

文章编号: 1000-0615(2018)04-0586-10

DOI: 10.11964/jfc.20170410791

## 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

熊向英, 黄国强\*, 王志成, 文雪

(广西海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

**摘要:** 为了解近年来广西卵形鲳鲹海豚链球菌流行菌株的基因型信息以及菌株间的差异, 对2015—2016年从广西地区7个养殖场的患病卵形鲳鲹体内分离得到的17株海豚链球菌菌株分别进行了基因型分析、耐药谱测定以及毒力基因检测。采用随机扩增多态性DNA标记技术(RAPD)和基因组重复序列PCR(rep-PCR)分析其基因型。结果显示, RAPD和rep-PCR指纹图谱结果一致, 17株海豚链球菌可分为2种基因型。对海豚链球菌7种主要的毒力相关基因特异PCR检测, 所有菌株均为 $simA^+scpI^+pdi^+sagA^+cpsD^+pgmA^+cfl^+$ 毒力基因型, 表明这2种基因型的海豚链球菌似乎均为毒力较强的菌株。采用K-B法进行了20种抗生素敏感实验分析其耐药谱, 结果表明归于基因1型的菌株耐药谱为AZT, 基因2型菌株则出现3种相似的耐药谱, 分别为SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB、SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/CRO和SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB/RIF, 证实基因型相同的菌株耐药谱型也相似, 2种基因型的菌株耐药谱型差异显著, 因此基因型和耐药谱型存在相关性。此结果为卵形鲳鲹海豚链球菌病流行病学研究、疫苗研制以及疫病监测提供理论依据。

**关键词:** 卵形鲳鲹; 海豚链球菌; 基因分型; 毒力基因; 耐药谱; 广西

**中图分类号:** S 941.42

**文献标志码:** A

海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)能引起多种野生和养殖经济鱼类患链球菌病<sup>[1-2]</sup>, 给世界水产养殖业造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>, 而且海豚链球菌已经威胁到人类的健康与安全, 目前已有多例人因接触病鱼而感染的报道<sup>[4-5]</sup>。海豚链球菌与同属的其他链球菌不同, 它不能用传统的Lancefield链球菌血清型的分型方法进行分型<sup>[6]</sup>。由于链球菌同种同群菌株分型复杂, 血清型众多且各亚群致病特点、毒力强弱均有所不同, 使得当前链球菌疫情原因尚无科学定论。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)是一种暖水性中上层鱼类, 在印度洋、太平洋和大西洋的温带、热带海域均有分布<sup>[7]</sup>。因卵形鲳鲹是优质的食用鱼类, 近年来逐渐成为广西地区海水网箱

养殖主要品种之一。本实验室在对卵形鲳鲹病害调查中发现其在养殖过程中长期受海豚链球菌的困扰, 表现症状为肠道内有大量黄白色脓状物, 脑干发红, 鳃盖出血, 部分病鱼眼球突出。目前有关卵形鲳鲹海豚链球菌的研究仅局限于个别病例的病原鉴定、PCR检测方法、16S rRNA序列亲缘关系分析<sup>[8-9]</sup>, 但这些研究均不能解释卵形鲳鲹海豚链球菌流行菌株之间是否存在差异, 以及菌株是否发生变异等问题。本研究通过对卵形鲳鲹海豚链球菌进行RAPD和rep-PCR基因型、耐药谱型分析以及毒力基因的检测, 对菌株进行更详细更精确地区分, 旨在查明其分子流行病学特征, 为疫苗研制、疾病监控以及探索其起源并监测今后可能的变异提供理论依据。

收稿日期: 2017-04-14 修回日期: 2017-06-16

资助项目: 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139088); 广西科学院基本科研业务费专项(15YJ22HYS14); 广西科技计划项目(桂科AB16380167)

通信作者: 黄国强, E-mail: hugh7531@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

DNA提取试剂盒MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit、PCR试剂(10×PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶)、2 000 DNA Marker购自大连宝生物工程有限公司;药敏纸片和生化反应管购自杭州滨和微生物试剂有限公司;血平板购自广东环凯微生物科技有限公司。

BHI培养基:1000 mL水中加入24.5 g脑心浸出液肉汤、10 g酵母粉、2 g葡萄糖,固体培养基加30 g琼脂,121 °C高压灭菌20 min。

### 1.2 海豚链球菌的分离纯化

2015—2016年在广西各养殖场采集到患病卵形鲳鲹,无菌条件下,分别取患病卵形鲳鲹的脑、肝脏、脾脏和肾脏组织接种于BHI平板上,于30 °C下恒温培养24~48 h,挑取优势单菌落在血平板上再次划线分离纯化。病原菌菌株信息见表1(表中养殖场都是当地一些小型养殖

场,没有名称,故用数字编号代替)。

### 1.3 海豚链球菌生理生化鉴定及培养特性观察

采用血平板和生化鉴定管,参照《伯杰氏系统细菌学手册》<sup>[10]</sup>,按照细菌微量生化鉴定管的说明进行操作,分别测定病原菌的溶血、生长、水解活性、产酸和酶活性等特征。

### 1.4 海豚链球菌DNA提取

挑单菌落于BHI液体培养基中,28 °C下振荡培养24~48 h后,按照MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit试剂盒(TaKaRa, Japan)说明书提取细菌基因组DNA,提取后保存至-20 °C备用。

