

研究报告

2018 年我国 19 株猪链球菌 4 型分离株的病原学特征及分析

段倩倩¹, 李亮¹, 邢刚², 刘雪兰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 马鞍山史记动物健康管理有限公司, 安徽 马鞍山 238251

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 Qianqian, Li Liang, Xing Gang, Liu Xuelan, Sun Pei, Wei Jianzhong, Li Yu. Etiological characteristics and analysis of 19 isolates of *Streptococcus suis* serotype 4 in China, 2018[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 202-216

摘要:【背景】近年来, 猪链球菌 4 型(*Streptococcus suis* serotype 4, SS4)分离率逐渐上升, 但是有关 SS4 的系统研究报道匮乏。【目的】研究 19 株 SS4 临床分离株的病原学特征。【方法】以 2 株猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)强毒株为参考菌株, 对 19 株 SS4 分离株进行培养特性及形态学观察、生化试验、小鼠致病性试验、毒力基因检测、生物被膜形成能力测定和多位点序列分型。【结果】19 株 SS4 的菌落直径均较 2 株 SS2 大, 溶血特性和镜检形态与 SS2 相同; 多数 SS4 菌株(68.4%, 13/19)与 2 株 SS2 的生化反应结果完全相同, 少数菌株(31.6%, 6/19)对乳糖、棉子糖、菊糖、蕁糖的发酵结果不完全相同; 均可致小鼠脑膜炎和死亡, 毒力最强的 7 株 SS4 与 2 株 SS2 的 LD_{50} 同处于 10^7 – 10^8 CFU/只数量级; 均携带 2–6 种毒力基因, 有 5 种毒力基因型, 毒力基因型 *epf*+*mrp*+*sly*+*gapdh*+*fbps*+*orf2*+ 占比最高(36.8%, 7/19); 均具有生物被膜形成能力, 以成膜力弱(1+)为主(89.5%, 17/19), 在扫描电镜下可见网状膜结构; 有 3 种 ST 型, 优势 ST 型为 ST94 (89.5%, 17/19), 新发现 2 种 ST 型(ST1158 和 ST1224)。【结论】19 株 SS4 分离株的培养及形态学特性均一, 生化特性多样, 毒力基因型和 ST 型组成复杂, 普遍具有生物被膜形成能力, 对小鼠具有强致病性。

关键词: 猪链球菌 4 型(SS4); 培养及形态学特性; 生化特性; 致病性; 多位点序列分型

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: 2021-06-22; **Accepted:** 2021-07-25; **Published online:** 2021-10-26

Etiological characteristics and analysis of 19 isolates of *Streptococcus suis* serotype 4 in China, 2018

DUAN Qianqian¹, LI Liang¹, XING Gang², LIU Xuelan¹, SUN Pei¹, WEI Jianzhong¹, LI Yu^{*1}

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

² Maanshan Shiji Animal Health Management Limited Company, Maanshan 238251, Anhui, China

Abstract: [Background] In recent years, the clinical isolation rate of *Streptococcus suis* serotype 4 (SS4) increased gradually, but systematic studies on SS4 were scarce. [Objective] In this research, we aimed to study on etiological characteristics of 19 isolates of SS4 in China, 2018. [Methods] 2 strains of *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) used as reference, 19 strains of SS4 were researched by cultural characteristics and morphological observation, biochemical test, animal pathogenicity test, virulence gene detection, determination of biofilm formation ability and multilocus sequence typing. [Results] Compared with 2 strains of SS2, 19 strains of SS4 had a larger colony diameter, the same hemolytic characteristics and microscopy morphology and incompletely same reaction to lactose, raffinose, synanthrin and mushroom sugar. All the strains of SS4 could caused meningitis and death in mice, and the LD_{50} of the 7 most virulent strains of SS4 and 2 strains of SS2 were in the order of 10^7 – 10^8 CFU. There were 2 to 6 virulence genes and 5 virulence genotypes in SS4, and *epf+mrp+sly+gapdh+fbps+orf2+* was the dominant (36.8%, 7/19). All the strains of SS4 had the ability of biofilm formation, weak (1+ mainly (89.5%, 17/19), and the reticular biofilm structure was observed under scanning electron microscope. There were 3 ST types in SS4, of which ST94 were prevalent (89.5%, 17/19), while ST1158 and ST1224 were new found. [Conclusion] The culture and morphological characteristics of 19 strains of SS4 were uniform, the biochemical characteristics diverse, the virulence genotypes diverse, the biofilm formation ability generally owned, with strong pathogenicity to mice and genetic diversity.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 4 (SS4); culture and morphological characteristics; biochemical characteristics; pathogenicity; multilocus sequence typing

猪链球菌病是由链球菌属中猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS)、马链球菌类马亚种、马链球菌兽疫亚种和兰氏分群中 D、E、L 群链球菌引起的一种常见的猪传染病。发病猪常表现为败血症、关节炎、脑膜炎、心内膜炎和淋巴结脓肿。SS 是世界范围内引起猪链球菌病最主要的病原, 根据荚膜多糖抗原特性的不同可分为 35 种血清型, 即 1–34 型和 1/2 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。近年来, 尽管 SS2 菌株在临床发病猪中仍占主导

