

闫一心, 梁瑶瑶, 高庭颢, 等. 1株产金属 β -内酰胺酶的血清3型ST117猪链球菌的生物学特性[J]. 畜牧与兽医, 2026, 58(5): 89-98.

YAN Y X, LIANG Y Y, GAO T H, et al. The biological characteristics of a serotype 3, ST117 *Streptococcus suis* strain that produces MBLs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58(5): 89-98.

1株产金属 β -内酰胺酶的血清3型ST117猪链球菌的生物学特性

闫一心¹, 梁瑶瑶¹, 高庭颢¹, 杨荣荣¹, 张启文¹, 李芃绪¹, 徐梦然¹,
袁紫婧¹, 项维¹, 雷连成^{1,2}, 任林柱^{1,3}, 钱晶⁴, 张付贤^{1*}

(1. 长江大学动物科学技术学院, 湖北 荆州 434023;

2. 吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062;

3. 吉林大学动物科学学院, 吉林 长春 130062;

4. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 从病猪肺组织中分离出1株链球菌, 通过形态观察、16S rRNA基因测序、多位点序列分型(MLST)等方法对其进行分子分型鉴定, 通过小鼠感染试验、毒力基因筛查、生物被膜形成能力、抗生素和中药药敏试验研究分离菌株的致病性和耐药性。结果: 分离菌株为革兰阳性, 电镜下可见连续排列成链状的卵圆形菌体; PCR和16S rRNA基因系统发育树分析确定其属于猪链球菌血清型3型, 命名为猪链球菌GZYZ0831; 分离菌株GZYZ0831的序列分型为ST117, 携带猪链球菌表面抗原(*sao*)、细菌转铁蛋白结合蛋白(*Tbp*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)、毒力相关序列第二开放阅读框(*orf2*)和溶菌酶释放相关蛋白(*mvp*)这5种毒力基因, 呈 α 溶血; 感染后可导致小鼠肺脏、脾脏和肝脏等多个器官不同程度的病变。GZYZ0831为产金属 β -内酰胺酶的多重耐药菌株, 携带 β -内酰胺酶耐药基因*blaTEM*和四环素耐药基因*tetO*, 对阿奇霉素、红霉素、克拉霉素、庆大霉素等17种药物耐药, 对中药黄连与板蓝根敏感。综上, 本研究系统性分析了1株猪链球菌3型ST117菌株的生物学特性, 为其致病机制和耐药机制研究提供科学依据, 并对猪链球菌感染的中药防控策略制定提供参考。

关键词: 猪链球菌; 血清型3型; ST117型; 生物学特性; 耐药性; 中药

中图分类号: S855.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)05-0089-10

The biological characteristics of a serotype 3, ST117 *Streptococcus suis* strain that produces MBLs

YAN Yixin¹, LIANG Yaoyao¹, GAO Tinghao¹, YANG Rongrong¹, ZHANG Qiwen¹, LI Pengxu¹, XU Mengran¹,
YUAN Zijing¹, XIANG Wei¹, LEI Liancheng^{1,2}, REN Linzhu^{1,3}, QIAN Jing⁴, ZHANG Fuxian^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

3. College of Animal Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China;

4. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: One *Streptococcus* strain was isolated from the lung tissue of diseased pigs, and its molecular typing identification was performed through morphological observation, 16S rRNA gene sequencing, and multilocus sequence typing (MLST). The pathogenicity and drug resistance of the isolated strain were studied *via* mouse infection experiments, virulence gene screening, biofilm formation ability tests, and drug sensitivity tests on antibiotics and traditional Chinese medicines (TCMs). The results showed that the isolated strain was Gram-positive, with oval-shaped bacterial cells arranged in chains observed under electron microscopy. PCR and 16S rRNA gene phylogenetic tree analysis identified it as *Streptococcus suis* serotype 3, designated as *Streptococcus suis* GZYZ0831. The sequence type of isolate GZYZ0831 was ST117, which carried five virulence genes: the surface antigen gene (*sao*), the bacterial transferrin-binding protein gene (*Tbp*), the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*), the virulence-associated sequence second open reading frame (*orf2*), and the muramidase-

收稿日期: 2025-05-22; 修回日期: 2025-09-05

基金项目: 湖北省重大科技专项(2024BBA004)

第一作者: 闫一心, 女, 本科生

*通信作者: 张付贤, 副教授, 研究方向为兽医微生物与免疫学, E-mail: zhangfuxian99@163.com。

released protein gene (*mrp*); and which exhibited α -hemolysis. Infection in mice caused varying degrees of pathological lesions in multiple organs including the lungs, spleen, and liver. GZY0831 was a multidrug-resistant strain producing metallo- β -lactamases (MBLs), carrying the resistance genes *blaTEM* and *tetO*. It possessed resistance to 17 antibiotics, including azithromycin, erythromycin, clarithromycin, and gentamicin, but was sensitive to the Chinese herbal medicines *Coptidis rhizoma* and *Isatidis radix*. This study systematically analyzed the biological characteristics of *Streptococcus suis* serotype 3 ST117 strain, providing scientific basis for research on the pathogenic and drug resistance mechanisms of *Streptococcus suis*, and serving as reference for the formulation of TCMs prevention and control strategies against *Streptococcus suis* infection.

Keywords: *Streptococcus suis*; serotype 3; serotype ST117; biological characteristics; drug resistance; Chinese herbal medicine

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是人畜共患的重要病原体, 引起的链球菌病对养猪业的发展和人类的公共卫生安全构成威胁。SS 主要通过伤口和消化道感染人, 通过呼吸道感染猪, 可造成人的细菌性脑炎或中毒样休克综合征, 以及猪只的急性败血症、脑膜炎、关节炎、肺炎等疾病^[1-2]。根据菌体荚膜抗原的差异, SS 分为 29 种血清型, 还有一些新的不可分型的菌株。研究发现, 临床上分离出来的 SS 主要是 2 型、9 型、3 型、1/2 型和 7 型, 其中, 北美 (加拿大和美国等) 的 SS 以 2 型和 3 型为主, 亚洲 (中国和韩国) 以 2 型、3 型、4 型为主^[3-4]。血清 2 型是目前 SS 中最常见和毒力最强的血清型^[5-6]。从华中及周边地区采样检测发现, 分离的 SS 主要为 2 型、3 型、9 型和 7 型等。SS 鉴别诊断主要依靠其重组修复蛋白 N (*recN*) 基因和荚膜血清型分型, 结合多位点序列分型 (MLST) 可用于 SS 分离株间的血清型及流行性的相关性研究。自 2005 年猪链球菌病暴发以来, ST1 和 ST7 型 SS 在中国散发的人类感染中占主导地位^[7]。陈经雕等^[8]对广东省 2005—2008 年分离自患者及病猪的 22 株 SS 血清 2 型菌株进行 MLST 分析, 将其分为 ST1、ST7 和 ST28 三型, 其中 ST1、ST7 型为患者和病猪菌株共有, ST28 型为病猪所特有。

