

## 研究报告

# 199 株猪链球菌临床分离株血清型、毒力基因及多位点序列分型分析

黄晓慧<sup>1,2</sup>, 韩雪姣<sup>1</sup>, 刘雪兰<sup>1</sup>, 李亮<sup>1</sup>, 孙裴<sup>1</sup>, 魏建忠<sup>1</sup>, 李郁<sup>\*1</sup>

1 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

2 合肥市动物疫病预防控制中心, 安徽 合肥 230061

黄晓慧, 韩雪姣, 刘雪兰, 李亮, 孙裴, 魏建忠, 李郁. 199 株猪链球菌临床分离株血清型、毒力基因及多位点序列分型分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4209-4223

Huang Xiaohui, Han Xuejiao, Liu Xuelan, Li Liang, Sun Pei, Wei Jianzhong, Li Yu. Serotypes, main virulence genes, and multilocus sequence typing of 199 clinical isolates of *Streptococcus suis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4209-4223

**摘要:**【背景】猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)血清型、基因型众多, 毒力因子复杂。【目的】了解 SS 临床分离株血清型、毒力基因分布、分子分型特征及其之间的相关性。【方法】针对 199 株 SS 临床分离株, 应用 PCR 技术进行血清分型和毒力基因检测, 采用多位点序列分型方法(multilocus sequence typing, MLST)进行基因分型, 并分析 SS 血清型、毒力基因型和序列型(sequence type, ST 型)的流行特点及其关联性。【结果】199 株 SS 临床分离株分属于 16 种血清型(1、2、3、4、6、7、8、9、10、12、15、16、21、24、29 和 30 型), 主要以 2、4、3 型为主, 分别占 26.13% (52/199)、14.57% (29/199)和 12.06% (24/199), 未定型(NT)菌株占 21.61% (43/199)。共鉴定出 72 种 ST 型, 其中 ST1、ST94、ST117、ST7、ST28 和 ST87 为主要 ST 型, 分别占 12.56% (25/199)、11.56% (23/199)、9.56% (19/199)、9.04% (18/199)、6.03% (12/199)和 3.01% (6/199), 另有 24 种新发现的 ST 型(ST1224–ST1227, ST1229–ST1235, ST1241–ST1242, ST1300–ST1310); 分为 12 个克隆群(cloning complexes, CC)和 32 个单个 ST 型。199 株 SS 分离株中毒力基因 *fbps* 的检出率最高, 为 96.98% (193/199); 共有 19 种毒力基因型, 其中 66 株(33.17%) *epf*-/*mrp*-/*sly*-/*gapdh*+/*fbps*+/*orf2*+型 SS 为优势毒力基因型。【结论】近年来 SS 的优势血清型为 2、4 和 3 型; ST 型具有明显的遗传异质性,

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省自然科学基金(1508085MC44); 安徽省重点研究与开发计划面上攻关项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金(皖农科[2016] 84 号)

**Supported by:** Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085MC44); Key Research and Development Project of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of Yangtze River Delta in Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016] 84)

\*Corresponding author: E-mail: liyouer@163.com

Received: 2022-03-21; Accepted: 2022-05-06; Published online: 2022-06-22

种内分化程度较高且与 ST 型存在一定交叉性; 毒力基因分布情况存在差异, 毒力基因型呈现多样化。本研究对 SS 临床分离株的流行特征进行探究, 为猪 SS 病诊断、治疗和制定防控措施提供科学依据。

**关键词:** 猪链球菌; 血清型; 毒力基因; 多位点序列分析

## Serotypes, main virulence genes, and multilocus sequence typing of 199 clinical isolates of *Streptococcus suis*

HUANG Xiaohui<sup>1,2</sup>, HAN Xuejiao<sup>1</sup>, LIU Xuelan<sup>1</sup>, LI Liang<sup>1</sup>, SUN Pei<sup>1</sup>, WEI Jianzhong<sup>1</sup>, LI Yu<sup>\*1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

2 Hefei Animal Disease Prevention and Control Center, Hefei 230061, Anhui, China

**Abstract:** [Background] *Streptococcus suis* (SS) has a variety of serotypes, genotypes, and virulence factors. [Objective] To reveal the serotypes, virulence gene distribution, molecular typing characteristics and their associations of SS clinical isolates. [Methods] A total of 199 clinical isolates of SS were collected in this study. We employed PCR to detect the serotypes and virulence genes and carried out multilocus sequence typing (MLST). Further, we analyzed the prevalence and associations of serotypes, virulence genotypes and sequence types (STs). [Results] The 199 SS clinical isolates belonged to 16 serotypes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 21, 24, 29, and 30). The serotypes 2, 4, and 3 were dominant, respectively involving 26.13% (52/199), 14.57% (29/199), and 12.06% (24/199) of the strains, and 21.61% (43/199) of the strains were untypable. We identified 72 STs, among which ST1, ST94, ST117, ST7, ST28, and ST87 were dominant, the strains of which accounted for 12.56% (25/199), 11.56% (23/199), 9.56% (19/199), 9.04% (18/199), 6.03% (12/199), and 3.01% (6/199), respectively. Twenty-four STs (ST1224–ST1227, ST1229–ST1235, ST1241–ST1242, and ST1300–ST1310) were newly discovered. In addition, these 72 STs involved 12 cloning complexes and 32 single STs. The detection rate of the virulence gene *fbps* in the 199 isolates was 96.98% (193/199). A total of 19 virulence genotypes were detected, among which *epf*–/*mrp*–/*sly*–/*gapdh*+/*fbps*+/*orf2*+ were dominant (66 strains, 33.17%). [Conclusion] In recent years the serotypes 2, 4, and 3 were dominant among the clinical isolates of SS. ST had obvious genetic heterogeneity and high degree of intraspecific differentiation. The serotypes and STs showed certain crossover. The isolates in this study presented varied distribution of virulence genes and diverse virulence genotypes. In this study, the epidemiological characteristics of SS clinical isolates were investigated to provide scientific basis for diagnosis, treatment and prevention and control measures of SS disease.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; serotype; virulence gene; multilocus sequence typing (MLST)

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是引起猪链球菌病最主要的病原, 临床上猪链球菌病多呈现脑膜炎、心内膜炎、多发性浆膜炎、关节炎和败血症<sup>[1]</sup>, 同时 SS 也是一种重要的人兽共

