

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.08.03

猪链球菌 2 型的分离鉴定及致病性试验

潘建刚, 张华伟, 陈波, 周明光, 王召贺, 徐高原*

(武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2020-05-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 08-0014-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 从全国部分猪场采集疑似猪链球菌感染病例脑样品 20 份进行细菌分离, 成功分离到 10 株细菌, 通过猪链球菌及血清类型鉴定, 最终确定其中一株为 2 型猪链球菌。应用猪链球菌 7 种主要毒力因子特异性基因扩增检测方法检测所分离到的 2 型猪链球菌的毒力因子分布情况, 并应用小鼠攻毒试验对其致病性进行观察研究。结果表明: 分离的 2 型猪链球菌具备 7 种毒力因子; 动物试验表明 SS2 能引起小鼠的急性败血症及脑膜炎; 细菌回归试验结果表明, 试验组死亡小鼠的脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏均有细菌定植, 且能分离出攻毒菌。此分离菌株的研究为研制 2 型猪链球菌病疫苗奠定了基础。

[关键词] 猪链球菌; 分离; 鉴定; 致病性

Isolation, Identification and Pathogenicity of *Streptococcus suis* Type 2

PAN Jian-gang, ZHANG Hua-wei, CHEN Bo, ZHOU Ming-guang, WANG Zhao-he, XU Gao-yuan*

(Wuhan Keqian Biology Co Ltd, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XU Gao-Yuan, E-mail: KQyanfa@163.com

Abstract: Twenty brain samples of pig with suspected infection by *Streptococcus suis* were collected from some pig farms in the country for bacterial isolation, and ten strains of bacteria were successfully isolated. One strain was *Streptococcus suis* type 2 through the identification. Seven major virulence factors specific gene amplification assays of *Streptococcus suis* were used to detect the distribution of the virulence factors in the isolated *Streptococcus suis* type 2, and the pathogenicity test was conducted to observe the pathogenicity of the mice. The results showed that the isolation of *Streptococcus suis* type 2 possessed 7 virulence factors; animal tests showed that *Streptococcus suis* type 2 could cause acute septicemia and meningitis in mice. The bacteria in brain, heart, liver, spleen, lungs and kidneys of the experimental group were all colonized and the challenge bacteria could be isolated. The study of the isolated strains laid the foundation for developing the vaccine of *Streptococcus suis* type 2.

Key words: *Streptococcus suis*; isolation; identification; pathogenicity

作者简介: 潘建刚, 硕士, 从事动物疫苗研发工作。

通讯作者: 徐高原。E-mail: KQyanfa@163.com

猪链球菌(*Streptococcus suis*)可引起猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症、肺炎和突然死亡^[1-2],严重危害着养猪业的发展。根据荚膜多糖抗原的差异,可将其分为 35 个血清型,即 1~34 及 1/2 型^[3]。对猪致病性较强的有猪链球菌 1 型、2 型、7 型和 9 型,尤其是猪链球菌 2 型,不仅对猪的致病性最强,而且可感染特定人群并致死,是一种重要的人畜共患病病原菌^[4]。本试验从我国部分猪场分离出 1 株 2 型猪链球菌,鉴定菌株 7 种毒力因子基因,并用分离菌株进行了小鼠致病性试验,以期 为猪链球菌 2 型疫苗的研究提供必要条件和有利数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 2014-2016 年从全国部分猪场采集疑似猪链球菌感染病例脑样品,脑组织有明显的肉眼可见出血,共 20 份。

1.1.2 猪链球菌培养基 TSA(Tryptic Soy Agar)、TSB(Tryptic Soy Broth)培养基购自 BD 生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 新生牛血清购自内蒙古金源康生物工程有限公司;革兰氏染液购自南京建成科技有限公司;引物合成及基因测序由擎科新业生物技术有限公司完成。

1.1.4 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.1.5 试验动物 18~22 g 的昆明鼠,购自湖北省实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离 将采集的 20 份脑样品,分别于无菌操作台中使用接种环挑取部分组织,均匀涂划在加有 5% 新生牛血清的 TSA 平板中,于 37℃ 条件下培养 24 h,观察结果。24 h 后于无菌条件下挑取平板上的疑似菌落划线接种于 5% 新生牛血清的 TSA 平板上,于 37℃ 条件下培养 24 h,观察细菌形态。

