

红拟石首鱼海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究

沈智华^{1,2} 钱冬² 许文军³ 顾金华⁴ 邵健忠¹

(1. 浙江大学生命科学院, 杭州 310012; 2. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001;

3. 浙江省海洋水产研究所, 舟山 316100; 4. 湖州市中心医院, 湖州 313000)

摘要:2001 年 9 月—12 月, 浙江舟山部分网箱养殖红拟石首鱼发生了陆续死鱼, 发病鱼表现为眼球突出、浑浊, 失去方向性, 皮肤溃疡等症状。从病鱼的肾脏和肝脏中分离到菌株 SO-2 和 SO-3, 对两分离株进行了致病性试验, 发现两者对红拟石首鱼、罗非鱼及小白鼠均有致病力, SO-2 和 SO-3 对红拟石首鱼、罗非鱼及小白鼠的 LD_{50} 分别为 4.8×10^8 CFU/尾和 1.9×10^7 CFU/尾、 2.8×10^8 CFU/尾和 8.3×10^7 CFU/尾及 9.6×10^6 CFU/只和 4.2×10^6 CFU/只, 试验感染鱼出现眼球突出、浑浊及失去方向性等与自然发病相似症状, 确定该两株菌为致病菌。两分离株为革兰氏染色阳性, 呈链状球菌, 溶血, 10 生长, 45 不生长; 接触酶阴性, 水解七叶灵、精氨酸; VP 试验、脲酶和马尿酸试验阴性, 发酵葡萄糖、水杨苷、蔗糖和淀粉, 不发酵阿拉伯糖、菊糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖和山梨醇。分离株对氨基青霉素、万古霉素和先锋等高度敏感, 对庆大霉素、复方新诺明、林可霉素、氟哌酸等不敏感。应用 16SrRNA 基因进行的菌株 PCR 鉴定, 确定该两株菌为海豚链球菌。

关键词: 红拟石首鱼; 海豚链球菌; 致病性; 鉴定

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)06-0678-06

红拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*), 又名美国红鱼、红姑鱼, 属鲈形目石首鱼科, 原产于北大西洋沿岸及墨西哥湾, 因其肉质细嫩、生长快、广温、广盐等优点, 而成为迄今世界上养殖产量最高的鱼种之一。1991 年引进, 1995 年繁殖成功, 现已在沿海各地网箱和池塘中广泛养殖。然而, 随着养殖规模的扩大和放养密度的提高, 红拟石首鱼的病害发生日趋频繁, 浙江省网箱养殖中, 每年 7 月—12 月均有病害发生, 并造成较大损失。2001 年 12 月对舟山某网箱养殖中发病红拟石首鱼进行了病原分离, 随后对分离株进行了生理生化特性和致病性分析以及菌株的 PCR 鉴定等研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株分离 由舟山某渔场提供的二龄患病红拟石首鱼, 体长 20—32cm, 体重 300—600g。病鱼体表皮肤多处溃疡, 眼球突出、色混浊或发白, 多血色腹水, 脾肿大或萎缩成黄绿色, 部分病鱼肝脏失血,

出现白片状花纹。无菌操作取濒死病鱼肝脏、肾脏组织, 于 TCBS、TSA 和自制肝浸液平板培养基, 自制肝浸液采用草鱼肝脏为原料, 制备方法参考文献^[1], 28 培养 48h 后取单菌落作纯培养。

1.2 分离菌适宜培养 用接种环沾取纯培养菌液, 分别接种于 TSA、普通肉汤琼脂、BHI 琼脂平板, 于 28 下培养, 观察 24h 和 48h 后菌落生长情况; 将纯培养菌液分别接种于 TSB、普通肉汤、BHI 液体试管中, 于 28、180r/min 培养, 24h 后测 OD_{560} 值, 根据公式: 菌浓度 = $(18.7587 \times OD_{560} - 0.7334) \times$ 稀释倍数^[2], 确定菌浓度。用接种环沾取纯培养菌液, 接种于 TSA 平板, 分别于 10、15、20、28、37 和 45 下培养, 观察 24h 和 48h 菌落生长情况。

