

猪链球菌血清 4 型毒力株鉴定多重 PCR 方法的建立

朱金鲁^{1,2,3}, 彭泽仁^{1,2,3}, 庄鸿琨^{1,2,3}, 孙洁⁴, 吴宗福^{1,2,3,5*}

1 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京

2 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京

3 世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京

4 深圳海关动植物检验检疫技术中心, 广东 深圳

5 广东省养猪与猪病防控技术研究企业重点实验室, 广东海大畜牧兽医研究院, 广东 广州

朱金鲁, 彭泽仁, 庄鸿琨, 孙洁, 吴宗福. 猪链球菌血清 4 型毒力株鉴定多重 PCR 方法的建立[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3782-3793.

ZHU Jinlu, PENG Zeren, ZHUANG Hongkun, SUN Jie, WU Zongfu. A multiplex PCR method for identification of virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 4[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3782-3793.

摘要:猪链球菌(*Streptococcus suis*)不仅是猪的重要致病菌, 还是一种人兽共患病原体。该菌血清型众多, 其中血清 4 型(SS4)属于可感染人类的血清型, 因其潜在的高致病性, 对公共卫生构成威胁。【目的】开发一种基于 SS4 毒力株特有毒力相关基因的多重 PCR 方法, 以实现 SS4 毒力株的精准鉴定。【方法】基于前期研究, 选择 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 这 4 个 SS4 毒力株特有的靶基因, 结合 SS4 血清型特异基因 *wzy* 作为内参基因, 设计了一套五重 PCR 方法。通过优化多重 PCR 扩增体系, 进行了特异性和敏感性试验, 并应用该方法检测新分离的 SS4 菌株。同时, 结合斑马鱼毒力试验验证该方法的准确性。【结果】该多重 PCR 方法能特异性扩增靶基因, 有效区分 SS4 毒力株与弱毒株。其敏感性高, 最低可检测到 4.1×10^2 CFU 的菌落数或 12.5 pg 的基因组 DNA。特异性验证表明, 该方法能准确辨识 SS4 毒力株。利用该方法检测临床分离的 6 株 SS4 菌株: 3 株菌株被鉴定为毒力株, 对斑马鱼的致病性较高, 死亡率为 60.00%–86.67%; 3 株被鉴定为弱毒株的菌株对斑马鱼的致病性低, 死亡率为 0–6.67%。【结论】本研究开发了一种基于猪链球菌毒力相关基因的多重 PCR 方法, 能够准确、灵敏地鉴定 SS4 毒力株, 为猪链球菌病的早期诊断和有效防控提供了技术支撑。

关键词:猪链球菌; 血清 4 型; 毒力株; 多重 PCR

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800503); 深圳市科技计划(KCXFZ20230731094003006)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800503) and the Shenzhen Science and Technology Program (KCXFZ20230731094003006).

*Corresponding author. E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

Received: 2025-02-19; Accepted: 2025-03-19; Published online: 2025-05-26

A multiplex PCR method for identification of virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 4

ZHU Jinlu^{1,2,3}, PENG Zeren^{1,2,3}, ZHUANG Hongkun^{1,2,3}, SUN Jie⁴, WU Zongfu^{1,2,3,5*}

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

2 Key Lab of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing, Jiangsu, China

3 WOA Reference Lab for Swine Streptococcosis, Nanjing, Jiangsu, China

4 Animal and Plant Inspection and Quarantine Technology Centre of Shenzhen Customs, Shenzhen, Guangdong, China

5 Guangdong Provincial Key Laboratory of Research on the Technology of Pig-breeding and Pig-disease Prevention, Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: *Streptococcus suis* is a major pathogen in pigs and also a zoonotic pathogen. This bacterium has numerous serotypes, among which *S. suis* serotype 4 (SS4) is known to infect humans and poses a threat to public health due to its potential high pathogenicity. **[Objective]** To develop a multiplex PCR method based on specific virulence-associated genes of SS4 virulent strains to achieve precise identification of such strains. **[Methods]** Based on previous research results, four target genes specific to SS4 virulent strains—*sly*, *igdE*, *tran*, and *sao*—were selected, and the SS4 serotype-specific gene *wzy* was used as an internal reference gene to design a pentaplex PCR method. After optimization of the multiplex PCR amplification system, specificity and sensitivity tests were conducted. This method was then employed to detect newly isolated SS4 strains. Additionally, zebrafish virulence assays were performed to validate the accuracy of this method. **[Results]** The multiplex PCR method specifically amplified the target genes, effectively distinguishing SS4 virulent strains from lowly virulent strains. The method exhibited high sensitivity, with a minimum detection limit of 4.1×10^2 CFU or 12.5 pg of genomic DNA. Specificity validation confirmed that this method accurately identified SS4 virulent strains. This method was then employed to examine six clinically isolated SS4 strains. Three strains were identified as virulent, showing high pathogenicity in zebrafish and causing a mortality rate of 60.00%–86.67%. The other three strains were identified as lowly virulent strains, exhibiting low pathogenicity in zebrafish and causing a mortality rate of 0–6.67%. **[Conclusion]** A multiplex PCR method based on virulence-associated genes of *S. suis* was successfully developed, enabling accurate and sensitive identification of SS4 virulent strains. This method provides technical support for the early diagnosis and effective prevention and control of *S. suis* infections.