患病原菌。SS 的血清型复杂, 根据细菌荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)抗原性的不同, SS 可分为 35 个血清型(SS1-SS34 型和 SS1/2 型)及未定型(NT)的菌株, 其中 SS2 为主要血清型, 分布广且致病性强<sup>[2]</sup>。由于 SS 血清型众多, 而且不同地区血清型流行情况不同, 各血清型菌株之间的免疫交叉保护作用较弱, 因此对 SS 进行血清型鉴定在了解特定地区流行病学和指导疫苗研发等方面有着重要的作用, 能够为合理防控猪链球菌病提供理论依据。以 CPS 合成相关基因为靶基因进行 SS 血清分型的 PCR 技术, 与传统血清凝集分型法相比具有操作快速、简便、成本低廉、特异性较高等特点<sup>[3]</sup>; 而基于 SS 基因组中 7 个管家基因在菌株中的多态性建立的多位点序列分型技术(multilocus sequence typing, MLST)则具有很高的分辨能力和可操作性, 不只可以观察各菌株之间的同源性, 更能够分析它们是否来源于同一个祖先, 所得序列数据有利于各个实验室之间进行交流和比较, 易于统一和标准化, 便于分子流行病学监测与分子进化研究<sup>[4]</sup>。

依据致病性的强弱, SS 可分为强毒株、弱毒株和无毒株。同一血清型和 ST 型或不同血清型和 ST 型的 SS 菌株之间毒力均存在明显差异, 这可能与菌株所携带的毒力因子有很大关系<sup>[5]</sup>。目前已报道的 SS 毒力因子主要包括荚膜多糖(CPS)、溶菌酶释放蛋白(muramidase-released protein, MRP)、胞外蛋白因子(extracellular protein factor, EPF)、溶血素(suilysin, SLY)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、纤黏蛋白结合蛋白(fibronectin and fibrinogen binding protein, FBPS)和毒力相关序列(open reading frame 2, ORF2)等<sup>[6]</sup>; 其中, MRP、EPF 和 SLY 被认为与 SS2 毒力相关联<sup>[7-8]</sup>。

为进一步探究 SS 临床分离株的血清型、毒力基因、ST 的分布特征及其之间的相关性, 本研究针对源自 2009-2019 年 199 株 SS 临床分离株进行了鉴定与分析, 从而为猪链球菌病的诊断、治疗及防治提供科学理论依据, 也为 SS 对公共卫生的风险评估奠定了良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

199 株受试菌株源于安徽、江苏、河北、广西和山东等地区的临床发病猪, 病猪患有至少包含高热、咳喘、关节肿大、皮肤发绀、败血症和脑膜炎等临床症状中的一种, 由安徽农业大学动物传染病实验室分离、鉴定并保存。其中 123 株为 2009-2017 年临床分离株, 76 株为 2018-2019 年临床分离株。

质控菌株: 肺炎链球菌标准株 ATCC 49619, 由安徽农业大学动物传染病实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSB-YE), 绍兴天恒生物科技有限公司; 小牛血清, 上海羽朵生物科技有限公司; 2×Taq PCR Master Mix 和 DL2000 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司。恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, BECKMAN 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一仪器有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

### 1.3 细菌 DNA 提取

将保存的 SS 菌株接种于含有 5%小牛血清的 TSB-YE 培养基中复苏, 37 °C、150 r/min 振荡培养 14 h。用接种环无菌挑取一环菌液四区划线于含有 5%小牛血清的 TSA 平板上, 挑取单菌落接种至含有 5%小牛血清的 TSB-YE 培养基中, 继续振荡培养 14 h, 按照煮沸法制备细

菌 DNA: 吸取培养好的 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清。加入 40  $\mu$ L 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)吹打混匀后, 进行沸水浴 10 min、冰水浴 5 min、再沸水浴 5 min。12 000 r/min 离心 1 min 后移上清液至另一支 1.5 mL 离心管, -20 °C 保存备用。

#### 1.4 SS 分离株血清型定型

根据文献[9]对 SS 分离株进行血清型鉴定。合成用于扩增 SS 不同血清型荚膜多糖基因的引物, 引物序列和预期产物大小见表 1、表 2。引物由通用生物系统有限公司合成。以不同 SS 分离株基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 首先利用分组特异性引物确定 SS 分离株的组别, 然后根据分组 PCR 的鉴定结果, 利用分型特异性引物对该组别所包含的血清型逐一进行鉴定。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 模板 DNA 5.0  $\mu$ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1.0  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 15 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s (分

型为 58 °C, 退火 90 s), 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ L 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统观察并记录结果。

#### 1.5 多位点序列分型(MLST)

根据 King 等<sup>[10]</sup>设计的 7 个管家基因(*mutS*、*recA*、*aroA*、*cpn60*、*thrA*、*dpr* 和 *gki*)引物对细菌进行 PCR 扩增, 引物序列见表 3。引物均由通用生物系统有限公司合成。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 模板 DNA 5.0  $\mu$ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 2.5  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 退火(退火温度见表 3) 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ L 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将鉴定正确的 PCR 产物送至通用生物科技有限公司进行双向测序。将所测序列结果在 SS 的 MLST 数据库(<http://ssuis.mlst.net>)进行等位基因编码查询, 将 7 个等位基因编码输入数据库

表 1 SS 血清型分组 PCR 引物

Table 1 PCR primers for SS serotype grouping

组别 Groups	血清型 Serotypes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	目的片段大小 Products size (bp)
1	3, 13, 18	P1: TGGTTCATATATCAATGCTC P2: ATTGGTTGTGAGTGCATTG	933
2	1, 2, 1/2, 6, 14, 16, 27	P1: TCAAAATACGCACCTAAGGC P2: CACTCACCTGCCCAAGAC	823
3	21, 28, 29, 30	P1: TGATTTGGGTGAGACCATG P2: CTCATGCTGGATAACACGT	583
4	4, 5, 7, 17, 19, 23	P1: ACAGTCGGTCAAGATAATCG P2: TCAGCTTGGGTAATATCTGG	455
5	8, 15, 20, 22, 25	P1: GGAAAGATGGAGGACCAGC P2: CCAACCAGACTCATATCCCC	265
6	9, 10, 11, 12, 24, 26, 33	P1: GACGCACCAAGTGATATGCC P2: GGTCCGACAATAGCCATTTC P3: GATGCCCAAGCGATATGCC P4: GGACCAACAATGGCCATCTC	146
7	31, 32, 34	/	/

注: /: 该组别所包含的血清型无法分组, 需要根据相应血清分型引物直接进行血清型鉴定

Note: /: The serotypes contained in the group cannot be grouped, and it is necessary to directly identify the serotypes according to the corresponding serotypes primers.

