

中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究

郭玉娟¹, 张德锋², 樊海平³, 陈学年^{1*}, 李彤彤², 李爱华^{2*}

(1. 肇庆学院生命科学学院, 广东 肇庆 526061;

2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

3. 福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 从广东省以及海南省等地区养殖的患病罗非鱼体内分离、收集到多株致病菌, 经生化分析和分子生物学鉴定, 均为无乳链球菌。对这些菌株分别进行了耐药谱测定、分子分型试验以及分子血清型分析。药敏试验结果表明, 2007—2010年分离到的无乳链球菌耐药谱基本相似; 多位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA) 试验中, 选择5个高变异指数的可变数目重复位点 (VNTR) 进行分子分型, 结果表明, 所有鱼源无乳链球菌菌株为同一 MLVA 型, 而作为对照的牛源无乳链球菌则明显不同; 为了对这些菌株进一步分型, 分别进行了分子血清型和表面蛋白抗原基因的检测, 结果表明, 鱼源无乳链球菌的分子血清型均为 I a 型, 表面蛋白抗原均为 alpha-C 蛋白。这进一步说明了不同年份和不同地区的鱼源无乳链球菌在基因水平上为同一分子类型, 具有相同的起源或传染源。同时也说明, 我国南方地区罗非鱼无乳链球菌在这几年中未发生明显的遗传变异。这些结果为罗非鱼无乳链球菌病疫苗研制、疫病监测及药物防治的研究提供理论依据。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; MLVA; 分子血清型

中图分类号: S 917.1; S 941

文献标志码: A

近年来, 随着我国罗非鱼养殖规模扩大, 各种传染性疾病的发生呈现不断增长的趋势, 尤其是近年来链球菌病的大范围流行, 对罗非鱼的养殖造成了巨大的损失。已有研究结果表明, 导致罗非鱼链球菌病的病原菌主要是无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*), 其中又以前者最为常见。无乳链球菌属于 B 群链球菌 (group B streptococcus, GBS), 它不仅是罗非鱼的病原菌, 也是新生儿和女性生殖道感染的重要病原菌以及奶牛乳腺炎的病原菌^[1-2]。流行病学调查发现, 罗非鱼无乳链球菌病主要流行于夏季, 水温为 25~37℃, 死亡率为 20%~30%^[3-5]。

目前, 全国许多罗非鱼养殖区都有分离到致病性无乳链球菌的报道^[3,6], 但至今缺乏对不同时间、不同地区分离的链球菌进行系统发育关系

的研究, 因此也就无法对其传播规律和传播途径进行分析。本研究借助分子生物学技术手段, 对收集到的多株罗非鱼致病性无乳链球菌进行分子分型研究, 以期阐明我国南方地区近年来发生的罗非鱼无乳链球菌病的分子流行病学特征, 同时为罗非鱼链球菌病的疫苗研制及药物筛选提供线索。

多位点可变数目串联重复序列分析 (multiple-locus variant-repeat analysis, MLVA) 分型是众多基因分型方法中较为成熟的一种^[7], 其基本原理是细菌基因组 DNA 中存在的可变数目串联重复位点 (variable number of tandem repeats, VNTR), 而且 VNTR 呈现出高度多态性, 通过多个不同 VNTR 位点的检测对细菌进行种间聚类分析, 即为 MLVA。MLVA 分型方法不仅能够提供完整的数字信息, 便于通过计算机进行统计分析,

收稿日期: 2011-09-21 修回日期: 2011-11-08

资助项目: 2011年广东省中国科学院全面战略合作项目(2011B090300036); 肇庆市科技计划项目(2010N029); 国家自然科学基金项目(31070112); 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2009CB118705)

