

卵形鲳鲹主要致病链球菌多重 PCR 诊断技术的建立* Development of Multiplex PCR Assay for Detection of Main Streptococcosis Pathogens in *Trachinotus ovatus*

熊向英,蔡小辉,彭银辉,黄国强,梁志辉,王志成**

XIONG Xiangying, CAI Xiaohui, PENG Yinhui, HUANG Guoqiang, LIANG Zhihui, WANG Zhicheng

(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)

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

摘要:【目的】快速、准确地检测卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)感染无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)和格式乳球菌(*Lactococcus garvieae*) 4种主要的致病菌,为卵形鲳鲹的健康养殖提供依据。【方法】针对4种致病菌的特异基因设计特异性引物 cfb-F/cfb-R, tuf-F/tuf-R, Si-F/Si-R, PLG-F/PLG-R, 建立多重 PCR 反应体系,通过调试各引物对之间的最佳比例以及最适退火温度,对反应体系进行优化及灵敏度测试。2014年6~8月,应用该体系对北海及湛江各养殖场的发病卵形鲳鲹进行检测,然后用通用引物扩增 16S rRNA 基因,经测序、比对检测体系的准确性。【结果】反应体系中 cfb-F/cfb-R, tuf-F/tuf-R, Si-F/Si-R, PLG-F/PLG-R 的最适浓度分别为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.08 $\mu\text{mol/L}$, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 最优退火温度为 54.3 $^{\circ}\text{C}$; 4种目标菌的检测灵敏度为 5×10^{-2} ng/ μL ; 11份病原样品检测中,2份出现海豚链球菌的目的条带,4份出现无乳链球菌的目的条带,5份未见目的条带,和测序分析结果一致。【结论】多重 PCR 方法能代替传统的微生物检测方法特异、快速、灵敏地检测4种致病菌。

关键词:多重 PCR 链球菌病 无乳链球菌 停乳链球菌 格式乳球菌 海豚链球菌

中图分类号:S941 文章标识码:A 文章编号:1005-9164(2016)01-0035-06

Abstract:【Objective】A method with multiplex PCR was developed for rapid and accurate detection of the four main streptococcosis pathogens of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus iniae*, and *Lactococcus garvieae* isolated from golden pompano *Trachinotus ovatus*, in order to provide theoretical foundation for healthy aquaculture of *Trachinotus ovatus*. 【Methods】Each of the four pairs of oligonucleotide primers including cfb-F/cfb-R, tuf-F/tuf-R, Si-F/Si-R, PLG-F/PLG-R exclusively amplified the target gene of the

specific microorganism. The multiplex PCR was optimized by testing the proportion between the four sets of primers and the annealing temperature. And the sensitivity of the multiplex PCR assay was evaluated using pure DNA. A total of 11 pathogen samples were collected from cultured *Trachinotus ovatus* from June to August in 2014, and analyzed using the established multiplex PCR to test its applicability. To verify the results of the multiplex PCR, molecular identification was performed by amplification of 16S

收稿日期:2015-06-15

修回日期:2015-08-05

作者简介:熊向英(1984-),女,助理研究员,主要从事水产动物病原生物学研究。

* 广西面上基金项目(2012GXNSFAA053065),广西科技攻关项目(桂科攻 1222013-2),广西区直属公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(GXIF-2012-02)和国家海洋局项目(201205028-4)资助。

** 通讯作者:王志成(1962-),男,副研究员,主要从事海水养殖研究, E-mail: WZC6666@126.com。

rRNA gene with universal primers. **【Results】**The optimized relative concentrations of the primers were 0.2 $\mu\text{mol/L}$ each of cfb-F/cfb-R, 0.08 $\mu\text{mol/L}$ each of tuf-F/tuf-R, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ each of Si-F/Si-R and 0.4 $\mu\text{mol/L}$ each of PLG-F/PLG-R. The sensitivity of the multiplex PCR using purified DNA was $5 \times 10^{-2} \text{ ng}/\mu\text{L}$. The application results revealed that 2 of the pathogen samples were *S. iniae*, 4 samples were *S. agalactiae* and no products were amplified from the other 5 pathogen samples. Sequencing of 16S rRNA and BLAST analysis were consistent with the results of the multiplex PCR. **【Conclusion】**The above results indicated that the multiplex PCR is a sensitive, specific and reproducible assay method for the simultaneous detection of four pathogenic bacteria that cause disease in golden pompano. Therefore, it could be a useful alternative to the conventional method for microbial detection.

