌株接种BHI平板,28℃培养24h,无菌生理盐水洗下培养物并对倍梯度稀释成不同浓度的菌悬液,肌肉注射暂养稳定后的试验用健康罗非鱼,每尾注射0.2mL,对照组注射等量生理盐水,每试验浓度组设置重复组。试验鱼放置于放水20L的水族箱,每箱放鱼7尾,不换水,连续充气,每天观察记录鱼体死亡情况,捡除死鱼,连续观察14d。感染组出现典型症状的鱼体,按照上述病原菌的分离、纯化方法分离、纯化并保存细菌。

**细菌形态观察及生理生化鉴定** 取-80℃保存的菌株划线接种于普通营养琼脂、BHI平板和血琼脂平板,28℃培养24h后,观察菌落特征。取BHI平板培养24h的培养物,革兰氏染色,Olympus CX41型显微镜观察。利用Bio Merieux Vitek全自动微生物分析系统GPI测定卡对分离菌株进行生理生化性质测定,同时按参考文献[5],对菌株进行适宜生长温度、盐度、pH测定试验。

**16S rRNA基因的特异性扩增鉴定** 通用引物fD<sub>1</sub>(5'-AGA GTT TGA TCM TGG

CTC AG-3'), rD<sub>1</sub>(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')[6],PCR基本反应过程如下:从28℃培养24h BHI平板挑取一环培养物,加入100 $\mu$ L无菌重蒸水,涡旋混匀后,沸水浴2min,12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心5min,取1 $\mu$ L上清液用于PCR扩增。扩增反应体积50 $\mu$ L,分别加入Taq酶2U,10×PCR缓冲液5 $\mu$ L,引物各10 pmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>及dNTP 100 $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>,无菌重蒸水补足反应体积;反应条件为95℃预变性5min,94℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸2min,共进行30个循环,最后72℃延伸10min结束反应。取5 $\mu$ L反应液在10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

**16S rRNA基因克隆与鉴定** 电泳结束后,在紫外光下观察,将目的条带切下,按照TIANGEN胶回收试剂盒说明进行DNA回收纯化。利用pMD-18T载体说明进行T-A克隆,得到的重组质粒分别命名为p1、p2、p3,转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞,挑取阳性克隆进行酶切验证后进行DNA测序(上海鼎安测序公司)。

**药物敏感试验** 28℃培养过夜的液体培养物涂布BHI平板,适当干燥后贴药敏纸片,每皿6片,每种药物2片,28℃培养48h后测定抑菌圈直径,按产品说明书判定对药物的敏感度。

**病理组织变化观察** 取典型症状的病鱼组织器官,10%中性福尔马林固定,常规石蜡切片,H.E染色,中性树胶封片[7],Olympus CX41型显微镜观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 涂片检查病原体

于鳃、肝脏、肾脏、脾脏、性腺、眼球等组织中,可发现革兰氏阳性的链状球菌,发现较多的为成对球菌,病情严重时可发现典型链状细菌。

### 2.2 人工感染试验

用自然发病罗非鱼分离获得的菌株TL60829NA,肌肉注射人工感染,当菌液浓度达6.0 $\times$ 10<sup>7</sup> cfu $\cdot$ mL<sup>-1</sup>时,死亡率达95.7%;人工感染发病鱼分离获得菌株TL60829NA1,经重复回归感染,当菌液浓度达5.0 $\times$ 10<sup>7</sup> cfu $\cdot$ mL<sup>-1</sup>时,死亡率达50%,当菌液浓度达1.0 $\times$ 10<sup>8</sup> cfu $\cdot$ mL<sup>-1</sup>时,死亡率达100%(表1)。人工感染和重复回归

感染发病鱼的主要症状表现为:于水面打转或间隙性窜游,眼球发白、体表出血等,与自然发病鱼

的症状相似,证实分离到的 TL60829NA 菌株为罗非鱼暴发性流行病的致病菌。

表 1 菌株 TL60829NA 和 TL60829NA1 的人工感染试验结果  
Tab. 1 Results of of strain TL60829NA and TL60829NA1 infection by muscle injection

