

研究报告

猪链球菌 2 型不同 *mrp* 基因型与毒力的关系

杜德超 于岩飞 马彩凤 姚火春 陆承平 张炜*

(南京农业大学动物医学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是重要的人畜共患病病原,且有强弱毒株之分,但至今仍缺少合适的毒力标志基因来鉴定致病性 SS2。本文旨在研究 *mrp* 基因型与 SS2 毒力的关系。【方法】通过 PCR 方法鉴定不同 SS2 菌株的 *mrp* 基因型。再通过“内标”化的斑马鱼感染模型和实时荧光定量 PCR,分别测定不同 *mrp* 基因型菌株的毒力水平和 *mrp* 转录水平。【结果】根据 PCR 结果可将 53 株 SS2 分为 *mrp*-A 型(27 株)和 *mrp*-B 型(26 株)两种基因型;*mrp*-A 型菌株比 *mrp*-B 菌株毒力偏强,且 A 型菌株中 *mrp* 转录水平更高。【结论】发现 *mrp* 基因在 SS2 中分布广泛,但不同菌株中 *mrp* 基因型不同,*mrp*-A 型菌株的致病力更强。而且,以 *mrp* 非保守区域作为诊断靶点能有效鉴定 SS2 强毒株。

关键词: 猪链球菌 2 型, *mrp* 基因型, 毒力

Genotype of *mrp* and its relationship with the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2

DU De-Chao YU Yan-Fei MA Cai-Feng YAO Huo-Chun
LU Cheng-Ping ZHANG Wei*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) is an important zoonotic pathogen, showing high diversity in virulence in different strains. Lacking suitable target(s) has, to date, hindered evaluation of virulence in SS2. Therefore, we investigated the relationship between the genotype of *mrp* and the virulence of SS2. [Methods] Different genotypes of *mrp* were identified by PCR; Virulence of SS2 strains was evaluated by internally standardized zebrafish model; and the transcription level of *mrp* in different strains was evaluated by real time PCR (quantitative PCR, qPCR). [Results] Two genotypes, named *mrp*-A (27 strains) and *mrp*-B (26 strains), were identified in 53 SS2 strains. Strains belonged to genotype *mrp*-A showed stronger virulence and higher transcription level of *mrp* than *mrp*-B strains. [Conclusion] *mrp* was widespread but various in different SS2 strains;

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31322054); Program for New Century Excellent Talents in University of Ministry of Education of China (No. NCET-110671); The Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese Ministry of Agriculture (No. 201303041)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-25-84395328; E-mail: vszw@njau.edu.cn

Received: March 20, 2015; Accepted: May 13, 2015; Published online (www.cnki.net): June 25, 2015

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金项目(No. 31322054); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-110671); 农业部行业公益性专项项目(No. 201303041)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-25-84395328; E-mail: vszw@njau.edu.cn

收稿日期: 2015-03-20; 接受日期: 2015-05-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-25

and *mrp*-A strains tended to be highly pathogenic. Furthermore, the non-conservative region of *mrp* could be a virulence-marker for SS2.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Genotype of *mrp*, Virulence

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种重要的人畜共患病病原,可引起人和猪的多种疾病,包括脑膜炎、关节炎、心内膜炎和败血症等,严重时可能造成突然死亡^[1-2]。33个血清型(1/2、1-31、33)中,猪链球菌2型(SS2)流行最广,致病力最强^[3-4]。1998年和2005年,分别在中国江苏和四川暴发人感染猪链球菌事件,并分别导致死亡14例和38例^[5]。SS的致病机理由多种毒力相关因子共同作用,其致病机理至今仍不明确^[6]。猪链球菌,甚至SS2,在健康猪群中普遍存在。有报道称,不同SS2菌株的致病力存在差异^[7-9],如何辨别不同SS2菌株的毒力成为难题。

有研究表明,溶菌酶释放蛋白(MRP)、细胞外因子(EF)、溶血素(SLY)为SS毒力因子^[10-13],*mrp*、*ef*和*sly*常一起被用作鉴定SS毒力的靶基因^[14-15]。针对*mrp*、*cps2*和*orf2*的三重PCR技术已作为国家标准(GBT19915.4-2005)来鉴定致病性的SS2。该标准中,*mrp*被用作毒力相关基因,并以是否含有*mrp*基因作为判断SS2是否有毒力的依据。但另有研究表明,*mrp*基因在不同毒力水平SS菌株中均有发现^[16]。所以*mrp*基因能否作为毒力标志物有待进一步考证。

