



西伯利亚鲟海豚链球菌和鲟疱疹病毒 II 型 混合感染的诊断与病理损伤

程子瑄¹, 耿毅^{1*}, 陈垚焱¹, 邓李霜¹, 汪开毓¹, 康振亚¹,
黄小丽², 陈德芳², 欧阳萍¹, 汪蕉¹

(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: 2018年8月, 四川彭州与邛崃的养殖西伯利亚鲟发生一种以出血为临床特征, 高死亡率的传染病, 为明确其病因, 本研究对发病鲟的肝脏、肾脏进行病原菌分离、鉴定和鲟疱疹病毒 II 型 (AciHV-2) 的 PCR 检测。从患病鲟体内分离到 2 株 G⁺链状球菌, 其 16S *rRNA* 序列 (MN416231、MN416230) 与 GenBank 中海豚链球菌 16S *rRNA* 序列同源性达 99%, 在以 16S *rRNA* 序列构建的系统发育树上, 分离菌与海豚链球菌聚为一支; 同时基于海豚链球菌 *lctO* 基因的特异性 PCR 检测为阳性, 鉴定 2 株分离菌为海豚链球菌。提取患病鲟肝脏、肾脏组织 DNA 进行 AciHV-2 特异性 PCR 检测, 扩增出 501 bp 的特异性条带, 在以 AciHV-2 *polymerase* 基因序列构建的系统发育树上, 检测样本与 AciHV-2 聚为一支。病理组织学上, 患病鲟的多组织器官发生明显损伤, 尤其是肝脏、肾脏、鳃、脾脏和肠的损伤较为严重, 表现为明显的变性、坏死、出血以及炎症细胞浸润; 电镜下, 观察到肝脏、肾脏组织内大量直径 200~220 nm 的疱疹病毒样颗粒与 0.7~0.8 μm 的链球菌入侵细胞, 并导致细胞损伤。综上, 诊断患病西伯利亚鲟的病因是海豚链球菌与 AciHV-2 混合感染。

关键词: 西伯利亚鲟; 海豚链球菌; 鲟疱疹病毒 II 型; 分离鉴定; 病理损伤

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

21 世纪初, 我国鲟养殖业开始迅猛发展, 养殖规模不断扩大, 相关产业链不断发展, 经十多年的快速发展, 我国已发展成为世界第一鲟养殖大国^[1]。西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*), 属鲟形目 (Acipenseriformes), 鲟科 (Acipenseridae), 鲟属 (*Acipenser*), 1996 年引入我国, 因其具有生长速率快、适应性强、肉质营养价值高, 味道鲜美等特点^[2], 深受养殖者与消费者青睐, 其养殖规模与产量已居我国鲟养殖第一位^[3]。目前, 危害全球鲟养殖最主要的疫病为细菌病和病毒

病, 主要细菌病原为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[4]、豚鼠气单胞菌 (*A. carvia*)^[5]、分枝杆菌 (*Mycobacterium*)^[6]、海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)^[7] 等; 病毒性病原为鲟虹彩病毒 (sturgeon iridovirus, SIV) 及鲟疱疹病毒-I、II (Acipenserid herpesvirus-1、2)^[8], 而在我国养殖鲟中则以细菌性疾病的危害较大^[9], 还未见病毒感染的确切报道。2018 年 8 月, 四川彭州与邛崃两地养殖西伯利亚鲟发生一种以出血为病理特征的传染病, 死亡率达 50% 以上, 为明确其病因, 本研究从

收稿日期: 2020-05-20 修回日期: 2020-07-02

资助项目: 四川省重点研发项目 (2018NZ0007); 四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目 (SCCXTD-15)

通信作者: 耿毅, E-mail: gengyisicau@126.com

自然发病的西伯利亚鲟体内分离病原菌, 对其进行表型与分子特性的分析, 同时进行 AciHV-2 特异性 PCR 检测, 发现该病是由海豚链球菌和 AciHV-2 混合感染引起。实验进行了感染西伯利亚鲟的病理损伤观察, 以明确其病理损伤特点, 为阐释海豚链球菌和 AciHV-2 混合感染的致病机制提供资料, 同时也为临床诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与标准菌株

患病西伯利亚鲟 5 尾, 体质量 126~360 g, 由四川邛崃及彭州的鲟养殖场送检。海豚链球菌标准菌株 ATCC29178 购自美国菌种保藏中心。

1.2 主要试剂

脑心浸液培养基 (BHI) 购自北京欣经科生物技术有限公司; 水解酪蛋白培养基 (Mueller-Hinton medium)、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 DP302、动物组织 (血液)DNA 提取试剂盒 DP304、PCR 产物纯化试剂盒 DP214、PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 临床症状及剖检观察

