

## 研究报告

## 猪源链球菌溶血性的检测\*

陈国强\*\* 陆承平\*\*\* 姚火春

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

**摘要:** 用平板法和上清法检测了 19 株猪源链球菌的溶血性, 并通过加入还原剂或氧化剂分别作活化和抑制试验, 对各菌株溶血素的性质做了初步鉴定。其中 8 株猪链球菌 2 型菌株在血平板上的溶血性较弱, 仅为  $\alpha$  溶血或弱  $\beta$  溶血, 但在 THB 和 5% 血清 THB 中都可产生很强的溶血性, 其溶血性可被还原剂活化, 被氧化剂和胆固醇所抑制, 卵磷脂对其活性则没有影响, 属于巯基活化类 (类 SLO) 溶血素。9 株马链球菌兽疫亚种菌株在血平板上呈显著的  $\beta$  溶血, 在不含血清 THB 中不能产生溶血性, 在含血清的 THB 中可产生较强的溶血性, 其活性不被还原剂活化, 不被氧化剂抑制, 胆固醇能抑制大部分活性, 卵磷脂则可全部抑制, 属于类 SLS 溶血素。两株非典型兰氏 C 群链球菌菌株在血平板上呈显著的  $\beta$  溶血, 在 THB 中显示了非常强的溶血性, 其活性不被还原剂活化、不被氧化剂抑制或卵磷脂抑制, 但被胆固醇强烈抑制, 属于非 SLO、非 SLS 溶血素。

**关键词:** 猪链球菌 2 型、马链球菌兽疫亚种, 溶血性, 检测

**中图分类号:** S858.285.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0001-04

## HEMOLYSIN EXAMINATION OF SWINE STREPTOCOCCAL ISOLATES

CHEN Guo-Qiang LU Cheng-Ping YAO Huo-Chun

(Key Lab of Animal Disease Diagnostics and Immunology, Ministry of Agriculture,  
Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095)

**Abstract:** The hemolysin production of 19 strains of *Streptococcus* spp. isolated from pigs in the Jiangsu and Shanghai regions in recent years were examined. Eight isolates of *Streptococcus suis* type 2 from Jiangsu showed weak hemolysis on blood agar, but a stronger reaction in Todd-Hewitt broth (THB). The hemolysin belonged to the group of thiol-activated hemolysins. Nine strains of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* showed strong hemolysis on blood agar and in THB containing 5% new-born calf serum, but no hemolysis in THB alone. This hemolysin was similar to streptolysin S (SLS). Another two isolates were atypical members of Lancefield group C *Streptococcus* and showed strong hemolysis on blood agar and in THB with 5% new-born calf serum, but the hemolysin was unlike either streptolysin O or SLS.

**Key words:** *Streptococcus suis* type 2, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, Hemolysin, Examination

猪链球菌病危害严重<sup>[1~3]</sup>, 是多年来一直困扰我国养猪业的主要传染病之一<sup>[4]</sup>。1998 年夏, 江苏某地猪群暴发了猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2) 引致的急性败血性传染病, 死亡率达 39.7%, 造成了巨大的经济损失, 并对人民健康造成了严重威

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970558)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970558)

上海市农委资助项目

\*\* 现工作单位: 江苏出入境检验检疫局技术中心动物检疫实验室, 210001

\*\*\* 联系人

收稿日期: 2001-08-13, 修回日期: 2001-11-30

肋<sup>[5,6]</sup>。本试验在对近几年从江苏和上海地区分离的猪源链球菌的溶血活性进行了检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

从江苏、上海等地的病猪分离猪源链球菌 13 株、1 株猪链球菌 2 型参考菌株 SS2-D (德国吉森大学 Baljer 教授惠赠)、5 株马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*) 菌株, 后者属链球菌兰氏 (Lancefield) 分群 C 群, 系从患败血症死亡的病猪分离, 其中 ATCC35246 (以下简称 35246), 购自美国菌种保藏中心, 其余 4 株由上海市畜牧兽医站提供。菌株来源等参见表 2。

### 1.2 培养条件对马链球菌兽疫亚种溶血素产量的影响

挑取 35246 单菌落, 接种于 THB, 37℃ 静置培养 18~24h 制成种子液。试验时按 1% 的比例移种至不同培养基中, 置不同条件下培养。溶血价的测定按文献 [6] 的方式进行 (下同)。

**1.2.1 血清浓度:** 将种子液分别接种于 THB、2% 血清 THB (含 2% 犍牛血清的 THB, 下同) 和 5% 血清 THB, 置 37℃ 静置培养 12h 测溶血价。

**1.2.2 培养基和培养时间:** 将种子液分别接种于 5% 血清 THB、5% 血清营养肉汤 (NB)、5% 血清马丁肉汤 (MB), 置 37℃ 静置培养, 接种后 6, 12, 18, 24, 30, 36 和 48h 分别取样测溶血价。

