



广西、四川两地屠宰场猪链球菌致病特征分析

彭泽仁^{1,2,3}, 吴宗福^{1,2,3*}

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014

2 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210014

3 世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京 210014

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 Zeren, WU Zongfu. Pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* isolated from slaughterhouses in Sichuan and Guangxi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4714-4725.

摘要:【目的】猪链球菌(*Streptococcus suis*)是猪的重要致病菌,同时也是一种人畜共患病原。屠宰场健康猪的猪链球菌感染率较高,血清型多而复杂,是人和猪的重要传染源。四川、广西两地都曾暴发猪链球菌疫情,大量生猪发病死亡的同时,也导致部分与病猪有密切接触的人群发病死亡。因此,对上述两地区屠宰场进行猪链球菌感染调查,明确其致病特征,具有重要公共卫生意义。

【方法】本研究自2021–2022年采集广西、四川两地屠宰场健康猪扁桃体,分离鉴定猪链球菌并进行血清型分型,对分离株进行斑马鱼毒力、小鼠毒力试验,并对毒力株进行基因组测序,进行多序列位点分型(multilocus sequence typing, MLST)及毒力标志基因分析,探究其致病特征。【结果】广西57份健康猪扁桃体样品猪链球菌阳性率为84.21% (48/57),分离鉴定出60株猪链球菌,其中分离率最高的是血清31型(16.67%, 10/60),其次为9型(11.67%, 7/60)、4型(10.00%, 6/60)、12型(8.33%, 5/60)等,2型菌株仅分离出1株,含2种及以上不同血清型猪链球菌的扁桃体占33.33% (16/48);四川250份健康猪扁桃体样品猪链球菌阳性率为10.8% (27/250),分离鉴定出41株猪链球菌,其中分离率最高的血清型为31型(34.15%, 14/41),其次为16型(17.07%, 7/41)、9型(12.20%, 5/41)、28型(9.76%, 4/41)等,2型菌株仅分离出1株,含有2种以上不同血清型的扁桃体占33.33% (9/27)。选择44株不同血清型的代表菌株(广西28株,四川16株)进行斑马鱼毒力试验,结果显示,5株菌株对斑马鱼致病性较强,攻毒计量在 3×10^6 CFU/尾时,对斑马鱼的致死率高达70%–100%,其中广西3株分别为2型、9型和新荚膜基因簇(novel capsular polysaccharide loci, NCL)18型,四川2株分别为2型和9型。对上述5株毒力株进行小鼠毒力试验,结果显示4株菌株致死率高达80%–100%,1株致死率为60%,与斑马鱼试验较为相符。MLST及毒力标志基因分析表明,2株血清2型菌株

资助项目: 国家自然科学基金(32172859)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172859).

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

Received: 2023-04-27; Accepted: 2023-07-10; Published online: 2023-07-14

均为 ST1 型及 *mrp+*、*epf+*、*sly+* 毒力型, 为世界范围内广泛流行的具有人畜共患潜力的致病型菌株; 2 株血清 9 型菌株毒力型均为 *mrp-*、*epf-* 和 *sly-*, ST 型分别为 ST1198 和 ST2104, 1 株 NCL18 型菌株为 ST2102 型和 *mrp+*、*epf-*、*sly-* 毒力型。【结论】上述结果表明, 两地屠宰场猪链球菌的感染情况存在差异, 广西屠宰场猪链球菌分离率较高, 都存在世界范围内广泛流行的具有人畜共患潜能的血清 2 型 ST1 毒力株, 公共卫生意义值得关注。

关键词: 猪链球菌; 广西; 四川; 屠宰场; 健康猪; 致病特征

Pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* isolated from slaughterhouses in Sichuan and Guangxi

PENG Zeren^{1,2,3}, WU Zongfu^{1,2,3*}

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 WOAHA Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] *Streptococcus suis* is a zoonotic pathogen that can cause diseases in pigs and humans. Healthy pigs in slaughterhouses often carry diverse serotypes of *S. suis*, which can be a major source of infections for susceptible animals and humans. The outbreaks of *S. suis* occurred in Sichuan and Guangxi, resulting in severe illness and deaths of pigs and humans. Therefore, it is crucial to investigate the infection rate of *S. suis* in healthy pigs in slaughterhouses and unveil the pathogenic characteristics of *S. suis* in these two areas. **[Methods]** We isolated *S. suis* from the tonsils of healthy pigs collected from slaughterhouses in Guangxi and Sichuan during 2021–2022 and performed serotype-specific PCR for serotyping the isolates. Furthermore, we examined the virulence of the isolates in zebrafish and mice and performed genome sequencing and multilocus-sequence typing (MLST) on the virulent strains to explore their pathogenic characteristics. **[Results]** The positive rate of *S. suis* was 84.21% (48/57) in the 57 tonsil samples collected from Guangxi. Among the 60 strains isolated from Guangxi, serotype 31 (16.67%, 10/60) had the highest isolation rate, followed by serotype 9 (11.67%, 7/60), serotype 4 (10.00%, 6/60), and serotype 12 (8.33%, 5/60). The tonsil samples carrying at least two serotypes of strains accounted for 33.33% (16/48) in Guangxi. The positive rate of *S. suis* in 250 tonsil samples collected from Sichuan was 10.8% (27/250). Among the 41 strains isolated from Sichuan, serotype 31 (34.15%, 14/41) had the highest isolation rate, followed by serotype 16 (17.07%, 7/41), serotype 9 (12.20%, 5/41), and serotype 28 (9.76%, 4/41). The tonsil samples carrying at least 2 serotypes of strains accounted for 33.33% (9/27) in Sichuan. Zebrafish infection experiments with 28 strains from Guangxi and 16 strains from Sichuan showed that five strains were highly virulent, causing the mortality rates ranging from 70% to 100% in the zebrafish challenged with the dose of 3×10^6 CFU/fish. The five strains included three strains from Guangxi (serotypes 2, 9 and NCL18) and two