### 1.5 海豚链球菌的基因型

病原菌的RAPD分型,以p14 5'-GATCAA GTCC-3'<sup>[11]</sup>为引物,对17株海豚链球菌进行随机扩增,25 μL反应体系中含1.0 μL模板DNA,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.4 mmol/L dNTPs,16 ng引物,1 U *Taq* DNA聚合酶,2.5 μL 10×PCR缓冲

表1 患病卵形鲳鲹中分离的海豚链球菌的信息

Tab. 1 The information of *S. iniae* isolated from diseased *T. ovatus*

| 序号<br>no. | 菌株<br>strain | 养殖场<br>area | 分离器官<br>organ | 日期<br>date | RAPD基因型<br>RAPD pattern | rep-PCR基因型<br>rep-PCR pattern |
|-----------|--------------|-------------|---------------|------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1         | BH15-2       | no.1        | 肝 liver       | 2015-07    | A                       | 1                             |
| 2         | BH16-14      | no.2        | 脑 brain       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 3         | BH16-15      | no.2        | 脾 spleen      | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 4         | BH16-16      | no.2        | 肝 liver       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 5         | BH16-17      | no.3        | 脑 brain       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 6         | BH16-18      | no.3        | 肝 liver       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 7         | BH16-21      | no.4        | 脑 brain       | 2016-07    | B                       | 2                             |
| 8         | BH16-22      | no.4        | 肠 intestine   | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 9         | BH16-23      | no.4        | 肝 liver       | 2016-07    | B                       | 2                             |
| 10        | BH16-24      | no.4        | 肝 liver       | 2016-07    | B                       | 2                             |
| 11        | BH16-25      | no.5        | 脑 brain       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 12        | BH16-26      | no.5        | 肝 liver       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 13        | BH16-27      | no.5        | 肠 intestine   | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 14        | BH16-28      | no.6        | 肠 intestine   | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 15        | BH16-29      | no.6        | 脑 brain       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 16        | BH16-30      | no.6        | 肝 liver       | 2016-07    | A                       | 1                             |
| 17        | BH16-31      | no.7        | 肝 liver       | 2016-07    | A                       | 1                             |

液。PCR反应条件：95 °C预变性5 min；95 °C变性30 s，38 °C退火1 min，72 °C延伸1 min，30个循环；72 °C延伸10 min。基因组重复序列PCR (rep-PCR)参照Malathum等<sup>[12]</sup>的方法，以BoxA2R 5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3'为引物，PCR反应条件：95 °C预变性7 min，90 °C变性0.5 min，40 °C退火1 min，65 °C延伸8 min，35个循环；65 °C延伸16 min。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶90 V电泳20 min，溴化乙锭染色，凝胶成像系统观察、拍照。

### 1.6 海豚链球菌的主要毒力基因PCR检测

通过PCR扩增检测分离菌株的毒力相关基因，如*scpI* (C5a肽酶)、*simA* (M蛋白)、*cpsD* (荚膜多糖)、*sagA* (细胞溶血素)、*pdi* (脱乙酰基酶)、*pgmA* (葡萄糖磷酸变位酶)和*cfi* (CAMP因子)等，其中*pgmA*和*cfi*的扩增分别根据GenBank中海豚链球菌特异性毒力基因*pgmA*序列 (GenBank序列号AY846302)、*cfi*序列 (GenBank序列号KC132870)设计引物，其余基因参照Baums等<sup>[13]</sup>的方法设计引物进行多重PCR扩增 (表2)。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，溴化乙锭染色，凝胶成像系统观察、拍照，并随机挑选任意2株菌的*cfi*和*pgmA*基因的PCR产物通过测序验证，测序由广州英潍捷基有限公司完成。

### 1.7 不同基因型海豚链球菌的耐药谱

按照NCCL试验操作标准，分别选取不同基因型的海豚链球菌代表菌株，取100 μL菌悬液 (浓度约为10<sup>8</sup> cfu/mL)均匀涂布于BHI固体培养基，10 min后贴药敏纸片，于28 °C倒置培养24 h后观察，并测量抑菌圈的直径，按照产品说明书判断菌株的耐药性。

## 2 结果

### 2.1 海豚链球菌的表型特征及生理生化反应

病原菌在BHI平板上形成圆形、乳白色、微隆起、边缘齐整、表面光滑、直径约为0.5~1.0 mm大小的菌落。光学显微镜下观察革兰氏染色的细菌，成紫色链状排列。生理生化反应显示所有菌株革兰氏染色均为阳性，呈β溶血，10 °C、45 °C、pH 9.6和40%胆汁中不生长，多数菌株能在6.5% NaCl中生长，能水解七叶苷和马尿酸，发酵菊糖、甘露醇、水杨苷和海藻糖，精氨酸双水解酶、乳糖、核糖、V-P试验、尿素酶等呈阴性，不能产生β-半乳糖苷酶 (表3)。