试验组 test group	菌液浓度(cfu·mL <sup>-1</sup> ) bacterial concentration	剂量(mL) dose	试验鱼(尾) test no.	死亡鱼(尾) dead no.	死亡率(%) mortality
TL60829NA	3.7×10 <sup>6</sup>	0.2	7×2	2	12.9
	7.5×10 <sup>6</sup>	0.2	7×2	2	12.9
	1.5×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	2	12.9
	3.0×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	4	28.6
	6.0×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	12	95.7
对照 control	0.85%生理盐水 physiological saline	0.2	7×2	0	0
TL60829NA1	6.25×10 <sup>6</sup>	0.2	7×2	0	0
	1.25×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	0	0
	2.5×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	0	0
	5.0×10 <sup>7</sup>	0.2	7×2	6	42.9
	1.0×10 <sup>8</sup>	0.2	7×2	14	100
对照 control	0.85%生理盐水 physiological saline	0.2	7×2	0	0

### 2.3 细菌形态观察及生理生化性质测定

BHI 平板 28℃ 培养 24 h, 菌落透明、湿润、圆形、边缘整齐, 直径为 0.5~1.0 mm。在血琼脂平板上呈 β 溶血; 革兰氏染色结果显示, 菌体为链状或成对排列的革兰氏阳性球菌, 单个球形菌体直径为 1.0~1.2 μm。

分离菌株的适宜生长盐度为 0~4%, 最适生长盐度为 0.85%~3.5%; 适宜生长温度 10~40℃, 最适生长温度为 28~37℃; 适宜生长 pH 为 4.4~7.6, 最适生长 pH 为 6.8~7.6。分离菌株 bioMerieux Vitek GPI 测定卡分析结果见表 2, 判读结果认为分离菌株为 *S. agalactiae*。

### 2.4 16S rRNA 基因序列分析和系统发育进化树构建

分离菌株 TL60829NA、TL60829NA1、TL60829NA2 经细菌 16S rRNA 基因通用引物 fD1/rD1 扩增后得到 1.5 kb 大小的片段(图 1), 与预期目标相符。经 T-A 克隆并转化 *E. coli* DH 5α 感受态细胞后, 挑取白斑, 碱裂解提取质粒 DNA 后进行 *Eco* R I、 $\lambda$ *Hind* III 双酶切验证, 结果见图 2。

将经酶切验证过的阳性克隆进行 DNA 测序, 结果得到长度为 1 510 bp 的近乎全长的 16S rRNA 基因片段。利用 DNASTAR 软件将该序列同 NCBI 登录号为 CP000114、EP092913、DQ303183、AB023574、AE014202、AF459432、DQ985468、AY762259、AF335572 和 DQ303187

的基因序列进行比对, 比对结果见图 3。从图 3 中可以看出, 该序列与 *S. agalactiae* A909 菌株 16S rRNA 基因序列(NCBI 登录号为 CP000114) 同源性最高, 为 99.7%。

### 2.5 药物敏感性试验

分离菌株对试验药物中的氨苄西林等 28 种敏感, 对试验药物中的链霉素等 15 种不敏感, 对试验药物中的庆大霉素等 5 种中度敏感(表 3)。

### 2.6 病理组织变化

病鱼鳃小片充血、水肿、坏死, 呼吸上皮增生、融合, 毛细血管肿胀、充血, 鳃丝末端充血膨大, 淋巴细胞浸润(图版-1)。心外膜破裂, 肌纤维断裂、紊乱、松散心肌炎性水肿, 淋巴细胞浸润(图版-2)。肝脏颗粒变性和脂肪变性, 动脉管与肝实质细胞分离, 管壁堆积血细胞和肝细胞核, 血铁黄素沉着, 肝细胞浑浊、肿胀、坏死(图版-3)。肠道粘膜上皮坏死、脱落, 固有膜炎性白细胞浸润(图版-4)。脾脏出血、水肿, 淋巴细胞减少, 组织内有大量含铁血黄素沉着(图版-5)。肾脏组织内有化脓灶, 内有大量嗜中性白细胞浸润, 肾小体肿胀, 中央毛细血管血液淤积肾小囊腔隙增大, 肾小管细胞增大、排列不规则, 小动脉血管壁玻璃样变性, 血管内形成微血栓, 上皮细胞坏死(图版-6)。眼球脉络膜和眶骨膜组织出现炎性损伤, 晶状体纤维断裂和脱离, 严重者被囊和晶状体坏死, 出现角膜溃烂, 视网膜损伤。

