

白明焕, 耿毅, 赵若璇, 等. 四川鲟源海豚链球菌的毒力基因谱及分子分型 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 36-42.
BAI Minghuan, GENG Yi, ZHAO Ruoxuan, et al. Virulence gene profiles and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from sturgeon in Sichuan[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 36-42.

四川鲟源海豚链球菌的毒力基因谱及分子分型

白明焕¹, 耿毅¹, 赵若璇¹, 郭向辉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:【目的】明确四川鲟源海豚链球菌 *Streptococcus iniae* 的毒力谱及分子流行病学特点, 为鲟海豚链球菌病的防控提供参考。【方法】对四川地区 17 株鲟源海豚链球菌以及海豚链球菌 ATCC29178 进行毒力基因多重 PCR 检测, 并通过随机扩增多态性 DNA(RAPD) 和重复序列 PCR(REP-PCR) 分析进行分子分型。【结果】所有菌株的 7 个主要毒力基因 *pgm*、*scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA*、*pdi* 和 *cfi* 均为阳性, 部分菌株的 *simA* 基因发生了变异。基于 RAPD 分析, 18 株菌分为 I、II 2 个基因型; 基于 REP-PCR 分析, 18 株菌分为 A、B、C、D 4 个基因型。【结论】四川地区 17 株鲟源海豚链球菌分离株均为强毒株, 毒力谱为 *pgm/scpI/simA/cpsD/sagA/pdi/cfi*, 并且同时存在多种基因型的菌株, 其中 D 型为优势流行型。

关键词: 鲟; 海豚链球菌; 毒力基因; 分子分型; RAPD; REP-PCR
中图分类号: S941.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)05-0036-07

Virulence gene profiles and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from sturgeon in Sichuan

BAI Minghuan¹, GENG Yi¹, ZHAO Ruoxuan¹, GUO Xianghui¹, 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: 【Objective】To clarify the virulence gene profiles and molecular typing of *Streptococcus iniae* from sturgeon in Sichuan, and provide a reference for prevention and control of *S. iniae* infection in sturgeon. 【Method】Virulence genes of 17 *S. iniae* strains isolated from sturgeon in Sichuan area and *S. iniae* ATCC29178 were detected by multi-PCR. Molecular typing of *S. iniae* was performed using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) and repetitive element polymerase chain reaction (REP-PCR) methods. 【Result】All seven major virulence genes including *pgm*, *scpI*, *simA*, *cpsD*, *sagA*, *pdi* and *cfi* were positive in all strains, and *simA* gene of partial isolates was mutated. Eighteen strains were divided into I and II types based on RAPD analysis, and four types of A, B, C and D by REP-PCR analysis. 【Conclusion】All 17 *S. iniae* isolates from sturgeon in Sichuan are virulent strains, and the virulence gene profile is *pgm/scpI/simA/*

cpsD/sagA/pdi/cfi. There are many genotypes of *S. iniae* in Sichuan, of which type D is the main epidemic type.

Key words: sturgeon; *Streptococcus iniae*; virulence gene; molecular typing; RAPD; REP-PCR

海豚链球菌 *Streptococcus iniae* 作为一种重要的鱼类病原菌,其感染常致高发病率和病死率。自 1972 年首次从亚马逊淡水海豚 *Inia geoffrensis* 中分离得到以来, *S.iniae* 先后在美国^[1]、日本^[2]、以色列^[3]等地被报道,对全球的温水鱼养殖造成了巨大的影响并持续至今^[4-8]。各国相继开展对海豚链球菌的相关研究,目前海豚链球菌至少存在 2 种生物型,且各型菌株的致病性有所差异^[9-10],同时海豚链球菌还有 *scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA*、*pdi*、*pgm* 和 *cfi* 等多种毒力因子^[11-14],各毒力因子之间的相互作用也是导致其致病性差异的重要原因,因此开展对海豚链球菌毒力谱及分型的研究对海豚链球菌病的防控,尤其是疫苗的研制具有重要的意义。