问询了解发病临床特征, 并对患病西伯利亚鲟进行剖检, 检查其大体病理变化。

1.4 细菌学检查

病原菌的分离与形态观察 在无菌条件下, 从病鱼肝脏、肾脏取样划线接种普通琼脂平板和 BHI 平板, 28 °C 下培养 24~48 h, 挑取形态大小一致的单个优势菌落在 BHI 平板上再次划线培养, 获得纯培养菌株, 观察菌落与菌体形态特征。

分离菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析 挑取纯培养的菌株接种于 28 °C 的 BHI 培养液中培养 24 h, 取生长期的新鲜菌液, 离心收集菌体, 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^[10](F: 5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/R: 5'-TACGGCT ACCTTGTTACGAC-3')PCR 扩增 16S rRNA 基因, 预期扩增片段大小 1 500 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 DNA 纯化

试剂盒纯化后, 由擎科梓熙 (成都) 生物技术有限公司测序。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 Blast 比对, 再采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

分离菌基于海豚链球菌 *lctO* 基因的 PCR 检测 参照 Mata 等^[11]的方法, 合成一对扩增海豚链球菌 *lctO* 基因的特异性引物 (F: 5'-AAG GGGAAATCGCAAGTGCC-3'/R: 5'-ATATCTG ATTGGGCCGTCTAA-3'), 对分离菌进行海豚链球菌 *lctO* 基因的 PCR 检测, 同时设海豚链球菌标准菌株 ATCC29178 为阳性对照。预期扩增片段大小 870 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。2% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增结果。

1.5 AciHV-2 的特异性 PCR 检测

采取患病西伯利亚鲟的肝脏与肾脏组织, 提取基因组 DNA, 参照 Kurobe 等^[12]的方法, 合成一对扩增 AciHV-2 的 *polymerase* 基因的特异性引物 (F: 5'-GCMMGRGGACAGAWCCCMG-3'/R: 5'-GGTGCACACRCCMADIGACG-3'), 以提取的基因组 DNA 为模板进行 AciHV-2 的 PCR 检测, 预期扩增片段大小 501 bp。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 由擎科梓熙 (成都) 有限公司测序。将基因组的 AciHV-2 的 *polymerase* 基因序列在 GenBank 中进行 Blast 比对, 再采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.6 组织病理学观察

取患病西伯利亚鲟的肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠和肌肉等组织, 10% 的中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 常规切片, 苏木紫—伊红 (H.E) 染色, 中性树胶封片, 光学显微镜观察。

1.7 电镜观察

取患病西伯利亚鲟的肝脏和肾脏组织, 参照文献 [13] 的方法, 2.5% 戊二醛溶液固定, 超薄切片, 电子显微镜观察。

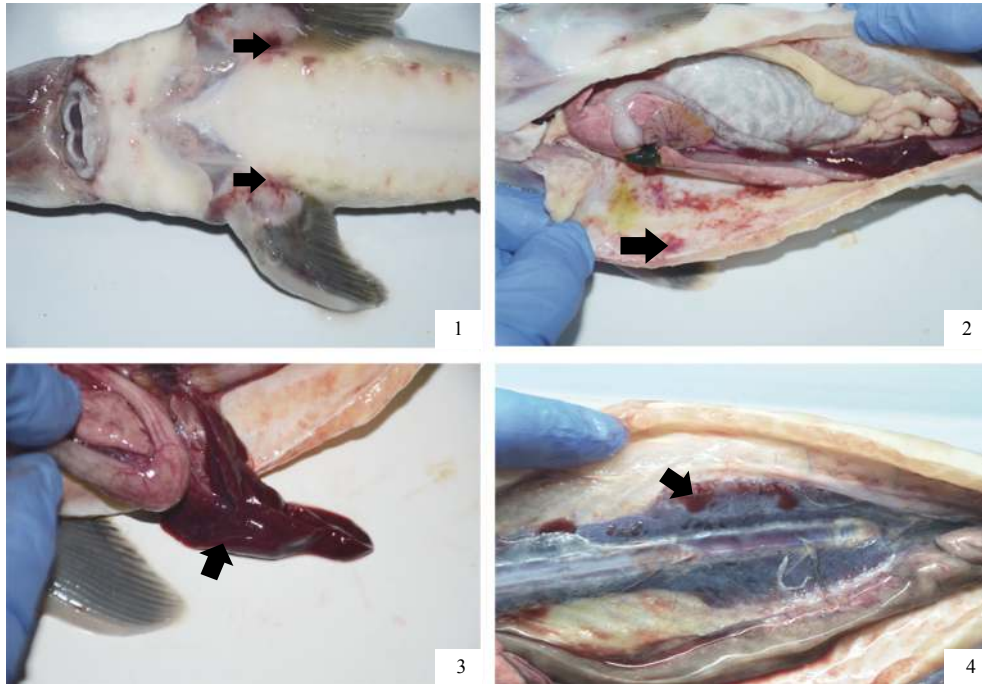
2 结果

2.1 临床症状及剖检

患病西伯利亚鲟食欲减退甚至不食, 体瘦、体色发黑, 游动时难以平衡, 发病后迅速死亡, 病死率高达 50% 以上。患病西伯利亚鲟体表及口周围、鳍条基部等点状或斑状出血和