表 2 SS 血清型分型 PCR 引物

Table 2 PCR primers for SS serotyping

组别 Groups	血清型 Serotypes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	目的片段大小 Products size (bp)
1	3	P1: GGTTTTGATTGGTCTAGTTG P2: CTCTAAAGCTCGATATCTAC	214
	13	P1: TATGGTTAAAGGTGGAAGT P2: CCTGTATATATTCCCTCCA	408
	18	P1: TAATGGGATAGTTGCGTTAC P2: ATACATAAAGTTGTCCTGCG	617
2	2 and 1/2	P1: TTAGCAACGTTGCCAATAAG P2: AATCCTCCATTA AAAACCCTG	173
	6	P1: GCTCACTATTTTTACATTACAC P2: TATTACTCCGCCAAATACAG	278
	1 and 14	P1: TTAGACAGACACCTTATAGG P2: CTAGCTTCGTTACTTGATTC	386
	16	P1: AAGGTTATCCACGAAAGATG P2: TCCGGCAATATTCTTTCAAG	494
	27	P1: AGACACTGCTTGCATTATTG P2: TCAGAATTACTTCTGTGTC	655
3	21	P1: TATCATATTGAGAATCTTCCC P2: TTGCGTAGCATACAAAGTTC	160
	28	P1: ATTATGTTGGTTGCAGAAGG P2: CGACTCAATTGTTGTAGTAG	272
	29	P1: TTCTGGGATTTTAGGAATGC P2: CATGAAATACGCACTTGTAC	415
	30	P1: TATTGCACTAGCTTCAGAAC P2: TGCATCCATAGTTGTATTTCG	568
	4	4	P1: GACTATCTGTATAACCCAAAC P2: TCCTTCCAAGTATTCTCTAG
5		P1: ATCTTAGGAATGATTCGGAC P2: ACCAGATATCTGAGCAAATG	720
7		P1: AACTACCTACCTGAACTTTG P2: AGTCTAAAAGTGATCGAGTC	566
17		P1: TAGCATCAGTTTATAACGAGG P2: TAGTTTATCTGTGACACACC	455
19		P1: GTGTCGCAAATCAAGTATTG P2: AAGCTAGTACAACAAGCATG	342
23		P1: TAATGTATGCTCTGTCAGT P2: AACGAAACGGAATAGTTTGC	221
5	8	P1: AAATAAGGTAGGAGCTACTC P2: ATCCAACCTTAGCTTTCTGT	446
	15	P1: ATCGTTTTGAGATTGAGTGG P2: TAAACGGATTTCGGTACTCA	542
	20	P1: TGTGGATTTCTGGGATAATC P2: TGTGGACGAATTACTACTTG	698
	22	P1: GCATTATCAGGATTCTTTCC P2: CCAATTGGGTGTTCAAAAAG	296

(待续)

(续表 2)

	25	P1: GTTTGCTCCGATCATAATAG P2: CCAGTAAAAGGACTCAATAC	174
6	9	P1: GAAAGTAGGTATATCTCAGC P2: GGGCTATTA AAACTCCTATC	368
	10	P1: TTTCCATTTGCTTATGGAC P2: GGAATAAAAACGATTGGGAG	633
	11	P1: ATGCGATTGCAACAATTGAC P2: AGGCATGAGTAATACATAGG	833
	12	P1: AACAGGTATTCAGGATTGC P2: CTCGGATAAAGATAATCAGC	131
	24	P1: TACTGAGATTTATTGGGACG P2: AAGCGATTGGATTACATTGC	224
	26	P1: TTATACCGAAATTTTGTGCC P2: CGTCAATCATATAAAGTGGG	472
	33	P1: GATGTTTTCAACAGGTGTAC P2: CAAAGTACCTATTTTCAGCG	710
7	31	P1: ACAATCGTTTCTGCAATACG P2: GATGAAAACATCGTTGGTAG	842
		P1: ATCAGTAGTGGGAATAGTTG P2: TTTACTGTTTTTCGACCGTG	423
	32	P1: AACCGCTGTTGAATTAAGAG P2: TTCGTTAGTTGAACTGTTCC	570
		P1: TAGGACTATGGTTCCTAATG P2: TATTCTAGTTCAAGTCGCTC	342
	34	P1: AAGTTTCATTTCGAGGACTTC P2: GTATATAACACCGCAAGAAG	246
		P1: ATACAGTGATGTCTTGCAAC P2: ATTGCTTTTTGACAATCGGC	701

表 3 SS 7 个管家基因扩增引物序列

Table 3 Primer sequences for amplification of seven SS housekeeping genes

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	退火温度 Anneal temperature (°C)	目的片段大小 Products size (bp)
<i>aroA</i>	F: TTCCATGTGCTTGAGTCGCTA R: ACGTGACCTACCTCCGTTGAC	59	563
<i>cpn60</i>	F: TTGAAAAACGTRACKGCAGGTGC R: ACGTTGAAIGTACCAAGAATC	56	466
<i>dpr</i>	F: CGTCTTTCAGCCCGCTCCA R: GACCAAGTTCTGCCTGCAGC	57	468
<i>gki</i>	F: GGAGCCTATAACCTCAACTGG R: AAGAACGATGTAGGCAGGATT	57	553
<i>mutS</i>	F: CGCAGAGCAGATGGAAGATCC R: CCCATAGCTGTTTTGGTTTCATC	57	526
<i>recA</i>	F: TATGATGAGTCAGGCCATG R: CGCTTAGCATTTTCAGAACC	52	432
<i>thrA</i>	F: GATTCAGAACGTCGCTTTGT R: AAGTTTTTCATAGAGGTCAGC	52	523

查询序列 ST 型。应用 START V2.0 软件构建 UPGMA 系统进化树作聚类分析, 利用 BURST 在线网站对各 ST 型进行分析并确定其克隆复合物。

### 1.6 毒力因子检测

选择 6 个主要的毒力基因(*epf*、*mrp*、*sly*、*orf2*、*gapdh* 和 *fbps*)进行 PCR 检测, 参考文献 [11]合成 SS 毒力基因 *epf*、*mrp*、*sly* 和 *orf2* 的 PCR 引物; 根据 NCBI 上 *gapdh* 和 *fbps* 基因序列的保守区, 使用 Primer Premier 5.0 设计 SS 毒力基因 *gapdh* 和 *fbps* 的 PCR 引物。引物序列及退火温度见表 4, 引物均由通用生物系统有限公司合成。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 模板 DNA 2.0  $\mu$ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5  $\mu$ L,  $2\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 退火(退火温度见表 4) 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ L 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统观察并记录结果。

表 4 SS 毒力基因扩增引物序列

Table 4 Primer sequences for amplification of SS virulence genes

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	退火温度 Anneal temperature ( $^{\circ}$ C)	目的片段大小 Products size (bp)
<i>epf</i>	F: GCTACGACGGCCTCAGAAATC R: TGGATCAACCACTGGTGTAC	56	626
<i>mrp</i>	F: CAGATGTGGACCGTAGACC R: GGATAATCACCAGCAGGAA	56	316
<i>sly</i>	F: GCAGAAGGGACAACCTGTAGAAG R: GGACTGCTATTATGGACTGTTGA	56	443
<i>orf2</i>	F: CAAGTGTATGTGGATGGG R: ATCCAGTTGACACGTGCA	56	858
<i>gapdh</i>	F: CACTAACCACGACATCCTT R: CAGCGTTTACTTCTTCAGC	55	383
<i>fbps</i>	F: ATGGGCAAGCACAGCAATA R: CCTGATAGTAGAAGTCCAGCAGAC	55	435