四川作为一个鲟科 *Acipenseridae* 养殖大省,在鲟鱼养殖过程中海豚链球菌病的危害较为严重^[15-16],尽管对部分菌株进行了毒力基因谱与分型的研究,但对于四川地区各流行菌株的基因型、主要流行基因型、毒力基因谱,及是否发生变异等都不清楚。本研究采用随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、重复序列 PCR (Repetitive element polymerase chain reaction, REP-PCR) 和多重 PCR 对 17 株鲟源海豚链球菌进行毒力基因谱与分子分型研究,以探明四川鲟源海豚链球菌分子流行病学特点,为有针对地筛选四川鲟海豚链球菌病疫苗候选株及防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

BHI 培养基购自北京欣经科生物技术有限公司;

PCR master mix、DL2000 DNA marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;API STREP 20 鉴定系统购自法国生物梅里埃公司;海豚链球菌 ATCC29178 株,购自 ATCC 菌种中心。

1.2 病原菌的分离和纯化

2016—2018 年从四川雅安、彭州、邛崃、蒲江等地送检的发病鲟鱼,首先用生理盐水冲洗体表,并用含体积分数 75% 的乙醇溶液的棉球进行体表消毒,然后用无菌的剪刀打开腹腔,分别从肝、脾、肾接菌至 BHI 培养基,并放置于 28 ℃ 恒温培养箱进行细菌培养 18~24 h,挑取 BHI 平板上菌落形态、大小一致的可疑菌落划线接种于 BHI 平板,28 ℃ 恒温培养 18~24 h,挑取单菌落进行后续鉴定。获得纯化后的菌株 4 ℃ 保存备用。共分离得到 17 株海豚链球菌。

1.3 病原菌的形态观察及 *lctO* 基因的特异性鉴定

取对数生长期的新鲜菌液观察其菌体形态,并按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。根据 Mata 等^[17]的方法,设计合成 *S. iniae* *lctO* 基因的一对特异性扩增引物(表 1)对其进行检测。PCR 反应条件参照文献 [15]。取 5 μL 扩增产物,10 g/L 的琼脂糖凝胶,在恒压 125 V 下电泳 35 min,置于凝胶成像系统观察 PCR 扩增结果并拍照记录。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后,送成都擎科梓熙生物测序,并将分离株 *lctO* 基因序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 比对以确定其相似性。将已鉴定纯化后的细菌接种于 BHI 肉汤,28 ℃ 条件下震荡培养 18~24 h,将部分

表 1 链球菌相关基因的引物信息
Table 1 Primer information of related gene of *Streptococcus*

基因 Gene	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence	产物大小/bp Product size
<i>lctO</i>	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	870
<i>scpI</i>	GCAACGGGTTGTCAAAAATC	GAGCAAAAGGAGTTGCTTGG	822
<i>simA</i>	AATTCGCTCAGCAGGTCTTG	AACCATAACCGCATAGCAC	994
<i>pdi</i>	TTTCGACGACAGCATGATTG	GCTAGCAAGGCCTTCATTTG	381
<i>sagA</i>	AGGAGGTAAGCGTTATGTTAC	AAGAAGTGAATTACTTTGG	190
<i>cpsD</i>	TGGTGAAGGAAAGTCAACCAC	TCTCCGTAGGAACCGTAAGC	534
<i>pgm</i>	TATTAGCTGCTCACGGCATC	TTAGGGTCTGCTTTGGCTTG	489
<i>cfi</i>	GTGCCTCAACATCAAACA	TAGCAAATCCCATATCAA	328

菌液用甘油保存于-20℃，部分菌液用脱脂奶粉冻干保存至-80℃备用。

1.4 病原菌的毒力基因谱检测

参照熊向英等^[11]的方法设计合成 *S. iniae* cfi 毒力基因的引物，其余 6 个毒力基因 *scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA*、*pdi* 和 *pgm* 的扩增引物则参照 Baums 等^[13] 和邓梦玲等^[16] 的方法设计合成 (表 1)，对分离株这些毒力基因进行多重 PCR 扩增。PCR 体系及循环条件参照邓梦玲等^[16] 的程序进行。PCR 扩增产物经 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测，将纯化回收的 PCR 产物送成都擎科梓熙生物测序。将获得的分离菌毒力基因序列和 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 比对。