另外,猪链球菌毒力评价缺乏统一的动物模型。SPF猪模型^[17]、斑马鱼模型^[18]、小鼠模型^[19-20]均被报道应用到SS毒力评价体系中。但是SPF猪价格昂贵,各品系的小鼠能否作为SS2的动物模型存在争议^[21]。另外,不同批次购买的斑马鱼活力状况无法完全统一,且对斑马鱼攻毒途径不同,都将导致斑马鱼实验结果出现差异^[18,22],从而失去可比性。如何解决动物模型问题是研究SS2毒力的瓶颈之一。本研究应用“内标”化的斑马鱼毒力评价模型,对含有不同*mrp*基因型的SS2菌株进行毒力检测,分析不同*mrp*基因型与SS2毒力的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及培养条件:综合考虑菌种的分离时间和地域跨度,从本实验室菌种库中挑选出53株SS2菌株应用于研究,其中包括对猪无致病力的参考菌株T15^[23]和强毒参考菌株ZY05719^[24]。ZY05719分离自四川大流行的病猪,并经过人工感染猪已验证为强毒(结果未发表)。菌株详情见表1。使用含有7%无菌绵羊血的THB琼脂糖固体培养基,于37℃静置培养,实现菌种的初步复苏;使用液体THB培养基,37℃、180 r/min摇床培养,实现菌株增殖。

1.1.2 主要试剂与仪器:Todd-Hewitt Broth (THB)为美国BD公司产品;无菌绵羊血、Premix TaqTM、基因组提取试剂盒等购自大连TaKaRa宝生物工程有限公司;RNA反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Ultrospec 2000型紫外分光光度计购自Bio-Rad公司;实时PCR 7300系统购自ABI公司。

1.2 不同 SS2 菌株中 *mrp* 基因同源性分析

从NCBI数据库检索猪链球菌2型*mrp*基因序列(GenBank: X64450)^[25],以及SS2菌株05ZYH33、98HAH33、GZ1、SC84、P1/7、A7、S735、05HAS68、SC070731、T15中的*mrp*基因序列(表2),使用DNAMAN软件进行序列比对,获得*mrp*序列在各个菌株中的高度同源区域和差异区域。

1.3 PCR 检测 *mrp* 基因在 SS2 菌株中的分布

根据*mrp*同源性分析结果,以*mrp*基因100%同源区域为模板设计引物*mrp*-1,以差异区域为模板设计引物*mrp*-2(表3)。

按照细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明,提取53株SS2菌株的基因组,并以此为模板进行PCR,鉴定不同SS2的*mrp*基因型。PCR反应体系:2×Premix TaqTM 12.5 μL,正反向引物(10 μmol/L)各