Keywords: *Streptococcus suis*; serotype 4; virulent strains; multiplex PCR

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是世界范围内猪链球菌病的主要病原体,可引起猪的败血症、脑膜炎和猝死,对养猪业造成严重的经济损失^[1]。此外,该菌还是一种人兽共患病原体,对与感染猪或猪肉密切接触的人群构成潜在威胁,

对公共卫生构成严重威胁^[2]。猪链球菌血清型众多,基于荚膜多糖抗原的差异可分为29个传统血清型(1–19、21、23–25、27–31、1/2)^[3]。此外,基于荚膜基因簇的差异,近年来发现了Chz血清型和33种新荚膜基因簇菌株(NCL1–21a,

21b-32)^[4-6]。截至目前,已有 11 个血清型被报道可引起人类感染,包括血清 1、2、4、5、7、9、14、16、21、24 和 31 型^[7-8]。

猪链球菌不同的血清型在种群结构和致病性方面表现出不同的特征^[9-11]。流行病学监测数据显示,猪链球菌血清 4 型(SS4)的致病性备受关注,且该血清型还可感染人类^[12-15]。本课题组最近研究发现 SS4 种群具有显著的多样性,最小核心基因组(minimum core genome, MCG)分群可分为 MCG 1、2、3、4、7-2 和 7-3^[11]。值得注意的是,61.90% 的菌株(78/126)归类于 MCG 1 和 MCG 3,具有潜在的人兽共患风险,尤其是属于克隆复合体(clonal complexes, CCs) CC17、CC94 和 CC839 的毒力株^[11]。此外,分析 SS4 种群中 35 个重要毒力相关基因的分布,发现 SS4 菌株的致病表型与毒力相关基因的分布存在显著关联,其中毒力株特异性地携带了 *mrp*、*sly*、*ofs*、*sao*、*dltA*、*Ide_{Ssuis}*、*igdE* 和 *tran* 这 8 个重要毒力相关基因^[11,16-17],提示这些基因可作为 SS4 毒力株的分子标志。进一步通过对这些毒力相关基因进行毒力株间的多序列比对,筛选出 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 这 4 个基因,这些基因具有适合设计多重 PCR 引物的保守序列。

鉴于 SS4 的致病性及潜在的公共卫生威胁,有必要建立一种简便、准确鉴别 SS4 毒力株的方法。因此,本研究以 SS4 毒力株特有的毒力相关基因 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 作为靶基因,并结合 SS4 血清型特异基因 *wzy*,设计一种多重 PCR 方法用于 SS4 毒力株的准确鉴定,以期为 SS4 的监测和防控提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养条件

本研究采用的猪链球菌菌株信息详列于表 1,菌株均由本实验室保存。其中包括 SS4 毒力株 ND90、WUSS406、2018WUSS011、ID36054、2021WUSS075、2018WUSS156、WUSS346、

2018WUSS160,弱毒株 2018WUSS056、2020WUSS059、2022WUSS018、2022WUSS019、2022WUSS056、2022WUSS141、WUSS309、WUSS399,其毒力已在先前的研究中通过动物感染试验得以确认^[11]。菌株 ND90 由中国疾病预防控制中心郑翰博士惠赠,菌株 ID36054 由泰国 Kasetsart 大学 Anusak Kerdsin 博士惠赠,其余菌株均由本课题组分离。在本研究中,所有菌株均在含有 5% 无菌绵羊血的 Todd Hewitt Broth (THB)培养基平板上,于 37 °C、5% CO₂ 条件下进行划线培养。随后,将单菌落转移至 THB 液体培养基中,在 37 °C、180 r/min 条件下培养。

1.2 主要试剂

THB 培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;DNA 聚合酶预混液(Rapid Taq Plus DNA Polymerase)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

1.3 靶基因序列分析及引物设计

选取毒力相关基因 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 作为多重 PCR 靶基因,使用 MultAlin 工具(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)对不同 SS4 毒力株中相同毒力基因进行多序列比对以鉴定适合设计引物的保守区域。SS4 血清型特异性 *wzy* 基因作为多重 PCR 的内参,以判断试验的有效性。靶基因序列可参考 SS4 毒力株 ID36054 基因组(登录号:CP109939.1)中 *sly* (位点:OHM47_03295)、*igdE* (位点:OHM47_07760)、*tran* (位点:OHM47_02510)、*sao* (位点:OHM47_03445)和 *wzy* (位点:OHM47_01070)。使用 PrimerPlex 软件设计五重 PCR 引物(表 2),引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成,浓度均为 10 μmol/L。

1.4 多重 PCR 体系建立

1.4.1 单重 PCR 扩增

以表 2 中 *sly*-F/R、*igdE*-F/R、*wzy*-F/R、

表1 本研究所用*Streptococcus suis*菌株信息Table 1 The information of *Streptococcus suis* strains used in this study

Strains	Serotype	Date	Host	Isolation source	Virulence level
ND90	4	2014	Diseased pig	Lung	V
WUSS406	4	2017	Healthy pig	Tonsil	V
2018WUSS011	4	2018	Healthy pig	Tonsil	V
2021WUSS075	4	2021	Healthy pig	Tonsil	V
2018WUSS156	4	2018	Diseased pig	/	V
ID36054	4	2011	Homo sapiens	Blood	V
WUSS346	4	2017	Healthy pig	Tonsil	V
2018WUSS160	4	2018	Diseased pig	Spleen	V
WUSS309	4	2017	Healthy pig	Tonsil	L
WUSS399	4	2017	Healthy pig	Tonsil	L
2018WUSS056	4	2018	Healthy pig	Tonsil	L
2020WUSS059	4	2020	Healthy pig	Tonsil	L
2022WUSS018	4	2022	Healthy pig	Tonsil	L
2022WUSS019	4	2022	Healthy pig	Tonsil	L
2022WUSS056	4	2022	Healthy pig	Tonsil	L
2022WUSS141	4	2022	Healthy pig	Tonsil	L
2023WUSS108	1/2	2023	Healthy pig	Tonsil	/
2023WUSS142	1	2023	Healthy pig	Tonsil	/
ZJWUSS065	2	2024	Diseased pig	Brain	/
SZWUSS009	3	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS051	5	2024	Healthy pig	Tonsil	/
2023WUSS088	6	2023	Healthy pig	Tonsil	/
2023WUSS049	7	2023	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS056	8	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS029	9	2024	Healthy pig	Tonsil	/
2022WUSS024	14	2022	Healthy pig	Tonsil	/
ZJWUSS044	4	2024	Diseased pig	Lung	/
SZWUSS010	4	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS047	4	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS048	4	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS0137	4	2024	Healthy pig	Tonsil	/
SZWUSS0138	4	2024	Healthy pig	Tonsil	/