## 2 结果与分析

### 2.1 血清型鉴定结果

采用 PCR 技术对 199 株 SS 临床分离株进行血清分型的结果显示, NT 型菌株占 21.61% (43/199), 可定型的 156 株 SS 分属于 SS1、SS2、SS3、SS4、SS6、SS7、SS8、SS9、SS10、SS12、SS15、SS16、SS21、SS24、SS29 和 SS30 等 16 种血清型, 其中 SS2 占 26.13% (52/199), 为优势血清型; 其次为 SS4 占 14.57% (29/199)、SS3 占 12.06% (24/199)、SS8 占 5.02% (10/199), 见图 1 和图 2。2009–2017 年间分离的 123 株 SS 主要血清型为: SS2 占 38.21% (47/123), SS3 占 15.45% (19/123), SS4 占 7.32% (9/123); 而 2018–2019 年间分离的 76 株 SS 主要血清型为: SS4 占 26.32% (20/76), SS8 占 7.89% (6/76), SS2 及 SS3 均占 6.58% (5/76)。

### 2.2 MLST 分型结果

#### 2.2.1 ST 型鉴定结果

对 SS 临床分离株 7 个管家基因进行 PCR

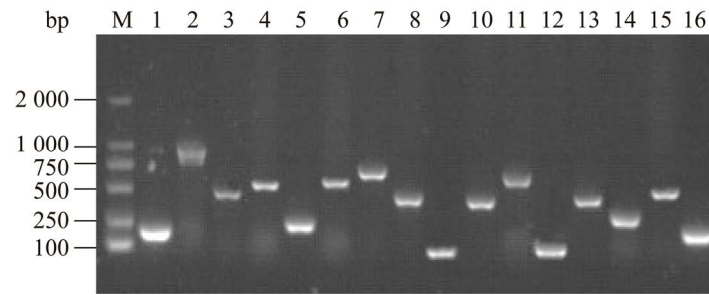


图1 SS血清型PCR鉴定图

Figure 1 PCR identification of SS serotypes. M: DL2000 DNA Marker; 1: SS21 (160 bp); 2: SS4 (903 bp); 3: SS8 (446 bp); 4: SS7 (566 bp); 5: SS3 (214 bp); 6: SS15 (542 bp); 7: SS10 (633 bp); 8: SS1 (386 bp); 9: SS12 (131 bp); 10: SS9 (368 bp); 11: SS30 (568 bp); 12: SS2 (173 bp); 13: SS29 (415 bp); 14: SS6 (278 bp); 15: SS16 (494 bp); 16: SS24 (224 bp).

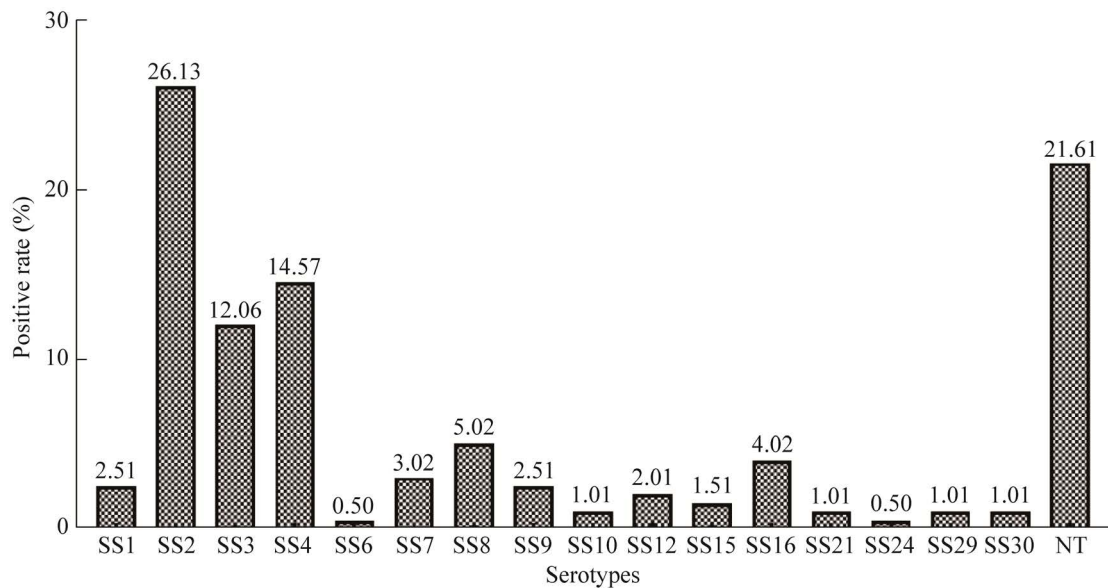


图2 199株SS血清型鉴定结果

Figure 2 Serotypes identification of 199 SS isolates.

扩增的结果见图3。经测序、比对分析显示, 199株SS共有72种ST型,具体分布情况见表5,其中ST1占12.56% (25/199), ST94占11.56% (23/199), ST117占9.56% (19/199), ST7占9.04% (18/199), ST28占6.03% (12/199), ST87占3.01% (6/199), 这些为主要ST型。在72种ST型中有24种为新发现的ST型,分别为: ST1224–ST1227, ST1229–ST1235, ST1241–ST1242, ST1300–ST1310。

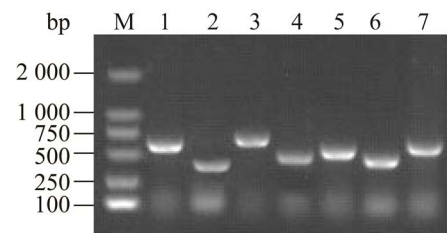


图3 管家基因PCR扩增结果

Figure 3 The PCR amplification results of housekeeping genes. M: DL2000 DNA Marker; 1: *mutS* (526 bp); 2: *recA* (432 bp); 3: *aroA* (563 bp); 4: *cpn60* (466 bp); 5: *thrA* (523 bp); 6: *dpr* (468 bp); 7: *gki* (553 bp).