**1.2.3 酸碱度:** 将种子液分别接种于 pH 为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 8.5 的 5% 血清 THB, 37℃ 静置培养 12h, 测溶血价。

**1.2.4 气体环境:** 将种子液接种至 5% 血清 THB (pH 为 7.5) 后, 分别在振荡通气 (110r/min) 及静置气体环境下培养 12h, 测溶血价。

### 1.3 猪源链球菌溶血性的检测

**1.3.1 鲜血琼脂平板法:** 将各菌株划线接种于 5% 兔鲜血琼脂平板, 置 37℃ 培养 24h 后观察结果。菌落周围出现溶血圈者, 判为溶血阳性。

**1.3.2 上清法:** 按照 1.2 部分确定的条件和文献 [7] 报道的方法, 分别检测马链球菌兽疫亚种和猪链球菌 2 型的溶血素, 即将各待测菌株接种于 THB 中, 于 37℃ 培养 18~24h 制成种子液, 然后按 1% 的接种量分别接种于 THB 和含 5% 犍牛血清的 THB 中, 置 37℃ 培养 12h 后测血价。

**1.3.3 溶血素的活化和抑制试验:** 在各菌株 5% 犍牛血清 THB 培养液上清中分别加入还原剂二硫代苏糖醇 (DTT) (上海大境生化制品经营部)、氧化剂过氧化氢 (南京金陵化工厂)、溶血抑制剂胆固醇 (上海生物化学试剂公司)、卵磷脂 (华东师范大学化工厂), 使之终浓度分别为 5mmol/L, 0.1% (v/v), 100g/mL, 100g/mL 置室温 (25℃) 作用 30 min 后, 分别测溶血价。

## 2 结果

### 2.1 培养条件对马链球菌兽疫亚种溶血素产量的影响

**2.1.1 血清浓度:** 35246 在 THB、2% 血清 THB 和 5% 血清 THB 中的溶血价分别为 0、32 和 64。

**2.1.2 培养基和培养时间:** 培养基的种类对溶血素产量影响极大, 在 5% 血清 THB 中

最高, 达 64, 其次为 5% 血清 MB, 达 16, 5% 血清 NB 中最低, 仅为 4。培养时间对溶血素的产量影响也很大, 其产量在接种后 12h, 达到高峰 (表 1)。

**2.1.3 酸碱度:** 35246 在 pH 为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 8.5 的 5% 血清 THB 中的溶血价分别为 8, 16, 64, 32, 16 和 4, 可见 pH 为 7.5 时, 溶血价最高。

**2.1.4 气体环境对溶血素产量的影响:** 在静置条件下培养溶血价为 64, 而在振荡通气条件下, 溶血价仅为 16。

2.2 猪源链球菌溶血性检测结果

所有 7 株猪链球菌 2 型菌株在血平板上的溶血性较弱, 仅为  $\alpha$  或弱  $\beta$  溶血, 但在 THB 和 5% 血清 THB 中都可产生很强的溶血性; 其溶血性可被还原剂活化, 被氧化剂和胆固醇所抑制, 卵磷脂对其活性则没有影响。9 株马链球菌兽疫亚种菌株在血平板上的溶血性很强, 呈显著的  $\beta$  溶血, 在不含血清 THB 中不能产生溶血性, 在含血清的 THB 中可产生较强的溶血性, 其活性不被还原剂活化, 不被氧化剂抑制, 被胆固醇抑制大部分活性, 而被卵磷脂全部抑制。非典型 C 群链球菌上海分离株 SH0066531 和 SH0066532 在血平板上呈显著的  $\beta$  溶血, 在液体培养条件下显示了非常强的溶血性, 溶血价达 512, 而且其活性不被还原剂活化、不被氧化剂抑制, 也不被卵磷脂抑制, 但被胆固醇强烈抑制。检测结果见表 2。