体表溃疡(图版 I -1)。剖检见腹膜出血(图版 I -2); 肝脏发白, 淤血、出血; 脾脏肿大, 呈暗红色(图版 I -3); 性腺出血, 肠道空虚, 肠腔内大量

黏液, 后段肠道明显出血; 肾脏肿大、出血, 呈深紫色(图版 I -4)。



图版 I 患病西伯利亚鲟的临床病变

1. 胸鳍基部出血(箭头); 2. 腹膜出血(箭头); 3. 脾肿大, 呈暗红色(箭头); 4. 肾脏肿大, 出血(箭头)

Plate I Gross lesions of diseased *A. baerii*

1. hemorrhage at the base of pectoral fin (arrow); 2. hemorrhage in peritoneum (arrow); 3. swelling in spleen with dark red (arrow); 4. swelling and hemorrhage in kidney (arrow)

2.2 细菌学检查

病原菌的分离与形态特征 从患病西伯利亚鲟的肝脏、肾脏中分离到优势菌 CZX180815 和 CZX180820。分离菌株在普通营养琼脂平板上生长不良, 在 BHI 平板形成白色、表面光滑、针尖大小、微隆起、边缘整齐、表面湿润的菌落。菌体为 G⁺ 球菌, 呈链状或成对排列。

16S rRNA 基因序列及系统发育分析 分别扩增出分离菌 CZX180815 和 CZX180820 的 16S rRNA 基因片段(GenBank 登录号: MN416231、MN416230), 测序后在 GenBank 中进行 Blast 比对, 发现其与海豚链球菌的 16S rRNA 基因序列的同源性最高, 达 99% 以上。在以分离菌 16S rRNA 基因及 GenBank 中相关基因序列(登录号标注在学名后)构建的系统发育树上, 2 株分离菌与海豚链球菌聚为一支(图 1)。

海豚链球菌 *lctO* 基因的 PCR 检测 以提取的分离菌 DNA 为模板, PCR 扩增海豚链球

菌 *lctO* 基因。结果显示, 2 株分离株与海豚链球菌标准株的基因组均扩增出 870 bp 的目的条带, 与预期相符(图 2)。结合形态学、16S rRNA 基因序列分析及特异性 PCR 检测, 鉴定 2 株分离菌(CZX180815 和 CZX180820) 为海豚链球菌。

2.3 *AciHV-2* 的特异性 PCR 检测

以提取的患病西伯利亚鲟肝脏和肾脏 DNA 为模板进行基于 *AciHV-2 polymerase* 基因的特异性 PCR 检测。结果从患病鲟肝脏和肾脏中均扩增出约 501 bp 的目的条带, 与预期相符(图 3), 随机抽取 2 个样品(QL2、PZ2) 进行测序, 测序后与 GenBank 中进行 Blast 比对, 其与 *AciHV-2* 的 *polymerase* 的同源性最高, 达 94% 以上。在以样品基因序列及 GenBank 中其他相关疱疹病毒基因序列构建的系统发育树上, 本研究中扩增出的 2 条基因序列与 *AciHV-2* 的 *polymerase* 基因序列聚为一支(图 4)。

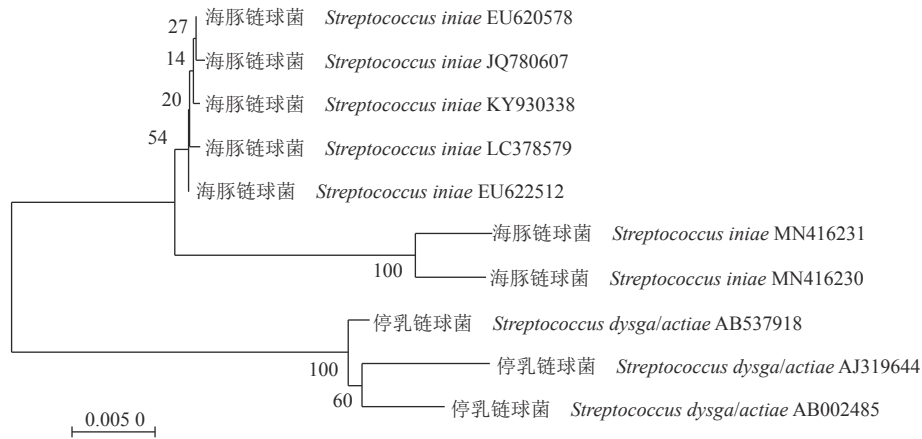


图 1 基于分离株 CZX180815 和 CZX180820 及相关菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树
 Fig. 1 Phylogenetic tree based on alignment for 16S rDNA sequence of the isolates CZX20180815 and CZX20180820 and other related species in *Streptococcus*

