

## 无乳链球菌感染尼罗罗非鱼的脑膜炎模型

崔静雯<sup>1</sup>, 汪开毓<sup>1\*</sup>, 贺扬<sup>1</sup>, 陈德芳<sup>2</sup>, 黄小丽<sup>2</sup>, 王均<sup>1</sup>,  
龙波<sup>1</sup>, 张丽杰<sup>1</sup>, 蒋洁<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

**摘要:** 针对尼罗罗非鱼无乳链球菌病的致病机制, 本实验建立了无乳链球菌感染尼罗罗非鱼脑膜炎的模型, 并制定相应的临床症状及组织病理学评分系统对其进行了研究。将 43 尾健康尼罗罗非鱼随机分为 4 组: 对照组 (n = 10) 和 3 个实验组 (n = 33)。3 个实验组根据不同感染剂量分为  $1.0 \times 10^6$  cfu 组 (n = 11)、 $1.0 \times 10^7$  cfu 组 (n = 11) 和  $1.0 \times 10^8$  cfu 组 (n = 11)。实验组分别将  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$  和  $1.0 \times 10^8$  cfu 的无乳链球菌菌液腹腔注射尼罗罗非鱼复制脑膜炎模型。对感染尼罗罗非鱼的临床症状、剖检病变、脑组织 (端脑、中脑、小脑、延脑) 病理学进行判定, 并结合细菌学检测, 按照拟定的评分系统评价各组脑膜炎的造模效果, 确定最佳造模方案。各实验攻毒组尼罗罗非鱼感染后 2 d 均出现不同程度死亡, 未见明显神经症状。感染 3 d 后鱼体开始出现异常活动的神经症状及突眼、角膜混浊等病理变化。病理组织学观察可见: 蛛网膜下腔和脑软膜上有大量炎性渗出和染成蓝紫色微细颗粒的细菌团块, 脑膜充血、水肿、疏松、增厚, 有大量的中性白细胞等炎性细胞浸润; 脑实质部基质疏松水肿, 呈海绵状; 脑组织炎性细胞浸润, 胶质细胞增生等软脑膜炎、脑膜脑炎症状。比较各组得分发现,  $1.0 \times 10^7$  cfu 组的无乳链球菌攻毒尼罗罗非鱼造模效果最好: 临床症状显著而组内尼罗罗非鱼差异性最小, 组织病理学观察患病尼罗罗非鱼病情和缓适中、利于观察研究。综上, 使用  $1.0 \times 10^7$  cfu 无乳链球菌腹腔攻毒尼罗罗非鱼可在第 3 天成功构建脑膜炎模型, 造模率为 100%。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; 脑膜炎; 模型

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*), 又称 B 族链球菌 (group B streptococcus, GBS)。1870 年初, GBS 作为牛的乳房炎病原开始引起人们关注。之后, GBS 成为引起新生儿或婴儿的化脓性脑膜炎、脑水肿、脑脓肿等神经系统疾病的重要病原, 再次引起人们的重视。1966 年在淡水鱼金色美鲮 (*Notemigonus crysoleucas*) 中分离出 B 群链球菌, 并相继出现多例鱼类感染病例。由于无乳链球菌具有广泛的感染宿主<sup>[1]</sup>, 且可跨种间传播<sup>[2]</sup>, 能够引起人类脑膜炎<sup>[3-5]</sup>, 新生儿败血症<sup>[6-7]</sup> 和肺炎<sup>[8]</sup>。由无乳链球菌导致的牛乳腺炎

是影响牛奶产量的主要原因<sup>[9-10]</sup>。

罗非鱼 (*Oreochromis sp.*) 是联合国粮食与农业组织 (FAO) 推荐的 21 世纪全球最重要的水产养殖品种之一。在中国, 其产量和出口量高居全球第一。截至 2010 年, 产量最多的水产品种是尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*)。链球菌是危害罗非鱼养殖业最为严重的病原菌, 其影响面积覆盖全球。2009 年起, 我国海南、广东等罗非鱼养殖地区暴发了无乳链球菌病, 其危害之大, 被称为罗非鱼养殖业的“H1N1”; 至今, 罗非鱼无乳链球菌的致病机制和有效防治方法仍是国内外研究热点。

收稿日期: 2015-03-17 修回日期: 2015-05-19

资助项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0848); 四川省科技厅产业链(2014NZ003); 四川省科技厅应用基础专项(2014JY0143)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywangsicau@126.com

众多临床症状表明,脑膜炎是感染罗非鱼无乳链球菌病的一个重要的特征性临床症状<sup>[11-13]</sup>。病鱼常表现出不同程度的精神萎靡、眼球突出、狂游、平衡丧失等神经系统病症,以及脑膜充血水肿、粒细胞浸润的病理学变化。迄今为止,对由无乳链球菌引起的罗非鱼中枢神经系统损伤机制仍不清楚。相比之前无乳链球菌脑膜炎在幼鼠(*Rattus*)<sup>[14]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[15]</sup>中的报道,本实验指出尼罗罗非鱼是另一个研究无乳链球菌脑膜炎发病机理的有价值的体内模型。此模型能够为揭示无乳链球菌侵入中枢神经系统的分子机理,入侵后对机体的影响和追踪疾病的发展,攻克无乳链球菌疾病提供一种工具或手段。因此,本研究拟通过使用不同剂量无乳链球菌腹腔攻毒尼罗罗非鱼,检测其发病率、死亡率和临床症状,尤其脑组织的病理剖检及组织学变化,建立尼罗罗非鱼无乳链球菌脑膜炎的病理模型,以期为临床诊断和进一步深入研究罗非鱼无乳链球菌脑膜炎的病理机制提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