### 2.2 海豚链球菌的基因型

根据随机扩增多态性DNA标记对17株海豚链球菌进行基因分型的结果，17株菌可分为2种

表2 海豚链球菌相关毒力基因的引物序列及预期扩增片段大小

Tab. 2 Primer sequences of virulence-related gene of *S. iniae* and the expected amplicon size

| 引物名称<br>primer | 引物序列(5'-3')<br>sequence | 目的条带/bp<br>product size | 基因<br>gene  | 退火温度/°C<br>annealing temp | 文献<br>reference |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------|-----------------|
| <i>scpI</i> -F | GCAACGGGTTGTCAAAAATC    | 822                     | <i>scpI</i> |                           |                 |
| <i>scpI</i> -R | GAGCAAAGGAGTTGCTTGG     |                         |             |                           |                 |
| <i>simA</i> -F | AATTCGCTCAGCAGGTCTTG    | 994                     | <i>simA</i> |                           |                 |
| <i>simA</i> -R | AACCATAACCGGATAGCAC     |                         |             |                           |                 |
| <i>pdi</i> -F  | TTTCGACGACAGCATGATTG    | 381                     | <i>pdi</i>  | 58                        | [13]            |
| <i>pdi</i> -R  | GCTAGCAAGGCCTTCATTG     |                         |             |                           |                 |
| <i>sagA</i> -F | AGGAGGTAAGCGTTATGTTAC   | 190                     | <i>sagA</i> |                           |                 |
| <i>sagA</i> -R | AAGAAGTGAATTACTTTGG     |                         |             |                           |                 |
| <i>cpsD</i> -F | TGGTGAAGGAAAGTCAACCAC   | 534                     | <i>cpsD</i> |                           |                 |
| <i>cpsD</i> -R | TCTCCGTAGGAACCGTAAGC    |                         |             |                           |                 |
| <i>pgmA</i> -F | AGACGGGTCACAGACTACAT    | 949                     | <i>pgmA</i> | 60                        | 本文              |
| <i>pgmA</i> -R | AGGAGCACTTTGACGGAATT    |                         |             |                           |                 |
| <i>cfi</i> -F  | GTGCCTCAACATCAACA       | 328                     | <i>cfi</i>  | 60                        | 本文              |
| <i>cfi</i> -R  | TAGCAAATCCCATATCAA      |                         |             |                           |                 |

表 3 分离菌株的生理生化特征

Tab. 3 The physiological and biochemical characteristics of the isolates

| 项目 item                           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 革兰氏染色 Gram stain                  | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| <b>生长 growth</b>                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 10 °C                             | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 45 °C                             | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| pH 9.6                            | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 6.5% NaCl                         | + | w | w | + | + | w | + | w | + | +  | w  | w  | -  | +  | +  | +  | w  |
| 40%胆汁 40% bile                    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 溶血 haemolysis                     | β | β | β | β | β | β | β | β | β | β  | β  | β  | β  | β  | β  | β  | β  |
| <b>水解 hydrolysis</b>              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 精氨酸 arginine                      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 马尿酸 hippurate                     | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 七叶苷 esculin                       | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| <b>产酸 acid from</b>               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 菊糖 inulin                         | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 乳糖 lactose                        | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 甘露醇 mannitol                      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 棉籽糖 raffinose                     | - | - | - | - | - | - | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 核糖 ribose                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 水杨苷 salicin                       | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 山梨醇 sorbitol                      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 海藻糖 fucose                        | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| <b>其他 others</b>                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| β-半乳糖苷酶 β-galactosidase           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| 吡咯烷基芳酰胺酶 pyrrolidonyl arylamidase | + | + | + | - | + | - | - | - | - | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| V-P试验 V-P test                    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 尿素酶 urease                        | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 甲基红 MR test                       | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| N-乙酰葡萄糖胺 N-acet-glucosamine       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

注: +. 阳性; -. 阴性; w. 弱反应; β. β溶血; 1~17分别代表菌株BH15-2, BH16-14, BH16-15, BH16-16, BH16-17, BH16-18, BH16-21, BH16-22, BH16-23, BH16-24, BH16-25, BH16-26, BH16-27, BH16-28, BH16-29, BH16-30, BH16-31, 下同

Notes: +. positive; -. negative; w. weak; β. beta-hemolytic; 1-17 represent *S. iniae* strains BH15-2, BH16-14, BH16-15, BH16-16, BH16-17, BH16-18, BH16-21, BH16-22, BH16-23, BH16-24, BH16-25, BH16-26, BH16-27, BH16-28, BH16-29, BH16-30, BH16-31, respectively, the same below

指定的基因型: A型和B型, 其中BH16-21、BH16-23、BH16-24属于B型, B型共出现了5条明显条带, A型出现的4条明显条带为同源片段(图1)。另外所有菌株均在750 bp处出现特异条带。基因组重复序列PCR电泳图谱见图2, 根据条带数目和位置完全相同为同一基因型的分型方法, 可将17株海豚链球菌分为2种指定的基因型, 其中1型14株, 2型3株(菌株BH16-21、BH16-23、BH16-24), 2型共出现了6条明显条带, 1型的5条

明显条带为两种基因型的同源片段。2种基因型的海豚链球菌存在于同一个养殖场(表1)。Rep-PCR分型的结果与RAPD分型结果一致。

### 2.3 海豚链球菌主要毒力基因的PCR检测

对分离的17株海豚链球菌*scpI*、*simA*、*cpsD*、*sagA*、*pdi* 5种毒力基因进行多重PCR检测, 以及*cfi*和*pgm* 2种毒力基因的PCR扩增, 结果显示所有菌株均扩增出*scpI*基因822 bp、*simA*基因994