表 2 分离菌株 bioMerieux Vitek GPI 分析结果

Tab. 2 Results of phenotypic characterization of the isolates in bioMerieux Vitek system tests

项目 items	菌株 strain			
	TL60829NA	TL60829NA2	TL60829NA3	<i>S. agalatae</i>
生长 growth at:				
6% NaCl	-	-	-	d
10%胆汁 10% Bile	+	+	+	
40%胆汁 40% Bile	-	-	-	d
奥普托欣 optochin	-	-	-	-
水解 hydrolysis of:				
七叶灵 esculin	-	-	-	-
精氨酸 arginine	+	+	+	+
尿素 urea	-	-	-	-
产酸 acid from:				
乳糖 lactose	-	-	-	d
菊糖 inulin	-	-	-	-
甘露醇 mannitol	-	-	-	-
棉籽糖 raffinose	-	-	-	-
核糖 ribose	+	+	+	+
水杨苷 salicin	-	-	-	d
山梨醇 sorbitol	-	-	-	-
海藻糖 trehalose	+	+	+	+
蔗糖 sucrose	+	+	+	
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	-
蜜二糖 melibiose	-	-	-	-
松三糖 melezitose	-	-	-	-
纤维二糖 cellobise	-	-	-	-
木糖 xylose	-	-	-	-
丙酮酸 pyruvate	-	-	-	-
淀粉 pullulan	-	-	-	-
葡萄糖 dextrose	-	-	-	-
蛋白胨基质 peptone Base	+	+	+	
杆菌肽 bacitracin	+	+	+	
半纤维素酶 hemicellulase	-	-	-	-
红四氮唑 tetrazolium red	+	+	+	
新生霉素抗性 novobiocin	+	+	+	
抗氧化酶 catalase	-	-	-	-
β溶血 β-hemolysis	+	+	+	+

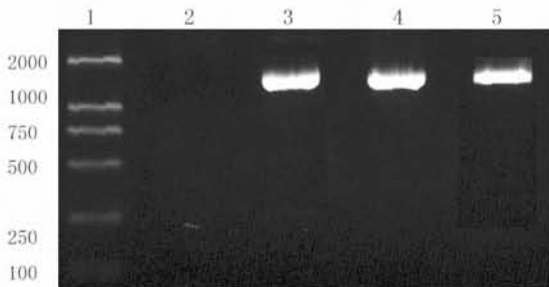


图 1 分离菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增

1. DNA marker DL2000; 2. 空白对照; 3~5. TL60829NA, TL60829NA1, TL60829NA2 16S rDNA

Fig. 1 PCR amplification of 16S rRNA gene

1. DNA marker DL2000; 2. blank control; 3 - 5. 16S rRNA gene of TL60829NA, TL60829NA1 and TL60829NA2

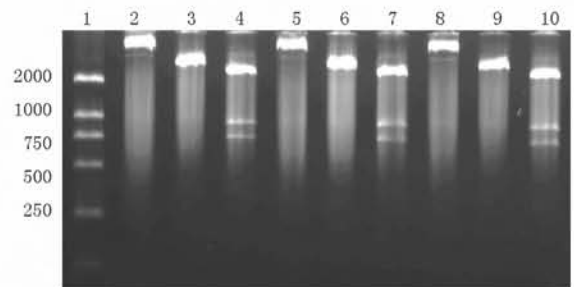


图 2 阳性克隆子酶切验证结果

1. DNA marker DL2000; 2, 5, 8. 质粒 1, 2, 3. 3, 6, 9. 质粒 1, 2, 3 λHind III 酶切结果; 4, 7, 10. 质粒 1, 2, 3 EcoRI / λHind III 酶切结果