无乳链球菌标准菌株购于 ATCC 菌种库(编号:ATCC51487)。

### 1.2 实验对象

健康尼罗罗非鱼 100 尾,体长(20±5)cm,体质量(250±10)g,购于成都双流某养殖渔场,置于鱼病研究中心的鱼缸中驯养 1 周,罗非鱼饵料日投喂 2 次(8:30 和 17:00),投饵率为体质量的 3%~5%,饲养温度(30±2)℃。实验前采血检测确认未受无乳链球菌感染。

### 1.3 菌液的准备

将低温保存的无乳链球菌 ATCC51487 分离株接种于脑心浸液琼脂培养基(BHI)上,37℃恒温培养 24 h。挑取单个菌落接种于脑心浸液肉汤中,37℃恒温振荡培养 24 h。菌液经 5 000×g 离心 5 min 收集菌体,并用 0.85% 生理盐水调节浓度至 1.0×10<sup>9</sup>、1.0×10<sup>8</sup> 和 1.0×10<sup>7</sup>cfu/mL 备用。

### 1.4 脑膜炎模型的诱导

选择驯养后的健康尼罗罗非鱼 43 尾,随机分为 4 组:对照组(n=10)和 3 个实验组(n=33)。3 个实验组根据不同感染剂量分为 1.0×10<sup>6</sup>cfu

组(n=11)、1.0×10<sup>7</sup>cfu 组(n=11)和 1.0×10<sup>8</sup>cfu 组(n=11)。各实验组中 10 尾用于腹腔注射对应剂量无乳链球菌,0.1 mL/尾;剩余 1 尾作为哨兵动物(哨兵动物是指为查明某一特定环境中某传染因子的存在状况,有意识地暴露在该环境中的易感动物),并于实验前剪尾标记,不作注射。对照组注射等量 0.85% 无菌生理盐水。所有水箱关闭供水系统,温度保持(30±2)℃,每日换水 1/3~1/2。连续观察 14 d,记录鱼健康、行为状况和存活率,并对濒死鱼及时剖检和取样。

### 1.5 临床观察

每 4~8 h 监测每条尼罗罗非鱼的健康状况,包括评价游泳和逃避行为。按照下述评分标准进行打分,并记录时间。精神及运动状况:精神良好,抓取时挣扎剧烈易于挣脱,游动正常记 0 分;活动减少,抓取时挣扎剧烈但不易挣脱,游动缓慢记 1 分;抓取时挣扎很难挣脱,呆滞停靠于鱼缸角落,间歇性侧游、旋游记 2 分;抓取时挣扎微弱或不挣扎,呈“假死”样呆立鱼缸中,持续性侧游、竖游、旋游等异常游动记 3 分。眼球症状:无异常记 0 分;眼球出血记 1 分;单侧眼球突出或角膜混浊记 2 分;双侧眼球突出或单侧突出并见眼角膜混浊记 3 分。

### 1.6 细菌学检查

对濒死鱼使用 150 mg/L MS222 麻醉,按如下顺序采集血液、眼和脑组织样品进行细菌学检测:(1)采取尾静脉血液拭子;(2)刺破角膜采集眼内液拭子;(3)取出眼球采集眼腔拭子;(4)打开颅腔采集脑拭子;(5)打开心包腔,采集心包腔拭子。将上述拭子涂抹接种于 BHI 平板上,置于 37℃过夜培养,观察细菌生长状况,革兰氏染色观察细菌形态,并将上述细菌用于特异性 PCR 鉴定,引物参考王均等<sup>[16]</sup>设计的罗非鱼源无乳链球菌毒力基因 *cfb* 的特异性引物。PCR 产物取 5 μL 用于琼脂糖凝胶电泳,检测扩增结果。

### 1.7 解剖检查

对濒死鱼使用 150 mg/L MS222 麻醉处死并进行剖检,按照上述步骤打开颅腔,观察脑的病理变化。

### 1.8 组织病理学检查

进行病理学观察后,将脑取出,使用 10% 中

性福尔马林固定。48 h 后取出,横剖分成 4 部分(端脑、中脑、小脑和延脑)置于组织学包埋框中,脱水、透明、包埋。制备石蜡切片(5 μm),并用苏木素和伊红染色(hematoxylin and eosin, H. E)。显微镜观察各部位病理变化,并参照 Baums 等<sup>[17]</sup>

评分体系(表 1)对炎症的程度和范围进行打分。每尾尼罗罗非鱼中枢神经系统得分(α)为脑组织划分的 4 个不同区域的分数总和除以 4。各组得分(β)由该组不同尼罗罗非鱼中枢神经系统的得分(α)总和除以该组尼罗罗非鱼数量。

表 1 组织病理学评分系统  
Tab.1 Histopathological scoring system

炎症的程度和范围 degree and extent of inflammation	得分 score
轻度的,局灶性的 mild, focal	1
轻度的,多灶性的或弥漫性的 mild, multifocal and diffuse	2
轻度至中度,局灶性的 mild to moderate, focal	2
轻度至中度,多灶性的或弥漫性的 mild to moderate, multifocal and diffuse	3
中度的,局灶性的 moderate, focal	3
中度的,多灶性的或弥漫性的 moderate, multifocal and diffuse	4
轻度的,局灶性坏死 mild, focal with necrosis	4
中度至重度,多灶性的或弥漫性的 moderate to severe, multifocal and diffuse	5
轻度至中度,多灶性的或弥漫性的坏死 mild to moderate, multifocal or diffuse with necrosis	5
重度的,多灶性的或弥漫性的坏死 severe multifocal or diffuse	6
重度的局灶性坏死 severe focal with necrosis	6
中度至重度,多灶性或弥漫性坏死 moderate to severe, multifocal or diffuse with necrosis	6
重度的,多灶性或弥漫性坏死 severe multifocal or diffuse with necrosis	7

