

研究报告

猪链球菌 4 型疫苗用菌株的筛选

段倩倩^{1,2}, 刘雪兰¹, 邢刚³, 李亮¹, 孙裴¹, 魏建忠¹, 李郁^{*1}

1 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

2 安徽省动物疫病预防与控制中心, 安徽 合肥 230091

3 马鞍山史记动物健康管理有限公司, 安徽 马鞍山 238251

段倩倩, 刘雪兰, 邢刚, 李亮, 孙裴, 魏建忠, 李郁. 猪链球菌 4 型疫苗用菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4224-4241
Duan Qianqian, Liu Xuelan, Xing Gang, Li Liang, Sun Pei, Wei Jianzhong, Li Yu. Screening of strains for inactivated vaccine against *Streptococcus suis* serotype 4[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4224-4241

摘要:【背景】猪链球菌 4 型(*Streptococcus suis* serotype 4, SS4)分离率日益升高, 对养殖业和公共卫生安全造成严重危害, 目前尚无有效的 SS4 疫苗。【目的】筛选致病力强、抗原性好、遗传性状稳定的 SS4 疫苗菌种。【方法】以 7 株 SS4 分离株(代号为 A1-A7)为受试菌株, 通过累积法测定菌株半数致死量(LD_{50}), ELISA 测定免疫小鼠血清中 IgG 效价, 攻毒保护试验测定免疫保护率, 并采集小鼠脏器观察病理组织学变化。再连续传代培养受试菌株, 分别对第 10、20、30 代菌株进行致病性和抗原性试验。【结果】A1-A7 菌株对小鼠的 LD_{50} 分别为 2.19×10^8 、 1.76×10^8 、 1.83×10^8 、 1.01×10^8 、 4.05×10^8 、 1.19×10^8 和 9.03×10^7 CFU。二免 7 d 后, A1、A2、A3、A4、A6、A7 免疫组 IgG 效价分别为 1:1 600、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:3 200 和 1:6 400, 免疫保护率分别为 30%、30%、50%、70%、60%和 80%, 而且 A4、A7 免疫组小鼠组织病变较其余 4 组轻微。体外传至 30 代后, A4 菌株的 LD_{50} 上升至 3.81×10^8 CFU, IgG 效价下降至 1:1 600, 免疫保护率下降至 40%, 而 A7 菌株的 LD_{50} 上升至 2.49×10^8 CFU, IgG 效价和免疫保护率稳定保持为 1:6 400 和 80%, 而且 A7 免疫组小鼠的组织病变较 A4 免疫组轻微。【结论】A7 菌株(原始编号为 HBgu18-4)具有强致病力和良好的抗原性, 而且遗传性状均一、稳定, 可作为 SS4 制苗候选菌株。

关键词: 猪链球菌 4 型; 疫苗用菌株; 致病性; 抗原性; 稳定性

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: 2022-02-12; Accepted: 2022-03-22; Published online: 2022-05-05

Screening of strains for inactivated vaccine against *Streptococcus suis* serotype 4

DUAN Qianqian^{1,2}, LIU Xuelan¹, XING Gang³, LI Liang¹, SUN Pei¹, WEI Jianzhong¹, LI Yu^{*1}

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

2 Anhui Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Hefei 230091, Anhui, China

3 Maanshan Shiji Animal Health Management Limited Company, Maanshan 238251, Anhui, China

Abstract: [Background] The increasing isolation rate of *Streptococcus suis* serotype 4 (SS4) causes serious harm to animal farming and public health, and there has been no effective vaccine for SS4 so far. [Objective] The purpose of this research was to screen out SS4 vaccine strains with strong pathogenicity and desirable antigenicity and genetic stability. [Methods] Seven SS4 isolates (code A1–A7) were selected as the tested strains. They were determined for the half lethal dose (LD_{50}), the IgG titer in serum of immunized mice and the immune protection rate by Reed-Muench method, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and challenge assay, respectively. Meanwhile, the histopathological changes of the mice organs were observed, and after continuous subculture, the 10th, 20th, 30th generations of the tested strains were subjected to pathogenicity and antigenicity tests. [Results] The LD_{50} of A1–A7 for the mice were 2.19×10^8 , 1.76×10^8 , 1.83×10^8 , 1.01×10^8 , 4.05×10^8 , 1.19×10^8 , and 9.03×10^7 CFU, respectively. After 7 days of secondary immunization, the IgG titers of A1, A2, A3, A4, A6, and A7 immune group were 1:1 600, 1:1 600, 1:3 200, 1:6 400, 1:3 200 and 1:6 400, respectively, and the immune protection rates were 30%, 30%, 50%, 70%, 60% and 80%, respectively, with the pathological changes of A4 and A7 immune groups being milder than the other immune groups. After *in vitro* passing to the 30th generation, the LD_{50} of A4 increased to 3.81×10^8 CFU, and the IgG titer and the immune protection rate decreased to 1:1 600 and 40%. By comparison the LD_{50} of A7 elevated to 2.49×10^8 CFU, and the IgG titer and the immune protection rate remained stable at 1:6 400 and 80%. Additionally, the pathological changes of A7 were milder compared with those of A4. [Conclusion] A7 (original number HBgu18-4) had strong pathogenicity and good antigenicity, with uniform and stable genetic traits. It could be used as a candidate strain for SS4 vaccine.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 4; vaccine strains; pathogenicity; antigenicity; stability

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种能引起败血症、关节炎、脑膜炎和心内膜炎的人畜共患病原菌。根据荚膜多糖抗原多态性, SS分为 29 种血清型, 从发病猪中分离到的 SS 大多属于 1–9 型, 以 SS2 为主。然而 SS 致病菌株会随着时间的推移发生变化。在临床发病猪中, 虽然 SS2 菌株仍占主导地位, 但是 SS4 菌株的分离率也呈现逐渐升高的态势^[1-3], 而且已

报道多起人感染 SS4 的病例。1988 年 Arends 等^[4]首次于荷兰分离到一株引起人脑膜炎的 SS4; 2009–2012 年 Kerdsin 等^[5]又在泰国分离到一株引起人败血症的 SS4。可见, 控制 SS4 感染对养殖业发展和公共卫生安全均具有重要意义。

一直以来, 疫苗免疫接种被认为是防治猪链球菌病的最主要手段。目前国内获得兽药批

文的 SS 商品化疫苗主要针对 SS2 和 SS7, 无法对 SS4 产生交叉免疫保护作用^[6-7]。因此, 本研究以 7 株临床分离的 SS4 强毒株为受试菌株, 通过致病性、抗原性和稳定性试验综合筛选性能优良的疫苗菌株, 以期为 SS4 疫苗的研制提供技术储备, 为有效防控猪链球菌病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 受试菌株

安徽农业大学动物传染病研究室从安徽、江苏和河北地区临床发病猪中分离到 19 株 SS4, 通过小鼠致死性试验(攻毒剂量为 2.70×10^8 CFU)初步筛选出 7 株 100%致死小鼠的 SS4 强毒株作为受试菌株, 原始编号为 AHshou18-1、AHhuai18-8、AHhuai18-10、JSxu18-4、JSxu18-10、HBgu18-3 和 HBgu18-4^[8], 代号为 A1-A7。

1.1.2 攻毒菌株

鉴于尚无 SS4 标准菌株, 选择 A7 菌株作为攻毒菌株, 其对小鼠的 LD_{50} 为 9.03×10^7 CFU, 毒力均强于国内 SS4 强毒参考株 SH1 510、JSYX1 611 和 HA1 006^[3]。

1.2 主要试剂和仪器

0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(tryptic soy broth, TSB), 绍兴天恒生物科技有限公司; 小牛血清, 上海羽朵生物有限公司; ISA 201 矿物油佐剂, 赛比克公司; HRP 标记羊抗鼠 IgG, 博士德生物工程有限公司; TMB 显色液, 上海碧云天生物技术有限公司。

恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 冷冻高速离心机, Beckman 公司; 超声波细胞破碎仪, 南京赛飞生物科技有限公司; PCR 仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 全波长多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司。

1.3 试验动物

926 只体重 18-22 g、6-8 周龄清洁级雌性昆明鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

1.4 SS4 抗原

鉴于 ELISA 试验中的包被抗原与免疫用灭活菌体不宜使用同一菌株, 选择 A5 菌株制备抗原。接种于 100 mL TSB 中, 37 °C、150 r/min 振荡培养 12 h。菌液经 8 000 r/min 离心 10 min, 用灭菌 PBS 重悬菌体, 洗涤 3 次, 超声破碎(功率 30%, 工作 3 s, 间歇 4 s, 共 20 min)充分释放菌体抗原, -80 °C 保存备用。