strains from Sichuan (serotypes 2 and 9). Furthermore, the 5 strains were used to infect mice, with four strains causing the mortality rates ranging from 80% to 100% and 1 strain causing the mortality rate of 60%, which were consistent with the results of the zebrafish infection experiments. MLST and virulence gene analysis revealed that the two strains of serotype 2 belonged to ST1 and exhibited the virulence genotypes *mrp+*, *epf+*, and *sly+*, showing the potential as zoonotic pathogens. The two strains of serotype 9 had the virulence genotypes *mrp-*, *epf-*, and *sly-* and belonged to ST1198 and ST2104, respectively. The NCL18 strain was typed as ST2102 and had the virulence genotypes *mrp+*, *epf-*, and *sly-*. **[Conclusion]** The *S. suis* infection rates differed between slaughterhouses in Guangxi and Sichuan, and the isolation rate was higher in Guangxi. The slaughterhouses in both Guangxi and Sichuan harbor serotype 2 ST1 strains with zoonotic potential that are widespread worldwide, warranting attention. **Keywords:** *Streptococcus suis*; Guangxi; Sichuan; slaughterhouse; healthy pigs; pathogenic characteristics

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是猪的重要致病菌,可引起猪的脑膜炎、败血症和肺炎等,同时该菌也可以感染人致病,是一种人畜共患病原^[1]。根据荚膜多糖抗原的差异,猪链球菌可分为29种传统血清型(1-19、21、23-25、27-31和1/2)^[2]、Chz血清型^[3]、27种新荚膜基因簇(NCL1-27)及未定型菌株^[4-7]。迄今为止发现的可以感染人的血清型已达10种,分别为血清2、4、5、7、9、14、16、21、24和31型^[8]。

屠宰场健康猪的猪链球菌携带率较高,甚至同一扁桃体可存在不同血清型的猪链球菌,因此,屠宰场来源猪链球菌被认为是易感猪和人的重要传染源^[9]。猪链球菌感染人的病例已在世界各地出现^[1]。四川于2005年暴发猪链球菌感染人,累计感染病例215例,死亡39例^[10]。广西分别于2006年(感染病例6例)^[11]、2007年(感染21例,死亡7例)^[12]、2012年(感染1例)^[13]、2013年(感染2例)^[14]和2016年(感染6例,死亡1例)^[15]发生猪链球菌感染人事件。因此,对上述两地区屠宰场进行猪链球菌感染调查,明确其致病特征,具有重要的公共卫生意义。

本研究自2021-2022年采集广西、四川两地区屠宰场健康猪扁桃体样品,分离鉴定猪链

球菌,采用血清型特异性PCR法分型,通过斑马鱼毒力试验、小鼠毒力试验分析致病特征,对毒力株全基因组测序,进行多序列位点分型(multilocus sequence typing, MLST)分析,明确其种群结构,并分析其毒力标志基因。研究结果不仅有助于了解两地区屠宰场猪链球菌感染情况及致病特征,也为制定相应的防控策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

2021-2022年分离自广西、四川两地屠宰场健康猪扁桃体的猪链球菌分离株、动物毒力试验强毒株对照SC070731菌株和弱毒株对照SH040917菌株,由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

琼脂粉、无菌96孔板、无菌脱纤维绵羊血、1 mL、20 mL和50 mL无菌注射器购自南京鼎国生物技术有限公司; THB (Todd Hewitt broth)培养基购自青岛海博生物公司; FastPure DNA Extraction Mini Kit、DL 2000 DNA marker、2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物公司; PCR扩增仪、FastDigest *Bst*NI 限

制性核酸内切酶购自赛默飞世尔科技公司; 匀浆仪购自杭州宝诚生物技术有限公司; 离心机购自株式会社日立制作所。

1.3 实验动物

3 cm 斑马鱼购自山东一溪月生物科技有限公司; SPF 级 BALB/c 品系小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.4 培养基配置

THB 培养基: 400 mL 蒸馏水中加入 14.56 g THB 培养基粉末, 高压灭菌后配制。猪链球菌选择性液体培养基配制: THB 培养基中加入终浓度为 1.2 mg/L 庆大霉素, 30 mg/L 萘啶酮酸, 1.2 mg/L 结晶紫。THB 固体培养基配制: 在 THB 中加入 1.5% 的琼脂粉, 高压灭菌后, 待温度降到 55 °C 左右, 加入 5% 无菌脱纤维绵羊血配制; 猪链球菌选择性固体培养基配制: THB 液体培养基中加入终浓度为 1.2 mg/L 结晶紫及 1.5% 的琼脂粉, 高压灭菌后, 待温度降到 55 °C 左右, 加入终浓度为 1.2 mg/L 庆大霉素和 30 mg/L 萘啶酮酸以及 5% 无菌脱纤维绵羊血配制。

1.5 样品采集和处理

采用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate Buffered Saline, PBS)冲洗屠宰场健康猪扁桃体表面, 并用酒精棉球擦拭, 将组织置于酒精灯火焰上方快速灼烧, 用剪刀从内部剪下约 0.1 g 的小块组织放入匀浆管中, 加 900 μ L PBS 配平, 使用匀浆仪充分研磨。

