

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170707001

http://www.yykxjz.cn/

刘婵, 冯娟, 谢云丹, 胡万涛, 王江勇, 苏友禄. 基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 130-136

Liu C, Feng J, Xie YD, Hu WT, Wang JY, Su YL. The application and detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia with a triple PCR based on virulence genes. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 130-136

基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌 三重 PCR 检测方法的建立及应用*

刘 婵^{1,2} 冯 娟² 谢云丹^{1,2} 胡万涛³ 王江勇² 苏友禄^{2①}

(1. 天津农学院水产学院 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所
农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300; 3. 广州大学生命科学学院 广州 510006)

摘要 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)作为罗非鱼主要病原, 传染力强、致死率高, 部分鱼从发病到死亡无明显病症, 难以确定鱼体是否携带该病原菌, 建立适用于生产一线的非乳链球菌检测技术势在必行。根据 GenBank 中无乳链球菌透明质酸酶基因(*hylB*)、青霉素结合蛋白基因(*ponA*)和 CAMP 因子基因(*cfb*)的保守序列, 设计 3 对特异性引物, 对多重 PCR 的反应条件和体系进行优化, 建立基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法, 并运用该方法检测来自广东省不同地区的罗非鱼组织样品。构建的三重 PCR 检测方法仅在无乳链球菌中扩增出 3 条特异性条带, 而在罗非鱼和常见的水产病原菌菌株中均未扩增出任何条带, 表现出良好的特异性; 以无乳链球菌基因组 DNA 浓度 $7.24 \times 10^{-5} \sim 5.65 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 为模板进行扩增, 该三重 PCR 能检测到的最低模板浓度为 $1.81 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{l}$, 表现出较高的灵敏度; 运用该方法检测 188 个罗非鱼组织样品, 其阳性检出率与常规细菌分离鉴定阳性率一致, 以常规细菌分离鉴定为标准, 对该三重 PCR 检测方法进行评价, 其诊断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp)均为 100%。结果表明, 构建的三重 PCR 检测方法不仅显著提高了检测的准确度和灵敏度, 还可在同一反应中同时检测 3 种无乳链球菌毒力基因, 为无公害水产品中无乳链球菌的快速检疫、水产养殖病害早期预警提供了一种快速、精准和高效的检测技术。

关键词 罗非鱼; 无乳链球菌; 毒力基因; 三重 PCR

中图分类号 S942 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0130-07

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)也称 B 簇链球菌(Group B streptococci, GBS), 为兼性革兰氏阳性球菌(Rosinski-Chupin *et al*, 2013; Soto *et al*, 2015)。该

菌宿主广泛, 不仅能感染包括人在内的哺乳动物, 还是养殖鱼类的重要病原(Schuchat *et al*, 1998)。罗非鱼为重要的世界性养殖鱼类, 是联合国粮农组织(FAO)

* 国家自然科学基金(31502210)、广州市珠江科技新星(201610010015)、广东省级鱼病防治专项(2016-302)、广东省自然科学基金(2015A030313688)和“广东特支计划”科技青年拔尖人才(2016TQ03N275)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31502210), Pearl River S&T Nova Program of Guangzhou (201610010015), Special Funds for Fish Diseases of Guangdong Province (2016-302), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030313688), and Youth Science and Technology Innovation Talents Funds in Special Support Plan for High Level Talents in Guangdong Province (2016TQ03N275)]. 刘 婵, E-mail: 784102490@qq.com

① 通讯作者: 苏友禄, 副研究员, E-mail: suyoulu@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2017-07-07, 收修改稿日期: 2017-07-31

向全球推广养殖的优良品种, 中国罗非鱼养殖年产量约为 178 万 t, 占世界罗非鱼总产量的三分之一以上, 是水产品出口量最大的品种之一(2016 中国渔业统计年鉴)。近年来, 罗非鱼链球菌病日益严重, 无乳链球菌作为其主要病原, 传染力强, 致死率高, 由此产生的病害给罗非鱼养殖产业带来了巨大的经济损失 (Evans *et al.*, 2008; Kayansamruaj *et al.*, 2015)。

