

文章编号: 1000-0615(2016)03-0503-09

DOI: 10.11964/jfc.20151210191

## 广东地区吉富罗非鱼无乳链球菌病的流行情况与耐药性

魏 顺<sup>1\*</sup>, 张 泽<sup>1</sup>, 李宇辉<sup>1</sup>, 胡敏强<sup>1</sup>, 余岸良<sup>1</sup>, 张 华<sup>1</sup>,  
兰江风<sup>1</sup>, 张 志<sup>3</sup>, 颜远义<sup>3</sup>, 林 鑫<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北协同创新中心, 湖北 武汉 430070;

3. 广东省水生动物疫病预防控制中心, 广东 广州 510000)

**摘要:** 为了调查广东省惠州、肇庆、珠海、湛江4个吉富罗非鱼主养区链球菌病的流行情况和耐药性, 并进一步分析 $\beta$ -内酰胺酶基因与青霉素类药物的耐药性关系。本实验通过传统的方法对菌株进行分离纯化, 扩增特异性基因*cfb*以及16s rDNA对各菌株进行鉴定; 采用k-b法测定分离菌株的药物敏感性; 通过PCR检测 $\beta$ -内酰胺酶类基因在分离菌株中的分布情况, 并用Statistic6.0统计分析各 $\beta$ -内酰胺酶基因与青霉素类药物的耐药关系。实验结果表明, 吉富罗非鱼无乳链球菌的阳性率从高到低的顺序为惠州(46.46%)>湛江(43.24%)>肇庆(17.30%)>珠海(4.17%); 药敏结果显示各地区无乳链球菌分离株对青霉素(耐药率为94.29%)和磺胺二甲基嘧啶(耐药率为86.40%)普遍耐药, 对恩诺沙星最为敏感(耐药率为3.99%);  $\beta$ -内酰胺酶基因分布与细菌耐药性统计结果显示, 无乳链球菌基因组中的9个 $\beta$ -内酰胺酶基因在各分离菌株中的分布呈高度多态性, 其中SAG0658基因与氨苄青霉素抗性显著相关, 提示SAG0658基因在无乳链球菌耐氨苄青霉素过程中发挥主要作用; 此外, 9个 $\beta$ -内酰胺酶基因与青霉素抗性无相关性, 说明其在菌株对青霉素耐药过程中并未发挥明显作用, 提示分离菌株对青霉素的耐药性可能依赖其他途径。

**关键词:** 吉富罗非鱼; 无乳链球菌; 药敏实验; 耐药基因

**中图分类号:** Q 935; S 941

**文献标志码:** A

罗非鱼是世界粮农组织重点推介的养殖鱼类, 也是我国重要的养殖品种。经过几十年的养殖, 其养殖规模不断扩大, 密度不断增加, 加上种质退化、环境污染等因素, 导致在养殖过程中常会出现疾病。其中罗非鱼链球菌病是罗非鱼养殖中最为常见的一种疾病, 该病给我国罗非鱼养殖业造成了巨大的经济损失。据报道, 2009—2011年, 罗非鱼链球菌病持续暴发, 死亡率高达90%<sup>[1]</sup>, 每年因该病导致的经济损失达20多亿元<sup>[2]</sup>。罗非鱼链球菌病发病高峰期7—9月, 发病水温在25~37℃, 患病鱼体主要症状为眼球凸出和白浊、游泳打旋、肛门红

肿、鳃部充血、胸鳍基部充血及腹水等<sup>[3]</sup>。

由于链球菌含有荚膜多糖, 难以被宿主巨噬细胞吞噬清除<sup>[4]</sup>。在生产中抗生素常被用来防治罗非鱼链球菌病, 但水产品中的含药量显示我国抗生素存在过度使用的问题<sup>[5]</sup>, 抗生素的频繁使用除了引起鱼体内药物残留的食品安全问题外, 也导致了野生菌株对抗生素产生耐药性, 使得对该疾病的防控工作更为困难。抗生素的抗菌机制有多种, 以青霉素为例, 其化学机构中含有 $\beta$ -内酰胺环, 能够通过抑制细菌肽聚糖的合成, 破坏细菌细胞壁的完整性, 使水分可渗入菌体, 从而导致菌体肿胀破裂<sup>[6]</sup>。一方面 $\beta$ -内

收稿日期: 2015-12-08 修回日期: 2016-01-14

资助项目: 湖北省自然科学基金(4006-36114036); 华中农业大学校自主创新基金(2013py069, 2014QC017, 2014py035); 华中农业大学本科生自主创新基金(2015BC003)

通信作者: 魏顺, E-mail: weishun@mail.hzau.edu.cn; 林鑫, E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

酰胺类抗生素能够通过破坏细菌细胞壁来杀死细菌；另一方面一些细菌能够靠其胞内产生的 $\beta$ -内酰胺酶来分解 $\beta$ -内酰胺环药物，从而产生对该类抗生素的耐药性<sup>[6]</sup>。GenBank已公布的无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)基因组中，共有9个 $\beta$ -内酰胺酶基因，但对该9个基因在野生菌株中的分布情况与青霉素类药物耐性的关系尚缺乏相关研究报道。此外，目前国内还缺乏不同养殖区罗非鱼无乳链球菌的耐药性系统调查报道。为了掌握目前广东省无乳链球菌的流行情况，监测各地区菌株耐药现状，给生产和科学研究提供基础资料，开展了广东惠州、肇庆、珠海、湛江4个吉富罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)主养区无乳链球菌流行病学调查以及耐药性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基、药敏滤纸片、试剂