Key words: multiplex PCR, Streptococcosis, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.014

0 引言

【研究意义】随着水产养殖业的快速发展,链球菌(*Streptococcus*)导致的疾病频繁暴发,并在世界范围内造成重大经济损失。迄今为止,链球菌病的主要致病菌包括副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、格式乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、*Lactococcus piscium*、鲑鱼漫游球菌(*Vagococcus salmoninarum*)、栖鱼肉杆菌(*Carnobacterium piscicola*)^[1-4]。1957年日本在养殖虹鲷鱼(*Oncorhynchus mikiss*)上发现链球菌病,这是最早发现的鱼类链球菌感染性疾病^[5]。20世纪80年代以后,已有多个国家报道了鱼类链球菌病的暴发与流行,包括尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica* (linnaeus))、尼罗尖吻鲈(*Lates niloticus*)、大菱鲆(*Psetta maxima*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、黄狮鱼(*Seriola quinqueradiata*)、红鼓鱼(*Sciaenops ocellatus*)、海鲷(*Sparus auratus*)、日本比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)^[6-15]。而在中国,养殖罗非鱼(*Oreochromis speices*)的链球菌发病率为20%~50%,死亡率为50%~70%,甚至更高,链球菌病已严重危害中国罗非鱼养殖业的健康发展^[16]。近年来,卵形鲳鲹凭借其肉质具有鲷类特殊鲜味、生长速度快、出口加工市场前景诱人等特点,养殖规模一度呈倍数增长态势^[17-18]。然而由于卵形鲳鲹主要养殖模式是采用高密度的近海网箱养殖,随着该养殖产业的快速发展和无序扩张,海区负荷过大,养殖环境不断恶化,导致卵形鲳鲹细菌性病害暴发日益频繁。**【前人研究进展】**2007年,周素明等^[19]首次从卵形鲳鲹上分离到停乳链球菌,随后在2014年,黄婷等^[20]从患病的卵形鲳鲹上同时分离到无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和海豚链球菌。本实验

室于2012—2014年针对卵形鲳鲹进行流行病学调查,陆续从北海、湛江、深圳、珠海等地分离到无乳链球菌、停乳链球菌、格式乳球菌和海豚链球菌,发现链球菌的分离频率不断增加,这表明链球菌病已成为威胁卵形鲳鲹健康养殖的主要病原之一。**【本研究切入点】**目前采用的生化反应、药敏试验和电镜观察等传统的诊断方法耗时费力,因此有必要开发一种经济有效的,能快速检测出卵形鲳鲹感染链球菌情况的诊断技术。**【拟解决的关键问题】**建立一个多重PCR体系,旨在快速、准确地检测无乳链球菌、停乳链球菌、海豚链球菌和格式乳球菌4种主要的致病菌,为卵形鲳鲹的健康养殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用阳性对照的4种菌株(表1):停乳链球菌和格式乳球菌由中国水产科学研究院南海水产研究所徐力文副研究员惠赠。无乳链球菌和海豚链球菌为本实验室-20℃保存。

表1 实验用的4种参考菌株信息表

Table 1 Information of reference strains used in the experiment

细菌 Microorganism	菌株 Strain	宿主 Host	采样地点 Geographic origin
停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	TS01	卵形鲳鲹 <i>T. ovatus</i>	深圳 Shenzhen
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	TS02	卵形鲳鲹 <i>T. ovatus</i>	北海 Beihai
海豚链球菌 <i>S. iniae</i>	TS04	卵形鲳鲹 <i>T. ovatus</i>	北海 Beihai
格式乳球菌 <i>L. garvieae</i>	TS03	海鲈 <i>Lateolabrax japonicas</i>	珠海 Zhuhai

病原菌株(表2):2014年6~8月在北海和湛江两地采集临床症状有食欲不振、昏睡、眼球突出、眼角膜混浊等的患病卵形鲳鲹11份,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血平板上,于 30℃ 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。

表 2 自然发病卵形鲳鲹的病原菌株信息表

Table 2 Bacterial strains from natural infected golden pompano were detected by m-PCR