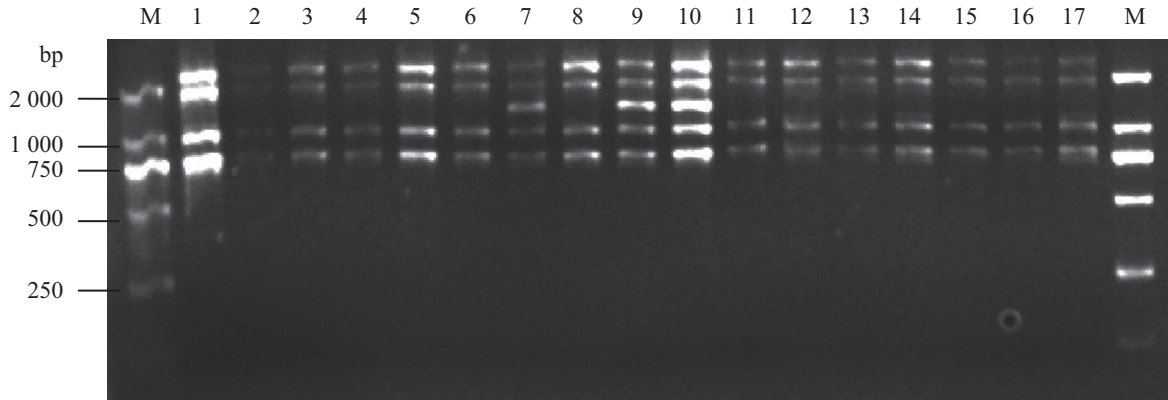


图1 RAPD分析海豚链球菌指纹图谱

M为标准物质2 000, 下同

Fig. 1 RAPD patterns of *S. iniae*

M represents a 2 000 DNA size maker, the same below

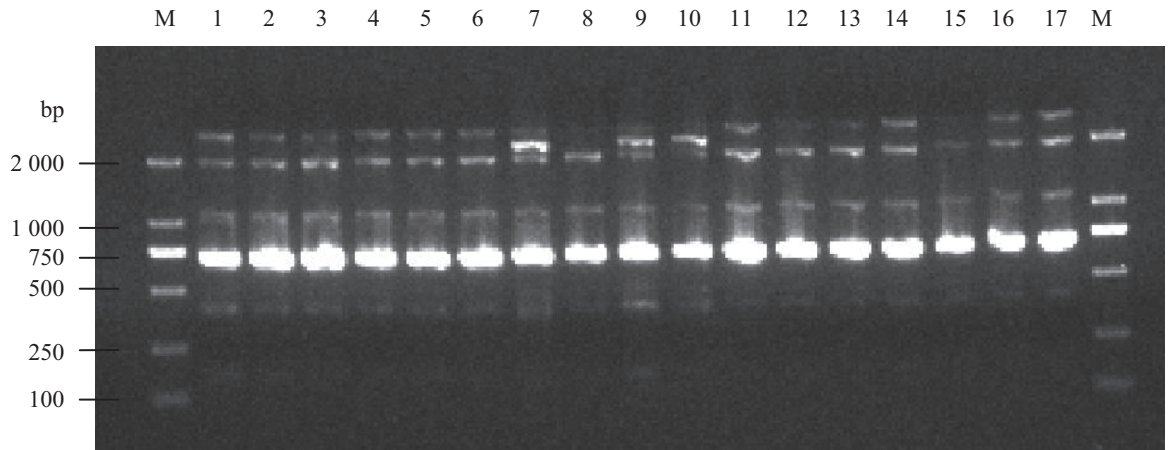


图2 Rep-PCR分析海豚链球菌的指纹图谱

Fig. 2 Rep-PCR patterns of *S. iniae*

bp、*cpsD*基因534 bp、*sagA*基因190 bp、*pdi*基因381 bp、*cfi*基因328 bp、*pgm*基因949 bp预期大小片段的条带, 随机挑选的2株菌BH16-17和BH16-23的*cfi*基因以及*pgmA*基因的PCR产物经过测序、比对, 分析表明这2株菌*cfi*基因序列与已报道的海豚链球菌*cfi*基因序列(NCBI序列号: KC132 870)相似性为99%, *pgmA*基因序列与已报道的海豚链球菌*pgmA*基因序列(NCBI序列号: AY846 302)相似性为99%, 表明分离菌株都含有这7种主要的毒力因子(图3, 4, 5)。

#### 2.4 不同基因型的海豚链球菌的耐药谱

两种不同基因型的海豚链球菌对20种常见抗生素的药敏实验结果表明, 不同基因型的海豚链球菌的耐药性差异显著, 基因1型的菌株耐

药谱为AZT, 基因2型出现3种相似的多重耐药谱(耐3类及以上抗生素), 分别为SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB、SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/CRO和SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB/RIF, 基因2型的菌株耐药情况较为严重(表4)。