## 2 实验结果

### 2.1 临床症状及评分

对照组(n = 10)和哨兵鱼(n = 3)临床症状观察均无明显异常。1.0 × 10<sup>6</sup> cfu (n = 10)、1.0 × 10<sup>7</sup> cfu (n = 10)和 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu (n = 10)实验组尼罗罗非鱼均在第 3 天开始出现死亡,并分别在感染后第 12 天、第 8 天和第 7 天达到 100% 的死亡率(图 1)。实验组攻毒尼罗罗非鱼感染后 1 d,仅 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu 组攻毒鱼表现轻度游动迟缓,其他各组均无明显症状;1.0 × 10<sup>7</sup> cfu 组在感染后 3 d 即出现突眼症状。各组尼罗罗非鱼出现突眼或者角膜混浊症状的数量和时间:1.0 × 10<sup>6</sup> cfu (n = 3)在第 6 天、第 7 天和第 11 天;1.0 × 10<sup>7</sup> cfu (n = 2)在第 3 天和第 8 天;1.0 × 10<sup>8</sup> cfu (n = 2)在第 6 天和第 7 天。感染鱼出现典型的中枢神经系统功能障碍症状表现为单侧性突眼(图版 I-1),双侧性突眼(图版 I-2),角膜混浊(图版 I-3),倒立游泳(图版 I-4),异常转圈(图版 I-5),在鱼缸底部持续横游并撞击鱼缸(图版 I-6)。根据脑膜炎的临床症状评分系统,对各组临床症状进行评分(表 2)。

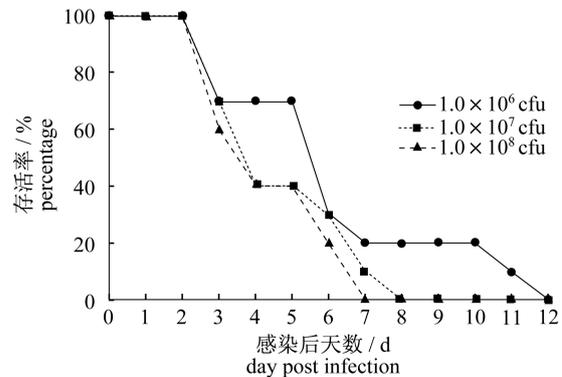


图 1 3 个不同剂量组(1.0 × 10<sup>6</sup>、1.0 × 10<sup>7</sup> 和 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu)无乳链球菌(ATCC51487)感染尼罗罗非鱼的生存曲线

Fig.1 Kaplan – Meier survival curve of Nile tilapia infected with *S. agalactiae* (ATCC51487), three groups of fish (n = 10) were infected with different doses as indicated (1.0 × 10<sup>6</sup>, 1.0 × 10<sup>7</sup> and 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu)

### 2.2 脑膜炎的解剖学检查

解剖学检查可见对照组(n = 10)和哨兵鱼(n = 3)脑为粉白色(图版II-1),水润有光泽,脑脊

液颜色均质、透明、有少量油滴(图版II-3,图中箭头所指)。各实验组(图版II-2)尼罗罗非鱼脑出

现肿胀苍白(图版II-4),脑脊液混浊、呈血样或铁锈色(图版II-5),甚至呈胶冻样(图版II-6)。

表 2 各组尼罗罗非鱼的临床症状评分系统  
Tab. 2 Clinical score of each Nile tilapia

组 groups	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	和 sum	平均 mean	中位数 median	众数 majority	标准差 standard deviation
$1.0 \times 10^6$ cfu	0	0	0	2	3	3	3	4	5	6	26	2.6	3	0,3	2.119
$1.0 \times 10^7$ cfu	2	2	2	3	3	3	3	4	5	5	32	3.2	3	3	1.135
$1.0 \times 10^8$ cfu	2	2	2	2	3	3	3	4	5	5	30	3	2,3	1.247	

注:虽然每 4~8 h 对所有尼罗罗非鱼进行了检测,但仍不排除有个别尼罗罗非鱼表现出典型的临床症状而未被检测到的情况。F 代表每一条鱼,3 组每组各有 10 条鱼,分别用 F1~F10 表示

Notes: although the health status of the Nile tilapia was evaluated every 4~8 h, it might have been that specific clinical signs were not recorded in some fish prior to death. F means every fish in this three groups, respectively marked F1~F10

### 2.3 脑膜炎的细菌学检查

对照组(n=10)和哨兵鱼(n=3)采样拭子接种 BHI 后未见细菌生长。各实验组尼罗罗非鱼均分离得到表面光滑湿润,边缘整齐的白色菌落;革兰氏染色后,1 000× 观察,球形革兰氏阳性菌呈链状或成对排列。分离纯化细菌,将提取出的细菌 DNA 用于无乳链球菌特异性 PCR 鉴定,产物经琼脂糖凝胶电泳后得到大小为 648 bp 的特异性条带(图 2),与预期相符。组织内分离出无乳链球菌的各组尼罗罗非鱼数量见表 3。实验攻毒组(n=30)尼罗罗非鱼体内均分离出 GBS,  $1.0 \times 10^6$  cfu 组有 1 尾尼罗罗非鱼脑组织未检测到无乳链球菌。

