

## 广西罗非鱼链球菌病流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析

李莉萍<sup>1</sup>, 王 瑞<sup>1</sup>, 黄 婷<sup>1</sup>, 黄维义<sup>2</sup>, 梁万文<sup>1</sup>,  
李 健<sup>2</sup>, 黄 彦<sup>3</sup>, 雷爱莹<sup>1</sup>, 甘 西<sup>1\*</sup>, 陈 明<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西水产研究所广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 530021;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530005;

3. 广西疾病预防控制中心, 广西 南宁 530021)

**摘要:**为获知近年广西罗非鱼链球菌病流行菌种及其基因型变化信息,采用特异 PCR 方法对 2006—2012 年从广西发病罗非鱼分离获得的 77 株临床菌株进行鉴定,并通过脉冲电场凝胶电泳(PFGE)对 2006—2011 年分离获得的 37 株流行菌株进行基因型分析。结果显示,其中 20 株鉴定为海豚链球菌其余 57 株鉴定为无乳链球菌。2006—2007 年获得的 19 株流行菌株中有 18 株为海豚链球菌(94.7%),仅 1 株无乳链球菌;2009—2012 年分离的 58 株流行菌株中 56 株为无乳链球菌(96.6%),仅 2 株海豚链球菌。PFGE 图谱聚类显示,海豚和无乳链球菌分别聚类为两个大分支,20 株海豚链球菌共产生 4 种 PFGE 带型,带型相似度为 83.9%~100%;17 株无乳链球菌共产生 5 种 PFGE 带型,带型相似度为 47.4%~100%。研究表明,广西罗非鱼链球菌病流行菌种已从过去(2008 年前)以海豚链球菌为主转变为现在(2009—2012 年)以无乳链球菌为主;流行菌株 PFGE 基因型存在多样性。

**关键词:**罗非鱼;无乳链球菌;海豚链球菌;脉冲场凝胶电泳;基因型

**中图分类号:**S 943

**文献标志码:**A

链球菌病是罗非鱼养殖高温季节最主要的传染性病害,每年给我国罗非鱼产业造成巨额经济损失。2001—2005 年,我国罗非鱼养殖零星出现链球菌病,但发病率极低(0.1%以下)<sup>[1]</sup>;2006—2007 年,该病发生率明显上升(5%~10%),并在个别养殖场造成了 5%~15% 的累计死亡率;2008 年,该病几乎不发生;而 2009—2012 年连续 4 年,链球菌病在我国罗非鱼主要养殖区大面积暴发流行,累计死亡率在 15%~95% 之间,发病区域逐年扩大、发病率和死亡率逐年递增,大批鱼苗因感染链球菌死亡<sup>[1-4]</sup>。祝璟琳等<sup>[3]</sup>,郭玉娟等<sup>[4]</sup>,李波等<sup>[5]</sup>和谭晶晶等<sup>[6]</sup>等 2009—2011 年分别对广东、广西和海南罗非鱼链球菌病部分病例进行了病原分离鉴定报道。根据本实验室调查统计,2012 年该病给罗非鱼养殖业造成的经济损失约

10~15 亿元,链球菌病已严重影响我国罗非鱼产业的可持续发展。显然,近年我国罗非鱼链球菌病发生了巨大变化,病情越发复杂,预防和治疗难度增大,这是否意味着流行菌种或菌型发生变化,目前相关研究报道还未能很好的阐明这些问题。

感染罗非鱼的链球菌主要是海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)和无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)<sup>[7]</sup>。生化鉴定、单克隆抗体、PCR 技术和 16S RNA 序列分析均能很好的区分两个菌种,但这些方法均不能很好区分菌株间的细微差异<sup>[8-11]</sup>。传统血清型和分子血清型分析常作为重要手段用于流行菌株抗原差异研究,但到目前罗非鱼无乳链球菌仅检测到 Ia、Ib 和 III 3 个血清型,原因可能是用于检测的标准血清为人源无乳链球菌制备<sup>[12-14]</sup>,难于对罗非鱼链球菌病流行菌

收稿日期:2012-12-23 修回日期:2013-03-22

资助项目:广西科学研究与技术开发课题(桂科攻 1123006-4);国家罗非鱼产业技术体系岗位科学家经费(CARS-49);广西罗非鱼产业创新团队岗位科学经费(GXBY-03);广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018034)