罗非鱼无乳链球菌病发病较快, 部分鱼从发病到死亡无明显病症, 较难确定鱼体是否携带该病原菌, 从而影响对病害的有效处理(程世亮等, 2016)。传统的病原菌分离和生理生化鉴定等方法, 由于操作繁琐、检测周期长, 不能达到快速检测目的(张新艳等, 2008; 卢迈新等, 2010); 普通 PCR 方法, 一次仅能检测 1 个基因, 可能会造成漏检或误检(Wu *et al.*, 2008); 环介导等温扩增(LAMP)方法, 具有灵敏度高、反应时间短、临床使用不需要特殊的仪器、操作简单等优点, 但对引物设计要求比较高, 有些基因可能不适用, 还容易形成气溶胶污染, 造成假阳性(甘文佳等, 2010); 荧光定量 PCR 虽然具有较高的灵敏度, 但检测仪器昂贵, 对实验操作技术水平要求较高(Su *et al.*, 2016)。因此, 建立快速、精准、高效且适用于生产一线的非乳链球菌检测技术势在必行。

多重 PCR 在一次反应中能同时扩增多个目的片段的靶序列, 具有高效、快捷、高度特异、敏感等优势, 已经成为诸多实验室的常规诊断方法(毕艳妮等, 2014)。目前, 多重 PCR 方法已用于养殖对虾中同时检测 6 种病毒(刘飞等, 2014)。本研究以无乳链球菌的毒力基因即透明质酸酶基因 *hylB*、编码表面相关青霉素结合蛋白的 *ponA* 基因和 CAMP 因子的 *cfb* 基因为靶标, 设计 3 对特异性引物, 通过引物组合优化建立一种快速、高效、稳定、特异性好、灵敏度高的无乳链球菌三重 PCR 检测方法, 旨在为无乳链球菌的快速检测和早期预警提供一种准确、高效的检测技术。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)和人源无乳链球菌标准株(ATCC BAA-1138)购于中国微生物菌种保藏中心。来源于不同年份和地区的无乳链球菌分离株 TZQ0901(2009 年分离自广东省肇庆市)、TGZ1001(2010 年分离自广东省高州市)、TYC1101(2011 年分离自广东省阳春市)、THZ1301(2013 年分离自广东省惠州市惠东区)、GZN1501(2015 年分离自广东省广州市)、TLC1601(2016 年分离自广东省龙川县)均从宿主罗非鱼分离获得, 海豚链球菌(*S. iniae*)、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)均由实验室分离、鉴定并保存。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中无乳链球菌 3 个特异性 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因序列, 通过 Primer Premier 6.0 软件设计相应的引物对(表 1), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 DNA 模板的制备

各实验菌株的 DNA 提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明, 并保存于-20℃备用。罗非鱼组织中细菌 DNA 提取步骤, 参照 Su 等(2016)的方法。首先取鱼组织约 50 mg, 放入组织匀浆器中研磨, 加入 1000 μl TE 缓冲液, 制成组织匀浆液。取上述匀浆液 180 μl, 加入 20 μl 浓度为 50 mg/ml 的溶菌酶, 30℃孵育 10 min, 后续步骤均参照细菌 DNA 提取试剂盒进行。即得到高纯度的鱼(鱼包括体内细菌)基因组 DNA, 保存于-20℃备用。

表 1 3 对引物的信息

Tab.1 The information of the three pairs of primers

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'~3')	扩增片段 Amplified fragment (bp)	扩增基因 Gene
<i>hylB</i> -F	CGCGACTTTGGCTTTCTGAG	790	<i>hylB</i>
<i>hylB</i> -R	TAATTGAGCGAGGGACACCG		
<i>ponA</i> -F	AGCTATCCCTGGTGTTCAC	598	<i>ponA</i>
<i>ponA</i> -R	ACCGTTAGGTACTGTATTGTTGT		
<i>cfb</i> -F	TGGGATTTGGGATAACTAAGC	348	<i>cfb</i>
<i>cfb</i> -R	TTTGAAGTGCTGCTTGTAAATG		

1.4 反应条件的优化与建立

单一引物扩增采用 25 μl 反应体系: 2 \times PCR DsMix 12.5 μl , 引物 F(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μl , 引物 R(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μl , DNA 模板 1.0 μl , ddH₂O 9.5 μl 。利用 3 对引物进行 PCR 扩增, 反应体系组成: 2 \times PCR DsMix 12.5 μl , 各引物上、下游(10 $\mu\text{mol/L}$)分别为 0.2~1.0 μl , DNA 模板 1.0 μl , 补充 ddH₂O 至 25 μl 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。然后取 5 μl 扩增产物, 在恒压 120 V 条件下, 1%的琼脂糖凝胶电泳 25 min 检测结果。其中, 无菌超纯水代替 DNA 模板的扩增结果为阴性对照。根据扩增结果, 选择最佳的引物比例和退火温度。同时, 将三重 PCR 方法所扩增的特异性片段送北京六合华大基因科技有限公司(广州)进行测序验证。