菌株 Strain	组织 Tissue	采样日期 Date	采样地点 Geographic origin
TS07	脑 Brain	2014-06-15	北海 Beihai
TS08	肝脏 Liver	2014-06-15	北海 Beihai
TS09	脑 Brain	2014-07-18	湛江 Zhanjiang
TS10	肾脏 Kidney	2014-07-18	湛江 Zhanjiang
TS11	脾脏 Spleen	2014-07-18	湛江 Zhanjiang
TS12	肝脏 Liver	2014-07-18	湛江 Zhanjiang
TS13	脾脏 Spleen	2014-07-28	湛江 Zhanjiang
TS14	肝脏 Liver	2014-07-28	湛江 Zhanjiang
TS15	脾脏 Spleen	2014-08-28	北海 Beihai
TS16	肝脏 Liver	2014-08-28	北海 Beihai
TS17	肾脏 Kidney	2014-08-28	北海 Beihai

试剂: DNA 提取试剂盒 MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit、PCR 试剂(10×PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs、Taq DNA 聚合酶)购自大连宝生物工程有限公司;4K DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

BHI 培养基: 1 000 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 15 g 琼脂,121℃ 高压灭菌 20 min。

表 3 多重 PCR 引物序列以及预期扩增片段大小

Table 3 Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon size

引物 Primer pairs	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	目的基因 Target gene	变性温度 Annealing temperature(°C)	片段大小 PCR amplicon (bp)	菌种 Pathogen	参考文献 References
cfb-F cfb-R	AAGCGTGTATTCCAGATTTCTCCT CAGTAATCAAGCCAGCAA	<i>cfb</i>	51	470	无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	[21]
tuf-F tuf-R	GTAGTTGCTTCAACAGACGG GGCGATTGGGTGGATCAACTC	<i>tuf</i>	51	795	停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	[22]
PLG-F PLG-R	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	16S rRNA	50	1 100	格式乳球菌 <i>L. garvieae</i>	[23]
Si-F Si-R	CACTAATCCAAAGAGTT TTAGGCGGCTGGCTCCTAA	16S rRNA	50	1 391	海豚链球菌 <i>S. miae</i>	[24]

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

将实验菌株接入 BHI 液体培养基中,于 33℃ 恒温摇床 220 r/min 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℃ 备用。

1.2.2 引物的设计和合成

依据无乳链球菌的特异性基因 *cfb* 的序列,停乳链球菌的特异性基因 *tuf* 的序列,海豚链球菌和格式乳球菌的 16S rRNA 序列设计 4 对引物(表 3),由广州英潍捷基有限公司合成。

1.2.3 多重 PCR 反应体系的建立

25 μL 反应混和液内含 1.0 μL 模板 DNA,1.5 mmol/L MgCl₂,0.4 mmol/L dNTPs,1 U TaqDNA 聚合酶,2.5 μL 10×PCR 缓冲液。多重 PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 35 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 45 s,32 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色,紫外线下观察、拍照。用胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收纯化目的 PCR 扩增产物,由广州英潍捷基有限公司完成测序。

1.2.4 多重 PCR 条件的优化

通过调整 4 对引物之间的比例以及退火温度的梯度变化(48.0℃、49.3℃、51.8℃、54.3℃、57.0℃、58.6℃),从中优化出最适条件。

1.2.5 多重 PCR 灵敏性检测

将提取备用的 4 种检测菌株的基因组 DNA 分别稀释为 8×10⁻¹ ng/μL、4×10⁻¹ ng/μL、2×10⁻¹ ng/μL、1×10⁻¹ ng/μL、5×10⁻² ng/μL,按照已优化的多重 PCR 反应条件进行 PCR 扩增,测定其灵敏性。

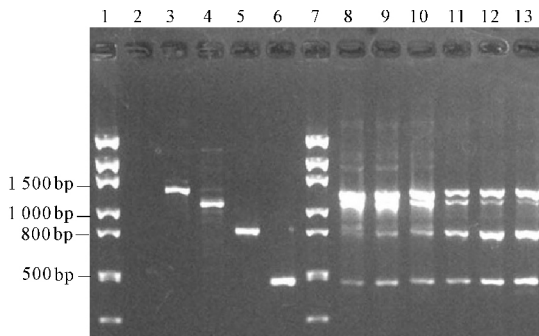
1.2.6 多重 PCR 对临床样品的检测

将从自然发病的卵形鲳鲹中分离纯化到的病原菌接种于 BHI 液体培养基中, 扩大培养后提取病原菌基因组 DNA 后, 利用优化的多重 PCR 体系检测。为验证多重 PCR 的结果, 用通用引物 27 F (5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3') 和 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增 16S rRNA 基因。PCR 产物测序由广州英潍捷基有限公司完成, 将所得序列在 Genbank 中进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 条件的优化