通信作者:陈 明,E-mail:cm990919@163.com;甘 西,E-mail:ganxicn@163.com

株进行更详细更精确的区分。实验主要利用 PCR 和 PFGE 技术对我国罗非鱼主要养殖省份广西过去 7 年(2006—2012 年)分离的流行菌株进行菌种和基因型分析,旨在为分析我国罗非鱼链球菌病的分子流行病学和区域流行特征提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标准菌株

海豚链球菌(*S. iniae*)标准菌株 ATCC29178、无乳链球菌标准菌株 ATCC27956、停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)标准菌株 NCTC4335、副乳链球菌(*S. parauberis*)标准菌株 MCCA01039 和格氏链球菌(*S. gordonii*)标准菌株 MCCA07812 均购自中国微生物菌种保藏中心。

### 1.2 流行菌株分离与培养

2006—2012 年,对广西罗非鱼主要养殖区域南宁、北海、钦州、柳州、玉林、河池、崇左及百色共 8 个地区的 70 个罗非鱼养殖场 5~1 000 g 不同规格的发病鱼进行细菌分离。每个发病养殖场选取 6~10 尾出现体表发黑、眼球突出、眼角膜变白、游姿异常、腹水、鳃盖或鳍条基部出血等症状,或未见明显症状的急性死亡罗非鱼进行血平板划线细菌分离,接种部位为发病鱼脑、肝或鳍条基部。28 ℃ 培养 24~48 h,挑取单个菌落进行纯化培养。应用 BBL Crystal 微生物鉴定系统对纯化的菌株进行生化鉴定。

### 1.3 二重 PCR 鉴定

实验对 2006—2012 年分离的 77 株临床菌株进行二重 PCR 鉴定。细菌 DNA 抽提:细菌于 TSB 液体培养基 28 ℃ 培养 24 h,取 1.5 mL 菌液 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,按细菌 DNA 抽提试剂盒(TIANGEN)说明书提取菌体 DNA, -20 ℃ 保存备用。PCR 扩增:海豚和无乳链球菌特异 PCR 扩增引物分别参考黎炯等<sup>[15]</sup>和 Zlotkin 等<sup>[16]</sup>报道方法设计引物,建立罗非鱼海豚和无乳链球菌二重 PCR 鉴定方法。无乳链球菌上下游引物分别为 H1(5'-AAGCGTGTATTCCAG-ATTTCT-3')和 H2(5'-CAGTAATCAAGCCCA-GCAA-3'),扩增片段大小为 474 bp;海豚链球菌上下游引物分别为 P1(5'-CTAGAGTACACA-TGTACTTAAG-3')和 P2(5'-GGATTTTCCACT-CCCATTAC-3'),扩增片段大小为 296 bp。为验

证引物特异性,实验选择可感染淡水鱼的海豚链球菌标准菌株 ATCC29178、无乳链球菌标准菌株 ATCC27956、停乳链球菌标准菌株 NCTC4335、副乳链球菌标准菌株 MCCA01039 和格氏链球菌标准菌株 MCCA07812 为参考菌株进行引物的特异性 PCR 扩增验证。PCR 反应体系 50 μL,含 DNA 模板 2.0 μL(约 50 ng),引物 H1 和 H2、P1 和 P2 各 2.0 μL,其余组分按照 Ex Taq 酶(TaKaRa)说明书,反应在 Bio-Rad PCR 仪上进行,反应条件为 94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环,72 ℃ 10 min。

### 1.4 37 株临床菌株的 PFGE 基因型分析

实验对 2006—2011 年分离获得的 37 株临床菌株进行 PFGE 型分析,DNA 脉冲场凝胶电泳分析参照 Oliveira 等<sup>[17]</sup>报道的方法进行。主要步骤:细菌培养于 5% 的血平板,培养 48 h;用细胞悬浮液(Tris-HCl 0.5 mol/L,EDTA 1 mol/L,pH 8.0)冲洗平板,收集细菌。用 20 mg/mL 的溶菌酶(Sigma)和 20 mg/mL 的蛋白酶 K(Sigma)消化收集的细菌。将细菌悬浮液与等体积的 1.0% 低熔点琼脂糖(Cambrex)混合后加至 50 μL 模具中。凝胶胶块溶解在 CLB 中(1 mol/L Tris-HCl,1 mol/L EDTA,1% Sarcosyl,0.1 mg/mL 蛋白酶 K)。用 2 U *Sma* I(TaKaRa)对胶块 DNA 进行酶切。胶块在 CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪(Bio-Rad)进行电泳,程序如下:始末脉冲时间为 4~40 s,电泳时间为 21 h,电压为 6 V/cm。PFGE 图像分析和比对采用 BioNumerics version 6.5 软件(Applied Maths BVBA)。