表 1 SS2 菌株信息以及 PCR 结果
Table 1 Details of SS2 strains and the results of PCR

菌株 Strains	血清型 Serotype	PCR results		来源 Source	菌株 Strains	血清型 Serotype	PCR results		来源 Source
		<i>mrp</i> -1	<i>mrp</i> -2				<i>mrp</i> -1	<i>mrp</i> -2	
hb1005	2	+	+	Hebei	HN07137	2	+	-	2007, Henan
SS2	2	+	+	Jiangsu	HN075231	2	+	-	2007, Henan
HA9801	2	+	+	1998, Jiangsu	HN08324	2	+	-	2008, Henan
HA9803	2	+	+	1998, Jiangsu	HZ060601	2	+	-	Hangzhou
88B	2	+	+	Guangdong	JX071101	2	+	-	2007, Jiaying
HA0608	2	+	+	Haian	JX071201	2	+	-	2007, Jiaying
hb1002	2	+	+	Hebei	JX071204	2	+	-	2007, Jiaying
hb1007	2	+	+	Hebei	JX080302	2	+	-	2008, Jiaying
hb1008	2	+	+	Hebei	JX081202	2	+	-	2008, Jiaying
JX071102	2	+	+	2007, Jiaying	JX0908001	2	+	-	2009, Jiaying
JX081105	2	+	+	2008, Jiaying	JX0908004	2	+	-	2009, Jiaying
LP090401	2	+	+	2009, Linping	JX0908005	2	+	-	2009, Jiaying
JR05730	2	+	+	2005, Jiangsu	JX0908006	2	+	-	2009, Jiaying
XS06033	2	+	+	2006, Xiaoshan	JX0908008	2	+	-	2009, Jiaying
GH05458	2	+	+	2005, Sichuan	zjhn090701	2	+	-	2009, Haining
ZY05721	2	+	+	2005, Sichuan	zjhn090703	2	+	-	2009, Haining
YJ05465	2	+	+	2005, Sichuan	zjhn090704	2	+	-	2009, Haining
ZG05464	2	+	+	2005, Sichuan	zjhn090706	2	+	-	2009, Haining
CHZ05806-1	2	+	+	Anhui	LP090106	2	+	-	2009, Linping
JDZ05802-1	2	+	+	Jiangxi	LP090402	2	+	-	2009, Linping
JXAU-SS-2	2	+	+	Jiangxi	TZ080501	2	+	-	2008, Taizhou
SS25995	2	+	+	Denmark	CZ130904	2	+	-	2013, Changzhou
SS2Xiangtan	2	+	+	Xiangtan	ZJNB115	2	+	-	Ningbo
P1/7	2	+	+	Europe	ZJ92091101	2	+	-	Zhejiang University
hb1009	2	+	-	Hebei	ZY05719	2	+	+	2005, Sichuan
hb1010	2	+	-	Hebei	T15	2	+	-	Holland
HN0104001	2	+	-	Zhejiang University					

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

1 μ L, 模板 DNA (20–50 mg/L) 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 或 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 斑马鱼实验

斑马鱼实验操作参考 Ju 等的研究^[26], 并进一步优化。选用成年斑马鱼用于研究(蓝斑马: 体长

3–4 cm; 养殖水温: 26–28 $^{\circ}$ C; 养殖密度: 15–20 鱼/L)。用前观察至少 3 d, 保证无死亡。进行正式毒力实验前, 每株 SS2 菌株需首先注射 3–5 尾斑马鱼复壮。从发病死亡的斑马鱼体内分离培养细菌, 用于正式斑马鱼毒力实验: 将对数生长期 ($OD_{600}=0.6–0.8$) 的菌株用灭菌的 PBS 洗涤并梯度稀

表 2 SS2 菌株中 *mrp* 基因信息
Table 2 Details of *mrp* in SS2 strains

菌株 Strains	位置标签 Locus tag	<i>mrp</i> 长度 Length of <i>mrp</i> (bp)
05ZYH33	SSU05_0753	3 786
98HAH33	SSU98_0755, SSU98_0756	3 772
GZ1	SSGZ1_0743	3 681
SC84	SSUSC84_0671	3 771
P1/7	SSU0706	3 771
A7	SSUA7_0703	3 771
S735	YYK_03370	3 771
05HAS68	HAS68_02020	3 399
SC070731	NJAUSS_0802	3 195
T15	T15_1254	3 405

释(10^8 – 10^4 CFU)。将斑马鱼于 90 mg/L 的 MS-222 溶液中适度麻醉(1–3 min 麻醉成功为宜),行泄殖腔注射 20 μ L 菌体悬液,每个梯度使用 15 尾斑马鱼。本研究的斑马鱼实验体系中,分别以 ZY05719 和 T15 为强、弱毒参考菌株,即“内标”。空白对照组注射 20 μ L 灭菌 PBS 缓冲液。连续 7 d 观察并记录攻毒后斑马鱼的死亡情况,根据 Reed & Muench 方法计算半数致死量(LD_{50})^[27]。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 *mrp* 在 SS2 中的转录水平

将 SS2 菌株接种于 THB 固体培养基,37 °C 静置培养后,挑取单菌落至液体 THB 培养基,37 °C、180 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.8,收集菌液。

用 TRIZOL 法提取 SS2 菌株总 RNA,经去除 DNA 反应,反转录为 cDNA。以 *mrp* 基因 100%同源区域为模板,设计实时荧光定量 PCR (qPCR)引物。以 *gapdh* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)为内参基因。使用 ABI 7300 qRT-PCR 系统,通过二步相对定量 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)法^[28],分析不同菌株中 *mrp* 基因的转录水平。qPCR 引物列于表 3。