BHI培养基购自海博生物有限公司；Ex taq、10×PCR buffer、DL2000Marker、Proteinase K、RNase购自大连宝生物(TaKaRa)公司；细菌DNA提取试剂盒购自大连宝生物(TaKaRa)公司。所有抗生素均购自杭州微生物有限公司：大环内酯类(红霉素)；氨基糖苷类(链霉素、新霉素、庆大霉素、壮观霉素)；磺胺类(磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶)； $\beta$ -内酰胺酶类(青霉素、氨苄青霉素)；喹诺酮类(恩诺沙星)。

### 1.2 病原菌分离、纯化和形态学鉴定

2015年6—9月，于广东省惠州、肇庆、珠海、湛江4个地区的数十个发病吉富罗非鱼养殖池塘进行随机采样，每个地区采集100尾左右。无菌条件下用接种环分别蘸取鱼体脑、肝脏、肾脏组织于固体BHI培养基划线培养，28℃培养12 h，挑取单菌落，之后转接至BHI液体培养基中扩大培养12 h。将分离的菌株进行涂片、革兰氏染色后置显微镜下观察细菌的形态，进行形态学初步鉴定，挑取革兰氏染色阳性圆形或卵圆形长链状菌体，于液体BHI培养基保存，用于下一步PCR鉴定。

### 1.3 PCR鉴定和16S rDNA测序

参照黎炯等<sup>[7]</sup>的方法，用链球菌特异性引物(cfb-F: AAGCGTGTATTCCAGATTTTCT; cfb-R:

CAGTAATCAAGCCCAGCAA)对分离菌株进行PCR检测，PCR反应体系：10×Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup>Plus) 2.0  $\mu$ L，dNTP(各2.5 mM) 1.0  $\mu$ L，引物cfb-F和cfb-R各1.0  $\mu$ L，DNA模板2.0  $\mu$ L(约50 ng)，TaKaRa Ex Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L，最后加ddH<sub>2</sub>O至总体积为20  $\mu$ L。PCR反应条件为94℃，5 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 40 s，35个循环；72℃ 7 min，4℃保存。目的片段大小为474 bp。随后抽提阳性克隆的基因组，方法参照细菌DNA提取试剂盒说明书(TaKaRa大连宝生物)。以阳性克隆基因组为模板，用16S rDNA通用引物27f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG和1492r: TACGGCTACCTTGTTACGACTT进行扩增，反应条件：94℃预变性5 min，30个循环(94℃变性30 s，58℃退火30 s，72℃延伸1.5 min)，72℃最终延伸7 min，4℃保存。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后观察，并进行纯化回收，将得到的回收产物进行测序。将16 S rDNA测序结果通过NCBI的BLAST (<http://Blast.cgi.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性分析。

### 1.4 耐药性实验

药敏实验采用纸片扩散法(k-b法)，移取200  $\mu$ L培养12 h的菌液涂布于固体BHI培养基上，将药敏滤纸片置于其上，倒置培养12 h，测量抑菌圈大小。抑菌圈大小参照“美国临床和实验室药敏操作标准”<sup>[8]</sup>。

### 1.5 耐药基因的检测

PCR扩增9个 $\beta$ -内酰胺酶基因序列，其PCR反应体系为10×Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup>Plus) 2.5  $\mu$ L，dNTP(各2.5 mM) 1.0  $\mu$ L，引物forward和reverse各0.5  $\mu$ L，DNA模板0.5  $\mu$ L，TaKaRa Ex Taq(5U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L，随后加入ddH<sub>2</sub>O至总体积为25  $\mu$ L。PCR反应条件为94℃ 5 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 40 s，共35个循环；最后72℃，7 min，4℃保存(表1)。

### 1.6 抗性基因与青霉素类抗生素的数据分析

为了统计抗性基因与青霉素类药物耐药性之间的关系，实验引入卡方值( $\chi^2$ )。 $\chi^2$ 用于独立性检验，主要为探求两个变量间是否相互独立。如果相互独立则表明该基因对耐药性无影响；如果相关，则表明该基因对耐药性有影响。

假设该基因与耐药性独立，确定显著性水平

表 1 无乳链球菌β-内酰胺酶基因检测引物

Tab. 1 PCR primers used to amplify the beta-lactamase gene of *S. agalactiae*

目的基因 target genes	引物序列 primer sequence (5'-3')	
	上游引物 forward primer	下游引物 reverse primer
SAG0522	AGAAAAAGAA	GAGCATCGCC
	GCCGCTTGGC	AGTAACGACT
SAG0721	TGACGCTGGT	CAATCAAGCC
	TTAACAGGCA	TGCCATTTCGG
SAG1761	TATGCGATTG	AGAGCGAGAG
	GTGGTCTCGG	GACCTGCATA
SAG1186	CAAACAGATC	ATGACGTCCG
	TGGCGCGTTT	ATCGCCATTT
SAG1210	GTTAGCTTTG	TCTCGCCCA
	GGCGTGTATG	TAAAACGAGC
SAG0782	CGCTCACTAT	AGTGGGGGAG
	ATGTCAGGGCT	GGAGATAAGAC
SAG1729	AAAAGTTGTC	TCCACAAAGG
	GGCGTGGGAA	CTTCGCAAAA
SAG0658	TGCATGGGA	GCGTAGGTCC
	TTAACCGTGG	TTCCCGTAAC
SAG0013	ATTTCTCCAC	CCTGGTAAAC
	AAGCTGCGGG	GTCGTCAGCAA