不同地区优势血清型调查结果显示, SS 血清 3 型 (SS3) 和 9 型 (SS9) 在我国部分地区如吉林、广东、四川、山东等地占有优势^[9], 但目前针对我国 SS3 菌株的分子分型、致病性、毒力和基因特性等研究较少。本研究通过应用 MLST 对从病猪体内分离出的 SS3 菌株进行分型鉴定, 结合抗生素敏感性试验和小鼠致病性试验, 系统分析分离菌株的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 样品来源

在 2024 年 10 月至 2025 年 1 月期间, 湖北省某生猪养殖企业的断奶 2 月龄仔猪出现突发高热、呼吸急促、喘气、后腿肌肉强直等症状。剖检病死猪发现胸腔有积液, 肺脏淤血、水肿, 肺脏和脑膜上可见出

血点。前期抗生素治疗时出现病情反复。无菌采集病猪的肺脏、脾脏、肝脏、肾脏和脑组织样本, 4 ℃ 冷藏运送至实验室。

1.2 试剂

基因组提取试剂盒购自湖南冠牧生物科技有限公司; 革兰染色试剂盒由上海碧云天生物技术有限公司供应; *Taq* 酶与 DL2000 DNA Marker 均于北京聚合美生物技术有限公司采购; 试验中所涉及的特定引物定制服务均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。中药抑菌试验中所使用的 30 种中药: 黄连、全蝎、罗汉果、桑皮、桔壳、金银花、丁香、乌梅、三七、熟地黄、苏子、桔梗、胖大海、天竺黄、川贝、板蓝根、朱砂、薄荷、石榴皮、荆芥、肉桂、半夏、大叶青、白术、何首乌、茯苓、款冬花、蒲公英、僵蚕、生地榆均购自武汉同仁堂大药房。

1.3 病原检测

将采集的病猪组织置于 PBS 中匀浆破碎, 使用细菌和病毒基因组提取试剂盒提取基因组 DNA/RNA; 合成猪常见呼吸道病原微生物如副猪格氏菌 (GPS)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 和多杀性巴氏杆菌 (Pm) 及 SS 的特异性检测引物^[10] (表 1), 以提取的样品基因组为模板, 分别进行 PCR 反应。PCR 体系: 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), DNA 模板 1 μ L, 2 \times *Taq* PCR Master Mix 酶 10 μ L, 超纯水 8 μ L。引物扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.25% 琼脂糖凝胶电泳, 130 V 电泳 30 min 后观察结果。

1.4 病样病原菌分离和鉴定

接种环蘸取病猪肺组织的新鲜切面, 在 BHI 固体培养基划线, 37 ℃ 培养 18~24 h。筛选疑似菌落, 采用 PCR 方法二次确认。经纯化处理的三代细菌培养物, 涂布平板, 进行革兰染色和镜检观察; 分离菌株的培养物经无菌 PBS 洗涤后均匀涂抹于玻片上, 加入 1% 鞣酸, 固定 2 h 后, 将盖玻片置于样品台上进行喷金处理和扫描电镜观察。

表1 猪常见呼吸道疾病病原微生物的引物信息

病原	基因	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	产物长度/bp
APP	<i>apxIV</i>	F: TTATCCGAACCTTTGGTTTAGCC R: CATATTTGATAAAAACCATCCGTC	55	417
Pm	<i>plpE</i>	F: AAATCGTTTTAAAAACAAGCTTATTGA R: TTATTGTGCTTGGTGACTTTTTTC	55	1 001
GPS	<i>vanY</i>	F: ATGTTAAATTTTGAAAATTTACCTTCTCTTC R: GCTTGACATTTGTCCCAATCA	55	302
SS	<i>recN</i>	F: CTACAAACAGCTCTCTTCT R: ACAACAGCCAATTCATGGCGTGATT	55	336
PCV2	<i>Rep</i>	F: GCTGCCACATCGAGAAAGCG R: TCAGAATACTGCGGGCCAAA	55	519
PRRSV	<i>orf7</i>	F: CCAGCCGGTCAATCAGCT R: GGCTTCTCCGGGCTTTTCT	54	111

注: *apxIV*, 胸膜肺炎放线杆菌 RTX 毒素IV; *plpE*, 磷脂酶相关蛋白 E 基因; *vanY*, 万古霉素耐药基因 Y; *Rep*, 复制蛋白; *orf7*, 开放阅读框 7。

1.5 构建系统进化树

以提取的分离菌株纯基因组为模板, 使用 16S rRNA 基因的通用引物 1492R (5'-TACGCTACCTTGT-TACGACTT-3') 和 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 进行 PCR 扩增。扩增体系与反应条件: 无菌条件下在 1.5 mL 离心管中加入 12.5 μL PCR *Taq* 高保真酶, 加入 10.5 μL 超纯水, 0.5 μL DNA 模板, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 混匀后离心。引物扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.25% 琼脂糖凝胶电泳, 130 V 电泳 40 min 后观察结果。目的条带切胶回收送武汉生物工程有限公司测序。测序结果使用 NCBI BLAST 网站进行比对分析, 选取与分离菌株同源性高且为 SS 的其他菌株 16S rRNA 基因序列, 通过 Mega 11 软件对多重序列进行排列, 并使用邻接法 (Neighbor-joining) 构建分离菌株基于 16S rRNA 基因的系统进化树, 设置 1 000 次 Bootstrap 重复检验进化树置信度, 在 ITOL 网站 (<https://itol.embl.de/>) 构建系统进化树。

1.6 血清型鉴定

合成 SS3 *Cps3J-Cps3K* 基因和 *Cps3N* 基因的特异性引物, 以分离菌株的基因组为模板进行 PCR 扩增, 根据 PCR 产物的类型判定 SS 的血清型^[11]。若 2 个引物扩增的条带分别为 214 与 1 273 bp, 则表明分离菌株为 SS3。

1.7 多位点序列分析

合成 SS 的 7 个管家基因重组蛋白 A 基因 (*recA*)、芳香族氨基酸生物合成蛋白基因 (*aroA*)、

分子伴侣素 60-L 基因 (*cpn60-L*)、类 Dps 过氧化物抗性蛋白基因 (*dpr*)、葡萄糖激酶基因 (*gki*)、DNA 错配修复蛋白 S 基因 (*mutS*) 和天冬氨酸激酶 I (*thrA*) 的引物, 以分离菌株的基因组为模板进行 PCR 扩增^[12], PCR 产物送武汉生物工程公司进行基因测序; 上传测序结果至多序列位点分型官方数据库网站 (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>) 数据库, 比对分离菌株等位基因编号, 进而确定该菌株的序列分型。

1.8 病原菌的致病性检测

1.8.1 毒力基因检测

合成 SS 常见的 7 种毒力基因: 溶菌酶释放相关蛋白 (*mrp*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、纤维蛋白原结合蛋白 (*fbp*)、毒力相关序列第二开放阅读框 (*orf2*)、表面抗原蛋白 (*sao*)^[13-14]、转铁蛋白结合蛋白 (*Tbp*)^[15-16] 以及溶血素 (*sly*) 相关引物^[2,17]; 提取分离菌株基因组, 使用 PCR 法检测其携带毒力基因种类与数量^[13]。