1.5 致病性试验

用累积法测定菌株对小鼠的 LD_{50} 。每株菌设置 5 个剂量组, 每个剂量组安排 10 只小鼠, 腹腔攻毒 0.3 mL 菌液。另设 10 只小鼠作为对照组, 注射等体积灭菌生理盐水。连续观察 7 d, 记录小鼠死亡情况, 计算 LD_{50} ^[9]。

1.6 灭活菌体制备

将筛选的 7 株 SS4 强毒株(A1-A7 菌株)分别接种于 5%小牛血清 TSB, 37 °C 培养至 6 h, 纯粹检验合格、细菌计数后, 通过稀释调整菌液浓度至 2.0×10^9 CFU/mL, 加入终浓度为 0.15%的甲醛溶液, 37 °C、150 r/min 振荡培养 12 h 灭活。用灭菌 PBS 清洗菌体 4 次。取灭活菌液 200 μ L 接种于 5%小牛血清 TSA, 37 °C 培养 36 h。无菌检验合格后, 取灭活菌液按 1:1 比例加入 ISA 201 矿物油佐剂, 充分振荡混匀, 分装后置 4 °C 保存。

1.7 抗原性试验

1.7.1 ELISA 检测小鼠血清 IgG 效价

将小鼠随机分组, 每组 16 只, 分别为免疫组、攻毒对照组和阴性对照组。免疫组以皮下多点注射途径接种 0.3 mL 毒力较强的 6 株(A1、A2、A3、A4、A6 和 A7 菌株)灭活菌体(即 6×10^8 CFU), 攻毒对照组和阴性对照组接种等体积灭菌 PBS, 14 d 后加强免疫。分别于

一免 14 d 后和二免 7 d 后, 每组随机选取 3 只小鼠进行眶下静脉丛采血, 收集血清备用。用 SS4 抗原(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h。PBST 洗涤 3 次后, 加入脱脂奶粉(50 g/L), 每孔 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。PBST 洗涤 3 次后, 加入倍比稀释(从 1:50 稀释至 1:51 200)免疫小鼠获得的鼠抗 SS4 血清和阴性对照组小鼠血清, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h。PBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000), 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。PBST 洗涤 3 次后加入 TMB 显色液, 每孔 100 μL , 室温下避光反应 10 min。加入终止液, 每孔 100 μL , 用酶标仪进行检测, 读取 OD_{490} 。根据待测血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} \geq 2.1$ 的界限判为阳性, 否则为阴性^[10]。

1.7.2 攻毒保护试验

二免 7 d 后, 免疫组和攻毒对照组均腹腔接种毒力最强的 A7 菌株, 剂量为 5 LD_{50} ; 阴性对照组腹腔接种等体积灭菌 PBS。观察并记录小鼠死亡情况。

1.7.3 病理组织切片观察

攻毒 14 d 后, 对各免疫组存活小鼠、攻毒对照组死亡小鼠及阴性对照组小鼠进行剖检, 取肺、肝、脾、肾、胸腺和脑进行病理组织切片观察。

1.8 稳定性试验

1.8.1 菌株传代

将筛选的免疫原性较好的 A4 和 A7 菌株接种 5% 小牛血清 TSA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后挑取单菌落进行传代, 连续传代 30 次。

1.8.2 传代菌株血清型验证

扩增 SS4 型的特异性基因 *cps4K*, 验证 A4 和 A7 第 10、20、30 代菌株的血清型^[11]。

1.8.3 传代菌株致病性试验

分别测定 A4 和 A7 第 10、20、30 代菌株对小鼠的 LD_{50} 。

1.8.4 传代菌株抗原性试验

分别用 A4 和 A7 第 10、20、30 代菌株制备灭活菌体免疫小鼠, 获取鼠抗 SS4 血清, 进行 ELISA 试验; 攻毒小鼠, 测定免疫保护率; 采集小鼠脏器进行病理组织切片观察。

2 结果与分析

2.1 致病性试验结果

7 株 SS4 的 LD_{50} 在 9.03×10^7 – 4.05×10^8 CFU/只范围内, 毒力相近(图 1 和表 1)。取其中毒力较强的 6 株(A1、A2、A3、A4、A6、A7 菌株)进行抗原性试验。

2.2 抗原性检测结果

2.2.1 小鼠血清 IgG 效价测定结果

从一免 14 d 到二免 7 d, 小鼠血清中 IgG 效价呈现上升趋势。二免 7 d 后, A4 和 A7 菌株的 IgG 效价最高, 均为 1:6 400, 其次是 A3 和 A6 菌株, 均为 1:3 200 (表 2)。

2.2.2 攻毒保护试验结果

A7 菌株的免疫保护率最高(80%), 其次是 A4 菌株(70%), A6、A3、A2 和 A1 菌株的免疫保护率最低, 分别为 60%、50%、30% 和 30% (图 2)。

2.2.3 病理组织切片观察结果

(1) 肺脏

对各组小鼠进行肺脏病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组肺轻微实质化; A3 免疫组肺泡隔轻度增厚, 轻微充血; A4、A6 免疫组肺泡隔轻微充血; A7 免疫组肺泡排列轻微紊乱; 攻毒对照组肺实质化, 严重充血, 炎性细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 3)。

(2) 肝脏

对各组小鼠进行肝脏病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组部分肝细胞脂肪变性, 少量炎性细胞浸润; A3 免疫组肝静脉周围有少量炎性细胞聚集; A4、A6、A7 免疫组和阴性对照组无明显病变; 攻毒对照组肝细胞水泡变性, 炎症细胞浸润(图 4)。