1.5 特异性实验

分别以鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)、人源无乳链球菌标准株(ATCC BAA-1138)、6 株罗非鱼无乳链球菌(TZQ0901、TGZ1001、TYC1101、THZ1301、GZN1501 和 TLC1601)、海豚链球菌、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌和迟缓爱德华菌的基因组 DNA 为模板, 根据优化后的多重 PCR 反应条件和体系进行 PCR 扩增。

1.6 敏感性实验

测定提取的鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)基因组 DNA 浓度, 将样品浓度按照 5⁰、5⁻¹、5⁻²、5⁻³、5⁻⁴、5⁻⁵、5⁻⁶ 和 5⁻⁷ 进行梯度稀释后分别为模板 DNA, 采用优化的多重 PCR 反应体系和条件进行 PCR 扩增, 确定三重 PCR 检测方法所需模板的最低浓度。

1.7 应用

利用构建好的三重 PCR 方法, 检测来自广东省廉江市、高州市、吴川市、开平市、惠城区和龙川县 6 个不同罗非鱼养殖区 188 个罗非鱼组织样品。同时, 利用常规细菌分离鉴定法对每份组织样品进行检测, 比较这 2 种检测方法的结果。

1.8 无乳链球菌三重 PCR 检测方法的评价

根据世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疾病诊断手册》(2016)所规定的原则, 在 95%以上的置信区间、允许误差 5%范围内对 188 个罗非鱼组织样品进行检测, 以常规细菌分离鉴定法为标准计算此三重 PCR 检测方法的诊断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp)。

2 结果

2.1 三重 PCR 反应体系的优化

分别对各引物加入体系的体积和退火温度进行优化, 优化后的最佳退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$, 反应体系优化结果见表 2。利用优化后的反应体系和反应条件进行无乳链球菌检测, 出现 3 条特异性条带; 使用单一引物分别扩增 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因, 均出现 1 条特异性条带, 条带位置与预期结果一致(图 1)。此外, 对送测序的特异性条带序列进行 BLAST 比对, 与无乳链球菌 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因的同源性均达到或超过 99%, 表明构建的三重 PCR 所扩增的特异性条带是准确的。

表 2 三重 PCR 反应体系试剂组成
Tab.2 The content of the reagent in the reaction system of a triple PCR

成份 Ingredients	体积 Volume (μl)
2 \times PCR DsMix	12.5
<i>hylB</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
<i>hylB</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
<i>ponA</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.6
<i>ponA</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.6
<i>cfb</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
<i>cfb</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
DNA 模板	1.0
ddH ₂ O	8.3
共计 Total	25.0

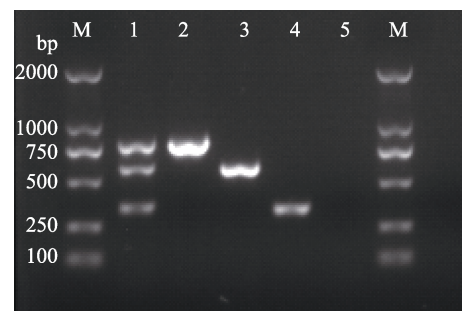


图 1 3 对引物和单一引物 PCR 扩增结果

Fig.1 The amplification of the single primer and three pairs of primers

M: DL2000 bp marker; 1: 三重 PCR 的结果; 2~4 分别表示 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因的扩增片段; 5: 阴性 M: DL2000 bp marker; Lane 1: the result of three pairs of primers; Lanes 2~4: Amplified fragments of *hylB*, *ponA*, and *cfb*; Lane 5: Negative control

2.2 特异性检测

特异性实验结果显示, 鱼源无乳链球菌(ATCC51487)、人源无乳链球菌(ATCC BAA-1138)以

及不同年份和地区的无乳链球菌分离株扩增结果一致, 均扩增出 3 条目的条带。而以罗非鱼、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、迟缓

