

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*

祝璟琳 杨 弘 邹芝英 李大宇 肖 炜

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081)

提要 采用常规的形态及生理生化特性检验、API 20 strep 快速鉴定及分子生物学等方法,对引起 2009 年海南罗非鱼大规模死亡的病原菌进行了致病性、表型生物学、分子生物学及药敏试验的系统研究。结果表明,2 株分离菌均为无乳链球菌,对罗非鱼具有很强的致病性。分离菌 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录存取号分别为 GU363869 和 GU363870)与其它链球菌的 16S rRNA 基因同源性相似性在 96.5%—100%之间,所测 2 株病原菌 16S rRNA 基因之间的同源性为 100%。16S rRNA 基因构建的系统进化树表明,2 株病原菌均与无乳链球菌聚类。药敏试验结果表明,分离菌株对头孢类药物、阿莫西林、强力霉素等 27 种试验药物较敏感,对复方新诺明、卡那霉素等 11 种试验药物不敏感,对庆大霉素的敏感性不同。

关键词 罗非鱼,无乳链球菌,16S rRNA,药敏试验

中图分类号 S942

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是世界性主要养殖鱼类之一,也是联合国粮农组织向全世界推广养殖的优良品种,养殖范围遍布 85 个国家和地区,具有生长快、食性杂、抗病力与抗逆性强、无肌间刺等优点。现已成为我国南方各省养殖规模最大的出口型鱼类,产量占世界的 50%。然而近年来,由于高密度养殖,种群退化,加上养殖水质、环境及气候恶化,病害频繁发生且日趋严重(刘堂水等, 2007; 柴宏基等, 2001; Chern *et al*, 1994; Suanyuk *et al*, 2008)。无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和海豚链球菌(*Streptococcus inia*)引起的罗非鱼链球菌病,是对罗非鱼危害最严重的细菌性疾病,美国每年因链球菌病造成的损失已超过 1.5 亿美元(Shoemaker *et al*, 1997)。

2009 年 8 月 16 日在海南文昌谭牛镇华侨农场的濒死罗非鱼上分离到病原菌 HN090816-1,从琼海市罗非鱼养殖科普示范基地的濒死罗非鱼上分离到病

原菌 HN090816-2,经人工感染证实均为致病菌株。经生理生化鉴定,API 20 strep 快速鉴定系统和 16S rRNA 分子鉴定可以确定 2 株病原菌均为无乳链球菌,并对 48 种抗菌类药物的敏感性进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 8 月 16 日在海南省文昌市谭牛镇华侨农场和琼海市罗非鱼养殖科普示范基地分别取症状典型的濒死罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),将脑和内脏器官(肝、脾、肾)在无菌操作情况下进行细菌分离,划线接种于 BHIA 平板上,28 °C 培养 24h,挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养,直至获得纯培养(菌株编号分别为 HN090816-1 和 HN090816-2)。

UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒和 *Taq* 酶购自 Takara 公司,其余相关试剂均为国内分析纯。药敏纸片为杭

* 2007 年公益性行业(农业)科研专项,3-49 号;现代农业产业技术体系建设专项资金,nyctx-48 号;2010 年引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目,2010-C26 号;国家科技支撑计划,2006BAD01A1202 号。祝璟琳,助理研究员,E-mail: zhujl@ffrc.cn

通讯作者: 杨 弘,研究员,E-mail: yangh@ffrc.cn

收稿日期: 2009-10-09,收修改稿日期: 2009-12-15

州天和微生物试剂公司产品。回归感染试验鱼为尼罗罗非鱼, 大小为(100±10)g, 取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉基地。

1.2 回归感染试验

将分离菌株在 BHIA 斜面上 28 ℃ 恒温培养 24h 后, 用 0.85% 无菌生理盐水洗下菌苔, 稀释成所需浓度的菌悬液(采用平板倾注法计算菌悬液浓度, 各试验组菌液浓度见表 1), 进行腹腔注射和创伤感染, 注射对照组注射等量的无菌生理盐水, 创伤对照组把鱼体表刮伤。用加热棒把水族箱的水加温到 32 ℃, 连续 9 天观察感染发病的病鱼症状, 发现死鱼及时捞出, 解剖检查其内脏器官病变情况, 同时作细菌分离。