1.5 病原菌的分型

对 17 株鲟源海豚链球菌以及海豚链球菌 ATCC 29178 进行以下分型：

精氨酸双水解酶 (Arginine dihydrolase, ADH) 分型参照 API STREP 20 鉴定系统使用说明书进行。

RAPD 分型根据 Bachrach 等^[10] 的方法，以 5'-GATCAAGTCC-3'为引物，对海豚链球菌进行随机

扩增，25 μL 反应体系中含 2 μL 模板 DNA，2 μL 引物，12.5 μL PCR Master Mix(2×)，8.5 μL ddH₂O。PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30 s，38℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1 min，30 个循环；72℃ 延伸 10 min。

基因组 REP-PCR 参照 Malathum 等^[18] 的方法，以 5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3'为引物，PCR 反应条件：95℃ 预变性 7 min；90℃ 变性 30 s，40℃ 退火 1 min，65℃ 延伸 8 min，35 个循环；65℃ 延伸 16 min。PCR 扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶于 90 V 电压电泳 20 min，溴化乙锭染色，凝胶成像系统观察、拍照。获得的图像运用 Quantity One v.4.62 软件处理，选择 UPGAMA 聚类方法和条带位置差异容许度 (Position tolerance) 方法，条带位置差异容许度选择 0.85%，优化值选择 0.5%。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定

2016—2018 年从四川雅安、彭州、邛崃、蒲江等鲟鱼养殖地分离到 17 株海豚链球菌，菌株详细信息见表 2。在 BHI 平板 28℃ 条件下恒温培养细

表 2 四川患病鲟鱼中分离的海豚链球菌的信息
Table 2 The information of *Streptococcus iniae* isolated from diseased sturgeon in Sichuan

菌株编号 ¹⁾ Strain No.	分离地点 Isolation site	分离年份 Isolation year	宿主 ²⁾ Host
2	雅安 Ya'an	2016	西伯利亚鲟 <i>Acipenser Baerii</i>
3	彭州 Pengzhou	2017	杂交鲟 Hybrid sturgeon
4	邛崃 Qionglai	2017	史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
5	蒲江 Pujiang	2017	杂交鲟 Hybrid sturgeon
6	邛崃 Qionglai	2017	西伯利亚鲟 <i>A.Baerii</i>
7	邛崃 Qionglai	2017	西伯利亚鲟 <i>A.Baerii</i>
8	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
9	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
10	彭州 Pengzhou	2018	史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
11	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
12	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
13	邛崃 Qionglai	2018	史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
14	邛崃 Qionglai	2018	史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
15	邛崃 Qionglai	2018	史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>
16	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
17	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon
18	彭州 Pengzhou	2018	杂交鲟 Hybrid sturgeon

1)菌株编号1为海豚链球菌ATCC29178; 2) 杂交鲟为达氏鲟♀×史氏鲟♂
1)Strain number 1 represents *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2)Hybrid sturgeon is *Huso dauricus*♀× *Acipenser schrenckii*♂

菌 24 h 后, 形成边缘光滑的乳白色菌落, 为革兰阳性链状球菌 (图 1), *lctO* 基因特异性检测为阳性 (图 2), 扩增产物测序比对结果显示分离菌与 GenBank 数据库中 *S. iniae* 的相似性最高, 达 99% 以上。

2.2 病原菌的分型

ADH 反应结果显示菌株 1、6、9、11、12、16、17 和 18 为 ADH 阳性, 其余菌株为 ADH 阴性, 说明彭州地区的分离株大部分为 ADH 阳性, 而雅安、蒲江以及大部分来自邛崃的分离株则为 ADH 阴性。

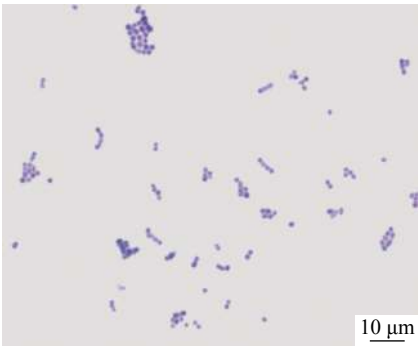
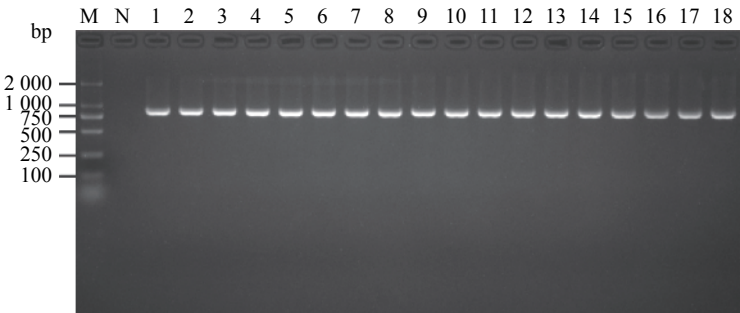