1.6 猪链球菌的分离鉴定

将匀浆液以 1:25 转接至猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)选择性液体培养基中, 放入 37 °C 二氧化碳培养箱中静置培养 8 h。采用猪链球菌种特异性基因——谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)、DNA 修复酶基因(*recN*)为目的片段设计的引物进行 PCR 扩增, 双阳性则鉴定为猪链球菌阳性样品, 引物信息详见本课题组前期发表的文章^[16]。将

阳性增菌液划线接种于猪链球菌选择性固体培养基, 放入 37 °C CO₂ 培养箱中培养 12 h。挑取单菌落放入 THB 液体培养基中培养至对数期。采用 *gdh*、*recN* 基因进行 PCR 扩增, 双阳性鉴定为猪链球菌, 将菌株放入 -80 °C 冰箱保存。

1.7 猪链球菌血清型分型

使用 THB 血平板复苏菌株, 置于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 12 h, 挑取单菌落于 THB 液体培养基中培养至对数期。按照 29 种传统血清型、Chz 血清型、27 种新荚膜基因簇血清型鉴定引物进行 PCR 扩增, 阳性则鉴定为相应血清型, 引物信息详见本课题组前期发表的文章^[16]。由于猪链球菌血清 1 型与 14 型、2 型与 1/2 型无法用普通 PCR 法进行区分, 参考 Matiasovic 等^[17]的方法, 使用 *cps K* 特异性引物扩增, 并采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收, 用 *Bst*NI 限制性内切酶进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。2 型和 14 型可被内切酶酶切, 酶切后产物为 347 bp 和 139 bp 两个片段; 1 型和 1/2 型无法被内切酶酶切, 酶切后产物大小为 486 bp。

1.8 斑马鱼毒力试验

选取规格相似的成年斑马鱼(约 3 cm), 适应性饲养 7 d, 按照两地区猪链球菌分离株血清型选择菌株, 参照本课题组前期文献[8,16,18]进行。正式攻毒前先复壮菌株, 将猪链球菌冻存菌液进行复苏, 挑取单菌落于 THB 液体培养基中培养至对数期, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 采用无菌 PBS 清洗 2-3 次, 最后一次使用无菌 PBS 重悬。使用 1 mL 无菌注射器将重悬菌液注射至斑马鱼泄殖腔中, 每尾斑马鱼注射 20 μ L, 放入 28 °C 温箱中培养 8-12 h, 期间若观察到斑马鱼死亡, 则采用 1 mL 无菌注射器取其脑脊液, 接种于 THB 血平板, 放入 37 °C CO₂ 培养箱中培养 12 h。挑取单菌落于 5 mL THB 液体培养基中, 置于 37 °C、180 r/min 摇床中培养

至浑浊,使用猪链球菌种特异性基因 *gdh*、*recN* 引物进行猪链球菌鉴定,两者均为阳性则鉴定为猪链球菌,确定攻毒菌液。将攻毒菌液以 1:100 转接于 5 mL THB 液体培养基中,放入 37 °C、180 r/min 摇床中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右,离心弃上清,并用无菌 PBS 清洗重悬。每组试验组攻毒 15 尾斑马鱼,每尾斑马鱼注射 20 μ L,攻毒菌量控制在 3×10^6 CFU/尾,以猪链球菌血清 2 型 SC070731 为强毒对照,猪链球菌血清 9 型 SH040917 为弱毒株对照。将攻毒菌液使用无菌 PBS 进行 10 倍比稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 浓度滴于 THB 方平板,放入 37 °C 温箱培养 12 h,进行菌落计数。攻毒结束后将斑马鱼放入 28 °C 温箱中,每隔 12 h 记录死亡尾数,连续观察 96 h。每株菌攻毒结果均与强毒对照组 SC070731 进行统计学分析^[18]。

1.9 小鼠毒力试验

选取 4–5 周龄 SPF 级 BALB/c 品系的小鼠进行毒力试验,将斑马鱼试验中的强毒株作为攻毒菌株。正式攻毒前先复壮菌株,每株菌攻毒 1–2 只小鼠,每只小鼠腹腔注射 200 μ L 浓缩菌液,12 h 后观察情况,当小鼠处于濒死期或死亡初期,立刻使用无菌接种环采集心血,接种于 THB 血平板上,挑取单菌落于 THB 液体培养基中培养至对数期,使用猪链球菌种特异性基因 *gdh*、*recN* 引物进行猪链球菌鉴定,两者均为阳性则鉴定为猪链球菌,确定攻毒菌液。将攻毒菌液以 1:100 转接至 THB 液体培养基中,放入 37 °C、180 r/min 摇床中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右,离心弃上清,用无菌 PBS 清洗重悬,控制 OD_{600} 在 0.6 左右。按照 3×10^8 CFU/只攻毒小鼠,每株菌攻毒 10 只,设置阳性对照强毒株 SC070731、阴性对照弱毒株 SH040917 和无菌 PBS 组^[8]。将攻毒菌液使用无菌 PBS 进行 10 倍梯度配比稀释,取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度滴于