对比测试 4 对引物之间的比例, 结果显示当多重 PCR 的反应体系中分别加入 0.2 μmol/L 引物 cfb-F/cfb-R, 0.08 μmol/L 引物 tuf-F/tuf-R, 1.6 μmol/L 引物 Si-F/Si-R 和 0.4 μmol/L 引物 PLG-F/PLG-R, 即比例为 1:0.4:8:2 时, 4 条 PCR 产物能同时扩出来。如图 1 所示, 退火温度为 54.3℃ 时各条带亮度均匀, 没有非特异条带产生, 说明 54.3℃ 为最佳退火温度。



1 和 7:4K DNA Marker; 2: 阴性对照; 3: *S. iniae* TS04; 4: *L. garvieae* TS03; 5: *S. parauberis* TS01; 6: *S. agalactiae* TS02; 8~13: 退火温度依次为 48℃、49.3℃、51.8℃、54.3℃、57℃、58.6℃

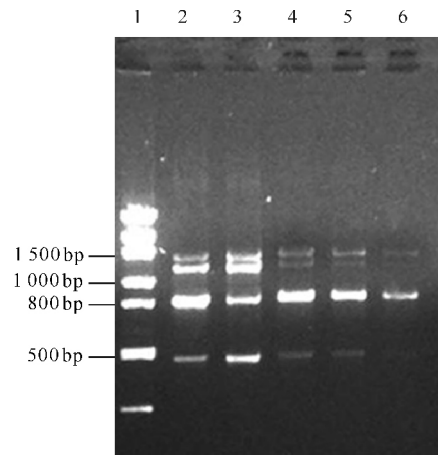
1 和 7:4K DNA Marker; 2: negative control; 3: *S. iniae* TS04; 4: *L. garvieae* TS03; 5: *S. parauberis* TS01; 6: *S. agalactiae* TS02; 8 to 13: the optimization of annealing temperature at 48℃, 49.3℃, 51.8℃, 54.3℃, 57℃ and 58.6℃, respectively

图 1 多重 PCR 对单种细菌的扩增以及最适退火温度

Fig.1 Specificity of the m-PCR assay for the detection of *S. iniae* (1 391 bp), *L. garvieae* (1 100 bp), *S. parauberis* (795 bp) and *S. agalactiae* (470 bp), and the optimization of annealing temperature

2.2 多重 PCR 灵敏度检测

对多重 PCR 反应体系进行灵敏度检测, 结果显示最低检测浓度为 5×10^{-2} ng/μL (图 2)。



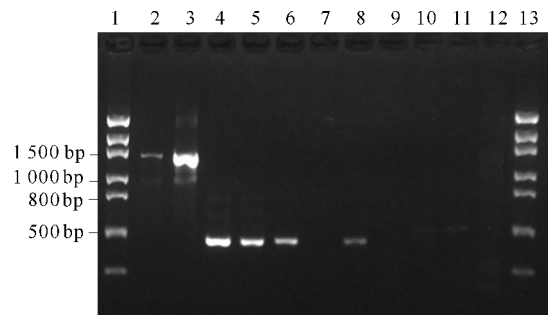
1:4K DNA Marker; 2:0.8 ng/μL; 3:0.4 ng/μL; 4:0.2 ng/μL; 5:0.1 ng/μL; 6:0.05 ng/μL

图 2 多重 PCR 灵敏度检测

Fig.2 Sensitivity of the m-PCR assay

2.3 临床样品多重 PCR 的检测结果

如图 3 所示, 多重 PCR 成功扩增出海豚链球菌的特异条带 1 391 bp 2 条, 无乳链球菌的特异条带 470 bp 4 条, 其余 5 份样品未见目的条带。所有菌株的 16S rRNA 基因 PCR 产物经测序、比对相似性分析表明, 分离菌株 TS07、TS08 与已报道的海豚链球菌 (NCBI 序列号: KC748467) 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, TS09、TS10、TS11、TS13 与已报道的无乳链球菌 (NCBI 序列号: JQ039375) 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, TS12、TS14 与已报道的气囊水栖菌 *Enhydrobacter aerosaccus* (NCBI 序列号: KF013200) 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, TS15、TS16 与已报道的副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* (NCBI 序列号: CP006008), TS17 与已报道的创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* (NCBI 序列号: CP009261) 16S rRNA 基因序列相似性为 100%。



