

肖琦, 赵霞玲, 钱雯娴, 等. 猪链球菌 3 型分离菌的生物学特性及致病性[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1475-1481.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.017

猪链球菌 3 型分离菌的生物学特性及致病性

肖琦¹, 赵霞玲^{1,2}, 钱雯娴^{1,2}, 郭佳慧^{1,3}, 檀济敏^{1,4}, 俞正玉¹, 汪伟¹,
孙珂^{1,5}, 倪艳秀¹, 祝昊丹¹, 周俊明¹, 姚火春⁴, 范红结⁴, 牛家强², 索朗斯珠²,
何孔旺¹

(1.江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏 南京 210014; 2.西藏农牧学院,西藏 林芝 860000; 3.扬州大学兽医学院,江苏 扬州 225009; 4.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095; 5.吉林农业大学动物科学技术学院,吉林 长春 130118)

摘要: 为研究猪链球菌 3 型(Ss3)分离菌的生物学特性及致病性,对疑似 Ss 进行培养、染色、生化试验、猪链球菌 PCR 鉴定、血清分型 PCR 鉴定、多位点序列分型(MLST 型)PCR 鉴定,并对小鼠和仔猪进行致病性试验。结果显示,3 株分离菌(分别命名为 JSHZ 菌株、GD7 菌株、H30 菌株)均呈革兰氏阳性,Ss PCR 鉴定显示为阳性,血清分型 PCR 结果表明分离到的菌株为 Ss3,序列型(ST)分别属于 ST27 型(JSHZ 菌株)、ST1004 型(GD7 菌株)和 ST117 型(H30 菌株);3 株分离菌的生化特性与猪链球菌相符;3 株分离菌经腹腔注射均可致死 Balb/C 小鼠,半致死量(LD_{50})分别为 2.0×10^7 CFU/ml、 3.5×10^7 CFU/ml 和 2.5×10^8 CFU/ml。选择 3 株分离菌中毒力较强的 JSHZ 菌株进行仔猪致病性试验,感染仔猪会出现明显的关节红肿、跛行,体温多数升高至 $40.5 \sim 41.8$ °C,精神萎靡,食欲减少等症状;高剂量(每头仔猪注射 JSHZ 菌数 6.0×10^9 CFU)处理可致仔猪出现食欲废绝、神经症状,甚至濒死,并在其脑组织中分离到 Ss3。本研究结果为进一步开展 Ss3 的防控研究奠定了基础。

关键词: 猪链球菌 3 型; 生物学特性; 致病性

中图分类号: S855.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)06-1475-07

Biological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus suis* serotype 3 isolates

XIAO Qi¹, ZHAO Xia-ling^{1,2}, QIAN Wen-xian^{1,2}, GUO Jia-hui^{1,3}, TAN Ji-min^{1,4}, YU Zheng-yu¹,
WANG Wei¹, SUN Ke^{1,5}, NI Yan-xiu¹, ZHU Hao-dan¹, ZHOU Jun-ming¹, YAO Huo-chun⁴,
FAN Hong-jie⁴, NIU Jia-qiang², SUOLANG Si-zhu², HE Kong-wang¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China; 2. Tibet College of Agriculture and Animal Husbandry, Linzhi 860000, China; 3. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 5. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

收稿日期: 2020-08-27

基金项目: 省部共建国家重点实验室培育基地江苏省食品质量安全重点实验室项目(2019SY001); 江苏现代农业(生猪)产业技术体系生物安全创新团队项目[JATS(2018)259]; 国家公益性行业(农业)科研专项(201303041)

作者简介: 肖琦(1980-), 女, 辽宁丹东人, 博士, 助理研究员, 主要从事猪病及人兽共患病防控研究。(E-mail) xiaoqi_2122@163.com

通讯作者: 何孔旺, (E-mail) kwh2003@263.net

Abstract: In order to study the biological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus suis* serotype 3 (Ss3) isolates, three strains of suspected *Streptococcus suis* (Ss), strain JSHZ and GD7 isolated from acute dead piglets, strain H30 isolated from healthy piglet, were cultured, stained and identified by Ss PCR, Ss serotyping