Fig. 2 Digest of positive clone

1. DNA marker DL2000; 2. 5, 8. p1, p2, p3; 3, 6, 9. λHind III digest of p1, p2, p3; 4, 7, 10. EcoRI / λHind III digest of p1, p2, p3

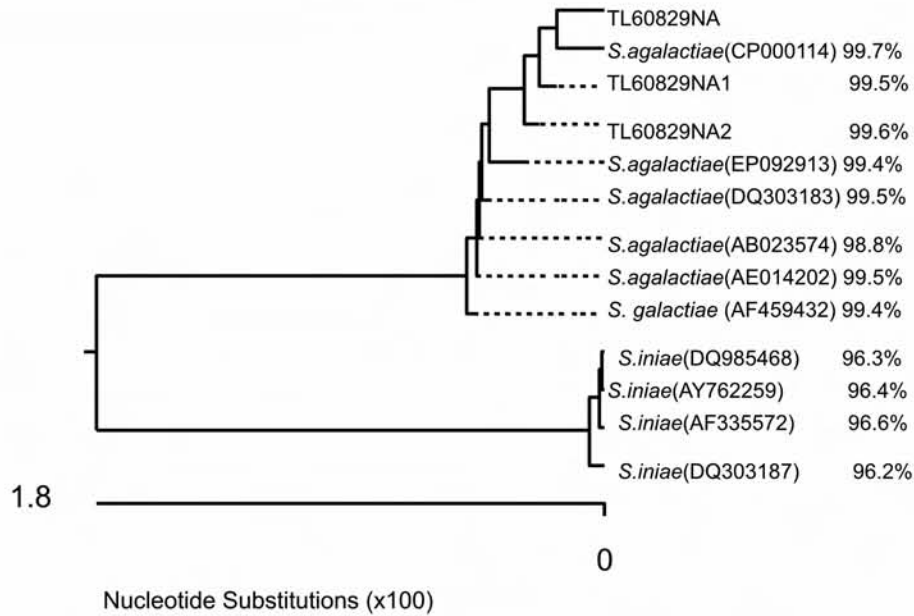


图3 几种链球菌 16S rRNA 基因系统进化树分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of *Streptococcus* sp. based on 16S rRNA gene

表3 分离菌株的药物敏感性试验结果

Tab. 3 The sensitivity of the isolated strains to test chemotherapentants

药品 chemical	敏感性 sensitivity	药品 chemical	敏感性 sensitivity	药品 chemical	敏感性 sensitivity
奈替米星 Netromycin	S	头孢呋新 Cefuroxime	S	吡哌酸 Pipemidic Acid	R
司帕沙星 Sparfloxacin	S	头孢他啶 Ceftazidime	S	多粘菌素 Polymyxin	R
诺氟沙星 Norfloxacin	S	头孢美唑 Cefmetazole	S	复方新诺明 Cotrimoxazole	R
氧氟沙星 Ofloxacin	S	头孢唑林 Cefazolin	S	痢特灵 Liteling	R
林可霉素 Lincomycin	S	头孢克肟 Cefixime	S	氟罗沙星 Fleroxacin	R
四环素 Tetracycline	S	头孢唑肟 Ceftizoxime	S	洛美沙星 Lomefloxacin	R
多西四环素 Doxycycline	S	头孢噻吩 Cefalothin	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	R
利福平 Rifampicin	S	氨苄西林 Ampicillin	S	苯唑西林 Oxacillin	R
克拉霉素 Clarithromycin	S	羧苄西林 Carbenicillin	S	链霉素 Streptomycin	I
阿奇霉素 Azitromycin	S	青霉素 G Penicillin G	S	磺胺甲基异噁唑 Sulfamethoxazole	R
万古霉素 Vancomycin	S	卡那霉素 Kanamycin	S	头孢西丁 Cefoxitin	R
头孢吡肟 cefepime	S	磷霉素 Fosfomicin	S	奈啶酸 Acidumnalidixicun	R
头孢哌酮 Cefoperazone	S	哌拉西林 Piperacillin	S	替硝唑 Tinidazole	R
头孢噻肟 Cefotaxime	S	红霉素 Erythromycin	S	妥布霉素 Tobracin	R
阿米卡星 Amikacin	R	氨基糖苷 Aztreonam	R	壮观霉素 Spectinomycin	I
依诺沙星 Enoxacin	I	米诺环素 Minocycline	I	庆大霉素 Gentamycin	I