THB 方平板,放入 37 °C 温箱培养 12 h,进行菌落计数。攻毒结束后,每隔 12 h 观察 1 次,记录死亡情况,连续观察 7 d。

1.10 全基因组测序

5 株毒力株复苏后,培养至对数期,10 000 r/min 离心 5 min,吸净上清液,液氮冷激后,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行细菌框架图测序。将序列上传至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因库(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov>)进行基因组注释,5 株毒力株的 GenBank 登录号分别为 JARBFM000000000 (2022WUSS001)、JARBFN000000000 (2022WUSS007)、JARBFO000000000 (2022WUSS031)、JARBFP000000000 (2022WUSS046)、JARBFQ000000000 (2022WUSS097)。将基因组序列上传至微生物多样性分析分型公共数据库中(<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>),分析猪链球菌 7 个等位基因(*aroA*、*cpn60*、*dpr*、*gki*、*mutS*、*recA* 和 *thrA*)序列,得出相应的等位基因号,每个独特的基因型对应了一个序列型(sequence types, STs)。若 7 个等位基因中有新的序列,则需申请等位基因号并申请 ST 型。将全基因组序列上传至细菌病原体毒力因子分析网站(<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>),分析猪链球菌毒力标志基因 *mrp* (编码溶菌酶释放蛋白)、*epf* (编码胞外因子)和 *sly* (编码溶血素)^[19]。

2 结果与分析

2.1 猪链球菌分离鉴定及血清型分型

2021 年 10 月采集广西屠宰场 57 份健康猪扁桃体,其中阳性样品 48 份,占比 84.21%,分离鉴定出 60 株猪链球菌并进行血清型分型,共分离出 22 种血清型,2 型菌株仅分离出

1 株。分离率最高的是 31 型(16.67%, 10/60), 其次为 9 型(11.67%, 7/60)、4 型(10.00%, 6/60)、12 型(8.33%, 5/60)、6 型(6.67%, 4/60)和 NCL18 型(5.00%, 3/60)等, 其中属于感染人血清型占所有菌株的 46.67% (28/60), 结果见图 1。此外含 2 种及以上不同血清型的扁桃体占猪链球菌阳性扁桃体 33.33% (16/48), 其中含 2 种不同血清型菌株的扁桃体占比最高, 为 68.75% (11/16), 结果见图 2。

2021 年 11 月采集四川屠宰场 250 份健康猪扁桃体, 其中阳性样品 27 份, 占比 10.8%, 分离鉴定出 41 株猪链球菌并进行血清型分型, 共分离出 13 种血清型, 2 型菌株仅分离出 1 株。分离率最高的为 31 型(34.15%, 14/41), 其次为 16 型(17.07%, 7/41)、9 型(12.20%, 5/41)、28 型(9.76%, 4/41)和 2 型(2.44%, 1/41)等, 其中属于感染人血清型占所有菌株的 73.17% (30/41), 结果见图 3。此外含有 2 种及以上不同血清型的扁桃体占猪链球菌阳性扁桃体 33.33% (9/27), 其中含 2 种不同血清型菌株的扁桃体占比最高, 为 66.67% (6/9), 结果见图 4。

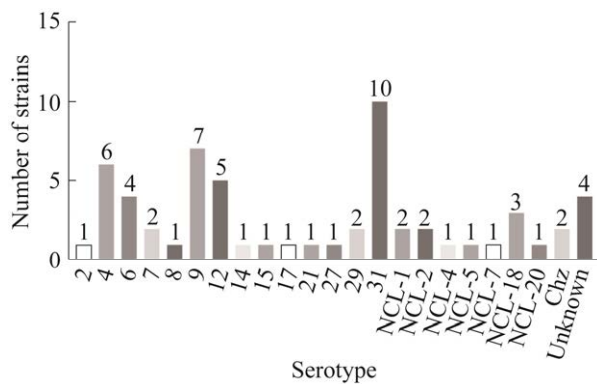


图 1 广西屠宰场猪链球菌血清型分布情况
Figure 1 Distribution of *Streptococcus suis* serotypes from a slaughterhouse in Guangxi. The Y-axis refers to the number of *S. suis* isolates, and the X-axis refers to isolates' serotypes or genotypes.

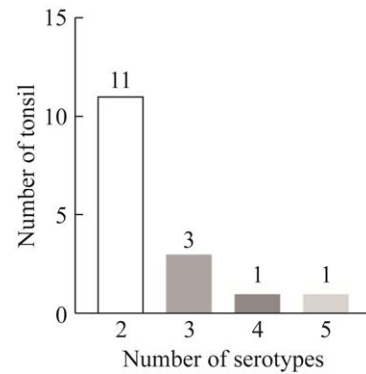


图 2 广西含两种及以上不同猪链球菌血清型扁桃体分布情况
Figure 2 Distribution of tonsil containing two or more different serotypes of *Streptococcus suis* in Guangxi. The Y-axis refers to the number of tonsil, and the X-axis refers to the number of serotypes the tonsil contains.

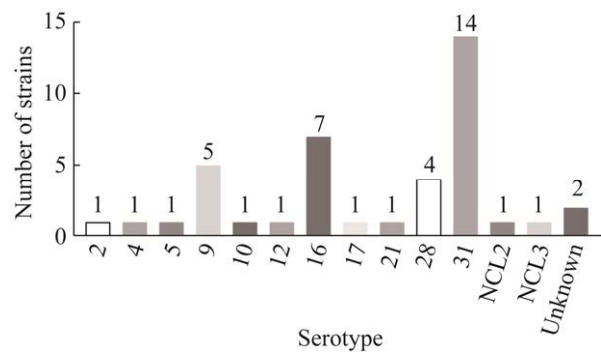


图 3 四川屠宰场猪链球菌血清型分布情况
Figure 3 Distribution of *Streptococcus suis* serotypes from a slaughterhouse in Sichuan. The Y-axis refers to the number of *S. suis* isolates, and the X-axis refers to isolates' serotypes or genotypes.