通讯作者: 李爱华, E-mail: liaihua@ihb.ac.cn; 陈学年, E-mail: lianex@sina.com

<http://www.scxuebao.cn>

而且具有非常高的稳定性和重复性,在不同实验室内具有很好的可比性。因此,本研究通过 MLVA 技术对罗非鱼无乳链球菌进行分子分型研究,分析其分子水平上的差异性。

研究无乳链球菌的血清型分布有助于流行病学追踪和疫苗的研制。近年来,无乳链球菌的分子血清型分型得到快速发展,在一些研究中正在取代传统的基于抗血清的分型方法。无乳链球菌的流行病学研究主要依赖于荚膜血清型^[8]。至今,已经鉴定出 10 种不同的无乳链球菌血清型(血清型 I a、I b、II-IX)^[9-10]。无乳链球菌血清型是由荚膜区域的血清特异基因决定的,是由荚膜基因簇(capsular gene cluster, cps)编码^[10-11]。无乳链球菌主要的表面蛋白抗原可分为表面蛋白 alpha-C、Rib、Alp2、Alp3、Alp4 和 epsilon 蛋白^[8]。通过对以上表面蛋白基因水平上的检测和比较分析,进一步了解不同时间和不同地区的无乳链球菌之间相互关系,为今后罗非鱼的无乳链球菌病的治疗提供理论基础。本研究借助这些分子分型技术,以期能阐明在我国南方地区养殖的罗非鱼中流行的无乳链球菌的分子流行病学特征,为探究其起源提供线索,为监视其今后可能的变异或新型无乳链球菌传入提供基础数据。

1 材料与方法

无乳链球菌菌株 2010 年于广东省肇庆市患病的罗非鱼肝脏、肾脏分离到 16 株病原菌。无乳链球菌(0718flz 和 0719gNA)由福建淡水水产研究所于 2007 年从罗非鱼体内分离;无乳链球菌(LFY-08-23 和 LFY-08-23a)是华中农业大学陈昌福教授惠赠;无乳链球菌(GD0908)是珠江水产研究所姜兰研究员惠赠。无乳链球菌(C918)为内蒙古民族大学布日额教授惠赠。菌株编号与来源见表 1。

罗非鱼分离菌的鉴定 2010 年 8 月份从广东省肇庆市 16 条患病罗非鱼的体内分离到 16 株细菌。患病罗非鱼的症状和卢迈新等^[12]描述的发病罗非鱼的症状相似。罗非鱼分离菌的生化鉴定参考无乳链球菌常规的鉴定方法和指标^[12-13]进行生理生化特征的测定,生化鉴定管和相关试剂购于杭州微生物试剂有限公司。分子鉴定则先通过链球菌属特异引物(Str1: GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC)和 Str2:

ACGTTTCGATTTTCATCACGTTG)进行菌落 PCR 检测^[14],即挑取划线培养的单菌落菌株,加入 50 μ L 无菌水进行涡旋混匀,取 1 μ L 菌液作为模板进行 PCR。阳性菌株再用细菌通用引物(U8f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 和 U1492r: TACGGYTACCTTGTACGACTT)PCR 扩增细菌的 16S rRNA 基因^[15]。PCR 模板为分离细菌的基因组 DNA,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min),72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察,目的条带切胶回收并连接到 pMD18-T 载体后转化到感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆进行测序。将菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 BLAST(<http://Blast.cgi.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性分析,采用 ClustalX 1.8 软件进行序列比对,用 MEGA 4.0 软件 N-J 法构建系统发育树。

表 1 无乳链球菌菌株分离时间和地点
Tab. 1 The isolating dates and sites of *S. agalactiae* in the present study