### 3 讨论

#### 3.1 卵形鲳鲹海豚链球菌的生理生化特征

海豚链球菌不同的地理株在生理生化特性上存在一定差异, 不同株的精氨酸双水解酶活性、乳糖和水杨苷发酵能力不同<sup>[14]</sup>, 且存在 $\alpha$ 和 $\beta$ 2种溶血类型<sup>[4]</sup>。本研究中的菌株精氨酸水解酶活性为阴性, 菊糖、马尿酸和甘露醇为阳性, Cai等<sup>[9]</sup>同样从卵形鲳鲹体内分离到的海豚链球菌

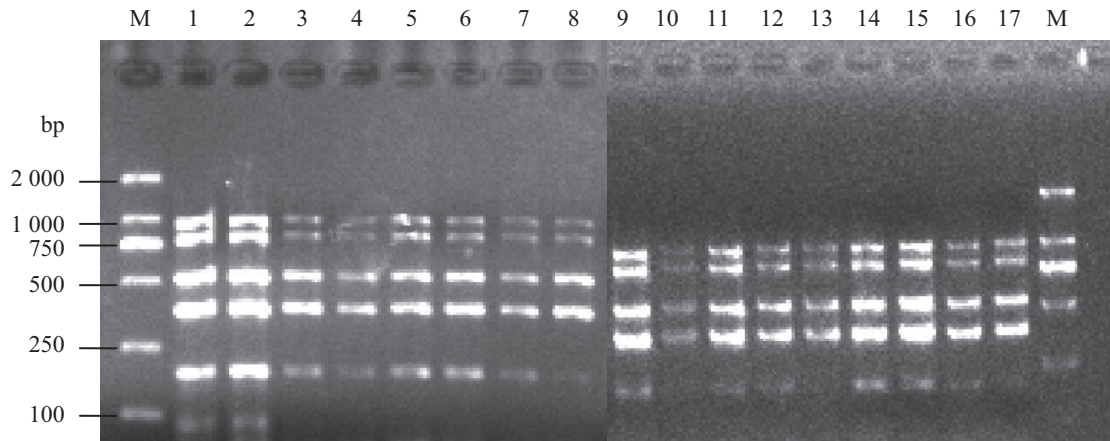


图 3 海豚链球菌毒力基因的多重PCR检测

Fig. 3 Multiplex PCR analysis of *S. iniae* for five virulence factors test

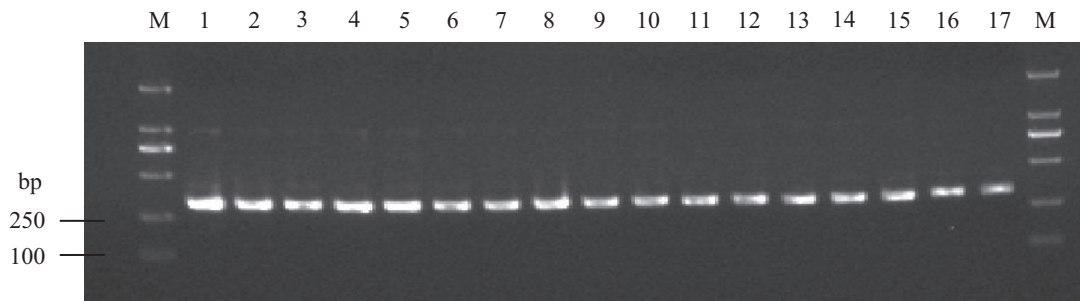


图 4 海豚链球菌 *cfi* 毒力基因的PCR检测

Fig. 4 PCR analysis of *S. iniae* for the virulence gene of *cfi*

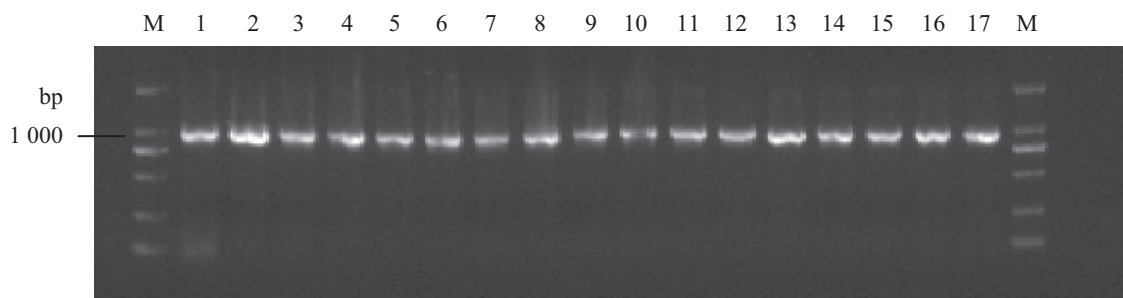


图 5 海豚链球菌 *pgmA* 毒力基因的PCR检测

Fig. 5 PCR analysis of *S. iniae* for the virulence gene of *pgmA*

的以上项目呈现相反的结果; Zhou等<sup>[15]</sup>所分离自不同宿主的26株海豚链球菌马尿酸和菊糖为阴性, 精氨酸水解酶和核糖为阳性。出现这种现象的原因有多种, 不同宿主、不同地理环境的菌株生理生化特性存在差异, 也可能与研究人员的主观判断误差或受试菌株数量有限相关。