2.2 斑马鱼毒力试验

按照血清型分布情况, 共选择 44 株猪链球菌进行斑马鱼毒力试验, 其中广西 28 株, 四川 16 株。广西斑马鱼毒力试验中, 菌株 2022WUSS001、2022WUSS007 和 2022WUSS031 对斑马鱼致病力较强, 攻毒计量在 3×10^6 CFU/尾时, 对斑马鱼的致死率高达 80%–100%, 与强毒株对照 SC070731 毒力相当; 菌株 2022WUSS002、

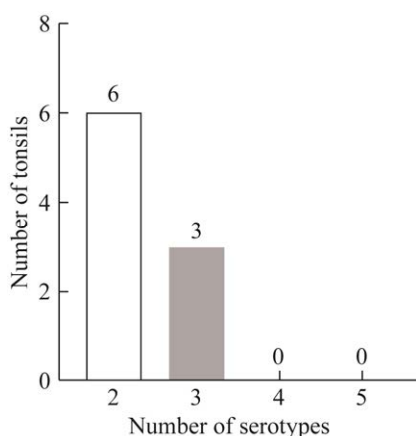


图 4 四川含两种及以上不同猪链球菌血清型扁桃体分布情况

Figure 4 Distribution of tonsil containing two or more different serotypes of *Streptococcus suis* in Sichuan. The Y-axis refers to the number of tonsil, and the X-axis refers to the number of serotypes the tonsil contains.

2022WUSS004、2022WUSS006、2022WUSS008、2022WUSS016、2022WUSS021、2022WUSS026、2022WUSS047 和 2022WUSS057 对斑马鱼致死率 40%–70%；其余菌株毒力较弱，对斑马鱼致死率低于 33.3%，结果见表 1。

四川斑马鱼毒力试验中，菌株 2022WUSS046、2022WUSS097 对斑马鱼致病力较强，攻毒计量在 3×10^6 CFU/尾时，对斑马鱼的致死率分别为 73.33% 和 100%。菌株 2022WUSS048、2022WUSS050 和 2022WUSS138 对斑马鱼致死率 40%–70%，其余菌株毒力较弱，对斑马鱼致死率低于 33.33%，结果见表 2。

2.3 小鼠毒力试验

根据斑马鱼毒力试验结果，选择毒力株(对斑马鱼致死率为 70%–100%) 2022WUSS001、2022WUSS007、2022WUSS031、2022WUSS046 和 2022WUSS097 进行小鼠毒力试验。血清 2 型菌株 2022WUSS007、2022WUSS097、血清 9 型菌株 2022WUSS046 和 NCL18 型菌株 2022WUSS031 对小鼠致死率分别为 80%、

100%、100%和 100%，与强毒株对照 SC070731 毒力相当；血清 9 型 2022WUSS001 对小鼠致死率为 60%，与斑马鱼试验较为相符，结果见表 3。

2.4 MLST、毒力标志基因分析

对 5 株毒力株进行全基因组测序，并分析 MLST 和毒力标志基因 *mrp*、*epf* 和 *sly*。2 株血清 2 型菌株 2022WUSS007、2022WUSS097 均为 ST1 型和 *mrp*+、*epf*+、*sly*+ 基因型，属于世界范围内广泛流行的可感染人和猪的致病型菌株；2 株血清 9 型菌株 2022WUSS001、2022WUSS046 基因型均为 *mrp*-、*epf*- 和 *sly*-，ST 型分别为 ST1198 和 ST2104，NCL18 型菌株 2022WUSS031 为 ST2102 型和 *mrp*+、*epf*-、*sly*- 基因型。

3 讨论与结论

Hoa 等^[20]对越南南部屠宰场进行猪链球菌感染调查发现，健康猪扁桃体是引起人感染猪链球菌的重要来源，其中最为常见的是猪链球菌血清 2 型菌株。Dong 等^[9]通过对来自人和猪的猪链球菌分离株进行系统进化分析发现，健康猪来源的具有人畜共患潜能的猪链球菌分离株具有较强的致病性。这表明屠宰场来源的猪链球菌是人和易感猪的重要传染源。因此对屠宰场展开猪链球菌感染调查，具有重要的公共卫生意义。迄今为止发现的猪链球菌中感染人血清型已达 10 种，分别是血清 2、4、5、7、9、14、16、21、24 和 31 型，除血清 24 型，其余血清型在本研究中均可分离到。不同地区屠宰场的猪链球菌分离率及血清型都有所不同。Vishva 等^[21]对印度屠宰场健康猪扁桃体进行猪链球菌检测，显示 7 型(24.13%)和 5 型(18.39%) 为优势血清型。Thongkamkoon 等^[22]对泰国屠宰场健康猪扁桃体进行猪链球菌感染调查发现，检出率最高的为血清 23 型，占比 10.2% (20/196)。

表 1 广西猪链球菌分离株斑马鱼毒力试验

Table 1 The results of *Streptococcus suis* zebrafish infection experiments in Guangxi

