

# 光唇鱼源无乳链球菌的分离鉴定及遗传特征

蔺凌云 潘晓艺\* 姚嘉赟 尹文林 曹铮 刘忆瀚 沈锦玉\*

(浙江省淡水水产研究所, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州 313001)

**摘要:** 为查明浙江养殖光唇鱼大量死亡的病原, 了解该病原的遗传特征, 本工作对患病光唇鱼进行病原分离, 结合形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列同源性, 鉴定分离菌株 ACRO-0708 为无乳链球菌; 人工回感试验证实其对光唇鱼具有较高的致病性, 菌株 ACRO-0708 的血清型为 I b, MLST 型为 ST261, 毒力基因型为  $sip^+ bibA^+ cfb^+ hylB^+ iagA^+ fbsA^+ fbsB^+ bac^- bca^- cylE^- scpB^- lmb^-$ , 不携带所检测的 6 种表面蛋白基因。药敏试验结果显示, 对青霉素、氨苄西林等 8 种药物较敏感, 对氯霉素、复方新诺明等 7 种药物耐药。

**材料与方法:** 发病光唇鱼采自浙江某光唇鱼养殖场; 健康光唇鱼由本所养殖基地提供, 每尾 10-12 g。对病鱼的肝、脾、肾及脑进行细菌分离, 于 BHI 和血平板上, 28 °C 培养 2 d。生化鉴定采用 API 20 Strep 链球菌快速鉴定试剂条, 分子鉴定采用 16S rRNA 基因序列同源性分析。腹腔注射梯度稀释的菌液, 观察发病症状并记录死亡情况。PCR 扩增无乳链球菌的荚膜多糖基因 (用于分子血清型的鉴定)、*adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK* 和 *tkl* (用于 MLST 分型)、毒力基因和表面蛋白基因。药敏试验采用琼脂扩散(纸片)法。

**结果:**



图 1 人工感染光唇鱼的发病症状

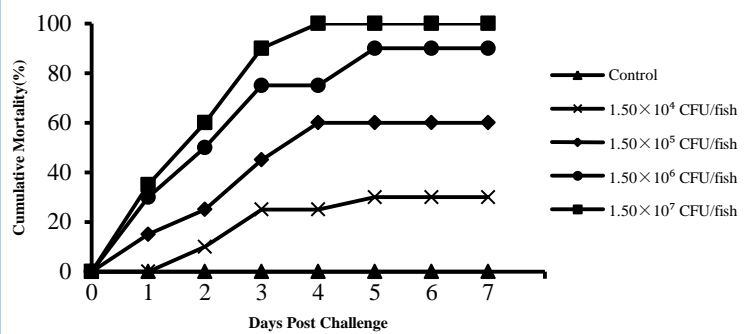


图 2 菌株 ACRO-0708 以不同剂量腹腔注射感染光唇鱼的累计死亡率

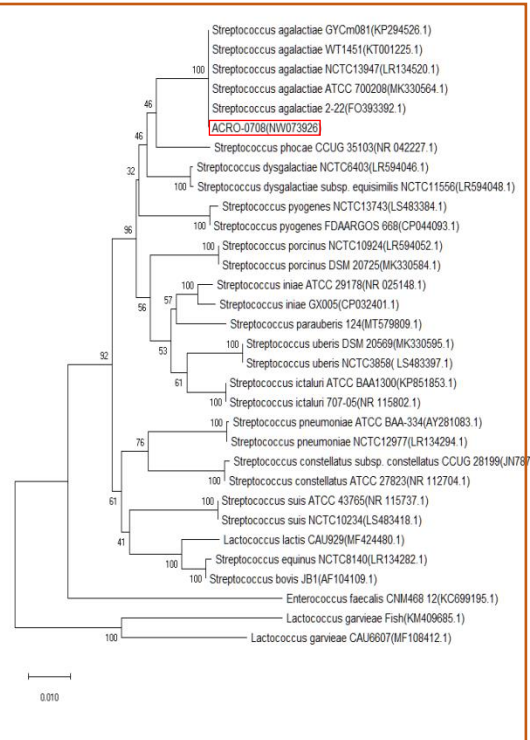


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育进化

Biochemical item	Result	
	Twelve <i>A. fasciatus</i> 's isolates*	<i>S. agalactiae</i> LMG15977 <sup>[7]</sup>
V-P test	+	+
HIP	+	+
AES	-	-
PYRA	-	-
α-GAL	-	-
β-GUR	+	+
β-GAL	-	-
PAL	+	+
LAP	+	+
ADH	+	-
Haemolysis	-	-
RIB	-	+s
ARA	-	-
MAN	-	-
SOR	-	-
LAC	-	-
TRE	-	-
INU	-	-
RAF	-	-
AMD	-	-
GLYG	-	+

表 1 菌株的生理生化鉴定结果

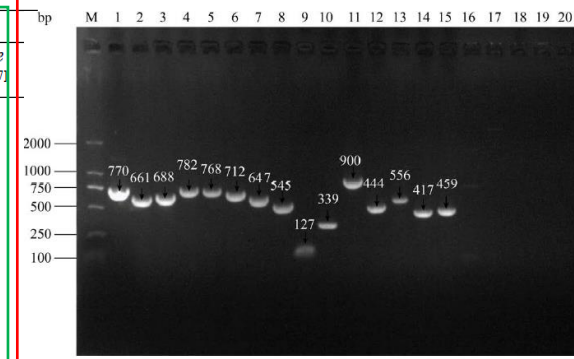


图 4 分子血清型、MLST 分型基因及毒力相关基因的 PCR 检测结果

Drug and contents/ (µg or U/piece)	Breakpoint/mm		ACRO-0708	
	Sensitivity	Resistance	Zone diameter/mm	Susceptibility
Penicillin 10 U	≥24	—	28	S
Ampicillin 10 µg	≥24	—	24	S
Ceftriaxone 30 µg	≥24	—	26	S
Vancomycin 30 µg	≥17	—	22	S
Erythromycin 15 µg	≥21	≤15	25	S
Tetracycline 30 µg	≥23	≤18	20	I
Chloramphenicol 30 µg	≥21	≤17	0	R
clindamycin 2 µg	≥19	≤15	30	S
levofloxacin 5 µg	≥17	≤13	0	R
Geotamicin 10 µg	≥15	≤12	0	R
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SMZ/TMP)	≥19	≤15	0	R
23.75 µg/1.25 µg	≥19	≤15	0	R
Enrofloxacin 10 µg	≥23	≤16	0	R
Sulfafurazole 300 µg	≥17	≤12	0	R
Spectinomycin 100 µg	≥14	≤10	20	S
Florfenicol 30 µg	≥22	≤18	24	S
Rifampicin 5 µg	≥20	≤16	17	I

表 2 菌株 ACRO-0708 的药物敏感性试验结果

**结论:** 本次光唇鱼暴发病的病原为无乳链球菌, 与我国水产动物主要流行株的 β 溶血 - I a-ST7 型不同, 该分离菌株 ACRO-0708 为非溶血 - I b-ST261 型, 这是一种鱼类及变温动物专化的病原菌, 毒性比 I a-ST7 型更强<sup>[35]</sup>。虽然该型菌株同人源无乳链球菌的亲缘关系较远, 且未见感染人类的报道, 但是鉴于其在全球范围内水产动物中的广泛流行, 该型无乳链球菌的流行病学应引起注意。