### 3.2 卵形鲳鲹海豚链球菌的基因型分析

Kim等<sup>[16]</sup>通过RAPD和rep-PCR方法把29株分

离于褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的海豚链球菌分成2种基因型, 其中基因1型表现出更高的致病性。Pereira等<sup>[17]</sup>用PFGE方法对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)链球菌临床菌株分型, 发现同一养殖场可分离到不同基因型的菌株。李丽萍等<sup>[18]</sup>发现分离自广西罗非鱼的20株海豚链球菌共产生4种PFGE带型, 即4种基因型。RAPD (random amplified polymorphic DNA) 即随机扩增多态

表4 不同基因型菌株对20种抗生素的药敏实验结果

Tab. 4 Sensibility of the isolates to 20 various antibiotics

| 抗生素<br>antibiotic | 药物含量/( $\mu\text{g}$ /片)<br>medicine content | 药物敏感度 susceptibility |         |         |         |         |         | 抑菌圈直径判断标准/mm<br>sensitivity standard of R, I, S |       |           |
|-------------------|--|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---|-------|-----------|
|                   |  | BH15-2               | BH16-14 | BH16-15 | BH16-21 | BH16-23 | BH16-24 | R   | I     | S         |
| 磺胺异噁唑 SIZ         | 300  | S                    | S       | —       | R       | R       | R       | $\leq 12$                                       | 13~16 | $\geq 17$ |
| 复方新诺明 T/S         | 1.25/23.75                                   | S                    | S       | S       | R       | R       | R       | $\leq 10$                                       | 11~15 | $\geq 16$ |
| 四环素 TET           | 30   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 14$                                       | 15~18 | $\geq 19$ |
| 红霉素 ERY           | 15   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 13$                                       | 14~22 | $\geq 23$ |
| 青霉素 PEN           | 10 U   | S                    | S       | S       | R       | R       | R       | $\leq 19$                                       | 20~27 | $\geq 28$ |
| 氨曲南 AZT           | 30   | R                    | R       | R       | R       | R       | R       | $\leq 17$                                       | 18~20 | $\geq 21$ |
| 多粘菌素B PB          | 300 U  | S                    | S       | S       | R       | S       | R       | $\leq 8$  | 9~11  | $\geq 12$ |
| 大观霉素 SPE          | 100  | S                    | S       | S       | R       | R       | R       | $\leq 14$                                       | 15~18 | $\geq 19$ |
| 诺氟沙星 NOR          | 10   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 12$                                       | 13~16 | $\geq 17$ |
| 利福平 RIF           | 5  | S                    | S       | —       | I       | S       | R       | $\leq 16$                                       | 17~19 | $\geq 20$ |
| 菌必治 CRO           | 30   | S                    | S       | —       | I       | R       | I       | $\leq 13$                                       | 14~22 | $\geq 23$ |
| 复达欣 CAZ           | 30   | S                    | S       | S       | R       | R       | R       | $\leq 17$                                       | 18~20 | $\geq 21$ |
| 阿齐霉素 AZI          | 15   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 13$                                       | 14~17 | $\geq 18$ |
| 新霉素 NEC           | 30   | I                    | S       | S       | I       | I       | I       | $\leq 16$                                       | 17~23 | $\geq 24$ |
| 头孢唑啉 CFZ          | 30   | S                    | S       | S       | S       | S       | I       | $\leq 10$                                       | 10~20 | $\geq 20$ |
| 庆大霉素 GEN          | 10   | I                    | I       | I       | I       | I       | I       | $\leq 15$                                       | 16~23 | $\geq 24$ |
| 环丙沙星 CIP          | 5  | S                    | S       | S       | I       | S       | S       | $\leq 15$                                       | 16~20 | $\geq 21$ |
| 氯霉素 CHL           | 30   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 12$                                       | 13~17 | $\geq 18$ |
| 氨苄青霉素 AMP         | 10   | S                    | S       | S       | S       | S       | I       | $\leq 13$                                       | 14~16 | $\geq 17$ |
| 强力霉素 DEO          | 30   | S                    | S       | S       | S       | S       | S       | $\leq 17$                                       | 18~22 | $\geq 23$ |

注: R.耐药, I.中度敏感, S.敏感, —.没有数据

Notes: R. drug resistance, I. median sensitivity, S. high sensitivity, —.no data

性DNA标记,是建立在PCR基础之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,已被广泛应用于细菌的血清型分型研究中。为了更好地验证海豚链球菌的基因型,本研究在采用RAPD技术的同时还应用rep-PCR技术,即利用细菌基因组中广泛分布的短重复序列为引物的靶序列进行PCR扩增,分析菌株间基因组存在的差异。本研究中,RAPD与rep-PCR方法分子分型的结果一致,均证实广西卵形鲳鲹源海豚链球菌可分为2种基因型,其中BH16-21、BH16-23、BH16-24为基因2型。值得注意的是这2种基因型的海豚链球菌存在于同一养殖场,同一环境或个体中不同基因型菌株为菌株的基因重组或变异提供了有利条件,而基因重组或变异使