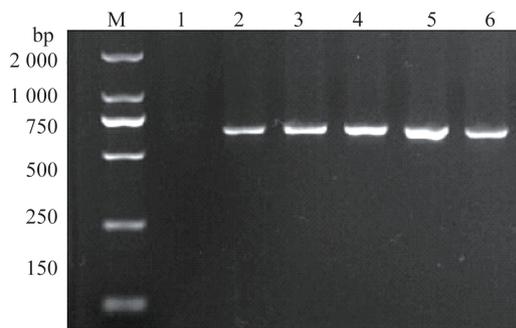


图 2 各部位分离菌株的 PCR 检测

M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照; 2: 脑组织分离细菌; 3: 眼内液分离细菌; 4: 眼腔分离细菌; 5: 心包腔分离细菌; 6: 血液中分离细菌

### Fig. 2 Detection of the *S. agalactiae* challenge strains

M: DNA Marker DL2000; 1: negative control; 2: strain isolated from brain; 3: strain isolated from ocular fluid; 4: strain isolated from the eye cavity; 5: strain isolated from the pericardial cavity; 6: strain isolated from the blood

### 2.4 脑膜炎的组织病理学观察及评分

对采集的尼罗罗非鱼脑组织进行切片、染色、病理学检测。结果显示,  $1.0 \times 10^6$  cfu 组感染尼罗罗非鱼 10 尾中的 3 尾出现脑组织坏死,  $1.0 \times 10^7$  cfu 组感染的尼罗罗非鱼 10 尾中的 5 尾出现脑组织坏死,  $1.0 \times 10^8$  cfu 组感染的尼罗罗非鱼 10 尾中的 6 尾出现脑组织坏死。攻毒 GBS 的 30 尾尼罗罗非鱼中至少有 24 尾脑组织出现明显病理变化,主要为柔脑膜(包括蛛网膜和软脑膜)增厚、血管充血(图版 III-1)、大量嗜中性白细胞和少数单核细胞浸润及不同体积的纤维蛋白渗出,并可见游离的无乳链球菌(图版 III-2,3); 炎症可波及到与柔脑膜邻接的浅在性脑组织,使脑实质部基质水肿疏松、呈海绵样结构(图版 III-3),在脑实质内,由于 GBS 侵入导致血管充血、渗出,大量嗜中性白细胞呈灶性聚集,并使局部脑组织坏死溶解,并发脑炎(图版 III-4); 脑血管腔和管周甚至脑实质中均出现大量 GBS(图版 III-4,5); 胶质细胞增生(图版 III-6); 浦肯野氏细胞结构不清,核染色质减少溶解、染色变淡,核呈空泡状(图版 III-7); 脑室内有絮状物和脓液附着于脑室壁和室管膜上(图版 III-8)。而对照组和哨兵鱼脑组织结构正常,未见明显病变。按照表 1 评分系统对各组的 4 个组织部位(延脑、端脑、中脑和小脑)分别打分,记录每尾鱼每个部位得分情况,汇总各组的 10 尾鱼中延脑、端脑、中脑和小脑得分分别为 0、1~3、4~7 分的鱼的尾数,并计算  $\beta$  值(表 4):  $1.0 \times 10^6$  cfu 组 1.700,  $1.0 \times 10^7$  cfu 组 2.675,  $1.0 \times 10^8$  cfu 组 3.350; 对照组  $\beta$  值得分为 0。

表 3 组织内分离出无乳链球菌的各组尼罗罗非鱼数量  
Tab. 3 *S. agalactiae* isolated from the tissues of Nile tilapias in each group

组别 groups	数量 no.	未分离出无乳链球菌 的尼罗罗非鱼数 Nile tilapia without any <i>S. agalactiae</i> isolate	特定部位分离出无乳链球菌的尼罗罗非鱼的数量/ 组内尼罗罗非鱼总数 number of Nile tilapia with <i>S. agalactiae</i> strain isolated from indicated site/total number of Nile tilapia				
			眼内液 ocular fluid	眼腔 eye cavity	脑 brain	血液 blood	心包腔 pericardial cavity
对照组 control	13 *	13/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
1.0 × 10 <sup>6</sup> cfu	10	0/10	10/10	9/10	9/10	10/10	9/10
1.0 × 10 <sup>7</sup> cfu	10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
1.0 × 10 <sup>8</sup> cfu	10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

注: \* 表示 13 尾中的 3 尾尼罗罗非鱼与被感染的尼罗罗非鱼在同一个鱼缸中担任哨兵动物, 10 尾尼罗罗非鱼被置于单独的鱼缸中作为未感染的对照, 下同

Notes: three of these thirteen Nile tilapias served as sentinel animals in the same tank as the infected fish. Ten Nile tilapias were kept in separate tanks and used as uninfected controls, the same below

表 4 各组组织病理学评分  
Tab. 4 Histopathological score of each group

感染剂量/cfu infection dose	延脑 medulla oblongata			端脑 cerebrum			中脑 optical lobe			小脑 cerebellum			β 得分 β score
	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	0	1~3	4~7	
对照组 control	13/13 *	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13	0
1.0 × 10 <sup>6</sup>	4/10	5/10	1/10	3/10	6/10	1/10	2/10	6/10	2/10	6/10	4/10	0/10	1.700
1.0 × 10 <sup>7</sup>	3/10	4/10	3/10	1/10	4/10	5/10	3/10	4/10	1/10	1/10	5/10	4/10	2.675
1.0 × 10 <sup>8</sup>	1/10	5/10	4/10	1/10	3/10	6/10	2/10	4/10	4/10	2/10	3/10	5/10	3.350