1.8.2 溶血性试验

将处于对数期的分离菌株均匀涂布在胰酪胨大豆羊血琼脂平板上, 37 °C 条件下恒温培养 36 h, 观察菌落的溶血环大小与形态, 分析菌株产生溶血素的能力。

1.8.3 小鼠感染试验

90 只 SPF 级雌性昆明小鼠购自华中农业大学试验动物中心, 饲养 3 d 观察其生长健康情况, 经 PCR 检测确认无特定病原体用于后续试验。培养至对数生长期的分离菌株洗涤 3 次, 平板计数法计数后以无菌 PBS 重悬调整至试验所需攻毒浓度: 1.07×10^{10} 、

1.07×10^9 、 1.07×10^8 、 1.07×10^7 、 1.07×10^6 CFU/mL。小鼠随机分为 6 组，腹腔注射 0.5 mL 菌液，对照组小鼠注射同体积的无菌 PBS。观察小鼠的状态，统计死亡情况。采集死亡小鼠部分病变器官组织用于病原体的分离鉴定，平板计数法计算各组织的细菌载量；取病理特征明显的脑、肺、肝、脾以及心脏组织，制备组织切片，显微镜观察组织的病变情况。

1.9 生物被膜形成能力分析

以大肠杆菌 O157 作为参考菌株，采用刚果红琼脂培养基法测定分离菌株的生物被膜形成能力^[19]。取 10 μ L 分离菌株的菌液，均匀接种到含刚果红的琼脂平板上，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h，观察菌落的特征。若菌落呈现锯齿状或无纹理，表明菌株不具有形成生物被膜的能力；如果菌落出现红黑相间的色泽，干燥且边缘翘曲，表明菌株具有形成生物被膜能力。采用结晶紫染色法定量分析分离菌株形成生物被膜的能力，使用酶标仪测定每孔的 $OD_{570\text{ nm}}$ 值，依据 OD 值判定分离菌株生物被膜形成能力。

1.10 耐药性分析

1.10.1 耐药基因检测

合成针对各种抗生素耐药基因的引物，采用普通 PCR 法筛查分离株耐药基因携带情况^[20-24]。四环素类：四环素耐药基因 C (*tetC*)、*tetO*、*tetA* 基因。红霉素类：红霉素核糖体甲基化酶基因 F (*ermF*)、红霉素酯酶基因 D (*ereD*)。氟喹诺酮类：DNA 旋转酶 A 亚基基因 (*gyrA*)、*gyrB*。氨基糖苷类：氨基糖苷腺苷酰基转移酶基因 A1 (*aadA1*)、*aadB*。 β -内酰胺类： β -内酰胺酶 IMP 型基因 (*blaIMP*)、*blaTEM*、*blaSHV*、*blaCTX*、*blaOXA*、*blaDHA*、*blaKPC*、*blaNDM*。磺胺类：磺胺耐药基因 1 (*sul1*)、*sul2*。林可霉素类：林可酰胺类耐药基因 H (*lnuH*)。

1.10.2 抗生素敏感性试验

金黄色葡萄球菌 ATCC25923 检验药物的有效性后，通过 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法分析分离菌株对不同抗生素的敏感性。取分离菌株均匀涂布于 BHI 平板上，将药敏片均匀贴在培养基上，在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h。测定抑菌圈的直径，在相同条件下进行 3 次药物敏感试验，取抑菌圈直径平均值，判断分离菌株对药物的敏感性。

1.10.3 中药抑菌试验和最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

将 30 种中草药分别煎煮，制备成 1 g/mL 的中药药液，将药敏片浸透药液后风干备用。将菌液均匀涂

布平板，贴好药敏片，并用空白药敏片作为对照。37 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养 24 h，测量抑菌圈直径，重复 3 次试验，根据抑菌圈大小判断分离菌株对中药药液的敏感性。以 96 孔板微量稀释法测定中草药对分离菌株的 MIC^[25-26]。

1.10.4 双纸片协同扩散试验

采用 CLSI 推荐的双纸片扩散试验，分析分离菌株携带超广谱 β -内酰胺酶 (ESBL) 和金属 β -内酰胺酶 (MBL) 的情况。

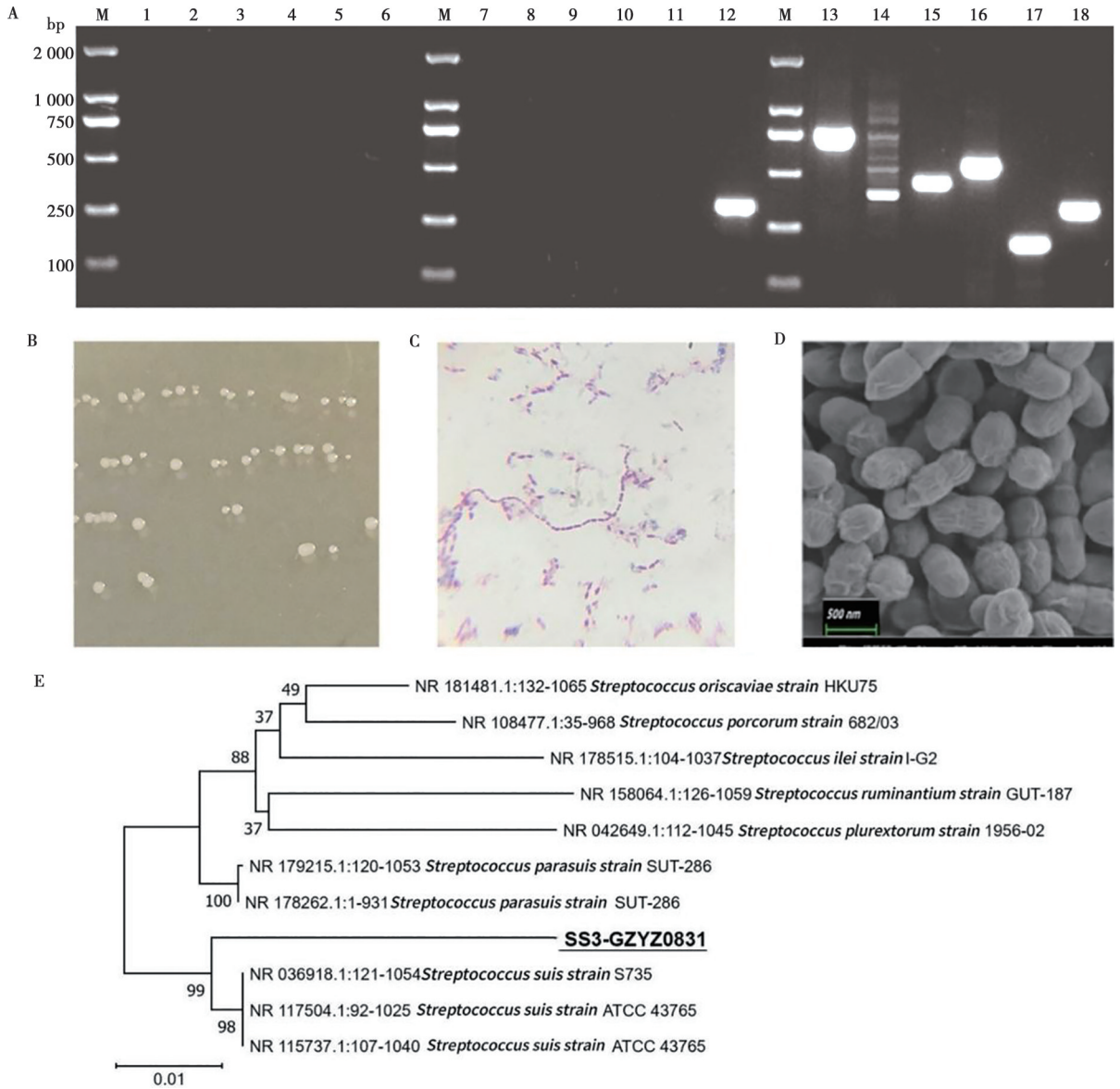
制备浓度为 0.5 麦氏浊度的细菌悬浮液，均匀涂布于含琼脂的脑心浸液肉汤培养基 (BHI) 表面。将含有头孢噻肟 (30 μ g)、头孢噻肟 (30 μ g) / 克拉维酸 (10 μ g)、头孢他啶 (30 μ g) 和头孢他啶 (30 μ g) / 克拉维酸 (10 μ g) 的药物敏感性纸片置于培养基上。在 37 $^{\circ}$ C 下培养 18~24 h，测量每种药敏片上的抑菌圈直径。如果任何抗生素与克拉维酸联用时，抑菌圈直径比单独使用时大 5 mm，则判定分离菌株为 ESBL 阳性。