PCR, multilocus sequence typing (MLST) PCR, biochemical tests, and pathogenicity tests were conducted on mice and piglets. The results showed that all the three isolates were Gram-positive and Ss3. The sequence type (ST) of JSHZ, GD7 and H30 belonged to ST27, ST1004 and ST117, respectively. The biochemical characteristics of the three strains were consistent with Ss. The three strains could be lethal to mice by intraperitoneal injection, and the median lethal dose (LD_{50}) were 2.0×10^7 CFU/ml (JSHZ), 3.5×10^7 CFU/ml (GD7) and 2.5×10^8 CFU/ml (H30), respectively. The JSHZ with highest virulence to mice was selected for the pathogenicity test on piglets. The results showed that for piglets, JSHZ could cause obvious arthritis and limping, raise the body temperature to $40.5-41.8^\circ\text{C}$, reduce the spirit and appetite. High dose of JSHZ (6.0×10^9 CFU) could cause piglet anorexia, neurological symptoms and even being dying, and Ss3 was isolated from the brain tissues of dying piglet. This study can lay a foundation for further research on prevention and control of Ss3.

Key words: *Streptococcus suis* serotype 3; biological characteristics; pathogenicity

猪链球菌(*Streptococcus suis*)可引起仔猪急性死亡、败血症、脑膜炎、关节炎、心内膜炎等,也可能感染人,甚至导致人死亡,是一种重要的人畜共患病原菌^[1]。猪链球菌根据荚膜可分成33个血清型(1~31型、33型和1/2型),其中血清2型在病猪和患病人群中的分离率最高^[2-3],血清3、7、9型在许多国家均较为普遍^[4-5]。流行病学资料显示,猪链球菌2型、3型是加拿大和美国最主要的流行血清型^[1]。在中国,Wei等^[6]对2003-2007年全国16个省(市)分离的407株猪链球菌进行研究,发现2型为主要的血清型,占43.2%;其次是3型,占14.7%。王巍^[7]从四川省20个县(区)不同日龄的发病猪中分离到34株猪链球菌,其中猪链球菌2型最多,占47.1%;其次是猪链球菌7型,占26.5%;猪链球菌3型排名第3,占11.8%。董志民等^[8]对2009-2016年中国部分地区病料中分离的41株猪链球菌进行血清分型鉴定,血清2型或1/2型共10株(24.4%),9型7株(17.1%),3型6株(14.6%)。上述研究结果表明,猪链球菌3型(Ss3)在中国部分猪群中占据着非常重要的地位,但有关Ss3培养特性、生化特性、基因特征及致病性的详细报告较少。

本研究拟对2株分离自急性死亡猪肺脏以及1株分离自健康猪扁桃体的Ss3菌株进行较为系统的研究,以期为进一步开展Ss3致病机制、免疫防控等相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病料及样品来源

病料为江苏省某猪场和广东省某猪场急性死亡猪肺脏,健康猪扁桃体采自江苏省某猪场。

1.2 主要试验材料

猪链球菌33个血清型(1~31型、33型和1/2

型)的参考菌株均由江苏省农业科学院兽医研究所保存,Balb/C雌性小鼠(4周龄)由扬州大学提供,30~35日龄健康仔猪购自江苏省某猪场(猪群未发生猪链球菌病并且未接种猪链球菌疫苗)。Todd-Hewitt Broth (THB)培养基购自BD公司,2×PCR mix、DNA marker购自广州东盛生物科技有限公司,pMD19-T载体购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自Omega Bio-Tek公司,链球菌生化试剂盒购自杭州微生物试剂有限公司。

1.3 细菌分离

对采集的猪肺脏、扁桃体表面进行无菌处理,用接种环取组织内部样品划线接种于THB固体培养皿,37℃培养24h。挑取灰白色、半透明且直径为1~2mm的圆形疑似菌落接种于THB液体培养基中,37℃200 r/min增菌培养过夜,用接种环取培养液划线接种于THB固体培养皿,37℃培养24h,然后挑菌再划线接种于THB固体培养皿。重复挑菌、划线接种过程,直至获得形态单一的纯菌落。