1.3 病原菌常规鉴定及 API 系统鉴定

细菌形态、生理生化特征试验参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌学鉴定手册》方法进行(东秀珠等, 2001; Palleroni, 1990)。快速鉴定按法国生物梅里埃公司 API 鉴定系统 Strep 试剂条说明书操作。

1.4 16S rRNA 基因序列测定和分析

1.4.1 细菌模板 DNA 的提取 将菌株 HN090816-1 和 HN090816-2 分别在 BHIA 斜面上 28 ℃ 培养 18—24h, 用 2ml 的灭菌 ddH₂O 洗下菌落, 取 1.5ml 至 1.5ml 离心管中, 8000r/m 离心 2min 收集菌体, 然后按经典酚/氯仿法提取细菌 DNA(萨姆布鲁克等, 2002)。

1.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序 扩增 16S rRNA 基因的正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8—27 个碱基位置); 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)(Martin *et al.*, 1998)。在 50μl 的 PCR 反应体系中含有: 10×PCR 缓冲液 5μl, 25mmol/L MgCl₂ 4μl, dNTP(各 2.5μmol/L) 4μl, 10μmol/L 引物各 2μl, 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.4μl, DNA 模板 2μl, ddH₂O 30.6μl。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 4min; 接着 94 ℃ 变性 1min, 56 ℃ 复性 1min, 72 ℃ 延伸 2min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 温育 5min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳确定条带, 经 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒纯化后, 直接交由上海基康生物有限公司进行序列测定。

1.4.3 序列分析与系统发育树的构建 所测序列利用 GenBank 数据库中的 Blast 进行相似性比较。根据返回的结果, 从 GenBank 数据库选取 17 条与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列, 在 Clustalx (1.83) 程序包中进行多重序列匹配排列

(multiple alignments)分析, 最后形成 1 个多重序列匹配排列阵, 其中形成的缺口用 “-” 填补, 用 N-J 法构建系统进化树, 并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测, 自举数集 1000 次。

1.5 药物敏感性测定

经鉴定后的菌株, 用常规琼脂扩散(K-B)法进行对常用抗菌类药物的敏感性测定, 以是否出现抑菌圈及抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标。

2 结果

2.1 回归感染试验结果

感染后前 3 天死亡的罗非鱼主要表现为游姿平衡失调, 翻滚, 转圈, 鱼体弯曲, 部分鱼胆囊肿大, 第 4 天后死亡的罗非鱼出现眼球浑浊, 鳃盖下缘和体表出血, 胆囊肿大等症状, 至第 8 天注射组罗非鱼全部死亡, 创伤感染组死亡率在 86.7% 以上, 注射对照组死亡 2 条, 创伤对照组死亡 1 条, 自然对照组没有死亡。取感染后死亡的罗非鱼进行细菌学检验, 结果均检验并分离到大量与供试菌株菌落形态高度一致的细菌, 理化特性表明为原感染菌。回归感染试验结果表明, 2 株分离细菌均为养殖罗非鱼的病原菌, 对罗非鱼有较强的致病性, 病程短, 死亡率高(表 1)。

2.2 病原菌常规鉴定及 API 20 strep 系统鉴定结果

菌株 HN090816-1 和 HN090816-2 均能在 BHIA 培养基上生长, 革兰氏染色, 镜检, 发现革兰氏阳性呈链状排列的球菌、无芽胞、无鞭毛, 氧化酶阳性、过氧化氢酶阴性, 溶血。根据这些特征, 可初步判定为链球菌。经 API 20 strep 系统鉴定, 菌株 HN090816-1 和 HN090816-2 和无乳链球菌的相似性为 99.9%, 故判定为无乳链球菌(表 2)。