表 5 199 株 SS 的 MLST 结果

Table 5 The MLST results of 199 SS

ST 型	菌株数(株)	血清型(菌株数)	ST 型	菌株数(株)	血清型(菌株数)	ST 型	菌株数(株)	血清型(菌株数)
ST types	Isolates	Serotypes	ST types	Isolates	Serotype	ST types	Isolates	Serotypes
	(strains)	(isolates)		(strains)	(isolates)		(strains)	(isolates)
ST1	25	2 (23) 16 (1) 1 (1)	ST94	23	4 (19) NT (4)	ST117	19	3 (17) NT (2)
ST7	18	2 (16) 10 (1) 1 (1)	ST28	12	2 (11) 12 (1)	ST87	6	8 (6)
ST1229	4	NT (4)	ST308	4	3 (3) 8 (1)	ST957	4	3 (1) 16 (2) 21 (1)
ST1081	3	NT (3)	ST1231	3	NT	ST1241	3	8 (3)
ST1257	3	NT (3)	ST13	3	1 (3)	ST485	3	4 (3)
ST1067	2	NT (2)	ST108	2	NT (2)	ST1230	2	NT (2)
ST1271	2	29 (1) NT (1)	ST1274	2	9 (2)	ST1301	1	16 (1)
ST316	2	12 (2)	ST373	2	7 (2)	ST436	2	NT (2)
ST82	2	9 (1) NT (1)	ST1084	1	NT (1)	ST1150	1	NT (1)
ST1004	1	3 (1)	ST1155	1	24 (1)	ST1156	1	6 (1)
ST1158	1	4 (1)	ST1224	1	4 (1)	ST1225	1	30 (1)
ST1226	1	7 (1)	ST1227	1	NT (1)	ST1232	1	NT (1)
ST1233	1	12 (1)	ST1234	1	30 (1)	ST1235	1	NT (1)
ST1242	1	NT (1)	ST1256	1	3 (1)	ST1268	1	2 (1)
ST1269	1	4 (1)	ST1270	1	4 (1)	ST1272	1	NT (1)
ST1273	1	NT (1)	ST1275	1	16 (1)	ST1276	1	16 (1)
ST1296	1	15 (1)	ST1297	1	4 (1)	ST1298	1	16 (1)
ST1299	1	2 (1)	ST1300	1	15 (1)	ST1302	1	NT (1)
ST1303	1	10 (1)	ST1304	1	NT (1)	ST1305	1	NT (1)
ST1307	1	9 (1)	ST1308	1	9 (1)	ST1309	1	21 (1)
ST1310	1	29 (1)	ST191	1	16 (1)	ST243	1	7 (1)
ST289	1	3 (1)	ST29	1	7 (1)	ST32	1	7 (1)
ST615	1	NT (1)	ST662	1	NT (1)	ST684	1	NT (1)
ST685	1	15 (1)	ST850	1	4 (1)	ST942	1	4 (1)

52 株 SS2 型分离株包括 ST1、ST7 及 ST28 等 5 种 ST 型, 其中 ST1 占比 44.23% (23/52)、ST7 占比 30.77% (16/52); 29 株 SS4 型分离株包括 ST94、ST485 及 ST850 等 8 种 ST 型, ST94 占比 65.5% (19/29); 24 株 SS3 型分离株包括

ST117、ST308 及 ST1004 等 6 种 ST 型, ST117 占比 70.83% (17/24)。

### 2.2.2 MLST 聚类分析结果

利用 BURST 在线网站(<https://pubmlst.org/>)对 SS 分离株进行分群统计, 结果显示 199 株

SS 临床分离株被划分为 12 个克隆群和 32 个单个 ST 型。ST1、ST7、ST289、ST1268 和 ST1299 属于 ST1 克隆群；ST28、ST29、ST32、ST117、ST1004、ST1150、ST1226、ST1241 和 ST1256 属于 ST27 克隆群；ST87 和 ST308 属于 ST87 克隆群；ST94、ST108、ST373、ST485、ST662 和 ST1269 属于 ST94 克隆群；ST191 和 ST1301 属于 ST191 克隆群；ST850 和 ST1297 属于 ST850 克隆群；ST1155 和 ST1156 属于 ST1155 克隆群；ST1158 和 ST1224 属于 ST1158 克隆群；ST1229、ST1231、ST1232 和 ST1233 属于 ST1229 克隆群；ST1275 和 ST1298 属于 ST1275 克隆群；ST1296 和 ST1300 属于 ST1296 克隆群；ST1307 和 ST1308 属于 ST1307 克隆群；其余 32 种 ST 型未划分到任何克隆群，为单个 ST 型。根据 199 株 SS 临床分离株的 72 种 ST 型构建 UPGMA 系统发育树，分离株可分为 2 个分支，分支一中包含 195 株 SS 共 70 种 ST 型，分支二中包含 4 株 SS (HF09-7、BB11-1、LA12-3 和 HF09-3) 共 2 种 ST 型(图 4)。

### 2.3 毒力基因检测结果

通过 PCR 技术对 199 株 SS 临床分离株的 6 种毒力基因 *epf*、*mrp*、*sly*、*gapdh*、*fbps* 和 *orf2* 进行检测,图 5 显示检出率分别为:*epf* 为 19.60% (39/199), *mrp* 为 9.56% (19/199), *sly* 为 46.73% (93/199), *gapdh* 为 92.46% (184/199), *fbps* 为 96.98% (193/199), *orf2* 为 76.38% (152/199)。其中 SS2 型分离株 *epf*、*mrp* 和 *sly* 的检出率分别为 48.08% (25/52)、19.23% (10/52) 和 61.54% (32/52); SS4 型分离株 *epf*、*mrp*、*sly* 的检出率分别为 44.82% (13/29)、24.14% (7/29) 和 68.97% (20/29)。199 株 SS 临床分离株共有 19 种毒力基因型, 66 株 SS 呈现 *epf*-/*mrp*-/*sly*-/*gapdh*+/*fbps*+/*orf2*+, 占比为 33.17% (66/199), 属于优势毒力基因型。毒力基因型分布情况见表 6。

其中 SS2 型分离株共呈现 11 种毒力基因型, SS4 型和 SS3 型分离株均为 6 种。另外, ST1 型分离株含有 9 种毒力基因型, ST7 型为 8 种, ST94 型为 7 种, ST117 型为 4 种。