1.4 革兰氏染色

参照文献[9]的方法对分离菌培养物进行革兰氏染色镜检。

1.5 猪链球菌PCR鉴定

采用煮沸法提取猪链球菌基因组DNA。参照文献[10]的方法合成猪链球菌谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)扩增引物(Ss F、Ss R)。PCR反应条件为:95℃预变性5min;然后进入30个循环(95℃30s,57℃30s,72℃1min),72℃10min。琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段,采用TA克隆法获得目的片段后送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序,在NCBI BLAST上比对序列,确定是否为猪链球菌。

1.6 猪链球菌血清分型 PCR 鉴定

参照文献[11]的方法合成猪链球菌不同血清型的扩增引物,用各个引物对分离菌的 DNA 进行 PCR 扩增^[8],将分型 PCR 扩增出现的特异性条带切胶回收,采用 TA 克隆法获得目的片段后进行测序,在 NCBI BLAST 上比对序列,确定猪链球菌的血清型。

1.7 分离菌的多位点序列分型 (MLST 型) PCR 鉴定

参照文献[12]的方法合成 7 个管家基因 (*aroA*、*cpn60*、*dpr*、*gki*、*mutS*、*recA*、*thrA*) 的引物,分别扩增分离菌的 7 个管家基因。对 PCR 产物进行测序,在 Ss MLST 数据库 (HTTP://SSUIS.MLST.NET) 中查询序列型 (ST)。

1.8 分离菌生化试验

按照生化试剂盒说明书的方法对分离菌培养物进行生化试验。

1.9 分离菌生长曲线的测定

用接种环取冻存的第 1 代菌液,接种于 THB 固体培养基上,37 °C 培养 24 h 得到第 2 代单菌落。挑取 3 个第 2 代单菌落接种于 5 ml THB 液体培养基中,37 °C 200 r/min 培养过夜,得到第 3 代菌液。取 4 ml 第 3 代菌液,加至含有 200 ml THB 液体培养基的锥形瓶中,37 °C 200 r/min 培养,从培养 0 h 开始,每 1 h 取一次菌样测细菌培养液在 600 nm 处的吸光值 (OD_{600}),绘制各分离菌的生长曲线。

1.10 分离菌的致病性试验

1.10.1 对小鼠的致病性试验

1.10.1.1 JSHZ 菌株、GD7 菌株 将 45 只 Balb/C 小鼠随机分成 5 组。其中,试验组 4 组,每组 10 只,另外 5 只为对照组。用无菌生物盐水稀释菌液,4 组试验组小鼠分别注射菌液原液、1:5 稀释液、1:25 稀释液和 1:125 稀释液,每只小鼠腹腔注射 1 ml 菌液;对照组每只小鼠腹腔注射 1 ml 无菌生理盐水,连续观察 3 d,记录死亡数。采集死亡小鼠的血液及肝、脾、肺、脑等,进行 Ss 分离,并用 Ss 3 分型 PCR 鉴定小鼠体内的菌株。用 Reed-Muench 法计算各菌株对 Balb/C 小鼠的半致死量。

1.10.1.2 H30 菌株 将 43 只 Balb/C 小鼠随机分成 5 组。先将 H30 菌液进行 20 倍浓缩作为菌液原液,然后用无菌生物盐水对其进行稀释,4 组试验组小鼠分别注射菌液原液、1:5 稀释液、1:25 稀释液

和 1:125 稀释液,每组分别有 9 只、9 只、10 只、10 只小鼠,每只小鼠腹腔注射 1 ml 菌液;对照组 5 只小鼠,每只小鼠腹腔注射 1 ml 无菌生理盐水,连续观察 3 d,记录死亡数。采集死亡小鼠的血液及肝、脾、肺、脑等,进行 Ss 分离,并用 Ss 3 分型 PCR 鉴定小鼠体内的菌株。用 Reed-Muench 法计算各菌株对 Balb/C 小鼠的半致死量。