图 1 海豚链球菌分离株革兰染色的显微形态

Fig. 1 Micromorphologies of isolated strains of *Streptococcus iniae* in Gram staining



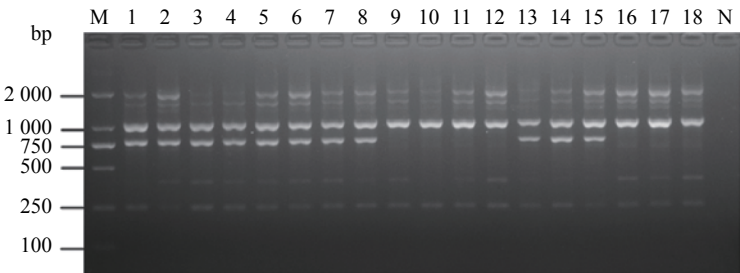
M: DL2000 DNA marker; N: 阴性对照; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: 分离菌株
M: DL2000 DNA marker; N: Negative control; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2-18: Isolated strains

图 2 海豚链球菌分离株 *lctO* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR-amplified *lctO* genes from isolated strains of *Streptococcus iniae*

通过对试验株进行 RAPD 分析显示出与 ADH 分型相似的结果, 18 株菌可分成 2 个基因型: I 型和 II 型。其中雅安、蒲江、邛崃等地的分离株扩

增出 750 bp 条带, 属于 I 型; 而彭州地区的分离株未扩出 750 bp 条带, 属于 II 型 (图 3)。



M: DL2000 DNA marker; N: 阴性对照; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: 分离菌株
M: DL2000 DNA marker; N: Negative control; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2-18: Isolated strains

图 3 海豚链球菌分离株的 RAPD 扩增图谱

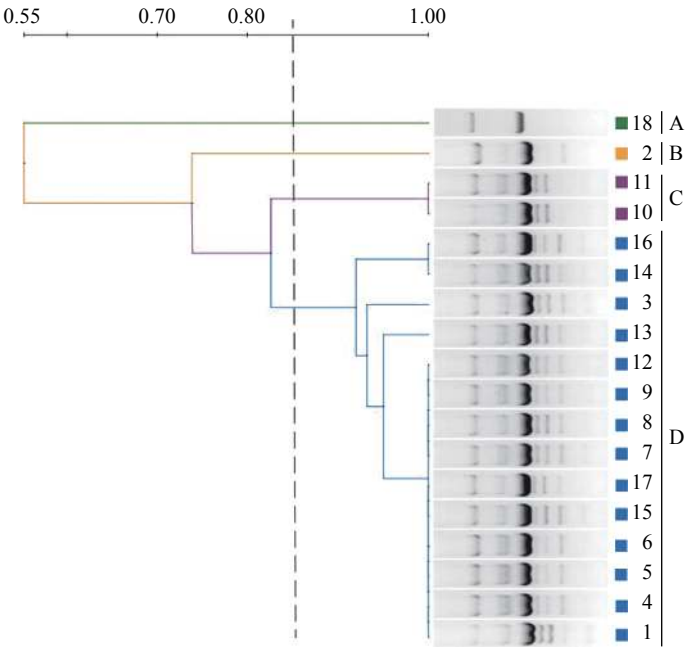
Fig. 3 RAPD profiles of isolated strains of *Streptococcus iniae*

通过对菌株进行 REP-PCR (图 4) 聚类分析, 18 株菌共分为 4 个基因型: A、B、C、D 型。菌株 1、3、4、5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17 号为 D 型, 2 号菌株为 B 型, 10、11 号菌株为 C 型, 18 号菌株为 A 型, 由此可见, D 型为四川地区的优势流行型。