V: Virulent strains; L: Lowly virulent strains; /: Unclassified.

tran-F/R 和 sao-F/R 为引物, 分别以 SS4 毒力株 2021WUSS075 和弱毒株 2022WUSS056 的细菌培养液($OD_{600}=0.6$)为模板进行单重 PCR 扩增。单重 PCR 扩增体系(25 μ L): Rapid *Taq* Plus DNA Polymerase 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)

各 0.75 μ L, 模板 2.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物鉴定: 1% 琼脂糖凝胶, 加样 5 μ L, 电压 180 V, 电泳 15 min。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primer used in the study

Target genes	Annotation/Function	Primers name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
sly	Suilysin	sly-F	ACTTACGAGCCACAAGAGATT	1 048
		sly-R	CACTGCTATTATGGACTGTTGA	
igdE	Cysteine protease IgdE	igdE-F	GCTTCCTGCTTATGTTGTTGTTG	840
		igdE-R	GCTGAGATTGTTTCCTGTGTTGA	
wzy	Wzy polymerase	wzy-F	GACTGGTTATTTGACAGCGATT	604
		wzy-R	AACAGTGGCAAGCAATACAAAG	
tran	Transcriptional regulator	tran-F	GGTTC AAGACTGGAAGAATTACGA	453
		tran-R	GAGGAGATTGGCATTATCAACTGA	
sao	Surface antigen one	sao-F	ATGGTGGACTTGCGCATATT	208
		sao-R	GTCATTGCTTCCTTAGAGACTT	

1.4.2 多重 PCR 扩增

采用表 2 中的引物，上游引物和下游引物分别按照浓度 1:1:1:1:1 比例混合，分别以 SS4 毒力株 2021WUSS075 和弱毒株 2022WUSS056 的细菌培养液($OD_{600}=0.6$)为模板，进行五重 PCR 扩增。五重 PCR 扩增体系(50 μ L): Rapid Taq Plus DNA Polymerase 25 μ L，上游混合引物 F 7.5 μ L，下游混合引物 R 7.5 μ L，模板 5 μ L，ddH₂O 5 μ L。PCR 扩增程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；98 $^{\circ}$ C 变性 10 s，56 $^{\circ}$ C 退火 30 s，68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，35 个循环；68 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物鉴定：1% 琼脂糖凝胶，加样 8 μ L，电压 180 V，电泳 20 min。

1.5 多重 PCR 体系的敏感性与特异性评估

按照 1.4.2 节中多重 PCR 扩增体系和扩增程序，分别以 SS4 毒力株 2021WUSS075 的细菌培养液($8.2 \times 10^2 - 8.2 \times 10^7$ CFU/mL)和基因组 DNA (0.025 μ g/ μ L–2.500 μ g/ μ L)为模板，进行五重 PCR 扩增，检测多重 PCR 体系的敏感性。Murray 等^[18]的研究揭示了 10 个猪链球菌的致病谱系，并指出其中血清 1、1/2、2、3、5、6、7、8、9 及 14 型与疾病相关且广泛流行。因此，在针对猪链球菌不同血清型特异性评估试验中，选择了这 10 种血清型的菌株作为对照株，菌株

信息详见表 1。此外，在针对非猪链球菌特异性评估试验中，以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、副猪格拉菌(*Glaesserella parasuis*)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、巴氏链球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)以及无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)作为对照株进行检测。

1.6 临床菌株多重 PCR 检测及斑马鱼毒力试验

采用表 2 中的引物，按照 1.4.2 节中多重 PCR 方法对实验室新分离的 SS4 菌株进行毒力株的多重 PCR 鉴定，并进行斑马鱼毒力试验。动物感染实验在南京农业大学实验动物中心进行[许可证号：SYXK(苏)2021-0086]。斑马鱼毒力试验参考文献[11,19-20]中描述的方法，在细菌对数生长期中期收集菌体，使用 PBS 洗涤 2 次，然后调整至适当的感染浓度。每个实验组包含 15 条斑马鱼，每条鱼感染剂量为 3×10^6 CFU，记录从感染后 12–96 h 的死亡率。在动物感染实验中，设置猪链球菌血清 2 型毒力株 SC070731^[21]、猪链球菌血清 9 型无毒株 SH040917^[22]，以及等体积的 PBS 作为对照。

2 结果与分析

2.1 靶基因选择及 PCR 扩增

如图 1 所示, 比对 8 株毒力株 (ND90、WUSS406、2018WUSS011、ID36054、2021WUSS075、2018WUSS156、WUSS346、2018WUSS160) 和 8 株弱毒株 (2018WUSS056、2020WUSS059、2022WUSS018、2022WUSS019、2022WUSS056、2022WUSS141、WUSS309、WUSS399) 的毒力相关基因分布, 毒力株相较于弱毒株, 特异性地携带有 *mrp*、*sly*、*ofs*、*sao*、*dltA*、*Ide_{Ssuis}*、*igdE* 和 *tran* 这 8 个毒力相关基因。进一步对这些毒力基因进行多序列比对后, 筛选出 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 这 4 个基因, 它们具有适合设计多重 PCR 引物的保守序列。因此, 选择这 4 个毒力相关基因, 并结合 SS4 血清型特异性 *wzy* 基因作为多重 PCR 的内参, 建立多重 PCR 方法。

采用表 2 中的引物, 针对靶基因 *sly*、*igdE*、*wzy*、*tran* 和 *sao* 进行了单重 PCR 和五重 PCR

扩增。首先, 以 SS4 毒力株 2021WUSS075 的细菌培养液为模板进行扩增。如图 2A 所示, 单重 PCR 扩增针对这 5 个靶基因均成功获得了预期大小且具有特异性的 PCR 产物, 泳道 1-5 分别对应基因 *sao* (208 bp)、*tran* (453 bp)、*wzy* (604 bp)、*igdE* (840 bp) 和 *sly* (1 048 bp)。在五重 PCR 的结果中, 泳道 6 观察到了 5 种预期大小的 PCR 产物, 它们自上而下分别对应基因 *sly*、*igdE*、*wzy*、*tran* 和 *sao*。相比之下, 以 SS4 弱毒株 2022WUSS056 的细菌培养液为模板进行扩增。如图 2B 所示, 在单重 PCR 和五重 PCR 扩增中, 仅内参基因 *wzy* 产生了预期大小的 PCR 产物, 其余靶基因均未产生 PCR 产物。这些结果表明, 本研究设计的引物具有高度的特异性, 能够准确地扩增出目标基因。同时, 通过五重 PCR 方法能够有效区分 SS4 毒力株与弱毒株。