将美罗培南 (10 μ g) 和无菌空白药物敏感性纸片置于平板上，纸片间距 15 mm。无菌条件下吸取 10 μ L EDTA 溶液 (0.5 mol/L) 滴于空白药敏纸片，设置 3 个平行，37 $^{\circ}$ C 恒温培养 16~18 h，测量抑菌圈直径。与对照组相比，若美罗培南纸片抑菌圈扩大，则判定分离菌株为 MBL 阳性。

2 结果与分析

2.1 病原的分离和鉴定

采集患呼吸道疾病猪只的组织样品进行病原筛查，结果如图 1A 所示，病料中未检出 APP、Pm、PCV2、GPS、PRRSV，而 *recN* 基因检测显示为阳性，其条带大小与 SS 阳性对照条带一致，推断该猪场病猪可能感染 SS。取病变肺组织划线培养，生长出的优势菌在培养基上生长出灰白色、边缘整齐的圆形菌落 (图 1B)；革兰染色后观察显示，分离菌株为革兰阳性，细菌多呈成对或链状 (图 1C)；扫描电镜下细菌形态呈卵圆形，呈现出链状平行特征 (图 1D)，这与《伯杰氏细菌鉴定手册》描述的链球菌特征一致。PCR 扩增分离菌株的 16S rRNA 基因，测序后构建进化树分析，结果显示分离菌株与 SS 菌株 S735 (NR036918) 的同源性最高并聚为一支，同源性超过 98% (图 1E)。综合分离菌株的形态特性和 16S rRNA 基因进化发育分析，确定该分离菌株为 SS，命名为 GZYZ0831。

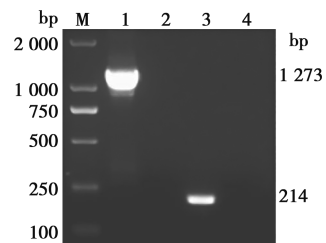


A. 病样 PCR 检测 (M. DL2000 DNA Marker; 1~6. 阴性对照; 7~12. 样品; 13~18. 阳性对照; 1、7、13. GPS; 2、8、14. PCV2; 3、9、15. Pm; 4、10、15. App; 5、11、17. PRRSV; 6、12、18. SS; B. 菌落形态; C. 革兰染色; D. 扫描电镜图; E. 基于 16S rRNA 基因的系统进化树。

图 1 细菌分离鉴定、培养特性与 16S rRNA 序列分析

2.2 血清型鉴定

以分离菌株的基因组为模板, SS3 基因 *Cps3J*-*Cps3K* 的特异性引物扩增出 1 273 bp 左右的条带, *Cps3N* 基因的特异性引物扩增出 214 bp 左右的条带 (图 2)。血清型鉴定的 PCR 结果表明, 分离菌株 GZY0831 为 SS3 菌株。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 分离菌株的 *Cps3J*-*Cps3K* 检测; 2. *Cps3J*-*Cps3K* 的阴性对照; 3. 分离菌株的 *Cps3N* 检测; 4. *Cps3N* 的阴性对照。

图 2 分离菌株的血清型鉴定

2.3 MLST 分型

对分离菌株的管家基因 (*aroA*、*thrA*、*recA*、*gki*、*dpr*、*cpn60* 和 *mutS*) 进行 PCR 检测和测序, 测序结果提交至 MLST 网站, 分离菌株对应的 7 个基因的编号分别为 31、57、5、34、31、3 和 25, 确定分离菌株 GZYZ0831 为 ST117 型 SS。

2.4 病原潜在致病力评估

2.4.1 毒力基因型检测

毒力基因检测结果如图 3A 所示, 分离株 GZYZ0831 携带 5 种毒力基因: *Tbp*、*mrp*、*GAPDH*、*orf2* 和 *sao*, 其毒力基因型为 $Tbp^+/mrp^+/sly^-/GAPDH^+/fbp^-/orf2^+/sao^+$ 。

2.4.2 溶血表型分析

分离株的菌落在血平板上形成直径约 1 mm 的圆形溶血环, 呈草绿色, 菌落周围的红细胞未被完全溶解 (图 3B), 呈现典型的 α 溶血, 表明分离菌株 GZYZ0831 具有 α 溶血活性。

2.4.3 小鼠感染试验

分离菌株感染小鼠后, 小鼠出现背毛凌乱, 共济

失调, 眼结膜潮红, 眼睑分泌黏性物质, 濒死时出现全身抽搐等神经症状。攻毒后 24 h, 对照组小鼠未死亡, 1.07×10^{10} CFU/mL 组小鼠全部死亡, 1.07×10^9 CFU/mL 组死亡 5 只, 其他试验组小鼠出现轻微临床症状, 未死亡 (图 3C)。 1.07×10^{10} CFU/mL 组死亡小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏的载菌量均在 10^7 CFU/mg 以上, 脑组织载菌量可达 5.81×10^6 CFU/mg (图 3D)。