2 结果与分析

2.1 不同 SS2 菌株中 *mrp* 序列的同源性

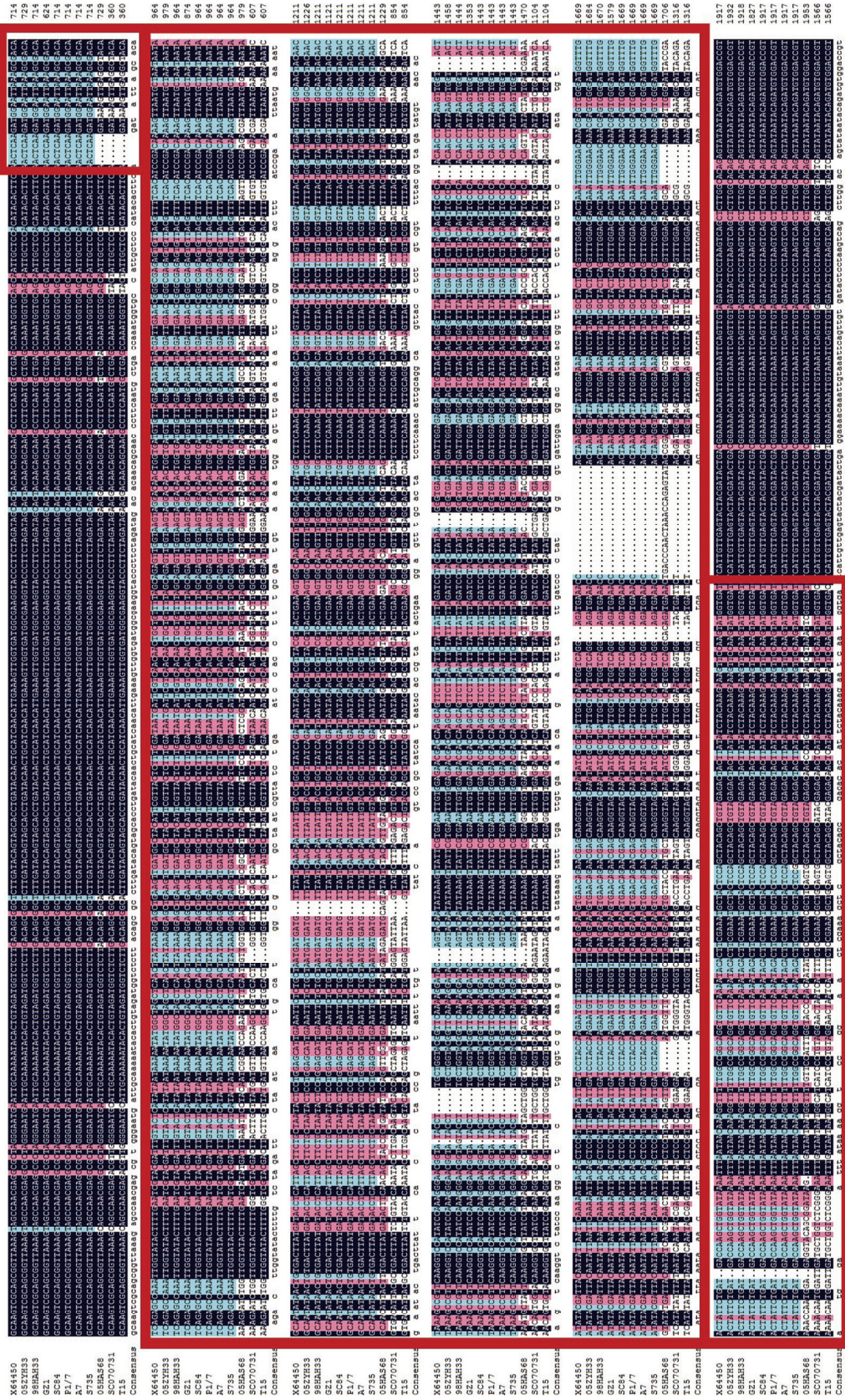
如图 1 所示,10 株 SS2 菌株中的 *mrp* 基因,其序列长度及碱基组成均存在明显差异。深蓝色表示各个序列完全一致的区域,其他颜色则表示不完全一致。图中红色框内区域颜色多变,表示各序列在该区域相似性较低,位于 *mrp* (GenBank: X64450) 编码序列的 691–1 812 位置;黄色框内深蓝色区域表示相似性为 100%的基因片段,全长 271 bp,位