## 2 结果

### 2.1 流行菌株分离与生化鉴定

所有疑似链球菌病罗非鱼均分离到链球菌,2006—2007 年发病养殖场累计死亡率在 5%~15% 之间,2009—2012 年累计死亡率在 15%~95% 不等。水温低于 28 ℃ 很少发生该病,水温超过 32 ℃ 时,发病率和死亡率明显上升。大部分临床菌株在血琼脂平板培养 24 h,可生成直径 1 mm 大小、边缘整齐、突起、乳白色菌落;极小部分流行菌株生长速度较慢,在血琼脂平板培养 48 h,才呈现 1 mm 大小、边缘不整齐、扁平、透明菌落。经鉴定,生长快的为 Ia 血清型无乳链球菌菌株,生长慢的为 Ib 血清型无乳链球菌菌株。所有菌株

在血平板呈现  $\beta$  溶血,革兰氏染色阳性,大多数呈长链或短链排列,少数为单个分布。实验共分离获得 77 株罗非鱼链球菌临床菌株,菌株相关信息见表 1。生化测定结果表明,77 株菌株均为过氧化氢酶阴性,无运动性, $\beta$  溶血,10  $^{\circ}\text{C}$  不生长,45  $^{\circ}\text{C}$  生长;接触酶阴性,水解七叶灵、精氨酸;VP 实验和脲酶实验阴性;发酵葡萄糖、水杨苷和蔗

糖,不发酵阿拉伯糖、菊糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖和山梨醇,其中 57 株水解马尿酸盐但不水解淀粉,20 株不水解马尿酸盐但水解淀粉。根据《伯杰氏系统细菌学手册》(第 9 版)中对链球菌的描述,57 株鉴定为无乳链球菌,20 株鉴定为海豚链球菌(表 2)。

表 1 2006—2012 年从广西分离获得的 77 株罗非鱼链球菌病流行菌株信息表  
Tab. 1 77 strains of *S. iniae* and *S. agalactiae* isolated from tilapia in Guangxi between 2006—2012

菌株编码 strain code	宿主/器官 host/organ	分离地点/养殖场 isolation locality/farm	分离时间 time	PCR 鉴定结果 result of PCR	基因型 PFGE type
GX001	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A1	2006-04	<i>S. iniae</i>	F
GX003	罗非鱼/肝	南宁市邕江/A2	2006-09	<i>S. iniae</i>	F
GX004	罗非鱼/脑	南宁市横县西津/A3	2006-07	<i>S. iniae</i>	F
GX005	罗非鱼/脑	南宁市横县莲塘/A4	2006-07	<i>S. iniae</i>	F
GX006	罗非鱼/肾	南宁市横县莲塘/A5	2006-09	<i>S. iniae</i>	F
GX007	罗非鱼/脑	南宁市横县莲塘/A6	2006-09	<i>S. iniae</i>	F
GX009	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A7	2006-04	<i>S. iniae</i>	H
GX010	罗非鱼/脑	南宁市横县莲塘/A8	2006-11	<i>S. iniae</i>	F
GX011	罗非鱼/脑	南宁市横县南乡/A9	2007-06	<i>S. iniae</i>	F
GX012	罗非鱼/肾	南宁市横县南乡/A10	2007-06	<i>S. iniae</i>	F
GX013	罗非鱼/肝	南宁市武鸣县/A11	2007-06	<i>S. iniae</i>	F
GX014	罗非鱼/肝	南宁市邕江/A12	2007-06	<i>S. iniae</i>	F
GX015	罗非鱼/肝	北海市合浦县/B1	2007-06	<i>S. agalactiae</i>	D
GX018	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A13	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX019	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A14	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX020	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A15	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX021	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A16	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX022	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A17	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX023	罗非鱼/脑	南宁市邕江/A18	2007-12	<i>S. iniae</i>	G
GX024	罗非鱼/脑	钦州市浦北县/C1	2009-06	<i>S. iniae</i>	F
GX025	罗非鱼/脑	钦州市浦北县/C2	2009-06	<i>S. iniae</i>	F
GX026	罗非鱼/脑	百色市西林县/D1	2009-09	<i>S. agalactiae</i>	E
GX027	罗非鱼/脑	北海市金海湾/B2	2010-07	<i>S. agalactiae</i>	A
GX028	罗非鱼/脑	北海市南瑶/B3	2010-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX029	罗非鱼/脑	北海市平阳镇/B4	2010-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX030	罗非鱼/脑	北海市平阳镇/B5	2010-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX031	罗非鱼/脑	南宁市三塘/A19	2010-09	<i>S. agalactiae</i>	C
GX032	罗非鱼/脑	柳州市沙塘镇/E1	2010-10	<i>S. agalactiae</i>	D
GX034	罗非鱼/脑	北海市银海区/B6	2011-07	<i>S. agalactiae</i>	C
GX035	罗非鱼/脑	北海市垌尾/B7	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX036	罗非鱼/脑	北海市垌尾/B8	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX038	罗非鱼/脑	北海市庙山/B9	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX039	罗非鱼/脑	北海市庙山/B10	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C