2.3 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与序列分析

为了从分子水平上对 2 株病原菌进行鉴定, 测定了其 16S rRNA 的基因序列。以总 DNA 为模板, 经通用引物 27F 和 1492R 扩增到 16S rRNA 基因, 共 1513 个碱基, 其序列在 GenBank 中的登录存取号分别为 GU363869 和 GU363870。通过 16S rRNA 基因序列的测序结果分析表明, 菌株 HN090816-1 和 HN090816-2 16S rRNA 基因序列分别与其它链球菌的 16S rRNA 基因同源性相似性在 96.5%—100% 之间, 所测 2 株病原菌 16S rRNA 基因之间的同源性为 100%。所测序列与 GenBank 中其它链球菌的 16S rRNA 序列用 Clustalx (1.83) 构建的系统进化树显示(图 1), 2 株病原菌均与无乳链球菌聚类, 故判定其为无乳链球菌。

表 1 回归感染试验结果
Tab.1 Results of the recurrent infection experiments

菌株	组别	试验尾数	菌浓度 (CFU/ml)	剂量 (ml)	感染后死亡数及死亡时间(d)									死亡尾数	死亡率(%)
					1	2	3	4	5	6	7	8	9		
菌株 1	注射组	15	2.1×10^8	0.5	1	6	2	0	4	1	1	0	0	15	100
	创浸组	15	3.2×10^6	*	1	0	0	2	1	5	3	2	0	14	93.3
菌株 2	注射组	15	2.3×10^8	0.5	2	1	4	3	4	1	0	0	15	100	
	创浸组	15	2.6×10^6	*	0	0	3	1	3	3	2	1	0	13	86.7
对照	注射组	15	—	0.5	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	13.3
	创伤组	15	—	*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	6.7
	自然组	15	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 菌株 1 代表菌株 HN090816-1, 菌株 2 代表菌株 HN090816-2, *代表在菌液中浸泡 30min

表 2 2 株链球菌的 API 20 strep 生化反应表
Tab.2 API 20 strep biochemical identification of two strains of *Streptococcus*

测定	底物	反应/酶	结果	
			HN090816-1	HN090816-2
VP	丙酮酸	3-羟基丁酮	+	+
HIP	马尿酸盐	水解作用	+	+
ESC	七叶灵	β -葡萄糖甙	-	-
PYRA	吡咯烷酮-2-萘胺	吡咯烷酮芳胺酶	-	-
α -GAL	6-2-茶 α -半乳糖吡喃甙	α -半乳糖甙酶	-	-
β -GUR	茶酚 AS-B1 β -D-葡萄糖醛酸盐	β -葡萄糖醛酸酶	-	-
β -GAL	2-茶- β -D-半乳糖吡喃甙	β -半乳糖甙酶	-	-
PAL	2-萘-磷酸盐	碱性磷酸酶	+	+
LAP	L-亮氨酸-2-萘胺	亮氨酸芳胺酶	+	+
ADH	精氨酸	精氨酸双水解酶	+	+
RIB	核糖	产酸	+	+
ARA	L-阿拉伯糖	产酸	-	-
MAN	甘露醇	产酸	-	-
SOR	山梨醇	产酸	-	-
LAC	乳糖	产酸	-	-
TRE	海藻糖	产酸	+	+
INU	菊糖(菊根粉)	产酸	-	-
RAF	棉子糖	产酸	-	-
AMD	淀粉	产酸	+	+
GLYG	糖原	产酸	-	-

注: “+”表示反应结果为阳性,“-”表示反应结果为阴性

2.4 药物敏感性试验结果

供试 2 株无乳链球菌对测定的 48 种抗菌类药物的敏感性试验结果见表 3。从表中可以看出较敏感的药物有: 头孢噻吩、头孢拉啶(先锋)、头孢西丁、头孢氨苄、头孢吡肟、头孢呋肟、头孢孟多、先锋、

先锋必、菌必治、青霉素 G、氨苄青霉素、氯霉素、先锋噻肟、四环素、舒普深、阿莫西林、氧哌嗪青霉素、红霉素、罗红霉素、阿奇霉素、强力霉素、克拉霉素、利福平、复达欣、思诺沙星、环丙沙星。不敏感的药物有: 阿米卡星、复方新诺明、痢特灵、卡那