表 3 本研究所用引物信息
Table 3 Primers used in this study

	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增位置 Amplification position	产物长度 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
PCR	<i>mrp</i> -1-F	ACCGTCCAAAAGTACCTTACC			
	<i>mrp</i> -1-R	TCTTCATCAACGTGGTTAGTT	2 627–2 897 ^a	271	53
	<i>mrp</i> -2-F	CGGTTCAAAAAGGATACAGTAC			
	<i>mrp</i> -2-R	AAGTGTATTTTGAACACCTGC	1 262–1 743 ^a	482	51
qPCR	q- <i>mrp</i> -F	CAACGACACCAGGAACAAATGGCG			
	q- <i>mrp</i> -R	CGGTGTATATCCTGGAACGTAAG			
	q- <i>gapdh</i> -F	ACACTGAAGACCAACTCGTATC			
	q- <i>gapdh</i> -R	CGCCATCAACTTCGATAACTTTAG			

注: ^a: 在 *mrp* 基因(GenBank: X64450)中的扩增位置。

Note: ^a: Amplification position in gene *mrp* (GenBank: X64450).



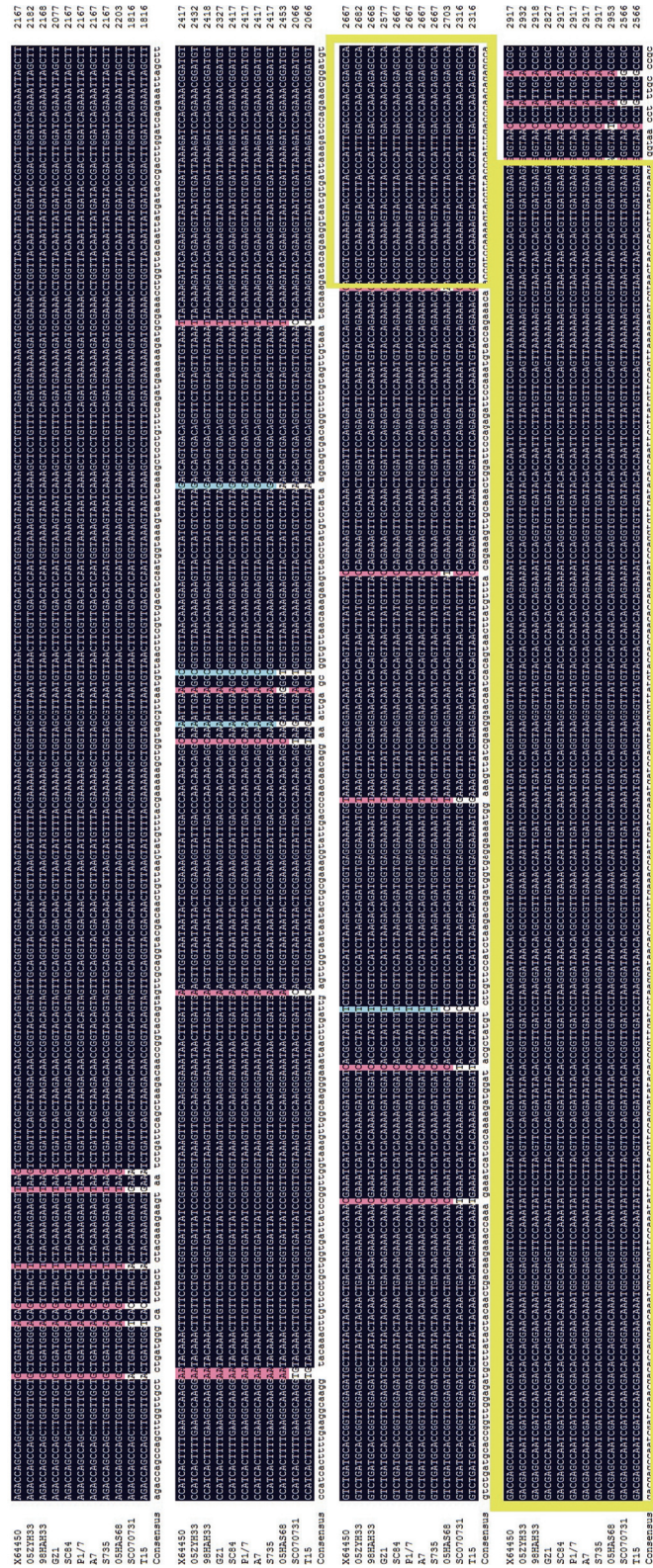


图 1 不同 SS2 菌株中 *mrp* 序列的同源性分析
 Figure 1 Homology analysis of sequences of *mrp* in different SS2 strains