Strains No.	Death in each period (h)								Total deaths	Mortality rate (%)	P	Significance	Serotype
	12	24	36	48	60	72	84	96					
SC070731	12	0	3	0	0	0	0	0	15	100.00	–	–	2
SH040917	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS001	14	0	0	1	0	0	0	0	15	100.00	0.810 2	ns	9
2022WUSS002	3	0	6	0	0	0	0	0	9	60.00	0.000 4	***	9
2022WUSS003	5	0	0	0	0	0	0	0	5	33.33	0.000 2	***	9
2022WUSS004	4	0	3	0	0	0	0	0	7	46.67	0.000 3	***	9
2022WUSS005	4	0	1	0	0	0	0	0	5	33.33	<0.000 1	****	9
2022WUSS006	1	0	5	0	0	0	0	0	6	40.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS007	12	0	3	0	0	0	0	0	15	100.00	>0.999 9	ns	2
2022WUSS008	3	2	1	0	4	0	0	0	10	66.67	0.000 2	***	31
2022WUSS009	0	0	1	1	0	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	31
2022WUSS010	1	0	0	0	1	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	31
2022WUSS012	1	0	2	0	0	0	0	0	3	20.00	<0.000 1	****	31
2022WUSS016	4	0	2	0	1	0	0	0	7	46.67	0.000 2	***	4
2022WUSS021	5	1	2	1	1	0	0	0	10	66.67	0.002 2	**	7
2022WUSS022	1	1	0	0	1	0	0	0	3	20.00	<0.000 1	****	15
2022WUSS023	1	0	1	0	0	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	29
2022WUSS024	0	3	0	0	1	0	0	0	4	26.67	<0.000 1	****	14
2022WUSS025	3	0	1	0	0	0	0	0	4	26.67	<0.000 1	****	21
2022WUSS026	2	1	3	2	0	0	1	0	9	60.00	<0.000 1	****	6
2022WUSS031	10	0	1	1	0	0	0	0	12	80.00	0.081 0	ns	NCL18
2022WUSS033	0	0	1	1	0	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	Unknown
2022WUSS047	3	0	0	0	3	0	0	0	6	40.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS057	6	1	0	1	0	0	0	0	8	53.33	0.001 9	**	8
2022WUSS058	0	1	0	0	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	7
2022WUSS061	0	0	0	1	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	12
2022WUSS063	0	0	0	1	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	17
2022WUSS068	0	0	1	2	0	0	1	0	4	26.67	<0.000 1	****	NCL1
2022WUSS070	1	0	1	0	1	0	0	0	3	20.00	<0.000 1	****	NCL5
2022WUSS071	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	NCL7

In the same batch, the virulence of each strain was compared with that of the virulent strain SC070731 (as a positive control), and use the Log-rank (Mantel-Cox) test to analysis statistical. **, ***, and **** indicate $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.000 1$, respectively. ns indicates no significance. – indicates not applicable.

表 2 四川猪链球菌分离株斑马鱼毒力试验

Table 2 The results of *Streptococcus suis* zebrafish infection experiments in Sichuan

Strains No.	Death in each period (h)								Total deaths	Mortality rate (%)	P	Significance	Serotype
	12	24	36	48	60	72	84	96					
SC070731	12	0	3	0	0	0	0	0	15	100.00	–	–	2
SH040917	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS045	3	0	0	1	0	0	0	0	4	26.67	<0.000 1	****	Unknown
2022WUSS046	10	0	1	0	0	0	0	0	11	73.33	0.081 0	ns	9
2022WUSS048	3	0	1	2	0	0	2	0	8	53.33	<0.000 1	****	16
2022WUSS050	7	2	0	0	0	0	1	0	10	66.67	0.015 3	*	31
2022WUSS051	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	31
2022WUSS060	4	0	0	1	0	0	0	0	5	33.33	0.006 1	**	21
2022WUSS096	0	0	1	0	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	31
2022WUSS097	13	0	1	0	0	0	0	1	15	100.00	0.930 6	ns	2
2022WUSS101	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6.67	<0.000 1	****	NCL2
2022WUSS110	3	0	0	0	0	0	0	0	3	20.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS112	1	0	0	0	1	0	0	0	2	6.67	<0.000 1	****	9
2022WUSS126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	28
2022WUSS133	2	0	0	0	0	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	NCL3
2022WUSS138	7	0	0	0	0	0	0	0	7	46.67	0.001 9	**	9
2022WUSS141	0	1	0	1	0	0	0	0	2	13.33	<0.000 1	****	4
2022WUSS142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	10

In the same batch, the virulence of each strain was compared with that of the virulent strain SC070731 (as a positive control), and use the Log-rank (Mantel-Cox) test to analysis statistical. *, ** and **** indicate $P<0.05$, $P<0.01$, and $P<0.000 1$, respectively. ns indicates no significance. – indicates not applicable.

表 3 猪链球菌小鼠毒力试验

Table 3 The results of *Streptococcus suis* mice infection experiments

Strains No.	Death in each period (d)							Total deaths	Mortality rate (%)	P	Significance	Serotype
	1	2	3	4	5	6	7					
SC070731	8	2	0	0	0	0	0	10	100.00	–	–	2
SH040917	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS001	0	2	2	2	0	0	0	6	60.00	<0.000 1	****	9
2022WUSS007	6	1	1	0	0	0	0	8	80.00	0.103 1	ns	2
2022WUSS031	10	0	0	0	0	0	0	10	100.00	0.146 2	ns	NCL18
2022WUSS046	5	0	5	0	0	0	0	10	100.00	0.018 2	*	9
2022WUSS097	10	0	0	0	0	0	0	10	100.00	0.146 2	ns	2

In the same batch, the virulence of each strain was compared with that of the virulent strain SC070731 (as a positive control), and use the Log-rank (Mantel-Cox) test to analysis statistical. * and **** indicate $P<0.05$ and $P<0.000 1$, respectively. ns indicates no significance. – indicates not applicable.

