

陈家丽, 周思旋, 林如涛, 等. 猪链球菌 1 型菌株的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 71-79.

CHEN J L, ZHOU S X, LIN R T, et al. Isolation, identification and biological characteristics of a *Streptococcus suis* serotype 1 strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 71-79.

## 猪链球菌 1 型菌株的分离鉴定及生物学特性研究

陈家丽<sup>1,2</sup>, 周思旋<sup>2\*</sup>, 林如涛<sup>1</sup>, 史开志<sup>2</sup>, 吴昊<sup>2</sup>, 陈席敏<sup>1,2</sup>,  
陈玉霞<sup>2</sup>, 王冬丁<sup>1,2</sup>, 朱祉聿<sup>2</sup>, 吴屿彤<sup>2</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州省农业科学院畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550005)

**摘要:** 为查明贵州省某猪场中引起仔猪呼吸道疾病的病原菌, 深入了解该病原的生物学特性, 无菌采集病死猪肺组织, 于含血清的胰蛋白胨大豆琼脂培养基划线培养分离菌株, 采用形态学观察、生化试验、16S *rRNA* 基因测序、PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 等方法对分离到的疑似菌株进行鉴定, 并进行毒力基因检测和药物敏感性测定, 最后通过小鼠模型测定了其致病性。结果: 分离菌株为猪链球菌 1 型, 命名为 S240051; 对庆大霉素、卡那霉素、新霉素、链霉素、多西环素、四环素、万古霉素、磺胺异噁呋 8 种抗生素耐药; 对青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、氨苄西林、环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星、泰妙菌素、克林霉素、利福平 11 种抗生素敏感; 携带 *sly* (链球菌溶血素 S)、*epf* (胞外蛋白酶因子)、*mrp* (黏附性纤毛蛋白)、*orf2* (开放阅读框 2)、*fbps* (纤维蛋白原结合蛋白)、*gapdh* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、*strA* (分选酶 A)、*ccpA* (分解代谢物控制蛋白 A) 等毒力基因; 该菌感染浓度为  $3.96 \times 10^9$  CFU/只时, 感染小鼠 100% 死亡, 且死亡小鼠肺脏、肝脏和脾脏组织病理切片可见明显病变。以上研究丰富了猪链球菌病原生物学资料, 为猪链球菌 1 型耐药机制和致病机理研究奠定了基础。

**关键词:** 猪链球菌 1 型; 毒力基因; 致病性; 耐药性; 分离鉴定

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)02-0071-09

## Isolation, identification and biological characteristics of a *Streptococcus suis* serotype 1 strain

CHEN Jiali<sup>1,2</sup>, ZHOU Sixuan<sup>2\*</sup>, LIN Rutao<sup>1</sup>, SHI Kaizhi<sup>2</sup>, WU Hao<sup>2</sup>, CHEN Ximin<sup>1,2</sup>,  
CHEN Yuxia<sup>2</sup>, WANG Dongdin<sup>1,2</sup>, ZHU Zhiyu<sup>2</sup>, WU Yutong<sup>2</sup>

(1. College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550005, China)

**Abstract:** To investigate the etiology of respiratory diseases in piglets from a swine farm in Guizhou Province and characterize the biological features of the causative pathogen, samples of lung tissues from dead pigs were aseptically collected for bacterial isolation. Suspected strains were purified via streaking on serum-enriched tryptone soybean agar (TSA) medium. The isolates were then systematically identified through morphological analysis, biochemical profiling, 16S *rRNA* gene sequencing, and PCR-RFLP. Further characterization included virulence gene detection and antimicrobial susceptibility testing. Finally, pathogenicity was evaluated using a murine infection model. The results were that the isolated strain was designated as *Streptococcus suis* serotype 1 (SS1) strain S240051, it was resistant to 8 antibiotics, including gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, doxycycline, tetracycline, vancomycin and sulfamethoxazole, and it was sensitive to 11 antibiotics including penicillin, amoxicillin, cefotaxime, ampicillin, ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin, tiamulin, clindamycin and rifampin. Virulence genotyping confirmed the presence of *sly*, *epf*, *mrp*, *orf2*, *fbps*, *gapdh*, *strA*, *ccpA* genes. When the infection concentration of the bacterium was  $3.96 \times 10^9$  CFU/mouse, 100% of the mice died. Histopathological analysis revealed significant lesions in the lung, liver, and spleen tissues of the infected mice. This study enriched the pathogenic and phenotypic data on *Streptococcus suis* and presented foundational insights into the drug resistance mechanisms and pathogenicity of *Streptococcus suis* Serotype 1.

**Keywords:** *Streptococcus suis* serotype 1; virulence genes; pathogenicity; drug resistance; isolation and identification

收稿日期: 2025-03-12; 修回日期: 2025-12-20

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2022] 重点 032, 黔科合支撑 [2022] 一般 088, 黔农科科技创新 [2023] 07, 黔农科院科技创新 [2022] 01, 黔科合成果 [2022] 一般 007 号)

第一作者: 陈家丽, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 周思旋, 博士, 研究员, 主要从事微生物学研究, E-mail: kerrybaiye@163.com。