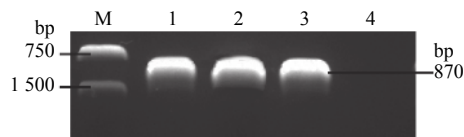


图 2 2 株分离菌 lctO 基因的 PCR 扩增结果
 M. DL 2 000 DNA marker, 1. 海豚链球菌阳性 ATCC29178, 2. 样品 CZX180815, 3. 样品 CZX180820, 4. 阴性对照

Fig. 2 Electrophoresis of *lctO* gene PCR of two bacterial isolates and *S. iniae* ATCC29178

M. DL 2 000 DNA marker, 1. *S. iniae* ATCC29178, 2. CZX180815; 3. CZX180820, 4. negative control

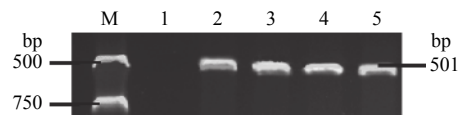


图 3 西伯利亚鲟组织 AciHV-2 的 polymerase 基因 PCR 扩增产物电泳图

M. DL 2 000 DNA marker, 1. 阴性对照, 2. 样品 QL-1, 3. 样品 QL-2, 4. 样品 PZ-1, 5. 样品 PZ-2

Fig. 3 Electrophoresis of AciHV-2 polymerase gene PCR amplification extracted from diseased *A. baerii*

M. DL 2 000 DNA marker, 1. negative control, 2. sample QL-1, 3. sample QL-2, 4. sample PZ-1, 5. sample PZ-2

2.4 组织病理学观察

患病西伯利亚鲟肝窦及中央静脉淤血, 肝细胞肿胀, 广泛性空泡变性, 部分区域肝细胞由变性发展到坏死, 表现为细胞核浓缩、溶解及细胞破裂 (图版 II -1)。脾脏骨髓与红髓结构模糊不清, 淋巴细胞减少, 大量含铁血黄素沉积, 红髓充血、出血, 网状内皮细胞增生, 骨髓出血, 巨噬细胞浸润 (图版 II -2)。肾小管上皮透明变性, 胞浆内大量红色滴状蛋白颗粒, 病变严

重的区域, 肾小管上皮细胞坏死, 表现为细胞核浓缩、裂解与溶解消失, 管腔中充满大量淡红染的蛋白; 肾间质充血、出血, 淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润; 肾小球肿大, 血管扩张充血, 血管内皮与系膜细胞增生 (图版 II -3、II -4)。鳃小片增粗, 上皮细胞增生, 形成增生性融合, 局部细胞发生坏死, 淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润 (图版 II -5)。肠黏膜上皮坏死、脱落, 固有膜裸露, 其内大量淋巴细胞、