注: R 为耐药; I 为中度敏感; S 为敏感

Notes: R resist; I mid-sensitive ; S sensitive

### 3 讨论

由链球菌感染引起的鱼类死亡在二十世纪七十年代已有零星报道,九十年代呈上升趋势,目前链球菌已成为鱼类的重要致病菌之一。Evans 等<sup>[8]</sup>研究认为,链球菌感染鱼体头部,破坏鱼脑神经,通过血液循环破坏肝、肾、脾等器官引发全身性出血的细菌性疾病,传染性强,死亡率高,治疗困难,且水温越高病情越重,链球菌对养殖品种有一定的选择性,多发于鲑科鱼类、罗非鱼、叉尾鲷、香鱼和淡水白鲳,而草鱼、鲤、鲢鳙鱼未见报道。国外文献报道罗非鱼的致病链球菌为 *S. iniae* 和 *S. agalactiae*<sup>[2]</sup>,国内分离到的罗非鱼致病链球菌为 *S. iniae*<sup>[1-3]</sup>,从罗非鱼暴发性流行病中分离确定无乳链球菌为致病菌在国内尚属首次。

关于链球菌的分类,Robinson 和 Meyer<sup>[9]</sup>于 1966 年第一次报道在淡水鱼金色美鲷 (*Notemigonus crysoleucas*) 中分离出 B 群属链球菌;随后 Plumb 等<sup>[10]</sup>及 Baya 等<sup>[11]</sup>从鱼类中分离出的多株非溶血性 B 群链球菌,但不能确定其归属,1994 年, Eldar 等<sup>[12]</sup>将其定名为 *Streptococcus difficile*; Wilkinson 等<sup>[13]</sup>、Elliott 等<sup>[14]</sup>及 Vandamme 等<sup>[15]</sup>将其所分离鉴定的链球菌,大都归属为 B 群无乳链球菌;2002 年, Evans 等<sup>[8]</sup>再次报道溶血性无乳链球菌是鱼类的主要致病菌;2005 年, Kawamura 等<sup>[16]</sup>提议重新划分 *S. difficilis* 的归属,确定为无乳链球菌的同物异名; Evans 等<sup>[17]</sup>于 2006 年从水生哺乳动物中分离出无乳链球菌,由此,无乳链球菌被认为是唯一拥有 B 群特异性抗原的链球菌。

水生动物链球菌病多发于水质差、养殖密度大的水域,长期使用低质饲料也是诱因之一。此外,与水体中存在大量的链球菌也有直接的联系。鱼类链球菌病的防治措施主要有药物防治、生态防治和免疫防治。虽然化学药物防治是最为直接和简便的控制手段,但长期使用化学药品将使病原体产生耐药性,易导致防治失败,同时也可能导致产品中的药物残留引起质量卫生安全问题。因此,利用确定的致病菌株,开发免疫防治技术,是控制罗非鱼链球菌病的主流方向。

### 参考文献:

[1] 柴家前,丁巧玲,王振龙,等. 罗非鱼链球菌的分离

鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1):18-20.