续表 1

菌株编码 strain code	宿主/器官 host/organ	分离地点/养殖场 isolation locality/farm	分离时间 time	PCR 鉴定结果 result of PCR	基因型 PFGE type
GX041	罗非鱼/脑	北海市银海区/B6	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX042	罗非鱼/脑	玉林市博白县东平镇/F1	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	B
GX043	罗非鱼/肝	玉林市博白县东平镇/F1	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX048	罗非鱼/脑	玉林市博白县东平镇/F2	2011-08	<i>S. agalactiae</i>	C
GX049	罗非鱼/脑	玉林市博白县东平镇/F2	2012-07	<i>S. agalactiae</i>	—
GX050	罗非鱼/脑	玉林市博白县宁潭镇/F3	2012-07	<i>S. agalactiae</i>	—
GX051	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A20	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX052	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A21	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX053	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A22	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX054	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A23	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX055	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A24	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX056	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A25	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX057	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A26	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX058	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A27	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX059	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A28	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX060	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A29	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX061	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A30	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX062	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A31	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX063	罗非鱼/脑	南宁市三塘镇/A32	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX064	罗非鱼/脑	柳州市鱼峰区/E2	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX065	罗非鱼/脑	柳州市柳江县成团镇/E3	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX066	罗非鱼/脑	柳州市柳江县成团镇/E3	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX067	罗非鱼/脑	柳州市沙塘农场/E4	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX068	罗非鱼/脑	柳州市沙塘农场/E4	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX069	罗非鱼/脑	柳州市鱼峰区/E5	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX070	罗非鱼/脑	柳州市柳南区/E6	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX071	罗非鱼/脑	柳州市沙塘农场/E4	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX072	罗非鱼/脑	河池市宜州六坡水库/U1	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX073	罗非鱼/脑	钦州市钦南区/C3	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX074	罗非鱼/脑	玉林市玉州区茂林镇/F4	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX075	罗非鱼/脑	玉林市玉州区腾阳村/F5	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX076	罗非鱼/脑	玉林市玉州区竹美/F6	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX077	罗非鱼/脑	玉林市二环路/F7	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX078	罗非鱼/脑	崇左市扶绥县中东/V1	2012-08	<i>S. agalactiae</i>	—
GX079	罗非鱼/脑	百色市田东县/D2	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX080	罗非鱼/脑	百色市田阳县/D3	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX081	罗非鱼/脑	南宁西乡塘区那龙/A33	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX082	罗非鱼/脑	北海市靖海镇垌尾/B11	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX083	罗非鱼/脑	北海海城区军屯村/B12	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX084	罗非鱼/脑	北海海城区高德办/B13	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX085	罗非鱼/脑	北海银海区平阳镇/B14	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX086	罗非鱼/脑	北海银海区平阳镇/B15	2012-09	<i>S. agalactiae</i>	—
GX087	罗非鱼/脑	柳州市柳北区农场/E7	2012-06	<i>S. agalactiae</i>	—
GX088	罗非鱼/脑	柳州市柳北区农场/E8	2012-06	<i>S. agalactiae</i>	—