菌株编号 no. of strains	地点 areas	时间 date	宿主 host
ZQ-1.1	广东省肇庆市市郊	2010-08	罗非鱼
ZQ-1.2	广东省肇庆市市郊	2010-08	罗非鱼
ZQ-1.3	广东省肇庆市市郊	2010-08	罗非鱼
ZQ-2.1	广东省肇庆市市郊	2010-08	罗非鱼
XQ-1	广东省肇庆市新桥	2010-08	罗非鱼
XQ-3	广东省肇庆市新桥	2010-08	罗非鱼
BZ-1	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-2	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-q1	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-q2	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-qa	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-qb	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-w1	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
BZ-w2	广东省肇庆市白诸	2010-08	罗非鱼
LT-1	广东省肇庆市莲塘	2010-08	罗非鱼
LT-2	广东省肇庆市莲塘	2010-08	罗非鱼
0718flz	福建省	2007-07	罗非鱼
0719gNA	福建省	2007-07	罗非鱼
LFY-08-23	海南省	2008-08	奥尼罗非鱼
LFY-08-23a	海南省	2008-08	奥尼罗非鱼
GD0908	广东省肇庆市	2009-08	罗非鱼
C918	内蒙古	2009-09	奶牛

无乳链球菌的药敏试验 挑取划线培养的无乳链球菌单克隆于 BHI 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 摇床培养至稳定期,通过麦氏比浊管估计菌液浓度,

<http://www.scxuebao.cn>

然后将稀释后的菌液涂布于晾干的 BHI 平板上,待涂布的菌液被完全吸收后贴上药敏片(药敏片购于杭州微生物试剂有限公司),28 ℃ 培养 20 h 后测定抑菌圈直径,按产品说明书判定各菌株对药物的敏感性。

无乳链球菌的 MLVA 方法分子分型 多位点串联重复序列分析(MLVA)参考 Radtke 等^[16]的方法,选择 5 个具有高变异指数的 VNTR 位点进行分析。5 对引物分别为 SATR1、SATR2、SATR3、SATR4、SATR5^[16]。PCR 模板为细菌基因组 DNA,PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 4 min,30 个循环(94 ℃ 变性 30 s,53 ~ 55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1.5 min),72 ℃ 终延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳后观察拍照,并分别选择部分目的条带(2 ~ 3 个)进行测序分析。

无乳链球菌分子血清型检测 参考 Imperi 等^[17]的方法,通过多重 PCR 检测无乳链球菌的分子血清型。PCR 模板为细菌基因组 DNA,PCR 终反应体系:1 × PCR Buffer;200 μmol/L dNTPs;250 nmol/L 引物(共 19 条引物混合,其中引物 cpsI-6-7-F 和 cpsI-7-9-F 的终浓度均为 400 nmol/L)^[17];1.5 U Ex Taq 酶(TaKaRa)。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,15 个循环,然后 94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,25 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min。PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照。

无乳链球菌的表面蛋白抗原基因的检测

参考 Creti 等^[8]的方法,通过多重 PCR 检测无乳链球菌的表面蛋白抗原基因。以细菌基因组 DNA 为模板,多重 PCR 反应体系:1 × PCR Buffer;200 μmol/L dNTPs;400 nmol/L 引物(共 6 条引物混合:Universal forward,Alpha-C reverse,Rib reverse,Epsilon reverse,Alp2/3 reverse 和 Alp4 reverse)^[8];1.5 U Ex Taq 酶(TaKaRa)。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 4 min,30 个循环(94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min),72 ℃ 终延伸 10 min。PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照。

2 结果

2.1 罗非鱼分离菌的鉴定结果

广东肇庆地区养殖罗非鱼体内分离到的致病菌进行链球菌属特异引物 PCR 检测,结果均为阳性,这表明分离菌均为链球菌属的细菌。另外,对链球菌进行了生化测定,其鉴定结果与文献[12-13]相符。通过 16S rRNA 序列构建系统进化树(图 1)结果表明,本研究中的所有罗非鱼分离株与无乳链球菌 A909 株和 ATCC13813 株聚为一枝,因此,分离菌鉴定为无乳链球菌。

2010 年莲塘罗非鱼分离株 LT-1 与 2009 年卢迈新等^[12]在同一地区分离的无乳链球菌 GDzl 株聚为一枝,并且 16S rRNA 序列完全相同,提示 2010 年在该地区发生的罗非鱼链球菌病病原很可能为之前在该地区潜伏的病原菌株。