于 *mrp* 编码序列的 2 627–2 897 位置。

2.2 *mrp* 基因在 SS2 菌株中的分布

如表 1 所示, *mrp*-1 在 53 株 SS2 菌株中阳性率为 100%, *mrp*-2 阳性率为 47.2%。将 *mrp*-1+/*mrp*-2+ 菌株归为 *mrp*-A 型, *mrp*-1+/*mrp*-2- 菌株为 *mrp*-B 型。

2.3 斑马鱼实验

攻毒后的病死斑马鱼的腹部和腮部发红, 呈现明显炎症反应。研究选取 10 株 *mrp*-A 型和 10 株 *mrp*-B 型 SS2 菌株用于斑马鱼实验, 其 LD_{50} 列于表 4。本研究中斑马鱼实验分 8 个批次进行, 每个批次均以 ZY05719 和 T15 为参考, 参考菌株的 LD_{50} 列于表 5。

2.4 统计分析 SS2 菌株毒力水平

通过比较待检菌株和参考菌株的 LD_{50} , 评价待检菌株的毒力水平。引入公式: $y(x) = [\log(LD_{50(x)}) - \log(LD_{50(T15)})] / [\log(LD_{50(ZY05719)}) - \log(LD_{50(T15)})]$ 。假定参考菌株 ZY05719 毒力水平为 1, 则 T15 毒力水平为 0; $y(x) \geq 0.5$, x 倾向为强毒株; $y(x) < 0.5$, x 倾向为弱毒株。如表 4 所示, 10 株 *mrp*-A 型菌株均为强毒株, 10 株 *mrp*-B 型菌株中 9 株为弱毒株, 1 株为强毒株。

2.5 *mrp* 基因在 SS2 菌株中的转录水平

$\Delta C_{T(x)} = C_{T(mrp)} - C_{T(gapdh)}$, $\Delta\Delta C_{T(x)} = \Delta C_{T(x)} - \Delta C_{T(ZY05719)}$, $2^{-\Delta\Delta C_{T(x)}}$ 表示 x 菌株中 *mrp* 基因相对于 ZY05719 中

表 4 SS2 菌株毒力评估
Table 4 Virulence evaluation of SS2 strains

<i>mrp</i> 基因型 Genotype of <i>mrp</i>	菌株 Strain	半数致死量 LD_{50}	$y(x)$	强毒或弱毒 Highly-virulent or low-virulent	毒力实验* Virulence test*
<i>mrp</i> -A	hb1005	6.63×10^5	0.67	HV	6 th
	HA9801	3.42×10^5	1.04	HV	6 th
	SS2	7.93×10^5	0.57	HV	6 th
	ZG05464	5.62×10^5	0.72	HV	7 th
	CHZ05806-1	5.03×10^5	0.77	HV	7 th
	hb1008	7.05×10^5	0.61	HV	7 th
	88B	7.65×10^5	0.58	HV	7 th
	GH05458	7.72×10^5	0.57	HV	7 th
	LP090401	3.81×10^5	0.97	HV	8 th
	P1/7	8.09×10^5	0.61	HV	8 th
<i>mrp</i> -B	HN0104001	8.87×10^5	0.20	LV	1 st
	ZJ92091101	1.95×10^6	-0.20	LV	1 st
	HZ060601	2.42×10^6	-0.19	LV	2 nd
	HN075231	7.94×10^6	-0.65	LV	3 rd
	JX0908005	2.37×10^7	-1.07	LV	3 rd
	JX0908008	3.91×10^6	-0.16	LV	4 th
	JX071201	3.24×10^6	-0.34	LV	4 th
	JX081202	5.72×10^5	0.84	HV	4 th
	CZ130904	3.49×10^6	-1.07	LV	5 th
	ZJNB115	9.25×10^5	0.16	LV	5 th

注: *: 研究中毒力检测实验分 8 次进行, 表格最后一列表示该菌株所处的毒力实验的次序。

Note: *: Eight batches of virulence tests were performed in this study. The last column indicated the order of virulence experiments of strains.

