

中国七种水生动物源无乳链球菌的分子特征及其对斑马鱼的致病性

张德锋¹, 可小丽¹, 刘志刚¹, 王世锋²,
袁伟¹, 石存斌¹, 卢迈新^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380;
2. 海南大学海洋学院, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228)

摘要: 为了解中国水生动物源无乳链球菌的分子流行特征, 揭示其传播和流行规律, 本实验对分离得到并鉴定的10株7种水生动物源无乳链球菌通过分子血清型、多位点序列分型(MLST)分型、毒力基因型和前噬菌体分型等方法进行分子分型; 其次, 通过斑马鱼评价7种水生动物源无乳链球菌的致病性。分子血清型分析结果表明, 10株无乳链球菌可分为3种血清型, 即 I a、I b 和 III 型; MLST 分型结果表明, I a 型无乳链球菌均为 ST7 型, I b 无乳链球菌均是 ST261 型, 只有 III 型无乳链球菌是 ST739 型。进一步分型结果表明, 10 株无乳链球菌可分为 3 种毒力基因型和 4 种前噬菌体基因型。根据 4 种分型结果可知, 10 株水生动物源无乳链球菌可分为 4 种类型, 其中虎纹蛙源无乳链球菌具有独立的分子血清型、MLST 型、毒力基因型和前噬菌体基因型, 即 III-ST739-V1-P3; 罗非鱼源无乳链球菌的基因型有 3 种, 即 I a-ST7-V2-P1、I a-ST7-V2-P2 和 I a-ST7-V3-P4; 红尾皇冠鱼、鳙和罗非鱼源无乳链球菌的基因型相同: I a-ST7-V2-P2; 卵形鲳鲅、宝石鲈和罗非鱼源无乳链球菌具有相同的基因型: I a-ST7-V2-P1; 鲮和罗非鱼源无乳链球菌的基因型相同, 即 I b-ST261-V3-P4。致病性研究表明, 7 种水生动物源无乳链球菌对斑马鱼均有强致病性。研究表明, 两栖类虎纹蛙源无乳链球菌和鱼源无乳链球菌的基因型明显不同, 它们之间遗传变异较大, 因此, 无乳链球菌在两栖类和鱼类之间相互传播的可能性较小。鱼源无乳链球菌有 3 种基因型, 且这 3 种基因型均在罗非鱼中流行, 这表明无乳链球菌在鱼类中相互传播的可能性较大, 尤其是在罗非鱼与其他鱼类之间。

关键词: 斑马鱼; 无乳链球菌; 流行病学; 分子血清型; MLST; 毒力基因

中图分类号: Q 938.8; S 917.4

文献标志码: A

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, 也称 B 群链球菌)作为一种重要的人兽共患病原菌, 能引起人的败血症、肺炎、蜂窝组织炎、心内膜炎和脑膜炎等症状^[1]。同时, 无乳链球菌也是一种重要的水生动物致病菌, 可感染多种淡水和海水养殖鱼类, 如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、胭脂鱼(*Liza klunzingeri*)、金头鲷(*Sparus*

auratus)、银鲳(*Pampus argenteus*)、卵形鲳鲅(*Trachinotus ovatus*)、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)和宝石鲈(*Scortum barcoo*)等^[2-4], 给水产养殖业带来重大风险^[5-6]。

目前, 无乳链球菌常用的分子分型方法主要有分子血清型、多位点序列分型(multilocus

收稿日期: 2016-07-26 修回日期: 2017-01-11

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 广东省鱼病防治专项(201611); 广东省自然科学基金(2016A030313146)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

sequence typing, MLST)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGE)、多位点可变数目串联重复序列分析(multiple-locus variant-repeat analysis, MLVA)、毒力基因型和前噬菌体(prophage)分型等分型方法^[7-10], 其中分子血清型、MLST、MGE、毒力基因型等分型方法的结果便于各国学者的引用和分析, 这些方法已经被广泛应用。近年来, 因无乳链球菌感染引起的罗非鱼链球菌病在我国南方地区呈现暴发趋势, 其相关的研究报告也较多。目前, 我国罗非鱼无乳链球菌的流行特征比较清楚, 即主要流行菌株的分子血清型为 I a型(95.2%), 其次是 I b型, III型最少^[8, 11-12]。MLST分型结果显示, 我国罗非鱼无乳链球菌主要是ST7型, 而ST261型属于小范围流行^[7, 12-14]。此外, 研究者还使用了多种分型方法对罗非鱼无乳链球菌进行分型分析, 为流行病学研究提供大量的基础数据^[8, 15]。然而, 我国其他水产动物源无乳链球菌的流行病学研究甚少。因此, 分析不同水生动物源无乳链球菌的分子流行特征, 对研究无乳链球菌的流行规律是必要的, 同时也有助于分析无乳链球菌在不同宿主之间是否相互传播。