2.2 五重 PCR 体系敏感性和特异性评估

如图 3 所示, 在多重 PCR 检测敏感性评估

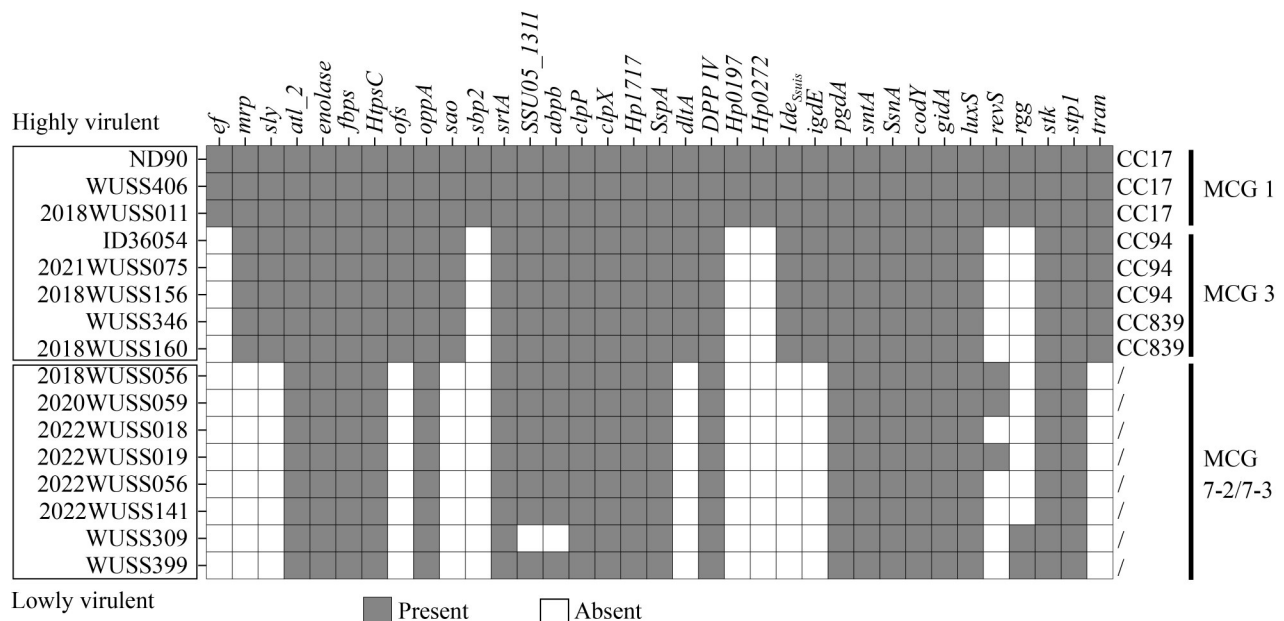


图1 猪链球菌4型毒力株与弱毒株毒力相关基因分布

Figure 1 Distribution of virulence-associated genes in virulent and lowly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 4.

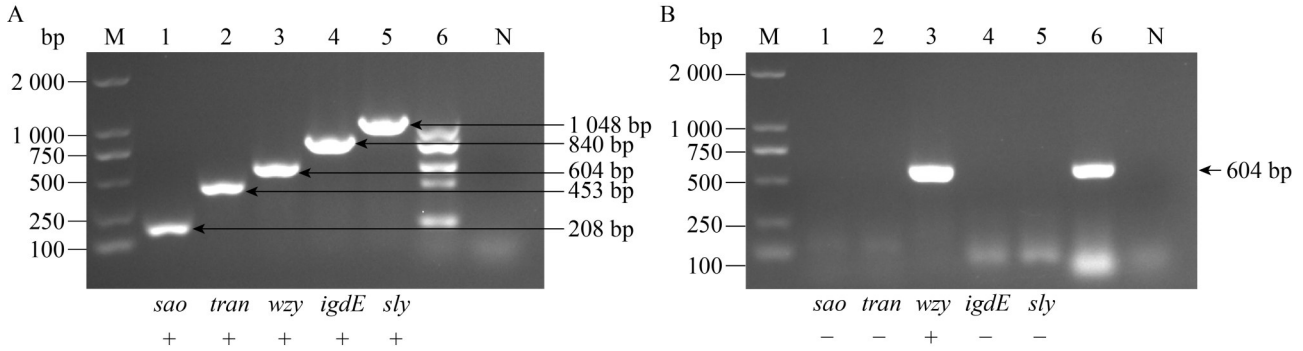


图2 单重PCR和五重PCR扩增。 A: 猪链球菌4型毒力株2021WUSS075为模板进行单重PCR (泳道1-5)和五重PCR (泳道6)扩增; B: 以猪链球菌4型弱毒株2022WUSS056为模板进行单重PCR (泳道1-5)和五重PCR (泳道6)扩增。M: DL2000 DNA marker; N: 空白对照(以H₂O为模板); -代表无特异性目的条带; +代表有特异性目的条带。

Figure 2 The results of single plex PCR and multiplex (5-plex) PCR amplification. A: Single plex PCR (lanes 1-5) and multiplex PCR (5-plex, lane 6) amplification using the virulent strain 2021WUSS075 of *S. suis* serotype 4 as the template; B: Single plex PCR (lanes 1-5) and multiplex PCR (5-plex, lane 6) amplification using the lowly virulent strain 2022WUSS056 of *S. suis* serotype 4 as the template. M: DL2000 DNA marker; N: Blank control (H₂O as template); -: The absence of specific target bands; +: The presence of specific target bands.