表 2 部分临床菌株生化指标  
Tab.2 Biochemical indexes of eight clinical strains

检测指标 detection indexes	海豚链球菌 <i>S. iniae</i>					无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>		
	GX001	GX009	GX011	GX019	GX015	GX026	GX027	GX035
接触酶(catalase)	-	-	-	-	-	-	-	-
VP 试验	-	-	-	-	-	-	-	-
溶血类型	β	β	β	β	β	β	β	β
七叶灵(ESC)	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸( ARG)	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶( URE)	-	-	-	-	-	-	-	-
马尿酸( PYR)	-	-	-	-	+	+	+	+
葡萄糖( FGN)	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨酸( SAL)	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖( SUC)	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉( PUL)	+	+	+	+	-	-	-	-
阿拉伯糖( ARA)	-	-	-	-	-	-	-	-
菊糖( INU)	-	-	-	-	-	-	-	-
乳糖( LAC)	-	-	-	-	-	-	-	-
蜜二糖( MEL)	-	-	-	-	-	-	-	-
棉子糖( RAF)	-	-	-	-	-	-	-	-
山梨醇( SOR)	-	-	-	-	-	-	-	-

注:GX001、GX009、GX011、GX019 为海豚链球菌菌株;GX015、GX026、GX027、GX035 为无乳链球菌菌株。

Notes:GX001,GX009,GX011,GX019 were *S. iniae* strains;GX015,GX026,GX027,GX035 were *S. agalactiae* strains.

## 2.2 二重 PCR 鉴定

2006—2012 年从广西分离获得的 77 株临床菌株经特异 PCR 扩增,20 株鉴定为海豚链球菌,其余 57 株鉴定为无乳链球菌。引物特异性实验结果如图 1,实验选择可感染淡水鱼的停乳链球菌标准菌株 NCTC4335、副乳链球菌标准菌株 MCCA01039 和格氏链球菌标准菌株 MCCA07812 四株对照菌株及空白孔均未扩增出任何条带,为阴性;无乳链球菌标准菌株

ATCC27956 及无乳链球菌 5 个基因型代表菌株 (GX026,GX027,GX028,GX032,GX042) 均扩增出 474 bp 大小的特异性条带;海豚链球菌标准菌株 ATCC29178 及海豚链球菌 3 个基因型代表菌株 (GX005,GX009 和 GX022) 均扩增出 296 bp 大小的特异性条带。同时,测序结果进一步验证了 PCR 检测方法的准确性。77 株流行菌株 PCR 鉴定结果见表 1。

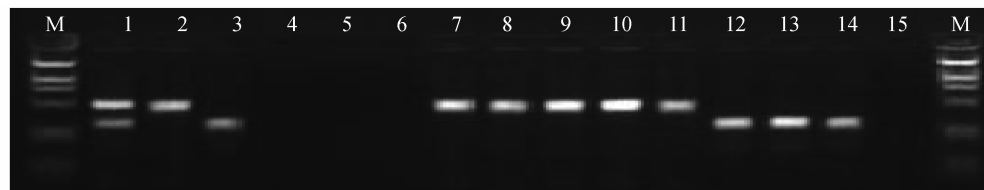


图 1 海豚链球菌与无乳链球菌二重 PCR 鉴定引物特异性扩增验证

1. 标准菌株 ATCC29178 (*S. iniae*) 与 ATCC27956 (*S. agalactiae*) 混合物; 2. 标准菌株 ATCC27956 (*S. agalactiae*); 3. 标准菌株 ATCC29178 (*S. iniae*); 4~6. 分别为标准菌株 NCTC4335 (*S. dysgalactiae*), MCCA01039 (*S. parauberis*), MCCA07812 (*S. gordonii*); 7~11. 分别为临床菌株 GX027、GX042、GX028、GX032 和 GX026; 12~14. 分别为临床菌株 GX005、GX022 和 GX009; 15. 为空白对照; M. DNA 分子量标记(DL2000,上到下:2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp)。

Fig.1 Verification of the specificity of *S. iniae* and *S. agalactiae* specific primers for the identification of streptococcal strains

Lanes 1-15 represent reference strain ATCC29178 (*S. iniae*) and ATCC27956 (*S. agalactiae*), ATCC27956 (*S. agalactiae*), ATCC29178 (*S. iniae*), NCTC4335 (*S. dysgalactiae*), MCCA01039 (*S. parauberis*), MCCA07812 (*S. gordonii*), clinical isolate strains (see Table 1) GX027, GX042, GX028, GX032, GX026, GX005, GX022, GX009 and blank control, respectively. M represents DL 2000 DNA size marker, 2 000, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp (top to bottom).