## 3 讨论与结论

SS 血清型种类繁多,其流行情况在不同地理位置有所差异。世界范围内流行最广的是 SS2 型,亚洲地区除 SS2 型外,SS3、SS4、SS5、SS7、SS8 及 SS1/2 型也较为多见。我国 SS 的分离率以 SS2 型最高,其次为 SS3、SS4、SS8、SS5、SS7、SS1/2、SS16 和 SS17 型<sup>[7]</sup>。Wei 等<sup>[7]</sup>分析了 2003–2007 年在国内 16 个省分离的 385 株致病性 SS 的血清型,以 SS2 型最多,其次是 SS3 型,SS4、SS8、SS5、SS7 和 SS1/2 型均有检出。刘琪等<sup>[12]</sup>对广州地区发病猪群 SS 流行病学调查分析表明,主要流行血清型为 SS2 型,其次为 SS3 型和 SS19 型。本研究结果显示,199 株 SS 临床分离株共分为 16 种血清型和 NT 型,在可定型的 SS 中,占比最多的是 SS2 型,其次为 SS4、SS3 和 SS8 型,表明兽医临床上存在多种血清型的 SS 感染,SS2 型为优势血清型,与国内相关报道<sup>[7,12]</sup>一致。2009–2017 年 SS 临床分离株以 SS2 型检出率最高,其次为 SS3 型和 SS4 型,而 2018–2019 年则以 SS4 型为主,其次为 SS8 型,表明兽医临床上 SS 的血清型流行分布呈现因时间推移而有所变化,这与刘琪等<sup>[12]</sup>和周明瑶<sup>[13]</sup>的报道一致。鉴于长期大量使用抗生素会导致药物残留及耐药菌株的产生,而且国家农业农村部推行的兽用抗菌药使用减量化行动,因此疫苗免疫接种成为目前防控猪链球菌病的首选途径,但由于 SS 血清型众多,而且不同地区血清型流行情况有所差异,同时各血清型间的免疫交叉保护作用较

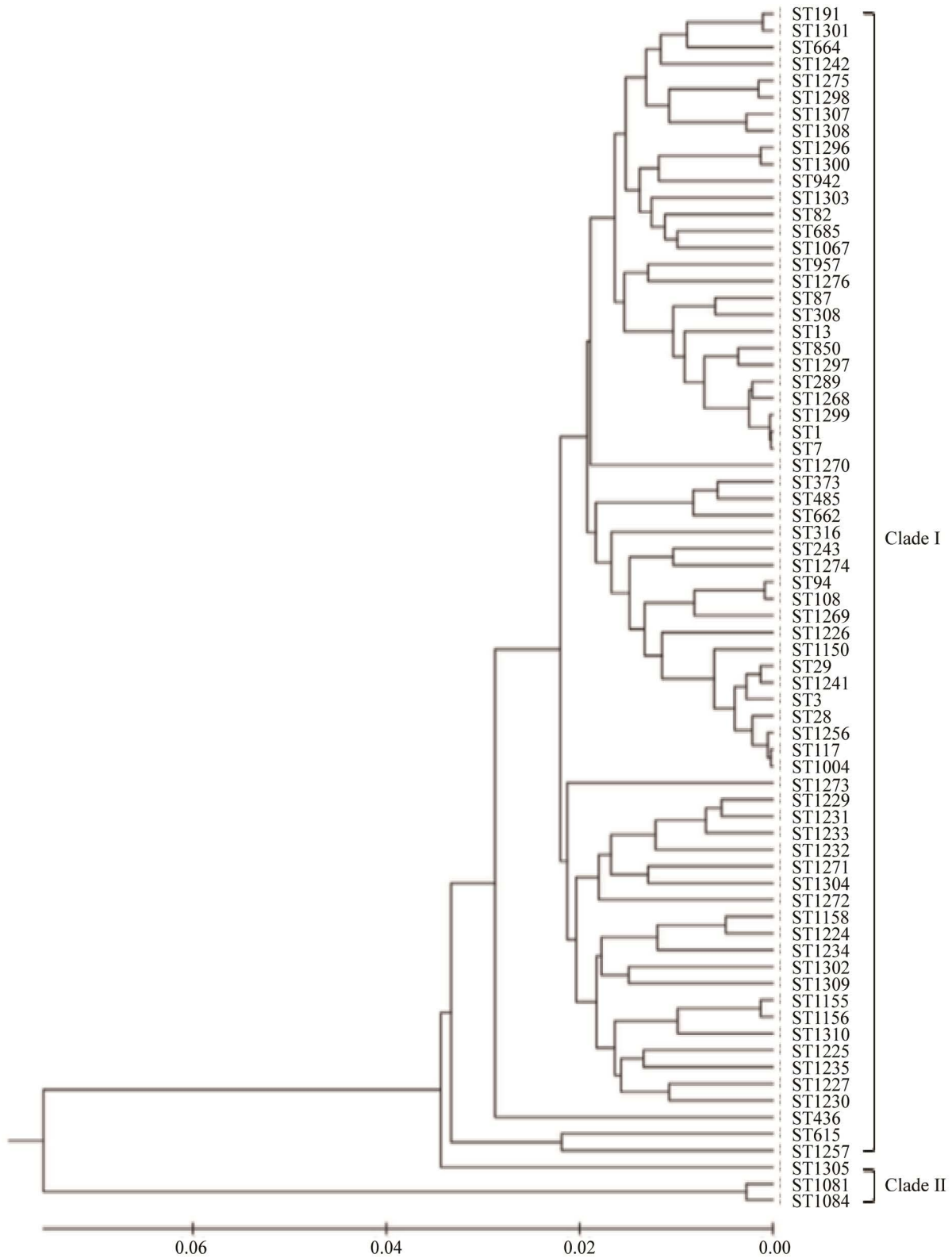


图 4 199 株 SS 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 199 SS.

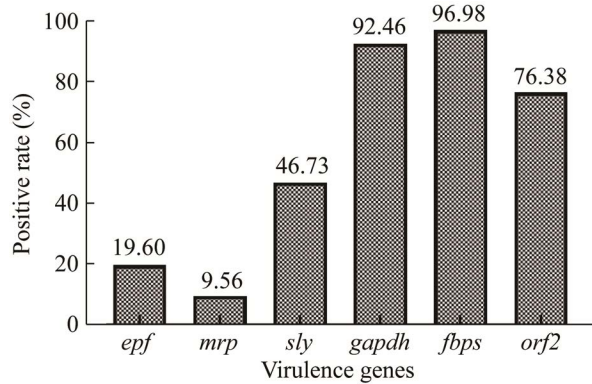


图5 毒力基因在SS分离株中的检出率

Figure 5 Detectable rate of virulence genes in SS isolates.