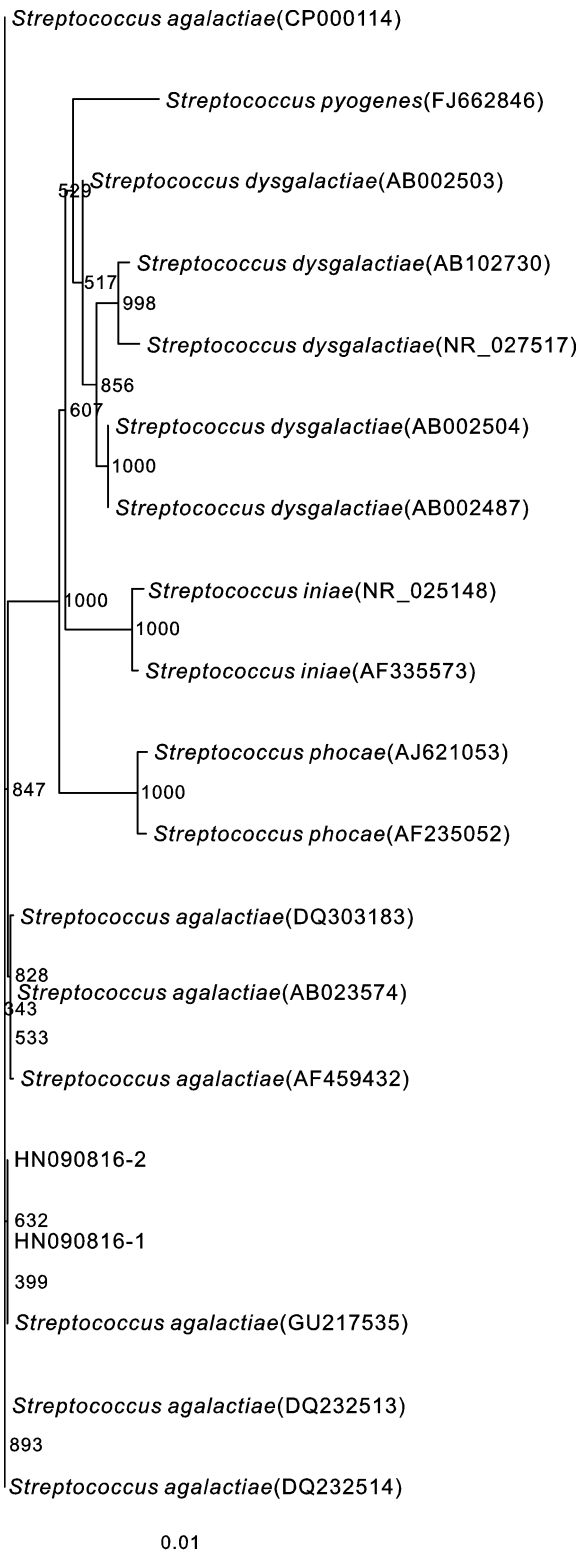


图 1 以 16S rRNA 基因构建的链球菌系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Streptococcus* built based on the structure of 16S rRNA genes

注: 括号内代表 GenBank 中序列存取号, 比例尺中的“0.01”代表遗传距离的单位, 分支上的数字为 1000 次重复抽样检测的自举分析置信度值

霉素、新霉素、依诺沙星、萘啶酸、奈替米星、链霉素、多粘菌素 B、妥布霉素。2 株病原菌对庆大霉素的敏感性不同, 菌株 HN090816-1 显示不敏感, 菌株 HN090816-2 显示敏感。

3 讨论

链球菌(*Streptococcus* spp.)是一种广泛分布于自然界的革兰氏阳性菌, 是人类的重要病原之一, 可引起败血症、肺炎及脑膜炎等, 同时也是其它多种脊椎动物包括猪、牛、鱼等的重要病原菌。目前已有多个国家报道了鱼类链球菌病的暴发与流行, 受感染的鱼类包括多种海水和淡水鱼类, 温水性鱼类受链球菌的危害尤其严重(Eldar *et al*, 1995; Evans *et al*, 2000, 2009a; Duremdez *et al*, 2004; 张新艳等, 2008; Suanyuk *et al*, 2008; Hernandez *et al*, 2009; Mian *et al*, 2009)。