目前, 斑马鱼(*Danio rerio*)作为模式动物已经被广泛用于发育生物学、免疫学和疾病感染等方面的研究。近年来, 斑马鱼作为人源或动物源链球菌重要的感染模型, 并在病原菌的致病机制和病原与宿主相互作用等方面进行了深

入研究^[16]。Patterson等^[17]研究表明, 在无乳链球菌感染疾病研究过程中, 斑马鱼可以作为细菌性脑膜炎研究的模式动物。本研究通过分子血清型、MLST、毒力基因型和前噬菌体分型等方法分析了我国7种水生动物源无乳链球菌的分子流行特征, 同时, 通过斑马鱼感染实验评价了不同宿主源无乳链球菌的致病性, 这将为我国水生动物源无乳链球菌的流行病学研究和病害防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 无乳链球菌菌株

鳊(*Aristichthys nobilis*)源无乳链球菌(Hn1404)、虎纹蛙(*Hoplobatrachus chinensis*)源无乳链球菌(FWL1405)、鲢(*Cirrhinus molitorella*)源无乳链球菌(GYcm081)、宝石鲈源无乳链球菌(BSL01)、卵形鲳鲹源无乳链球菌(JC141)和罗非鱼源无乳链球菌(WC15122、LT-1和WC1535)等菌株为本实验室保存(表1)。红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)源无乳链球菌(071901)由天津市水产技术推广站徐晓丽博士惠赠(表1)。

1.2 菌株分型

分子血清型 无乳链球菌基因组DNA使用细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)进行提取。获得的细菌基因组DNA置于-20 °C保存, 用于PCR扩增。无乳链球菌的分子血清型分析, 首先参考Imperi等^[18]方法进行分

表 1 7种水生动物源无乳链球菌的菌株信息

Tab. 1 The information of *S. galactiae* isolated from 7 kinds of aquatic hosts

菌株 strain	宿主 host	分离时间 time	分离地点 geographical region
Hn1404	鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	2014	广东省佛山市 Foshan city, Guangdong Province
FWL1405	虎纹蛙 <i>Hoplobatrachus chinensis</i>	2014	广东省惠州市 Huizhou city, Guangdong Province
071901	红尾皇冠鱼 <i>Aequidens rivulatus</i>	2012	天津市 Tianjin city
BSL01	宝石鲈 <i>Scortum barcoo</i>	2013	广东省广州市 Guangzhou city, Guangdong Province
JC141	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	2014	海南省临高县 Lin'gao county, Hainan Province
GYcm081	鲢 <i>Cirrhinus molitorella</i>	2014	广东省阳江市 Yangjiang city, Guangdong Province
LT-1	罗非鱼 <i>Oreochromis</i> sp.	2010	广东省肇庆市 Zhaoqing city, Guangdong Province
WC1535	罗非鱼 <i>Oreochromis</i> sp.	2015	海南省文昌市 Wenchang city, Hainan Province
WT1451	罗非鱼 <i>Oreochromis</i> sp.	2015	海南省文昌市 Wenchang city, Hainan Province
WC15122	罗非鱼 <i>Oreochromis</i> sp.	2015	海南省文昌市 Wenchang city, Hainan Province

型, 然后进一步通过Poyart等^[19]方法再次确认。PCR扩增条件参考已知方法进行^[18-19], PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照。

MLST分型 无乳链球菌的多位点序列分型(MLST), 分别通过PCR扩增*adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK*和*tki*等7个管家基因, PCR扩增引物参见网站<http://pubmlst.org/sagalactiae/>。PCR产物进行测序, 然后将测序结果与网站上相应的等位基因序列进行比对分析, 获得相应菌株的ST序列型号。如有未能比对到相应等位基因序列型号的基因, 则提交其相应的等位基因序列, 从而获得新的等位基因序列型号, 甚至是新的ST型号。

毒力基因分型 应用PCR方法检测无乳链

球菌的毒力相关基因, 如*bac* (β -C蛋白基因)、*bca* (α -C蛋白基因)、*bibA* (细菌免疫原性黏附素基因)、*cfb* (CAMP因子基因)、*cylE* (β -溶血素/溶细胞素基因)、*hylB* (透明质酸酶基因)、*iagA* (侵袭相关基因)、*scpB* (C5a肽酶基因)、*lmb* (层黏连蛋白结合蛋白基因)、*fbsA* (纤维蛋白结合蛋白A基因)和*sip* (表面免疫原性蛋白基因)等^[20-21]。以无乳链球菌基因组DNA为模板进行PCR反应(表2)。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照。