$\alpha=0.05$ ; 在该假设成立的情况下, 利用公式  $\chi_c^2 = \frac{(|O_{11}O_{22} - O_{12}O_{21}| - n/2)^2 n}{R_1 R_2 C_1 C_2}$  (其中, 下标 c 代表显著性水平), 计算出  $\chi^2$  的值; 查表可知, 自由度为 1 时, 在 0.05 的显著性水平下的  $\chi^2$  值为 3.84 [ $\chi_{0.05}^2(1)=3.84$ ]. 通过比较  $\chi_c^2$  与  $\chi_{0.05}^2(1)$ , 如果  $\chi_c^2 < \chi_{0.05}^2(1)$ , 则表明假设正确, 所以该基因与耐药性独立, 即该基因的存在与否与耐药性无显著相关性; 如果  $\chi_c^2 > \chi_{0.05}^2(1)$ , 则假设不正确, 表明该基因与耐药性有关联, 即该基因的存在与否与耐药性有显著相关性。

### 1.7 不同产地鱼源无乳链球菌药敏实验检测结果的统计学分析

为了比较各地区分离株耐药率的差异, 应用 Statistic 6.0 软件对数据进行整理分析, 通过方差分析比较各地区分离菌株对抗生素耐药率的显著差异情况。

## 2 结果

### 2.1 疾病症状观察

自然发病鱼的主要症状: 肛门红肿, 鳃盖和鳍条充血。解剖病鱼发现: 体腔中有大量腹水; 胆囊肿大, 肝脏干酪样坏死(图1)。

### 2.2 病原菌分离鉴定

从广东省惠州、肇庆、珠海、湛江 4 个地区的 30 个鱼塘的待检鱼体中共计分分离鉴定获得

111 株无乳链球菌。其中惠州地区 16 株, 肇庆地区 59 株, 珠海地区 2 株, 湛江地区 34 株。约 40.54% 分离自脑, 30.63% 分离自肝脏, 28.83% 分离自肾脏(表 2)。各地区抽检鱼体检测无乳链球菌的阳性率结果中, 惠州地区最高, 为 46.46%; 珠海地区最低, 阳性率为 4.17%; 湛江地区 43.24%, 肇庆地区 17.30%(图 2)。

### 2.3 分离菌株耐药谱

无乳链球菌菌株对 11 种常见抗生素的药敏实验结果显示, 不同地区分离菌株的耐药性存在差异; 湛江地区分离菌株耐药情况最为严重, 对青霉素、庆大霉素、链霉素、新霉素、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶均呈现较高的耐药率 (>80%); 其次为惠州地区, 对青霉素、红霉素、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶均有较高的耐药率 (>80%)。此外, 各地区的分离菌株均对恩诺沙星敏感(图 3)。

### 2.4 耐药基因与耐药性的关系

$\beta$ -内酰胺酶基因在各分离菌株中的分布统计结果显示: 9 个  $\beta$ -内酰胺酶基因在各分离菌株基因组中的分布呈现多样性(图 4)。卡方统计结果显示: 对于氨苄青霉素抗性, 除 SAG0658 外, 其余 8 个基因  $\chi_{0.05}^2(1)$  均小于 3.84, 说明 SAG0658 与氨苄青霉素的抗性有显著相关性, 而其余 8 个基因均与之无显著相关性; 此外, 青霉素抗性 > 9 个  $\beta$ -内酰胺酶基因均无显著相关性(表 3)。

### 2.5 不同区域鱼源无乳链球菌耐药状况比较

比较壮观霉素的耐药情况发现, 惠州和珠海两地的分离菌株对壮观霉素的耐药性皆为 50.00%, 明显高于其他地区; 氨苄青霉素于各地区分离株的耐药状况显示, 珠海地区的耐药率 (50.00%) 明显高于惠州地区 (12.50%), 而其余地区之间耐药率均无显著性差异; 惠州、肇庆、珠海、湛江 4 个地区分离株的青霉素耐药率均较高, 分别为 100.00%、83.05%、100.00% 和 94.12%, 且无显著性差异; 对于庆大霉素, 惠州地区 (81.25%) 明显高于肇庆、珠海和湛江地区, 此外肇庆、珠海和湛江地区分离菌株对庆大霉素均较为敏感 (10.17%、0.00%、17.65%); 对于链霉素, 惠州地区分离菌株耐药率最高 (81.25%), 肇庆地区最低 (13.56%), 这 2 个地区的分离菌株对链霉素的耐药率有显著性差异, 另外肇庆、珠海和湛江三地的分离株之间耐药率无显著性