爱德华氏菌、海豚链球菌、创伤弧菌的基因组 DNA 为模板均未扩增出任何条带, 与阴性对照结果相一致(图 2)。

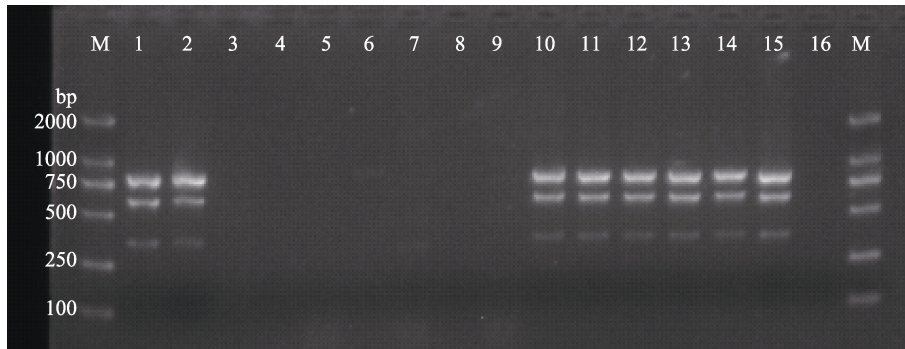


图 2 三重 PCR 特异性检测结果

Fig.2 The specificity result of triple PCR assay

M: DL2000 bp marker; 1: 鱼源无乳链球菌(ATCC51487); 2: 人源无乳链球菌(ATCC BAA-1138); 3: 罗非鱼基因组; 4: 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种; 5: 粪肠球菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 迟缓爱德华氏菌; 8: 海豚链球菌; 9: 创伤弧菌; 10~15: 扩增使用的模板为 TZQ0901、TGZ1001、TYC1101、THZ1301、GZN1501 和 TLC1601; 16: 阴性对照
M: DL2000 bp marker; Lane 1: *S. agalactiae* ATCC51487; Lane 2: *S. agalactiae* ATCC BAA-1138; Lane 3: *Tilapia* genomic DNA; Lane 4: *P. damsela* subsp. *piscicida*; Lane 5: *E. faecalis*; Lane 6: *S. aureus*; Lane 7: *E. tarda*; Lane 8: *S. iniae*; Lane 9: *V. vulnificus*; Lanes 10~15: TZQ0901, TGZ1001, TYC1101, THZ1301, GZN1501, and TLC1601 of *S. agalactiae*; Lane 16: Negative control

2.3 灵敏性检测

以无乳链球菌基因组 DNA 浓度分别为 5.65、1.13、 2.26×10^{-1} 、 4.52×10^{-2} 、 9.04×10^{-3} 、 1.81×10^{-3} 、 3.62×10^{-4} 和 7.24×10^{-5} ng/ μ l 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示, 三重 PCR 能检测到的无乳链球菌基因组 DNA 最低浓度为 1.81×10^{-3} ng/ μ l(图 3)。



图 3 三重 PCR 敏感性检测结果

Fig.3 The sensitivity result of the triple PCR assay

M: DL2000 bp marker; 1~8: 无乳链球菌模板浓度分别为 5.65、1.13、 2.26×10^{-1} 、 4.52×10^{-2} 、 9.04×10^{-3} 、 1.81×10^{-3} 、 3.62×10^{-4} 和 7.24×10^{-5} ng/ μ l; 9: 阴性对照
M: DL2000 bp marker; Lanes 1~8: Template concentration of *S. agalactiae* as 5.65, 1.13, 2.26×10^{-1} , 4.52×10^{-2} , 9.04×10^{-3} , 1.81×10^{-3} , 3.62×10^{-4} , and 7.24×10^{-5} ng/ μ l; Lane 9: Negative control

2.4 三重 PCR 检测方法的应用

采自廉江、龙川、高州、吴川、开平和惠东的罗非鱼样品阳性检出率分别为 100%(4/4)、100%(8/8)、57.14%(4/7)、50%(2/4)、1.23%(2/159)和 0(0/6); 总体来看, 188 尾罗非鱼组织样品的阳性检出率为 10.6% (20/188), 均与常规细菌分离鉴定结果相一致(表 3)。