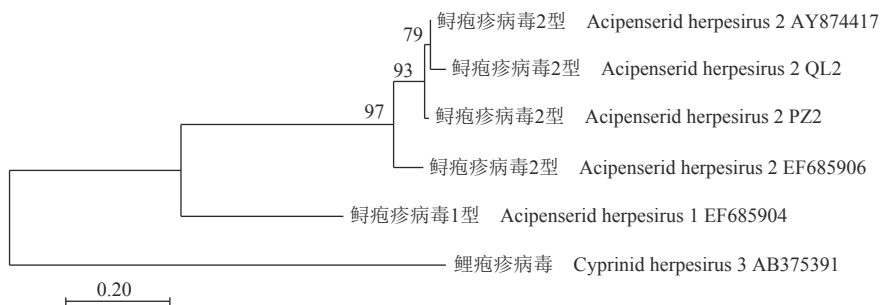
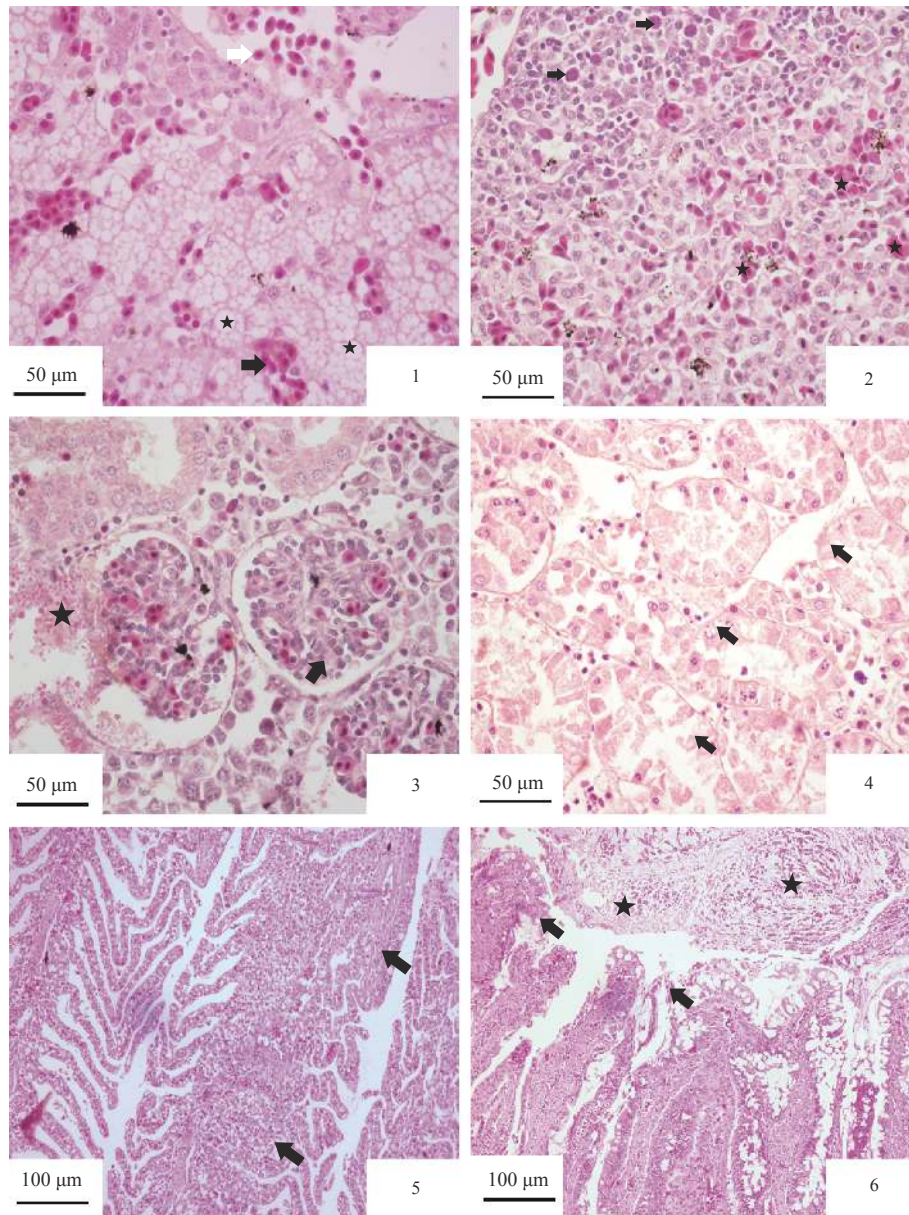


图 4 基于 AciHV-2 polymerase 基因序列构建的系统发育树
 Fig. 4 Phylogenetic tree based on sequence of AciHV-2 polymerase



图版 II 感染西伯利亚鲟的病理组织学检测结果 (H.E)

1. 肝细胞肿胀, 空泡变性(星号)、肝窦(黑色箭头)及中央静脉淤血(白色箭头); 2. 脾脏淋巴细胞减少, 巨噬细胞浸润(箭头), 白髓出血(星号); 3. 肾小球肿大(箭头), 囊内多量渗出物(星号); 4. 肾小管上皮变性, 坏死(箭头); 5. 鳃小片上皮增生(箭头); 6. 肠黏膜上皮坏死(箭头), 脱落(星号)

Plate II Histopathological lesions of infected *A. baerii* (H.E)