2.3 病原菌的毒力谱检测

对 18 株海豚链球菌进行毒力谱检测, 结果 (图 5、图 6) 显示 *pgm*、*scpI*、*pdi*、*cpsD*、*saga* 和 *cfi* 基因符

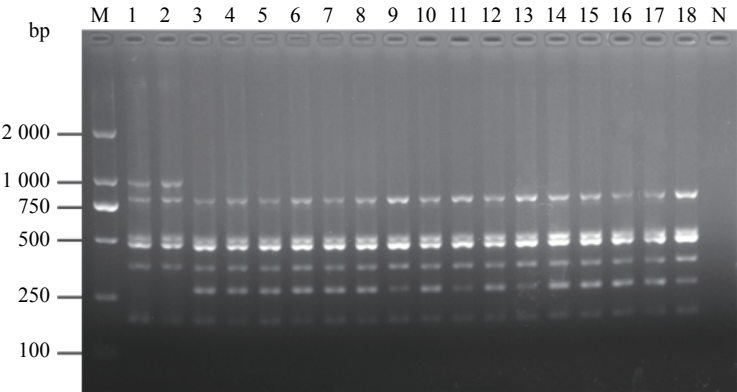
合预期片段, 经测序鉴定为 *S. iniae*。 *simA* 基因检测 1 号和 2 号菌株扩增出的条带符合预期结果, 而 3~18 号菌株扩增出 255 bp 左右的条带, 2 号菌株和其他随机选取的 3 个菌株进行测序鉴定, 4 株菌扩增出的条带均为 *simA* 基因, 相似性高达 98% 以上。将随机挑选菌株 2、3、9 和 18 的 *simA* 基因扩增产物纯化测序后上传 NCBI 数据库, 并获得登录号 MK959355、MK973066、MK973067 和 MK973068。



1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: 分离菌株
1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: Isolated strains

图 4 基于 REP-PCR 对 18 株海豚链球菌进行聚类分析

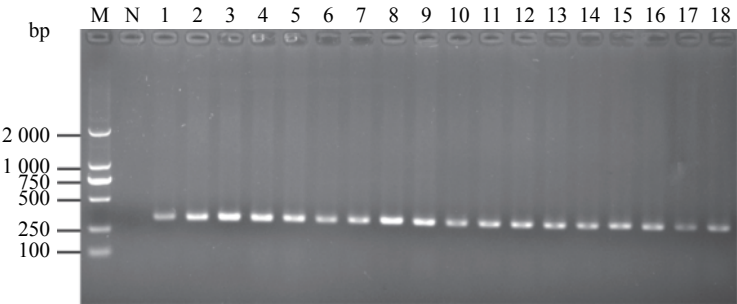
Fig. 4 Clustering analysis of 18 *Streptococcus iniae* strains based on REP-PCR



M: DL2000 DNA marker; N: 阴性对照; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: 分离菌株
M: DL2000 DNA marker; N: Negative control; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: Isolated strains

图 5 海豚链球菌毒力基因的多重 PCR 检测

Fig. 5 Multi-PCR analysis of virulence genes from *Streptococcus iniae*



M: DL2000 DNA marker; N: 阴性对照; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: 分离菌株
M: DL2000 DNA marker; N: Negative control; 1: *Streptococcus iniae* ATCC29178; 2~18: Isolated strains