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 为革兰阳性兼性厌氧菌, 其形态学特征为无鞭毛结构、缺乏芽胞形成能力, 且多呈成对或链状排列<sup>[1]</sup>。猪链球菌是猪链球病的病原, 可引发多种严重疾病, 包括脑膜炎、败血症、关节炎及心内膜炎等<sup>[2]</sup>。猪链球菌血清型复杂, 根据荚膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS) 抗原的差异, 可分为 29 个血清型 (1~19、21、23~25、27~31 和 1/2 型)<sup>[3]</sup> 和 Chz 血清型<sup>[4]</sup>, 后续根据荚膜多糖抗原基因簇的差异, 现已报道 33 种新荚膜基因簇 (NCL1~20、21a、21b、22~32), 此外还存在部分未定型菌株<sup>[5-6]</sup>。截至目前, 已报道的感染人类的血清型已达 11 种, 分别为血清 1、2、4、5、7、9、14、16、21、24、31 型<sup>[7]</sup>。我国目前用于猪链球菌防控的疫苗多针对猪链球菌 2 型, 少部分含有针对猪链球菌 7 型和马链球菌兽疫亚种的成分, 但不同地区猪链球菌血清型的流行存在差异, 不同血清型间疫苗免疫缺乏交叉保护性<sup>[8]</sup>。因此, 对于猪链球菌病发病猪场, 需先准确判定致病菌株的血清型及生物学特性, 采取针对性的防控措施以减少损失。

当前, 猪链球菌的研究多聚焦于血清 2 型, 而针对血清 1 型的致病机制及防控研究相对较少。本研究自贵州省某猪场病死仔猪肺脏组织样本中分离获得 1 株猪链球菌, 经系统鉴定确认为血清 1 型。通过革兰染色镜检观察、生化特性鉴定、血清型基因鉴定及毒力基因检测明确其生物学特征; 进一步结合药敏试验和小鼠感染模型评估其耐药性及致病力, 以期对猪链球菌病的临床综合防控及致病机制解析提供理论依据与数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

贵州省某猪场病死猪, 临床表现为生长迟缓、消瘦、被毛杂乱、后肢关节肿大, 呼吸急促并伴有咳嗽, 经实验室剖检后发现肺脏组织肿大, 表面有弥散性出血点。结合临床表现与病理特征, 怀疑为感染猪链球菌所致。

### 1.2 质控菌株和试验动物

金黄色葡萄球菌 ATCC29213 由贵州省畜牧兽医研究所实验室保存并提供。SPF 级 5 周龄昆明小鼠 36 只, 体重 (25±2) g, 雌雄各半, 购自长沙市天勤生物技术有限公司。

### 1.3 主要试剂

新生牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 和胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基购自青岛海博生物公司; 细菌 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; DL2000

Marker、2×Premix Taq 酶均购自宝生物工程有公司; MvaI BstN I 限制性内切酶购自赛默飞世尔科技有限公司; 抗生素购自上海源叶生物科技有限公司。

### 1.4 细菌的分离与纯化

无菌采集病死猪肺脏病变与正常交界处的组织, 划线接种于含 5% 新生牛血清的 TSA 培养基上, 37 °C 恒温培养 18 h 后, 观察 TSA 培养基上菌落形态, 挑取单个疑似菌落接种于 TSA 培养基上纯化培养, 并进行革兰染色, 在光学显微镜下观察分离菌株的染色结果和形态特征。将纯化后的可疑单个菌落接种至 5 mL 含 10% 新生牛血清的 TSB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 8 h。

### 1.5 生化鉴定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》, 链球菌对葡萄糖、蔗糖、乳糖及海藻糖的发酵能力为稳定阳性; 对半乳糖、果糖、甘露醇与阿拉伯糖的代谢结果因菌株而异, 无机盐及含氮代谢物对硫化氢生成、尿素酶活性、马尿酸钠水解及柠檬酸盐利用试验均呈阴性<sup>[9]</sup>。将分离菌株接种在含 10% 新生牛血清的 TSB 培养基中培养至 8 h, 取纯培养物和无菌生理盐水分别接种于细菌微量生化反应管中, 37 °C 静置培养 24~48 h, 观察细菌微量生化反应管的颜色变化, 判定试验结果。

### 1.6 16S rRNA PCR 鉴定及测序

使用细菌 DNA 试剂盒提取菌液 DNA, 参照文献 [10] 合成细菌通用引物 16S-F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'), 16S-R (5'-ACGGCTACCT-TGTTACGACTT-3'), 采用 PCR 方法进行扩增, 预计片段大小为 1 500 bp。PCR 扩增体系为 50 μL: 2×Premix Taq 25 μL, 上下游引物各 2 μL, 模板 2 μL, 剩余体积以 ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认含有目标条带的剩余 PCR 产物委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成双向测序。获取正向与反向测序结果后, 通过 SeqMan 软件进行序列拼接校正, 最终将完整序列提交至 GenBank 数据库, 利用 BLAST 工具进行同源性比对分析。

### 1.7 血清型鉴定

参考文献 [11-13] 合成猪链球菌不同血清型特异性引物 (见表 1), 以纯化菌液 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25 μL: 2×Premix Taq 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL, 剩余体积以 ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 53~58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30

个循环; 72 °C 延伸 10 min。鉴定分离菌株血清型的引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法<sup>[14]</sup>对 *CpsK* 阳性菌 PCR 产物通过限制性

内切酶 *Bst*N I 进行酶切鉴定, 扩增体系及程序同上述, 扩增结束后取 PCR 及酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 确定分离菌株血清型。