前噬菌体分型 罗非鱼源无乳链球菌GD201008-001与人源的A909菌株在基因组水平上亲缘关系较近^[22], 而且A909菌株的基因组经PHAST在线分析(网址: <http://phast.wishartlab.com/>)结果发现, A909菌株的基因组上3个区域含有前

表2 本研究中使用的引物

Tab. 2 The primers used in this study

引物 primer	上游引物序列(5'-3') forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列(5'-3') reverse primer sequence (5'-3')	长度/bp length	退火温度/°C annealing temperature
scpB	CCTGCTAAAAGTCTGATAC	CATAAGCATAGTCGTAAGCC	853	54
lmb	CCGTCTGTAATGATGTGGC	GAAATACCCGAGATACCAAG	473	54
hylB	CACCAATCCCCACTCTACTA	TGTGTCAAACCATCTATCAG	570	56
bca	CTACAATCCAGGGAGTGCA	ACTTCTTCCGTCCTTAG	383	53
bac	AAGCAACTAGAAGAGGAAGC	TTCTGCTCTGGTGTITTAGG	479	53
cylE	CATTGCGTAGTCACCTCCC	GGGTTTCCACAGTTGCTTGA	399	54
fbsA	AGAGCCAAGTAGGTCAACTTATAG	TTCATGCGTCTCAAACCG	290	54
cfb	AAGCGTGTATTCCAGATTCC	AGACTTCATTGCGTGCCAAC	348	56
iagA	CGGGATTGATCTAAGTCGCT	CCATCAACATCAGTCGCTAA	459	53
bibA	AACCAGAAGCCAAGCCAGCAACC	AGTGGACTTGCGGCTTCACCC	127	58
vspA	GGTCGCGATAGAGTTTCTTCCGC	AACGCCTGGGGCTGATTTGGC	104	58
sip	TCTCTCAATACAATTTCCGAAG	GTGGTCATAGTGGTTGGCAGT	867	54
SAK_0610	TCATTTATCTTCATCCCGTC	AGTGAGCTATCTAGAAAAGTTGGC	294	55
SAK_0635	GACTAGGACATCAAATGGAGGTC	GGATAAACAGTCAATAGCCTCAA	577	55
SAK_0748	AAACGTAACGCTGCTTGGGCTCA	GTAGAACGAGTTTCCCATCCAC	1138	56
SAK_0762	CTCCTCAATCAAGGGTTACTTCC	TGACACTGGTCTTAAACTTCCGT	303	56
SAK_1326	TTTCCACTGAATTGAACGCCATCT	GCGGTCCTTATCGGACTGCTC	571	56
SAK_1943	AACTCTGAACGATGCCTCTTA	GCCTAGTAATAGAAGTGATGTGAC	711	55
SAK_2079	TCGTAGTACCAACTTGGACTTCTG	ACTAAAAGAGTTTCATAGATGGCAA	291	56
SAK_2083	AGCCCTTTGCTTATTTCCACC	AGAGCGCTACCTTATCCCTG	588	54
SAK_2090	TGTCTTAAGTGTAAATGGTTTCAA	CCGATTGTAGAGCACCAAGGCG	261	56
SAK_2094	ACATACCGTAAAATACAATACTCAG C	GCCTATATTCGATACATTGCTCT	739	56

噬菌体基因组DNA。本研究选取A909基因组不同区域的10个前噬菌体基因作为目标检测基因, 设计引物(表2)并用于无乳链球菌前噬菌体DNA分型。

1.3 无乳链球菌对斑马鱼的致病性

斑马鱼是链球菌致病性研究过程中十分重要的模式生物^[16], 而本研究中无乳链球菌来源于不同水生动物, 为了评价不同水生动物源无乳链球菌的致病性, 因此选用斑马鱼作为感染对象。无乳链球菌Hn1404、FWL1405、071901、JC141、BSL01、WC1535、LT-1、GYCm081和WC15122菌株接种至脱脂绵羊血平板或BHI平板上, 30 °C培养过夜(I b型菌株因其生长缓慢, 需培养48 h), 分别刮取菌落至无菌PBS缓冲液中制备成菌悬液, 并将菌液稀释至600 CFU/mL。16尾成年野生型斑马鱼(AB品系, 由珠江水产研究所水生实验动物中心提供), 通过腹腔注射进行感染, 每尾注射20 μL菌悬液, 每组3个重复。对照组每尾斑马鱼腹腔注射20 μL无菌PBS缓冲液。试验组和对照组斑马鱼均在30 °C水温中饲养, 每日饲喂并且定期换水(约占总体积的1/4)。连续观察7 d, 记录各组斑马鱼的发病情况、死亡时间和死亡数。根据斑马鱼感染无乳链球菌后的死亡时间和死亡数, 通过SPSS 17.0分析软件绘制斑马鱼的生存曲线(即生存函数, Kaplan-Meier方法)。同时, 通过SPSS软件分析不同感染组之间累积死亡率的显著性差异(使用单因素方差分析), 评估不同宿主源无乳链球菌对斑马鱼的致病性差异。