1.3 病原形态观察 单菌落接种于 BHI 液体试管, 28 培养 18h 后取菌液, 经涂片、固定和革兰氏染色, 显微镜观察。

1.4 生化特性测定 采用琼脂平板和生化鉴定管等方法, 分别测定两株菌的溶血、生长、水解活性、酶

收稿日期: 2004-03-02; 修订日期: 2005-05-30

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y3004425) 资助

作者简介: 沈智华 (1965—), 女; 高级工程师; 主要从事水产病害防治研究。浙江省淡水水产研究所沈锦玉、尹文林、刘问, 浙江省海洋水产研究所许源剑、张学舒、史海东、楼宝等在试验中给予了热情帮助, 谨致衷心感谢! E-mail: zjszh@163.com

通讯作者: 邵健忠 (1963—), 男, 教授; 博士生导师; E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

活性和发酵等特征。溶血试验所用血琼脂平板和生化性状鉴定管均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.5 分离株的 PCR 鉴定 分离菌株种的鉴定采用 16S rRNA 基因特异性扩增法进行,特异引物按文献^[3],由大连宝生物公司(TaKaRa)合成,序列为 F5 5'-CTAGAGTACACATGTACTTAAAG-3' 和 R5 5'-GGATTTTCCACTCCCATTTAC-3'。PCR 反应基本过程为:挑取 TSA 培养单菌落于 1 mL 0.1 mol/L TE (pH 7.4) 缓冲液中,充分振荡,8000 r/min 离心 5 min,取沉淀用 100 μ L TE 重悬,取 2 μ L 用于 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系中,分别加入 Taq 酶 2 u (Promega 公司)、10 \times 缓冲液 5 μ L、MgCl₂ 5 μ L、引物各 10 pmol/L 以及 dNTP (Takara, 2.5 mmol/L) 8 μ L,用双蒸水补足反应体积;反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min、再 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共进行 35 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束反应,取反应液 8 μ L 经 2% 琼脂糖电泳 (90 V, 90 min) 后观察结果。标准分子量对照为 100 bp Ladder (Takara);BioRad GelDoc2000 扫描并记录结果。

1.6 药物敏感性试验 采用药敏纸片琼脂平板扩散法。所用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.7 分离菌对红拟石首鱼的致病性试验 在浙江省海洋水产研究所西闪试验场进行。试验用红拟石首鱼购自舟山某网箱养殖点,规格为 100—120 g/尾。于室内暂养 1 周后进行菌株致病性试验。用无菌生理盐水将纯培养菌液稀释至 4.0×10^9 、 4.0×10^8 、 4.0×10^7 、 4.0×10^6 、 4.0×10^5 CFU/mL,腹腔注射 0.4 mL/尾,同时设注射生理盐水组为对照。试验期间水温为 24—27 $^{\circ}$ C,对死亡鱼进行肾脏细菌分离,致病性试验的结束时间以不再发生死亡为止,半数致死剂量 LD₅₀ 以 Reed-Muench 法计算。^[4]

1.8 分离菌对罗非鱼的致病性试验 试验于室内水泥池内进行。试验用罗非鱼购自浙江省淡水水产研究所特种苗种基地,规格为 55—65 g/尾。于曝气自来水中暂养 7 d 后试验。用无菌生理盐水将纯培养菌液稀释至 3.5×10^9 、 7×10^8 、 1.4×10^8 和 2.8×10^7 CFU/mL,腹腔注射 0.2 mL/尾,并设生理盐水对照,水温控制在 24—26 $^{\circ}$ C。致病性试验的结果观察与分析方法同上。

1.9 分离菌对小白鼠的致病性试验 试验小鼠购自浙江省医学科学院实验动物中心,规格为 20—23 g/只。纯培养菌液以生理盐水稀释至 5.0×10^8 、 5.0×10^7 、 5.0×10^6 和 5.0×10^5 CFU/mL,腹腔注射 0.4 mL/只,并设生理盐水对照。试验观察与分析方

法同上,并对死亡鼠进行肾脏和肝脏细菌分离。

2 结果

2.1 患病鱼细菌分离

从病鱼的肝、肾中分离到在自制肝浸液平板上几乎呈纯培养的小菌落。菌落光滑、圆形、奶白色,直径 0.2—1.2 mm。从中挑取单菌落,得到 SO-2 和 SO-3。

2.2 病原菌的培养

SO-2、SO-3 的适宜培养基为 TSA 平板和 BHI 液体培养基。两株菌在 28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 下生长良好,20 $^{\circ}$ C 下生长较慢,菌落较小,15 $^{\circ}$ C 下生长很慢,24 h 时菌落极微小,10 $^{\circ}$ C 下 96 h 时肉眼可见针尖大小的菌落,45 $^{\circ}$ C 下不生长。