表 1 猪链球菌血清分型引物序列信息

| 引物名称            | 引物序列 (5'→3')            | 片段长度/bp | 退火温度/°C |
|-----------------|-------------------------|---------|---------|
| <i>CpsK</i> -F  | GTTGCTGGTTATGATAGGGTAG  | 486     | 53      |
| <i>CpsK</i> -R  | AAGCTTCTTTTGCTGTTTGCTC  |         |         |
| <i>Cps1I</i> -F | TCTTATAACAGGCGTCAAAACA  | 153     | 56      |
| <i>Cps1I</i> -R | ATCGGTATAAAAGCAAGACACA  |         |         |
| <i>Cps2J</i> -F | TTCGTATTAACCTTACTTGGCGT | 363     | 55      |
| <i>Cps2J</i> -R | TAAATCCCCATATGCCAAATCC  |         |         |
| <i>Cps3L</i> -F | ACATCCATTGCAGGAGTAGTA   | 210     | 56      |
| <i>Cps3L</i> -R | TGCAGTCCAAAATCTTCTCGT   |         |         |
| <i>Cps4K</i> -F | TGATATTGGCTATCTTTTGGGG  | 542     | 56      |
| <i>Cps4K</i> -R | TTCCCCCTTCAAATAAACTCTG  |         |         |
| <i>Cps5L</i> -F | AGGTATGCTCTTCTTATTCGCAG | 428     | 58      |
| <i>Cps5L</i> -R | ATAATCCCTCCTGATACTAGGC  |         |         |
| <i>Cps6I</i> -F | TGGTGTCTTTCTACCTGCAA    | 705     | 55      |
| <i>Cps6I</i> -R | TCACCAAGATACGTGAACCA    |         |         |
| <i>Cps7H</i> -F | GGAAAGAGACACGTTGGTATC   | 395     | 56      |
| <i>Cps7H</i> -R | GGACACGTAAGACTGACTAG    |         |         |
| <i>Cps8K</i> -F | ATCGCTTCAAATAAGGTAGGAG  | 268     | 53      |
| <i>Cps8K</i> -R | TGTAGGCCGTAATATCAACAAA  |         |         |
| <i>Cps9H</i> -F | GGCTACATATAATGGAAGCCC   | 389     | 55      |
| <i>Cps9H</i> -R | CCGAAGTATCTGGGCTACTG    |         |         |

### 1.8 毒力基因检测

参考文献 [13, 15], 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成猪链球菌 *sly* (链球菌溶血素 S)、*epf* (胞外蛋白酶因子)、*orf2* (开放阅读框 2)、*mrp* (黏附性纤毛蛋白)、*fbps* (纤维蛋白原结合蛋白)、*gapdh* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、*srtA* (分选酶 A)、

*ccpA* (分解代谢物控制蛋白 A) 和 *luxS* (自诱导物-2 合成酶) 9 种主要毒力基因特异性引物(引物信息见表 2)。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 52~58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后, 取 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 2 猪链球菌主要毒力基因引物序列信息

| 引物名称           | 引物序列 (5'→3')          | 片段长度/bp | 退火温度/°C |
|----------------|-----------------------|---------|---------|
| <i>sly</i> -F  | GCTFGACTTACGAGCCACAA  | 248     | 56      |
| <i>sly</i> -R  | CCGCGCAATACTGATAAGC   |         |         |
| <i>epf</i> -F  | GCTACGACGGCCTCAGAAATC | 627     | 52      |
| <i>epf</i> -R  | TGGATCAACCACTGGTGTAC  |         |         |
| <i>mrp</i> -F  | ATCAGAATCACCACCTTTTGG | 885     | 55      |
| <i>mrp</i> -R  | TCATACCCAGTAAATACACG  |         |         |
| <i>orf2</i> -F | CAAGTGTATGTGGATGGG    | 858     | 58      |
| <i>orf2</i> -R | ATCCAGTTGACACGTGCA    |         |         |

续表2

| 引物名称            | 引物序列 (5'→3')                 | 片段长度/bp | 退火温度/℃ |
|-----------------|------------------------------|---------|--------|
| <i>fbps</i> -F  | CAAGGTTTGGGTCGGGATA          | 720     | 58     |
| <i>fbps</i> -R  | CCCGTCTGTTGCCAAGTAA          |         |        |
| <i>gapdh</i> -F | CAGTCAAAGCCCGAACC            | 571     | 58     |
| <i>gapdh</i> -R | CCACCGAAGCCAAGAGGT           |         |        |
| <i>srtA</i> -F  | GAACCGCAATCCGACCAAT          | 123     | 55     |
| <i>srtA</i> -R  | AAAAGAATAAACAGGCTGAGAGACAACA |         |        |
| <i>ccpA</i> -F  | CGGTGTCAGTGATATGGG           | 96      | 55     |
| <i>ccpA</i> -R  | GTCAGGTTTGGACGGGTA           |         |        |
| <i>luxS</i> -F  | GCTCCTGACCACCTATCTGC         | 101     | 55     |
| <i>luxS</i> -R  | AGCTGAATGAAGGCTGTGGT         |         |        |

## 1.9 药敏试验

本试验依据临床和实验室标准研究所 (CLSI) 指南, 采用肉汤微量稀释法评估猪链球菌临床分离株对 10 类 19 种抗生素的敏感性。将分离菌株纯培养物用 TSB 调整至  $1 \times 10^5$  CFU/mL, 在 96 孔板的第 1 孔加 180  $\mu$ L 稀释好的菌液, 第 2~11 孔加 100  $\mu$ L 稀释好的菌液, 在第 1 孔中加入 20  $\mu$ L 抗生素, 充分吹打混匀, 随后取 100  $\mu$ L 的混合液于第 2 孔中吹打混匀, 依次类推加至第 11 孔, 弃去 100  $\mu$ L 稀释液, 第 12 孔加无菌 TSB 培养液作为阴性对照, 放置于 37  $^{\circ}$ C 二氧化碳温箱中培养 20 h。每种药物 3 个重复。以不长细菌药物的最小药物浓度作为最小抑菌浓度 (MIC) 值, 其耐药折点参考文献 [16]。本试验用金黄色葡萄球菌 ATCC29213 作为质控菌株。