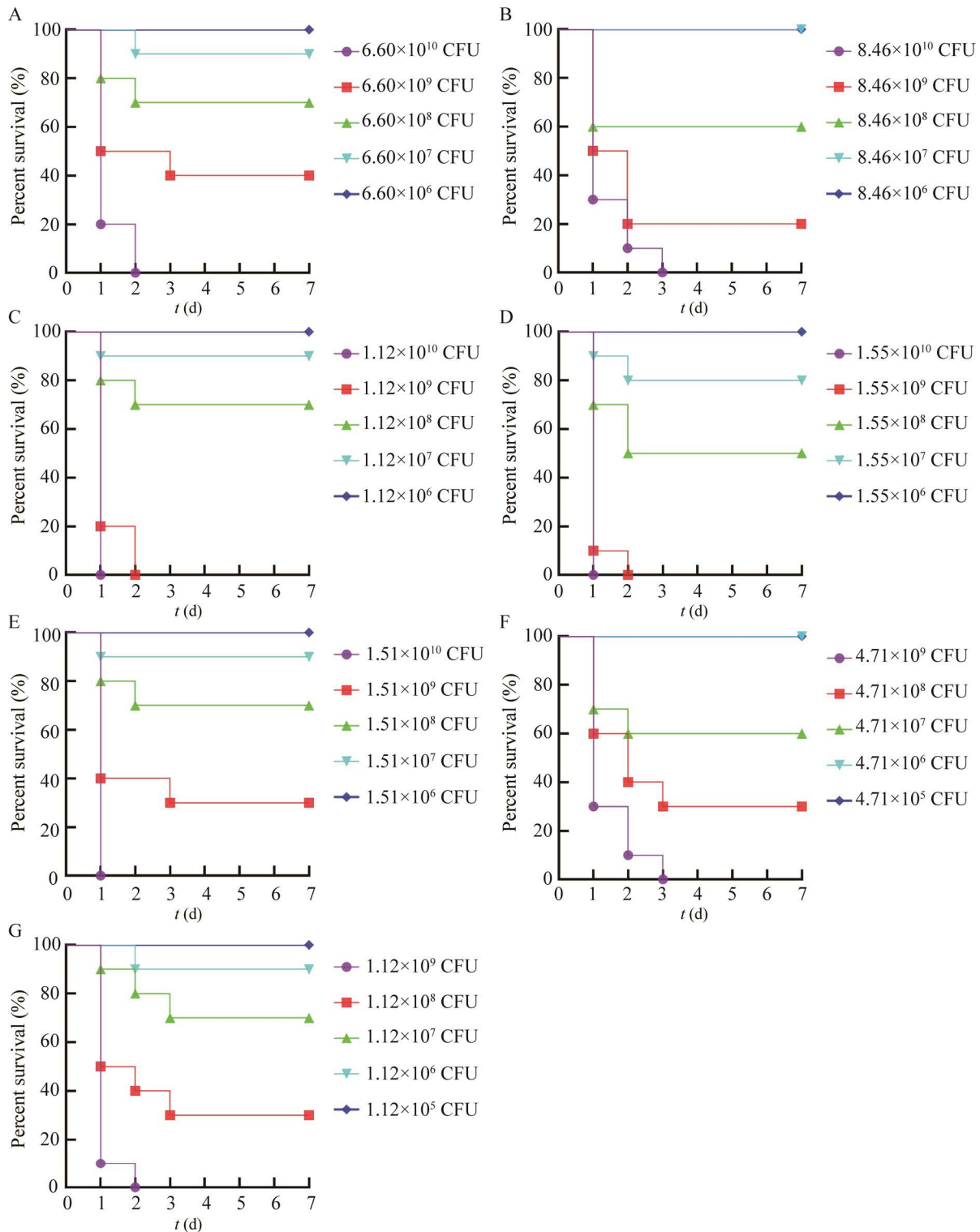


图 1 小鼠生存曲线 A: A1 菌株; B: A2 菌株; C: A3 菌株; D: A4 菌株; E: A5 菌株; F: A6 菌株; G: A7 菌株

Figure 1 Mouse survival curves. A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A5 strain; F: A6 strain; G: A7 strain.

表 1 7 株 SS4 对小鼠的 LD₅₀ 测定结果

Table 1 LD₅₀ of 7 SS4 strains to the mice

菌株 Strain	攻毒剂量 Dose (CFU)	死亡小鼠数(只) Mortality number of the mice	存活小鼠数(只) Survival number of the mice	累积死亡数(只) Cumulative mortality number	累积存活数(只) Cumulative survival number	累积死亡率 Cumulative mortality rate (%)	LD ₅₀ (CFU)
A1	6.60×10 ⁹	10	0	20	0	100	2.19×10 ⁸
	6.60×10 ⁸	6	4	10	4	71	
	6.60×10 ⁷	3	7	4	11	27	
	6.60×10 ⁶	1	9	1	20	5	
	6.60×10 ⁵	0	10	0	30	0	
A2	8.46×10 ⁹	10	0	22	0	100	1.76×10 ⁸
	8.46×10 ⁸	8	2	12	2	86	
	8.46×10 ⁷	4	6	4	8	33	
	8.46×10 ⁶	0	10	0	18	0	
	8.46×10 ⁵	0	10	0	28	0	
A3	1.12×10 ¹⁰	10	0	24	0	100	1.83×10 ⁸
	1.12×10 ⁹	10	0	14	0	100	
	1.12×10 ⁸	3	7	4	7	36	
	1.12×10 ⁷	1	9	1	16	6	
	1.12×10 ⁶	0	10	0	26	0	
A4	1.55×10 ¹⁰	10	0	27	0	100	1.01×10 ⁸
	1.55×10 ⁹	10	0	17	0	100	
	1.55×10 ⁸	5	5	7	5	58	
	1.55×10 ⁷	2	8	2	13	13	
	1.55×10 ⁶	0	10	0	23	0	
A5	1.51×10 ¹⁰	10	0	21	0	100	4.05×10 ⁸
	1.51×10 ⁹	7	3	11	3	79	
	1.51×10 ⁸	3	7	4	10	29	
	1.51×10 ⁷	1	9	1	19	5	
	1.51×10 ⁶	0	10	0	29	0	
A6	4.71×10 ⁹	10	0	21	0	100	1.19×10 ⁸
	4.71×10 ⁸	7	3	11	3	79	
	4.71×10 ⁷	4	6	4	9	31	
	4.71×10 ⁶	0	10	0	19	0	
	4.71×10 ⁵	0	10	0	29	0	
A7	1.12×10 ⁹	10	0	21	0	100	9.03×10 ⁷
	1.12×10 ⁸	7	3	11	3	79	
	1.12×10 ⁷	3	7	4	10	29	
	1.12×10 ⁶	1	9	1	19	5	
	1.12×10 ⁵	0	10	0	29	0	

注: 距离比例=(高于 50%的累积死亡率-50)/(高于 50%的累积死亡率-低于 50%的累积死亡率); lg (LD₅₀)=高于 50%累积死亡率的稀释度倒数的对数+距离比例×稀释倍数的对数

Note: Distance ratio=(Cumulative mortality rate above 50%–50)/(Cumulative mortality rate above 50%–Cumulative mortality rate below 50%); lg (LD₅₀)=Logarithm of reciprocal dilution over 50% cumulative mortality+Logarithm of distance ratio×dilution multiples.

表 2 6 株 SS4 的灭活菌体免疫小鼠后血清 IgG 效价
Table 2 Serum IgG titers of the mice immunized with the inactivated bacteria of 6 SS4 strains

菌株 Strain	一免 14 d 14 d after the first immunization	二免 7 d 7 d after the second immunization
A1	1:400	1:1 600
A2	1:800	1:1 600
A3	1:800	1:3 200
A4	1:1 600	1:6 400
A6	1:1 600	1:3 200
A7	1:1 600	1:6 400

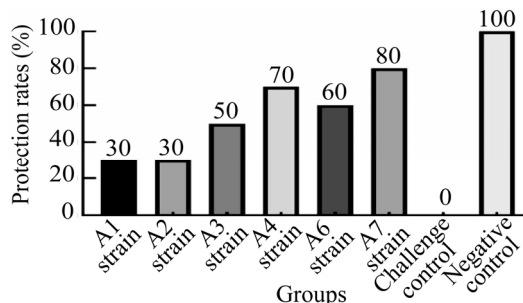


图 2 6 株 SS4 的灭活菌体对小鼠的免疫保护率
Figure 2 Protection rates of the inactivated bacteria of 6 SS4 strains for the mice.

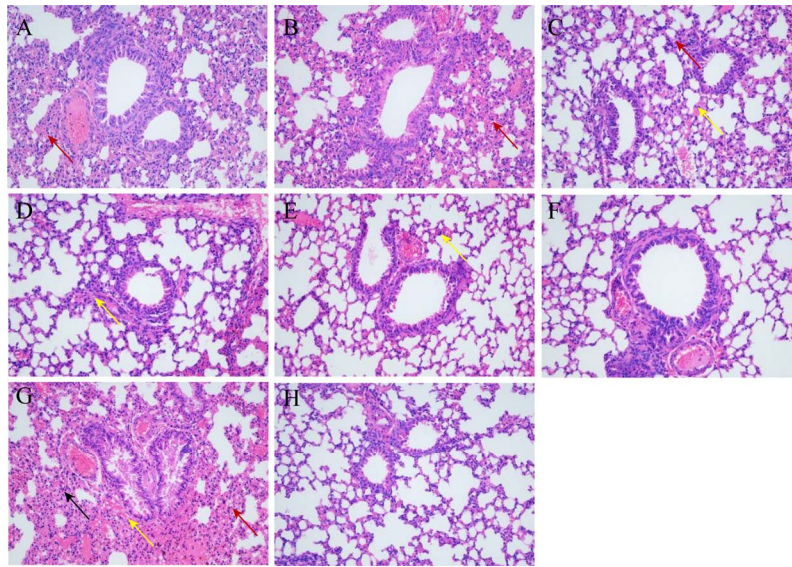


图3 各组小鼠肺脏病理组织学变化(HE染色, 200×) A: A1菌株; B: A2菌株; C: A3菌株; D: A4菌株; E: A6菌株; F: A7菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肺泡隔增厚; 黄色箭头表示组织充血; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 3 Histopathological changes of lung in each group of mice (HE staining, 200×). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate thickening of the alveolar septum; The yellow arrow indicates tissue hyperemia; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