2 结果

2.1 分子血清型

参考Imperi等^[18]方法检测无乳链球菌的分子血清型, 结果显示, FWL1405菌株为Ⅲ型; Hn1404、071901、JC141、BSL01、LT-1和WC1535菌株为I a型; GYCm081、WT1451和WC15122菌株为I b型。参考Poyart等^[19]进一步验证的结果发现, 本研究中10株无乳链球菌分为3种分子血清型, 与Imperi等^[18]方法检测的结果相同。

2.2 MLST分型

分别对已测序的无乳链球菌7个管家基因序列在MLST序列数据库中进行比对分析, 获得相

应菌株等位基因型别和ST序列号。比对结果表明, FWL1405菌株的*adhP*在数据库中没有相同的序列型别, 因此, 该基因序列属于新的型别。通过向数据库提交该基因序列, 获得新的等位基因型别以及菌株的ST型号, 即*adhP*型别为129, 比对结果发现FWL1405菌株*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK*和*tkl*等位基因型别分别是5、7、1、3、3、2, 获得该菌株新的ST型号为739。Hn1404、071901、JC141、LT-1、BSL01和WC1535菌株等位基因比对分析结果表明, 这些菌株均为ST7型。序列比对分析表明GYCm081、WT1451和WC15122菌株均为ST261型。

2.3 毒力基因检测

通过PCR检测10株无乳链球菌的12个毒力相关基因, 结果表明*hylB*、*fbxA*、*iagA*、*sip*、*cspA*、*bibA*和*cfb*基因在所有菌株中均为阳性。根据每株病原菌拥有毒力基因数目的不同可分为3种毒力基因型, 即FWL1405菌株的毒力基因型为V1: *scpB-lmb-bca-cylE-hylB-fbxA-iagA-sip-cspA-bibA-cfb*; 071901、Hn1404、LT-1、JC141、BSL01和WC1535菌株的毒力基因型相同, 即V2: *bca-bac-cylE-hylB-fbxA-iagA-sip-cspA-bibA-cfb*; GYCm081、WT1451和WC15122菌株有相同的毒力基因型, 即V3: *hylB-fbxA-iagA-sip-cspA-bibA-cfb*。

2.4 前噬菌体分型

无乳链球菌前噬菌体DNA的PCR检测结果显示, 根据无乳链球菌拥有的前噬菌体基因的数量可将10株病原菌分为4种基因型, 即FWL1405菌株为P3型(SAK_1326-SAK_1943-SAK_2083-SAK_2094); 071901、Hn1404和LT-1菌株为P2型(SAK_0748-SAK_0762-SAK_1326-SAK_1943); JC141、BSL01和WC1535菌株为P1型(SAK_0748-SAK_0762-SAK_1326-SAK_1943-SAK_2079-SAK_2083-SAK_2090-SAK_2094); GYCm081、WT1451和WC15122菌株为P4型(不含所检测的10个前噬菌体基因)。

2.5 无乳链球菌对斑马鱼的致病性

人工感染斑马鱼的试验结果表明, 不同水生动物源的无乳链球菌对斑马鱼均有强致病性(图1)。LT-1、BSL01、FWL1405、WC1535、

表 3 7种水生动物源无乳链球菌的毒力基因

Tab. 3 The virulence genes of *S. agalactiae* isolated from 7 kinds of aquatic hosts

毒力基因 virulence gene	菌株 strain									
	FWL1405	071901	Hn1404	LT-1	JC141	BSL01	WC1535	GYCm081	WT1451	WC15122
<i>scpB</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>lmb</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bca</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>bac</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>cyIE</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>hylB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fbsA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>iagA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sip</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cspA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>bibA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cfb</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
类型 type	V1	V2	V2	V2	V2	V2	V2	V3	V3	V3

注: +,阳性; -,阴性
Notes: +, positive; -, negative

表 4 7种水生动物源无乳链球菌的前噬菌体DNA基因型

Tab. 4 The prophage DNA patterns of *S. agalactiae* isolated from 7 kinds of aquatic hosts