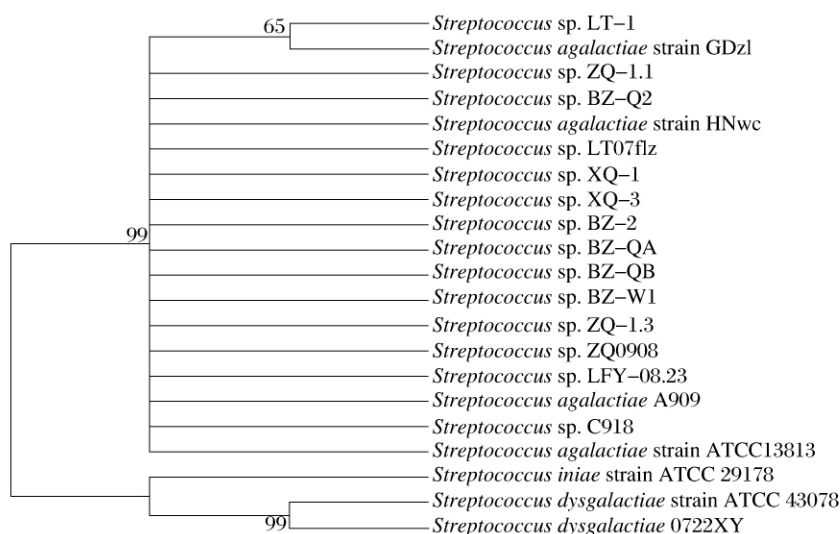


图 1 邻近法构建无乳链球菌 16S rRNA 基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the *Streptococcus* species based on 16S rRNA gene by Neighbor-Joining method

2.2 无乳链球菌的耐药谱

22 株无乳链球菌对 20 种药物的药敏试验结果见表 2。无乳链球菌对庆大霉素、阿米卡星、恩诺沙星、新霉素、链霉素、妥布霉素、磺胺异噁唑等药物均耐药;对哌拉西林、头孢唑啉、强力霉素均

敏感;对其它药物如诺氟沙星、氯霉素、环丙沙星、红霉素、头孢西丁、呋喃妥因、利福平等药物的敏感性表现出不完全相同,但是鱼源无乳链球菌对这些药物的敏感性相近,具体表现为抑菌圈大小均接近(抑菌圈大小未显示)。

表 2 无乳链球菌药敏试验结果
Tab.2 Results of antibiotic sensitivity test of *S. agalactiae* strains

药物种类 name of antibiotic	药物敏感性 antibiotic sensitivity																		
	ZQ-	BZ-	BZ-	BZ-	BZ-	BZ-	BZ-	BZ-	BZ-	XQ-	XQ-	LT-	LT-	TL	TL	LFY-	GD	C	
	1.1- 2.1	1	2	q1	q2	qa	qb	w1	w2	1	3	1	2	07 flz	07 gNA	08- 23	0908	918	
庆大霉素 gentamicin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
阿米卡星 amikacin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
恩诺沙星 enrofloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
新霉素 neomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
链霉素 streptomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
妥布霉素 tobramycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
磺胺异噁唑 sulfafurazole	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
诺氟沙星 norfloxacin	R	R	R	I	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
四环素 tetracycline	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
万古霉素 vancomycin	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
氯霉素 chloromycetin	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	R	R	I	I	I	I
环丙沙星 ciprofloxacin	I	S	I	I	I	I	I	S	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	R
氨苄青霉素 ampicillin	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
红霉素 erythromycin	I	I	I	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	I	I
头孢西丁 ceftioxin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	S	I	I	I	I
呋喃妥因 nitrofurantion	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I
利福平 rifampicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I
哌拉西林 piperacillin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢唑啉 cefazolin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
强力霉素 doxycycline	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

注: R. 耐药; I. 中度敏感; S. 敏感。

Notes: R. resistant; I. intermediate; S. sensitive.