表 2 猪源链球菌溶血素检测结果

菌株	血清群/型	血平板	THB 培养		添加活化剂或抑制剂				菌株来源
			THB	THB (5% 血清)	DTT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	胆固醇	卵磷脂	
HA9801	2	+	128	128	256	0	0	128	江苏
HA9802	2	+	128	128	256	0	0	128	江苏
HA9803	2	+	128	128	256	0	0	128	江苏
HA01	2	+	64	64	128	0	0	64	江苏
RC9901	2	+	64	128	256	0	0	64	江苏
RC9902	2	+	64	64	128	0	0	64	江苏
SS2-D	2	+	32	32	64	0	0	32	德国
SH006444	2	+	32	32	64	0	0	32	上海
SH0066531	非典型 C	+	32	512	512	512	0	512	上海
SH0066532	非典型 C	+	32	512	512	512	0	512	上海
SH006431B1	C	+	0	32	32	32	4	0	上海
SH006431B2	C	+	0	32	32	32	4	0	上海
ATCC35246	C	+	0	64	64	64	8	0	四川
C55166	C	+	0	64	64	64	8	0	中监所
C55127	C	+	0	64	64	64	8	0	中监所
C55126	C	+	0	64	64	64	16	0	中监所
C94-1	C	+	0	32	32	32	8	0	中监所
ST171	C	+	0	64	64	64	8	0	弱毒疫苗
JS01	C	+	0	64	64	64	8	0	江苏

### 3 讨论

很多链球菌都可产生溶血素,其中A群链球菌溶血素的研究较深入。A群链球菌可产生两种溶血素,一种对氧敏感,遇氧失活,称为SLO (Streptolysin O),另一种对氧不敏感,称为SLS (Streptolysin S)。SLO能被胆固醇强烈抑制,SLS只在含有SLS诱生剂如血清、RNA的培养基中才能产生,SLS被胆固醇抑制部分活性,被卵磷脂和台盼蓝强烈抑制<sup>[8-10]</sup>。根据本试验溶血素检测的结果,可判定本试验所测的8株猪链球菌2型菌株的溶血素属于巯基活化类(类SLO)溶血素,9株马链球菌兽疫亚种菌株所产生的溶血素属于类SLS,还有两株非典型C群链球菌所产生的溶血素属于非SLO、非SLS溶血素。

马链球菌兽疫亚种曾经是我国猪链球菌病的主要病原,但其产生的溶血素属于何种类型的溶血素,一直未见报道。本试验表明,马链球菌兽疫亚种猪分离株溶血素属于类SLS溶血素,与Suzuki报道<sup>[11]</sup>的马链球菌兽疫亚种松鼠分离株以及Flangan报道<sup>[12]</sup>的马链球菌马亚种的溶血素的一致。尽管马链球菌兽疫亚种的3个菌株35246、JS01和ST171的毒力差异很大,对小鼠的LD<sub>50</sub>分别为10<sup>4.0</sup>、10<sup>5.5</sup>和10<sup>7.3</sup>(待发表资料),但本试验发现它们在血平板上和液体培养基中的溶血性都没有明显差异,提示该菌除溶血素外,可能还有其它重要致病因子。

溶血素是细菌一种常见的致病因子,对其进行准确、快速的检测,具有很大的实际意义。溶血素检测方法最常用的为平板法和上清法。平板法是一种最简便的方法,但具有很大的局限性。例如,猪链球菌2型在血平板上的溶血性比马腺疫链球菌兽疫亚种弱很多,但在各自最合适的液体培养条件下,两者的溶血性差不多,甚至前者比后者还要强。上清法是检测细菌胞外溶血素的另一种常用的方法,可对溶血素的含量进行准确的测定。但由于培养条件对溶血素的产量具有很大甚至决定性的影响,因此,一定要根据不同的细菌,选择产生溶血素的最佳培养条件,这样所得的检测结果才有意义。

### 参考文献

- [1] Touil F, Higgin R, Nadeau M. Microbiol, 1988, 17: 171 ~ 177.
- [2] Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, et al. J Vet Med Sci 1993, 55 (4): 623 ~ 626.
- [3] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: Past Res Commun, 1997, 21: 381 ~ 407.
- [4] 蔡宝祥主编. 家畜传染病学(第3版). 北京: 中国农业出版社, 1996. 131 ~ 133.
- [5] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 南京农业大学学报, 1999, 22 (2): 67 ~ 70.
- [6] 胡晓抒, 朱凤才, 汪 华, 等. 中华预防医学杂志, 2000, 34 (3): 150 ~ 153.
- [7] 陈国强, 姚火春, 陆承平. 南京农业大学学报, 2000, 23 (3): 71 ~ 75.
- [8] Halbert S P. Microbial toxins. Academic Press, 1970, 3: 69 ~ 100.
- [9] Ginsberg S. In Microbial toxins. Academic Press, 1970, 3: 103 ~ 107.
- [10] 雷祚荣主编. 细菌毒素分子生物学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 106 ~ 108.
- [11] Suzuki J, Yoshihara E, Kobayashi S, et al. Kansenshogaku Zasshi, 1995, 69 (3): 327 ~ 332.
- [12] Flanagan J, Collin N, Timoney J, et al. Microb Patho, 1998, 24 (4): 211 ~ 221.