无乳链球菌和海豚链球菌引起的罗非鱼链球菌病, 是对罗非鱼危害最严重的细菌性疾病, 属于人畜共患病。无乳链球菌根据其荚膜多糖抗原性的不同, 可分为 10 种血清型(a、 b、 — 型), 能引发败血症和脑膜炎(Slotved *et al*, 2007)。无乳链球菌主要分布在美国、以色列、日本、科威特、泰国、中国、越南、巴西等地。从暴发的纪录看, 受感染鱼的体重变化较大, 死亡率高, 疾病通常在 26 以上水温发生, 感染途径为直接接触或通过水(Mian *et al*, 2009)。本次流行病暴发水温为 26—37 , 在水温 32 以上易发。该病常常是因为鱼体应激而暴发, 应激因素有水温过高、缺氧或养殖密度过大等。链球菌病常以水平传播的方式相互感染, 即经过食物或创伤在罗非鱼之间传播, 也可以被环境中的病原感染。疾病常呈急性型, 在高水温季节时, 病鱼的死亡高峰期可持续 2—3 周, 但在水温低的季节, 该病也可呈慢性, 死亡率较低, 但持续时间长。

利用一些商品化试剂盒如 API 20 Strep、ID 32 strep 系统等, 结合常规检测方法, 可以对鱼类链球菌进行快速鉴定(Suanyuk *et al*, 2008)。本试验利用 API 20 strep 快速鉴定系统将分离到的两株病原菌成功地鉴定为无乳链球菌。但商用试剂盒也存在一些缺陷, 有时会出现一些误判或者无法判定的状况。如利用 API 20 Strep 试剂盒对海豚链球菌鉴定时易出现判定假象。Evans 等(2000)利用 API 系列试剂盒鉴定 B 群链球菌分离菌, 结果显示 VP 试验为阳性, 而利用常规试验方法进行 VP 试验则得出阴性结果, 对于这种

表 3 药敏纸片名称和规格及病原无乳链球菌的药物敏感性
Tab.3 Names, types of discs and antimicrobial sensitivity of pathogenic *Streptococcus agalactiae*

序号	名称	规格 (μg/片)	抑菌圈直径(mm)		敏感性	序号	名称	规格 (μg/片)	抑菌圈直径(mm)		敏感性
			HN090816-1	HN090816-2					HN090816-1	HN090816-2	
1	阿米卡星	30	0	0	R	25	头孢西丁	30	22	30	HS
2	头孢噻吩	30	36	50	HS	26	氟罗沙星	5	17	16	S
3	菌必治	30	30	32	HS	27	恩诺沙星	10	24	26	HS
4	壮观霉素	100	8	16	S	28	洛美沙星	10	16	18	S
5	氟哌酸	10	18	18	S	29	萘啶酸	30	0	0	R
6	青霉素 G	10	26	35	HS	30	舒普深	75/75	30	35	HS
7	复方新诺明	23.7/1.2	0	0	R	31	头孢氨苄	30	25	28	HS
8	呋喃妥因	30	20	28	S	32	罗红霉素	15	24	26	HS
9	氨苄青霉素	10	32	36	HS	33	阿奇霉素	15	26	30	HS
10	先锋噻肟	30	26	30	HS	34	奈替米星	30	0	0	R
11	头孢拉啶	30	30	30	HS	35	头孢吡肟	30	24	32	HS
12	四环素	30	26	34	HS	36	阿莫西林	10	25	34	HS
13	万古霉素	30	16	18	S	37	头孢克肟	5	16	20	S
14	痢特灵	300	0	0	R	38	头孢呋肟	30	32	32	HS
15	乙酰螺旋霉素	30	20	24	S	39	多粘菌素 B	30	0	0	R
16	红霉素	15	24	26	HS	40	头孢孟多	30	30	30	HS
17	卡那霉素	30	0	0	R	41	链霉素	10	0	0	R
18	强力霉素	30	32	25	HS	42	利福平	5	26	26	HS
19	先锋	30	32	35	HS	43	复达欣	30	25	28	HS
20	庆大霉素	10	0	11	—	44	先锋必	75	30	36	HS
21	新霉素	30	0	0	R	45	环丙沙星	5	24	25	HS
22	依诺沙星	10	0	0	R	46	氧哌嗪青霉素	100	24	30	HS
23	左氟沙星	5	16	20	S	47	氯霉素	30	24	30	HS
24	克拉霉素	15	23	24	HS	48	妥布霉素	10	0	0	R