试验中,以SS4毒力株2021WUSS075的细菌培养液(浓度范围为 8.2×10^2 – 8.2×10^7 CFU/mL)和基因组DNA(浓度范围为0.025 pg/μL至2.5 ng/μL)为模板,进行五重PCR扩增。结果显示,该五重PCR体系的最低检测限度为 4.1×10^2 CFU菌落数(图3A,泳道4)和12.5 pg的基因组DNA(图3B,泳道4)。在多重PCR特异性评估试验中,不同血清型菌株的扩增结果呈现差异。如图3C所示,血清1、2、14型菌株的扩增产物包含4条特异性条带,自上而下分别对应毒力基因*sly*、*igdE*、*tran*和*sao*。血清1/2、3、7、9型菌株的扩增产物仅显示2条条带,对应基因*igdE*和*sao*。血清型5、6、8菌株未观察到任何扩增产物。血清型4菌株特异性扩增出5条条带,且为唯一呈现全部5种目标条带的血清型。此外,以大肠杆菌、副猪格拉菌、胸膜肺炎放线杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌属、巴氏链球菌、马链球菌兽疫亚种以及无乳链球菌作为对照菌株进行检测,结果显示所有对照菌株均未出现特异性扩增产物(图3D)。上述结果表明,

本研究所建立的多重PCR方法对SS4毒力株具有高度特异性,能够通过独特的5条扩增条带与其他血清型菌株明确区分,验证了该方法在血清4型鉴定中的可靠性和特异性。

2.3 鉴定新分离SS4菌株

用建立的多重PCR检测临床分离的6株SS4菌株,如图4所示,菌株ZJWUSS044、SZWUSS047和SZWUSS048扩增出5个基因,归为毒力株;而菌株SZWUSS010、SZWUSS0137和SZWUSS0138仅扩增出内参基因*wzy*,其余靶基因均未检测到,归为弱毒株。

2.4 斑马鱼毒力试验

斑马鱼毒力试验显示,3株经多重PCR鉴定为毒力株的ZJWUSS044、SZWUSS047、SZWUSS048对斑马鱼致病性较强,斑马鱼死亡率分别为86.67%、86.67%、60.00%;3株经多重PCR鉴定为弱毒株的SZWUSS010、SZWUSS0137和SZWUSS0138对斑马鱼致病性较低,死亡率分别为0、0和6.67%(表3)。这表明该方法可

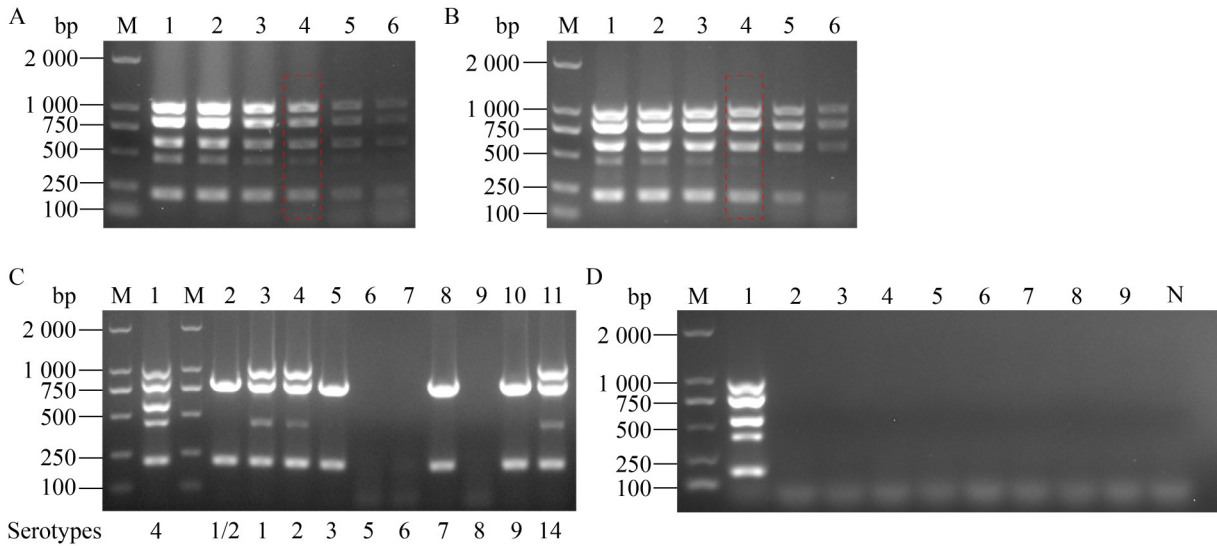


图3 多重PCR的敏感性与特异性。 A: 以毒力株2021WUSS075细菌培养液为模板(泳道1–6: 4.1×10^5 、 4.1×10^4 、 4.1×10^3 、 4.1×10^2 、 4.1×10^1 、 4.1×10^0 CFU); B: 以毒力株2021WUSS075基因组DNA为模板(泳道1–6: 12.5 ng、1.25 ng、0.125 ng、12.5 pg、1.25 pg、0.125 pg); C: 针对猪链球菌不同血清型的多重PCR特异性验证(泳道1–11: 血清4型2021WUSS075、1/2型2023WUSS108、1型2023WUSS142、2型ZJWUSS065、3型SZWUSS009、5型SZWUSS051、6型2023WUSS088、7型2023WUSS049、8型SZWUSS056、9型SZWUSS029、14型2022WUSS024); D: 针对非猪链球菌的多重PCR特异性验证[泳道1–9: 阳性对照(猪链球菌4型菌株2021WUSS075)、大肠杆菌、副猪格氏菌、胸膜肺炎放线杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌属、巴氏链球菌、马链球菌兽疫亚种以及无乳链球菌; N: 空白对照(以H₂O为模板)]。