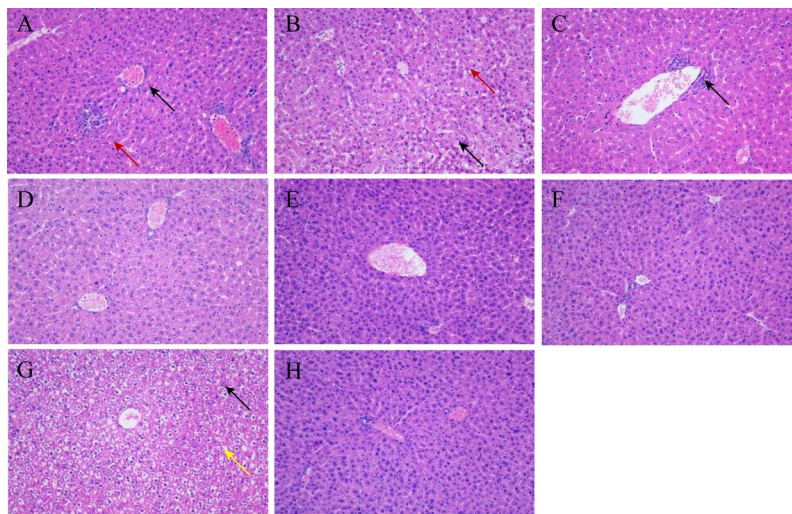


图4 各组小鼠肝脏病理组织学变化(HE染色, 200×) A: A1菌株; B: A2菌株; C: A3菌株; D: A4菌株; E: A6菌株; F: A7菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肝细胞脂肪变性; 黄色箭头表示肝细胞水泡变性; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 4 Histopathological changes of liver in each group of mice (HE staining, 200×). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrow indicates hepatocyte steatosis; The yellow arrows indicate vesicular degeneration of hepatocytes; the black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

(3) 脾脏

对各组小鼠进行脾脏病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组少量炎性细胞浸润; A3、A4、A6、A7 免疫组和阴性对照组无明显病变; 攻毒对照组红骨髓界限不清, 淋巴细胞稀疏, 粒细胞浸润(图 5)。

(4) 肾脏

对各组小鼠进行肾脏病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组肾小管上皮细胞水肿, 少量炎性细胞浸润; A3、A4、A6、A7 免疫组局部出血; 攻毒对照组肾小管上皮细胞疏松、水肿, 出血明显, 炎性细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 6)。

(5) 胸腺

对各组小鼠进行胸腺病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组胸腺细胞排列疏松, 皮

质、髓质界限不清; A3、A4、A6、A7 免疫组和阴性对照组无明显病变; 攻毒对照组胸腺细胞数量骤减, 局部组织坏死, 炎性细胞浸润(图 7)。

(6) 脑

对各组小鼠进行脑病理组织学观察, 结果显示: A1、A2 免疫组大量神经元细胞核固缩, 少量炎性细胞浸润; A3、A6 免疫组少量神经元细胞核固缩; A4、A7 免疫组和阴性对照组无明显病变; 攻毒对照组大量神经元坏死, 神经胶质细胞弥漫性增生(图 8)。

2.3 稳定性试验结果

2.3.1 传代菌株血清型验证结果

A4 和 A7 第 10、20、30 代菌株均携带 *cps4K* 基因, 表明其血清型遗传稳定(图 9)。

2.3.2 传代菌株致病性试验结果

在体外传代过程中 A4 和 A7 菌株对小鼠的

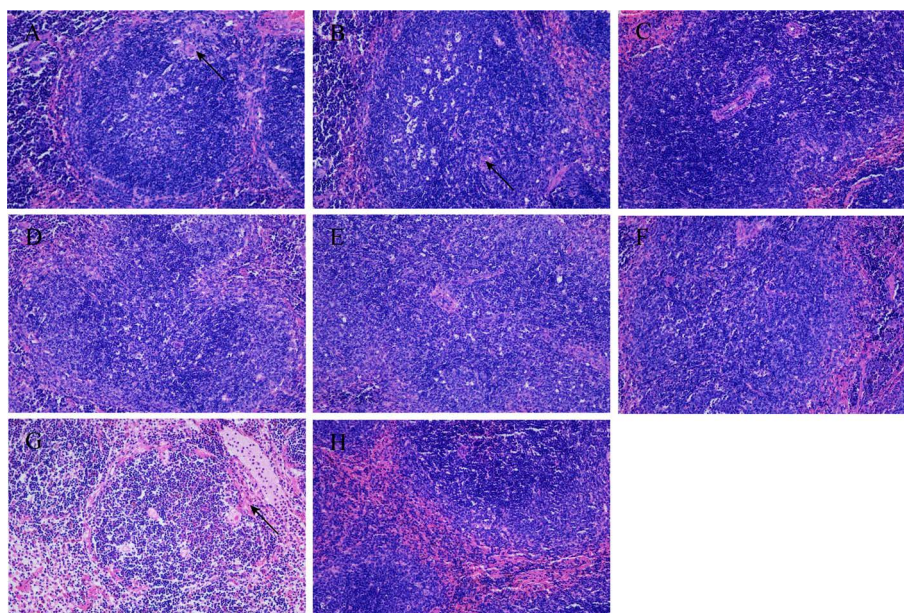


图 5 各组小鼠脾脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A1 菌株; B: A2 菌株; C: A3 菌株; D: A4 菌株; E: A6 菌株; F: A7 菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 5 Histopathological changes of spleen in each group of mice (HE staining, 200×). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

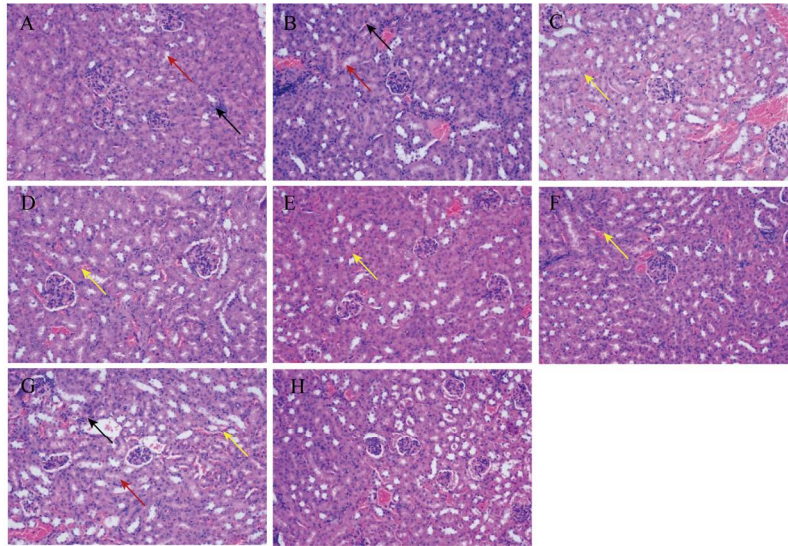


图 6 各组小鼠肾脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A1 菌株; B: A2 菌株; C: A3 菌株; D: A4 菌株; E: A6 菌株; F: A7 菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肾小管上皮细胞水肿; 黄色箭头表示组织出血; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 6 Histopathological changes of kidney in each group of mice (HE staining, 200×). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate edema of renal tubular epithelial cells; The yellow arrows indicate tissue bleeding; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

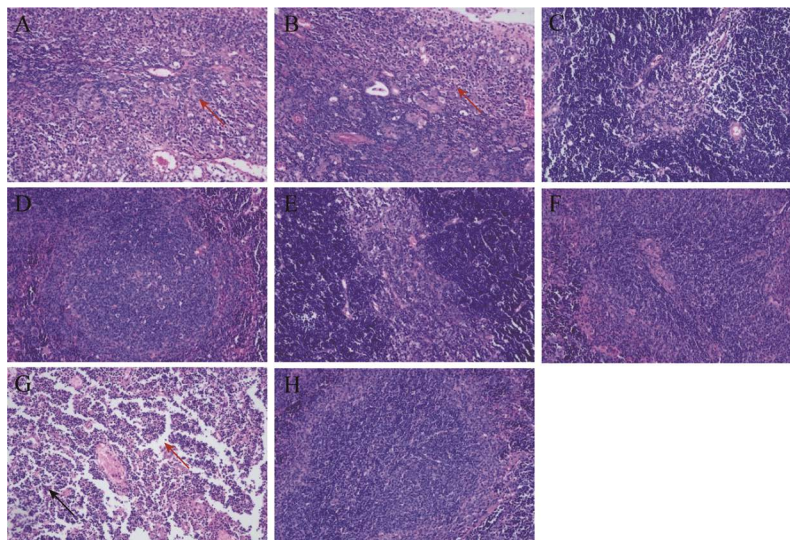


图 7 各组小鼠胸腺病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A1 菌株; B: A2 菌株; C: A3 菌株; D: A4 菌株; E: A6 菌株; F: A7 菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示胸腺细胞排列疏松; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 7 Histopathological changes of thymus in each group of mice (HE staining, 200×). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate the loose arrangement of thymus cells; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