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 菌体形态显微观察 SO-2 和 SO-3 液体培养物经涂片和染色后,在显微镜下观察可见球形细胞呈长短不一的链状排列。革兰氏染色呈阳性(图 1)。



图 1 分离菌 SO-2 的显微形态

Fig. 1 Micrograph of the isolate SO-2 ($\times 1000$)

2.3.2 分离菌的生理生化特征 两株菌均为溶血;10 $^{\circ}$ C 生长,45 $^{\circ}$ C 不生长;接触酶阴性;水解七叶灵、精氨酸,VP 试验、脲酶和马尿酸试验阴性;发酵葡萄糖、水杨苷、蔗糖和淀粉,不发酵阿拉伯糖、菊糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖和山梨醇。详见表 1。

2.4 分离菌株的 PCR 鉴定

分离菌株 16SrRNA 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。由图可见,分离菌株 SO-2 和 SO-3 经海豚链球菌种特异性引物扩增,产生了预期 300 bp 的特异产物,符合海豚链球菌 16SrRNA 基因的特异分子特征。

2.5 药物敏感性试验

结果表明,庆大霉素、复方新诺明、林可霉素、氟哌酸、丁氨卡那、卡那霉素等 6 种抗生素对两株菌完全无抑制效果,但两分离株对氨卞青霉素、万古霉素

表 1 分离菌株生化特性鉴别结果
Tab. 1 Physio-biochemical characteristics of two isolates

| 检测项目 Item | SO-2 | SO-3 | 参考株 * Reference strains | 检测项目 Item | SO-2 | SO-3 | 参考株 * Reference strains |
|----------------|------|------|----------------------------|----------------------------|------|------|----------------------------|
| 10 | + | + | + | 蜜二糖 Melibiose | - | - | - |
| 45 | - | - | - | 淀粉 Starch | + | + | + |
| 接触酶 Catalase | - | - | - | 蔗糖 Sucrose | + | + | + |
| 6.5 %NaCl | - | - | - | 水杨苷 Salicin | + | + | + |
| 溶血类型 Hemolysis | | | | 精氨酸 Arginine | + | + | + |
| 七叶灵 Esculin | + | + | + | VP 试验 | - | - | - |
| 马脲酸 Hippurate | - | - | - | 海藻糖 Fucose | + | + | |
| 脲酶 Urease | - | - | - | 核糖 Ribose | + | + | |
| 葡萄糖 Glucose | + | + | + | 甘露醇 Mannitol | + | + | |
| 乳糖 Lactose | - | - | - | 碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase | + | + | |
| 菊糖 Inulin | - | - | - | -半乳糖苷酶 | - | - | |
| 阿拉伯糖 Arabinose | - | - | - | -葡萄糖苷酶 | + | + | |
| 棉子糖 Raffinose | - | - | - | -半乳糖苷酶 | - | - | |
| 山梨醇 Sorbitol | - | - | - | | | | |

*海豚链球菌 ATCC29177 和 ATCC29178 的生化性状^[5]

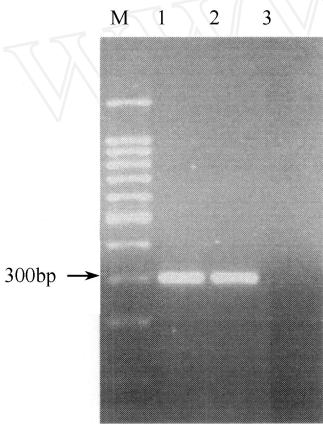


图 2 分离株 16SrRNA 基因的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of 16SrRNA gene of two isolates by using PCR
1. SO-2; 2. SO-3; 3. BSK-10

和先锋 等高度敏感,几种抗菌药物对两株菌的抑菌圈数据见表 2。

2.6 致病性

2.6.1 SO-2 和 SO-3 对红拟石首鱼的致病性 SO-2 和 SO-3 对红拟石首鱼的致病性试验结果见表 3。实验结果显示,SO-2 和 SO-3 两分离株对红拟石首鱼均有致病性,用 1.6×10^9 CFU/尾剂量攻击,发病死亡率能分别达到 83 % 和 90 %。发病鱼表现出眼球