1.10.2 对仔猪的致病性试验

1.10.2.1 试验一 取 8 头 35 日龄健康仔猪,喂 7 d 无抗饲料,随机分成 4 组,每组 2 头。其中,试验组 3 组,对照组 1 组。选取方法 1.10.1 小鼠致病性试验中毒力较强的 1 株菌株,用无菌生理盐水稀释菌液,3 组试验组仔猪分别注射菌液原液 (原液组 1)、1:10 稀释液、1:100 稀释液,每头仔猪耳缘静脉注射 2 ml;对照组每头仔猪注射 2 ml 无菌生理盐水。连续观察 7 d,记录每头仔猪的体温 (上午、下午各测一次) 和临床表现,每天采集血液以及有关节炎症状仔猪的关节液,进行 Ss 分离,并用血清分型 PCR 鉴定是否为 Ss3。在第 7 d 对仔猪进行安乐死,采集血液及肝、脾、肺、脑等,进行 Ss 分离并进行组织病理切片观察。

1.10.2.2 试验二 选取 5 头 30 日龄健康仔猪,喂 7 d 无抗饲料,随机分成 2 组,一组 3 头,一组 2 头。选取方法 1.10.1 小鼠致病性试验中毒力较强的 1 株菌株,2 组试验组仔猪分别注射菌液原液 (原液组 2) 和 10 倍浓缩液,每头仔猪耳缘静脉注射 2 ml。仔猪感染后的观察、测温、细菌分离鉴定、剖检、组织学观察均与方法 1.10.2.1 一致。

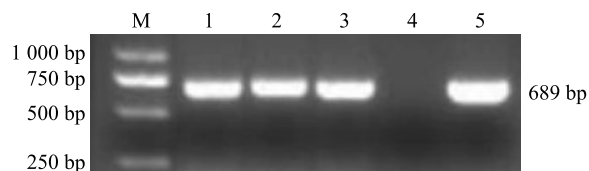
2 结果与分析

2.1 细菌分离培养染色鉴定

采集的病料样品在 THB 固体培养基上划线,然后在 THB 液体培养基中增菌,纯培养后获得单一纯菌落,观察菌落形态,并进行革兰氏染色镜检。结果发现,从急性死亡猪肺脏中分离到的 2 株菌株 (分别命名为 JSHZ 菌株和 GD7 菌株) 为疑似猪链球菌,从健康猪扁桃体中分离到的 1 株菌株 (命名为 H30 菌株) 也为疑似猪链球菌,各分离菌在 THB 固体培养基上均长成灰白色菌落,菌落直径为 1~2 mm。分离菌涂片经革兰氏染色后,在光学显微镜油镜下观察,为蓝紫色的短链状球菌。

2.2 猪链球菌 PCR 鉴定

利用 *Ss gdh* 扩增引物对获得的 3 株猪链球菌疑似菌株进行 PCR 鉴定和序列比对,结果(图 1)显示,3 株分离菌均能扩增出 689 bp 左右大小的片段,与预期结果相符。扩增片段序列与 *Ss* HB30 菌株 *gdh* 基因(序列号 FJ572237.1)100%同源,说明分离到的 3 株菌株均为 *Ss*。



M:2 000 DNA marker;1:JSHZ 菌株;2:GD7 菌株;3:H30 菌株;4:阴性对照;5:猪链球菌阳性对照。

图 1 分离菌株猪链球菌 *gdh* 基因的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR amplification of the *gdh* gene of the isolated *Streptococcus suis*

2.3 猪链球菌血清型 PCR 鉴定

对 3 株分离菌进行 *Ss* 血清型 PCR 鉴定和序列

表 1 *Ss3* 菌株 MLST 型鉴定

Table 1 Multilocus sequence typing (MLST) of *Ss3* strains by PCR

| 菌株 | 等位基因编号 | | | | | | | 序列型 |
|------|-------------|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| | <i>aroA</i> | <i>cpn60</i> | <i>dpr</i> | <i>gki</i> | <i>mutS</i> | <i>recA</i> | <i>thrA</i> | |
| JSHZ | 31 | 30 | 5 | 34 | 31 | 3 | 25 | ST27 |
| GD7 | 31 | 57 | 5 | 34 | 31 | 3 | 199 | ST1004 |
| H30 | 31 | 57 | 5 | 34 | 31 | 3 | 25 | ST117 |