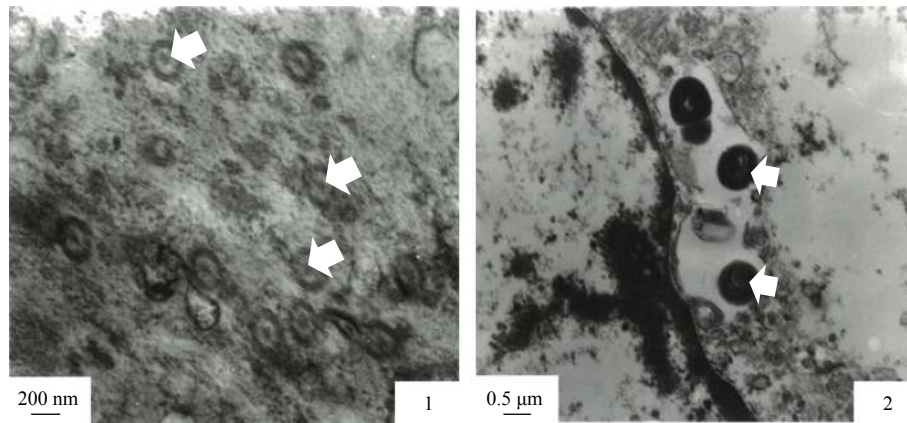
1. swelling and vacuolar degeneration in liver cell (star), congestion of hepatic sinuses (black arrow) and central veins (white arrow); 2. lymphocyte depletion and infiltration of macrophages in spleen (arrow) white pulp hemorrhage (star); 3. glomerular enlargement (arrow), and a large amount of exudate in renal capsule (star); 4. degeneration and necrosis in renal tubular epithelia (arrow); 5. proliferation of epithelia in gill lamella (arrow); 6. necrosis (arrow) and shedding (star) of epithelia intestinal mucosa

巨噬细胞等炎症细胞浸润, 肠腔内充满大量坏死、脱落的细胞及红染的黏液 (图版 II -6)。

2.5 电镜观察

患病西伯利亚鲟肝脏、肾脏组织超薄切片后, 电镜观察发现细胞超微结构破坏, 线粒体

肿胀、嵴断裂或溶解, 内质网扩张脱颗粒, 溶酶体增多, 有的细胞线粒体、内质网等细胞器溶解, 核染色质浓缩、边移; 并在一些细胞内见直径 200~220 nm 的疱疹病毒样颗粒 (图版 III -1) 以及直径为 0.7~0.8 μm 的球形细菌 (图版 III -2)。



图版 III 患病西伯利亚鲟肾脏组织的电镜观察

1. 细胞内疱疹病毒样颗粒(箭头); 2. 细胞内球状细菌(箭头)

Plate III Electron microscope observation of *A. baerii* kidney

1. herpesvirus-like particles in cell (arrow); 2. coccus in cell (arrow)

3 讨论

海豚链球菌作为一种重要的水生动物病原菌, 隶属于链球菌科 (Streptococcaceae), 链球菌属, 1976 年 Pier 等^[14] 首次从患皮肤脓肿的亚马逊淡水海豚 (*Inia geoffrensis*) 中分离, 并证实其致病性, 其后全球多地相继发现该菌可感染鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、银鼓鱼 (*Selenotoca multifasciata*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 和银大麻哈鱼 (*O. kisutch*) 等鱼类^[15-17], 给水产养殖造成严重的危害, 同时也对人类健康造成威胁。近年来的研究表明, 海豚链球菌对我国养殖鲟的危害较为严重, 其发病死亡率往往大于 35%, 其感染可致鲟体表出血、溃疡及多组织器官损伤, 尤其是心脏外膜出现大量米粒样大小的泡状囊肿, 具有一定的诊断意义^[18]。本研究中, 从病鱼肝脏中分离出了海豚链球菌, 感染鲟表现出体表出血、溃疡及肝脏、肾脏、脾脏、鳃等器官的变性、坏死、出血以及炎症细胞浸润的病理损伤, 这之前报道的海豚链球菌感染鲟的病理损伤相似^[17-18], 但其心脏外膜的损伤不明显, 其原因尚未明确, 本研究还发现分离海豚链球菌的 *simA* 基因发生了变异, 这是否是导致心脏外膜损伤并发生变化的原因之一值得进一步探究。

AciHV-2 最早于 1991 年在美国成体白鲟 (*Psephurus gladius*) 的卵巢液中分离到^[19], 其后在加拿大、欧洲有 AciHV-2 感染鲟发病的报道^[20-21], AciHV-2 感染鲟苗的累计死亡率达 45%~80%, 患