## 1.10 生长曲线的测定

将纯化后的菌株划线接种至含 5% 新生牛血清 TSA 培养基平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h, 无菌挑取单菌落于含 10% 新生牛血清 TSB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 8 h 作为种子菌液。

吸光度  $OD_{600}$  值测定法: 吸取 1 mL 种子菌液按 1% 的比例, 加入含 10% 新生牛血清的 TSB 培养基, 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养, 设置 3 个重复, 每隔 1 h 取出用分光光度计测定菌液  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线。

活菌计数测定法: 均匀吸取 100  $\mu$ L 各时间段菌液至 900  $\mu$ L 无菌 PBS 中, 漩涡充分混匀, 连续 10 倍稀释, 制备得到  $10^{-1}$  ~  $10^{-8}$  稀释倍数菌液, 每个倍数菌液分别使用无菌涂布棒将菌液涂布均匀, 重复 3 次, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h, 每个平板进行单菌落计数, 根据计数结果计算每毫升菌液中的活菌数 (CFU/mL), 绘制生长曲线。

## 1.11 致病性测定

### 1.11.1 小鼠半数致死量 ( $LD_{50}$ ) 测定

将 36 只清洁级昆明小鼠, 随机分为 6 组, 每组 6 只, 其中 5 组腹腔注射用无菌 PBS 调整浓度分别为  $3.96 \times 10^9$ 、 $3.96 \times 10^8$ 、 $3.96 \times 10^7$ 、 $3.96 \times 10^6$ 、 $3.96 \times 10^5$  CFU/mL 的菌液 0.2 mL, 另外 1 组注射等体积无菌 PBS 作为对照组。攻菌后密切记录观察小鼠发病和死亡情况, 连续观察 7 d, 根据改良寇氏法计算小鼠  $LD_{50}$  [17]。小鼠死亡后及时分离鉴定死亡小鼠内脏组织病原, 观察小鼠组织器官病理损伤情况。

### 1.11.2 病理切片制作及病理观察

取  $3.96 \times 10^9$  CFU/mL 浓度感染组与健康对照组小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏及肾脏组织, 经 4% 多聚甲醛固定 48 h 后, 依次通过乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸渍及包埋等操作制作切片, 观察各组织的病理变化, 并对比两组间差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离纯化

从发病猪肺脏中分离到较为纯净的细菌, 在 TSA 平板上呈灰白色针尖大小圆形菌落 (图 1A); 挑取疑似菌落进行革兰染色镜检, 结果显示为革兰阳性菌, 圆形菌体以短链至长链的形态排列 (图 1B), 形似猪链球菌, 命名为 S24051。

### 2.2 生化鉴定

生化试验结果显示, S24051 分离株对乳糖、果糖、蔗糖、七叶苷、 $\beta$ -半乳糖苷试验呈阳性, 鸟氨酸脱羧酶、甘露醇、山梨醇、赖氨酸、硝酸盐、硫化氢、尿素等试验呈阴性, 见表 3。生化试验结果符合链球菌的生化特性。

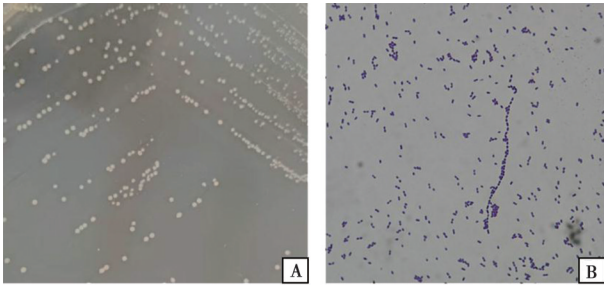


图1 分离菌株在 TSA 上形态 (A) 和革兰染色镜检 (B)

表3 分离菌株 S24051 生化鉴定结果

| 项目     | 结果 | 项目     | 结果 |
|--------|----|--------|----|
| 阿拉伯糖   | -  | 蔗糖     | +  |
| 鸟氨酸脱羧酶 | -  | 七叶苷    | +  |
| 甘露醇    | -  | 硝酸盐    | -  |
| 乳糖     | +  | β-半乳糖苷 | +  |
| 山梨醇    | -  | 硫化氢    | -  |
| 赖氨酸    | -  | 尿素     | -  |
| 果糖     | +  |        |    |

注：+：阳性；-：阴性。

### 2.3 16S rRNA PCR 鉴定及测序

PCR 扩增结果显示，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，扩增条带在 1 000~2 000 bp 之间（图 2），与预期扩增大小 1 500 bp 一致，将测序结果在 GenBank 中已发表的猪链球菌序列进行 BLAST 比对，与猪链球菌（GenBank 登录号为：CP152119.1）同源率为 100%，结合菌落形态、镜检图片以及生化结果，表明分离菌株为猪链球菌。

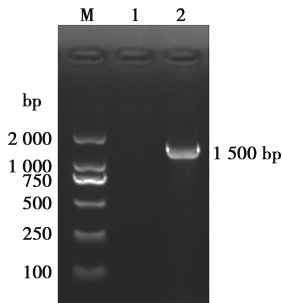


图2 分离菌株 S24051 16S rRNA PCR 鉴定

### 2.4 血清型鉴定

对 S24051 分离株 *Cps1I*、*Cps2J*、*Cps3L*、*Cps4K*、*Cps5L*、*Cps6I*、*Cps7H*、*Cps8K*、*Cps9H* 片段进行扩增