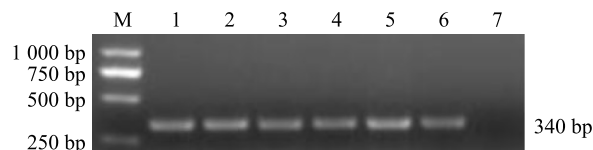
2.5 生化试验

在马尿酸钠、6.5%NaCl 高盐肉汤、甘露醇、山梨醇、木糖、阿拉伯糖、七叶苷、尿素试验中,3 株分离菌的结果为阴性;在乳糖、血清菊糖、水杨素、棉子糖、蕈糖、蔗糖、葡萄糖试验中,3 株分离菌的结果为阳性。表明 3 株 *Ss3* 分离菌均符合 *Ss* 的生化特性。

2.6 分离菌株生长曲线

图 3 显示,JSHZ 菌株的对数生长期为培养后 0~5 h,GD7 菌株的对数生长期为培养后 0~3 h,H30 菌株的生长速度较为缓慢,对数生长期不明显。在生长平台期,JSHZ 菌株和 GD7 菌株的活菌数分别达到 2.50×10^8 CFU/ml 和 2.85×10^8 CFU/ml,而 H30 菌株的活菌数仅为 2.25×10^7 CFU/ml。说明从急性死亡猪肺脏中分离到的 2 株 *Ss3* 菌株(JSHZ 菌株、GD7 菌株)生长比较快,生长平台期的菌数较多;而

比对,结果(图 2)显示,仅 *Ss3* 引物 PCR 能扩增出大小约为 340 bp 的目的片段,其他各血清型引物 PCR 扩增结果均为阴性。*Ss3* 引物 PCR 扩增的片段序列与 *Ss3 cps3L* 基因(序列号 KC537365.1)100%同源,表明分离到的 3 株菌株均为 *Ss3*。



M:2 000 DNA marker;1~2:JSHZ 菌株;3~4:GD7 菌株;5:H30 菌株;6:猪链球菌 3 型阳性对照;7:阴性对照。

图 2 分离菌株猪链球菌 3 型 PCR 鉴定

Fig.2 PCR amplification of the isolated *Streptococcus suis* serotype 3(*Ss3*)

2.4 MLST 型 PCR 鉴定

MLST 型 PCR 鉴定结果(表 1)显示,3 株分离菌分属 3 个不同的 ST 型,JSHZ 菌株属于 ST27 型,GD7 菌株属于 ST1004 型,H30 菌株属于 ST117 型。

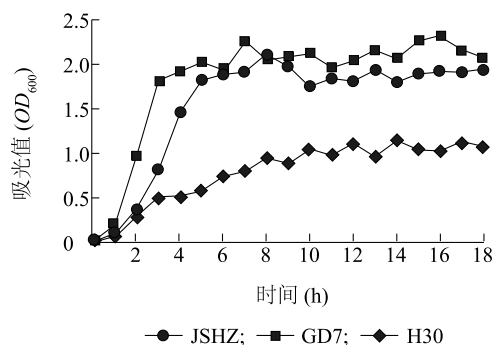


图 3 3 株 *Ss3* 分离菌的生长曲线

Fig.3 Growth curves of three *Ss3* strains

从健康猪扁桃体中分离到的 *Ss3* 菌株(H30 菌株)生长比较慢,生长平台期的菌数较少。

2.7 致病性

2.7.1 对小鼠的致病性 表 2 显示,用不同稀释倍

数的 JSHZ、GD7、H30 菌液对 Balb/C 小鼠进行腹腔注射,注射后 4 h,各组均有部分小鼠开始出现被毛粗乱、精神萎靡等症状,随后多数表现出拉稀、闭眼,有的出现神经症状。Balb/C 小鼠死亡主要发生在 14~48 h。死亡小鼠的血液及肝、脾、肺、脑中均能分离到大量菌落形态单一的 Ss,血清分型 PCR 鉴定

结果均为 Ss3。JSHZ、GD7、H30 菌株对 4 周龄 Balb/C 小鼠的半致死量(LD_{50})分别为 2.0×10^7 CFU/ml、 3.5×10^7 CFU/ml 和 2.5×10^8 CFU/ml,说明 JSHZ 菌株对 Balb/C 小鼠的致病性最强,而 H30 菌株对 Balb/C 小鼠的致病性相对较弱。