注：“HS”代表较敏感，“S”代表敏感，“R”代表不敏感

可能有人归结为链球菌种属表型特征的易变性。因此本试验对分离的病原菌继续开展了 16S rRNA 分子鉴定进行确认。16S rRNA 为所有生物体生存所必需且较保守的基因序列之一，16S rRNA 技术已被成功地建立为一种鉴定微生物种、属、家族种类的标准方法(王国良等, 2008; 张新艳等, 2008)。目前 16S rRNA 序列分析方法在海豚链球菌和无乳链球菌鉴定方面得到了广泛运用(张新艳等, 2008; Mian *et al.*, 2009)。本试验结果表明菌株 HN090816-1 和 HN090816-2 16S rRNA 基因序列分别与其它链球菌的 16S rRNA 基因同源性相似性在 96.5%—100%之间, 所测 2 株病

原菌 16S rRNA 基因之间的同源性为 100%。所测序列与 GenBank 中其它链球菌的 16S rRNA 序列构建的系统进化树显示这 2 株病原菌均与无乳链球菌聚类, 故判定其为无乳链球菌。

使用抗生素来降低死亡率和经济损失是目前通行的做法。链球菌病目前还没有很好的治疗药物, 在澳大利亚, 土霉素, 呋喃唑酮和阿莫西林在澳洲肺鱼海豚链球菌病中广泛使用, 其中红霉素被认为是最有效的(Creeper *et al.*, 2006)。本试验结果表明, 分离的两株无乳链球菌对头孢菌素类药物, 阿莫西林, 青霉素类药物, 红霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素

等红霉素衍生物, 与土霉素抗菌谱相同的强力霉素、四环素等, 思诺沙星、环丙沙星等氟喹诺酮类药物, 以及氯霉素等 27 种抗菌药物较敏感。对复方新诺明、卡那霉素等 11 种试验药物不敏感。2 株病原菌对环丙沙星、卡那霉素的敏感性与张新艳等(2008)从福建分离的菌株不同, 2 株病原菌对庆大霉素的敏感性也不同, 可能是由于地理位置不同导致血清型不同所致。此外, 由于鱼一旦发病, 基本不会进食, 而且所有的链球菌菌株都有荚膜, 链球菌还能逃避巨噬细胞的吞噬清除(Locke *et al*, 2007), 因此口服药物的效果往往不佳。在这种情况下, 养殖户又常常延长喂药时间或增加用药量, 这样就很容易诱导产生抗药性更强的菌株。对于已经发病的罗非鱼, 如果病情不是很急的话, 用阿莫西林、氟苯尼考和强力霉素等抗生素还能起到控制作用, 但如果病情急, 呈暴发性死亡, 则用药效果不大。初次用药效果明显, 一旦停止使用药物, 死亡数量又增加, 再次使用同样药物效果不理想。

链球菌疫苗能刺激鱼类产生抗体从而介导鱼类获得免疫力。相对于药物治疗, 利用疫苗预防鱼类链球菌病是一种理想途径。国外从 20 世纪 90 年代便开始进行罗非鱼链球菌疫苗的研究, 近年来, 高效的无乳链球菌及其细胞外蛋白产物(ECP)疫苗已经研制成功并获得专利(US Patent 7204993)。本试验首次在海南省养殖罗非鱼上分离到致病链球菌, 鉴定的无乳链球菌为疫苗的制备提供了很好的候选菌株。但无乳链球菌血清型多, 并且在疫苗选择的压力下还会变异, 从而导致疫苗失效。此外, 由于鱼类疫苗受免疫途径、水体环境、病原变异、鱼类自身等因素的制约, 目前商品化的渔用无乳链球菌疫苗才刚刚起步, 开发新的技术和创新方法, 克服血清型特异性, 研究全球有效的无乳链球菌疫苗, 将是今后疫苗开发的方向。