1.2.2 PCR 鉴定

1.2.2.1 DNA 提取 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,-20℃ 以下保存备用。

1.2.2.2 PCR 引物 选取猪链球菌属保守基因 *gdh*(谷氨酸脱氢酶),血清型特异性基因 *cas2J*(荚膜多糖)以及 7 种主要毒力因子 *fbps*(纤连蛋白原结合蛋白)、*sly*(溶血素)、*orf2*(毒力相关因子)、*mrp*(溶菌酶释放蛋白)、*89k*(毒力岛)、*gapdh*(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)和 *epf*(胞外因子)基因,参考文献设计引物^[5-9],引物序列见表 1。

表 1 猪链球菌引物

Tab 1 Primer of <i>Streptococcus suis</i>			
目的基因	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	片段大小/bp
<i>gdh</i>	F:TTCTGCAGCGTATTCTGTCAAACG	55	695
	R:TGTTCCATGGACAGATAAAGATGG		
<i>cas2J</i>	F:GTTCTTCAGATTCATCAACGGAT	56	387
	R:TATAAAGTTTGCAACAAGGGCTA		
<i>fbps</i>	F:ATCGATTCAITTTAAATAGGTTCTGCTCGC	55	2179
	R:GGTACCATTGTTGCTATTTGGACACCAGAA		
<i>sly</i>	F:GCTTTATTGCGTGCTGAC	55	1099
	R:CTGTCTCCACCACTCCC		
<i>orf2</i>	F:CAAGTGTATGTGGATGGG	56	858
	R:ATCCAGTTGACACGTGCA		
<i>mrp</i>	F:CAGATGTGGACCGTAGACC	58	316
	R:GGATAATCACCAGCAGGAA		
<i>89k</i>	F:TCGCCACTATGTTATCTGCTTA	56	720
	R:GATTGTGGACCATGCTCTTTAG		
<i>gapdh</i>	F:CAGTCAAAGCCCGCAACC	58	571
	R:CCACCGAAGCCAAGAGGT		
<i>epf</i>	F:GCTACGACGCCTCAGAAATC	55	626
	R:TGGATCAACCACTGCTTTAC		

1.2.2.3 PCR 检测及测序分析 PCR 扩增体系:10×buffer 5.0 μL,dNTP(2.5 mmol/L)4.0 μL,引物 P1(10 μmol/L)1.0 μL,引物 P2(10 μmol/L)1.0 μL,模板 DNA 2.0 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.25 μL,加注射用水至 50 μL;反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 终延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产

物,将该 PCR 产物连接 pMD18 - T 载体,送擎科新业生物技术有限公司测序,并与 BLAST 上的相关序列比较分析。

1.2.3 形态观察 按常规方法对分离菌株进行革兰氏染色,普通光学显微镜下观察菌体形态特征。

1.2.4 生长曲线的测定 分离菌株接种 TSB 液体培养基,37 ℃ 培养 8 ~ 10 h 作为种子液。再将上述种子液按培养基总体积的 2% 接种 TSB 培养基,于 37 ℃ 摇床 170 r/min 振荡培养。其间每隔 2 h 取样进行活菌计数,监测 24 h。

1.2.5 小鼠致病性试验 采用半数致死量(LD₅₀)评价分离菌的致病性,取 30 只雄性昆明小鼠,随机分为 6 组,每组 5 只,其中 5 组作为攻毒组,一组作为对照组。浓缩菌液,调整菌液初始浓度为 1.0 × 10¹⁰ CFU/mL,进行 10 倍倍比稀释,选取 10⁰ ~ 10⁻⁴ 5 个梯度,每个梯度攻毒一组小鼠,腹腔注射菌液 0.2 mL,对照组腹腔注射 0.2 mL 生理盐水。连续观察 14 d,记录各组死亡情况,对死亡小鼠立即解剖,观察病变情况,进行各脏器细菌分离、鉴定。根据 Reed - Muench 累加法计算分离菌株的 LD₅₀^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 细菌分离 20 份脑组织分别接种 TSA 平板,通过挑选可疑菌落,对其纯化,总共分出 10 株疑似菌株。在平板上可见灰白色、半透明、表面光滑、圆形、边缘整齐的小菌落。

2.2 细菌鉴定 分离的 10 株细菌,用猪链球菌属引物 gdh 进行 PCR 鉴定,其中 3 株能扩增出约 695 bp 大小的条带,分别回收 PCR 产物进行测序,在 NCBI 上进行 BLAST 比对,显示与猪链球菌对应的序列同源性在 95% 以上,说明分离菌株为猪链球菌(图 1)。