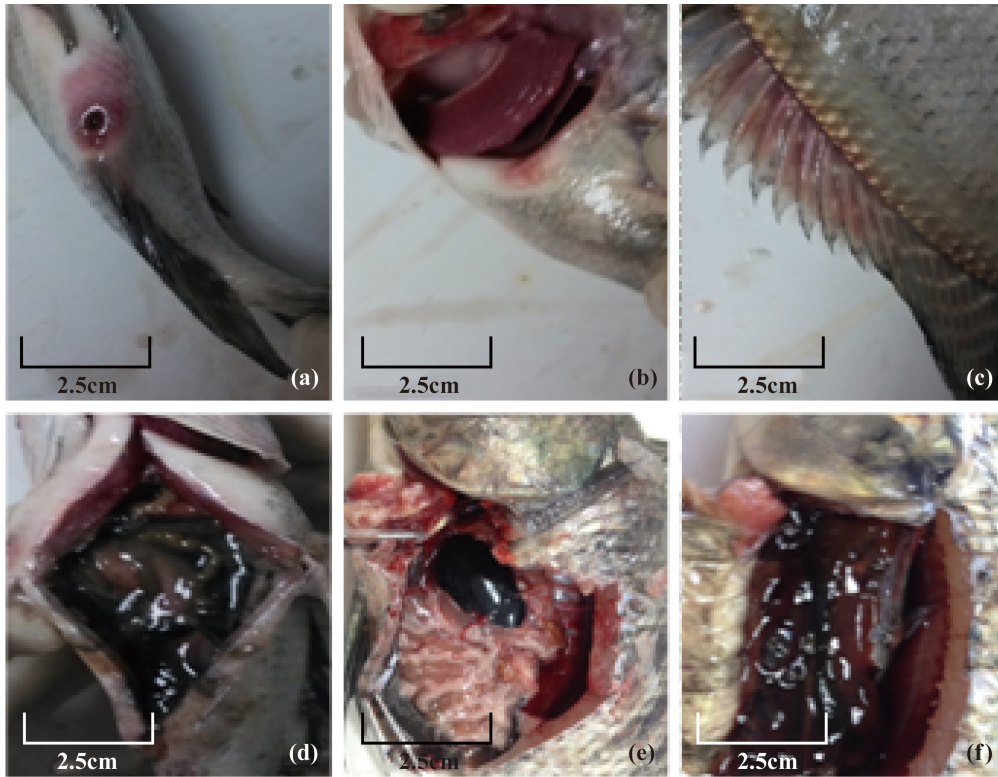


图 1 感染吉富罗非鱼的临床症状

(a)肛门红肿; (b)鳃盖充血; (c)鳍条充血; (d)腹水; (e)胆囊肿大; (f)肝脏干酪样坏死

Fig. 1 Clinical symptoms of GIFT tilapia infected with *S. agalactiae*

(a) anal redness; (b) opercular congestion; (c) fin congestion; (d) ascites; (e) gallbladder enlargement; (f) hepatic cheese-like necrosis

表 2 无乳链球菌的分离情况

Tab. 2 Distribution of the *S. agalactiae* isolates

来源 sources	惠州/尾 Huizhou		肇庆/尾 Zhaoqing			珠海/尾 Zhuhai		湛江/尾 Zhanjiang			分离率/% isolated rate
	博罗 杨村	沥林	鼎湖区	大胜区	端州区	金沙区 平沙镇	石城镇 向县村	河唇镇 河唇村	河唇镇 坡脊村	石城镇 军屯村	
脑 brain	1	5	15	8	4	1	7	1	0	3	40.54
肝脏 liver	1	5	9	3	4	0	2	0	5	5	30.63
肾脏 kidney	1	3	13	2	1	1	3	1	1	6	28.83
总计 total	3	13	37	13	9	2	12	2	6	14	100.00

差异; 对于新霉素, 惠州和湛江地区(81.25%、41.18%)明显高于肇庆和珠海两地(10.17%、0%); 对于红霉素, 湛江地区(91.18%)明显高于其他3个地区; 对于磺胺二甲基嘧啶, 4个地区均呈现较高的耐药率(93.75%、69.49%、100%和82.35%), 且无显著性差异; 对于磺胺对甲氧嘧啶, 肇庆地区(74.58%)明显低于其他三地(93.75%、100%和97.06%); 对于磺胺嘧啶, 湛江和惠州(97.06%、93.75%)明显高于肇庆和珠海两地(76.27%、50%); 对于恩诺沙星, 4个地区的耐药

性均较低(平均耐药率3.99%), 最低可达到0.00%(珠海地区), 且4个地区分离株的耐药率无显著差异。此外, 绝大部分菌株呈现多重耐药(表4)。

### 3 讨论

2001—2007年, 我国南方地区罗非鱼链球菌病的病原主要为海豚链球菌(*S. iniae*)<sup>[9-11]</sup>。张新艳等<sup>[12]</sup>调查显示, 2008年导致我国南方吉富罗非鱼患链球菌病的优势病原为无乳链球菌。本研究对广东省2015年6—9月罗非鱼链球菌病的流行