剖检发现, 对照组小鼠的组织未见异常 (图 4A), 感染组小鼠的肺脏出血, 肝脏肿大, 脑组织水肿, 出现脑膜炎症状 (图 4B)。组织病理学观察发现, 感染组小鼠心肌细胞变性坏死, 心肌纤维断裂, 组织间出现积液; 脑组织神经纤维疏散无序; 肝板间有大量红细胞渗出, 肝细胞脂肪变性、坏死; 脾脏、肾小囊腔中有红细胞渗出 (图 4C)。结果表明, 分离株 GZYZ0831 感染时可引起小鼠严重器官损伤。

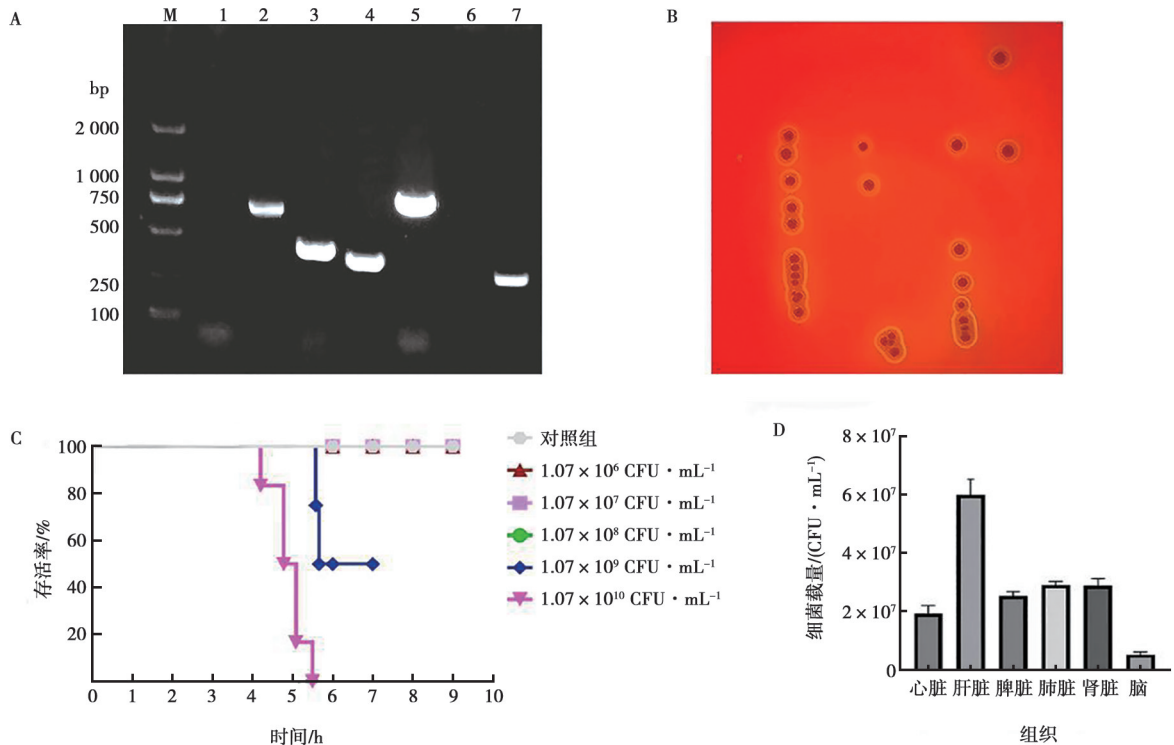


图 3 分离菌株的致病性分析 (A. 分离菌株的毒力基因筛查 (M. DL2000 DNA Marker; 1. *fbp*; 2. *sao*; 3. *Tbp*; 4. *GAPDH*; 5. *orf2*; 6. *sly*; 7. *mrp*); B. 分离菌株的溶血性; C. 组织细菌载量; D. 小鼠感染后生存曲线)。

图 3 分离菌株的致病性分析

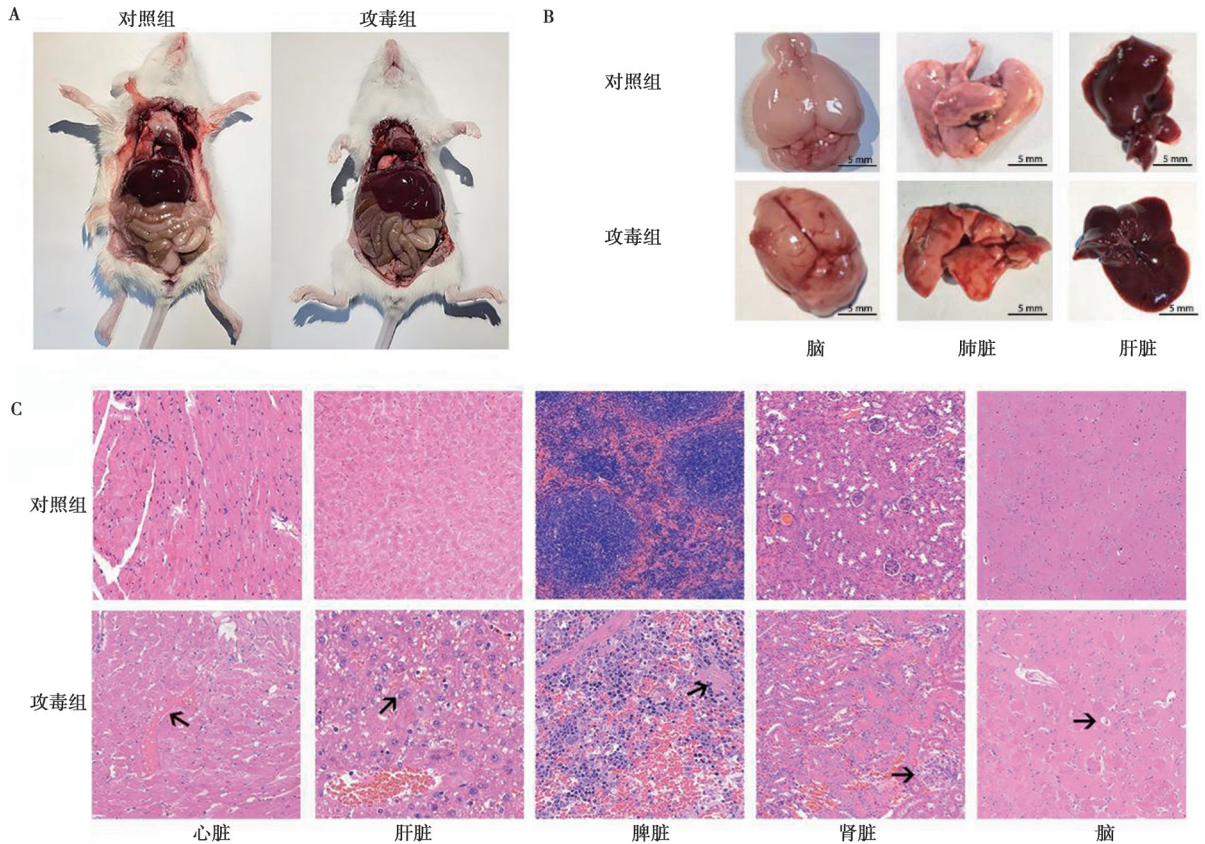


图 4 感染小鼠的剖检病变和病理组织学变化 (HE, 100 \times)。

图 4 感染小鼠的剖检病变和病理组织学变化

2.5 生物被膜形成能力分析

刚果红琼脂试验发现, 参考菌株大肠杆菌 O157 不具备生物被膜的形成能力, 在刚果红培养基上生长的菌落周边光滑、无卷曲; 分离菌株 GZY0831 在含有刚果红的培养基上生长出了深红色、周边卷曲、表面干燥膨起的菌落 (图 5A), 表明分离菌株 GZY0831 具有形成生物被膜的能力。结晶紫试验测得分离株 GZY0831 的 $OD_{570\text{nm}}$ 平均值为 0.394, 而大肠杆菌 O157 的平均值为 0.169 (图 5B), 表明分离株 GZY0831 具有中等生物被膜形成能力。