2.5 三重 PCR 检测方法的评价结果

以常规细菌分离鉴定方法为标准, 根据 Dse 和 Dsp 计算公式得出本研究所建立的三重 PCR 检测方法的 Dse 和 Dsp 均为 100%(表 4)。

3 讨论

罗非鱼是我国主要的水产品养殖和出口品种之一, 近几年, 由于罗非鱼产品不合格(农兽药残留、品质不合格、微生物污染、食品添加剂超标等), 出口严重受阻(赵海军等, 2015)。其中, 由无乳链球菌带来的病害给罗非鱼养殖产业带来的损失最为严重。水产品中微生物的检测方法主要有生化培养法、免疫学法和核酸检测法等(应晓国等, 2017), 王远微等(2008)利用三重 PCR 对临床疑似样本的检出率为 81.8%, 对人工攻毒样本的检出率为 87.5%, 两组数据均高于用细菌分离的检出率(40.9%和 67.5%), 说

表 3 组织样品检测结果
Tab.3 The detection result of the tissue samples

诊断方法 Method	阳性检出数/样本总数 Positive samples/total samples					
	廉江市 Lianjiang	高州市 Gaozhou	吴川市 Wuchuan	开平市 Kaiping	惠城区 Huicheng	龙川县 Longchuan
常规细菌分离鉴定 Conventional method	4/4	4/7	2/4	2/159	0/6	8/8
三重 PCR 检测方法 Triple PCR assay	4/4	4/7	2/4	2/159	0/6	8/8

表 4 两种不同的方法对组织样品的检测
Tab.4 Two different methods for detection of the tissue samples

项目 Items	罗非鱼组织样品 Tilapia tissue samples	
常规细菌分离鉴定 Conventional method	阳性 P(20)	阴性 N(168)
三重 PCR 检测方法 Triple PCR assay	真阳性 TP(20)	假阳性 FP(0)
	假阴性 FN(0)	真阴性 TN(168)
计算公式 Calculation	$Dse=TP/(TP+FN)\times 100\%=100\%$	$Dsp=TN/(TN+FP)\times 100\%=100\%$

明多重 PCR 可避免单个毒力基因进行检测时漏检情况的发生,同时也暗示多重 PCR 比细菌分离技术更灵敏。

基于 PCR 技术的无乳链球菌检测方法大多选取靶标基因为 16S~23S rRNA 间区序列、sip 和荚膜多糖类编码基因等(王均等, 2011; Forsman *et al.*, 1997)。无乳链球菌普遍存在 20 多种毒力基因(Lin *et al.*, 2011), 透明质酸酶(Hyl)是无乳链球菌重要的毒力因子,有助于链球菌在巨噬细胞内存活并影响巨噬细胞促炎性因子的表达,在无乳链球菌致病过程中起关键作用(Wang *et al.*, 2014)。青霉素结合蛋白(PBP1a)在 GBS 抗吞噬清除中起重要作用(Hamilton *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2000), 蔡朝阳等(2006)发现青霉素结合蛋白的改变与金黄色葡萄球菌对甲氧西林等 β -内酰胺类抗生素以及万古霉素等糖肽类抗生素耐药有密切关系,影响药物作用的靶位,阻止抗生素的杀菌作用。CAMP 因子认为是具有成孔性质的分泌蛋白,在 GBS 致病过程中发挥重要作用(Udo *et al.*, 2013)。通过基因组的数据检索确认,不同来源的(包括人及其他动物源)无乳链球菌均包含上述 3 种毒力基因,说明它们在病原体的侵入、繁殖与扩散及抵抗机体防御中起关键作用(Casadevall *et al.*, 2001),因此,选择 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 毒力基因设计引物检测罗非鱼无乳链球菌十分必要。

多重 PCR 方法具有特异性好、灵敏度高的优点,被广泛应用于水产病原的检测。曾伟伟等(2013)针对草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)各类型毒株的保守序列,建立了 GCRV 的三重 PCR 检测方法;危芙蓉等(2010)根据广州管圆线虫核糖体小亚基 *rDNA* 基因序列设计特异性引物,并与小管福寿螺 16S