### 2.3 PFGE 基因型分析

如图2所示,2006—2011年分离的37株临床菌株基因组DNA被 *Sma* I 消化后,无乳链球菌菌株产生7~11种条带,大小在10~850 kb之间;海豚链球菌流行菌株产生12~13种条带,大小在10~620 kb之间。基于PFGE带型进行聚类分析,将无乳链球菌和海豚链球菌病流行菌株分为2个大的进化分支,两者带型相似度仅为

35.7%。17株无乳链球菌被分为5种(A、B、C、D和E)不同的PFGE基因型,相似度在47.4%~100%,其中基因C型为优势基因型,占已分析无乳链球菌总数的70.59%(12/17)。20株海豚链球菌产生4种(F、G、H和I)PFGE带型,相似度在94.8%~100%,其中F为优势基因型(65.00%,13/20)。

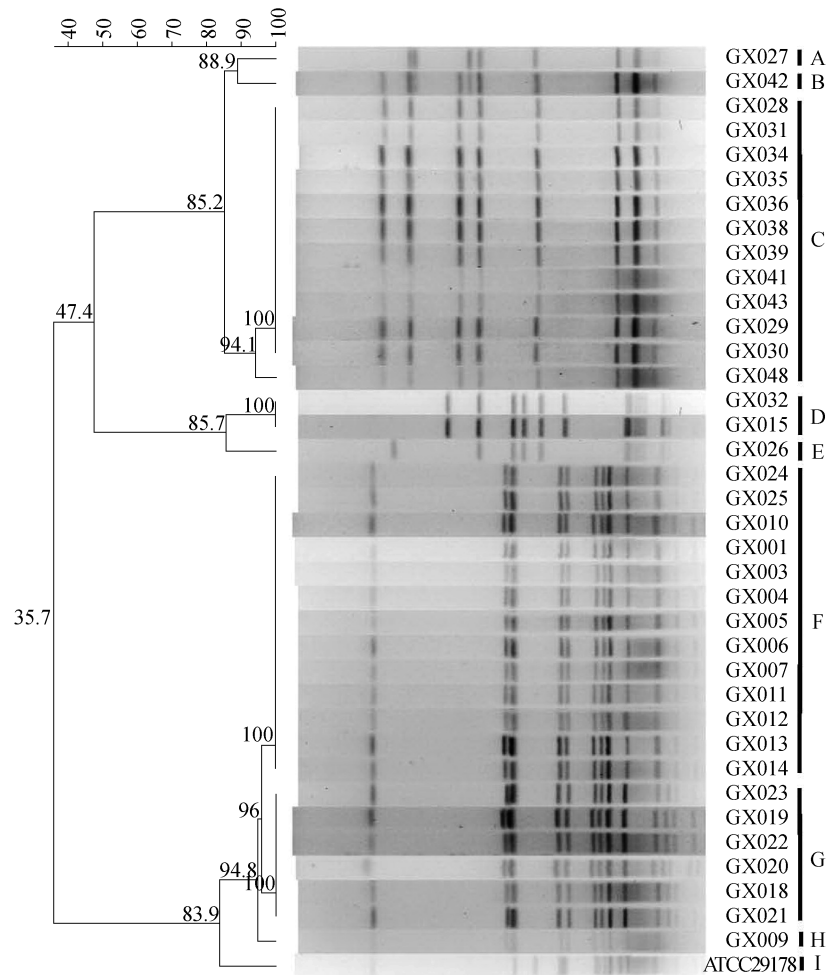


图2 2006—2011年广西罗非鱼主要养殖区分离获得的37株临床菌株PFGE聚类分析

Fig. 2 The molecular typing result by PFGE of the 37 streptococcal strains isolated from tilapia concentrated aquaculture areas of Guangxi in 2006—2011

### 3 讨论

广西罗非鱼链球菌病日趋严重,并有逐年变化的趋势。截至目前,有关广西罗非鱼链球菌病流行菌株的相关研究很少,只对个别病例的临床菌株进行了菌种鉴定<sup>[2,13,18]</sup>。实验所用菌株为2006—2012年从广西罗非鱼集中养殖区分离菌

株,分别来源于广西南宁、北海、钦州、柳州、玉林、河池、崇左及百色共8个地级市的70个罗非鱼养殖场,在时间和地域上具有很好的代表性。PCR鉴定结果显示,2007年以前分离获得的临床菌株有94.7%(18/19)为海豚链球菌,仅5.3%(1/19)为无乳链球菌;2009—2012年分离到的临床菌株有96.55%(56/58)为无乳链球菌,仅3.45%