2.3 2 型猪链球菌 PCR 鉴定 3 株猪链球菌经过 cas2J 引物 PCR 鉴定,1 株能扩增出长度约为 387 bp 大小的条带,回收 PCR 产物进行测序,发现所测序列片段大小和预期片段大小相同,同时把测出的序列结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,显示与对应血清型的序列同源性在 95% 以上,说明所扩增的基因即为目的基因(图 2)。

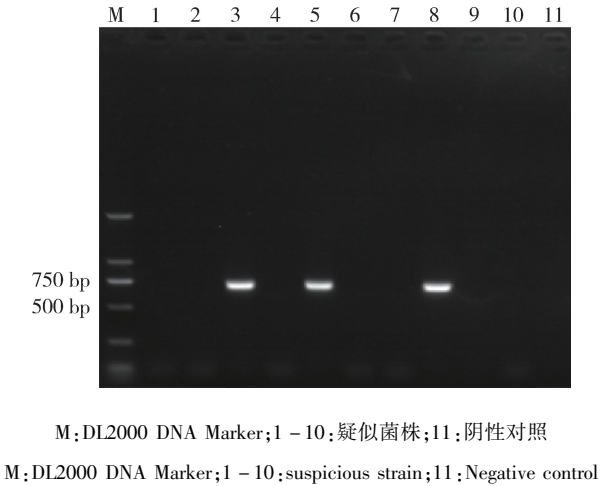


图 1 猪链球菌 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR identification results for *Streptococcus suis*

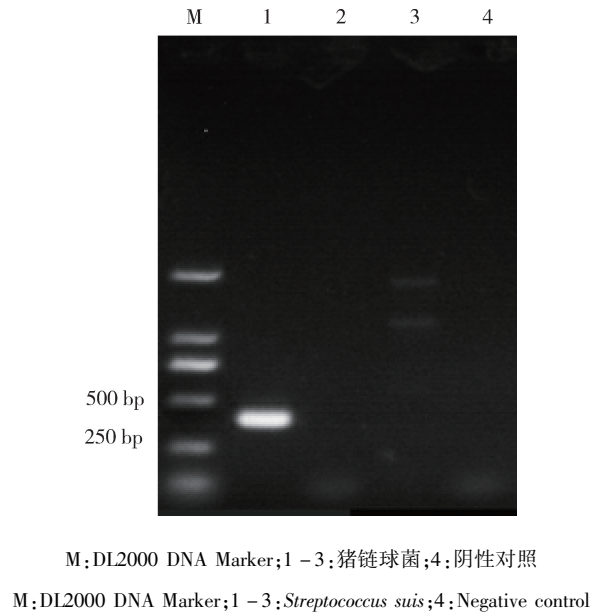


图 2 2 型猪链球菌 PCR 鉴定结果

Fig 2 PCR identification results for *Streptococcus suis* type 2

2.4 毒力因子鉴定 分离的 1 株 2 型猪链球菌通过 PCR 检测了 mrp、epf、sly、orf2、gapdh、fbps 和 89k 7 种毒力因子,结果 7 种毒力因子在分离菌株中都能检测到(图 3)。对上述菌株毒力基因测序分析,结果发现所测序列片段大小和预期片段大小相同,同时把测出的序列结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,显示与对应的毒力因子序列同源性在 95% 以上,说明所扩增的基因即为目的基因,分离菌株基因中几种主要毒力因子都有分布。

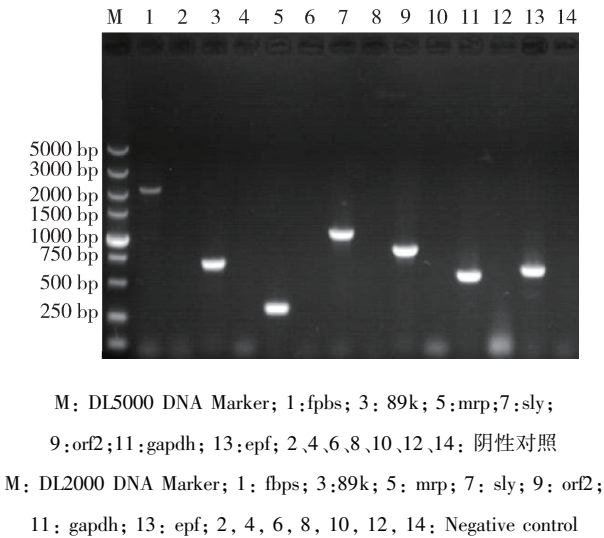


图3 分离菌株毒力因子 PCR 检测结果

Fig 3 PCR identification results for virulence genes of *Streptococcus suis*

2.5 形态学特性 分离的 2 型猪链球菌经过革兰氏染色后在显微镜下观察,细菌为革兰氏阴性细小杆菌,具有多种不同形态,可见单个的球杆菌、杆菌或丝状的菌体(图 4)。