表 2 3 株 Ss 3 分离菌对小鼠的致病性试验

Table 2 Pathogenicity test of three Ss 3 isolates on mice

| 菌株 | 试验分组 | 每只小鼠注射菌数 (CFU) | 死亡数 (只) | 存活数 (只) | 死亡率 (%) | 半致死量 (CFU/ml) |
|------|-------------------|--------------------|------------|------------|------------|-------------------|
| JSHZ | 原液组 | 2.50×10^8 | 10 | 0 | 100 | 2.0×10^7 |
| | 1:5 稀释组 | 5.00×10^7 | 9 | 1 | 90 | |
| | 1:25 稀释组 | 1.00×10^7 | 2 | 8 | 20 | |
| | 1:125 稀释组 | 2.00×10^6 | 0 | 10 | 0 | |
| GD7 | 原液组 | 2.85×10^8 | 8 | 2 | 80 | 3.5×10^7 |
| | 1:5 稀释组 | 5.70×10^7 | 8 | 2 | 80 | |
| | 1:25 稀释组 | 1.14×10^7 | 1 | 9 | 10 | |
| | 1:125 稀释组 | 2.28×10^6 | 0 | 10 | 0 | |
| H30 | 原液 ^a 组 | 1.25×10^9 | 6 | 3 | 67 | 2.5×10^8 |
| | 1:5 稀释组 | 2.50×10^8 | 5 | 4 | 56 | |
| | 1:25 稀释组 | 5.00×10^7 | 2 | 8 | 20 | |
| | 1:125 稀释组 | 1.00×10^7 | 0 | 10 | 0 | |

^a表示该原液为 20 倍浓缩的菌液。

2.7.2 对仔猪的致病性

2.7.2.1 试验一结果(表 3)显示,仔猪在感染 JSHZ 菌液后 18~42 h 出现关节红肿、跛行、体温升高、精神萎靡、食欲减少等临床症状。在感染后的第 1 d 仔猪体温升高,多数为 $40.5 \sim 41.0$ °C,最高可达 41.3 °C,但在感染后的第 2~3 d 体温全部恢复正常。关节红肿和跛行等症状也在感染后第 3~4 d 消失,所有仔猪在观察期内均未死亡。感染仔猪的血液分菌结果显示,原液组 1 和 1:10 稀释组仔猪在感染后 1~2 d 均能分离出 Ss3;而 1:100 稀释组仔猪在各个时间点均未能分离出 Ss3。在感染后的第 4 d,仍能从有关节红肿症状的仔猪关节液中分离出 Ss3;感染后第 7 d 对仔猪进行剖检,所有仔猪的血液及肝、脾、肺、脑中均未分离出 Ss3。

2.7.2.2 试验二结果(表 3)显示,本试验中 2 组仔猪感染后的临床表现与试验一中的原液组 1 和 1:10 稀释组基本一致,体温升高、关节红肿、跛行等症状也多在感染后第 2~4 d 消失。10 倍浓缩组有一头仔猪体温升高至 41.8 °C,较高体温持续至第 5 d,并在攻毒后第 2 d 开始食欲废绝,卧地不起,浑身发

抖,四肢呈划水状,至第 5 d 时处于濒死状态。感染仔猪的血液分菌结果显示,2 组仔猪在注射 JSHZ 菌液后第 1~3 d 能分离出 Ss3。在感染后第 5 d,仍能从有关节红肿症状的濒死仔猪关节液中分离出 Ss3;在感染后第 5 d 扑杀濒死仔猪,从其脑组织中分离到 Ss3,从肝、脾、肺中未分离到 Ss3;在感染后第 7 d 剖检其他仔猪,其血液及肝、脾、肺、脑中均未分离到 Ss3。表明 JSHZ 菌液高剂量(10 倍浓缩)处理会导致仔猪出现典型的神经症状,并可能引起猪死亡。