2.6 耐药性分析

2.6.1 抗生素敏感性试验

对照菌株金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 的药敏试验结果证实药敏片有效。抑菌圈测量结果表明, 多西环素、红霉素、克拉霉素、丁胺卡那、新霉素、美诺环素、庆大霉素、阿奇霉素、环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星、头孢唑林、头孢拉定、氨苄西林、磺胺异恶唑、复方新诺明、甲硝唑等 17 种药物对分离菌株产生的抑菌圈直径均 ≤ 13 mm, 表明 GZY0831 菌株对以上抗生素耐药; 对利福平、青霉素、氟苯尼考、头孢呋辛等 5 种药物中介。综合上述

结果, 表明菌株 GZY0831 为多重耐药菌株。

2.6.2 耐药基因检测

耐药基因检测结果如图 5C 所示, 菌株 GZY0831 携带 *bla_{TEM}* 和 *tetO* 耐药基因, 其他耐药基因为阴性。

2.6.3 抗生素药敏试验

双纸片协同试验发现, 头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸对菌株 GZY0831 的抑菌圈直径分别为 26 和 22 mm。头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸对菌株 GZY0831 的抑菌圈直径分别为 34 和 32 mm。头孢他啶与克拉维酸的组合并未显著增加抑菌圈直径, 表明菌株 GZY0831 为不产 ESBL 的细菌; EDTA-纸片协同试验显示, 美罗培南和美罗培南/EDTA 对菌株 GZY0831 的抑菌圈直径分别为 31 和 36.5 mm (图 5D), 进一步证实了菌株 GZY0831 为 MBL 阳性菌株。

2.6.4 中药抑菌试验

在中药体外抑菌测试中, 黄连和板蓝根的抑菌圈直径分别为 11 和 10 mm, 表明两者对分离菌株 GZY0831 中等敏感; 黄连的最小抑菌浓度为 197 mg/mL, 板蓝根则为 115 mg/mL。其他中药对分离菌

株 GZYZ0831 未见明显的抑制作用。

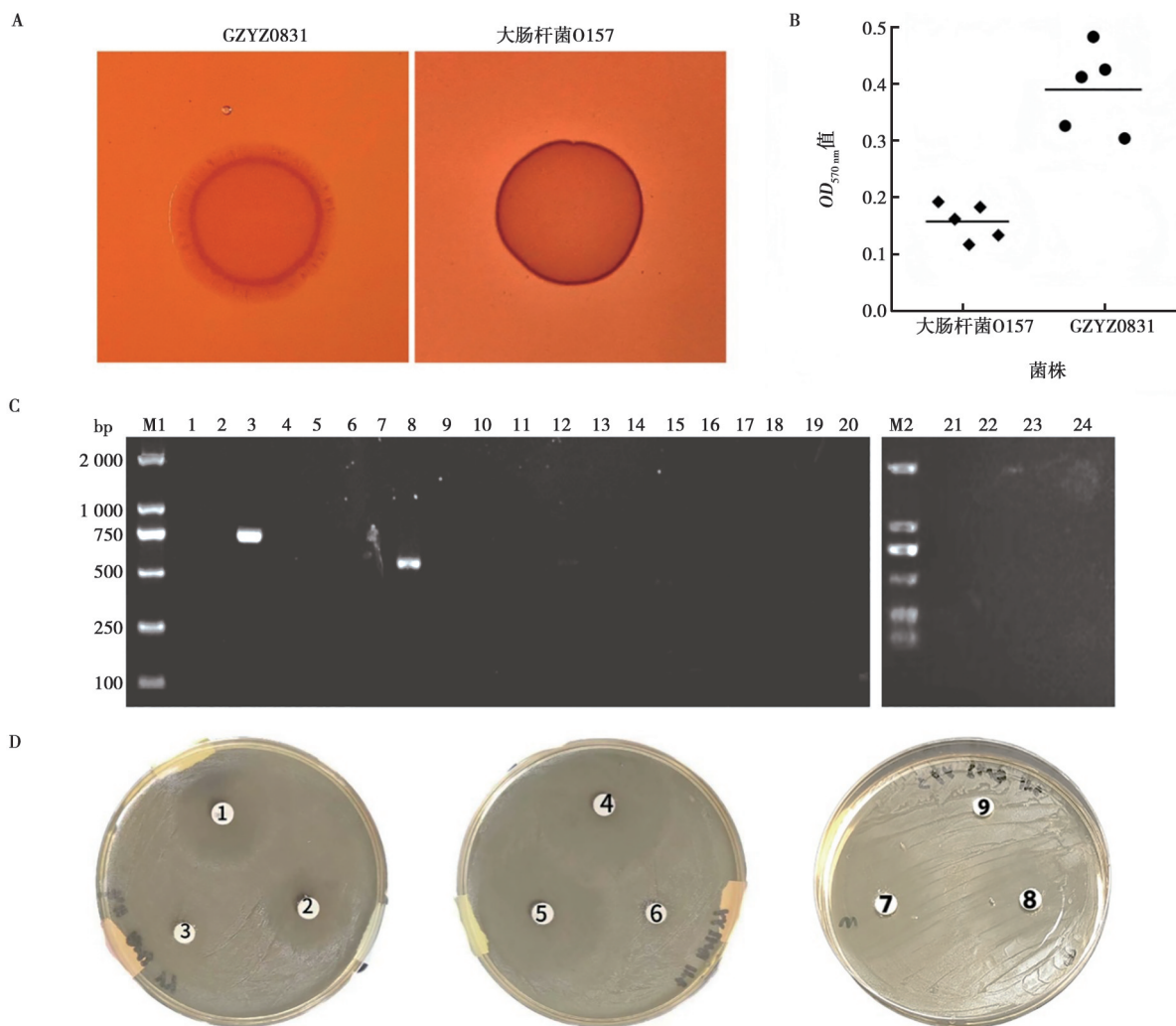


图 5 分离菌株的耐药性检测

A. 分离株 GZYZ0831 和大肠杆菌 O157 在刚果红琼脂平板上的菌落形态; B. 分离菌株的生物被膜形成能力检测; C. 分离菌株的耐药基因检测 (M1、M2. DNA Marker; 1. *blaIMP*; 2. *blaSHV*; 3. *blaTEM*; 4. *blaCTX*; 5. *blaOXA*; 6. *blaDHA*; 7. *tetC*; 8. *tetO*; 9. *tetA*; 10. *blaKPC*; 11. *blaNDM*; 12. *gyrA*; 13. *gyrB*; 14. *aadA1*; 15. *aadB*; 16. *sul1*; 17. *sul2*; 18. *ermF*; 19. *ereD*; 20. *lnuH*; 21. *blaVIM*; 22. *blaNDM*; 23、24. 阴性对照); D. 双药敏协同试验结果 (1. 头孢噻肟; 2. 头孢噻肟/克拉维酸; 3. 空白纸片对照; 4. 美罗培南; 5. 美罗培南/EDTA; 6. 空白纸片对照; 7. 头孢他啶; 8. 头孢他啶/克拉维酸; 9. 空白纸片对照)。