注: 0~7 分的定义见表 1

Notes: see tab. 1 for definition of scores ranging from 0 to 7

### 3 讨论

自 20 世纪 70 年代以来, 有学者先后用不同致病菌通过滴鼻、口服、静脉注射、腹腔注射和脑穿刺等多种途径接种病原体构建动物脑膜炎模型。呼吸道感染的细菌常采用滴鼻感染方式建立脑膜炎模型, 胃肠道感染的细菌多采用口服感染方法建立脑膜炎模型, 血源性感染的细菌常采用腹腔注射、肌肉注射或静脉注射方式建立脑膜炎模型。Patterson 等<sup>[15]</sup> 研究证实无乳链球菌通过腹腔注射和肌肉注射途径感染斑马鱼较容易, 且采用腹腔注射能够绕过其皮肤的防御机制而直接感染鱼体, 进而广泛分布于鱼体, 造成更严重的病理变化; 斑马鱼在感染后 24~48 h 发展为暴发性的感染, 并表现出脑膜炎的症状<sup>[18]</sup>。因此本实验选用腹腔注射无乳链球菌标准菌株 (ATCC-

51487) 攻毒尼罗罗非鱼构建脑膜炎模型。ATCC51487 是由具有脑膜炎症状的罗非鱼脑组织分离出来的, 因此为复制并建立尼罗罗非鱼的脑膜炎模型提供了参考依据。而且选用 ATCC 菌株更易于广泛复制, 为研究罗非鱼脑膜炎的致病机制提供病理模型。

通过前期预实验, 本实验选用了 3 种不同剂量进行感染造模: 1.0 × 10<sup>6</sup>、1.0 × 10<sup>7</sup> 和 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu。结果发现 3 种剂量导致的死亡率均达到 100%, 临床可见典型的神经症状, 解剖后可观察到脑膜严重充血, 脑组织肿胀, 胶冻样脑脊液等病理变化; 脑组织损伤提示无乳链球菌在脑组织具有高负荷细菌载量; 血液细菌学检查显示无乳链球菌能够在各感染组血液内繁殖, 并在 1.0 × 10<sup>7</sup> 和 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu 感染组的脑组织中分离到无乳链球菌。因此推测, 无乳链球菌可穿透血

脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 和血液脑脊液屏障 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB) 进入脑组织, 并激活炎症反应, 导致尼罗罗非鱼发生脑膜炎。进一步组织病理学观察可见: 软脑膜严重充血, 软脑膜和蛛网膜下腔炎性浸润增厚; 脑组织严重充血, 基质疏松水肿, 炎性细胞浸润, 胶质细胞增生; 高倍下可见大量染成蓝紫色微细颗粒的无乳链球菌 (无乳链球菌为蓝色) 定植于脑组织血管内壁、血管腔和蛛网膜下腔, 个别严重的区域周边实质也可见无乳链球菌定植。此结果与某些学者描述的罗非鱼及其他鱼类感染无乳链球菌的脑膜炎病理变化一致<sup>[19-21]</sup>。

目前较为通用的细菌性脑膜炎 (bacterial meningitis, BM) 模型成功的标准: (1) 脑脊液 (cerebro-spinal fluid, CSF) 细菌培养与注入细菌相同; (2) 脑组织呈 BM 病理学改变; (3) 动物表现评估出现 BM 神经症状; (4) 实验室检查心血培养与注入细菌相同或者脑脊液白细胞计数呈炎性改变。凡符合标准(1)或(2)或(3) + (4) 认为模型成立<sup>[22]</sup>。本实验腹腔注射  $1.0 \times 10^7$  和  $1.0 \times 10^8$  cfu 剂量的 ATCC51487 后, 罗非鱼被成功感染出现中枢神经症状, 脑组织出现脑膜炎病理变化、大量炎性细胞浸润, 在脑组织内观察并分离到无乳链球菌, 因此, 确定本实验建模成功。结合临床症状、脑组织炎症的程度和范围评价各感染组脑膜炎模型状况, 发现使用  $1.0 \times 10^7$  cfu 无乳链球菌感染尼罗罗非鱼, 可在感染后第 3 天成功建立脑膜炎模型, 鱼体临床症状显著而组内差异最小, 且脑组织坏死数居中, 病情和缓适中、最适观察。

#### 参考文献:

- [1] 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]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(1-2): 186-192.
- [2] Evans J J, Klesius P H, Pasnik D J, et al. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(5): 774-776.
- [3] Reguera A, González M Á, Sanchez A, et al. *Streptococcus agalactiae* meningitis in an immunocompetent male [J]. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 2011, 29(9): 707-708.
- [4] Sanz R P, Cabeza O L, Hermosa C, et al. Acute meningitis by *Streptococcus agalactiae* in a immunocompetent male [J]. Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia, 2013, 26(1): 78-79.
- [5] Martín D R M, Ruiz G J M, Gonzalo P S, et al. Meningitis by *S. agalactiae* in a non-pregnant immunocompetent woman [J]. Revista Clinica Espanola, 2010, 210(11): 591-592.
- [6] Stoicescu S M, Broascaucianu D, Voicila C. 877 group B *Streptococcus*-frequently risk factor for early neonatal infection [J]. Pediatric Research, 2010, 68: 440-440.
- [7] Jawa G, Hussain Z, da Silva O. Recurrent late-onset group B *Streptococcus* sepsis in a preterm infant acquired by expressed breastmilk transmission: a case report [J]. Breastfeeding Medicine, 2013, 8(1): 134-136.
- [8] Villena R M A, Olalla S J, de la Torre L J, et al. *Streptococcus agalactiae* induced cavitated pneumonia [J]. Revista Clínica Española, 2009, 209(5): 252-254.
- [9] Richards V P, Lang P, Bitar P D, et al. Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae* [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2011, 11(6): 1263-1275.
- [10] Andersen H J, Pedersen L H, Aarestrup F M, et al. Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(4): 1233-1239.
- [11] Chang P H, Plumb J A. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19(3): 235-241.
- [12] Chen C, Chao C, Bowser P R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* - infected tilapia [J]. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 2007, 27(1): 2.
- [13] Inocente Filho C, Müller E E, Pretto G L G, et al. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) [J]. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 2009, 2(1): 12-15.
- [14] Ferrieri P, Burke B, Nelson J. Production of