2.6 生长曲线绘制 在液体 TSB 培养基中培养分离菌株,分离菌 6 h 左右开始进入对数生长期,培养 8 ~10 h 活菌数达到最高峰,但从 10 h 开始活菌数一直呈现下降趋势。分离菌株在 TSB 液体培养基繁殖速度快,活菌数高(图 5)。

2.7 小鼠攻毒试验 昆明小鼠腹腔注射不同浓度的菌液后,试验小鼠最早于攻毒后第 1 天开始出现死亡现象,死亡高峰出现在攻毒后 2 ~5 d,7 d 后停



图4 革兰氏染色结果(100 ×)

Fig 4 The results of Gram stain(100 ×)

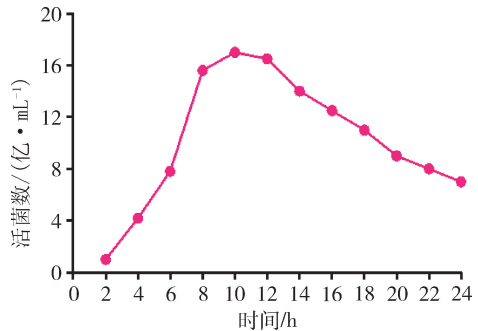


图5 2 型猪链球菌生长曲线

Fig 5 The growth curve of *Streptococcus suis* type 2

止死亡。按 Reed – Muench 法计算,分离 2 型猪链球菌的 LD₅₀ 见表 2。将浓缩菌液稀释到 4.8 × 10⁷ CFU/mL,攻毒 0.2 mL,能使半数小鼠发生死亡,表明分离菌株毒力较强。

表 2 半数致死量(LD₅₀) 试验结果

Tab 2 The results of LD ₅₀									
组别	浓缩后菌液浓度 /(CFU · mL ⁻¹)	攻毒剂量 /mL	每组试验 数量/只	昆明鼠死亡数量/只					LD ₅₀ /(CFU · mL ⁻¹)
				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
分离株	1.0 × 10 ¹⁰	0.2	5	5	5	3	1	0	4.8 × 10 ⁷
对照组	PBS	0.2	5	0	0	0	0	0	—

2.8 剖检观察 剖检攻毒死亡小鼠,可见攻毒小鼠腹腔内渗出液增多,脑和各脏器出血;试验结束后剖检空白对照组小鼠,可见健康对照组小鼠腹腔

及各器官正常。结果见图 6。分离的 2 型猪链球菌能引起小鼠的急性败血症及脑膜炎,导致小鼠死亡,成功在小鼠上建立攻毒模型。

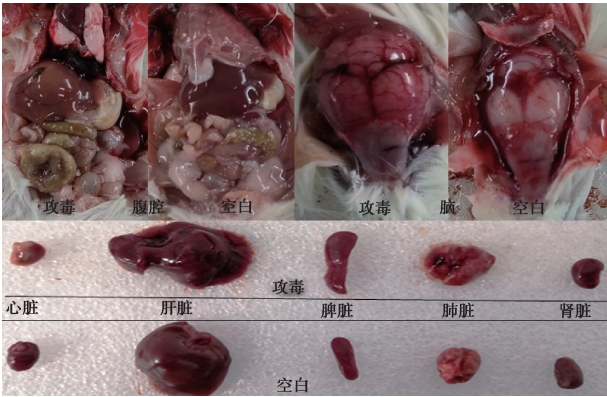


图 6 剖检结果

Fig 6 The results of anatomy

2.9 脏器细菌分离 剖检死亡小鼠,取各脏器在无菌操作台内进行细菌分离,结果显示攻毒后死亡小鼠各脏器均能分离出细菌。对各脏器分离的细菌进行 PCR 鉴定并测序,结果表明各脏器分离菌株均为攻毒 2 型猪链球菌(图 7)。