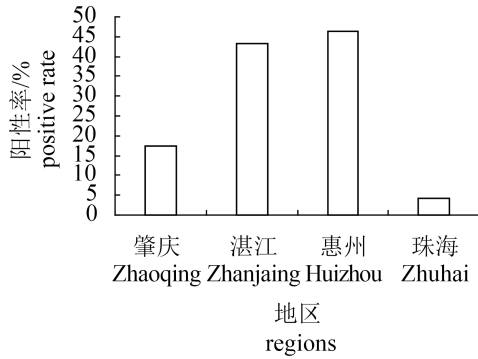


图2 广东省4个主养区无乳链球菌的阳性率

Fig. 2 The positive rate of *S. agalactiae* carried in tilapia cultured in different cities of Guangdong province

病学调查发现, 分离自待检吉富罗非鱼体内的1000余株野生菌株中的111株为无乳链球菌; 此外实验用特异性引物PCR扩增鉴定海豚链球菌, 但并未鉴定获得海豚链球菌, 说明广东地区吉富罗非鱼链球菌病的优势病原为无乳链球菌。药敏实验结果显示, 所有分离菌株对青霉素普遍耐药, 其耐药率为97.06%。另外, 各分离株对恩诺沙星普遍敏感, 其耐药比率为5.88%, 该结果与之前报道无乳链球菌对喹诺酮类药物高度敏感的情况一致<sup>[3, 13-15]</sup>。针对喹诺酮类抗生素, 各地区分离株对恩诺沙星普遍敏感(平均耐药率为3.99%)。另外, 惠州地区的分离菌株对磺胺类药物普遍耐药, 这可能与当地磺胺类药物的过度使用有关。

氨基糖苷类抗生素的作用机制影响细菌蛋白

质合成的全过程, 可抑制初始复合物的合成, 诱导细菌合成错误蛋白质以及阻抑已合成蛋白质的释放, 从而导致细菌死亡<sup>[16]</sup>。对于同为氨基糖苷类抗生素的庆大霉素、链霉素、新霉素, 它们表现出的耐药性具有一定的相似性。惠州地区对这3种氨基糖苷类抗生素的耐药性均为81.25%, 为4个地区中耐药性最高的地区。实验发现惠州地区分离菌株对庆大霉素的耐药性与其他3个地区有显著性差异, 对链霉素的耐药性与肇庆地区有显著性差异, 惠州地区与湛江地区分离菌株对新霉素的耐药性与肇庆分离菌株地区和珠江地区有显著性差异。也即惠州地区分离菌株对氨基糖苷类抗生素的耐药性与其他地区有显著性差异。大环内酯类药物能结合到细菌核糖体的50S亚基上, 通过阻断转肽作用及mRNA位移, 选择性抑制蛋白质合成<sup>[17]</sup>。在本研究的结果中, 红霉素的耐药性在各地区中展现了较显著的差异性, 耐药性最高的湛江地区可达到91.18%的耐药率, 耐药性最低的惠州地区耐药率仅为12.50%, 且耐药性最高的地区对红霉素的耐药性与其他3个地区之间有较为显著的差异性。磺胺类药物能够影响二氢叶酸的合成, 使细菌的生长和繁殖受到抑制<sup>[18]</sup>。在本研究中, 分离菌株在4个地区对磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶均表现为普遍耐药, 最高地区的耐药率可达到100%; 肇庆地区对磺胺对甲氧嘧啶的耐药率显著低于其他3个地区。喹诺酮类药物能够抑制细菌DNA的螺旋酶和拓扑异构

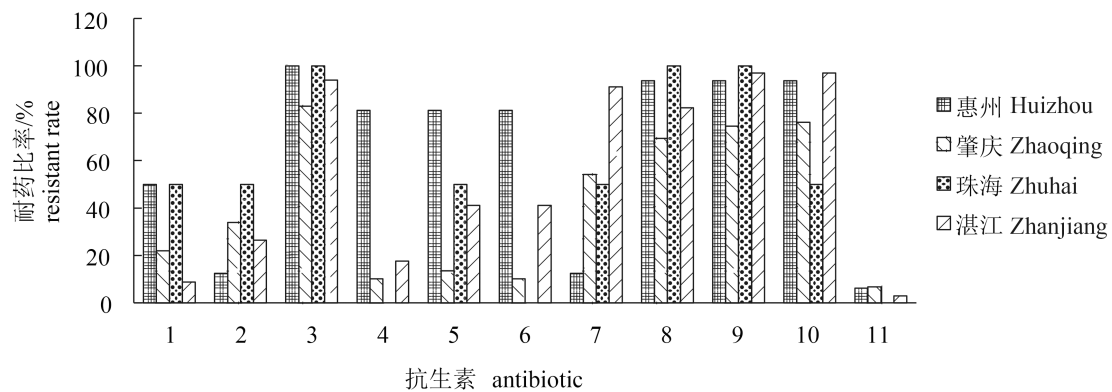


图3 无乳链球菌药敏实验结果

1. 壮观霉素; 2. 氨苄青霉素; 3. 青霉素; 4. 庆大霉素; 5. 链霉素; 6. 新霉素; 7. 红霉素; 8. 磺胺二甲基嘧啶; 9. 磺胺对甲氧嘧啶; 10. 磺胺嘧啶; 11. 恩诺沙星