前噬菌体 prophage	菌株 strain									
	FWL1405	071901	Hn1404	LT-1	JC141	BSL01	WC1535	GYCm081	WT1451	WC15122
SAK_0610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAK_0635	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAK_0748	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAK_0762	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAK_1326	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAK_1943	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAK_2079	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SAK_2083	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SAK_2090	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SAK_2094	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
类型 type	P3	P2	P2	P2	P1	P1	P1	P4	P4	P4

Hn1404、071901、JC141、GYCm081和WC15122感染组斑马鱼的7 d平均累积死亡率分别为87.5%、56.2%、62.5%、75.0%、100%、81.2%、56.2%和37.5%，PBS对照组的7 d累积死亡率为

0。感染组斑马鱼通常表现为腹部和胸鳍基部充血、离群游动，在腹腔注射40 h后即可发现体色发黑、眼球突出、打转游动或狂游。不同宿主源无乳链球菌感染斑马鱼后的死亡时间主要集

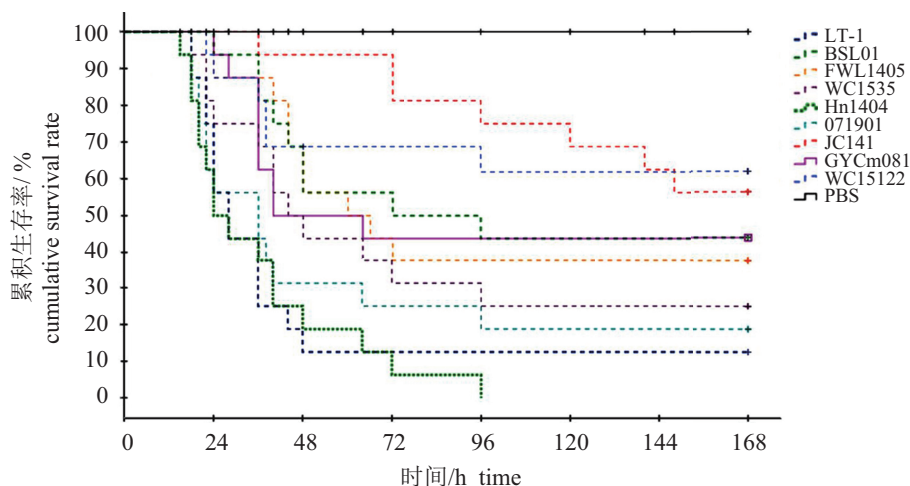


图 1 无乳链球菌感染斑马鱼后的存活曲线

Fig. 1 The survival curve of zebrafish infected with *S. agalactiae*

中在20~72 h (图1)。从濒死的斑马鱼肝脏和肾脏中都能分离到形态单一的细菌菌落, 经分子生物学鉴定, 结果均为无乳链球菌。研究表明, 0~96 h时, Hn 1404组的累积死亡率显著高于除LT-1组外的其他7组($P < 0.05$); 然而LT-1组和071901组之间无显著性差异; WC1535组和071901组无显著性差异; BSL01组、FWL1405组和GYCm081组之间无显著性差异; JC141组、GYCm081组和WC15122组之间无显著性差异。

3 讨论

3.1 不同水生动物源无乳链球菌的分子分型分析

无乳链球菌是重要的水生动物致病菌, 尤其是温水性鱼类受链球菌病的危害非常严重^[6]。无乳链球菌可以感染多种经济鱼类, 目前我国已报道的有尼罗罗非鱼^[2]、鲮^[23]、卵形鲳鲆、宝石鲈、红尾皇冠鱼^[24]。此外, 杭小英等^[25]发现牛蛙(*Rana catesbeiana*)也可感染无乳链球菌, 并且造成高达60%的死亡率。2014年, 本实验室在广东省惠州市人工养殖的患病虎纹蛙中分离到无乳链球菌, 同年在广东省佛山市患病鳊的体内分离到无乳链球菌, 这表明我国无乳链球菌感染水生动物的宿主范围呈扩大趋势, 但是无乳链球菌在水生动物中是否有相互传播的可能性? 本研究通过对7种水生动物源无乳链球菌进行分子分型以及对斑马鱼致病性分析, 揭示不