rDNA 的特异性引物组合,建立了检测小管福寿螺体内广州管圆线虫的多重 PCR 方法;李晨等(2010)根据水产上常见病原菌鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)的毒力相关基因,建立了同时检测 3 种菌的单管多重 PCR 方法。本研究中,用单一引物分别扩增 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因,可获得特异性扩增条带,将上述 3 对引物组合并优化出多重 PCR 条件和体系,可同时扩增出 3 条特异性条带。Su 等(2016)研究发现,以无乳链球菌的一些毒力基因(如 *sip* 和 *cpsE*)为靶标设计引物进行 PCR 扩增,存在跟其他病原菌基因组 DNA 交叉反应的现象,而本研究中未能在其他水产动物病原菌基因组中扩增出条带,表明所建立的三重 PCR 检测方法特异性强。灵敏度测试发现,本研究所构建的方法可检测到浓度为 1.81×10^{-3} ng/ μ l 的细菌基因组 DNA,比黄锦炉等(2012)构建的三重 PCR 检测方法灵敏度提高了近 200 倍。运用本研究构建的三重 PCR 方法检测广东省各地区罗非鱼组织样品的阳性检出率为 10.6%(20/188),与细菌分离鉴定的结果吻合,说明三重 PCR 在罗非鱼样品检测过程中具有广阔的应用前景。该三重 PCR 检测方法准确性高、特异性强、灵敏度高,为罗非鱼无乳链球菌病的诊断、大规模检疫、流行病学调查等提供了一种快速、准确而有效的方法。

参 考 文 献

- Bi YN, Song Y, Ma SQ, *et al.* Progress in the application of multiplex PCR in detection of pathogenic microorganisms. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(12): 1476-1478 [毕艳妮, 宋宇, 马淑青, 等. 多重 PCR 技术在病原微生物

- 物检测中的应用进展. 中国微生态学杂志, 2014, 26(12): 1476–1478]
- Cai ZY. Relationship between penicillin binding protein and drug resistance of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(4): 361–363 [蔡朝阳. 青霉素结合蛋白与金黄色葡萄球菌耐药性关系研究. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 361–363]
- Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. Journal of Infectious Diseases, 2001, 184(3): 337–344
- Cheng SL, Liu XF, Zheng W, et al. *Streptococcus agalactiae* infection in fish. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(2): 105–109 [程世亮, 刘新风, 郑文, 等. 鱼类无乳链球菌病. 动物医学进展, 2016, 37(2): 105–109]
- Evans JJ, Klesius PH, Bohnsack JF, et al. Genomic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates from multiple hosts and their infectivity in Nile tilapia. International Symposium on Talipia in Aquaculture, 2008(8): 109
- Forsman P, Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiology, 1997, 143(11): 3491–3500
- Gan WJ, Hu XC. LAMP and its use in gene diagnosis of pathogens. Journal of Pathogen Biology, 2010, 5(2): 143–145 [甘文佳, 胡旭初. LAMP 技术及其在病原基因诊断中的应用. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(2): 143–145]
- Hamilton A, Popham DL, Carl DJ, et al. Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B streptococcus to antimicrobial peptides. Infection & Immunity, 2006, 74(11): 6179–6187
- Huang JL, Wang KY, Xiao D, et al. The development and application of a triplex PCR method for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 254–261 [黄锦炉, 汪开毓, 肖丹, 等. 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)三重 PCR 快速检测方法的建立与应用. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 254–261]
- Jones AL, Knoll KM, Rubens CE, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. Molecular Microbiology, 2000, 37(6): 1444–1455
- Kayansamruaj P, Pirarat N, Kondo H, et al. Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains. Infection Genetics & Evolution Journal of Molecular Epidemiology & Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2015, 36: 307–314
- Li C, Wang XH, Huang J. Multiplex PCR for the detection of three main aquatic pathogens. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(3): 100–106 [李晨, 王秀华, 黄捷. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 100–106]
- Lin FP, Lan R, Sintchenko V, et al. Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*. PLoS One, 2011, 6(4): e17964
- Liu F, Zhang BC, Zhang XH, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six viruses in shrimp. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 60–67 [刘飞, 张宝存, 张晓华, 等. 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 60–67]
- Lu MX, Li J, Ye X, et al. Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces. Microbiology, 2010, 37(5): 766–774 [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. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766–774]
- Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, et al. Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage. BMC Genomics, 2013, 14(1): 252
- Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting paradigms. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(3): 497–513
- Soto E, Wang R, Wiles J, et al. Characterization of isolates of from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf Coast, Latin America, and Thailand. Journal of Aquatic Animal Health, 2015, 27(2): 123–134
- Su YL, Feng J, Li YW, et al. Development of a quantitative PCR assay for monitoring *Streptococcus agalactiae*, colonization and tissue tropism in experimentally infected tilapia. Journal of Fish Diseases, 2016, 39: 229–238
- Udo EE, Boswihi SS, Alswaih N. Genotypes and virulence genes in group B streptococcus isolated in the maternity hospital, Kuwait. Medical Principles and Practice, 2013, 22(5): 453–457
- Wang J, Wang KY, Xiao D, et al. Development of double PCR for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(5): 496–502 [王均, 汪开毓, 肖丹, 等. 罗非鱼源无乳链球菌双重 PCR 快速检测方法的建立. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 496–502]
- Wang YW, Tang C, Yu XH, et al. Detecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish by triplex PCR. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 947–951 [王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌. 微生物学报, 2008, 48(7): 947–951]
- Wang Z, Guo C, Xu Y, et al. Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. Infection & Immunity, 2014, 82(6): 2615–2625
- Wei FR, Liu HX, Lv S, et al. Multiplex PCR assay for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Pomacea canaliculata*. China Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2010, 28(5): 355–358 [危芙蓉, 刘和香, 吕山, 等. 用多重 PCR 技术检测小管福寿螺体内广州管圆线虫幼虫. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(5): 355–358]
- Wu J, Liu Y, Hu S, et al. Development of a rapid PCR test for identification of *Streptococcus agalactiae* in milk samples collected on filter paper disks. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2008, 21(1): 124–130
- Ying XG, Yuan N, Deng SG, et al. Research progress on