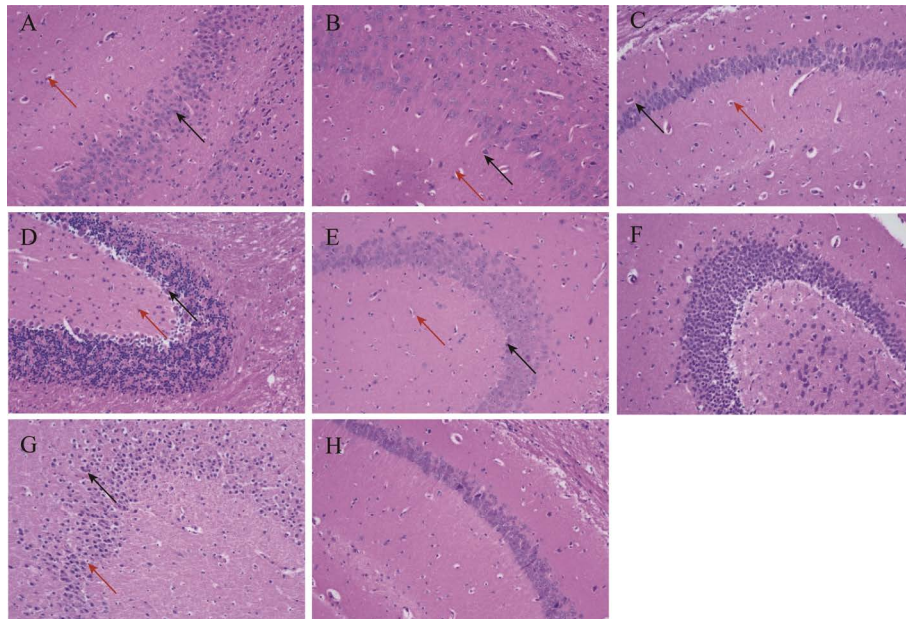


图 8 各组小鼠脑病理组织学变化(HE 染色, 200 \times) A: A1 菌株; B: A2 菌株; C: A3 菌株; D: A4 菌株; E: A6 菌株; F: A7 菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示神经元细胞核固缩; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 8 Histopathological changes of brain in each group of mice (HE staining, 200 \times). A: A1 strain; B: A2 strain; C: A3 strain; D: A4 strain; E: A6 strain; F: A7 strain; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrow indicates nuclear pyknosis of the neuron; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

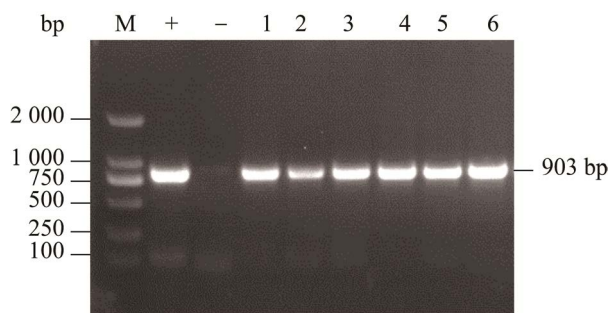


图 9 第 10、20、30 代 A4 和 A7 菌株的 *cps4K* 基因 PCR 检测结果 M: DL2000 DNA Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-3: A4 第 10、20、30 代菌株; 4-6: A7 第 10、20、30 代菌株
Figure 9 PCR detection results of *cps4K* gene of 10th, 20th, 30th generations of A4 and A7. M: DL2000 DNA Marker; +: Positive control; -: Negative control; 1-3: 10th, 20th, 30th generations of A4; 4-6: 10th, 20th, 30th generations of A7.

LD_{50} 均处于上升趋势, 表明毒力逐渐下降。其中 A7 原代菌株和传代菌株 1g (LD_{50}) 的标准差小于 A4 菌株, 表明在遗传过程中 A7 菌株的致病性比 A4 菌株更稳定(图 10 和表 3)。

2.3.3 传代菌株抗原性测定结果

(1) 小鼠血清 IgG 效价测定结果

从一免 14 d 到二免 7 d, 小鼠血清中 IgG 效价呈现上升趋势。二免 7 d 时, A4 菌株从原代的 1:6 400 下降至第 30 代的 1:1 600, A7 菌株始终为 1:6 400(表 4)。

(2) 攻毒保护试验结果

A4 和 A7 从原代到第 30 代免疫组免疫保护率均呈降低趋势, 但是同一代次的 A7 菌株对小鼠的免疫保护率(70%–80%)始终高于 A4 菌株(40%–70%) (图 11)。

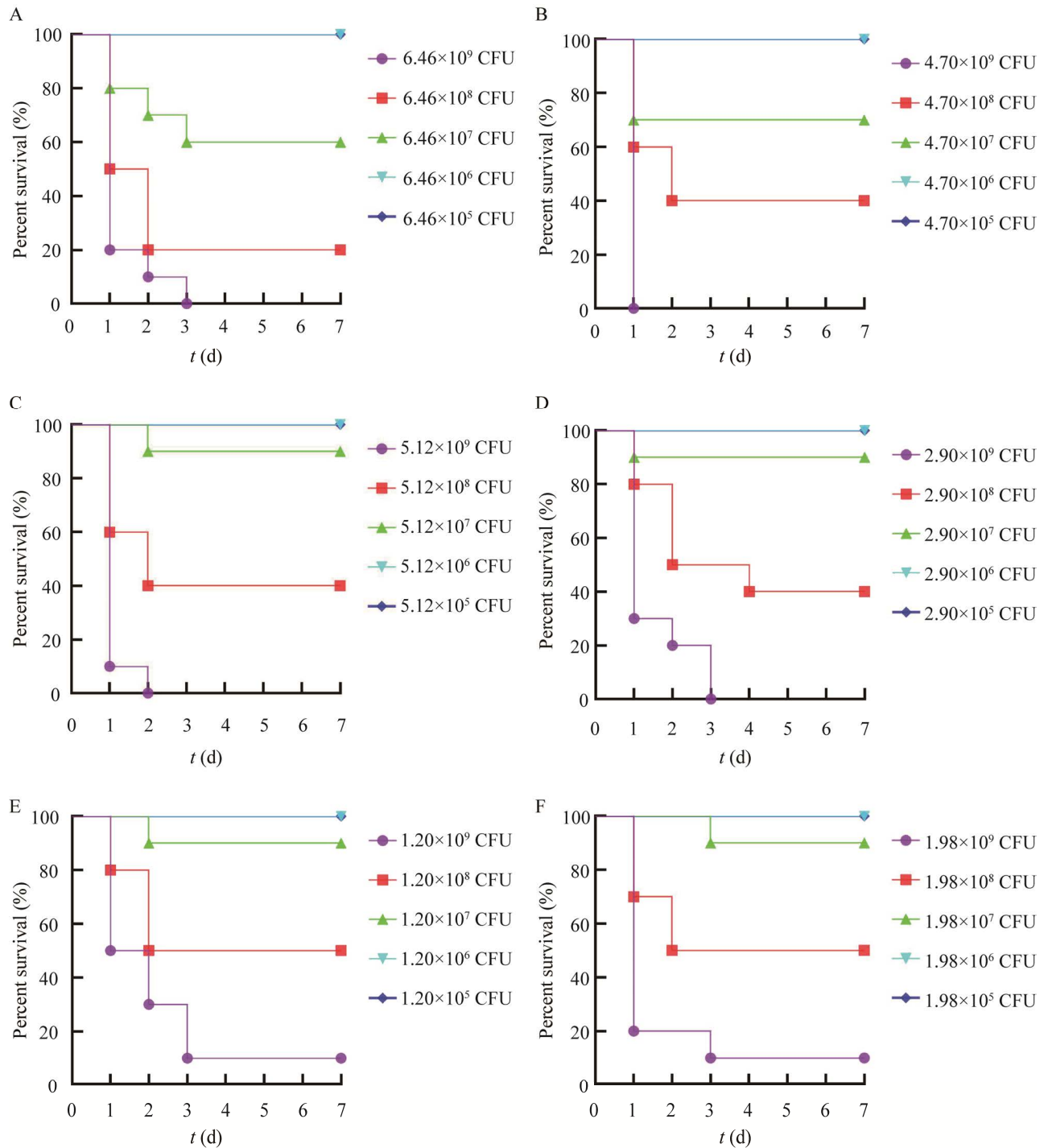


图 10 传代菌株感染小鼠生存曲线 A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株

Figure 10 Survival curve of mice infected by passing strains. A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation.