表 5 8 次毒力实验中 ZY05719 和 T15 的 LD_{50}
Table 5 LD_{50} of ZY05719 and T15 involved in eight batches of virulence tests

毒力实验 Virulence test	ZY05719 半数致死量 LD_{50} of ZY05719	T15 半数致死量 LD_{50} of T15
1 st	1.80×10^5	1.32×10^6
2 nd	3.66×10^5	1.77×10^6
3 rd	1.17×10^5	1.50×10^6
4 th	4.26×10^5	2.91×10^6
5 th	3.49×10^5	1.13×10^6
6 th	3.70×10^5	2.18×10^6
7 th	3.03×10^5	2.73×10^6
8 th	3.58×10^5	2.91×10^6

mrp 基因的转录水平。ZY05719 中 MRP 蛋白确定表达(结果未发表)。如图 2 所示, 相较强毒菌株 ZY05719, *mrp*-A 型菌株中 *mrp* 转录水平高, 而 *mrp*-B 型菌株中 *mrp* 转录水平低, 且差异极显著 ($P < 0.001$)。

3 结论

猪链球菌 2 型是猪链球菌 33 个血清型中流行最广、毒力最强的血清型, 不同 SS2 菌株的致病性不同。MRP (*mrp*) 常被用作毒力标志之一以鉴定致病性 SS2, 但 MRP-菌株其 PCR 结果不一定为 *mrp*^[16], 只是该菌株中 *mrp* 基因不表达。作为最常用的毒力标志, *mrp* 基因在 SS2 菌株中普遍存在,

但是不同菌株中 *mrp* 基因序列不同, MRP 表达水平也有差异。终止子的提前会导致 MRP 不能正常表达^[16]。这些差异可能与 SS2 致病力强弱有关。

“内标”的引入, 能有效避免斑马鱼重复性不佳的问题, 在每批次毒力实验中, 待检菌株只需与参考菌株比较即可判断其毒力水平, 结果更可靠。毒力实验结果显示, *mrp*-A 菌株的 $y(x)$ 均大于 0.5, 归为强毒株, 而大多数 *mrp*-B 菌株为弱毒株, 说明 A 型 *mrp* 基因可能对 SS2 致病力的形成具有重要意义。

GAPDH 为参与糖酵解的一种关键酶, 其编码基因 *gapdh* 为常用的内参基因之一。本研究以 *gapdh* 为内参, 评估 *mrp* 基因的转录水平; 以强毒菌株 ZY05719 中 *mrp* 转录水平为参考, 评价其他 SS2 菌株中 *mrp* 转录水平。结果表明, *mrp*-A 菌株比 *mrp*-B 菌株的 *mrp* 转录水平高, 由此推测 *mrp*-A 菌株中 MRP 可能更易表达, 从而更易发挥致病力。但是, *mrp*-B 型菌株 JX081202 中 *mrp* 转录水平很低, 却为强毒株, 推测该菌株中尚有其他与致病性密切相关的成分。有研究表明 *srtBCD* 基因簇与 SS2 毒力相关^[29-30], 而我们之前的研究结果(未发表)显示 JX081202 为 *sbp2'* (*srtBCD* 基因簇组成成分) 阳性菌株, 而且 *sbp2'*+ 菌株比 *sbp2'*- 菌株毒力强。

不同毒力的 SS2 菌株的基因组差异明显, *mrp*

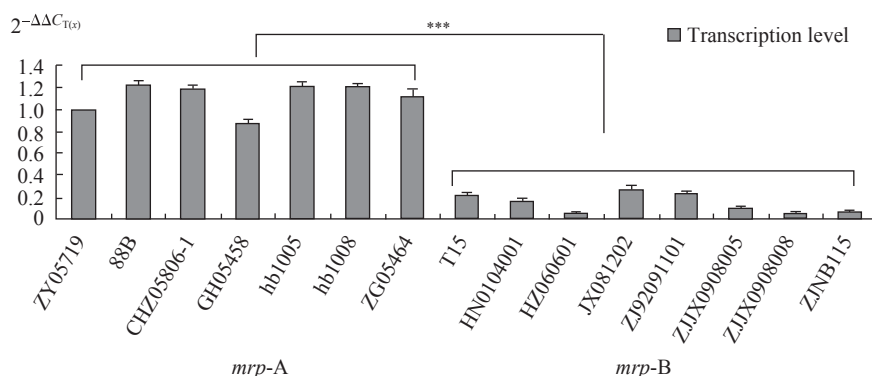


图 2 不同 SS2 菌株中 *mrp* 基因的转录水平

Figure 2 Transcription level of *mrp* in different SS2 strains

Note: ***: $P < 0.001$.