1, 13:4K DNA Marker; 2:TS07; 3:TS08; 4:TS09; 5:TS10; 6:TS11; 7:TS12; 8:TS13; 9:TS14; 10:TS15; 11:TS16; 12:TS17

图 3 自然发病卵形鲳鲹病原样品的多重 PCR 检测

Fig.3 Detection of bacterial from naturally infected *T. ovatus* samples by m-PCR

3 讨论

由于传统鉴定致病菌的生化反应、药敏试验和电镜观察等诊断方法耗时、费力,建立一个快速、经济、灵敏的诊断技术能有效得防止疾病的暴发。Hengariu 等^[25]认为多重 PCR 体系构建成功的关键在于各引物对之间的相对浓度、PCR 缓冲液的浓度、氯化物和 dNTPs 之间的平衡以及循环的温度。多数学者^[26-28]则认为多重 PCR 体系的优化主要为改变退火温度、MgCl₂、dNTPs 和聚合酶的浓度等。Panangala 等^[29]建立多重 PCR 时通过调整引物之间的浓度,其中最高浓度引物是最低浓度引物的 1.5 倍。本研究中,通过预试验显示多重 PCR 体系构建成功关键参数为 4 对引物之间的比例和退火温度,其中海豚链球菌的特异基因最难扩增。因此,在反应体系中大幅度提高了海豚链球菌引物 Si-F/Si-R 的浓度,使得引物 Si-F/Si-R 的浓度是 tuf-F/tuf-R 的 20 倍;此外,当退火温度为 54.3℃ 时,可避免目的条带不均匀扩增,非特异性条带的出现,确定 54.3℃ 为最佳退火温度。

3 对引物 cfb-F/cfb-R, PLG-F/PLG-R, Si-F/Si-R 的特异性在之前的文献中都用系统进化相关菌进行过验证^[21,24,30],均未扩增出相关条带,而 tuf 基因能够区分分类关系上即使是最相近的链球菌种^[22],所以本研究并没有对该多重 PCR 体系进行特异性验证。本实验最低能够检测到 5×10^{-2} ng/ μ L 的基因组 DNA 模板的质量浓度,这和其他学者的研究结果类似,比如鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 的最低检测浓度为 50 pg,海豚链球菌、无乳链球菌、副乳房链球菌、格式乳球菌为 12.5~50 pg^[30-31],因此,本实验的灵敏度能够达到对链球菌病诊断的需求。

另外,为了验证多重 PCR 的可靠性,本实验用通用引物扩增其 16S rRNA 基因,产物测序后经过比对证明。值得注意的是,结果显示同一条鱼上的不同组织可能感染不同的细菌,这与黄婷等^[20]报道从发病卵形鲳鲷上首次同时分离到无乳链球菌和海豚链球菌的结果一致,但是传统观念认为一条鱼只能感染一种细菌,这可能与不同组织的感染途径不同有关,有待于进一步进行深入研究。

4 结论

初步建立的多重 PCR 反应体系中引物 cfb-F/cfb-R, tuf-F/tuf-R, Si-F/Si-R, PLG-F/PLG-R 的最适浓度分别为 0.2 μ mol/L、0.08 μ mol/L、1.6 μ mol/L 和 0.4 μ mol/L;最优退火温度为 54.3℃,能同时检测无乳链球菌、停乳链球菌、海豚链球菌和格

式乳球菌 4 种主要的卵形鲳鲷致病链球菌,为卵形鲳鲷的健康养殖提供依据。

致谢

感谢中国水产科学研究院南海水产研究所徐力文副研究员惠赠无乳链球菌和停乳链球菌。

参考文献:

- [1] BERCOVIER H, GHITTINO C, ELDAR A. Immunization with bacterial antigens: Infections with *Streptococcus* and related organisms[J]. Dev Biol Stand, 1997, 90: 153-160.
- [2] ELDAR A, HOROVITCZ A, BERCOVIER H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1997, 56: 175-183.
- [3] ELDAR A, GORIA M, GHITTINO C, et al. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 1005-1008.
- [4] ELDAR A, GHITTINO C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Similar but different diseases[J]. Dis Aquat Org, 1999, 36: 227-231.
- [5] HOSHINA T, SANO T, MORIMOTO Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish[J]. J Tokyo Univ Fish, 1958, 44: 57-58.
- [6] AHMED H A. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* \times *O. aureus*) in Saudi Arabia[J]. Aquaculture, 1994, 128(3-4): 195-201.
- [7] PERERA R P, JOHNSON S K, COLLINS M D, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* \times *T. aurea* Hybrids[J]. J Aquat Anim Health, 1994, 6: 335-340.
- [8] SHOEMAKER C A, EVANS J J, KLESIOUS P H. Density and dose: Factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2000, 188: 229-235.
- [9] DOMEÉNECH A, DERENAÁANDEZ-GARAYZÁBAL J F, PASCUAL C, et al. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis* [J]. J Fish Dis, 1996, 19(1): 33-38.
- [10] BROMAGE E S, THOMAS A, OWENS L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer* [J]. Dis Aquat Org, 1999, 36: 177-181.
- [11] AMAL M N A, ZAMRI-SAAD M, IFTIKHAR A R, et al. An outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured golden pompano, *Trachinotus blochii* (Lacépède), in Malaysia[J]. J Fish Dis, 2012, 35(11): 849-852.
- [12] MATSUYAMA H, MANGINDAAN R E P, YANO T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) [J]. Aquaculture, 1992, 101: 197-203.

- [13] ELDAR A, PERL S, FRELIER P F, et al. Red drum, *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection[J]. Dis Aquat Org, 1999, 36:121-127.
- [14] NGUYEN H T, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures[J]. Aquaculture, 2002, 205:7-17.
- [15] EVANS J J, KLESZIUS P H, GILBERT P M, et al. Characterization of haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait [J]. J Fish Dis, 2002, 25:505-513.
- [16] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. 南方水产, 2010, 6 (1):75-79.
LU M X. Review of research on streptococcosis in *Tilapia* [J]. South China Fisheries Science, 2010, 6 (1):75-79.
- [17] 陈伟洲, 许鼎盛, 王德强, 等. 卵形鲳鲹人工繁殖及育苗技术研究[J]. 台湾海峡, 2007, 26(3):435-442.
CHEN W Z, XU D S, WANG D Q, et al. Study on the spawning and hatching technique for *Trachinotus ovatus* [J]. J Oceanogr Taiwan Strait, 2007, 26(3):435-442.
- [18] 杨火盛. 卵形鲳鲹人工养殖试验[J]. 福建水产, 2006, 1:39-41.
YANG H S. Studies on the culture of pompano, *Trachinotus ovatus* [J]. J Fujian Fish, 2006, 1:39-41.
- [19] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2007, 46(2):68-71.
ZHOU S M, LI A X, MA Y, et al. Isolation, identification and characteristics of 16S rDNA gene sequences of the pathogens responsible for the streptococcosis in cultured fish[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(2):68-71.
- [20] 黄婷, 李莉萍, 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, 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, 2:161-166.
- [21] 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, 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, 2010, 36 (4):449-452.
- [22] ABDELSALAM M, EISSA A E, CHEN S C. Genetic diversity of geographically distinct *Streptococcus dysgalactiae* isolates from fish [J]. Journal of Advanced Research, 2015, 6 (2):233-238.
- [23] ZLOTKIN A, ELDAR A, GHITTINO C, et al. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:983-985.
- [24] CHIN I C, CHIA C W, TA C C, et al. Multiplex nested-polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* and *Streptococcus iniae*, four important fish pathogens in subtropical Asia[J]. Aquac Res, 2009, 40:1182-1190.
- [25] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol[J]. BioTechnique, 1997, 23:504-511.
- [26] CERRO A, MARQUEZ I, GUIJARRO J A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10):5177-5180.
- [27] ILHAN A, EROL C, SEVKI K. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens[J]. Vet Microbiol, 2008, 131:332-338.
- [28] ILHAN A. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease[J]. Dis Aquat Org, 2011, 93:199-206.
- [29] VICTOR S P, CRAIG A S, VICKY L S, et al. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila* [J]. Dis Aquat Org, 2007, 74:199-208.
- [30] MATA A I, GIBELLO A, CASAMAYOR A, et al. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish [J]. Appl Environ Microbiol, 2004b, 70:3183-3187.
- [31] TAPIA C D, YAÑEZ A, ARANCIBIA G, et al. Multiplex PCR for the detection of *Piscirickettsia salmonis*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Streptococcus phocae* in Chilean marine farms[J]. Dis Aquat Org, 2011, 97:135-142.

(责任编辑:竺利波)