Matajira 等^[23]发现, 巴西猪链球菌血清 2 型分离率最高。本课题组近年来持续关注健康猪感染猪链球菌情况: 2017–2019 年采集江苏地区扁桃体和鼻拭子样本 454 份进行猪链球菌鉴定, 阳性率为 68.50%, 血清 31 型检出率最高, 占比 16.96%, 其次是 9 型(14.04%)和 16 型(11.70%)等^[24]; 2020 年采集江苏地区 64 份扁桃体进行猪链球菌鉴定, 阳性率为 54.68%, 血清 16 型检出率最高, 占比 22.22%^[25]; 2020–2021 年采集浙江地区 131 份健康猪扁桃体进行猪链球菌鉴定, 阳性率为 62.59%, 血清 16 型检出率最高, 占比 16.18%, 其次为 31 型(11.76%)、9 型(7.35%)等^[16]; 2021 年对重庆 154 份扁桃体进行猪链球菌鉴定, 阳性率为 51.95%, 血清 16 型检出率最高, 占比 16.09%, 其次为 9 型(9.20%)、4 型(8.05%)等^[26]。本研究中广西、四川两地猪链球菌阳性率分别为 84.21%和 10.8%, 感染人血清型分别占比 46.67%和 73.17%; 两地猪链球菌血清 31 型分离率均为最高, 这与本课题组 2017–2019 年对江苏地区进行猪链球菌感染调查的结果相符。上述结果表明, 屠宰场表观健康猪链球菌携带率较高, 且较多扁桃体中含有两种及以上不同血清型的猪链球菌, 但不同地区猪链球菌分离率及血清型存在差异。本研究广西样本量较少, 且来源地受限, 鉴于该地区阳性率较高, 今后应扩大监测范围和样品量。

King 等^[27]的研究发现, 同为血清 2 型的菌株可能属于不同的基因型。对猪链球菌 MLST 分析发现, 血清 2 型中 ST1、ST7、ST25 和 ST28 在猪中最为流行^[28]。ST1 型菌株是世界范围内广泛流行的具有人畜共患潜力的致病性菌株, 在欧洲和亚洲较为普遍, ST25 和 ST28 菌株在北美患病动物身上更常见^[9,29]。通过动物感染试验发现, ST1 菌株毒力明显强于 ST25 和 ST28 菌株^[30]。ST7 型属于 ST1 型的单位点突变衍生

基因型, 主要在中国流行, 是国内暴发猪链球菌病的主要病原^[31]。血清 9 型中 ST16 和 ST243 型为主要 ST 型, 其中 ST243 为中国血清 9 型中具有高毒力潜力的 ST 型, ST16 菌株在西班牙地区具有更高的人畜共患潜能^[32-33]。本研究根据两地区血清型分布选择菌株进行斑马鱼和小鼠毒力试验选出 5 株毒力株进行全基因组测序并分析 MLST, 发现 2 株血清 2 型菌株均为世界范围内广泛流行的具有人畜共患潜力的 ST1 型菌株; 血清 9 型菌株为 ST1198 和 ST2104 型, 且对斑马鱼及小鼠致病性较强, 提示除了 ST16 和 ST243, ST1198 和 ST2104 的血清 9 型菌株的致病性也值得关注。

上述研究表明, 广西、四川两地区屠宰场来源的猪链球菌的感染情况存在差异, 两地区均存在世界范围内广泛流行的具有人畜共患潜力的血清 2 型 ST1 菌株。

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(1): 1-20.
- [2] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, ARAI S, OSAWA R, SEKIZAKI T, TAKAMATSU D. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*[J]. *Pathogens*, 2016, 5(3): 45.
- [3] PAN ZH, MA JL, DONG WY, SONG WC, WANG KC, LU CP, YAO HC. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 976-985.
- [4] ZHENG H, JI SB, LIU ZJ, LAN RT, HUANG Y, BAI XM, GOTTSCHALK M, XU JG. Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(12): 4111-4119.