图 6 海豚链球菌毒力基因 cfi 的 PCR 检测

Fig. 6 PCR analysis of *cfi* virulence gene from *Streptococcus iniae*

3 讨论与结论

S.iniae 作为鱼类养殖中的主要致病菌^[19], 对世界鲟鱼养殖造成重大影响, 目前有关 *S.iniae* 致病机制的研究主要包括动物感染模型的建立^[20-21], 感染后海豚链球菌在各组织的分布情况等^[22-23]。现已证实 *S.iniae* 具有多种毒力因子^[14]: 主要通过调理作用使海豚链球菌免于巨噬细胞吞噬的荚膜和 M 样蛋白^[14]; 参与细胞壁和荚膜的生物合成, 并能抵抗正电性抗菌肽的磷酸葡萄糖苷酶 (pgmA)^[24]; 损伤宿主红细胞、粒细胞和单核细胞的细胞溶血素 (sagA)^[25]; 水解中性粒细胞化学诱导物补体因子 C5a, 从而损伤宿主具抗侵袭能力的 C5a 肽酶^[26]; 增强细菌的抵抗力, 并对宿主上皮细胞进行黏附和入侵的脱乙酰基酶^[27]; 拦截抗体向补体呈递抗原的 CAMP 因子^[28]等。这些毒力因子相互作用帮助 *S.iniae* 侵入宿主, 逃避宿主的防御, 引起宿主发病^[29]。本研究对四川地区分离的 17 株鲟源海豚链球菌以及参考菌株进行 7 种主要毒力基因的检测, 所有菌株均为阳性, 其毒力谱均为 *pgm/scpI/simA/cpsD/saga/pdi/cfi*, 这表明了四川地区的鲟源海豚链球菌分离株均有较强的毒力。相关研究表明编码 M 样蛋白的 *simA* 基因是高度保守的毒力因子^[30], 其主要作用是帮助细菌黏附并入侵宿主各器官, 同时还能抵抗宿主巨噬细胞的吞噬, 并引起炎症反应。*S.iniae* 感染往往造成鱼类宿主的急性死亡, 而缺失 *simA* 基因的突变株抗吞噬能力明显降低^[31]。本研究发现 2016 年后四川地区的分离株 *simA* 基因均发生了变异, 经测序比对发现变异菌株的 *simA* 基因有部分序列的缺失, 但 *simA* 基因变异发生的原因, 以及变异对菌株毒力的影响还不清楚, 这值得进一步的探究。

由于 *S.iniae* 各菌株分型复杂, 又无法用 Lancefield 链球菌血清分类法进行分型^[32], 因此 *S.iniae* 究竟有多少种血清型尚不清楚。Barnes 等^[33] 根据 *S.iniae* 对 ADH 的反应将以色列的分离株分成 2 种生物型, 但随着研究的深入, 该分型已无法满足需要。RAPD 分析是建立在 PCR 基础上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术, 它不仅能反映生物个体间的遗传稳定性, 也能敏感地反映出遗传差异。Bachrach 等^[10] 通过研究发现生物 I 型 (ADH 阳性) 菌株在 RAPD 扩增中出现 750 bp 大小的条带, 而生物 II 型则不能扩增出, 但我国多位学者先后对各地的 *S.iniae* 分离株进行分析的结果却不完全支持上述观点。黄婷等^[34] 和熊向英等^[11] 研究发现广西的分离

株 ADH 反应为阴性, 在 RAPD 扩增中却有 750 bp 大小的条带; 周素明^[35] 的研究中分离株属于 2 个生物类群, 但 ADH 反应均为阳性。本研究中部分菌株虽然为 ADH 阳性, 但 RAPD 不能扩增出 750 bp 大小的条带, 而有部分 ADH 阴性菌株却能扩增出 750 bp 的条带。为了进一步从分子水平上比较分离株, 本研究采用 REP-PCR 进行分析, 该方法是通过扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列, 来揭示基因组间的差异。与 RAPD 相比, 该方法可以更为准确地反映菌株间的差异。通过该方法将试验菌株明显分成了 4 个基因型。其中菌株 9~12 以及 16~18 在 RAPD 分型中为同一型, 而 REP-PCR 分析则分成 3 个基因型。值得注意的是菌株 9~12 为不同时间同一地点的不同分离株, 其遗传特征存在明显的差异, 菌株 16~18 为同一地点相同时间的不同分离株, 其遗传特征也存在多样性, 这也进一步证实了四川地区存在多种基因型的菌株。同一环境中的多种血清型或基因型的菌株有利于菌株的基因重组或变异, 而这种基因的重组或变异则可能增加病原菌突破宿主防御的能力和致病力, 四川地区近年海豚链球菌对鲟鱼的危害越来越大是否与不同基因型的菌株共存导致基因突变有关, 还需要探索。我们的研究发现四川海豚链球菌 *simA* 基因发生了变异, 至于其他功能性基因有无变异, 从而影响其致病力值得进一步研究。

参考文献:

[1] PIER G B, MADIN S H, AL-NAKEEB S. Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1978, 28(2): 311-314.

[2] KITAO T, AOKI T, SAKOH R. Epizootic caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish[J]. *Fish Pathol*, 2009, 15(3/4): 301-307.

[3] 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(3): 139-143.