Fig. 3 Results of antibiotic sensitivity of *S. agalactiae* isolates

1. spectactular mycin; 2. ampicillin; 3. penicillin; 4. gentamicin; 5. streptomycin; 6. neomycin; 7. erythromycin; 8. sulfamethazine; 9. sulfamethoxydiazine; 10. sulfadiazine; 11. enrofloxacin

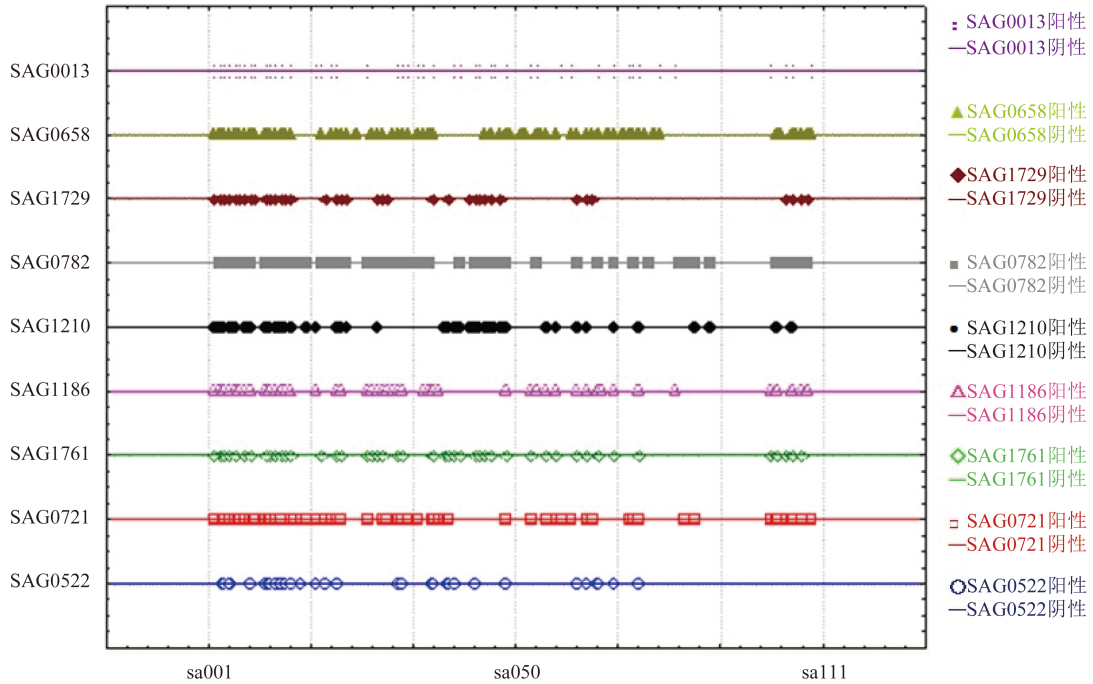


图 4 β-内酰胺酶基因在各分离菌株中的分布

纵坐标分别代表无乳链球菌中9个β-内酰胺酶基因；横坐标代表菌株名(sa001~sa111)

Fig. 4 The distribution of beta-lactamase genes in different isolates

Y-axis represents nine beta-lactamase genes of *S. agalactiae*; X-axis represents the names of isolates (sa001-sa111)

表 3 耐药基因与青霉素耐药性的关系

Tab. 3 Relationship between resistant genes and antibiotic resistance to penicillin

卡方值 the value of $\chi_c^2$	氨苄青霉素 ampicillin	$\chi_c^2$					
		$\chi_{0.05}^2(1)$	是否显著相关 significant or not	青霉素 penicillin	$\chi_{0.05}^2(1)$	是否显著相关 significant or not	
β-内酰胺酶基因 beta-lactamase genes	SAG0522	0.24	3.84	否	0.25	3.84	否
	SAG0721	0.11	3.84	否	0.39	3.84	否
	SAG1761	0.86	3.84	否	1.48	3.84	否
	SAG1186	0.65	3.84	否	1.66	3.84	否
	SAG1210	0.15	3.84	否	0.29	3.84	否
	SAG0782	0.00	3.84	否	2.04	3.84	否
	SAG1729	2.70	3.84	否	0.21	3.84	否
	SAG0658	4.70	3.84	是	1.35	3.84	否
	SAG0013	0.04	3.84	否	0.01	3.84	否

酶IV活性，从而表现出抗菌作用<sup>[19]</sup>。β-内酰胺酶类抗生素能够抑制细胞壁粘肽合成酶，从而阻止细胞壁粘肽的合成，促发菌体自溶酶活性，使细胞溶解<sup>[20]</sup>。实验发现，本研究的分离菌株对不同类型的β-内酰胺酶类抗生素耐药率差异明显，各地区分离菌株对氨苄青霉素的平均耐药率仅为30.72%，而对青霉素的平均耐药率高达

94.29%。

细菌对青霉素类药物的耐药性主要依靠2种方式：一是通过生产β-内酰胺酶等水解青霉素药物的β-内酰胺环；二是改变青霉素结合蛋白 (penicillin-binding proteins, PBPs) 的结构，使青霉素药物不能有效作用于靶点<sup>[21]</sup>。由PBPs介导的无乳链球菌青霉素耐药机制此前已有报道：由