3 讨论

SS 是重要人畜共患传染病病原, 已有多项研究揭示了 SS 不同血清型的地区流行特征。本研究从患呼吸道疾病的病猪肺组织中分离出的 1 株优势菌进行形态观察、核酸检测和 16S rRNA 测序分析, 确定分离菌株为 SS; 血清学鉴定分离菌株为 SS3, MLST 分析为 ST117 型, 与亚洲 SS 的分子流行病学数据一致^[27-29]。2022 年, 黄晓慧等^[30]首次报道了 ST117 型 SS, 目前已报道的 ST117 型猪 SS3 的菌株均来源于猪, 主要分布在亚洲地区。关于 ST117 型 SS3 的流行病学调查、致病机理以及耐药特征等有待进一步系

统、深入研究。

SS 具备多元的致病能力, 其毒性机制大致可分为 4 大类别: 细菌外表的组成部分或分泌蛋白、各类酶、转录调控因子或调控体系和运输蛋白或分泌途径的相关因子。本研究分离的 ST117 型菌株携带 *Tbp*、*mrp*、*GAPDH*、*orf2* 和 *sao* 这 5 种毒力基因。在动物试验中, 人工感染的小鼠出现显著病变, 包括小鼠脑膜炎、多器官出血、组织显著病变, 这与自然发病猪只出现的神经症状、器官出血的临床症状相一致。分离株 GZYZ0831 可以引起小鼠死亡; 病理组织学分析发现, 感染小鼠的脏器出现包含肝脏出血、肝细胞脂肪沉积和细胞质空化的病理变化, 这可能与分离菌株

携带的毒力基因 *mrp* 和 *GAPDH* 以及菌株的 α 溶血特性紧密相关,也进一步验证了分离菌株具有一定的致病性。

tetO 基因为 SS 较常见携带的耐药基因^[31]。韩宁等^[32]对广东地区 40 株 SS 的耐药基因检测后,发现其中四环素耐药基因 *tetO* 检出率为 35%;而王佳煜^[33]对四川地区 62 株 SS 的耐药基因检测结果发现,四环素类耐药基因 *tetO* 的检出率为 79.03%。研究发现,SS 不同血清型携带的四环素类耐药基因 (*tetM*、*tetO*、*tetL*) 并不相同;我国大部分地区的 SS2 对四环素类药物耐药主要由 *tetM* 基因介导,而 SS9 对四环素类药物耐药主要由 *tetO* 基因介导^[34]。毛从剑等^[35]研究表明 SS3 介导四环素耐药的耐药基因可能与 SS9 相似。本研究分离出的猪链球菌血清型 3 型菌株携带耐药基因 *tetO*,与上述研究结果一致。*blaTEM* 基因在 SS 中并不常见,赵志慧等^[36]的研究发现,SS 对 β -内酰胺类药物呈现出中高度敏感,而分离菌株从耐药基因筛查出 *blaTEM* 基因,且在抗生素敏感试验中对 β -内酰胺类药物表现出中高度耐药,表明该菌株是不常见的对 β -内酰胺类药物耐药的菌株。分离菌株仅携带 *blaTEM* 与 *tetO* 两种耐药基因,但抗生素敏感性试验证实分离菌株对 17 余种抗生素耐药,为多重耐药菌株。这种表型与基因型之间的差异可能和链球菌的细胞壁对氨基糖苷类药物通透性很低、单一基因的多效性以及染色体基因突变相关^[37-38],加上分离菌株具有中等生物被膜形成能力,在一定程度上增加了分离菌株的耐药性。

MBL 和 ESBL 都是能够水解 β -内酰胺类抗生素的酶。MBL 是分子上最多样化的碳青霉烯酶,能够利用活性位点中的金属离子辅助因子水解大多数 β -内酰胺类抗生素(包括碳青霉烯类)。当 ESBL 带来的耐药性不足时,MBL 的出现会导致更为严重的耐药情况。研究发现,产 MBL 的耐药菌株是多重耐药菌中最危险的类型之一,其危害涉及患者、医疗系统及全球公共卫生多个层面。产 MBL 的碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染人和动物的死亡率显著高于普通感染^[39]。分离株 GZYZ0831 为 MBL 阳性菌株,但与 MBL 相关的耐药基因 *blaIMP*、*blaVIM* 和 *blaNDM* 检测均为阴性,分析原因可能与菌株携带新型或罕见 MBL 基因相关,比如 *GIM-1*、*SIM-1*、*SPM-1*、*AIM-1* 等亚型基因^[40];分离菌株为产 MBL 的多重耐药菌株,具有中等生物被膜形成能力,其表现的高适应性和多重耐药性在临床上需引起高度重视,关于其复杂的耐药机制需结合基因组测序和耐药调控等方法进行深入研究。

中药凭借其丰富的药用资源及较低的耐药诱导特

性,在抗微生物感染与机体免疫调节领域展现出独特价值。Li 等^[41]研究发现黄连乙醇提取物对 SS 具有显著抑菌性;陈俭清等^[42]发现大黄、黄芩水提物对 SS 生物膜形成抑制率分别达到 68.5% 和 72.3%;冯沙沙等^[43]证实黄柏、丹参等 29 味中药提取物对 SS 分离株具有显著生长抑制作用。研究发现,黄连、板蓝根等药材对 ST117 型 SS3 GZYZ0831 菌株表现出一定的抑菌效应,药效差异可能与药材基源、产地生态环境、采收加工方法及菌株致病力差异等因素相关。需要指出的是,现阶段研究主要集中于体外抗菌活性评价,后续拟系统开展复方配伍优化、生物膜清除机制及中西药协同效应研究,以期构建基于传统医药理论的耐药链球菌感染防控体系提供理论依据。

4 结论

本试验从病猪肺组织中分离出 1 株血清 3 型,ST117 型 SS,携带 *Tbp*、*mrp*、*GAPDH*、*orf2* 和 *sao* 这 5 种毒力基因,具有 α 型溶血活性;感染小鼠可导致小鼠神经症状,内脏器官出现严重病变,具有一定的致病性。分离菌株为产 MBL 的耐药菌株,携带 *tetO* 和 *blaTEM* 耐药基因,对庆大霉素、卡那霉素、阿奇霉素、克拉霉素等 17 种药物耐药;中药板蓝根和黄连对分离菌株均有抑菌作用。研究结果为 SS3 的分子流行病学调查和致病机制研究提供一定的理论依据,也为猪链球菌病的防控和精准治疗提供借鉴。