及电泳检测，结果 *Cps1I* 引物出现条带大小为 153 bp 左右的目的条带，其他基因扩增结果均为阴性（图 3），表明 S24051 分离株可能为血清型 1 型或 14 型。为进一步明确 S24051 分离菌株的血清型，采用 PCR-RFLP 方法对 S24051 分离菌株 *CpsK* 基因的 PCR 扩增产物进行酶切鉴定，使用限制性核酸内切酶 *Bst*NI 消化后，琼脂糖凝胶电泳结果显示该分离菌株和阳性对照的条带均未被切开，片段长度仍为 486 bp（图 4）。结果表明，该菌株为猪链球菌 1 型。

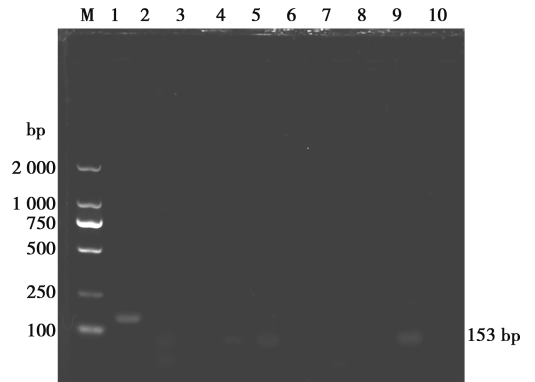


图3 分离菌株 S24051 血清型鉴定

图3 分离菌株 S24051 血清型鉴定

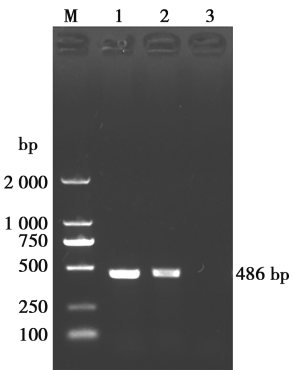


图4 分离菌株 *CpsK* 基因产物酶切鉴定

### 2.5 毒力基因鉴定

毒力基因检测结果显示：S24051 分别在 248、627、885、858、720、571、123、96 bp 左右扩增出 *sly*、*epf*、*mrp*、*orf2*、*fbps*、*gapdh*、*strA*、*ccpA* 基因特异性条带，而 *luxS* 为阴性（图 5），表明 S24051 携带的毒力基因有 *sly*、*epf*、*mrp*、*orf2*、*fbps*、*gapdh*、*strA*、*ccpA*。

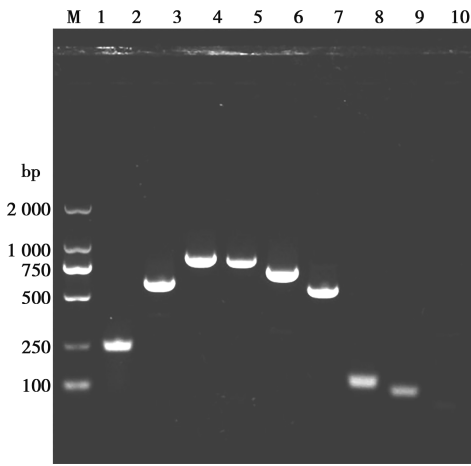


图 5 分离菌株 S24051 毒力基因 PCR 检测  
M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 9. 分别为 *sly*、*epf*、*mrp*、*orf2*、*fbps*、*gapdh*、*strA*、*ccpA*、*luxS* 基因; 10. 空白对照。

图 5 分离菌株 S24051 毒力基因 PCR 检测

## 2.6 药敏试验

药敏试验结果显示, 分离菌株对庆大霉素、卡那霉素、新霉素、链霉素、多西环素、四环素、万古霉素、磺胺异噁唑这 8 种抗生素耐药; 对青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、氨苄西林、环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星、泰妙菌素、克林霉素、利福平 11 种抗生素敏感 (见表 4)。

## 2.7 生长曲线测定

### 2.7.1 吸光度 $OD_{600}$ 值测定

通过分光光度计测定 S24051 菌株生长 0~16 h 的  $OD_{600}$  值, 每一时间节点以 3 个重复的  $OD_{600}$  值平均数绘制生长曲线, 由图 6 得知,  $OD_{600}$  值在 2 h 时开始上升, 8 h 进入平台期。

表 4 分离菌株 S24051 药敏试验结果

| 药物类别   | 药物名称  | 耐药折点/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | MIC/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 结果判定 |
|--------|-------|--|---|------|
| β-内酰胺类 | 青霉素   | 4  | 2   | S    |
|        | 阿莫西林  | 2  | <0.125                                      | S    |
|        | 头孢噻肟  | 4  | <0.125                                      | S    |
|        | 氨苄西林  | 0.25   | <0.125                                      | S    |
| 氨基糖苷类  | 庆大霉素  | 16   | 32  | R    |
|        | 卡那霉素  | 64   | 128   | R    |
|        | 新霉素   | 16   | 128   | R    |
|        | 链霉素   | 32   | >128  | R    |
| 氟喹诺酮类  | 环丙沙星  | 2  | 0.5   | S    |
|        | 恩诺沙星  | 2  | 0.5   | S    |
|        | 左氧氟沙星 | 8  | 0.5   | S    |
| 四环素类   | 多西环素  | 2  | 2   | R    |
|        | 四环素   | 8  | 128   | R    |
| 糖肽类    | 万古霉素  | 2  | 2   | R    |
| 截短侧耳素类 | 泰妙菌素  | 32   | 0.5   | S    |
| 林可酰胺类  | 克林霉素  | 1  | <0.125                                      | S    |
| 利福霉素类  | 利福平   | 0.5  | <0.125                                      | S    |
| 磺胺类    | 磺胺异噁唑 | 128  | >128  | R    |
| 酰胺醇类   | 氯霉素   | 16   | 8   | S    |