Figure 3 Sensitivity and specificity of multiplex PCR. A: Using the bacterial culture of virulent strain 2021WUSS075 as the template (Lanes 1–6: 4.1×10^5 , 4.1×10^4 , 4.1×10^3 , 4.1×10^2 , 4.1×10^1 , and 4.1×10^0 CFU); B: Using the genomic DNA of virulent strain 2021WUSS075 as the template (Lanes 1–6: 12.5 ng, 1.25 ng, 0.125 ng, 12.5 pg, 1.25 pg, and 0.125 pg); C: Specificity of multiplex PCR for different *S. suis* serotypes (Lanes 1–11: serotype 4 (2021WUSS075), serotype 1/2 (2023WUSS108), serotype 1 (2023WUSS142), serotype 2 (ZJWUSS065), serotype 3 (SZWUSS009), serotype 5 (SZWUSS051), serotype 6 (2023WUSS088), serotype 7 (2023WUSS049), serotype 8 (SZWUSS056), serotype 9 (SZWUSS029), and serotype 14 (2022WUSS024)); D: Specificity of multiplex PCR against non-*S. suis* strains (Lanes 1–9: Positive control (*S. suis* serotype 4 strain 2021WUSS075), *E. coli*, *G. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *S. pasteurianus*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, and *S. agalactiae*; N: Blank control (H₂O as template)).

较为准确鉴定 SS4 毒力株。

3 讨论与结论

猪链球菌存在多种致病血清型, 大多数研究仍主要集中在血清 2 型, 而其他致病血清型的研究相对较少。近年来的研究表明, 猪链球菌血清 4 型(SS4)的致病性及其流行病学特征正

日益受到关注。全球多国监测数据显示, SS4 已呈现出显著的地域性流行趋势。在中国、韩国和加拿大, SS4 在发病猪中的检出率排名第三, 分别占临床分离株的 5.6%–5.9%^[1,23]; 德国在 1996–2004 年和 2015–2016 年的 2 次调查中, SS4 的占比均超过 10%^[12]。值得注意的是, 动物感染模型揭示了该血清型具有强致病潜力,

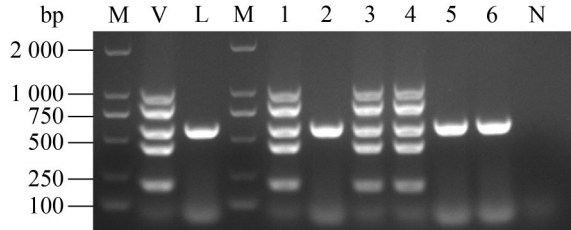


图4 猪链球菌4型新分离株的多重PCR鉴定。V代表毒力株对照；L代表弱毒株对照；泳道1–6：猪链球菌4型新分离菌株ZJWUSS044、SZWUSS010、SZWUSS047、SZWUSS048、SZWUSS0137、SZWUSS0138；N：空白对照(以H₂O为模板)。

Figure 4 The results of multiplex PCR for newly isolated strains of *Streptococcus suis* serotype 4. V indicates a virulent strain control; L indicates a lowly virulent strain control; Lanes 1–6: Newly isolated strains of *S. suis* serotype 4, namely ZJWUSS044, SZWUSS010, SZWUSS047, SZWUSS048, SZWUSS0137, and SZWUSS0138; N: Blank control (H₂O as template).

66.67% 的 SS4 代表菌株对斑马鱼的致死率超过 50%，且 35% 的猪源分离株对小鼠的致病性与人源 SS4 致病株 ID36054 相当^[11]。这些证据表明，SS4 不仅在全球养猪业中持续构成威胁，而且作为一种潜在的人兽共患病风险源，需要加

强对其的监测。

猪链球菌能够产生多种毒力相关因子，不同菌株中这些因子的种类和数量存在差异。前期研究发现，SS4 毒力株特异性地携带有 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 这 4 个在致病过程中具有重要作用的毒力相关基因。这些基因分别编码溶血素(suilsin, Sly)、猪链球菌免疫球蛋白 G 分解酶(IgdE)、表面蛋白 Sao 和转录调控因子 Tran，它们在猪链球菌的致病机制中发挥着重要作用。Sly 是一种由猪链球菌产生的胆固醇依赖性穿孔毒素，在猪链球菌的致病过程中发挥关键作用，被广泛认为是该菌毒力的关键标志物^[24]。Sly 通过在宿主细胞膜上形成孔洞，导致细胞裂解，对多种细胞类型具有广泛的细胞毒性作用，包括上皮细胞、内皮细胞和免疫细胞^[25-27]。此外，Sly 还能影响宿主的补体系统，有助于猪链球菌的免疫逃避，并可能改变宿主的血脑屏障，促进病原菌诱导脑膜炎等疾病^[24,28]。IgdE 对 IgG 具有蛋白水解活性，且对猪 IgG 显示出高度特异性，表明 IgdE 可能是一种新型且重要的毒力相关因子^[29]。Sao 蛋白在猪链球菌中高度保守，是一种表面蛋白，不仅存在于血清 2 型菌株中，也在多种致病性血清型中广泛分布^[30]。Sao 还能够诱导宿主产生强烈的免疫反应，因此常被选

表3 斑马鱼毒力试验

Table 3 The results of the zebrafish infection experiment

Strains	Deaths in each period								Total deaths	Mortality rate (%)	P value	Significance
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h				
ZJWUSS044	1	4	6	0	2	0	0	0	13	86.67	0.000 6	***
SZWUSS010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****
SZWUSS047	2	4	6	0	1	0	0	0	13	86.67	0.003 2	**
SZWUSS048	2	4	2	1	0	0	0	0	9	60.00	0.001 5	**
SZWUSS0137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****
SZWUSS0138	0	0	0	1	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****
SC070731	5	9	1	0	0	0	0	0	15	100.00	–	–
SH040917	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****

The survival outcome of serotype 4 strains for zebrafish was compared with that of the highly pathogenic strain SC070731 using the Log-rank (Mantel-Cox) test. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.000 1$.