[4] AGNEW W, BARNES A C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 122(1/2): 1-15.

[5] SHOEMAKER C A, KLESIUS P H, EVANS J J. Prevalence of *Streptococcus iniae* in *Tilapia*, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States[J]. *Am J Vet Res*, 2001, 62(2): 174-177.

[6] ORTEGA C, GARCÍA I, IRGANG R, et al. First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from *Tilapia* (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico[J]. *J Fish Dis*, 2018, 41(5): 773-782.

- [7] GUO S, MO Z, WANG Z, et al. Isolation and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in offshore cage-cultured *Trachinotus ovatus* in China[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 247-252.
- [8] SONG Z, YUE R, SUN Y, et al. Fatal bacterial septicemia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* caused by *Streptococcus iniae*[J]. *Dis Aquat Organ*, 2017, 122(3): 195-203.
- [9] EYNGOR M, TEKOAH Y, SHAPIRA R, et al. Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains[J]. *Appl Environ Micro*, 2008, 74(22): 6892-6897.
- [10] BACHRACH G, ZLOTKIN A, HURVITZ A, et al. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3756-3758.
- [11] 熊向英, 黄国强, 王志成, 等. 广西卵形鲳鲹海豚链球菌基因分型、耐药谱型以及毒力基因检测[J]. *水产学报*, 2018, 42(4): 586-595.
- [12] DENG M, YU Z, GENG Y, et al. Outbreaks of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China[J]. *Aquac Res*, 2017, 48(3): 909-919.
- [13] BAUMS C G, HERMEYER K, LEIMBACH S, et al. Establishment of a model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*)[J]. *J Comp Pathol*, 2013, 149(1): 94-102.
- [14] BAIANO J C, BARNES A C. Towards control of *Streptococcus iniae*[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(12): 1891.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] MATA A I, BLANCO M. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 101(2): 109-116.
- [18] MALATHUM K, SINGH K V, WEINSTOCK G M, et al. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(1): 211-215.
- [19] LEMOS M L, OSORIO C R. Characteristics of the diseases[M]. Netherlands: Springer, 2007: 1-6.
- [20] MILLER J D, NEELY M N. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis[J]. *Acta Trop*, 2004, 91(1): 53-68.
- [21] NEELY M N, PFEIFER J D, CAPARON M. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3904-3914.
- [22] MCNULTY S T, KLESIUS P H, SHOEMAKER C A, et al. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills[J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1): 165-173.
- [23] EVANS J J, SHOEMAKER C A, KLESIUS P H. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following nare inoculation[J]. *Aquaculture*, 2001, 194(3/4): 233-243.
- [24] BUCHANAN J T, STANNARD J A, LAUTH X, et al. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(10): 6935-6944.
- [25] NIZET V, BEALL B, BAST D J, et al. Genetic locus for streptolysin S production by group A *Streptococcus*[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(7): 4245-4254.
- [26] LOCKE J B, COLVIN K M, DATTA A K, et al. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish[J]. *J Bacteriol*, 2009, 189(4): 1279-1287.
- [27] MILANI C J E, AZIZ R K, LOCKE J B, et al. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 2): 543-544.
- [28] JÜRGENS D, STERZIK B, FEHRENBACH F J. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity[J]. *J Exp Med*, 1987, 165(3): 720-732.
- [29] HENDERSON B, POOLE S, WILSON M. Bacterial modulins: A novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis[J]. *Microbiol Rev*, 1996, 60(2): 316-341.
- [30] BAIANO J C, TUMBOL R A, UMAPATHY A, et al. Identification and molecular characterisation of a fibrinogen binding protein from *Streptococcus iniae*[J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8(1): 1-16.
- [31] LOCKE J B, AZIZ R, VICKNAIR M, et al. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2824.
- [32] PIER G B, MADIN S H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1976, 26(4): 545-553.
- [33] BARNES A C, YOUNG F M, HORNE M T, et al. *Streptococcus iniae*: Serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing[J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(3): 241-247.
- [34] 黄婷, 李莉萍, 王瑞, 等. 广西罗非鱼和卵形鲳鲹海豚链球菌的生化特性及基因多态性分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(5): 459-462.
- [35] 周素明. 鱼类海豚链球菌流行病学及诊断技术的研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.