detection techniques of aquatic products. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(4): 1196–1202 [应晓国, 袁宁, 邓尚贵, 等. 水产品质量安全检测技术研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2017(4): 1196–1202]

Zeng WW, Wang Q, Wang YY, *et al.* Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 419–426 [曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 419–426]

Zhang XY, Fan HP, Zhong QF, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 772–779 [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. *水产学报*, 2008, 32(5): 772–779]

Zhao HJ, Yang BB, Hao Y, *et al.* The actualities and countermeasures of export tilapia in China. *Journal of Food Safety and Quality*, 2015, 6(12): 5100–5106 [赵海军, 杨彬彬, 郝跃, 等. 我国罗非鱼出口现状及对策. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(12): 5100–5106]

(编辑 冯小花)

The Application and Detection of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Tilapia with a Triple PCR Based on Virulence Genes

LIU Chan^{1,2}, FENG Juan², XIE Yundan^{1,2}, HU Wantao³, WANG Jiangyong², SU Youlu^{2①}

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384;

2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;

3. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006)

Abstract *Streptococcus agalactiae* has become one of the most important emerging pathogens with strong infectivity and virulence, causing high mortalities and large economic losses in tilapia farming industries in China. There are no obvious symptoms in some tilapia infected by *S. agalactiae*, so it can be difficult to determine if a fish carried the pathogen. Thus, it was necessary to establish an effective method for detection of *S. agalactiae* in the breeding process of tilapia. Three pairs of specific primers were designed based on the conserved sequence of *hylB*, *ponA*, and *cfb* genes encoding hyaluronidase, penicillin binding protein, and CAMP factor of *S. agalactiae* published in GenBank, respectively. After the optimization of the reaction conditions and reaction system of multiplex PCR, the triple PCR method based on the three virulence genes was developed for detection of *S. agalactiae* isolated from tilapia. Furthermore, the established method was applied to detect tissue samples of tilapia collected from different farming areas in Guangdong Province. The detection result of *S. agalactiae* only amplified three specific bands, however there were no bands in the host and the other common bacterial pathogen strains in aquaculture, which indicated that the method had good specificity. The dynamic range of template concentration of *S. agalactiae* was $7.24 \times 10^{-5} \sim 5.65$ ng/ μ l. Sensitivity tests showed that the detection limit of the *S. agalactiae* in genomic DNA was 1.81×10^{-3} ng/ μ l, with a higher sensitivity. The positive rate for detection of 188 tissue samples isolated from tilapia using the triple PCR method was consistent with the positive rate by the conventional bacterial identification method. The triple PCR method was evaluated with the conventional method as the standard; diagnostic sensitivity (Dse) and diagnostic specificity (Dsp) were 100%. In summary, the results showed that the triple PCR method not only improved the accuracy and sensitivity of the detection, but also detected three virulence genes of *S. agalactiae* in the same reaction system. Therefore, this method provided a rapid, accurate, and efficient detection technology for monitoring *S. agalactiae* infection in harmless aquatic products and early warning of aquaculture diseases.

Key words Tilapia; *Streptococcus agalactiae*; Virulence gene; Triple PCR

① Corresponding author: SU Youlu, E-mail: suyoulu@scsfri.ac.cn