表 3 第 0、10、20、30 代 A4 和 A7 菌株对小鼠的 LD_{50}

Table 3 0th, 10th, 20th, 30th generations of A4 and A7 on LD_{50} of mice

菌株	传代数	LD_{50} (CFU)	SD (lg (LD_{50}))
Strain	Number of passages		
A4	0	1.01×10^8	0.234 7
	10	1.35×10^8	
	20	2.88×10^8	
	30	3.81×10^8	
A7	0	1.56×10^8	0.077 7
	10	1.87×10^8	
	20	2.25×10^8	
	30	2.49×10^8	

表 4 第 0、10、20、30 代 A4 和 A7 灭活菌体免疫小鼠后血清 IgG 效价

Table 4 Serum IgG titers of the mice immunized with 0th, 10th, 20th and 30th generations of inactivated A4 and A7

菌株	传代数	一免 14 d	二免 7 d
Strain	Number of passages	14 d after the first immunization	7 d after the second immunization
A4	0	1:1 600	1:6 400
	10	1:800	1:3 200
	20	1:800	1:3 200
	30	1:400	1:1 600
A7	0	1:1 600	1:6 400
	10	1:1 600	1:6 400
	20	1:1 600	1:6 400
	30	1:1 600	1:6 400

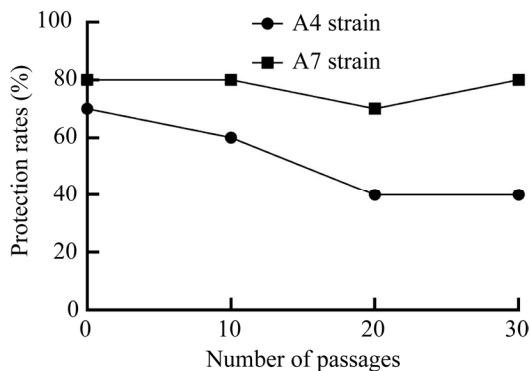


图 11 第 0、10、20、30 代 A4 和 A7 灭活菌体对小鼠的免疫保护率

Figure 11 The immune protection rates of 0th, 10th, 20th, 30th generations of inactivated A4 and A7 to the mice.

(3) 病理组织切片观察结果

1) 肺脏

对各组小鼠进行肺脏病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组肺泡隔增宽, 轻微实质化; A7 传代菌株免疫组肺泡隔轻微充血; 攻毒对照组肺脏实质化, 严重充血, 炎性细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 12)。

2) 肝脏

对各组小鼠进行肝脏病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组少量肝细胞脂肪变性, 少量炎性细胞浸润; A7 传代菌株免疫组少量肝细胞脂肪变性; 攻毒对照组肝细胞水泡变性, 炎症细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 13)。

3) 脾脏

对各组小鼠进行脾脏病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组红、白髓分界不清, 少量炎性细胞浸润; A7 传代菌株免疫组和阴性对照组无明显病变; 攻毒对照组淋巴细胞稀疏, 粒细胞浸润(图 14)。

4) 肾脏

对各组小鼠进行肾脏病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组少量肾小球萎缩, 较多肾小管上皮疏松水肿; A7 传代菌株免疫组少量肾小球萎缩; 攻毒对照组肾小管上皮细胞疏松、水肿、脱落, 肾小球分叶明显, 严重出血, 炎性细胞浸润; 阴性对照组未见明显炎症(图 15)。

5) 胸腺

对各组小鼠进行胸腺病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组胸腺萎缩, 少量脂肪填充, 淋巴细胞稀疏; A7 传代菌株免疫组淋巴细胞稀疏; 攻毒对照组淋巴细胞数量骤减, 皮质、髓质界限不清, 局部组织坏死, 炎性细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 16)。

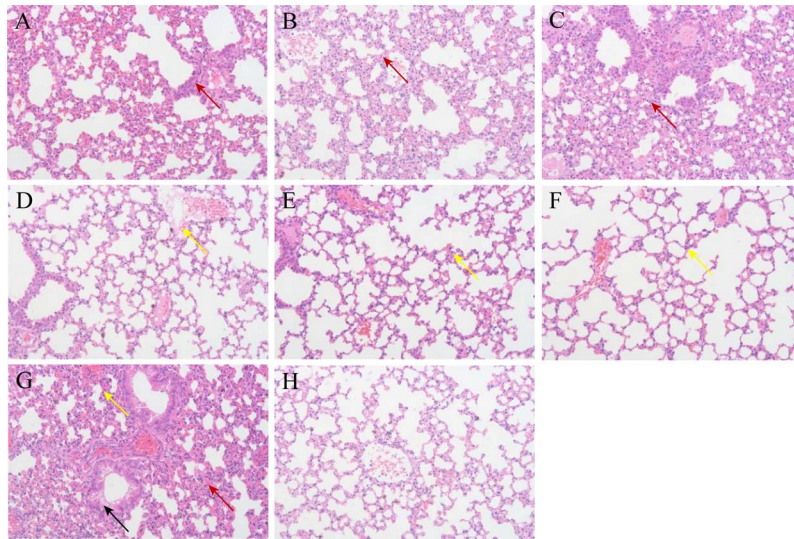


图 12 传代菌株免疫组小鼠肺脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肺泡隔增宽; 黄色箭头表示组织充血; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 12 Histopathological changes of lung in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate alveolar septum widening; The yellow arrows indicate hyperemia; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

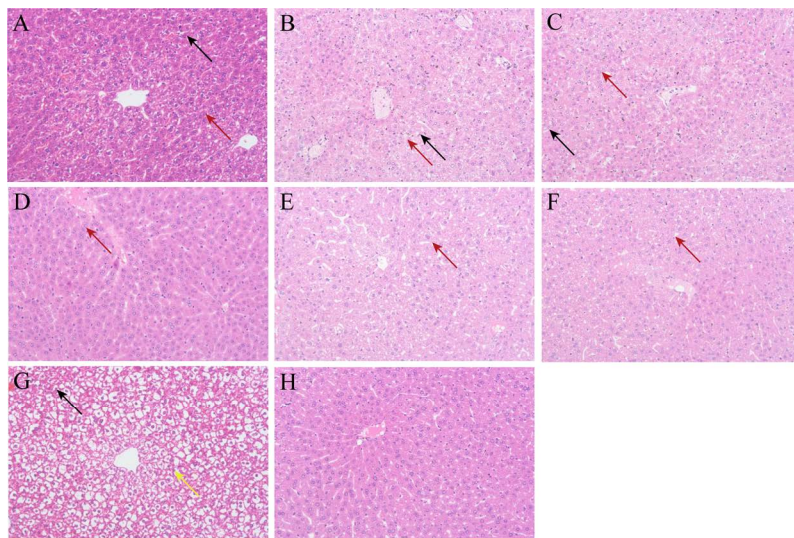


图 13 传代菌株免疫组小鼠肝脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肝细胞脂肪变性; 黄色箭头表示肝细胞水泡变性; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 13 Histopathological changes of liver in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrow indicates hepatocyte steatosis; The yellow arrows indicate vesicular degeneration of hepatocytes; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

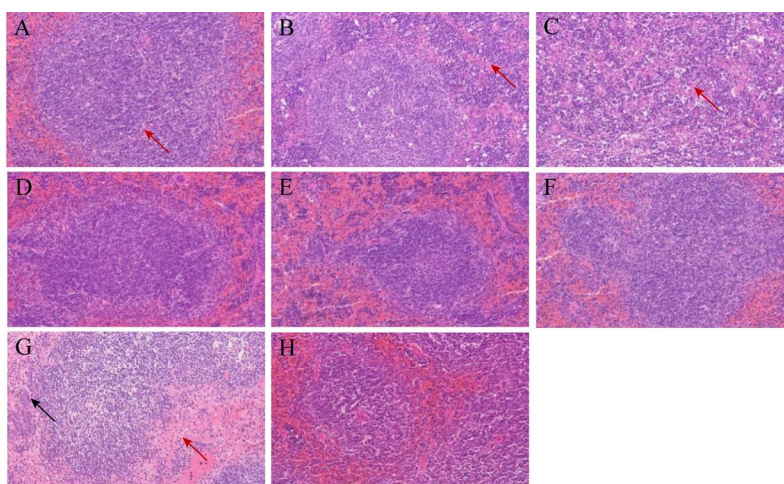


图 14 传代菌株免疫组小鼠脾脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示脾脏红、白髓分界不清; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 14 Histopathological changes of spleen in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrow indicates that the red and white pulp of the spleen is not clearly demarcated; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