基因的变异只是其表征之一。在菌株进化历程中, 外源性 DNA (如噬菌体序列) 的插入、基因的跳跃等机制都会导致 SS2 原有基因的改变, 从而直接影响菌株的生物学特性。基因的调控机制也非常复杂, 同一基因在不同菌株中的表达水平可能会出现差异。*mrp* 基因的多样性可能是在进化过程中产生的, 且 *mrp* 转录调控机制甚至表达调控机制也可能随着生物进化而出现差异。这些推测都值得在后续研究中深入分析。

本研究在初步分析不同菌株中 *mrp* 序列的基础上, 将 *mrp* 基因分为 A、B 两种型, 且 *mrp*-A 型 (*mrp*-1+/*mrp*-2+) 菌株比大多数 *mrp*-B 型 (*mrp*-1+/*mrp*-2-) 菌株毒力偏强。虽然 *mrp* 基因不能作为快速鉴定 SS2 强毒株的唯一标志, 但以 *mrp* 基因的非保守区域 *mrp*-2 为靶基因仍能有效辨别致病性 SS2, 为快速鉴定 SS2 强毒菌株提供依据。

参 考 文 献

- Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans[J]. Clinical Infectious Diseases, 1988, 10(1): 131-137
- Heidt MC, Mohamed W, Hain T, et al. Human infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(9): 4898-4901
- Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(8): 2922-2929
- Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 74(3): 237-248
- Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(5): e151
- Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 76(3): 259-272
- Berthelot-Hérault F, Gottschalk M, Morvan H, et al. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2005, 69(3): 236-240
- Quessy S, Dubreuil JD, Caya M, et al. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(5): 1975-1979
- Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype[J]. Infection and Immunity, 1992, 60(2): 550-556
- Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin[J]. Microbiology, 1995, 141(Pt1): 189-195
- Lalonde M, Segura M, Lacouture S, et al. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines[J]. Microbiology, 2000, 146(Pt8): 1913-1921
- Vecht U, Arends JP, Van der Molen EJ, et al. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type ii after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs[J]. American Journal of Veterinary Research, 1989, 50(7): 1037-1043
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(9): 3156-3162
- Schultsz C, Jansen E, Keijzers W, et al. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in the Netherlands[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e33854
- Silva LMG, Baums CG, Rehm T, et al. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115(1/3): 117-127
- Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, et al. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and sulysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 139(3/4): 310-317
- Berthelot-Hérault F, Cariolet R, Labbé A, et al. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2001, 65(3): 196-200
- Pu JY, Huang XX, Lu CP. Virulence detection of *Streptococcus suis* type 2 in zebrafish[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2655-2658 (in Chinese)
- 濮俊毅, 黄新新, 陆承平. 用斑马鱼检测猪链球菌2型的致病力[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2655-2658
- Beaudoin M, Higgins R, Harel J, et al. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 99(2/3): 111-116
- Kataoka Y, Haritani M, Mori M, et al. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 1991, 53(6): 1043-1049
- Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Tetenburg BJ, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific[J]. Veterinary Microbiology, 1997, 58(1): 53-60
- Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 316(1): 36-43
- Jiang H, Fan HJ, Lu CP. Identification and distribution of putative virulent genes in strains of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 133(4): 309-316
- Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Functional analysis of *luxS* in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 152(1/2): 151-160
- Smith HE, Vecht U, Gielkens AL, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2[J]. Infection and Immunity, 1992, 60(6): 2361-2367
- Ju CX, Gu HW, Lu CP. Characterization and functional analysis of *atl*, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(6): 1464-1473
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. The American Journal of Hygiene, 1938, 27(3): 493-497
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, et al. Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 138(1/2): 132-139
- Tang YL, Zhao HC, Wu W, et al. Genetic and virulence characterization of *Streptococcus suis* type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan, China[J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(6): 541-548