突出、浑浊,失去方向性等典型自然发病症状。SO-2 和 SO-3 对红拟石首鱼的 LC_{50} 分别为 4.8×10^8 CFU/尾和 1.9×10^7 CFU/尾,表明 SO-3 致病性大于 SO-2,同时两者都在较高剂量感染的条件下才引起发病($SO-2 > 1.6 \times 10^7$ CFU/尾, $SO-3 > 1.6 \times 10^6$ CFU/尾)。另外,实验中观察到,攻毒 24h 内急性死亡的鱼除了在肾脏中能分离到大量攻击菌株外,发病症状并不明显,而在攻毒 2d 后发病的鱼才出现失去方向性、眼球浑浊等症状。其中部分病鱼眼球浑浊症状在试验结束时(第 10d)能恢复正常,如 SO-3 攻击菌量为 1.6×10^9 CFU/尾组,存活的 1 尾眼白浊,攻击菌量为 1.6×10^8 CFU/尾组,存活的 3 尾中有 2 尾眼白浊,但它们至试验结束时,眼球已恢复正常,从肾脏中也不再分离到细菌。

2.6.2 SO-2 和 SO-3 对罗非鱼的致病性 SO-2 和 SO-3 对罗非鱼的致病性实验结果见表 4。从表 4 可以看出,SO-2 和 SO-3 两株菌对罗非鱼也有致病性,当感染剂量为 7×10^8 CFU/尾时,能引起 100 % 发病死亡。发病鱼表现为眼球突出,眼珠发白,失去方向性,细菌攻击至死亡时间越长症状越明显。SO-2 和 SO-3 对罗非鱼的 LD_{50} 分别为 2.8×10^8 CFU/尾和 8.3×10^7 CFU/尾。

表 2 几种抗菌药物对 SO-2 和 SO-3 的抑菌圈直径(mm)

Tab.2 The sensitivity of two isolates to antibiotics

| 抗菌药物 Antibacterial agents | SO-2 | SO-3 | 抗菌药物 Antibacterial agents | SO-2 | SO-3 |
|---------------------------|------|------|---------------------------|------|------|
| 青霉素 Penicillin | 21 | 18 | 优立新 Unasyn | 17 | 15 |
| 氨卞青霉素 Ampicillin | 26 | 28 | 杆菌肽 Bacitracin | 17 | 16 |
| 氧哌嗪青霉素 Piperacillin | 20 | 22 | 利福平 Rifampicin | 19 | 19 |
| 先锋 Cephalixin | 22 | 23 | 麦迪霉素 Medimycin | 20 | 18 |
| 先锋 Cephalixin | 15 | 22 | 新霉素 Neomycin | 10 | 12 |
| 氯霉素 Chloramphenicol | 19 | 18 | 呋喃妥因 Nitrofurantoin | 20 | 20 |
| 强力霉素 Doxycycline | 21 | 21 | 苯唑青霉素 Oxacillin | 18 | 22 |
| 红霉素 Erythromycin | 21 | 18 | 妥布霉素 Tobramycin | 11 | 14 |
| 万古霉素 Vancomycin | 18 | 18 | 先锋必 Cefobid | 24 | 24 |

表 3 SO-2 和 SO-3 对红拟石首鱼的致病性(死亡数/ 试验数)

Tab.3 Pathogenicity of two isolates to red drum(death no. /test no.)

| 菌株 | 1.6 ×10 ⁹ | 1.6 ×10 ⁸ | 1.6 ×10 ⁷ | 1.6 ×10 ⁶ | 1.6 ×10 ⁵ | 对照 | LD ₅₀ |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|
| Strain | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | Control | (CFU/ 尾) |
| SO-2 | 5/ 6 * | 2/ 10 | 0/ 10 | 0/ 10 | 0/ 10 | 0/ 10 | 4.8 ×10 ⁸ |
| SO-3 | 9/ 10 | 7/ 10 | 4/ 6 * | 0/ 10 | 0/ 10 | 0/ 10 | 1.9 ×10 ⁷ |