2.3 无乳链球菌的 MLVA 方法分子分型

22 株无乳链球菌的 5 个不同 VNTR 位点的 PCR 产物电泳结果及部分菌株的测序结果分析表明:所有鱼源无乳链球菌的 SATR1 电泳结果均相同,即无重复序列,重复数为 0,C918 菌株的重复单元为 60 bp,重复数为 3;所有鱼源无乳链球菌的 SATR2 电泳结果均相同,重复单元为 18 bp,重复数为 6,C918 菌株的重复单元为 18 bp,重复数为 4;所有鱼源无乳链球菌的 SATR3 电泳结果均相同,重复单元为 12 bp,重复数为 23,C918 菌株无相关 PCR 产物;所有鱼源无乳链球菌的 SATR4 电泳结果均相同,即无重复序列,重复数为 0,C918 菌株的重复单元为 18 bp,重复数为 3;

所有鱼源无乳链球菌的 SATR5 电泳结果均相同,即重复单元为 48 bp,重复数为 13,C918 菌株无重复单元,重复数为 0。以上结果说明鱼源无乳链球菌的 MLVA 分型结果均相同,而参考菌株牛源无乳链球菌 C918 株的 MLVA 分型与鱼源的不一致(图 2)。

2.4 无乳链球菌的分子血清型检测结果

多重 PCR 产物电泳结果表明 22 株无乳链球菌的分子血清型结果均相同,产生两条电泳条带,其大小分别为 688 和 272 bp,与 Imperi 等^[17]的电泳图谱中的 I a 型条带大小相同,即其分子血清型为 I a 型(图 3)。

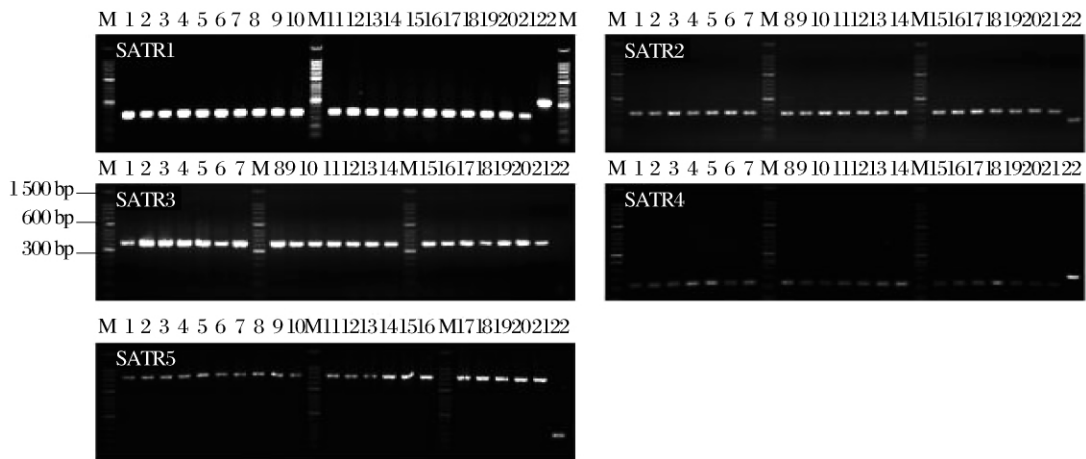


图2 无乳链球菌 MLVA 检测

SATR1、SATR2、SATR3、SATR4、SATR5 分别为 22 株无乳链球菌的 PCR 产物电泳结果, 1~21 为鱼源无乳链球菌 PCR 产物电泳条带, 22 号为 C918 菌株 PCR 产物电泳条带。M. DL 1500 Marker (TaKaRa)。

Fig. 2 MLVA assays of *S. agalactiae*

SATR1、SATR2、SATR3、SATR4、SATR5 are the gel electrophoresis of amplification of PCR in MLVA assays. 1~21. *S. agalactiae* strains were isolated from tilapia; 22. *S. agalactiae* strain (C918) was isolated from dairy cattle; M. DL 1500 Marker (TaKaRa) .