注: S 表示敏感, R 表示不敏感。

### 2.7.2 活菌计数测定

由 3 个平行组的活菌计数结果可见, S24051 菌株的生长均呈现明显的延缓期、对数期、稳定期和衰

亡期。分离菌株在 0~2 h 时生长较迟缓, 3 h 左右开始进入对数生长期, 8 h 时活菌数达到峰值, 9 h 后活菌数急剧下降, 随后进入衰亡期 (图 7)。

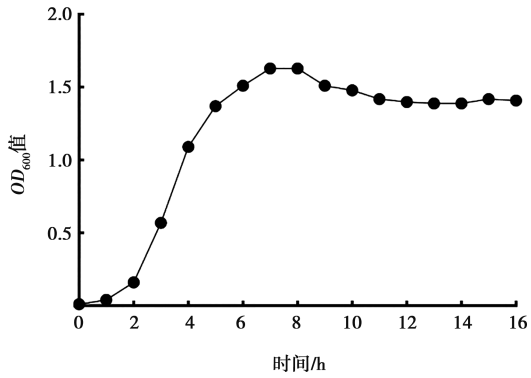


图6 分离菌株 S24051 OD<sub>600</sub> 值与时间生长曲线

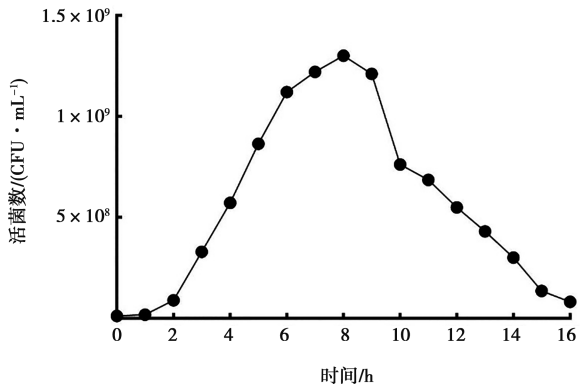


图7 分离菌株 S42051 活菌数与时间生长曲线

## 2.8 致病性测定

### 2.8.1 LD<sub>50</sub>测定

小鼠腹腔注射不同浓度的 S24051 菌液各组小鼠死亡情况见表 5。攻菌 2 h 后，感染组小鼠均开始出现嗜睡、进食减少、蜷缩等症状，6 h 后小鼠眼部出现分泌物。感染浓度为 3.96 × 10<sup>9</sup> CFU/只的小鼠 8 h

后开始死亡，24 h 内全部死亡，其余组未出现死亡，36 h 后逐渐恢复。本试验数据无法根据改良寇氏法公式计算 LD<sub>50</sub>。剖检死亡小鼠，无菌采集心、肝、脾、肺、肾及脑组织样本，并划线接种于添加 5% 新生牛血清的 TSA 培养基平板，经 37 °C 培养 24 h 后，观察到单一形态的菌落大量生长，经形态观察和分子鉴定，确诊为猪链球菌 1 型。

表 5 分离菌株 S24051 感染小鼠各组小鼠死亡情况 (n=6)

| 攻菌剂量/(CFU · 只 <sup>-1</sup> ) | 死亡数量/只 | 死亡率/% |
|-------------------------------|--------|-------|
| 0                             | 0      | 0     |
| 3.96 × 10 <sup>9</sup>        | 6      | 100   |
| 3.96 × 10 <sup>8</sup>        | 0      | 0     |
| 3.96 × 10 <sup>7</sup>        | 0      | 0     |
| 3.96 × 10 <sup>6</sup>        | 0      | 0     |
| 3.96 × 10 <sup>5</sup>        | 0      | 0     |

### 2.8.2 小鼠组织病理切片观察

将感染剂量为 3.96 × 10<sup>9</sup> CFU/只的死亡小鼠和 PBS 对照组小鼠组织制备病理切片，如图 8 所示。感染组肝脏组织部分区域可见散在点状坏死灶并伴有少量淋巴细胞浸润，见细胞崩解、结构模糊，坏死区域还可见蓝紫色杆状颗粒聚集，疑似细菌；中央静脉周围肝血窦轻微扩张，充血明显。脾脏组织可见红髓内脾血窦明显充血和出血。肺脏组织见肺泡隔增厚，肺间质可见少量炎性细胞浸润，局部肺泡上皮细胞变性坏死，见细胞崩解、结构模糊。肾脏组织可见皮质内部分肾小球系膜细胞增生，系膜增厚，局部血管轻微充血扩张。对照组各组织未见明显异常病理变化。