病鲟往往表现为行动迟缓, 胸鳍旁出现圆形或椭圆形白色损伤、皮肤坏死、肛门充血、肝脏苍白、体表出现白色小水泡, 并且会逐渐发展为溃疡, 形成的创伤容易导致病鱼受到其他细菌或寄生虫的继发感染, 加重病情, 导致更为严重的损失, 但是耐受过的鱼被再次感染后的死亡率会明显下降^[22]。本病例中, 检测发现患病西伯利亚鲟肝脏、肾脏等组织 AciHV-2 特性 PCR 检测为阳性, 同时电子显微镜下也发现组织内有大量直径 200~220 nm 的疱疹病毒样颗粒与链状细菌, 结合细菌学检测结果, 表明发生在四川彭州与邛崃的鲟疫情是由海豚链球菌和 AciHV-2 混合感染所致。本研究中发现感染鲟的临床特征及病理损伤与前人报道的鲟海豚链球菌和 AciHV-2 混合感染相似^[23], 但患病鱼体表的溃疡不是很明显, 这是否与感染的 AciHV-2 毒力有关值得探索, 由于 AciHV-2 在 EPC、FHM 等细胞系上不增殖, 分离该病毒需要鲟源 WSSK-1 等细胞系, 因此, 本研究未成功分离到 AciHV-2, 也给后续的研究带来了困难。

本研究首次发现了 AciHV-2 在我国养殖鲟中的感染与致病机理, 对于该病原在我国鲟养殖区的来源是否与国外报道的引入带毒鱼有关, 虽带毒鱼的来源目前尚不能确定, 但对于 AciHV-2 目前在我国鲟养殖区的分布流行情况值得进一步调查, 为限制带毒鲟的流通, 控制 AciHV-2 的扩散提供依据。在病理损伤观察中发现, 感染鲟脾脏损伤表现为淋巴细胞数量明显减少, 表明海豚链球菌与 AciHV-2 混合感染能致鲟免疫力减低, 在应激的情况下会引起大量死亡, 因

此, 应减少对感染鲟的应激, 改善养殖环境, 降低条件性致病菌感染的几率, 对降低海豚链球菌与 AciHV-2 混合感染造成的损失有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] 刘晓勇, 李鸳鸯, 赵海军. 中国鲟鱼养殖产业发展战略思考[J]. *中国渔业经济*, 2013, 31(6): 69-76.
Liu X Y, Li S S, Zhao M J. The aquaculture industry and development strategy of sturgeon in China[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31(6): 69-76(in Chinese).
- [2] 杨移斌, 夏永涛, 曹海鹏, 等. 西伯利亚鲟基本生物学特性及养殖介绍[J]. *水产养殖*, 2013, 34(11): 17-20.
Yang Y B, Xia Y T, Cao H P, *et al.* Basic biological characteristics and culture of *Acipenser baerion*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2013, 34(11): 17-20(in Chinese).
- [3] Wei Q J, He J, Yang D G, *et al.* Status of sturgeon aquaculture and sturgeon trade in China: a review based on two recent nationwide surveys[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, 20(5): 321-332.
- [4] 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.
- [5] 司力娜, 李绍戊, 王荻, 等. 养殖鲟鱼暴发病原菌分离及药敏实验[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(4): 18-22.
Si L N, Li S W, Wang D, *et al.* The isolation and drug sensitive tests of pathogens found in sturgeon epizootic disease[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(4): 18-22(in Chinese).
- [6] 张德锋, 李爱华, 龚小宁. 鲟分枝杆菌病及其病原研究[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 495-504.
Zhang D F, Li A H, Gong X N. Research on the mycobacteriosis and its pathogen in sturgeons[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 495-504(in Chinese).
- [7] 郑李平, 耿毅, 雷雪平, 等. 鲟海豚链球菌的分离鉴定及其感染后的病理损伤[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(2): 203-210.
Zheng L P, Geng Y, Lei X P, *et al.* Isolation and identification of *Streptococcus iniae* from sturgeon and its pathological lesions of infection[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(2): 203-210(in Chinese).
- [8] 王荻, 刘红柏, 卢彤岩, 等. 鲟鱼病毒性疾病研究进展[J]. *水产学杂志*, 2008, 21(2): 84-89.
Wang D, Liu H B, Lu T Y, *et al.* Advance on the study of sturgeon virosis[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2008, 21(2): 84-89(in Chinese).
- [9] 曹师琪, 耿毅, 余泽辉, 等. 杂交鲟鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及感染的病理损伤[J]. *华南农业大学学报*, 2018, 39(4): 13-19.
Cao S Q, Geng Y, Yu Z H, *et al.* Isolation and identification of *Yersinia ruckeri* from hybrid sturgeon and pathological lesions of its infection[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2018, 39(4): 13-19(in Chinese).
- [10] Jensen S, Bergh O, Enger O, *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.
- [11] Mata A I, Blanco M M, Domínguez 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.
- [12] Kurobe T, Kelley G O, Waltzek T B, *et al.* Revised phylogenetic relationships among herpesviruses isolated from sturgeons[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2008, 20(2): 96-102.
- [13] 洪涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
Hong T. Biomedical ultrastructure and electron microscopy[M]. Beijing Science Press, 1980(in Chinese).
- [14] Pier G B, Madin S H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia Geoffrensis*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1976, 26(4): 545-553.
- [15] 罗璋, 许杰, 韩进刚, 等. 银鼓鱼病原菌(海豚链球菌)的分离与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(1): 95-99.
Luo Z, Xu J, Han J G, *et al.* Isolation and identification of pathogenetic *Streptococcus iniae* from selenotoca multi fasciata[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(1): 95-99(in Chinese).
- [16] 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[J]. *微生物学报*, 2014, 54(4): 442-448.
Wang X L, Xu L P, Wang J B, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity of *Streptococcus iniae* from hybrid sturgeons (*Huso dauricus* female × *Acipenser schrencki* male)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 442-448(in Chinese).
- [17] 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[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(1): 161-166.
Zhang J, Zhou S M, Zhou A X. *Streptococcus iniae* infection in cultured tilapia, sea bass, and barramundi in Guangdong[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 161-166(in Chinese).
- [18] 邓梦玲, 耿毅, 刘丹, 等. 西伯利亚鲟海豚链球菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 127-135.
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Deng M L, Geng Y, Liu D, *et al.* Isolation, identification and detection of virulence genes of *Streptococcus iniae* from *Acipenser baerii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(1): 127-135(in Chinese).
- [19] Hedrick R P, McDowell T S, Groff J M, *et al.* Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon *Acipenser transmontanus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1991, 11(1): 49-56.
- [20] Watson L R, Yun S C, Groff J M, *et al.* Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 22(3): 199-210.
- [21] Doszpoly A, Shchelkunov I S. Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AciHV-2-Short communication[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2010, 58(2): 269-274.
- [22] Georgiadis M P, Hedrick R P, Johnson W O, *et al.* Risk factors for outbreaks of disease attributable to white sturgeon iridovirus and white sturgeon herpesvirus-2 at a commercial sturgeon farm[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2000, 61(10): 1232-1240.
- [23] Soto E, Richey C, Stevens B, *et al.* Co-Infection of *Acipenserid herpesvirus 2* (AciHV-2) and *Streptococcus iniae* in cultured white sturgeon *Acipenser transmontanus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2017, 124(1): 11-20.