致谢 海南省水产研究所李向民所长和王德强主任在病原菌采集过程中给予了大力支持, 谨致谢忱。

参 考 文 献

王国良, 祝璟琳, 金 珊, 2008. 养殖大黄花(*Pseudosciaena crocea*)3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析. 海

- 洋与湖沼, 39(2): 162—167
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 364—398
- 刘堂水, 樊海平, 陈昌福, 2007. 罗非鱼“突眼”病细菌性病原的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 26(4): 538—541
- 柴宏基, 张少华, 2001. 奥尼罗非鱼粘孢子虫病的诊断和防治. 科学养鱼, (5): 30
- 萨姆布鲁克, 拉塞尔著, 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 27—36
- Chern R S, Chao C B, 1994. Outbreaks of a disease caused by a rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathol, 29: 61—71
- Creep J H, Buller N B, 2006. An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. Aust Vet J, 84(11): 408—411
- Duremdez R, Al-Marzouk A, Qasem J A *et al*, 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. J Fish Dis, 27(5): 307—310
- Eldar A, Bejerano Y, Livoff A *et al*, 1995. Experimental *Streptococcal meningo-encephalitis* in cultured fish. Vet Microbiol, 13(9): 867—870
- Evans J J, Shoemaker C A, Kelsius P H, 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture, 198: 197—210
- Locke J B, Colvin K M, Datta A K *et al*, 2007. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish. J Bacteriol, 189(4): 1279—1287
- Martin F P, Collen M C, 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Appl and Environ Microbiol, 64(10): 3724 —3730
- Mian G F, Godoy D T, Leal C A G *et al*, 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Vet Microbiol, 136(1): 180—183
- Palleroni N J, 1990. Genus I *Pseudomonas*. Berger's manual of systematic bacteriology. Vol.3. Baltimore: Williams and Wilkins, 141—359
- Shoemaker C, Klesius P, 1997. Streptococcal disease problems and control: a review. In: Fitzsimmons K ed. Tilapia aquaculture. Vol.2. Northeast Regional Agricultural Engineering Service-106, Ithaca, NY, USA, 671—680
- Slotved H C, Kong F, Lambertsen L *et al*, 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* Serotype. J Clin Microbiol, 45(9): 2929—2936
- Suanyuk N, Kong F, Ko D *et al*, 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-relationship to human isolates? Aquaculture, 284(1): 35—40

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DRUG SENSITIVITY TEST OF PATHOGENIC *STREPTOCOCCUS* FROM TILAPIAS *OREOCHROMIS NILOTICUS* CULTURED IN HAINAN

ZHU Jing-Lin, YANG Hong, ZOU Zhi-Ying, LI Da-Yu, XIAO Wei

(Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081)

Abstract Two strains of bacteria, HN090816-1 and HN090816-2, were isolated from diseased tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Hainan, and were confirmed to be pathogenic by recurrent infections. They were identified as *Streptococcus* in regular physiological and biochemical analyses. With the API 20 strep technique, they were recognized as *Streptococcus agalaciate*, which were of 99.9% homology to *S. agalaciate*. In order for further confirmation on the molecular level, 16S rRNA gene were sequenced, their sequence accession number in GenBank being GU363869 and GU363870 respectively. Sequences analysis of 16S rRNA gene showed that they were very similar to other *Streptococcus*, and their nucleotide homology were between 96.5% and 100%. The nucleotide homology of 16S rRNA gene between the two isolates were 100%. Phylogenetic tree of *Streptococcus* based on 16S rRNA gene showed that strains HN090816-1 and HN090816-2 clustered together with *S. agalaciate*. Therefore, strains HN090816-1 and HN090816-2 were identified as *S. agalaciate*. Their sensitivities to 48 kinds of antimicrobial drugs were determined. The result showed that the two isolates were both highly sensitive to 27 antibiotics, such as Cephalosporin Drugs, amoxicillin and doxycycline, and were both resistant to 11 antibiotics, such as cotrimoxazole and kanamycin; while they showed different sensitivity to gentamicin.

Key words Tilapia *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalaciate*, 16S rRNA, Drug sensitivity test