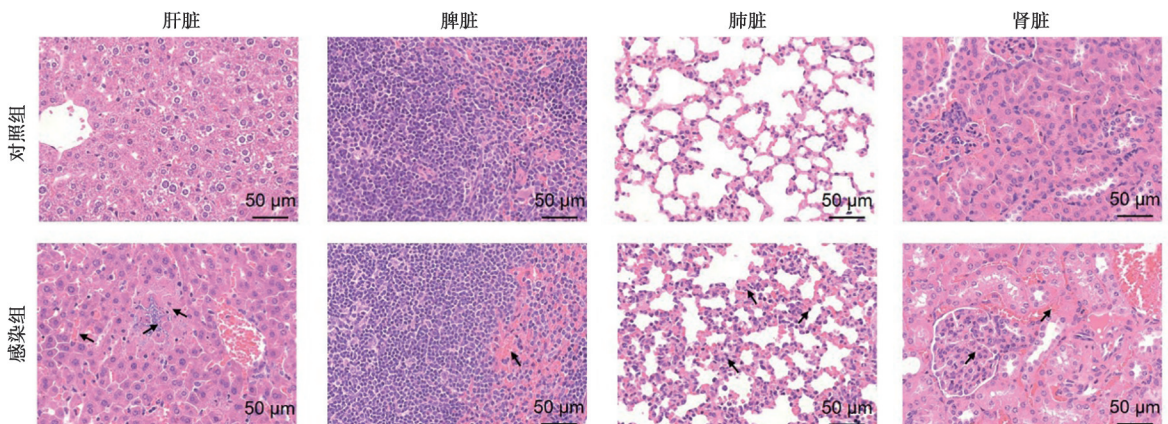


图8 小鼠组织病理变化

### 3 讨论

自1968年丹麦首次报告以来,猪链球菌病先后在英国、美国、荷兰、泰国等地被报道,目前在全球范围内均有分布<sup>[18]</sup>。导致猪发病的主要血清型有1型、2型、7型、9型等,其中2型是被公认的毒性最强和分布最广泛的血清型<sup>[19]</sup>。血清1型在欧洲国家为优势血清型,常从西班牙、捷克等欧洲国家的病猪中分离出来<sup>[20-21]</sup>。在国内也多有较强毒力的猪链球菌1型被报道。刘敬天义等<sup>[22]</sup>从患猪链球菌病的仔猪气管中分离鉴定出1株猪链球菌1型,对斑马鱼有强毒力。2023年,许杨等<sup>[23]</sup>从采集的江苏丹阳屠宰场健康猪扁桃体样本中分离出77株猪链球菌分离株,鉴定出1株猪链球菌1型,且对小鼠有较强致病力。值得关注的是,国内外已报道了4例猪链球菌1型感染人病例<sup>[24-26]</sup>,其中我国江西、贵州先后各出现感染1型猪链球菌患者且医治无效死亡<sup>[27-28]</sup>。因此,对猪链球菌进行血清型鉴定在了解特定地区流行病学有着重要的作用,能够为合理防控猪链球菌病提供理论依据。传统的分型方法是通过制备抗血清进行血清凝集试验,但由于猪链球菌1型、2型、1/2型、14型之间存在交叉凝集反应,使用传统血清凝集分型法,很难将二者区分开来<sup>[29]</sup>。2020年Matiasovic等<sup>[14]</sup>基于*CpsK*中的单核苷酸多态性,设计出可以区分猪链球菌血清型2和1/2,以及1和14的分型方法。本研究参考此方法,最终将本次分离的猪链球菌鉴定为血清型1型,这是贵州省首次在猪肺组织上分离并鉴定出1型猪链球菌。

猪链球菌致病性强弱常与其携带的毒力因子相关,其中*sly*、*mrp*、*epf*这3个毒力因子常用作鉴定猪链球菌的毒力<sup>[30]</sup>。值得注意的是,在贵州省报道的猪链球菌1型感染人并导致死亡的病例中,造成死亡的菌株毒力基因型为*sly*<sup>+</sup>/*epf*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>-</sup><sup>[31]</sup>。本研究通过PCR检测S24051的毒力基因型为*sly*<sup>+</sup>/*epf*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>+</sup>/*orf2*<sup>+</sup>/*fbps*<sup>+</sup>/*gapdh*<sup>+</sup>/*strA*<sup>+</sup>/*ccpA*<sup>+</sup>,可能具有更高的致病性。因不同血清型之间交叉免疫保护效果差,抗生素仍是兽医临床防治链球菌感染的有效且常用途径,而受抗菌药物的长期选择压力,细菌耐药性不断上升,且出现了多重耐药特征<sup>[32]</sup>。2017—2019年间,Tan等<sup>[33]</sup>从临床健康猪群分离的猪链球菌菌株对克林霉素、克拉霉素、四环素、红霉素等4种抗生素耐药性较高。韩瑞等<sup>[34]</sup>分离到的10株链球菌检测出氟喹诺酮类、四环素类、大环内酯类以及磺胺类耐药基因,表明耐药情况非常严峻。本研究分离得到的S24051对新霉素、链霉素、磺胺异噁肟、四环素耐药,后续防控中要引起重视。根据Wei等<sup>[35]</sup>研究猪链球菌2

型对小鼠的致病力,发现当LD<sub>50</sub>低于5×10<sup>8</sup> CFU时判定为强毒株,LD<sub>50</sub>低于3×10<sup>9</sup> CFU时判定为中等毒力毒株。本研究中分离菌株感染浓度为3.96×10<sup>9</sup> CFU/只时,小鼠全部死亡,表明该菌株对小鼠有较强致病力。本试验尚无法确定LD<sub>50</sub>数值,需进一步明确。感染小鼠肺脏、肝脏、脾脏、肾脏组织发生明显病变,提示本次分离菌株的致病性不容忽视。

### 4 结论

本研究首次从贵州省某规模化猪场病死猪肺脏组织样本内成功分离出1株血清1型猪链球菌,携带*sly*<sup>+</sup>/*epf*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>+</sup>/*orf2*<sup>+</sup>/*fbps*<sup>+</sup>/*gapdh*<sup>+</sup>/*strA*<sup>+</sup>/*ccpA*<sup>+</sup>等毒力基因,对庆大霉素、卡那霉素、新霉素、链霉素、多西环素、四环素、万古霉素、磺胺异噁肟等8种抗生素耐药,对昆明小鼠具有较强致病性,为该菌致病机制和免疫防控相关研究提供了参考。