表 4 不同产地鱼源无乳链球菌耐药率比较

Tab. 4 Comparison of antibiotic resistance of *S. agalactiae* isolated from fishes in different places

	壮观霉素 spectinomycin	氨苄青霉素 ampicillin	青霉素 penicillin	庆大霉素 gentamicin	链霉素 streptomycin	新霉素 neomycin
惠州 Huizhou	50.00 <sup>a</sup>	12.50 <sup>b</sup>	100.00 <sup>a</sup>	81.25 <sup>a</sup>	81.25 <sup>a</sup>	81.25 <sup>a</sup>
肇庆 Zhaoqing	22.03 <sup>b</sup>	33.90 <sup>ab</sup>	83.05 <sup>a</sup>	10.17 <sup>b</sup>	13.56 <sup>b</sup>	10.17 <sup>b</sup>
珠海 Zhuhai	50.00 <sup>a</sup>	50.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	50.00 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>b</sup>
湛江 Zhanjiang	8.82 <sup>b</sup>	26.47 <sup>ab</sup>	94.12 <sup>a</sup>	17.65 <sup>b</sup>	41.18 <sup>ab</sup>	41.18 <sup>a</sup>
均值 average value	32.71	30.72	94.29	27.27	46.50	33.15
	红霉素 erythromycin	磺胺二甲基嘧啶 sulfamethazine	磺胺对甲氧嘧啶 sulfamethoxydiazine	磺胺嘧啶 sulfadiazine	恩诺沙星 enrofloxacin	
惠州 Huizhou	12.50 <sup>b</sup>	93.75 <sup>a</sup>	93.75 <sup>a</sup>	93.75 <sup>a</sup>	6.25 <sup>a</sup>	
肇庆 Zhaoqing	54.24 <sup>b</sup>	69.49 <sup>a</sup>	74.58 <sup>b</sup>	76.27 <sup>b</sup>	6.78 <sup>a</sup>	
珠海 Zhuhai	50.00 <sup>b</sup>	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	50.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	
湛江 Zhanjiang	91.18 <sup>a</sup>	82.35 <sup>a</sup>	97.06 <sup>a</sup>	97.06 <sup>a</sup>	2.94 <sup>a</sup>	
均值 average value	51.98	86.40	91.35	79.27	3.99	

注: 不同字母代表水平之间差异显著, 相同字母代表水平之间差异不显著 ( $P < 0.05$ )

Notes: different letters represent significant difference between different levels, labeled with the same letter represents no significant difference ( $P < 0.05$ )

于耐药菌株的PBPs氨基酸发生突变, 导致其构象改变, 使青霉素药物无法结合, 从而产生耐药性, 其中PBP蛋白家族中的pbp2x对青霉素的耐药性起主要作用<sup>[22]</sup>。本研究则主要从 $\beta$ -内酰胺酶介导的青霉素耐药角度来探讨菌株中 $\beta$ -内酰胺酶基因的分布情况与菌株青霉素耐药性的关系。根据NCBI中GenBank公布的无乳链球菌基因组序列, 实验检测了9个 $\beta$ -内酰胺酶基因在各分离菌株中的分布情况, 结果显示 $\beta$ -内酰胺酶基因在各分离菌株中的分布情况呈现多样性。通过统计分析, 实验发现SAG0658基因与氨苄青霉素抗性显著相关, 而其余8个 $\beta$ -内酰胺酶基因与氨苄青霉素的抗性无显著相关性, 且这9个基因与青霉素的抗性均无显著相关性。提示无乳链球菌SAG0658基因在抵抗青霉素类药物作用的过程中发挥重要作用。此外, 本研究中的各分离菌株对青霉素普遍耐药, 而对氨苄青霉素普遍敏感。造成这一结果的原因推测有两点: ①青霉素和氨苄青霉素的化学结构上有区别, 导致 $\beta$ -内酰胺酶对这2种药物作用效果不同; ②可能是由于分离菌株的PBPs结构发生改变, 导致药物无法有效作用至靶点。这一现象在粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 中已被证实: 粪肠球菌

*pbp4*基因上第573位的天冬氨酸突变为谷氨酸 (Asp-573→Glu), 导致青霉素的结合能力降低, 而对氨苄青霉素的结合影响不大<sup>[23]</sup>。在本研究中, 无乳链球菌分离菌株对氨苄青霉素和青霉素所呈现的不同耐药表型是否与以上机制相同尚需进一步研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Edwards M S. Issues of antimicrobial resistance in group B *Streptococcus* in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis [J]. *Seminars Pediatric Infectious Disease*, 2006, 17(3): 149–152.
- [2] Chen M, Li L P, Wang R, *et al.* PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3–4): 526–530.
- [3] Johri A K, Paoletti L C, Glaser P, *et al.* Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(12): 932–942.
- [4] Martin T R, Ruzinski J T, Rubens C E, *et al.* The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B *Streptococci* from the lungs of infant and