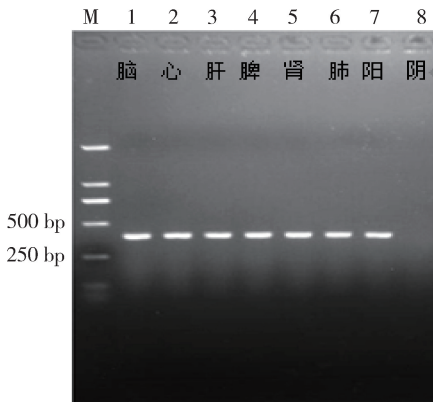


图 7 攻毒小鼠各脏器细菌分离鉴定

Fig 7 Isolation and identification of bacteria from various organs of challenged mice

3 讨论与小结

猪链球菌是一种重要的人畜共患病病原,其致病性差异很大,只有高致病力菌株才能引起猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症、肺炎和突然死亡等症状,低致病力和无致病力的菌株常见于猪的呼吸道。在致病性血清型中 2 型的致病力最强,发病率最高,流行范围最广,其致病性和它的毒力因子相关^[12-13]。现有疫苗菌株分离年代都比较久远,保

护效果有一定的降低。本研究采集最近几年疑似猪链球菌感染病例脑样品,经过平板分离和 PCR 鉴定成功获得一株 2 型猪链球菌,PCR 检测显示分离菌株基因中几种主要毒力因子都有分布,在 TSB 液体培养基繁殖速度快,活菌数高,能引起小鼠的急性败血症及脑膜炎导致小鼠死亡,证明分离株毒力强,是潜在的疫苗菌株。

参考文献:

[1] 简娟娟,刘利,王维. 猪链球菌 2 型感染的临床特征和治疗[J]. 现代畜牧科技, 2015(2): 68-69.

Jian J J, Liu L, Wang W. Clinical characteristics and treatment of *Streptococcus suis* type 2 infection [J]. Modern Animal Husbandry Science Technology, 2015(2): 68-69.

[2] 高尚庆,雷连成,韩文瑜. 猪链球菌 2 型基因工程疫苗研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(2): 33-35.

Gao S Q, Lei L C, Han W Y. Progress in the research of genetically engineering vaccine of *Streptococcus suis* type 2 [J]. Biotechnology Bulletin, 2007(2): 33-35.

[3] 马建华,魏建忠. 猪链球菌毒力因子研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(8): 95-99.

Ma J H, Wei J Z. Progress on virulence factors of *Streptococcus suis* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(8): 95-99.

[4] Kerdin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, et al. Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(5): 835-842.

[5] Goyette 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]. Emerging Microbes and Infections, 2014, 3(6): 45-46.

[6] Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, et al. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis* [J]. Future Microbiology, 2012, 7(2): 259-279.

[7] 鞠爱萍,王长军,郑峰,等. 江苏省中部地区猪链球菌主要致病血清型分子流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(2): 151-154.

Ju A P, Wang C J, Zheng F, et al. Study on molecular epidemiology of major pathogenic *Streptococcus suis* serotypes in middle part of Jiangsu province [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2008, 29(2): 151-154.

- [8] 赵战勤, 胡睿铭, 吴 斌, 等. 猪源链球菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(4): 376–381.
Zhao Z Q, Hu Z M, Wu B, *et al.* Isolation, identification and biological characterization of *Streptococcus suis* from swine in China [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2007, 38(4): 376–381.
- [9] 方勤美, 黄绍谦, 俞伏松, 等. 猪链球菌 2 型福建分离株的主要毒力基因分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(1): 65–68.
Fang Q M, Huang S Q, Yu F S, *et al.* Gentc analysis on the main virulence genes in the Fujian strain of *Streptococcus suis* type 2 from slaughtered pigs[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2010, 26(1): 65–68.
- [10] 李秀丽, 董志民, 燕晓翠, 等. 猪链球菌 2 型感染昆明小鼠模型的建立及评价[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(3): 206–214.
Li X L, Dong Z M, Ya X C, *et al.* Establishment and evaluation of the artificial infection model of *Streptococcus suis* type 2 in Kunming mice [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 46(3): 206–214.
- [11] Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, *et al.* Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for generation of capsular variation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2796–2806.
- [12] Seele J, Singpiel A, Spoerry C, *et al.* Identification of a novel host – specific IgM protease in *Streptococcus suis* [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(5): 930–940.
- [13] Segura M, Zheng H, Greeff A, *et al.* Latest developments on *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen: part I [J]. Future Microbiology, 2014, 9(4): 441–444.

(编 辑:李文平)