- bacteremia and meningitis in infant rats with group B streptococcal serotypes [ J ]. *Infection and immunity*, 1980, 27 ( 3 ): 1023 - 1032.
- [ 15 ] Patterson H, Saralahti A, Parikka M, *et al.* Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection [ J ]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38 ( 3 ): 447 - 455.
- [ 16 ] Wang J, Wang K Y, Xiao D, *et al.* Development of double PCR for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia [ J ]. *Veterinary Science in China*, 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. *中国兽医科学*, 2011, 41 ( 5 ): 496 - 502. ]
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] Noraini O, Jahwarhar N A, Sabri M Y, *et al.* The effect of heat stress on clinicopathological changes and immunolocalization of antigens in experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*) [ J ]. *Veterinary World*, 2013, 6 ( 12 ): 997 - 1003.
- [ 19 ] Huang J L. Study on etiology, pathology of tilapia *Streptococcus agalactiae* disease and on the prokaryotic expression of cpsE gene [ D ]. Ya' an: Sichuan Agricultural University, 2012. [ 黄锦炉. 罗非鱼无乳链球菌病原学、病理学及 cpsE 基因的原核表达研究. 雅安: 四川农业大学, 2012. ]
- [ 20 ] Zamri S M, Amal M, Siti Z A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis sp.*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae* [ J ]. *Journal of Comparative Pathology*, 2010, 143 ( 2 - 3 ): 227 - 229.
- [ 21 ] 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. *中国水产科学*, 2014, 21 ( 6 ): 1244 - 1252. ]
- [ 22 ] Zou H F. To explore the relationship between vascular endothelial growth factor ( VEGF ) and the pathogenesis of neonatal rat bacterial meningitis ( BM ) [ D ]. Changsha: Central South University, 2004. [ 邹华芳. VEGF 与新生鼠细菌性脑膜炎发病机制相关关系的研究. 长沙: 中南大学, 2004. ]

## *Oreochromis niloticus* model of meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection

CUI Jingwen<sup>1</sup>, WANG Kaiyu<sup>1\*</sup>, HE Yang<sup>1</sup>, CHEN Defang<sup>2</sup>, HUANG Xiaoli<sup>2</sup>,  
WANG Jun<sup>1</sup>, LONG Bo<sup>1</sup>, ZHANG Lijie<sup>1</sup>, JIANG Jie<sup>1</sup>

(1. Veterinary Medicine College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

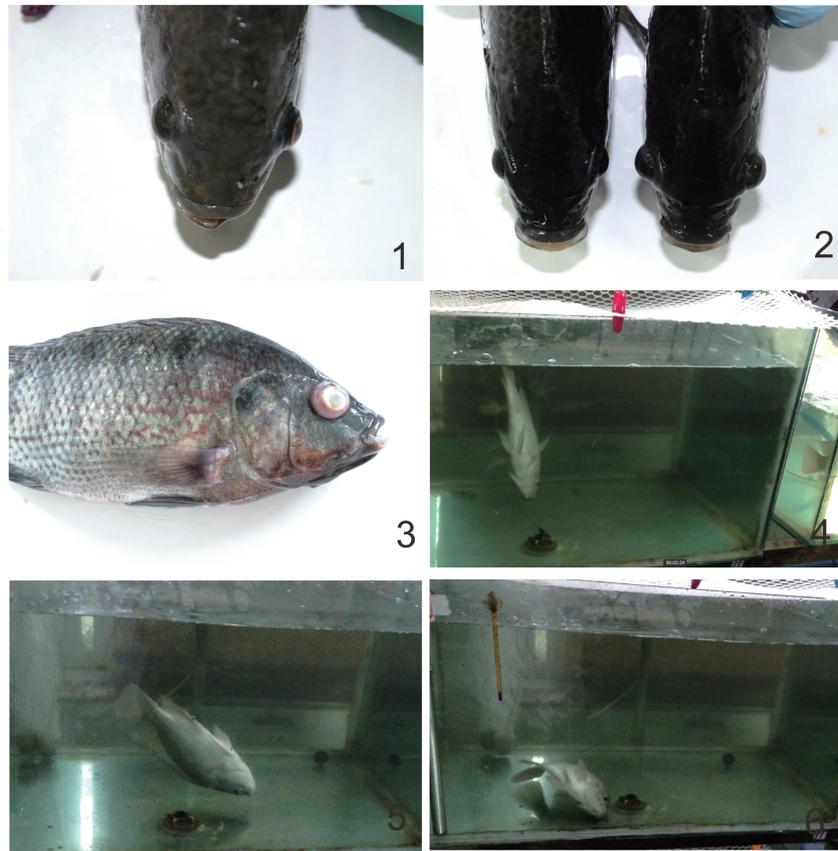
2. Animal Science & Technology College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** The meningitis was the characteristic clinical manifestation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected by *Streptococcus agalactiae*. To know the degree and extent of inflammation as well as the presence of necrosis in the brain, we build an intraperitoneal infection model and develop a new clinical and histopathological scoring system for *S. agalactiae* in Nile tilapia. 43 healthy Nile tilapias were randomly divided into 4 groups: control group (n = 10), low dose group:  $1.0 \times 10^6$  cfu group (n = 11), middle dose group:  $1.0 \times 10^7$  cfu group (n = 11), high dose group:  $1.0 \times 10^8$  cfu group (n = 11). Clinical symptoms and cerebral histopathological changes (cerebrum, optical lobe, cerebellum and medulla oblongata included) was observed in our study, we scored these three groups and obtained the best one. The infected Nile tilapia died in second day post infection, however, neurological symptoms were not apparently observed in the dead fish. Survivors developed constant aberrant swimming, exophthalmia and corneal opacity. According to microscopical examination of four regions of the brain, large amount of bacteria stained bluish violet colonized the subarachnoid space and cerebral pia mater. Histopathology revealed the changes of leptomeningitis and meningoencephalitis, including congestion/ hemorrhage, edema, loose and thickening in meninges, inflammatory cell neutrophilic leukocytes infiltration, superficial periplast of brain inflammatory cell infiltration and lysis spongy - structure, gliocyte hyperplasia, and so on. Compared with the scores, we found that the group of  $1.0 \times 10^7$  cfu was the best dosage, which showed significant clinical symptoms, the minimum diversity value and the condition of the sick fish contributed to the observational study. We chose the dose of  $1.0 \times 10^7$  cfu to inject Nile tilapia intraperitoneally to develop a model of *S. agalactiae* meningitis with the 100% success rate on the third day post infection.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; meningitis; model