- [5] QIU XT, BAI XM, LAN RT, ZHENG H, XU JG. Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(24): 7102-7112.
- [6] 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.
- [7] BOJARSKA A, JANAS K, PEJSAK Z, OTULAK-KOZIEŁ 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.
- [8] 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.
- [9] DONG XX, CHAO YJ, ZHOU Y, ZHOU R, ZHANG W, FISCHETTI VA, WANG XH, FENG Y, LI JQ. The global emergence of a novel *Streptococcus suis* clade associated with human infections[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2021, 13(7): e13810.
- [10] CHEN C, TANG JQ, DONG W, WANG CJ, FENG YJ, WANG J, ZHENG F, PAN XZ, LIU D, LI M, SONG YJ, ZHU XX, SUN HB, FENG T, GUO ZB, JU AP, GE JC, DONG YQ, SUN W, JIANG YQ, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates[J]. *PLoS One*, 2007, 2(3): e315.
- [11] 陈明, 刘义威, 卢耀娟, 梁炯明, 杨成志, 胡昱, 詹晓瑜. 玉林市 4 例人感染猪链球菌病例的流行病学分析[J]. *华南预防医学*, 2009(4): 33-34.
CHEN M, LIU YW, LU YJ, LIANG JM, YANG CZ, HU Y, ZHAN XY. Epidemiological analysis of 4 cases of human infection with *Streptococcus suis* in Yulin City[J]. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2009(4): 33-34 (in Chinese).
- [12] 董柏青, 林玫, 杨进业, 王鸣柳, 龚健, 李翠云, 张杰, 秦卫文, 吴兴华, 杨进, 梁大斌, 廖和壮, 谭冬梅, 权怡, 周凌云. 广西 21 例人感染猪链球菌病例的流行病学分析[J]. *应用预防医学*, 2008(2): 65-69.
DONG BQ, LIN M, YANG JY, WANG ML, GONG J, LI CY, ZHANG J, QIN WW, WU XH, YANG J, LIANG DB, LIAO HZ, TAN DM, QUAN Y, ZHOU LY. Epidemiological analysis of 21 cases of human infection with *Streptococcus suis* in Guangxi[J]. *Applied Preventive Medicine*, 2008(2): 65-69 (in Chinese).
- [13] 梁小英, 王莉宁. 人感染猪链球菌致脑膜炎败血症 1 例[J]. *中国医药指南*, 2012(21): 633-634.
LIANG XY, WANG LN. A case of meningosepticemia caused by *Streptococcus suis* infection in human[J]. *Guide of China Medicine*, 2012(21): 633-634 (in Chinese).
- [14] 曾桂芬, 刘行超, 李世花, 肖慧玲, 徐宝灵. 2 例人感染猪链球菌病临床分析[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(7): 1006-1007.
ZENG GF, LIU XC, LI SH, XIAO HL, XU BL. Clinical analysis of 2 cases of human infection with *Streptococcus suis* disease[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2014, 11(7): 1006-1007 (in Chinese).
- [15] 王福春, 黄德胜, 谢继杰. 广西靖西市一起人感染猪链球菌病疫情调查分析[J]. *医学动物防制*, 2017, 33(9): 962-964.
WANG FC, HUANG DS, XIE J. Analysis of Guangxi Jingxi City in 1 cases of human *Streptococcus suis* infection investigation[J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2017, 33(9): 962-964 (in Chinese).
- [16] 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).
- [17] MATIASOVIC J, ZOUHAROVA M, NEDBALCOVA K, KRALOVA N, MATIASKOVA K, SIMEK B, KUCHAROVICOVA I, GOTTSCHALK M. Resolution of *Streptococcus suis* Serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(7): e00480-20.
- [18] 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.
- [19] CHEN C, ZHANG W, ZHENG H, LAN RT, WANG HY, DU PC, BAI XM, JI SB, MENG Q, JIN D, LIU K, JING HQ, YE CY, GAO GF, WANG L, GOTTSCHALK M, XU JG. Minimum core genome sequence typing of bacterial pathogens: a unified approach for clinical and public health microbiology[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(8): 2582-2591.
- [20] HOA NT, CHIEU TTB, NGA TTT, van DUNG N, CAMPBELL J, ANH PH, HUU THO H, van VINH CHAU N, BRYANT JE, HIEN TT, FARRAR J, SCHULTSZ C. Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17943.
- [21] VISHVA KV, GANGWAR P, CHATURJI THAKOR J, DINESH M, SAHOO M, SINGH R, MAHAJAN S, QURESHI S, LADDIKA L, RANJAN SAHOO N, DE UK. Carrier status of *Streptococcus suis* in the palatine tonsils of apparently healthy slaughtered pigs of India[J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2022, 43(5): 557-578.
- [22] THONGKAMKON P, KIATYINGANGSULEE T, GOTTSCHALK M. Serotypes of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in Phayao Province, Thailand[J]. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 1-7.
- [23] MATAJIRA CEC, MORENO LZ, POOR AP, GOMES VTM, DALMUTT AC, PARRA BM, de OLIVEIRA CH, BARBOSA MRF, SATO MIZ, CALDERARO FF, MORENO AM. *Streptococcus suis* in Brazil: genotypic, virulence, and resistance profiling of strains isolated from pigs between 2001 and 2016[J]. *Pathogens*, 2019, 9(1): 31.
- [24] 沈艳玲. 猪链球菌血清 31 型致病与耐药特征[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文. SHEN YL. Pathogenicity and drug resistance of *Streptococcus suis* serotype 31[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University (in Chinese).
- [25] 卞晨. 江浙地区屠宰场猪链球菌流行病学调查及猪链球菌血清 7 型病原与耐药特征[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文. BIAN C. The epidemiological survey of *Streptococcus Suis* from slaughterhouses In Jiangsu and Zhejiang Provinces and pathogenicity and antimicrobial resistance of *S. suis* serotype 7[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University (in Chinese).
- [26] 都玉, 刘召颖, 彭泽仁, 吴宗福. 重庆屠宰场猪链球菌感染的调查[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(6): 58-65. DU Y, LIU ZY, PENG ZR, WU ZF. Investigation of *Streptococcus suis* infection in slaughterhouses in Chongqing[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(6): 58-65 (in Chinese).
- [27] KING SJ, LEIGH JA, HEATH PJ, LUQUE I, TARRADAS C, DOWSON CG, WHATMORE AM. 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.
- [28] de GREEFF A, WISSELINK HJ, de BREE FM, SCHULTSZ C, BAUMS CG, THI HN, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, SMITH HE. Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolates as determined by comparative genome hybridization[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11(1): 1-15.
- [29] ESTRADA AA, GOTTSCHALK M, ROSSOW S, RENDAHL A, GEBHART C, MARTHALER DG. Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(9): e00377-19.
- [30] ATHEY TBT, TEATERO S, TAKAMATSU D, WASSERSCHIED J, DEWAR K, GOTTSCHALK M, FITTIPALDI N. Population structure and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* serotype 2 sequence type 25 strains[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150908.
- [31] YE C, ZHU X, JING H, DU H, SEGURA M, ZHENG H, KAN B, WANG L, BAI X, ZHOU Y, CUI Z, ZHANG S, JIN D, SUN N, LUO X, ZHANG J, GONG Z, WANG X, WANG L, SUN H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(8): 1203-1208.
- [32] DONG WY, ZHU YC, MA Y, MA JL, ZHANG Y, YUAN LF, PAN ZH, WU ZF, YAO HC. Multilocus sequence typing and virulence genotyping of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates revealed high genetic and virulence diversity[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(22): fnx192.
- [33] ZHENG H, DU PC, QIU XT, KERDSIN A, ROY D, BAI XM, XU JG, VELA AI, GOTTSCHALK M. Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada[J]. *Veterinary Research*, 2018, 49(1): 1-13.