图 4 显示,10 倍浓缩组的濒死仔猪可见心包积液,脑部出血,其他脏器病变不明显;对攻毒后第 7 d 扑杀的其他感染仔猪进行剖检时发现心包积液,其他脏器未见明显病变。组织病理切片显微观察结果(图 5、图 6)显示,10 倍浓缩组的濒死仔猪脑组织中形成明显血管套,大脑皮层局部胶质细胞增生;其他感染组仔猪部分可见心脏有局灶性心肌纤维变性坏死,大脑皮层早期局灶性轻微梗死,小角质细胞增多,肝、脾、肺组织未见明显病理变化。

表 3 仔猪注射 JSHZ 菌液后的临床表现

Table 3 Clinical manifestation of piglets injected with JSHZ

| 试验分组 | 每头仔猪注射菌数 (CFU) | 猪编号 | 体温升高(连续 2 次测量体温不低于 40.5 ℃) | 关节红肿、跛行 | 精神萎靡、食欲减少 | 卧地不起、四肢划水或身体发抖 | 濒死 |
|-------------|-----------------|-----|----------------------------|---------|-----------|----------------|----|
| 1 : 100 稀释组 | 5×10^6 | 001 | | | ✓ | | |
| | | 002 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 1 : 10 稀释组 | 5×10^7 | 003 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| | | 004 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 原液组 1 | 5×10^8 | 005 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| | | 006 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 原液组 2 | 6×10^8 | 007 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| | | 008 | | ✓ | ✓ | | |
| | | 009 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 10 倍浓缩组 | 6×10^9 | 010 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | | 011 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 对照组 | 0 | 012 | | | | | |
| | | 013 | | | | | |

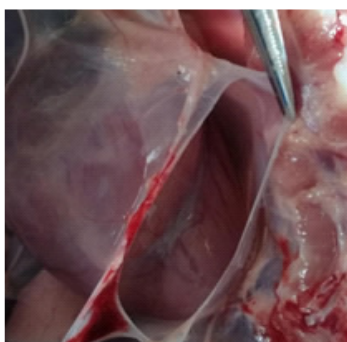
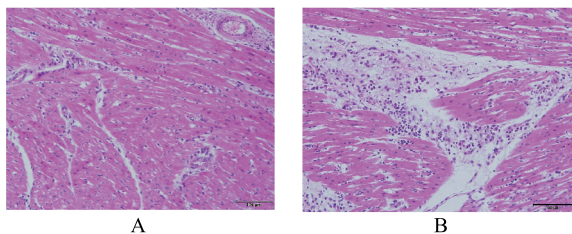


图 4 感染组仔猪心包积液

Fig.4 Pericardial effusion of infected piglet



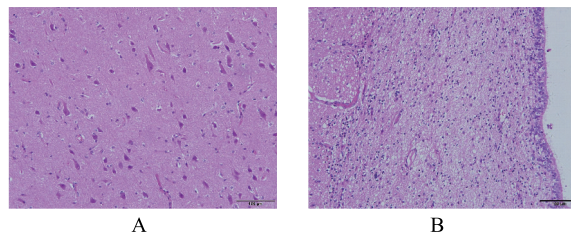
A: 对照组; B: 感染组。

图 5 心脏病理组织观察图 (×200)

Fig.5 Histological observation of piglet heart

3 讨论

在猪链球菌 33 个血清型中,猪链球菌 2 型 (Ss2) 最为流行,而且 Ss2 还是一种重要的人兽共患



A

B

A: 对照组; B: 感染组。

图 6 脑病理组织观察图 (×200)

Fig.6 Histological observation of piglet brain

病原菌。1998–1999 年和 2005 年分别在中国江苏省南通市和四川省资阳市、内江市等地发生人感染 Ss2 的疫情^[13]。除 Ss2 外,常见的能引起猪或人感染的猪链球菌还有 Ss3、Ss9 和 Ss7^[4], Ss3 是北美洲主要的流行血清型,特别是在美国, Ss3 的分离率甚至高于 Ss2^[14-15]。流行病学资料显示,在中国 Ss3 也是优势血清型之一^[6-8]。因此,系统开展 Ss3 分离菌的生物学特性和致病特性研究对指导猪链球菌病的防控非常必要。