*由于实验过程中未及时捞出死亡鱼,部分鱼死于缺氧,从死鱼肾脏中未分离到攻击菌或攻击菌数量仅很少几个,故把这部分死亡鱼作为非试验鱼处理。

表 4 SO-2 和 SO-3 对罗非鱼的致病性(死亡数/ 试验数)

Tab.4 Pathogenicity of two isolates to tilapia(death no. /test no.)

| 菌株 | 7 ×10 ⁸ | 1.4 ×10 ⁸ | 2.8 ×10 ⁷ | 5.6 ×10 ⁶ | 对照 | LD ₅₀ |
|--------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|
| Strain | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | (CFU/ 尾) | Control | (CFU/ 尾) |
| SO-2 | 5/ 5 | 2/ 5 | 1/ 5 | 0/ 5 | 0/ 5 | 2.8 ×10 ⁸ |
| SO-3 | 5/ 5 | 3/ 5 | 1/ 5 | 0/ 5 | 0/ 5 | 8.3 ×10 ⁷ |

2.6.3 SO-2 和 SO-3 对小白鼠的致病性 SO-2 和 SO-3 对小白鼠的致病性试验结果见表 5。结果表明,SO-2 和 SO-3 对小白鼠有明显的致病性,发病小

鼠于攻毒后 1—3d 内死亡,从肝脏和肾脏中能分离到攻击菌。SO-2 和 SO-3 对小白鼠的 LD₅₀ 分别为 9.6 ×10⁶CFU/ 只和 4.2 ×10⁶CFU/ 只。

表 5 SO-2 和 SO-3 对小白鼠的致病性(死亡数/ 试验数)

Tab.5 Pathogenicity of two isolates to mouse(death no. /test no.)

| 菌株 | 2.0 ×10 ⁸ | 2.0 ×10 ⁷ | 2.0 ×10 ⁶ | 2.0 ×10 ⁵ | 对照 | LD ₅₀ |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|
| Strain | (CFU/ 只) | (CFU/ 只) | (CFU/ 只) | (CFU/ 只) | Control | (CFU/ 只) |
| SO-2 | 5/ 5 | 3/ 5 | 1/ 5 | 0/ 5 | 0/ 5 | 9.6 ×10 ⁶ |
| SO-3 | 5/ 5 | 4/ 5 | 2/ 5 | 0/ 5 | 0/ 5 | 4.2 ×10 ⁶ |

3 讨 论

通过对患病红拟石首鱼体内细菌分离以及分离株 SO-2 和 SO-3 的回归感染试验,确定了该两株菌为引起红拟石首鱼皮肤溃疡,眼球突出、浑浊等发病

症状并造成较严重死亡(死亡率达 20 %—30 %)的病原菌。研究结果显示,该两株菌对红拟石首鱼的 LD₅₀ 值较高,分别为 4.8 ×10⁸CFU/ 尾和 1.9 ×10⁷CFU/ 尾,表明两株菌可能只有在高剂量感染的条件下才能发病死亡,而低剂量感染毒性较低。在实

验中发现,有些攻毒鱼初期出现眼球白浊、失去方向性等症状,但随后症状消失,从肾脏中也未分离到细菌。在对罗非鱼攻毒试验中发现有些鱼在细菌攻击 5—7d 左右才开始发生失去方向性、眼球白浊等症状,且此症状可以持续几天,最后部分死亡,部分又恢复正常。这与自然状态下该病病程较长、鱼死亡陆续发生的特点是一致的。

世界范围内由链球菌感染引起鱼类死亡在 20 世纪七、八十年代已有零星报道,九十年代呈上升趋势,目前链球菌已成为主要的鱼类致病菌之一。海豚链球菌最早于 1976 年从患皮肤脓肿的亚马逊淡水海豚中分离到,九十年代后以色列、美国、日本等学者先后在虹鳉、罗非鱼、蓝子鱼、牙鲆、条纹鲈和金头鲷等二十多种养殖和野生鱼类中发现了海豚链球菌,并认为是引起鱼类链球菌病的主要病原菌^[5-10]。1996—2000 年, Eldar 和 Colorni 在以色列网箱养殖红拟石首鱼中分离到海豚链球菌^[5-10]。在中国,随着大量国外养殖品种的引进,一些养殖新品种中也出现了链球菌感染,如罗非鱼、虹鳉、大菱鲆、银鲑、牙鲆等,但迄今尚未见养殖鱼类海豚链球菌的报道。