**Corresponding author:** WANG Kaiyu. E-mail: kywangsicau@126.com

**Funding projects:** Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848); Sichuan Science and Technology Agency Projects (2014NZ0003); Sichuan Science and Technology Agency Application Foundation Project (2014JY0143)

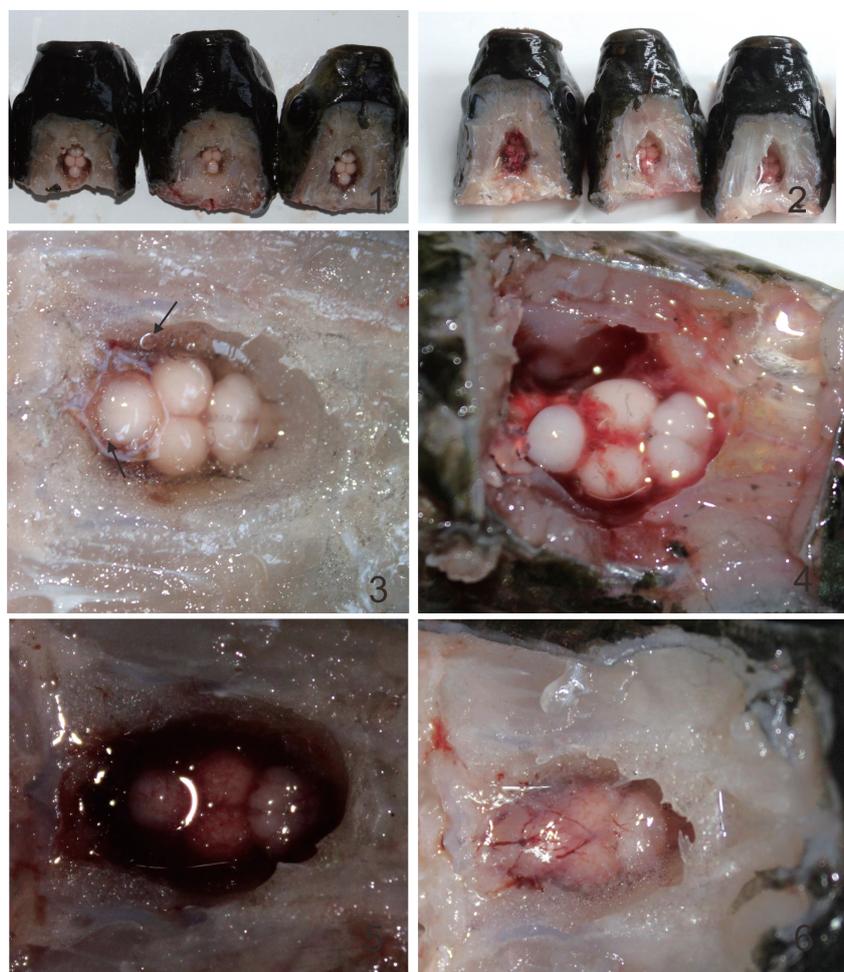


图版 I 尼罗罗非鱼无乳链球菌脑膜炎的临床症状

(1)单侧性突眼;(2)双侧性突眼(左为正常对照);(3)角膜混浊;(4)倒立游泳;(5)异常的转圈游泳;(6)在鱼缸底部持续横游并撞击鱼缸

**Plate I Clinical symptom of *S. agalactiae* meningitis in Nile tilapia**

(1)one side of exophthalmia; (2)both sides of exophthalmia(left fish is normal control); (3)corneal opacity; (4)swimming with a head-down position; (5) constant aberrant swimming; (6) intermittent or constant side swimming at the bottom and hit the bowl