- adult rats [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1992, 165(2): 306–314.
- [5] 李来好, 杨贤庆, 郝淑贤, 等. 罗非鱼、南美白对虾体内药残状况研究[J]. *南方水产*, 2005, 1(1): 43–48.
- Li L H, Yang X Q, Hao S X, *et al.* Study for residues of fishery chemotherapeutic agents in tilapia and *Litopenaeus vannamei* [J]. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(1): 43–48 (in Chinese).
- [6] Wang X J, Minasov G, Shoichet B K. Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(1): 85–95.
- [7] 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.
- Li J, Ye X, Lu M X, *et al.* Rapid identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* with duplex PCR assay [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2010, 36(4): 449–452 (in Chinese).
- [8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24 [J]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- [9] 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.
- Chai J Q, Ding Q L, Wang Z L, *et al.* Isolation and identification of tilapia *Streptococcus* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2002, 24(1): 18–20 (in Chinese).
- [10] 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.
- Li B, Chen M, Li L P, *et al.* Biochemistry identification and drug sensitivity test of pathogenic *Streptococcus* from tilapia in Guangxi [J]. *Chinese Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35(10): 93–95 (in Chinese).
- [11] Zhou S M, Zhu M Q, Ma Y, *et al.* Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(11): 869–875.
- [12] 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 772–779.
- Zhang X Y, Fan H P, Zhong Q F, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 772–779 (in Chinese).
- [13] 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.
- Tan J J, Chen C F, Gao Y, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Streptococcus agalactiae* from hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(6): 745–751 (in Chinese).
- [14] 白龙, 郝永清, 范利霞, 等. 奶牛乳腺炎无乳链球菌的分离鉴定[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(1): 96–97.
- Bai L, Hao Y Q, Fan L X, *et al.* Isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from mastitis-affected cows [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(1): 96–97 (in Chinese).
- [15] 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离、鉴定与致病性[J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 22–27.
- Ke J, Zhao F, Luo L, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of pathogenic bacteria of fulminant disease of tilapia in Guangdong Province [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 22–27 (in Chinese).
- [16] Stogios P J, Spanogiannopoulos P, Evdokimova E, *et al.* Structure-guided optimization of protein kinase inhibitors reverses aminoglycoside antibiotic resistance [J]. *Biochemical Journal*, 2013, 454(2): 191–200.
- [17] Liang J H, Han X. Structure-activity relationships and mechanism of action of macrolides derived from erythromycin as antibacterial agents [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(24): 3131–3164.
- [18] Jovanović M, Stojanović B J. Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1301: 27–37.
- [19] Cui S F, Peng L P, Zhang H Z, *et al.* Novel hybrids of metronidazole and quinolones: synthesis, bioactive evaluation, cytotoxicity, preliminary antimicrobial



- mechanism and effect of metal ions on their transportation by human serum albumin [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 86: 318–334.
- [20] Knox J R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39(12): 2593–2601.
- [21] Goffin C, Ghuysen J M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(4): 1079–1093.
- [22] Nagano N, Nagano Y, Kimura K, *et al.* Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B *Streptococci* with reduced penicillin susceptibility [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(12): 4258–4267.
- [23] Conceição N, Da Silva L E P, Da Costa Darini A L, *et al.* Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 28: 289–295.

## Epidemic and antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) in Guangdong Province

WEI Shun<sup>1\*</sup>, ZHANG Ze<sup>1</sup>, LI Yuhui<sup>1</sup>, HU Minqiang<sup>1</sup>, YU Angen<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>,  
LAN Jiangfeng<sup>1</sup>, ZHANG Zhi<sup>3</sup>, YAN Yuanyi<sup>3</sup>, LIN Li<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 510000, China)

**Abstract:** In order to investigate the epidemic and the antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) cultured in Huizhou, Zhaoqing, Zhuhai, Zhanjiang cities of Guangdong province, the relationship between beta-lactamase gene and the resistance to penicillin in *S. agalactiae* was further analyzed. Isolates were identified by amplified specific gene *cfb* and 16s rDNA; In this study, k-b method was adopted to determine the antimicrobial sensitivity of isolates; the distribution of beta-lactamase gene in strains was detected by PCR assay; and the relationship between beta-lactamase gene and penicillin drugs was analyzed by statistic 6.0. The results showed that the ranking of positive rate of *S. agalactiae* carried in tilapia was: Huizhou (46.46%) > Zhanjiang (43.24%) > Zhaoqing (17.30%) > Zhuhai (4.17%). Drug sensitive tests showed that all isolates from the four cities were highly resistant to penicillin (with the resistant rate of 94.29%) and sulfamethazine (with the resistant rate of 86.40%), but were sensitive to enrofloxacin (with the resistant rate of only 3.99%). The diversity of the 9 beta-lactamase genes was highly distributed in the isolates. The relevance between the beta-lactamase genes and antibiotic resistance showed that the *SAG0658* was significantly correlated with the resistance to ampicillin, suggesting that the *SAG0658* might play an important role in the resistance of *S. agalactiae* to ampicillin. However, there was no significant correlation between the nine beta-lactamase genes and the resistance to penicillin, indicating that there might be other mechanisms underlying the resistance of *S. agalactiae* to penicillin.

**Key words:** GIFT *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; drug sensitive test; antibiotic resistant gene

**Corresponding author:** WEI Shun. E-mail: weishun@mail.hzau.edu.cn; LIN Li. E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Hubei Province, China (4006-36114036); Seed Foundation of Huazhong Agricultural University ((2013py069, 2014QC017, 2014py035); Undergraduate Innovation Fund Project by Huazhong Agricultural University (2015BC003)