(2/58)为海豚链球菌。这一结果表明,广西罗非鱼链球菌病流行菌种以 2008 年为界发生了根本性更替,由原来(2008 年前)的海豚链球菌为主转变为现在(2009 年后)的以无乳链球菌为主。这种转变,推测与 2008 年中国南方大部分地区出现罕见低温气候有关。2008 年 2 月,中国南方地区发生 50 年一遇的冻灾天气,持续一个月低温天气,致使南方地区 95% 罗非鱼全部冻死,当年没有出现暴发罗非鱼链球菌病和分离获得链球菌相关报道。本实验室通过比较持续低温条件下(8~10℃)两种链球菌的生存能力和感染能力,已证实当年持续低温和菌种本身致病力差异是我国罗非鱼流行菌种在 2008 年发生更替的直接原因。

PFGE 结果显示,广西各地罗非鱼链球菌病流行菌株基因型存在差异。北海市流行菌株基因型有 A、C 和 D 共 3 个基因型,但以 C 型为优势基因型;百色市分离的菌株为 E 型;柳州市分离的菌株为 D 型;玉林市分离的菌株有 B 和 C 型,但以 C 型为优势基因型;南宁市流行菌株基因型最多,2006—2007 年分离的 18 株海豚链球菌分为 F、G、H 3 个基因型;2009—2011 年分离的 16 株为无乳链球菌分为 A、B、C、D 和 E 4 个基因型。这种流行菌型区域多样性可能与罗非鱼养殖苗种及人员流通相关。因为饲料等养殖物质运输、活鱼运输、水流(海洋、湖泊、河流和地下水)、人员流动和产品贸易等因素是该病流行菌株传播的主要途径<sup>[19-20]</sup>。南宁是广西鱼苗的中转站,所以临床菌株基因型最多,北海和玉林毗邻广东和海南两省,鱼苗及鱼种、人员频繁往来于 3 地,因此流行菌株基因型较多;柳州和百色两市分别处于广西中北部和西部,地理位置离广西罗非鱼主产区相对偏远,苗种来源单一,对外物质和人员交流也相对较少,因此菌株基因型较少。同时,各年份优势菌群也存在较大差异。2006—2007 年广西优势菌群为 F 型海豚链球菌;2009—2011 年广西优势菌群为 C 型无乳链球菌。PFGE 是细菌分子分型的重要方法之一<sup>[21-22]</sup>,具有可重复性、实验室间可比性以及分辨力强特点。建立广西罗非鱼链球菌流行菌株 PFGE 分型图谱数据库,可很好的鉴定比较菌株差异,进而分析感染来源和暴发因素,较准确掌握该病病原的变化特点和趋势,为科学防控及其疫苗研发应用提供直接依据。

罗非鱼链球菌已严重威胁到人类健康与安全。截至目前,在北美和亚洲已有 9 例罗非鱼海豚链球菌感染人的病例报道,感染途径均是患者直接接触发病罗非鱼<sup>[23]</sup>。同时,研究已证实无乳链球菌可以在人、奶牛、小鼠、蜥蜴和罗非鱼间进行交叉感染<sup>[24-26]</sup>。实验发现,从同一尾罗非鱼的脑(GX042)和肝(GX043)分别分离到 B 和 C 两个基因型菌株。Pereira 等<sup>[25]</sup>用 PFGE 方法对巴西罗非鱼链球菌临床菌株分型研究也发现同一养殖场可分离到不同基因型的菌株。不同基因型菌株在同一体或环境相聚为菌株基因重组或菌株变异提供了有利条件,这种基因重组或变异为菌株突破宿主屏障(动物与动物,人与动物)提供了可能。因此,开展罗非鱼链球菌病流行菌株基因型分析与监测,不仅为罗非鱼链球菌病的预防和控制提供依据,也为进一步研究链球菌宿主种间屏障突破机制提供重要信息。

#### 参考文献:

- [1] 柴家前,丁巧玲,王振龙,等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20.
- [2] 甘西,陈明,余晓丽,等. 罗非鱼海豚链球菌 16s rRNA 基因的序列测定和系统进化分析[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 618-623.
- [3] 祝璟琳,杨弘,邹芝英,等. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596.
- [4] 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.
- [5] 李波,陈明,李莉萍,等. 广西罗非鱼链球菌病原的生化鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(10): 93-95.
- [6] 谭晶晶,陈昌福,高宇,等. 奥尼罗非鱼无乳链球菌的鉴定、致病性及药物敏感性研究[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 745-751.
- [7] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 75-79.
- [8] Facklam R, Elliott J, Shewmaker L, et al. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(2): 933-937.
- [9] Klesius P, Evans J, Shoemaker C, et al. Rapid

- detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody based indirect fluorescent antibody technique [ J ]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 180-186.
- [ 10 ] Mata A I, Blanco M M, Dominguez 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.
- [ 11 ] Berridge B R, Fuller J D, Azavedo J D, *et al.* Development of a specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer [ J ]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(9): 2778-2781.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] Suanyuk N, Kong F, Ko D, *et al.* Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? [ J ]. *Aquaculture*, 2008, 284(1-4): 35-40.
- [ 14 ] Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a Meningoencephalitis in fish [ J ]. *Current Microbiology*, 1994, 28(3): 139-143.
- [ 15 ] 黎炯, 叶星, 卢迈新, 等. 双重 PCR 快速鉴别无乳链球菌和海豚链球菌 [ J ]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(4): 449-452.
- [ 16 ] Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 4065-4067.
- [ 17 ] Oliveira I C, De Mattos M C, Areal M F, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis of human group B streptococci isolated in Brazil [ J ]. *Journal of chemotherapy ( Florence, Italy)*, 2005, 17(3): 258-263.
- [ 18 ] 邓显文, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 广西罗非鱼海豚链球菌的分离鉴定 [ J ]. *广西农业科学*, 2010, 41(5): 495-498.
- [ 19 ] Evans J J, Wiedenmayer A A, Klesius P H, *et al.* Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections [ J ]. *Aquaculture*, 2004, 233(1-4): 15-21.
- [ 20 ] Bachrach G, Zlotkin A, Hurvitz A, *et al.* Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3756-3758.
- [ 21 ] Smith C L, Condemine G. New approaches for physical mapping of small genomes [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(3): 1167-1172.
- [ 22 ] Olive D M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms [ J ]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [ 23 ] Lau S K, Woo P C, Luk W K, *et al.* Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and beta-hemolytic than those from North America [ J ]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2006, 54(3): 177-181.
- [ 24 ] Evans J J, Klesius P H, Pasnik D J, *et al.* Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [ J ]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(5): 774-776.
- [ 25 ] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C, *et al.* Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1-2): 186-192.
- [ 26 ] Hetzel U, König A, Yildirim A O, *et al.* Septicaemia in emerald monitors (*Varanus prasinus* Schlegel 1839) caused by *Streptococcus agalactiae* acquired from mice [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 95(4): 283-293.



## PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in Guangxi

LI Liping<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, HUANG Ting<sup>1</sup>, HUANG Weiyi<sup>2</sup>, LIANG Wanwen<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2</sup>,  
HUANG Yan<sup>3</sup>, LEI Aiyi<sup>1</sup>, GAN Xi<sup>1\*</sup>, CHEN Ming<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory for Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,  
Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China;

2. Institute of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

3. Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China)

**Abstract:** To acquire the data upon the clinical dominant strains of tilapia *Streptococcus* spp. and their genotype variations in Guangxi province, a total of 77 clinical *Streptococcus* spp. strains collected from the epidemic areas of Guangxi from 2006 to 2012 were identified by species-specific PCR. Among them, 37 strains collected from 2006 to 2011 were genotyped by the pulse field gel electrophoresis (PFGE) method. As a result, 57 out of 77 strains were identified as *Streptococcus agalactiae*, and the rest were determined as *S. iniae* by PCR identification process. As is shown, the dominant strains from 2006 to 2007 were *S. iniae*, accounted for 94.7% (18/19), only 5.3% (1/19) was *S. agalactiae* strains. Between 2009 and 2012, the dominant strains, however, became *S. agalactiae*, which accounted for 96.6% (56/58), only 3.4% (2/58) was referred as *S. iniae* strains. The strains were divided into two branches by PFGE genotyping. 20 *S. iniae* strains were in one classification with 4 PFGE genotypes, the similarities of which were 83.9% – 100%. 17 *S. agalactiae* strains were put in another branch with 5 PFGE genotypes, the similarities of which were between 47.4% and 100%. Our data confirmed that the prevalent strains of tilapia *Streptococcus* spp. in Guangxi province have been shifting from *S. iniae* (before 2008) to *S. agalactiae* (2009 – 2012), and the PFGE genetic diversities were demonstrated in the prevalent strains.

**Key words:** Tilapia; *Streptococcus agalactiae*; *S. iniae*; PFGE; genotype

**Corresponding author:** CHEN Ming. E-mail: cm990919@163.com; GAN Xi. E-mail: ganxicn@163.com