菌株突破宿主屏障成为可能。

有研究者将海豚链球菌分为2种血清型(I、II),I型海豚链球菌对精氨酸双水解酶和核糖的反应都呈阳性,II型海豚链球菌则对精氨酸双水解酶和核糖的反应都呈阴性,两种血清型之间的区别主要是由于荚膜的差异造成,精氨酸双水解酶阴性的菌株具有更完整且包覆性更好的细菌外壳,使得细菌能更好地逃避宿主的免疫反应而更具有感染性<sup>[19]</sup>。Bachrach等<sup>[11]</sup>则通过RAPD技术将海豚链球菌2个血清型区分开,精氨酸双水解酶阳性株其RAPD分型能扩增750 bp大小的特异条带,而精氨酸双水解酶阴性株则无750 bp特异条带。但是黄婷等<sup>[20]</sup>对海豚链球菌进行RAPD分析时,发现精氨酸水解酶呈阴性的

菌株都在750 bp处出现特异条带。同样Zhou等<sup>[15]</sup>采用微量凝集的方法证实的所分离的2个血清类型的所有菌株精氨酸水解酶反应均呈阳性。本研究中RAPD指纹图谱显示所有菌株均在750 bp处出现特异条带,而其对精氨酸双水解酶和核糖的反应均为阴性,造成这种现象可能与链球菌种属表型特征的易变性有关,或者使用RAPD分型来判定海豚链球菌的血清型有待进一步验证,同时表型和基因型之间的关系有必要进行更深入的研究。

### 3.3 卵形鲳鲹海豚链球菌的毒力基因鉴定

细菌毒力因子的鉴定是研究细菌致病机制的一个重要方面,已报道*S. iniae*几种重要的毒力基因:*simA*基因编码的M蛋白能穿过荚膜延伸至菌体表面成为菌毛,在细菌对细胞的黏附和感染以及抵抗吞噬细胞时发挥重要作用<sup>[21]</sup>;*sagA*编码的细胞溶血素能够损伤宿主红细胞,中性粒细胞和淋巴细胞等<sup>[22]</sup>;*scpI*基因编码的C5a肽酶能水解中性粒细胞化学诱导物补体因子C5a,从而损伤宿主的抗侵袭能力<sup>[23]</sup>;*pdi*编码的脱乙酰基酶使得细菌对溶菌酶的抵抗力增强,逃避宿主血液免疫并增强菌体对宿主上皮细胞的黏附和入侵<sup>[24]</sup>;*cps*编码的荚膜多糖形成高度粘稠状的荚膜包围整个菌体,保护细菌不受宿主补体激活和吞噬细胞介导的吞噬作用的伤害<sup>[23]</sup>;*pgmA*基因编码的葡萄糖磷酸变位酶参与了细胞壁和荚膜生物合成,并能抵抗正电性抗菌肽<sup>[25]</sup>;*cfi*基因编码CAMP因子,能协同其他能够分泌鞘磷脂酶的菌种溶解细胞膜,结合免疫球蛋白Fc片段,拦截抗体向补体呈递抗原<sup>[26]</sup>。本研究在针对这7种重要毒力基因的PCR检测中,所有菌株均扩增出相应大小的条带,表明在广西分离得到的2种基因型的海豚链球菌均为毒力较强的致病菌株。

### 3.4 不同基因型海豚链球菌的耐药谱

链球菌耐药性的产生主要有2种机制,一是通过耐药质粒的转移,另一种是通过核糖体的保护作用<sup>[27]</sup>。环境的改变如抗生素的频繁使用也可以增加细菌对该药物或同类药物的耐药性。养殖水体、沉淀物、养殖动物等含有多种抗生素,从其中分离到的菌株具有多种耐药谱<sup>[28-29]</sup>。本研究中,基因型相同的菌株耐药谱型也相似,但是不同基因型的菌株耐药谱型差异明显,基因2型的菌株耐药情况严重,对其中7~8种

抗生素都耐药。这一结果表明广西网箱养殖卵形鲳鲹中的海豚链球菌已经出现耐药性较高的流行菌株,检测养殖水体的理化因子时发现该养殖区溶解氧偏低,重金属离子浓度升高,亚硝酸盐超过渔业水质标准,水质恶化现象明显,不排除是长期使用抗生素的结果。由于抗生素耐药质粒很容易在细菌之间转移,长期使用抗生素来控制链球菌的方法将会严重危害水产养殖业的发展。

综上所述,广西地区卵形鲳鲹源海豚链球菌的流行菌株基因型存在多样性,不同基因型菌株对应的耐药谱差异显著,基因型和耐药谱型存在相关性,此结果为卵形鲳鲹海豚链球菌病疫病监测、疫苗研制提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] 罗璋,许杰,韩进刚,等.银鼓鱼病原菌(海豚链球菌)的分离与鉴定[J].华中农业大学学报,2012,31(1):95-99. Luo Z, Xu J, Han J G, et al. Isolation and identification of pathogenetic *Streptococcus iniae* from *Selenotoca multifasciata*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(1): 95-99(in Chinese).
- [2] 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. Deng M L, Geng Y, Liu D, et al. Isolation, identification and detection of virulence genes of *Streptococcus iniae* from *Acipenser baerii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(1): 127-135(in Chinese).
- [3] 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]. American Journal of Veterinary Research, 2001, 62(2): 174-177.
- [4] Lau S K P, Woo P C Y, Tse H, et al. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(3): 1004-1009.
- [5] 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.
- [6] Pier G B, Madin S H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a Beta-Hemolytic streptococcus isolated from an amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1976, 26(4): 545-