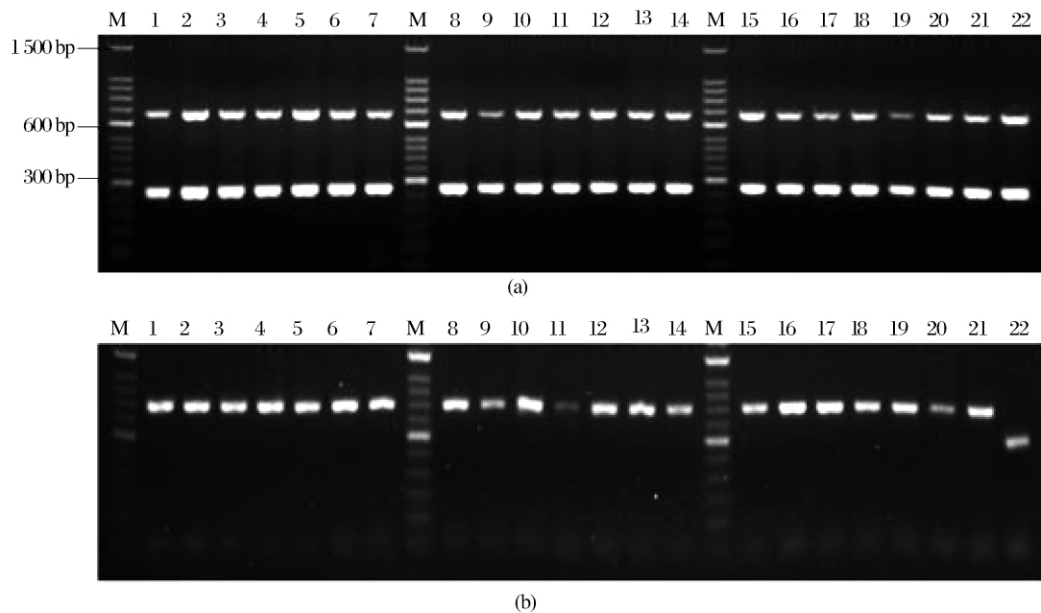


图3 无乳链球菌分子血清型检测

(a) 22 株无乳链球菌分子血清型 PCR 产物电泳图, PCR 产物为两条带, 大小分别为 688 和 272 bp。(b) 22 株无乳链球菌表面蛋白抗原基因 PCR 产物电泳图, PCR 产物电泳为一条带, 1~21 号电泳条带大小: 398 bp; 22 号电泳条带大小: 295 bp。1~21 号为鱼源无乳链球菌, 22 号为 C918。M. DL 1500 Marker (TaKaRa)。

Fig. 3 Molecular serotype assays of *S. agalactiae*

(a) Gel electrophoresis of multiplex PCR amplification products of molecular serotype of 22 *S. agalactiae* strains. (b) Gel electrophoresis of multiplex PCR amplification products of surface protein genes of 22 *S. agalactiae* strains. 1~21. *S. agalactiae* strains were isolated from tilapia; 22. *S. agalactiae* strain (C918) was isolated from dairy cattle. M. DL 1500 Marker (TaKaRa) .

2.5 无乳链球菌的表面蛋白抗原基因检测结果

22 株无乳链球菌菌株的表面蛋白抗原基因的多重 PCR 产物电泳结果表明, 所有鱼源无乳链

球菌的条带大小相同, 均约为 400 bp, 而牛源无乳链球菌 C918 的电泳条带大小明显不同, 约为 300 bp。根据 Creti 等^[8]电泳图谱和阳性片段大小判