Diagnosis and pathological lesions of the co-infection of *Streptococcus iniae* and acipenserid herpesvirus 2 in *Acipenser baerii*

CHENG Zixuan¹, GENG Yi^{1*}, CHEN Yaoyan¹, DENG Lishuang¹, WANG Kaiyu¹,
KANG Zhenya¹, HUANG Xiaoli², CHEN Defang², OUYANG Ping¹, WANG Jiao¹

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

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

Abstract: In August 2018, an infectious disease with high mortality and hemorrhagic symptom occurred in *Acipenser baerii* in Pengzhou and Qionglai Counties, Sichuan Province, China. Bacterial examination, PCR detection of acipenserid herpesvirus 2 (AciHV-2) and pathological examination of liver and kidney of *A. baerii* were performed to elucidate the aetiology. Two strains of gram-positives chain-forming cocci were isolated from the diseased *A. baerii*, and the 16S *rRNA* gene sequencing analysis by BLAST in GenBank indicated that the two isolates (MN416231 and MN416230) showed a high level of similarity to *Streptococcus iniae* (more than 99%). A phylogenetic tree based on the 16S *rRNA* sequences indicated that the two isolates and other *S. iniae* strains were grouped into a same branch. In addition, specific PCR detection for *lctO* gene of *S. iniae* showed that the two isolates were positive. Based on the 16S *rRNA* gene sequencing analysis and specific PCR detection, two isolates were identified as *S. iniae*. The total DNA was extracted from liver and kidney tissues of diseased *A. baerii* for PCR detection of AciHV-2 polymerase gene, and a 501 bp target band was amplified. A phylogenetic tree based on the sequences indicated that the two samples(QL2, PZ2)and other AciHV-2 strains were clustered together in a branch. Histopathologically, degeneration, necrosis, hemorrhage and infiltration of the inflammation cells occurred in multiple tissues and organs, particularly obvious in liver, kidney, gill, spleen and intestine. A large number of cells invaded by herpesvirus-like particles with a diameter of 200-220 nm and streptococcus with a diameter of 0.7-0.8 microns were observed using electron microscopy, which caused cell damage. In conclusion, the etiology of the diseased *A. baerii* was a co-infection of *S. iniae* and AciHV-2.

Key words: *Acipenser baerii*; *Streptococcus iniae*; AciHV-2; isolation and identification; pathological lesion

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

Funding projects: Key Research Projects of Sichuan (2018NZ0007); Sichuan Freshwater Fish Industry Technology System Innovation Team Construction Project (SCCXTD-15)