参考文献:

- [1] DUTKIEWICZ J, SROKA J, ZAJAC V, et al. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology [J]. Ann Agric Environ Med, 2017, 24 (4): 683-695.
- [2] WERTHEIM H F L, NGHIA H D T, TAYLOR W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48 (5): 617-625.
- [3] SEGURA M. *Streptococcus suis* research: progress and challenges [J]. Pathogens, 2020, 9 (9): 707.
- [4] 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.
- [5] 李繁,彭泽仁,刘荣启,等.猪链球菌检测技术研究进展[J].微生物学报,2025,65(3):883-897.
- [6] 姜合祥.猪链球菌 2 型烯醇化酶刺激脑微血管内皮细胞 RPSA 蛋白的异位表达及膜复合体的发生[D].长春:吉林大学,2021.
- [7] SEGURA M, ARAGON V, BROCKMEIER S L, et al. Update on *Streptococcus suis* research and prevention in the era of antimicrobial restriction: 4th international workshop on *S. suis* [J]. Pathogens,

- 2020, 9 (5): 374.
- [8] 陈经雕, 刘美真, 柯碧霞, 等. 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.
- [9] 胡群. 猪链球菌 2、3、7 和 9 型分型方法的建立与共有免疫原的筛选 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [10] ISHIDA S, TIEN L H T, OSAWA R, et al. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis* [J]. J Microbiol Meth, 2014, 107: 66-70.
- [11] 徐引弟, 孙帅杰, 王治方, 等. 河南省猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (2): 501-509.
- [12] KING S J, LEIGH J A, HEATH P J, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (10): 3671-3680.
- [13] 潘建刚, 张华伟, 陈波, 等. 猪链球菌 2 型的分离鉴定及致病性试验 [J]. 中国兽药杂志, 2020, 54 (8): 14-19.
- [14] SMITH H E, BUIJS H, WISSELINK H J, et al. Selection of virulence-associated determinants of *Streptococcus suis* serotype 2 by in vivo complementation [J]. Infect Immun, 2001, 69 (3): 1961-1966.
- [15] OLIVEIRA S, PIJOAN C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. Vet Microbiol, 2004, 99 (1): 1-12.
- [16] KIM J, CHUNG H K, JUNG T, et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms [J]. J Vet Med Sci, 2002, 64 (1): 57-62.
- [17] HUONG V T L, HA N, HUY N T, et al. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20 (7): 1105-1114.
- [18] 李翠萍, 吴民耀, 王宏元. 3 种半数致死浓度计算方法之比较 [J]. 动物医学进展, 2012, 33 (9): 89-92.
- [19] SCHERRER S, ROSATO G, SPOERRY SERRANO N, et al. Population structure, genetic diversity and pathotypes of *Streptococcus suis* isolated during the last 13 years from diseased pigs in Switzerland [J]. Vet Res, 2020, 51 (1): 85.
- [20] LIANG P, WANG M, GOTTSCHALK M, et al. Genomic and pathogenic investigations of *Streptococcus suis* serotype 7 population derived from a human patient and pigs [J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10 (1): 1960-1974.
- [21] JIANG F, GUO J, CHENG C, et al. Human infection caused by *Streptococcus suis* serotype 2 in China: report of two cases and epidemic distribution based on sequence type [J]. BMC Infect Dis, 2020, 20 (1): 223.
- [22] 廖虹瑜, 罗隆泽, 曾林子, 等. 2006—2016 年四川省猪链球菌血清 2 型多位点序列分型分析 [J]. 疾病监测, 2017, 32 (7): 544-547.
- [23] TAN J H, YEH B I, SEET C S R. Deafness due to haemorrhagic labyrinthitis and a review of relapses in *Streptococcus suis* meningitis [J]. Singapore Med J, 2010, 51 (2): e30-e33.
- [24] HE Z, PIAN Y, REN Z, et al. Increased production of sulfolysin contributes to invasive infection of the *Streptococcus suis* strain 05ZYH33 [J]. Mol Med Rep, 2014, 10 (6): 2819-2826.
- [25] 马建凤, 刘华钢, 朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33 (1): 42-45.
- [26] 张赛奇, 王米, 杨锐乐, 等. 15 种中药对猪大肠杆菌的体外抑菌试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015 (3): 163-165.
- [27] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定 [J]. 南京农业大学学报, 1999, 22 (2): 67.
- [28] WISSELINK H J, JOOSTEN J J, SMITH H E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (8): 2922-2929.
- [29] 胡云皓, 佟仁冬, 辛凌翔, 等. 猪链球菌 2 型的主要毒力因子与先天性免疫逃逸机制 [J]. 中国兽医杂志, 2024, 60 (10): 98-105.
- [30] 黄晓慧, 韩雪姣, 刘雪兰, 等. 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.
- [31] 刘宝玲, 楚品品, 李春玲, 等. 猪链球菌临床分离株对四环素类抗生素的耐药性和耐药基因分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49 (7): 2796-2804.
- [32] 韩宁, 李杰, 陈佳文, 等. 广东省某猪场链球菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (7): 1405-1410.
- [33] 王佳煜. 四川地区猪链球菌的分离鉴定及部分生物学特性分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- [34] 关琳, 王丹丹, 祝昊丹, 等. 猪链球菌 9 型分离株的耐药性及耐药基因分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35 (11): 1015-1020.
- [35] 毛从剑, 曹冶, 于吉锋, 等. 猪链球菌 3 型的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024 (14): 74-80, 126.
- [36] 赵志慧, 李艳华. 猪链球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2008, 42 (6): 50-53.
- [37] 徐叔云. 中华临床药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [38] HAENNI M, LUPO A, MADEC J Y. Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp [J]. Microbiol Spectr, 2018, 6 (2). DOI:10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017.
- [39] GRABEIN B, ARHIN F F, DAIKOS G L, et al. Navigating the current treatment landscape of metallo- β -lactamase-producing gram-negative infections: what are the limitations [J]. Infect Dis Ther, 2024, 13 (11): 2423-2447.
- [40] BONOMO R A. β -lactamases: a focus on current challenges [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7 (1): a025239.
- [41] LI Y H, ZHOU Y H, REN Y Z, et al. Inhibition of *Streptococcus suis* adhesion and biofilm formation *in vitro* by water extracts of *rhizoma coptidis* [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 371.
- [42] 陈洁清, 周永辉, 杨艳北, 等. 中药水提物对体外猪链球菌生物被膜作用的试验 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52 (11): 14-16.
- [43] 冯沙沙, 宋鹏琰, 翟福展, 等. 42 种常见中药对猪链球菌的体外抑菌试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医 (下半月), 2017 (12): 131-133.