根据 Weinstein 等的研究结果和《伯杰氏系统细菌学手册》,典型的海豚链球菌在 10 生长,45 不生长;能水解七叶灵和精氨酸,VP 试验、脲酶和马尿酸试验呈阴性;发酵葡萄糖、水杨苷、蔗糖和淀粉,不发酵阿拉伯糖、菊糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖和山梨醇等;对万古霉素敏感^[12-15]。这些生理生化性状及药物敏感性与本文报道的 SO-2 和 SO-3 分离株相一致,同时,由两菌株引起的患病红拟石首鱼的症状也与 Eldar 等报道的相似,表现为皮肤溃疡、失去方向性、眼球突出等^[9],表明 SO-2 和 SO-3 为海豚链球菌。在此基础上,应用 Zlotkin 报道的海豚链球菌核糖体 RNA 基因特异性引物进行分离株 16S rRNA 基因片段特异性扩增,结果产生了 300bp 的海豚链球菌特异产物,由此进一步确定 SO-2 和 SO-3 为海豚链球菌。由于目前常用的细菌生化鉴定试剂盒均未包含海豚链球菌,这给海豚链球菌的鉴定带来了一定的困难,必须借助分子鉴定方法。除了 Zlotkin 的 16SrRNA 基因片段鉴定方法外,对海豚链球菌的分子生物学鉴定方法还有:Berridge 等建立的应用种特异性寡核苷酸引物对 16S-23SrDNA 基因间隔序列进行的 PCR 鉴定及 Goh 等建立的应用种特异性引物进行的 Cpn60 基因 PCR 鉴定方法^[13-14]。Zlotkin, Berridge 和 Goh 等建立的分子鉴定技术为海豚链球

菌的鉴定提供了重要的参考。

海豚链球菌是少数几种人鱼共患菌之一,对人体具有强致病力,能引起人蜂窝组织炎、淋巴管炎、败血症、心内膜炎、脑膜炎、骨髓炎等。1991 年美国德克萨斯州首次报道了鱼类海豚链球菌感染人体的病例,1994 年加拿大渥太华市报道了第二例鱼类海豚链球菌感染人体的病例,加拿大多伦多地区在 1995—1996 年间发生了 9 例因剖鱼不慎感染海豚链球菌的病例,引起感染者发烧、蜂窝组织炎、淋巴管炎等症状,其中感染最严重的导致脑膜炎和心内膜炎。本试验中 SO-2 和 SO-3 对小鼠的 LD₅₀ 为 9.6×10^6 CFU/只和 4.2×10^6 CFU/只,分别为对红拟石首鱼毒性的 50 倍和 4.5 倍及对罗非鱼的 29.2 倍和 19.8 倍。从中可以看出,该两株菌对哺乳动物小鼠具有比对原宿主红拟石首鱼更强的致病性。因此,海豚链球菌引起的鱼类疾病,不仅对渔业生产造成危害,而且对食品安全和人类健康构成了威胁,对链球菌病原的诊断、检测和防治值得引起人们的高度重视。

参考文献:

- [1] Chen T S. Preparation and application of microbial medium[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1995: 93—95 [陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995: 93—95]
- [2] Qian D, Chao Z, Shen J Y, et al. The optimum conditions for growth of *Aeromonas hydrophila* BSK-10 [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(3): 38—44 [钱冬, 曹铮, 沈锦玉等. 嗜水气单胞菌 BSK-10 株的优化培养及生长动态研究. 中国水产科学, 2001, 8(3): 38—44]
- [3] Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. Possible Transmission of *Streptococcus iniae* from Wild Fish to Cultured Marine Fish [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 4065—4067
- [4] Huang Z X. Basic medicovirology and method [M]. Beijing: Science Press, 1990: 143—144 [黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990: 143—144]
- [5] Yin Z, Xu B H. Studies on the bacteriosis of fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(1): 76—83 [殷战, 徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究. 水生生物学报, 1995, 19(1): 76—83]
- [6] Weinstein M R, Litt M, Kertesz D A, et al. Invasive Infections Due to a Fish Pathogen, *Streptococcus iniae* [J]. *N. Engl. J. Med.*, 1997, 337: 589—594
- [7] Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish [J]. *Curr. Microbiol.*, 1994, 28: 139—143
- [8] Perera R, Johnson S, Collins M, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* and *T. aurea* hybrids [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1994, 6: 335—340
- [9] Pier G, Madin S. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic

- streptococcus isolated from an Amazon fresh water dolphin ,*Inia geoffrensis*[J]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 1976 ,**26**:545—553
- [10] Eldar A ,Perl S ,Frelie P E , *et al.* Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection[J]. *Dis. Aquat. Org.* , 1999 ,**36**:121—127
- [11] Colomni A ,Diamant A ,Eldar A , *et al.* *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes[J]. *Dis. Aquat. Org.* , 2002 ,**49**:165—170
- [12] Weinstein M R ,Low D E ,McGeer A , *et al.* Preliminary Report. Invasive infection due to *Streptococcus iniae* :a new or previously unrecognized disease-Ontario. 1995—96[J]. *CCDR* ,1996 ,**22**:129—132
- [13] Sneath P H A , Mair N A ,Sharp M E , *et al.* Bergey 's manual of systematic bacteriology [M]. Baltimore : The Williams & Wilkins Co. , 1986 ,**2**:999—1002
- [14] Berridge B R ,Fuller J D ,Azavedo J , *et al.* Development of Specific Nested Oligonucleotide PCR Primers for the *Streptococcus iniae* 16S - 23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer[M]. *Journal of Clinical Microbiology* , 1998 ,**36**(9) :2778—2781
- [15] Goh S H ,Driedger D , Gillett S , *et al.* *Streptococcus iniae* , a Human and Animal Pathogen : Specific Identification by the Chaperonin 60 Gene Identification Method[J]. *JCM*. 1998 ,**36**(3) :2164—2166

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF STREPTOCOCCUS INIAE ISOLATED FROM RED DRUM SCIAENOPS OCELLATUS

SHEN Zhi-Hua^{1,2} QIAN Dong² XU Wen-Jun³ GU Jin-Hua⁴ and SHAO Jian-Zhong¹

(1. College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310012; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries , Huzhou 313001;

3. Zhejiang Institute of Marine Fisheries , Zhoushan 316100; 4. Huzhou Central Hospital , Huzhou 313000)

Abstract : In recent years ,red drum (*Sciaenops ocellatus*) became the economic important species of marine cage-culture in Zhejiang Province. During September to October 2001 ,continuous mortality of cage-cultured red drum was recorded in Zhoushan , with the symptoms of skin lesions ,exophthalmia and disorientation ,etc. Two bacterial strains SO-2 and SO-3 were isolated from the kidney of moribund red drum. The pathogenicity of these two isolates to red drum ,tilapia and mouse was tested. The LD₅₀ of SO-2 and SO-3 to red drum were 4.8×10^8 CFU/ fish and 1.9×10^7 CFU/ fish ,to tilapia 2.8×10^8 CFU/ fish and 8.3×10^7 CFU/ fish ,to mouse 9.6×10^6 CFU/ mouse and 4.2×10^6 CFU/ mouse ,respectively. The challenged fish presented the similar external signs to natural infected red drum ,such as exophthalmia and disorientation. These two isolates were preliminarily identified as *Streptococcus iniae* with the characteristics of gram-positive cocci in chains , catalase negative and beta-hemolytic ,growth under 10 and non-growth up to 45 °C ,hydrolyzation of esculin and arginine ,Voges-Proskauer ,urease ,and hippurate tests negative ,fermentation of glucose ,salicin ,sucrose and starch ,non-fermentation of arabinose ,inulin ,lactose ,melibiose ,raffinose and sorbitol. They were highly sensitive to ampicillin ,vancomycin and cefazolin ,while resistant to gentamicin ,compound sulfamethoxazole ,lincomycin and norfloxacin. Polymerase chain reaction (PCR) of 16S rRNA gene was carried out by using the primers specific for *Streptococcus iniae* and a 300bp product was identified with 2 % agar electrophoresis ,which confirmed the identification of these two isolates as *Streptococcus iniae*.

Key words : Red drum (*Sciaenops ocellatus*) ; Pathogenicity ; *Streptococcus iniae* ; Identification