作疫苗设计的候选蛋白以及诊断猪链球菌感染的标志物^[31-32]。转录调节因子 *Tran* 参与猪链球菌细胞代谢和应激耐受, 调控多种毒力相关因子^[17,33]。基因 *tran* 缺失会导致 130 个基因的表达发生变化, 对环境应激的耐受性下降, 与上皮细胞的黏附能力减弱, 并且在斑马鱼模型中的毒力显著降低, 表明 *Tran* 是猪链球菌致病性的一个关键调控因子^[33]。此外, 在前期的研究中, 对 126 个 SS4 基因组中重要毒力相关基因的分布情况进行了系统分析。研究表明, *sly*、*igdE*、*sao* 和 *tran* 与其他关键毒力相关基因存在显著的连锁特征: 携带这 4 个毒力相关基因的 SS4 毒力株同时具有多个重要的毒力相关基因, 包括 *ef*、*mrp*、*ofs*、*Ide_{Ssuis}*、*sbp2*、*dltA*、*hp0197*、*hp0272* 和 *rgg*^[11]。值得注意的是, 其中 *mrp*、*Ide_{Ssuis}*、*sbp2*、*hp0197*、*hp0272* 和 *rgg* 基因已被证实具有人兽共患潜能^[34]。综上所述, *sly*、*igdE*、*sao* 和 *tran* 这 4 种毒力基因因其重要的致病作用和 SS4 毒力株中的特异性携带, 适合作为鉴定 SS4 毒力株的靶基因。

本研究的特异性试验结果显示, 部分非 SS4 血清型菌株能够扩增出全部或部分毒力基因条带。这一现象可能与不同血清型中毒力基因的保守性差异有关。例如, 毒力基因 *sly* 和 *sao* 不仅存在于血清 2 型菌株中, 还广泛分布于多种具有致病性的血清型^[30,35]。本研究中某些血清 1、2、14 型菌株的 4 种毒力基因均呈阳性, 提示这些菌株可能具有毒力。然而, 毒力相关基因的表达水平可能会因血清型背景的差异而有所不同^[36]。因此, 这些基因是否也可作为其他血清型毒力株的鉴定标准, 仍需进一步验证。因此, 为了更有效地区分 SS4 毒力株与其他血清型的菌株, 本研究建立的多重 PCR 方法采用了“4+1”基因组合(4 个毒力基因+1 个血清型特异性基因)。通过这种组合, 能够有效地将 SS4 毒力株与其他血清型菌株区分开来。

综上所述, 本研究基于 SS4 毒力株特有的毒力相关基因 *sly*、*igdE*、*tran* 和 *sao* 作为靶基

因, 并结合 SS4 血清型特异性 *wzy* 基因, 成功开发了一种 SS4 毒力株鉴别的五重 PCR 方法, 可准确、简便地鉴定 SS4 毒力株, 为 SS4 的监测和防控提供有力的技术支持。

作者贡献声明

朱金鲁: 方法论, 数据分析, 完成呈现, 撰写文章, 编辑、审阅; 彭泽仁: 软件程序; 庄鸿琨: 验证; 孙洁: 提供资源; 吴宗福: 提出概念, 方法论, 编辑、撰写、审阅, 项目管理, 获取基金。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER JP, XU JG, SEGURA M, GOTTSCHALK M. *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 & Infections*, 2014, 3(6): e45.
- [2] GOTTSCHALK M, XU JG, CALZAS C, SEGURA M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?[J]. *Future Microbiology*, 2010, 5(3): 371-391.
- [3] SEGURA M, ARAGON V, BROCKMEIER SL, GEBHART C, GREEFF A, KERDSIN A, O'DEA MA, OKURA M, SALÉRY M, SCHULTZ C, VALENTIN-WEIGAND P, WEINERT LA, WELLS JM, GOTTSCHALK M. Update on *Streptococcus suis* research and prevention in the era of antimicrobial restriction: 4th international workshop on *S. suis*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(5): 374.
- [4] BOJARSKA A, JANAS K, PEJSKAK Z, OTULAK-KOZIEL K, GARBACZEWSKA G, HRYNIEWICZ W, SADOWY E. Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 240: 108534.
- [5] HUANG JH, LIU X, CHEN H, CHEN L, GAO XP, PAN ZH, WANG J, LU CP, YAO HC, WANG LP, WU ZF. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 995-1003.
- [6] KRÁLOVÁ N, FITTIPALDI N, ZOUHAROVÁ M,