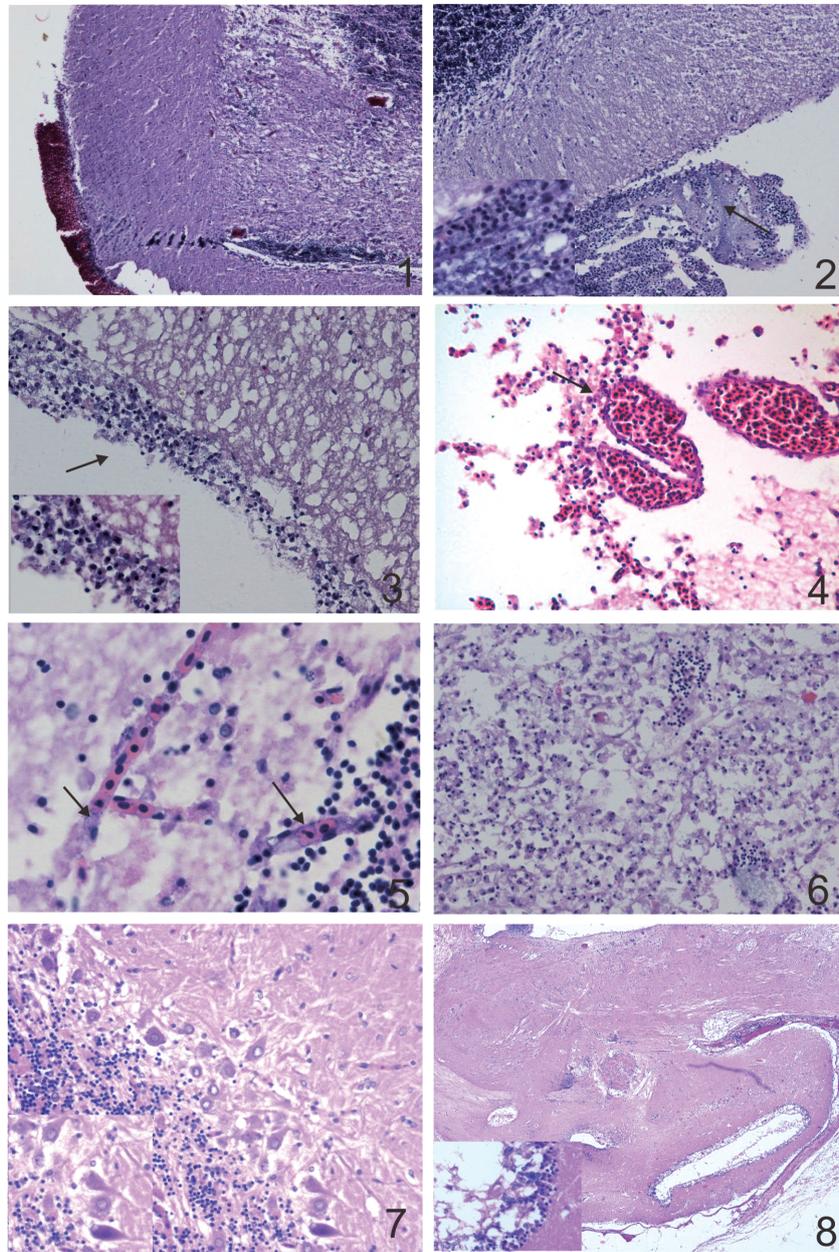


图版 II 尼罗罗非鱼脑的解剖检查

(1)对照组; (2)实验攻毒组; (3)对照组; (4)  $1.0 \times 10^6$  cfu 组; (5)  $1.0 \times 10^7$  cfu 组; (6)  $1.0 \times 10^8$  cfu 组

**Plate II Anatomy inspection of Nile tilapia**

(1) control group; (2) challenged group; (3) control group; (4) group of  $1.0 \times 10^6$  cfu; (5) group of  $1.0 \times 10^7$  cfu; (6) group of  $1.0 \times 10^8$  cfu



图版 III 尼罗罗非鱼无乳链球菌脑膜炎的组织病理学变化 (H. E)

(1) 软脑膜增厚、血管充血 (100 ×); (2) 蛛网膜增厚, 蛛网膜下腔可见大量链球菌 (↑)、炎性细胞浸润 (200 ×), 左下小图 (1 000 ×); (3) 软脑膜可见大量链球菌 (↑), 炎性细胞浸润, 浅层脑组织基质疏松、呈海绵样结构 (400 ×), 左下小图 (1 000 ×); (4) 脑实质可见 GBS (↑), 血管充血、渗出, 嗜中性白细胞聚集, 局部脑组织坏死溶解 (400 ×); (5) 血管腔和管周出现大量 GBS (↑) (1 000 ×); (6) 胶质细胞增生 (400 ×); (7) 浦肯野氏细胞结构不清, 核染色质减少溶解、染色变淡, 核呈空泡状 (400 ×), 左下小图 (400 ×); (8) 脑室内有絮状物和脓液附着于脑室壁和室管膜上 (40 ×), 左下小图 (400 ×)

**Plate III Histopathological changes of *S. agalactiae* meningitis in Nile tilapia (H. E)**

(1) vasocongestion and thickening of in the leptomeninges (100 ×); (2) arachnoid thickening, generous streptococcus were observed in the subarachnoid space (↑), inflammatory cell infiltration (200 ×), left thumbnail (1 000 ×); (3) generous streptococcus were observed in the leptomeninges (↑), inflammatory cell infiltration, superficial periplast of brain lyse like spongy structure (400 ×), left thumbnail (1 000 ×); (4) vascular congestion and seepage (↑), neutrophilic leukocytes gathered, local necrosis were observed in brain parenchyma, (400 ×); (5) GBS were observed in the parenchyma, the blood vessel lumen and wall (↑) (1 000 ×); (6) gliocyte hyperplasia in (400 ×); (7) the structure of Purkinje cells were unclear, nuclear chromatin reduced and dissolved, light stained, nuclear vacuolated (400 ×), left thumbnail (400 ×); (8) floc and pus were attached to the wall and ependyma of ventricles (40 ×), left thumbnail (400 ×)