同宿主源无乳链球菌的基因型特征和致病能力, 为无乳链球菌的分子流行病学以及疫苗研发奠定理论基础。

致病性实验研究表明, 不同宿主源无乳链球菌对斑马鱼均有强致病性, 这表明本研究中的病原菌都是致病性无乳链球菌。毒力基因检测结果发现, 除蛙源无乳链球菌外, 其他宿主源无乳链球菌的*scpB*和*lmb*基因均为阴性。鳊、红尾皇冠鱼、宝石鲈和罗非鱼源的I a型无乳链球菌不含*scpB*和*lmb*基因, 与之前的研究结果相同, 即罗非鱼源I a型无乳链球菌不含*scpB*和*lmb*基因^[7, 22, 26]。在泰国, 95%的罗非鱼源和环境中的无乳链球菌也发生*scpB*和*lmb*基因的缺失^[21]。同样地, 鲮源和罗非鱼源I b型无乳链球菌的*scpB*和*lmb*基因也同时缺失, *scpB*和*lmb*基因Blastn比对结果发现, I b型罗非鱼源无乳链球菌如GX026菌株(GenBank序列号: CP011328)和SA20-06菌株均无此两个基因序列^[27]。值得注意的是, I b型无乳链球菌其毒力基因阳性率(7/12, 58.3%)低于I a型无乳链球菌的毒力基因阳性率(10/12, 83.3%)。然而, I b型无乳链球菌对斑马鱼也具有强致病力, 这表明*bac*、*bca*和*cyIE*基因不是无乳链球菌致病相关的必须毒力基因。毒力基因检测结果表明, 虎纹蛙源无乳链球菌为V1型; 鱼源无乳链球菌可分为V2型和V3型, 其中I a型无乳链球菌均属于V2型, I b型无乳链球菌均为V3型, 这暗示着不同分子血清型无乳链球菌的毒力基因型也可能不相同。

无乳链球菌的分子血清型和MLST分析结果显示, 7种水生动物源无乳链球菌可分为3种分子血清型和2种ST型, 其中仅蛙源无乳链球菌为Ⅲ-ST739型; I a-ST7型无乳链球菌的宿主有鳙、卵形鲳鲹、红尾皇冠鱼、罗非鱼和宝石鲈; I b-261型无乳链球菌的宿主有鲮和罗非鱼。毒力基因和前噬菌体分型结果显示, Ⅲ-ST739型无乳链球菌为V1-P3型; I a-ST7型无乳链球菌又可分为2种基因型, 即V2-P2型和V2-P1型; I a-ST261型无乳链球菌为V3-P4型。研究表明, 除了蛙源无乳链球菌的基因型较为特殊外, 其他鱼源无乳链球菌流行3种基因型, 而这3种基因型在罗非鱼无乳链球菌上均有发现。因此, 研究无乳链球菌在这些宿主之间的相互传播是很有意义的。

3.2 不同水生动物源无乳链球菌的流行与传播分析

我国华南地区罗非鱼养殖产量高、范围广, 但是, 近年来罗非鱼链球菌病害十分严重, 对罗非鱼养殖业造成巨大的经济损失。考虑到无乳链球菌在我国南方地区的罗非鱼中普遍流行, 且存在多种株型, 然而, 无乳链球菌在罗非鱼与其他宿主之间能否相互传播, 至今尚无相关参考文献。本研究表明, 虎纹蛙无乳链球菌FWL1405是Ⅲ-ST739型, 而且其毒力基因和前噬菌体分型均发现该菌株与鱼源无乳链球菌株型存在较大差异, 这表明目前无乳链球菌在虎纹蛙与鱼类之间相互传播的可能性很小。鳙源(Hn1404株)、红尾皇冠鱼源(071901株)和罗非鱼源无乳链球菌(LT-1株)的分子血清型、MLST分型、毒力基因型和前噬菌体DNA分型结果均发现这些无乳链球菌的基因型均相同, 这表明它们有共同的起源。其中, 我国南方罗非鱼养殖地区多数罗非鱼养殖池塘养殖少量的鳙, 用于调节水质。因而, 无乳链球菌在罗非鱼和鳙之间相互传播的可能性很大。红尾皇冠鱼无乳链球菌分离自天津地区, 虽然该地区也养殖罗非鱼, 但是规模较小, 无乳链球菌在这两种宿主之间是否存在相互传播, 目前尚难以确定。需要指出的是, 广东省广州市和佛山市等地区也养殖红尾皇冠鱼, 据了解因为经常抽取河水, 导致红尾皇冠鱼养殖池塘常常有野生罗非鱼入侵, 因此, 无乳链球菌有可能在罗非