### 参考文献:

- [1] 赵泽广, 杨威, 赵志强, 等. 一株21型猪链球菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023 (2): 86-91, 135.
- [2] PAN S, HE H, AN T Q, et al. *Streptococcus suis*: a review of its effects on immune organs [J]. Microorganisms, 2025, 13 (7): 1613.
- [3] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, et al. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis* [J]. Pathogens, 2016, 5 (3): 45.
- [4] PAN Z, MA J, DONG W, et al. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81 (3): 976-985.
- [5] HUANG J, LIU X, CHEN H, et al. 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]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66 (2): 995-1003.
- [6] KRÁLOVÁ N, FITTIPALDI N, ZOUHAROVÁ M, et al. *Streptococcus suis* strains with novel and previously undescribed capsular loci circulate in Europe [J]. Vet Microbiol, 2024, 298: 110265.
- [7] ZHU J, WANG J, KANG W, et al. *Streptococcus suis* serotype 4: a population with the potential pathogenicity in humans and pigs [J]. Emerg Microbes Infect, 2024, 13 (1): 2352435.
- [8] 赵霞玲, 肖琦, 钱雯娟, 等. 藏猪猪链球菌的分离鉴定及其致病性和药物敏感性分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2023, 31 (1): 122-133.
- [9] 黎芷欣, 周思旋, 周碧君, 等. 猪链球菌1/2型的分离鉴定与致病性研究 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53 (6): 743-749.
- [10] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. J Bacteriol, 1991, 173 (2): 697-703.
- [11] 李森. 猪链球菌常见血清型PCR方法的建立及应用 [D]. 湖南: 湖南农业大学, 2016.

- [12] LIU Z, ZHENG H, GOTTSCHALK M, et al. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis* [J]. PLoS One, 2013, 8 (8): e72070.
- [13] 杨龙斌, 毛天骄, 吴华健, 等. 江淮地区猪链球菌和肠球菌分离株的鉴定、分型及药物敏感性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41 (2): 131-137.
- [14] MATIASOVIC J, ZOUHAROVA M, NEDBALCOVA K, et al. Resolution of *Streptococcus suis* serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-restriction fragment length polymorphism method [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58 (7): e00480-20.
- [15] 刘丁语, 刘宝玲, 何振文, 等. 1株致仔猪脑膜炎的猪链球菌的分离鉴定及致病性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (5): 2143-2153.
- [16] WANG X, SUN J, BIAN C, et al. The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Streptococcus suis* cps31 [J]. Vet Microbiol, 2021, 259: 109149.
- [17] 周丽萍, 贺东生. MDMA (摇头丸) 对小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定及其毒性作用 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2005, 30 (5): 41-43.
- [18] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER J P, XU J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent: an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing [J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3 (1): 1-20.
- [19] 马婷婷, 朱远致, 闭璟珊, 等. 广西部分地区猪群中猪链球菌的分离鉴定及耐药性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55 (2): 103-109.
- [20] PETROCCHI-RILO M, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ S, AGUARÓN-TURRIENTES Á, et al. Anatomical site, typing, virulence gene profiling, antimicrobial susceptibility and resistance genes of *Streptococcus suis* isolates recovered from pigs in Spain [J]. Antibiotics, 2021, 10 (6): 707.
- [21] ZOUHAROVÁ M, ŠIMEK B, GEBAUER J, et al. Characterisation of *Streptococcus suis* isolates in the Czech republic collected from diseased pigs in the years 2018-2022 [J]. Pathogens, 2022, 12 (1): 5.
- [22] 刘敬天义, 何培娟, 董芳芳, 等. 猪链球菌 1 型临床分离株的鉴定和基因组学分析 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (1): 73-79.
- [23] 许杨, 王瑞光, 彭泽仁, 等. 2023 年江苏地区屠宰场健康猪源猪链球菌致病与耐药特征 [J]. 微生物学报, 2025, 65 (1): 211-224.
- [24] YANG W, YANG C, LU X. Human infective endocarditis and septic shock caused by *Streptococcus suis* serotype 1 [J]. BMC Infect Dis, 2025, 25 (1): 86.
- [25] HUANG Y, TENG L, HO S, et al. *Streptococcus suis* infection [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2005, 38 (5): 306-313.
- [26] HATRONJIT R, FITTIPALDI N, JENJAROENPUN P, et al. Genomic comparison of two *Streptococcus suis* serotype 1 strains recovered from porcine and human disease cases [J]. Sci Rep, 2023, 13 (1): 5380.
- [27] 吴景文, 王斌, 郭双莉, 等. 江西省一例人感染 1 型猪链球菌病例的流行病学调查与分析 [J]. 国外医学 (医学地理分册), 2017, 38 (2): 164-165.
- [28] 马青, 李世军, 刘英, 等. 贵州省一例人感染猪链球菌病例的病原学检测与分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31 (5): 489-492.
- [29] GOTTSCHALK M, HIGGINS R, JACQUES M, et al. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis* [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27 (12): 2633-2636.
- [30] BOJARSKA A, MOLSKA E, JANAS K, et al. *Streptococcus suis* in invasive human infections in Poland: clonality and determinants of virulence and antimicrobial resistance [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35 (6): 917-925.
- [31] 马青, 刘英, 王月, 等. 贵州省死亡病例 1 型猪链球菌的分离及分子生物学特征分析 [J]. 现代预防医学, 2018, 45 (3): 506-509.
- [32] VARELA N P, GADBOIS P, THIBAUT C, et al. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis* [J]. Anim Health Res Rev, 2013, 14 (1): 68-77.
- [33] TAN M F, TAN J, ZENG Y B, et al. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy pigs from 2017 to 2019 in Jiangxi Province, China [J]. J Appl Microbiol, 2021, 130 (3): 797-806.
- [34] 韩瑞, 杨行, 张文波, 等. 江西省猪链球菌的分离鉴定及耐药基因、毒力基因检测分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32 (1): 164-174.
- [35] WEI Z, LI R, ZHANG A, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007 [J]. Vet Microbiol, 2009, 137 (1-2): 196-201.