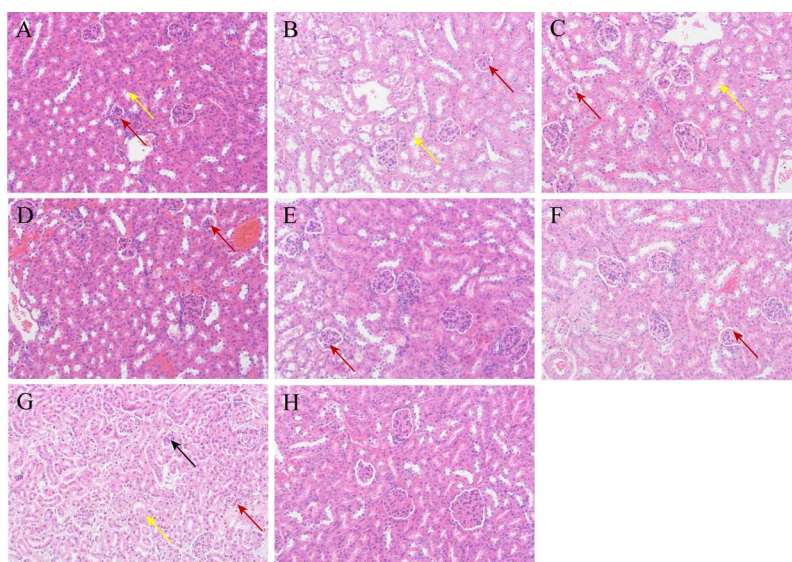


图 15 传代菌株免疫组小鼠肾脏病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示肾小球萎缩; 黄色箭头表示肾小管疏松水肿; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 15 Histopathological changes of kidney in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate glomerular atrophy; The yellow arrows indicate renal tubules with loose edema; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

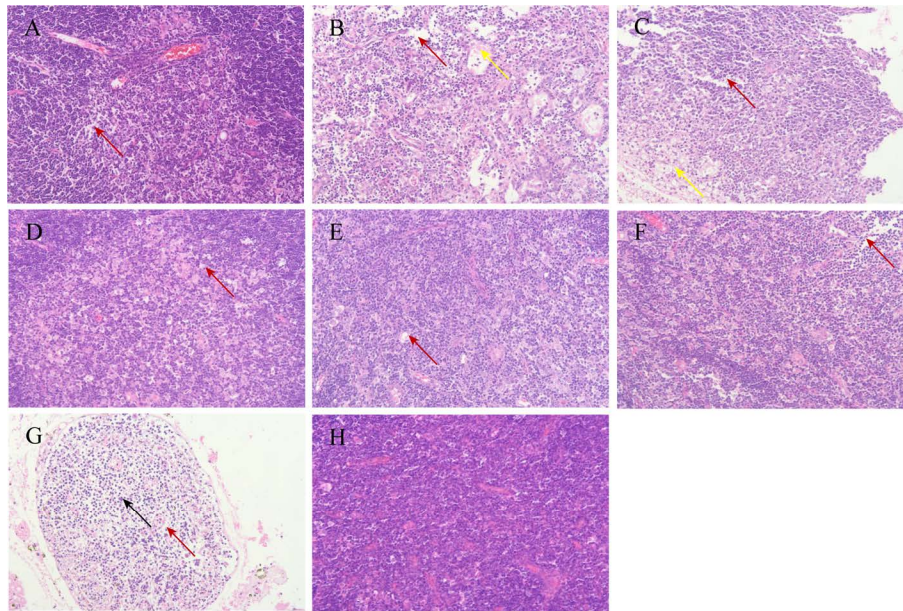


图 16 传代菌株免疫组小鼠胸腺病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示淋巴细胞稀疏; 黄色箭头表示脂肪组织; 黑色箭头表示炎症细胞浸润

Figure 16 Histopathological changes of thymus in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrows indicate lymphocyte osteoporosis; The yellow arrows represent adipose tissue; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

6) 脑

对各组小鼠进行脑病理组织学观察, 结果显示: A4 传代菌株免疫组轻微充血, 部分神经元固缩深染; A7 传代菌株免疫组轻微充血; 攻毒对照组神经元细胞核固缩、坏死, 神经胶质细胞弥漫性增生, 炎症细胞浸润; 阴性对照组无明显病变(图 17)。

3 讨论与结论

SS 是条件性致病菌, 长期定殖于健康猪扁桃体和上呼吸道。当外部环境突然发生变化或机体抵抗力下降时, SS 将扩散进入血液, 侵袭不同组织器官引发感染^[12]。同时, SS 易与其他

病原发生混合感染, 协同致病, 使病死率大幅升高^[13]。临床上常使用抗生素来控制猪链球菌病, 但是随着抗生素的过分滥用, SS 耐药情况愈加严峻^[14-16]。虽然不断有新的抗 SS 感染药物被发现和研究, 体外药敏试验也显示出较好的抗菌活性, 但其疗效和安全性尚需验证, 这使得人类需要更加重视 SS 疫苗的开发研究^[17-18]。临床上常用的细菌病疫苗有灭活疫苗、弱毒疫苗和亚单位疫苗。弱毒疫苗用量少、免疫效果强且持久, 但存在毒力易返祖、安全性差、保存要求高等缺点; 亚单位疫苗作用安全, 但是其多是针对单个毒力因子或抗原制备, 难以获得完全的免疫保护。相比之下, 灭活疫苗具有

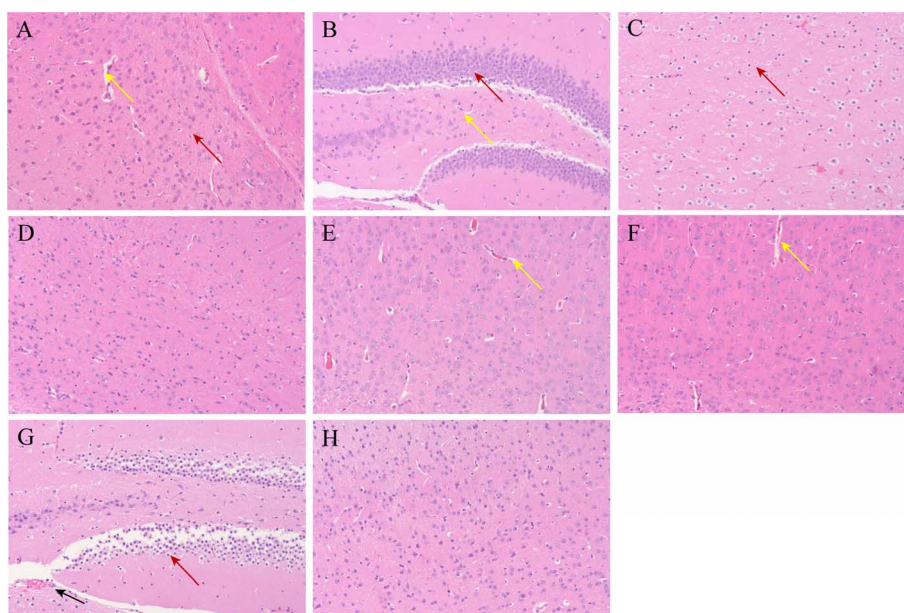


图 17 传代菌株免疫组小鼠脑病理组织学变化(HE 染色, 200×) A: A4 第 10 代菌株; B: A4 第 20 代菌株; C: A4 第 30 代菌株; D: A7 第 10 代菌株; E: A7 第 20 代菌株; F: A7 第 30 代菌株; G: 攻毒对照组; H: 阴性对照组。红色箭头表示神经元细胞核固缩; 黄色箭头表示血管充血; 黑色箭头表示炎性细胞浸润

Figure 17 Histopathological changes of brain in each subcultured group of mice (HE staining, 200×). A: A4 10th generation; B: A4 20th generation; C: A4 30th generation; D: A7 10th generation; E: A7 20th generation; F: A7 30th generation; G: Infection group; H: Negative control group. The red arrow indicates nuclear pyknosis of the neuron; The yellow arrows indicate congestion; The black arrows indicate an inflammatory cell infiltrate.