弱, 因此, 了解和掌握 SS 流行的血清型对于合适疫苗的选择具有重要意义。

MLST 作为一种具有高分辨率的分型方法, 可实现区域性细菌分子流行病学监测, 广泛用于 SS 的流行病学调查<sup>[4]</sup>。King 等<sup>[10]</sup>对 294 株 SS 分离株进行 MLST 分析, 共获得 92 种 ST 型, 其中 ST1 克隆群、ST27 克隆群和 ST87 克隆群为主要 ST 克隆群。Ye 等<sup>[14]</sup>对国内两次暴发的 SS 疫情的研究结果发现 114 株 SS 中有 106 株属于 ST1 克隆群。Wang 等<sup>[15]</sup>对我国屠宰场生猪 SS 携带情况的调查结果表明 ST1 克

表6 199株SS的毒力基因型

Table 6 Virulence genotypes of 199 SS

毒力基因型 Virulence genotypes	菌株数 Isolates No.	百分比及占比 Percentage and proportion	ST型(总数) ST types (total)	血清型 Serotypes
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	66	33.17% (66/199)	ST7, ST28, ST1, ST117, ST94... (42)	2, 3, 4, 8, 9, 16, 7, 12, 15, 10, 21, 29, 30, 24, NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	38	19.09% (38/199)	ST1, ST7, ST117, ST308, ST94... (20)	2, 3, 4, 8, 1, 9, 16, 7, 15, NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	22	11.06% (22/199)	ST1, ST28, ST117, ST308, ST1256... (17)	2, 3, 4, 16, 7, 12, 21, NT
<i>epf</i> <sup>+</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	19	9.56% (19/199)	ST1, ST7, ST94, ST1224 (4)	2, 4, 1
<i>epf</i> <sup>+</sup> / <i>mrp</i> <sup>+</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	15	7.54% (15/199)	ST1, ST7, ST1299, ST94 (4)	2, 4
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	12	6.03% (12/199)	ST7, ST289, ST485, ST87... (11)	2, 3, 4, 8, 1, 9, 16, NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	5	2.51% (5/199)	ST28, ST1156, ST1257, ST1081 (4)	2, 6, NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	4	2.01% (4/199)	ST1081, ST1084, ST1229, ST1302 (4)	NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>-</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	3	1.51% (3/199)	ST13, ST373 (2)	1, 7
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>-</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	2	1.01% (2/199)	ST684, ST1150 (2)	NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>+</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	2	1.01% (2/199)	ST1, ST7 (2)	2
<i>epf</i> <sup>+</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	2	1.01% (2/199)	ST1, ST7 (2)	2
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	2	1.01% (2/199)	ST94, ST108 (2)	2
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>-</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	1	0.50% (1/199)	ST87 (1)	8
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>-</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	1	0.50% (1/199)	ST94 (1)	NT
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>+</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>+</sup>	1	0.50% (1/199)	ST957 (1)	3
<i>epf</i> <sup>-</sup> / <i>mrp</i> <sup>+</sup> / <i>sly</i> <sup>+</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	1	0.50% (1/199)	ST117 (1)	3
<i>epf</i> <sup>+</sup> / <i>mrp</i> <sup>-</sup> / <i>sly</i> <sup>-</sup> / <i>gapdh</i> <sup>+</sup> / <i>fbps</i> <sup>+</sup> / <i>orf2</i> <sup>-</sup>	1	0.50% (1/199)	ST1 (1)	2

注: +: 该基因 PCR 检测结果为阳性; -: 该基因 PCR 检测结果为阴性

Note: +: PCR results of the gene are positive; -: PCR results of the gene are negative.

克隆群和 ST27 克隆群为主要流行复合物。本研究中 199 株 SS 临床分离株共有 72 种 ST 型, 分为 12 个克隆群和 32 个单个 ST 型, 其中 21 种为新发现的 ST 型, 12 个克隆群中 ST1 克隆群占 23.12% (46/199)、ST27 克隆群占 20.10% (40/199), 表明 SS 临床分离株 ST 型呈多元化分布, ST1 克隆群和 ST27 克隆群为 SS 的主要流行复合物, 与当前国内 ST 复合物流行趋势一致。UPGMA 系统发育树显示不同 ST 型菌株处于不同进化分支, 种类分化程度高, 具有遗传多样性, 同一克隆群中的不同 ST 型菌株处于同一进化分支, 亲缘关系更近。新发现的 21 种 ST 型丰富了 MLST 的数据, 其产生可能是由于不同 ST 型的菌群之间频繁接触, 导致不同菌群间等位基因的水平转移或随机的基因位点突变。进一步分析不同血清型 SS 临床分离株的 ST 型, 结果显示 SS2 型分离株 ST1 和 ST7 为优势 ST 型, 与国内外 SS2 分离株流行的 ST 型相符<sup>[16-17]</sup>; SS3 型分离株优势 ST 型为 ST117, 不同于 Goyette-Desjardins 等<sup>[18]</sup>的研究结果; SS4 型分离株优势 ST 型为 ST94, 与国内外的报道也并非完全相同, 我国江沪地区发病猪中 SS4 优势 ST 型为 ST850<sup>[19]</sup>, 美国、泰国发病猪中 SS4 分离株流行 ST 型均为 ST94<sup>[1,20]</sup>。表明 SS 的 ST 型多样, 在不同血清型 SS 中流行情况各异, 但与血清型呈交叉相关。

SS 致病力的差异与其毒力因子的分布密切相关, SS 毒力因子众多, 主要包括 MRP、EPF、SLY、GAPDH、FBPS 和 ORF2 等<sup>[6]</sup>, 它们协同影响着 SS 的致病性。不同毒力基因在 SS 致病过程中功能不同, 其中 *gapdh* 参与细菌黏附宿主细胞的过程, *fbps* 在 SS 定殖靶器官与免疫逃避过程中发挥作用<sup>[21]</sup>。*mrp*、*epf* 和 *sly* 是 SS 的毒力标志基因, 主要影响 SS 的侵袭力、黏附力以及在血液中的存活能力, 其携带率一

定程度上能够反映 SS 致病力的强弱<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, 6 种常见毒力基因中携带率最高的是 *fbps* 和 *gapdh* 基因, 分别为 96.98% (193/199) 和 92.46% (184/199), 广泛分布于各血清型 SS 菌株中, 表明黏附、定殖及代谢能力在 SS 生存、繁殖、感染宿主并致病的过程中起重要作用。*mrp*、*epf* 和 *sly* 在不同血清型分离株中的携带率不同, 其中 SS2 菌株的携带率(19.23%、24.14% 和 48.08%) 和 SS4 菌株的携带率(44.82%、61.54% 和 68.97%) 均明显高于 SS 的平均携带率(9.56%、19.60% 和 46.73%), 这可能与 SS 不同血清型临床分离株致病性的差异有关。199 株 SS 临床分离株共呈现 19 种毒力基因型, 其中 *epf-mrp-sly-gapdh+fbps+orf2+* 型为优势毒力基因型, 占比为 33.17% (66/199)。在欧洲, 毒力基因型为 *epf-mrp-sly-* 的菌株通常被认为无毒力, 但许大文<sup>[23]</sup>、陶政<sup>[24]</sup>在进行 SS 安徽省和江西省分离株致病性研究中发现该基因型菌株也具有致病作用。Fittipaldi 等<sup>[25]</sup>研究也表明缺乏此 3 种毒力标志基因的菌株不一定是弱毒株。因此, 毒力基因的分布并不能完全解释菌株临床感染的毒力强弱, 动物试验仍是检验菌株毒力强弱的唯一标准。进一步分析不同血清型 SS 携带毒力基因及其类型, 结果显示 199 株 SS 临床分离株均携带 1-6 种毒力基因, 其中 SS2 型和 SS4 型各 2-6 种、SS3 型 2-4 种; SS2 型呈现 11 种毒力基因型, SS4 型和 SS3 型各 6 种。表明 SS 临床分离株的毒力基因分布复杂, 毒力基因型呈现多样化, 而且不同血清型或同一血清型的 SS 所携带的毒力基因及其类型均存在差异。此外, SS 不同 ST 型或同种 ST 型菌株间的毒力基因型也存在差异。贺亚楠<sup>[26]</sup>对 22 株 SS 江苏分离株 MLST 及毒力因子检测结果显示, 同种 ST 型的不同菌株携带的毒力基因不同; Zhu 等<sup>[8]</sup>对 180 株 SS2 中国分离株进