- [2] 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[J]. 水产学报, 2007,31(5): 618-623.
- [3] 周素明,李安兴,马跃,等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析[J]. 中山大学学报(自然科学版),2007,46(2):68-71.
- [4] Evans J J, Pasnik D J, Klesius P H, et al. identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* in tilapia [C]. Proceedings of the International Symposium of Tilapia Aquaculture ISTA7. Veracruz, Mexico, September 2006; 25-42.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,2001:364-369.
- [6] Wiliam G W, Susan M B, Dale A P, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173 (2): 697-703.
- [7] 孟运莲. 现代组织学与细胞学技术[M]. 武汉: 武汉大学出版社,2004:68-86.
- [8] Evans J J, Klesius P H, Gilbert P M, et al. Characterization of beta-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L and wild mullet, *Liza klunzingeri*(Day), in Kuwait[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25: 505-513.
- [9] Robinson J A, Meyer F P. Streptococcal fish pathogen [J]. Journal of Bacteriology, 1966, 92:512.
- [10] Plumb J A, Schachte J H, Gaines J L, et al. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1974,103:358-361.
- [11] Baya A M, Lupiani B, Hetrick F M, et al. Association of *Streptococcus* sp with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries[J]. Journal of Fish Diseases, 1990,13:251-253.
- [12] Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing *Meningoencephalitis* in fish [J]. Current Microbiology, 1994, 28: 139-143.
- [13] Wilkinson H W, Thacker L G, Facklam R R. Nonhaemolytic group B Streptococci of human, bovine and ichthyic origin [J]. Infection and

- Immunity, 1973,7:496-498.
- [14] Elliott J A, Facklam R R, Richter C B. Wholecell protein patterns of nonhaemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs and fish[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28: 628-630.
- [15] Vandamme P, Devriese I A, Pot B, et al. *Streptococcus difficile* is a nonhaemolytic group B, type Ib Streptococcus [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47:81-85.
- [16] Kawamura Y, Itoh Y, Mishima N, et al. High genetic homogeneity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile*; reclassification of *S. difficile*, Eldar et al 1995 as a junior synonym of *S. agalactiae*, Lehmann and Neuman n 1896 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2005, 55:961-965.
- [17] 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]. Journal of Wildlife Diseases, 2006, 42(3): 561-569.

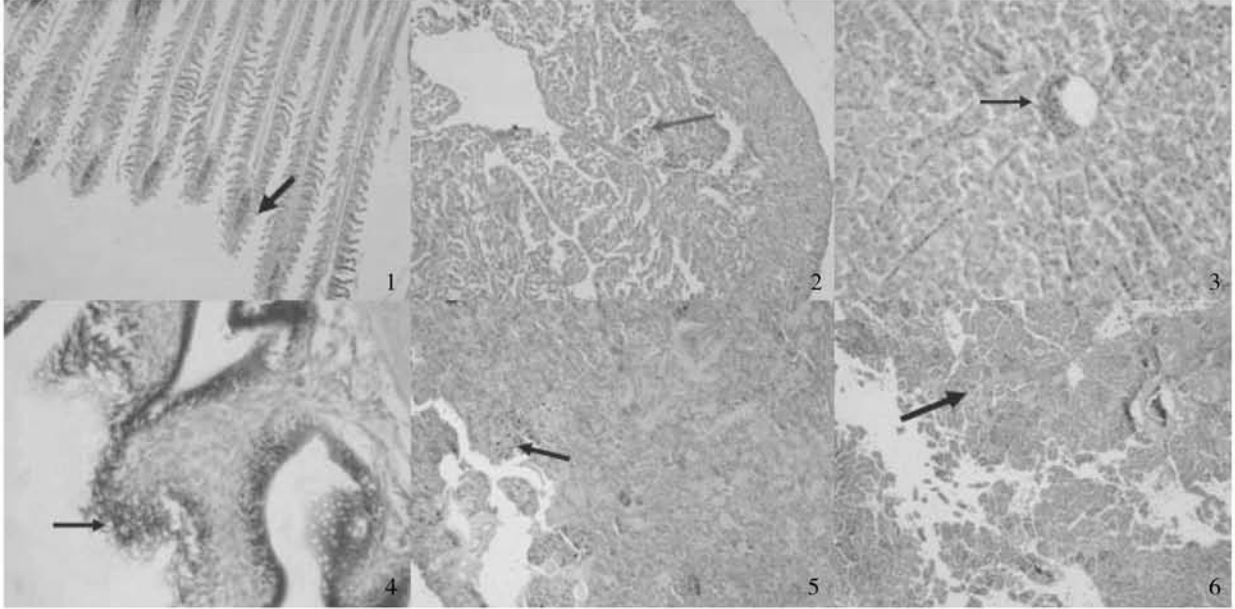
### Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia

ZHANG Xin-yan, FAN Hai-ping, ZHONG Quan-fu,  
ZHUO Yu-chen, LIN Yu, ZENG Zhan-zhuang

(The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In recent years, an epidemic disease with the symptoms of darken appearance, erratic or disorientated swimming behavior, exophthalmia or opacity to eyes, inflammation or ulceration of the abdominal skin, and accumulation ascetic fluid in intestines and stomach, etc. outbreaked in cultured tilapia in Fujian, Guangdong and Hainan provinces. One strain of bacteria TL60829NA was isolated from the liver of diseased tilapia, the challenged tilapia presented the similar external signs such as exophthalmia and disorientated swimming behavior to those of the natural infected tilapia, so the isolate was the primary pathogenic agent of the epidemic disease in cultured tilapia. In conventional and Bio Merieux Vitek system tests, isolates were catalase negative,  $\beta$ -haemolytic, Gram-positive cocci and serogroup B. By 16S rDNA amplified and sequenced, the phylogenetic tree of *Streptococciosis* showed that the isolate clustered together with *Streptococcus agalactiae*, the *S. iniae* strains clustered together, the isolate was identified as *S. agalactiae*. The isolates were highly sensitive to 28 antibiotics such as ampicillin, kanamycin and penicillin G, and resistant to 15 antibiotics, such as tobracin, cotrimoxazole and ciprofloxacin. Histopathological analysis revealed that the gill's structure was broken down, the epithelial cells swelling; the membrane of the heart ruptured, the cardiac muscle hyperemia, disorderly arranged and leucocytes soaked; the essence structure of liver was destroyed obviously, pellet and fat denaturation; epithelia cells broke away from the intestines; the spleen was hemorrhage, dropsy and cellulose, a large amount of blood source pigmentation dyed pale brown by HE; essential structure of kidney was destroyed, obviously hyperemia and hemorrhage; the choroid and the orbital membrane inflamed and damaged, the crystalline lens fiber broken.

**Key words:** tilapia; *Streptococciosis agalactiae*; pathogenicity; bacterial identification; chemotherapeutant sensitivity; histopathology



图版 罗非鱼无乳链球菌暴发性流行病组织病理变化

1. 鳃充血、水肿、坏死( $\times 40$ ); 2. 肌纤维断裂、紊乱、松散, 炎性水肿, 淋巴细胞浸润, 肌间充血、出血, ( $\times 100$ ); 3. 肝脏颗粒变性和脂肪变性, 管腔扩张, 管壁堆积血细胞和肝细胞核( $\times 400$ ); 4. 肠道粘膜上皮变性、坏死、脱落; 充血、出血, 组织疏松水肿( $\times 400$ ); 5. 脾脏出血、水肿和纤维素渗出, 淋巴细胞减少, 组织内有大量含铁血黄素沉着( $\times 100$ ); 6. 肾脏严重坏死, 充血、出血, 大量淋巴细胞浸润( $\times 100$ )

**Plate The pathological changes of an outbreak epidemic of diseased tilapia with *Streptococcus agalaciate***

1. the gill structure was broke down, the cells showed swelling, coming off in diseased tilapia ( $\times 40$ ); 2. the membrane of the heart ruptured, the cardiac muscle was swelling, hyperemia, twisted rupturing, arranged disorderly and leucocytes soaked ( $\times 100$ ); 3. the essence structure of liver was destroyed obviously, pellet and fat denaturation. ( $\times 400$ ); 4. Epithelia cells broke away from the intestines ( $\times 400$ ); 5. the spleen was hemorrhage, dropsy and cellulose a large amount of blood source pigmentation dyed pale brown by H. E ( $\times 100$ ); 6. the essence structure of kidney was destroyed, obviously hyperemia and emorrhage( $\times 100$ )