本研究从急性死亡猪肺脏中分离到 JSHZ 菌株和 GD7 菌株,从健康猪扁桃体中分离到 H30 菌株,经鉴定均为 Ss3, 3 株菌株的菌落特征、菌体形态及生化特性基本一致,但 3 株菌株的 ST 序列分型却不同,分别属于 ST27 型、ST1004 型和 ST117 型。ST27 型为 Ss3 菌株常见的 ST 型^[1],有学者曾分离到 ST117 型的 Ss3 菌株^[10],也有学者曾分离到属于

ST117型的Ss2菌株^[10],而ST1004型为本研究最新鉴定和上传的ST型,说明Ss3的ST型呈现多样性。在生长特性方面,JSHZ菌株和GD7菌株生长较快,JSHZ菌株的对数生长期为培养后0~5 h,GD7菌株的对数生长期为培养后0~3 h;而H30菌株生长缓慢,没有明显的对数生长期,在生长平台期的活菌数仅能达到JSHZ菌株和GD7菌株的9.00%和7.89%,这种生长能力的差异是否与菌株的致病特性相关还有待进一步研究。小鼠致病性试验结果显示,虽然H30菌株对小鼠的致病性低于JSHZ菌株和GD7菌株,但仍表现出较强的致病性,说明健康猪也可能携带有致病性的Ss3菌株,并成为潜在的传染源。JSHZ菌株、GD7菌株和H30菌株均能引起部分小鼠出现神经症状,并能在其脑组织中分离到接种的相应菌株,表明Ss3可突破小鼠血脑屏障进入脑组织。

用JSHZ菌液注射仔猪,可导致仔猪出现体温升高、关节红肿、跛行、精神萎靡、食欲减少等典型的Ss临床症状。在感染早期,较高剂量组(每头仔猪注射菌数不低于 5×10^7 CFU)仔猪的血液中均能分离到接种的Ss3菌株,表明JSHZ菌株人工感染猪成功。在感染JSHZ菌株后,多数仔猪的临床症状仅持续2~3 d,但高剂量(每头猪注射菌数为 6×10^9 CFU)注射时有一头仔猪出现了猪链球菌急性病例中典型的神经症状,组织病理学检查发现明显出现血管套,大脑皮层局部胶质细胞增生,同时在其脑内分离到Ss3,表明Ss3 JSHZ菌株亦能突破猪血脑屏障。Ss3能人工感染猪,并能引起猪链球菌感染的典型症状和病理变化。

参考文献:

- [1] GOYETTE-DESJAIDINS G, AUGER J P, XU J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3:e45.
- [2] FENG Y J, ZHANG H M, WU Z W, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases[J]. *Virulence*, 2014, 5(4):477-497.
- [3] 刘海珠,袁晓明. 人猪链球菌感染的临床实验室诊断研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(5):490-493.
- [4] OH S I, JEON A B, JUNG B Y, et al. Capsular serotypes, virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from pigs in Korea[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79:780-787.
- [5] ZHANG C, ZHANG P, WANG Y, et al. Capsular serotypes, antimicrobial susceptibility, and the presence of transferable oxazolidinone resistance genes in *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247:108750.
- [6] WEI Z G, LI R, ZHANG A D, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 137:196-201.
- [7] 王巍. 四川地区猪链球菌流行调查及其病原特性研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2015.
- [8] 董志民,杨春蕾,田向学,等. 猪链球菌的分离鉴定及其致病性分子基础研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(2):96-100.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015年版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2016.
- [10] OKWUMABUA O, O'CONNOR M, SHULL E. A polymerase chain reaction(PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(1):79-84.
- [11] 周明瑶. 2015年苏南地区健康猪群猪链球菌流行病学调查[D]. 南京:南京农业大学, 2016.
- [12] KING S J, LEIGH J A, HEATH P J, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(10):3671-3680.
- [13] TANG J, WANG C, FENG Y, et al. Streptococcus toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3(5): e151.
- [14] MESSIER S, LACOUTURE S, GOTTSCHALK M, et al. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007 [J]. *Canadian Veterinary Journal*, 2008, 49(5):461-462.
- [15] GOTTSCHALK M, LACOUTURE S, BONIFAIT L, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/4):819-825.

(责任编辑:王妮)