断,鱼源无乳链球菌表面蛋白抗原为 alpha-C 蛋白,牛源无乳链球菌表面蛋白抗原为 Rib 蛋白。

3 讨论

本研究中采用了 16S rRNA 基因序列分析, MLVA 分型,分子血清型检测以及表面蛋白抗原基因检测,对 2007—2010 年从福建、海南和广东等地区分离收集的罗非鱼无乳链球菌进行分型,结果表明这些菌株之间在上述分子分型上无差异,可能是由于不同时间和地区的罗非鱼无乳链球菌存在同一分子遗传类型。与此相似, Ye 等^[18]通过与本文不同的分子分型方法发现广东省和海南省罗非鱼无乳链球菌的分子血清型也均为 I a 型,而且这些菌株的 MLST 分型结果也相同,均为 ST-7。Pereira 等^[19]也发现在巴西不同地区分离的大多数鱼源无乳链球菌菌株 PFGE 分型为 A1 型,而其它型的菌株很少。这不仅为我们研究罗非鱼无乳链球菌的传播路线提供依据,也有利于罗非鱼无乳链球菌的疫苗研制,因为罗非鱼无乳链球菌病的病原菌可能为同一株系。

虽然近年来罗非鱼无乳链球菌的检出率逐年增加,但是它们之间的相互关系却知之甚少。本研究对福建省、海南省、广东省等地区分离的鱼源无乳链球菌进行耐药性和 MLVA 分子分型比较分析,结果表明不同地区和不同时间分离到的菌株对大多数药物敏感性相似,对少数药物的敏感性存在差异,可能是由于不同地区因为用药后病原菌的耐药性发生改变导致。无乳链球菌对很多药物产生耐药性,这提示我们在渔业上用药需要慎重,也给今后渔业上用药提供参考。这些菌株对磺胺类药物耐药,而对哌拉西林敏感,对氨苄青霉素中度敏感,这些结果与文献报道^[13-20]的类似。本研究发现,与之前的相关报道相比,罗非鱼无乳链球菌对喹诺酮类药物(如诺氟沙星)的耐药性有增加的趋势^[2,12-13,20],需引起重视。

据报道,MLVA 比脉冲场电泳(PFGE)和多位点序列分型(MLST)更具有区分度,并且更加方便、经济^[21]。Radtke 等^[16]通过 MLVA 对无乳链球菌进行分型,研究表明 11 个位点中有 5 个位点的变异度最大,可以选取这 5 个位点建立 MLVA。本研究中选用这 5 个位点进行 PCR 扩增,PCR 产物凝胶电泳和部分目的片段测序结果表明所有鱼源无乳链球菌均为同一型,而且与牛源无乳链球

菌有明显的差异。牛源无乳链球菌和鱼源无乳链球菌在 MLVA 分型结果上表现出明显的不同。与此相似,Pereira 等^[19]用 PFGE 分析也发现鱼源、人源和牛源无乳链球菌在基因型上均不相关。虽然牛源和鱼源的无乳链球菌分子血清型均为 I a 型,但是它们的表面蛋白抗原基因不同,鱼源的均表现为 alpha-C 蛋白,牛源的为 Rib 蛋白,这表明鱼源和牛源无乳链球菌在表面蛋白抗原上存在明显的差异性,因此,鱼源无乳链球菌来源于人和牛的可能性甚小。

为了更好的验证以上分子分型的结果,本研究参考 Bishi 等^[22]的方法进行了鱼源无乳链球菌肠道细菌基因间重复序列(ERIC)分型研究,结果表明不同菌株的 ERIC 分型结果相同(电泳条带未显示),这进一步表明不同时间和地区的无乳链球菌分型结果一致。这表明通过以上 MLVA 分型和分子血清型分型的结果可靠,而且以上的分型方法较其他方法,如 MLST 分型、PFGE 分型更加方便、经济,而且准确、高效。

综上所述,不同时间和地区的鱼源无乳链球菌分子分型水平上一致,即遗传类型相同,这说明这些地区的无乳链球菌在时间和空间上存在密切的关系,具有相同的起源或传染源。同时也说明,我国南方地区罗非鱼无乳链球菌在这几年中未发生明显的遗传变异。这些结果可为罗非鱼无乳链球菌病疫苗研制,疫病监测及药物防治的研究提供理论依据。也为今后监测罗非鱼无乳链球菌是否发生遗传变异,或者监测是否有新遗传类型的无乳链球菌的传入提供了基础。

参考文献:

- [1] Aila N A E I, Tency I, Claeys G *et al.* Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35 - 37 weeks of pregnancy [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2009 (9): 153.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.

- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Savine E, Warren R M, Van Der Spuy G D, et al. Stability of variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Clinical Microbiology 2002, 40(12): 4561-4566.
- [8] Creti R, Fabrtti F, Orefici G, et al. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes [J]. Journal of Clinical Microbiology 2004, 42(3): 1326-1329.
- [9] Poyart C, Tazi A, Poupet H R, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(6): 1985-1988.
- [10] Slotved H C, Kong F, Lambertsen L, et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(9): 2929-2936.
- [11] Lppolito D L, James W A, Tinnemore D, et al. Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution [J]. BMC Infectious Diseases 2010, 10: 336.
- [12] 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析 [J]. 微生物学通报 2010, 37(5): 766-774.
- [13] 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.
- [14] Picard F J, Ke D F, Boudreau D K, et al. Use of *uf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species [J]. Journal of Clinical Microbiology 2004, 42(8): 3686-3695.
- [15] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [16] Radtke A, Lindstedt B A, Afset J E, et al. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae* [J]. Journal of Clinical Microbiology 2010, 48(7): 2502-2508.
- [17] Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae* [J]. Journal of Microbiology Methods 2010, 80(2): 212-214.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Elberse K E M, Nunes S, Sa-Leao R, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: Comparison with PFGE and MLST [J]. PLoS ONE 2011, 6(5): e19668.
- [22] Bishi D K, Verghese S, Verma R S. Molecular typing of colonizing *Streptococcus agalactiae* strains by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) in a Chennai based hospital [J]. Indian Journal of Microbiology 2008, 48(2): 291-296.

Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in Southern China

GUO Yu-juan¹, ZHANG De-feng², FAN Hai-ping³, CHEN Xue-nian^{1*}, LI Tong-tong², LI Ai-hua^{2*}

(1. College of Life Sciences Zhaoqing University Zhaoqing 526061 China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

3. The Freshwater Fisheries Research Institution of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Streptococcus agalactiae* strains were isolated and collected from moribund tilapia in Guangdong, Hainan and Fujian Provinces, and these isolates were identified by biochemical and molecular biological characterization. In the current study, we compared the phylogenetic relationships among *S. agalactiae* strains. Furthermore, we compared antibiotic sensitivity, molecular classification and molecular serotype of these strains which were isolated from different years and different geographical regions. Antibiotic sensitivity assays showed that among 20 antibiotics tested, there are 10 antibiotics that had no differences and the other 10 items showed similar sensitivity. Five most diverse loci (Variable number of tandem repeats, VNTR) were used for the construction of MLVA to evaluate the diversity of these strains. Molecular classification assays showed that all *S. agalactiae* strains isolated from fish were of the same molecular classification, but the *S. agalactiae* strain (C918) isolated from dairy cattle was different. Molecular serotype of these isolates using a multiplex PCR reaction, and the results showed that the molecular serotype of *S. agalactiae* was I a. However, surface protein genes assays showed that the surface protein of *S. agalactiae* strains is alpha-C protein except the *S. agalactiae* (C918) strain. Conclusion: these *S. agalactiae* isolates isolated from fish are of the same classification by molecular classification assays. Therefore, these results provide a theoretical basis for control of the tilapia diseases and for vaccine development of *S. agalactiae* in tilapia.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; MLVA; molecular serotype

Corresponding author: LI Ai-hua. E-mail: liaihua@ihb.ac.cn;

CHEN Xue-nian. E-mail: lianx@sina.com