行 MLST 及毒力基因型分析, 提出 ST 型与毒力基因型分布之间为随机性关联。本研究结果显示同一 ST 型菌株包含多种毒力基因型, 不同 ST 型菌株的毒力基因型种类也不同, 表明 ST 型与毒力基因型之间并无明确的相关性。鉴于 SS 高度动态、开放的泛基因组之间常常发生大规模重排<sup>[27]</sup>, 因此多种毒力基因的携带和毒力基因型的多样化使得 SS 对养殖业及公共安全的威胁更大, 应引起关注。

综上所述, 199 株 SS 临床分离株血清型种类较多, SS2 为优势血清型; ST 型多元化, 种类分化程度高; 毒力基因型呈现多样化。血清型与 ST 型存在一定交叉性, 血清型、ST 型与毒力基因型之间均无相关性。

## REFERENCES

- [1] 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-e00319
- [2] Dekker N, Bouma A, Daemen I, Vernooij H, Van Leengoed L, Wagenaar JA, Stegeman A. Effect of simultaneous exposure of pigs to *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 on their colonization and transmission, and on mortality[J]. *Pathogens*, 2017, 6(4): 46
- [3] Liu ZJ, Zheng H, Gottschalk M, Bai XM, Lan RT, Ji SB, Liu HC, Xu JG. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72070
- [4] 廖亚玲, 邹全明. 病原微生物基因多位点序列分型的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35(4): 65-68  
Liao YL, Zou QM. Advances in multilocus sequence typing of pathogenic microorganisms[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2007, 35(4): 65-68 (in Chinese)
- [5] Silva LMG, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(1/2/3): 117-127
- [6] Zhang CP, Zhang ZQ, Song L, Fan XZ, Wen F, Xu SX, Ning YB. Antimicrobial resistance profile and genotypic characteristics of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolated from clinical carrier sows and diseased pigs in China[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 284303
- [7] Wei ZG, Li R, Zhang AD, He HK, Hua YF, Xia J, Cai XH, Chen HC, Jin ML. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 137(1/2): 196-201
- [8] Zhu WF, Wu C, Sun XM, Zhang AD, Zhu J, Hua YF, Chen HC, Jin ML. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(3/4): 527-534
- [9] Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(5): 1714-1719
- [10] 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
- [11] 李丽, 黄良宗, 谢博, 张海龙, 顾万军. 9 型猪链球菌广东株的分离鉴定和基因序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(4): 1016-1026  
Li L, Huang LZ, Xie B, Zhang HL, Gu WJ. Isolation, identification and gene sequence analysis of *Streptococcus suis* serotype 9 strain from Guangdong[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(4): 1016-1026 (in Chinese)
- [12] 刘琪, 王娟, 周如月, 贾爱卿, 王贵平. 广东地区健康猪群和发病猪群猪链球菌流行病学调查分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(6): 1825-1831  
Liu Q, Wang J, Zhou RY, Jia AQ, Wang GP. The *Streptococcus suis* epidemiological analysis of healthy and infected swine in Guangdong province[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(6): 1825-1831 (in Chinese)
- [13] 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: 南京农业大学硕士学位论文, 2016

- Zhou MY. The epidemiological investigation of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in southern Jiangsu province in 2015[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [14] Ye CY, Zhu XP, Jing HQ, Du HM, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang LL, Bai XM, Zhou YY, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(8): 1203-1208
- [15] Wang KC, Zhang W, Li XC, Lu CP, Chen JM, Fan WX, Huang BX. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from slaughter swine[J]. Current Microbiology, 2013, 66(4): 344-349
- [16] 陈经雕, 刘美真, 柯碧霞, 谭海玲, 李柏生, 柯昌文. 广东省猪链球菌 2 型菌株毒力基因及分子分型分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(10): 986-990
- Chen JD, Liu MZ, Ke BX, Tan HL, Li BS, Ke CW. Analysis on the main virulence genes and molecular typing of *Streptococcus suis* type 2 in Guangdong province[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(10): 986-990 (in Chinese)
- [17] 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
- [18] 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
- [19] 孙珂, 倪艳秀, 祝昊丹, 王丹丹, 关琳, 俞正玉, 周俊明, 吕立新, 王春风, 何孔旺. 猪链球菌 4 型分离株生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(1): 80-88
- Sun K, Ni YX, Zhu HD, Wang DD, Guan L, Yu ZY, Zhou JM, Lyu LX, Wang CF, He KW. Study on biological characteristics of *Streptococcus suis* type 4 isolates[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(1): 80-88 (in Chinese)
- [20] 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
- [21] Shelyakin PV, Bochkareva OO, Karan AA, Gelfand MS. Micro-evolution of three *Streptococcus* species: selection, antigenic variation, and horizontal gene inflow[J]. BMC Evolutionary Biology, 2019, 19(1): 83
- [22] 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
- [23] 许大文. 致病性猪链球菌安徽分离株的生物学特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2012
- Xu DW. Biological study on pathogenic *Streptococcus suis* Anhui isolates[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [24] 陶政. 猪链球菌江西分离株的生物学特性研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2017
- Tao Z. Biological characteristics study on *Streptococcus suis* isolated from Jiangxi province[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [25] Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. 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
- [26] 贺亚楠. 江苏部分地区 2016 年健康猪群猪链球菌流行病学调查[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017
- He YN. The epidemiological investigation of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in Jiangsu province in 2017[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [27] 张九州. 猪链球菌血清 2 型分子诊断技术研究及初步应用[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2012
- Zhang JZ. Development and preliminary application of molecular diagnostic technique of *Streptococcus suis* serotype 2[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2012 (in Chinese)