研制周期短、使用安全、易于保存且易于制备联合疫苗等优点, 最贴合生产实际。根据国家兽药基础数据库最新发布的信息, 截至目前, 国内获得国家兽药批文的 SS 商品化疫苗共有 5 种, 均为灭活疫苗, 包括猪链球菌病灭活疫苗(2 型, HA9 801 株)、猪链球菌病灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种+SS2)、猪链球菌病蜂胶灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种+SS2)、猪链球菌病灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种+SS2+SS7)、猪链球菌病和副猪嗜血杆菌病二联灭活疫苗(LT 株+MD0 322 株+SH0 165 株)^[6-7]。但是上述疫苗主要针对 SS2 和 SS7, 难以对 SS4 提供交互保护作用。因此, 基于临床发病猪中分离的

SS4, 开展优良菌株的选育, 对 SS4 疫苗的研发和猪链球菌病的防控具有重要意义。

制苗用菌株的特性与疫苗的免疫效果密切相关, 尤其是抗原性。通常认为菌株的抗原性与其致病力呈正相关, 因为致病力强的菌株可能携带大量毒力相关因子, 可诱导强烈的免疫应答。本研究通过致病性试验测定 7 株 SS4 对小鼠的 LD_{50} , 从中筛选出毒力较强的 6 株(A1、A2、A3、A4、A6 和 A7 菌株)开展抗原性试验。抗原性包括反应原性和免疫原性。反应原性指抗原与相应抗体或效应淋巴细胞反应的能力, 是生产诊断抗原的菌种或毒种的必要特性; 免疫原性指抗原刺激机体产生抗体或效

应淋巴细胞的特性,是制苗用菌株的必要特性^[19]。SS 是典型的胞外寄生菌,在体内主要介导体液免疫。IgG 是体液免疫应答过程中产量最高的抗体,而且在抗原二次刺激机体时效价攀升,这与灭活疫苗需多次免疫的特性相符,因此 IgG 效价可作为评定疫苗菌株抗原性的重要指标。然而免疫保护率和病理组织变化可从整体水平上直接反映疫苗菌株对试验动物的保护效果。在本研究中,A4、A7 免疫组 IgG 效价、免疫保护率均高于 A3、A6、A1 和 A2 免疫组,并且 A4、A6 和 A7 免疫组小鼠组织病变较 A1、A2、A3 免疫组轻微。因此筛选抗原性较优的 A4 和 A7 菌株进行稳定性试验。综合致病性和抗原性试验结果发现,A4 和 A7 菌株的毒力、抗原性均较其余 4 株 SS4 强,证实菌株的抗原性与其致病力之间的确呈正相关。

除致病力和抗原性外,菌株遗传性状的稳定也是保障疫苗安全性和免疫效力的关键因素,常通过检测传代菌株的血清型、致病力、抗原性来确定。体外传代具有易操作、效率高优点,在疫苗生产过程中较为常用。然而连续传代可能会导致毒力因子丢失,并且培养基中营养成分的缺失、pH 的改变也有可能致菌株遗传性状发生变化^[20]。经连续体外传代后,A4 和 A7 均携带 *cps4K* 基因,表明血清型遗传稳定;毒力均逐渐下降,其中 A7 原代、10 代、20 代、30 代菌株 $lg(LD_{50})$ 的标准差小于 A4 菌株,说明在遗传过程中 A7 菌株的致病性比 A4 菌株更稳定;A7 传代菌株灭活菌体诱导的 IgG 效价和免疫保护率均高于同代的 A4 菌株灭活菌体,小鼠组织病变也较轻微,表明 A7 菌株具有更稳定的抗原性。

本研究综合致病力、抗原性、稳定性等指标,最后成功筛选到一株性能优良的 SS4 制苗候选菌株 A7 (原始编号为 HBgu18-4)。这为

SS4 疫苗的研制提供了技术储备,为有效防控猪链球菌病奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 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
- [2] 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
- [3] 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, Lü 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)
- [4] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans[J]. Reviews of Infectious Diseases, 1988, 10(1): 131-137
- [5] 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: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2018, 37(5): 917-925
- [6] 魏凤,张文通,李峰,苗立中,沈志强.商品化猪链球菌疫苗分类及特点[J].猪业科学,2018,35(11):103-104
Wei F, Zhang WT, Li F, Miao LZ, Shen ZQ. Classification and characteristics of commercial *Streptococcus suis* vaccine[J]. Swine Industry Science, 2018, 35(11): 103-104 (in Chinese)
- [7] 姚清,李润成,卿任科,廖华媛,余兴龙.湖南省部分发病猪猪链球菌血清型的调查[J].养猪,2019(3):113-115
Yao Q, Li RC, Qing RK, Liao HY, Yu XL. Investigation on serotypes of *Streptococcus suis* in some cases in Hunan Province [J]. Swine Production, 2019(3): 113-115 (in Chinese)
- [8] 段倩倩,李亮,邢刚,刘雪兰,孙裴,魏建忠,李郁.2018 年我国 19 株猪链球菌 4 型分离株的病原学特征

- 及分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 202-216
- Duan QQ, Li L, Xing G, Liu XL, Sun P, Wei JZ, Li Y. Etiological characteristics and analysis of 19 isolates of *Streptococcus suis* serotype 4 in China, 2018[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 202-216 (in Chinese)
- [9] Ma ZC, Li Y, Gu JY, Peng T, Liu ZH, Wang HY, Meng FL, Wang FK, Liu SD. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Streptococcus suis* type 2[J]. Agricultural Biotechnology, 2019, 8(4): 64-68
- [10] 陈章, 吴华健, 毛天骄, 韩业芹, 孙裴, 魏建忠, 李东风, 李郁. 猪链球菌 2 型疫苗用菌株的筛选[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(1): 57-64
- Chen Z, Wu HJ, Mao TJ, Han YQ, Sun P, Wei JZ, Li DF, Li Y. Screening of strain for inactivated vaccine of *Streptococcus suis* type 2[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(1): 57-64 (in Chinese)
- [11] 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
- [12] 金梅林. 猪链球菌致病分子基础与防控技术[M]. 北京: 科学出版社, 2018
- Jin ML. Molecular Basis and Control Technology of *Streptococcus suis* Infection[M]. Beijing: Science Press, 2018 (in Chinese)
- [13] Meng FD, Tong J, Vötsch D, Peng JY, Cai XH, Willenborg M, Herrler G, Wu NH, Valentin-Weigand P. Viral coinfection replaces effects of sullysin on *Streptococcus suis* adherence to and invasion of respiratory epithelial cells grown under air-liquid interface conditions[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(8): e00350-e00319
- [14] Nhung NT, Yen NTP, Cuong N, Kiet BT, Hien VB, Campbell J, Thwaites G, Baker S, Geskus R, Ashton P, et al. Carriage of the zoonotic organism *Streptococcus suis* in chicken flocks in Vietnam[J]. Zoonoses and Public Health, 2020, 67(8): 843-848
- [15] Werinder A, Aspán A, Backhans A, Sjölund M, Guss B, Jacobson M. *Streptococcus suis* in Swedish grower pigs: occurrence, serotypes, and antimicrobial susceptibility[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2020, 62(1): 36
- [16] Yongkiettrakul S, Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Acheampong DA, Srimanote P, Maneerat K, Visessanguan W, Nookaew I. Genome sequences of antibiotic-resistant *Streptococcus suis* strains isolated from human patients and diseased and asymptomatic pigs in Thailand[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2021, 87: 104674
- [17] 张欣, 潘晨浩, 赵瑞利, 姜轩, 金天明, 赵洋, 马吉飞, 于恩远, 李留安, 张振洲, 等. 抗菌肽 Temprine-La(FS)抑制 2 型猪链球菌生物被膜形成的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 324-337
- Zhang X, Pan CH, Zhao RL, Jiang X, Jin TM, Zhao Y, Ma JF, Yu EY, Li LA, Zhang ZZ, et al. Inhibitory effect of antimicrobial peptide temprine-La(FS) on biofilm formation of *Streptococcus suis* type 2[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(1): 324-337 (in Chinese)
- [18] Zhu HD, Han LX, Ni YX, Yu ZY, Wang DD, Zhou JM, Li B, Zhang W, He KW. *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of nisin against *Streptococcus suis*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(2): 598-610
- [19] 罗满林. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2019
- Luo ML. Veterinary Biotechnology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2019 (in Chinese)
- [20] 吴琼娟, 杨志鹏, 姚焱彬, 陆萍, 魏建忠, 孙裴, 李郁. 猪红斑丹毒丝菌疫苗用菌株的筛选[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(9): 1467-1475
- Wu QJ, Yang ZP, Yao YB, Lu P, Wei JZ, Sun P, Li Y. Screening of strains for inactivated vaccine of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(9): 1467-1475 (in Chinese)