- NEDBALCOVÁ K, MATIAŠKOVÁ K, GEBAUER J, KULICH P, ŠIMEK B, MATIAŠOVIC J. *Streptococcus suis* strains with novel and previously undescribed capsular loci circulate in Europe[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 298: 110265.
- [7] LIANG PJ, WANG ML, GOTTSCHALK M, VELA AI, ESTRADA AA, WANG JP, DU PC, LUO M, ZHENG H, WU ZF. Genomic and pathogenic investigations of *Streptococcus suis* serotype 7 population derived from a human patient and pigs[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 1960-1974.
- [8] HATRONGJIT R, FITTIPALDI N, JENJAROENPUN P, WONGSURAWAT T, VISETNAN S, ZHENG H, GOTTSCHALK M, KERDSIN A. Genomic comparison of two *Streptococcus suis* serotype 1 strains recovered from porcine and human disease cases[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 5380.
- [9] LIU ZY, XU QH, LIANG PJ, PENG ZR, YAO HC, ZHENG H, WU ZF. The characteristics of population structure and antimicrobial resistance of *Streptococcus suis* serotype 8, a non-negligible pathotype[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(5): e2495-e2505.
- [10] WANG XM, SUN JJ, BIAN C, WANG JP, LIANG ZJ, SHEN YL, YAO HC, HUANG JH, WANG LP, ZHENG H, WU ZF. The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Streptococcus suis* cps31[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 259: 109149.
- [11] ZHU JL, WANG JP, KANG WM, ZHANG XY, KERDSIN A, YAO HC, ZHENG H, WU ZF. *Streptococcus suis* serotype 4: a population with the potential pathogenicity in humans and pigs[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1): 2352435.
- [12] PRÜFER TL, ROHDE J, VERSPOHL J, ROHDE M, de GREEFF A, WILLENBORG J, VALENTIN-WEIGAND P. Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996–2016[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210801.
- [13] HATRONGJIT R, BOUEROY P, JENJAROENPUN P, WONGSURAWAT T, MEEKHANON N, CHOPJIT P, ZHENG H, FITTIPALDI N, CHAREONSUDJAI S, SEGURA M, GOTTSCHALK M, KERDSIN A. Genomic characterization and virulence of *Streptococcus suis* serotype 4 clonal complex 94 recovered from human and swine samples[J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0288840.
- [14] ARENDS JP, ZANEN HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans[J]. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988, 10(1): 131-137.
- [15] KERDSIN A, AKEDA Y, TAKEUCHI D, DEJSIRILERT S, GOTTSCHALK M, OISHI K. Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, 37(5): 917-925.
- [16] SEGURA M, CALZAS C, GRENIER D, GOTTSCHALK M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(21): 3772-3799.
- [17] TRAM G, JENNINGS MP, BLACKALL PJ, ATTACK JM. *Streptococcus suis* pathogenesis: a diverse array of virulence factors for a zoonotic lifestyle[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2021, 78: 217-257.
- [18] MURRAY GGR, MD MUKARRAM HOSSAIN AS, MILLER EL, BRUCHMANN S, BALMER AJ, MATUSZEWSKA M, HERBERT J, HADJIRIN NF, MUGABI R, LI GW, FERRANDO ML, de OLIVEIRA IMF, NGUYEN T, YEN PLK, PHUC HD, MOE AZ, WAI TS, GOTTSCHALK M, ARAGON V, VALENTIN-WEIGAND P, et al. The emergence and diversification of a zoonotic pathogen from within the microbiota of intensively farmed pigs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(47): e2307773120.
- [19] 刘召颖, 朱夏雨, 牛洪颖, 万欣, 吴宗福. 浙江某市屠宰场猪链球菌血清型、耐药及致病特征[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 3236-3250.
- LIU ZY, ZHU XY, NIU HY, WAN X, WU ZF. Serotypes, antimicrobial resistance, and pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* isolated from a slaughterhouse in an area of Zhejiang Province[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3236-3250 (in Chinese).
- [20] 彭泽仁, 吴宗福. 广西、四川两地屠宰场猪链球菌致病特征分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4714-4725.
- PENG ZR, WU ZF. Analysis of pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* in slaughterhouses in Guangxi and Sichuan[J/OL]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4714-4725 (in Chinese).
- [21] WU ZF, WANG WX, TANG M, SHAO J, DAI C, ZHANG W, FAN HJ, YAO HC, ZONG J, CHEN D, WANG JN, LU CP. Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis* meningitis isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island[J]. *Gene*, 2014, 535(2): 156-164.
- [22] WU ZF, ZHANG W, LU CP. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(3): 159-166.
- [23] GOTTSCHALK M, LACOUTURE S, BONIFAIT L, ROY D, FITTIPALDI N, GRENIER D. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/3/4): 819-825.
- [24] TENENBAUM T, ASMAT TM, SEITZ M, SCHROTEN H, SCHWERK C. Biological activities of sulysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis[J]. *Future Microbiology*, 2016, 11: 941-954.
- [25] NORTON PM, ROLPH C, WARD PN, BENTLEY RW, LEIGH JA. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of sulysin[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999, 26(1): 25-35.
- [26] LALONDE M, SEGURA M, LACOUTURE S, GOTTSCHALK M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines[J]. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 8): 1913-1921.
- [27] AUGER JP, CHRISTODOULIDES M, SEGURA M, XU JG, GOTTSCHALK M. Interactions of *Streptococcus suis* serotype 2 with human meningeal cells and astrocytes[J]. *BMC Research Notes*, 2015, 8: 607.

- [28] LEUNG C, DUDKINA NV, LUKOYANOVA N, HODEL AW, FARABELLA I, PANDURANGAN AP, JAHAN N, PIRES DAMASO M, OSMANOVIĆ D, REBOUL CF, DUNSTONE MA, ANDREW PW, LONNEN R, TOPF M, SAIBIL HR, HOOGENBOOM BW. Stepwise visualization of membrane pore formation by suliyisin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin[J]. eLife, 2014, 3: e04247.
- [29] SPOERRY C, SEELE J, VALENTIN-WEIGAND P, BAUMS CG, von PAWEL-RAMMINGEN U. Identification and characterization of IgdE, a novel IgG-degrading protease of *Streptococcus suis* with unique specificity for porcine IgG[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(15): 7915-7925.
- [30] LI YY, MARTINEZ G, GOTTSCHALK M, LACOUTURE S, WILLSON P, DANIEL DUBREUIL J, JACQUES M, HAREL J. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(1): 305-312.
- [31] FENG YJ, ZHENG F, PAN XZ, SUN W, WANG CJ, DONG YQ, JU AP, GE JC, LIU D, LIU CH, YAN JH, TANG JQ, GAO GF. Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 275(1): 80-88.
- [32] WANG J, DONG RR, ZOU P, CHEN YJ, LI N, WANG Y, ZHANG T, PAN XZ. Identification of a novel linear B cell epitope on the Sao protein of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1492.
- [33] LI Y, ZHENG JX, ZHANG H, FAN HJ, LU CP. Effect of Tran on virulence through regulating metabolism and stress tolerance of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Microbiological Research, 2014, 169(9/10): 666-674.
- [34] ROODSANT TJ, van der PUTTEN BCL, TAMMINGA SM, SCHULTSZ C, van der ARK KCH. Identification of *Streptococcus suis* putative zoonotic virulence factors: a systematic review and genomic meta-analysis[J]. Virulence, 2021, 12(1): 2787-2797.
- [35] FITTIPALDI N, FULLER TE, TEEL JF, WILSON TL, WOLFRAM TJ, LOWERY DE, GOTTSCHALK M. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suliyisin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 139(3/4): 310-317.
- [36] SEGURA M, FITTIPALDI N, CALZAS C, GOTTSCHALK M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical?[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(7): 585-599.