鱼和红尾皇冠鱼之间水平传播, 无乳链球菌也有可能因为天津地区引入广东地区的红尾皇冠鱼苗种等原因进而跨地区传播。宝石鲈源(BSL01株)、卵形鲳鲹源(JC141株)和罗非鱼源无乳链球菌(WC1535株)的基因型也相同, 其中我国的宝石鲈和罗非鱼主要是淡水养殖, 由于BSL01菌株的分离地点是广州市, 而且与WC1535株基因型相同的无乳链球菌在广州地区养殖的罗非鱼中也十分流行(结果未显示), 因此, 无乳链球菌很有可能会在宝石鲈和罗非鱼之间相互传播。无乳链球菌JC141株分离自海南省海水养殖的卵形鲳鲹, 而我国尚未有海水养殖罗非鱼暴发无乳链球菌病的相关报道, 因此, 无乳链球菌在卵形鲳鲹和罗非鱼之间是否相互传播尚未可知。此外, 鲮源和罗非鱼源无乳链球菌也有相同的基因型, 鲮源无乳链球菌(GYcm081株)分离自广东省中山市地区, 本研究中罗非鱼源无乳链球菌WT1451和WC15122均分离自海南省地区, 这似乎表明无乳链球菌在鲮和罗非鱼之间相互传播的可能性很小。然而, 在广东省患病罗非鱼中同样发现I b型无乳链球菌的流行(目前尚不清楚其基因型), 而且广西地区养殖的罗非鱼无乳链球菌(GX026株)与鲮源、罗非鱼源无乳链球菌的基因型相同。因此, 无乳链球菌在鲮和罗非鱼之间是否存在相互传播还需进一步证实。综上, 本研究进一步认识了无乳链球菌在我国不同水生动物源之间的相互流行与传播特征。本研究表明, 两栖类(虎纹蛙)无乳链球菌和鱼源无乳链球菌的株型之间存在较大差异, 无乳链球菌在它们之间相互传播的可能性较小。然而, 不同鱼源无乳链球菌之间存在相同的基因型, 因此, 无乳链球菌在不同鱼类之间有相互传播的可能性, 尤其是在罗非鱼和其他鱼类之间。当然, 仅仅通过上述几种分子分型方法进行无乳链球菌的流行病学研究也存在局限性, 本研究为今后从基因组学水平进一步揭示不同宿主源无乳链球菌之间的遗传变异以及进化关系奠定基础。

参考文献:

- [1] Pietrocola G, Schubert A, Visai L, et al. FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation[J]. Blood,

- 2015, 105(3): 1052-1059.
- [2] 崔静雯, 汪开毓, 贺扬, 等. 无乳链球菌感染尼罗罗非鱼的脑膜炎模型[J]. 水产学报, 2015, 39(12): 1883-1893.
- Cui J W, Wang K Y, He Y, *et al.* *Oreochromis niloticus* model of meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(12): 1883-1893(in Chinese).
- [3] Liu L, Li Y W, He R Z, *et al.* Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(12): 1067-1072.
- [4] Saad M Z, Amal M N, Abdullah S Z, *et al.* Control and prevention of Streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a review[J]. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2014, 37(4): 389-410.
- [5] 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.
- Lu M X, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(5): 766-774(in Chinese).
- [6] 黄木珍, 黎炯, 潘忠超, 等. 宝石鲈无乳链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 247-251.
- Huang M Z, Li J, Pan Z C, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility analysis of *Streptococcus agalactiae* in *Scortum barcoo*[J]. *China animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(10): 247-251(in Chinese).
- [7] Zhang D F, Li A H, Guo Y J, *et al.* Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China[J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 64-69.
- [8] Li L P, Wang R, Liang W W, *et al.* Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3-4): 719-724.
- [9] Radtke A, Lindstedt B A, Afset J E, *et al.* Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(7): 2502-2508.
- [10] Kong F R, Martin D, James G, *et al.* Towards a genotyping system for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus): Use of mobile genetic elements in Australasian invasive isolates[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(4): 337-344.
- [11] 李莉萍, 王瑞, 黄婷, 等. 2007-2012年中国罗非鱼无乳链球菌流行菌株血清型分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(5): 469-475.
- Li L P, Wang R, Huang T, *et al.* Serotype of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in China from 2007 to 2012[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(5): 469-475(in Chinese).
- [12] 张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1044-1054.
- Zhang D F, Liu L H, Ren Y, *et al.* Isolation, identification, and molecular characteristics of a new geno-type of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1044-1054(in Chinese).
- [13] Chen M, Wang R, Luo F G, *et al.* *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes I a, III and V from human and cow are able to infect tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1-2): 129-135.
- [14] Ye X, Li J, Lu M X, *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(4): 623-632.
- [15] 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).
- [16] Saralahti A, Ramet M. Zebrafish and streptococcal infections[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 82(3): 174-183.
- [17] 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.
- [18] Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, *et al.* A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular

- type (I a to IX) of *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80(2): 212-214.
- [19] Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, *et al.* Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(6): 1985-1988.
- [20] Godoy D T, Carvalho-Castro G A, Leal C A G, *et al.* Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(6): 476-483.
- [21] Kayansamruaj P, Pirarat N, Katagiri T, *et al.* Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2014, 26(4): 488-495.
- [22] Liu G J, Zhang W, Lu C P. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 775.
- [23] 刘礼辉, 张德锋, 李宁求, 等. 鲢鱼源无乳链球菌的鉴定、血清型分析及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2015, 46(11): 2053-2058.
- Liu L H, Zhang D F, Li N Q, *et al.* Identification, serotype analysis and drug sensitivity test of *Streptococcus agalactiae* from *Cirrhinus molitorella*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(11): 2053-2058(in Chinese).
- [24] 姚学良, 徐晓丽, 李贺密, 等. 红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)病原无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 106-112.
- Yao X L, Xu X L, Li H M, *et al.* Biological characteristics of pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from *Aequidens rivulatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 106-112(in Chinese).
- [25] 杭小英, 周冬仁, 叶雪平, 等. 牛蛙无乳链球菌病原的分离鉴定[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 361-364.
- Hang X Y, Zhou D R, Ye X P, *et al.* Isolation and identification on the pathogen of bullfrog *Streptococcus* disease[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(2): 361-364(in Chinese).
- [26] Kayansamruaj P, Pirarat N, Kondo H, *et al.* Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015, 36: 307-314.
- [27] de Pádua Pereira U, dos Santos A R, Hassan S S, *et al.* Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks[J]. Standards in Genomic Sciences, 2013, 8(2): 188-197.

Molecular characteristics and the pathogenicity to zebrafish of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from seven aquatic animals in China

ZHANG Defeng¹, KE Xiaoli¹, LIU Zhigang¹, WANG Shifeng²,
YUAN Wei¹, SHI Cunbin¹, LU Maixin^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The aim of this study is to obtain the molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS) strains isolated from seven aquatic animals in China, and then analyze the epidemiology and transmission of GBS strains in these aquatic animals. In this study, a total of 10 GBS strains were isolated from seven aquatic animals. These isolates were analyzed by four typing methods: molecular serotype, MLST (Multilocus Sequence Typing), virulence genotype and prophage typing. In addition, the pathogenicity of GBS strains was evaluated by zebrafish. The ten GBS strains were divided into three types based on molecular serotype, namely I a, I b and III. The results of MLST indicated that serotypes I a, I b and III were ST7, ST261 and ST739, respectively. The ten GBS strains were divided into three virulence genotypes (V1, V2 and V3) determined by PCR detection. The FWL1405 strain (-ST739) isolated from *Hoplobatrachus chinensis* carried 11 virulence genes (11/12, 91.7%), and the a-ST7 GBS strains carried 10 virulence genes (10/12, 83.3%), and the b-ST7 GBS strains were possessed of 7 virulence genes (7/12, 58.3%). Prophage typing showed that the ten GBS strains were divided into four types (P1, P2, P3 and P4), and the strains of P1 and P1 types belong to a-ST7 GBS strains. These results revealed that GBS strains from seven hosts were divided into four genotypes, and the FWL1405 strain was the unique type: -ST739-V1-P3, determined by the previous four typing methods. However, tilapia GBS strains (LT-1, WC1535, WT1451 and WC15122) were divided into three genotypes: I a-ST7-V2-P1, I a-ST7-V2-P2 and I a-ST7-V3-P4. More important, the GBS strains isolated from *Aristichthys nobilis*, *Aequidens rivulatus*, and *Oreochromis* sp., have the same genotype: I a-ST7-V2-P2. The strains isolated from *Trachinotus ovatus*, *Scortum barcoo*, and *Oreochromis* sp., have the same genotype: I a-ST7-V2-P1. Furthermore, the same genotype of the GBS strains were found that isolated from *Cirrhinus molitorella* and *Oreochromis* sp.. Additionally, in this study, all the GBS strains have strong pathogenicity to zebrafish (*Danio rerio*). In conclusion, the genotypes of ten GBS strains were significantly different between amphibians (frog) and fishes. The possibility was little that GBS strains transmitted between amphibians and fishes. Notably, there were three genotypes of GBS strains from fishes, and the same genotype GBS strains were all found in tilapia. These results indicated that the possibility was great that GBS strains transmitted among these six species of fish, especially between tilapia and other fish species.

Key words: *Danio rerio*; *Streptococcus agalactiae*; epidemiology; molecular serotype; MLST; virulence gene

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); Special Fund for Fish Diseases Prevention and Therapy from Guangdong Province (201611); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313146)