- 553.
- [7] 区又君, 李加儿. 卵形鲳鲹的早期胚胎发育[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 786-789.
- Ou Y J, Li J E. Early embryonic development in *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 786-789(in Chinese).
- [8] 黄婷, 李丽萍, 王瑞, 等. 卵形鲳鲹感染无乳链球菌与海豚链球菌的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(2): 161-166.
- Huang T, Li L P, Wang R, et al. Pathogenic bacteria *Streptococcus agalactiae* and *S. iniae* in diseased ovate pompano *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(2): 161-166(in Chinese).
- [9] Cai X H, Peng Y H, Wang Z C, et al. Characterization and identification of streptococci from golden pompano in China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 119(3): 207-217.
- [10] Whiley R A, Hardie J M. Genus I. *Streptococcus* rosenbach 1884, 22AL[M]//De Vos P, Garrity G M, Jones D, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer, 2009, 3: 655-711.
- [11] 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.
- [12] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(1): 211-215.
- [13] Baums C G, Hermeyer K, Leimbach S, et al. Establishment of a Model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Comparative Pathology, 2013, 149(1): 94-102.
- [14] 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]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(3): 241-247.
- [15] Zhou S M, Xie M Q, Zhu X Q, 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.
- [16] Kim M S, Jin J W, Han H J, et al. Genotype and virulence of *Streptococcus iniae* isolated from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea[J]. Fisheries Science, 2014, 80(6): 1277-1284.
- [17] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C M, 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.
- [18] 李丽萍, 王瑞, 黄婷, 等. 广西罗非鱼链球菌病流行菌株PCR鉴定和PFGE基因型分析[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 927-935.
- Li L P, Wang R, Huang T, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in Guangxi[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 927-935(in Chinese).
- [19] Agnew W, Barnes A C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1-2): 1-15.
- [20] 黄婷, 李丽萍, 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.
- Huang T, Li L P, Wang R, et al. Biochemistry and gene polymorphism analysis of *Streptococcus iniae* strains isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and *Trachinotus ovatus* in Guangxi Province[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 459-462(in Chinese).
- [21] Locke J B, Aziz R K, Vicknair M R, 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.
- [22] Nizet V, Beall B, Bast D J, et al. Genetic locus for streptolysin S production by Group A streptococcus[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(7): 4245-4254.
- [23] Locke J B, Colvin K M, Datta A K, et al. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1279-1287.
- [24] 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(2): 543-554.
- [25] Buchanan J T, Stannard J A, Lauth X, et al. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a

- target for vaccine development[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(10): 6935-6944.
- [26] 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]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1987, 165(3): 720-732.
- [27] Tian Y, Aarestrup F M, Lu C P. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 103(1-2): 55-62.
- [28] Kumar P A, Joseph B, Patterson J. Antibiotic and heavy metal resistance profile of pathogens isolated from infected fish in Tuticorin, south-east coast of India[J]. *Indian Journal of Fisheries*, 2011, 58(2): 121-125.
- [29] Lee S W, Najiah M, Wendy W, *et al.* Multiple antibiotic resistance and heavy metal resistance profile of bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hatchery[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(6): 740-745.

## Molecular typing, antibiogram type and detection of virulence genes of *Streptococcus iniae* strains isolated from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi Province

XIONG Xiangying, HUANG Guoqiang\*, WANG Zhicheng, WEN Xue

(Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China)

**Abstract:** To acquire the data of genotype and diversity upon the clinical dominant strains *Streptococcus iniae* of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi, a total of 17 bacterial isolates were analyzed by molecular typing, antibiogram type and virulence-related gene which were collected from diseased golden pompano in 7 farms located in Guangxi Province during 2015—2016. By using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) and repetitive primer polymerase chain reaction (rep-PCR) method, we successfully differentiated all 17 isolates into two distinct genotypes. Seven virulence-related genes were detected by PCR using specific primer, and the results revealed that the virulence-related genotype of these strains was *simA<sup>+</sup>scpI<sup>+</sup>pdi<sup>+</sup>sagA<sup>+</sup>cpsD<sup>+</sup>pgmA<sup>+</sup>cfi<sup>+</sup>*. All isolates seemed to show a high virulence. In addition, the antibiotic resistance profiles of 17 strains were tested with 20 common antibiotics using Kirby-Bauer disc diffusion methodology. The antibiogram of the isolates belonging to genotype 1 in rep-PCR analysis was AZT, while the antibiograms of genotype 2 were SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB, SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/CR and SIZ/T/S/PEN/AZT/SPE/CAZ/PB/RIF, respectively. Our research revealed that the two genotypes display significant differences of two antibiogram types and the same genotype isolates have similar antibiogram types. Therefore, a correlation between the genotype and the antibiogram types of *S. iniae* isolates has been identified. This study provides theoretical foundation and technical support for epidemiological study, vaccine development and disease control of *S. iniae* in golden pompano.

**Key words:** *Trachinotus ovatus*; *Streptococcus iniae*; molecular typing; virulence gene; antibiogram type; Guangxi Province

**Corresponding author:** HUANG Guoqiang. E-mail: hugh7531@163.com

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Guangxi Province, China (2015GXNSFAA139088); Basic Scientific Research Foundation of Guangxi Academy of Sciences (15YJ22HYS14); Guangxi Science and Technology Plan Projects (Gui S Tackle AB16380167)