地位, 但是 SS4 菌株的分离率出现逐渐升高的态势^[1–3]。除了引起猪发病外, SS4 还可感染人。1988 年 Arends 等^[4]首次于荷兰分离到一株可引起人脑膜炎的 SS4; 2009–2012 年 Kerdsin 等^[5]又在泰国分离到一株可引起人败血症的 SS4。鉴于目前 SS4 毒力因子、致病力、动物模型的系统性研究较少, 因此, 开展 SS4 的病原学生物特性研究, 切实了解 SS4 的流行病学情况, 对于养殖业和公共卫生安全十分重要。

本研究以 19 株分离自临床病例的 SS4 为试验菌株, 以前期分离、鉴定和保存的 2 株 SS2

强毒株为参考菌株进行培养特性及形态学观察、生化试验、小鼠致病性试验、毒力基因检测、生物被膜形成能力测定和多位点序列分型, 以期为 SS 病原学和分子流行病学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试菌株

19 株 SS4 来源于安徽、江苏、河北地区临

床发病猪, 由安徽农业大学动物传染病研究室分离、鉴定和保存, 菌株背景信息见表 1。

1.1.2 参考菌株

2 株 SS2 强毒株由安徽农业大学动物传染病研究室分离、鉴定和保存, 菌株背景信息见表 2。

1.1.3 试验动物

460 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。

表 1 2018 年分离的受试菌株背景信息

Table 1 Background information of test strains isolated in 2018

序号 No.	菌株 Strain	分离地区 Region	分离部位 Material
1	AHshou18-1	安徽寿县 Shouxian, Anhui	脾 Spleen
2	AHshou18-2	安徽寿县 Shouxian, Anhui	脑 Brain
3	AHhuai18-7	安徽怀远 Huaiyuan, Anhui	肺 Lung
4	AHhuai18-8	安徽怀远 Huaiyuan, Anhui	肝 Liver
5	AHhuai18-10	安徽怀远 Huaiyuan, Anhui	脑 Brain
6	JSfang18-1	江苏盐城 Yancheng, Jiangsu	脑 Brain
7	JSlai18-1	江苏宿迁 Suqian, Jiangsu	心包积液 Pericardial effusion
8	JSxi18-3	江苏盐城 Yancheng, Jiangsu	肺 Lung
9	JSxu18-4	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	肝 Liver
10	JSxu18-5	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	脾 Spleen
11	JSxu18-6	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	肺 Lung
12	JSxu18-7	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	肝 Liver
13	JSxu18-8	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	脾 Spleen
14	JSxu18-9	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	脑 Brain
15	JSxu18-10	江苏盱眙 Xuyi, Jiangsu	心包积液 Pericardial effusion
16	HBgu18-3	河北故城 Gucheng, Hebei	肺 Lung
17	HBgu18-4	河北故城 Gucheng, Hebei	肝 Liver
18	HBgu18-5	河北故城 Gucheng, Hebei	脾 Spleen
19	HBgu18-6	河北故城 Gucheng, Hebei	脑 Brain

表 2 参考菌株背景信息

Table 2 Background information of reference strains

Item	HF2	HF3
分离地区 Region	安徽合肥 Hefei, Anhui	安徽合肥 Hefei, Anhui
分离部位 Material	脾脏 Spleen	脾脏 Spleen
分离时间 Time	2010	2013
毒力基因型 Virulence genotype	<i>epf-mrp-sly+fbps+gapdh+orf2+</i>	<i>epf+mrp-sly+fbps+gapdh+orf2+</i>
序列型 ST type	ST1	ST7
LD_{50} (CFU)	1.50×10^8	9.72×10^7

1.1.4 主要试剂和仪器

普通营养琼脂、0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)、0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)、纯化琼脂粉、生化微量反应管, 绍兴天恒生物科技有限公司; 脱纤维兔血、脱纤维马血, 南京茂捷微生物科技有限公司; 5%绵羊血琼脂, 江门市凯林贸易有限公司; 小牛血清, 上海羽朵生物有限公司; DL2000 DNA Marker、 $2\times Taq$ PCR Mix, 天根生化科技有限公司。

5%小牛血清 TSA: TSA-YE 4.8 g, 纯化琼脂粉 0.3 g, 小牛血清 5.0 mL, 蒸馏水 100.0 mL。5%兔血琼脂: TSA-YE 4.8 g, 纯化琼脂粉 0.3 g, 脱纤维兔血 5.0 mL, 蒸馏水 100.0 mL。5%马血琼脂: TSA-YE 4.8 g, 纯化琼脂粉 0.3 g, 脱纤维马血 5.0 mL, 蒸馏水 100.0 mL。

光学显微镜, 广州明美光电技术有限公司; PCR 仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技股份有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 临界点干燥仪, EMITECH 公司; 扫描电镜, 日立 Hitachi 公司; 全波长多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司。

1.2 培养特性及形态学观察

将保存的 19 株 SS4 受试菌株和 2 株 SS2 参考菌株划线接种于 5%小牛血清 TSA, 37 °C 培养 12 h, 复苏后分别接种至普通营养琼脂、5%小牛血清 TSA、5%绵羊血琼脂、5%兔血琼脂、5%马血琼脂, 并分别在需氧、微需氧、厌氧条件下 37 °C 恒温培养。观察细菌生长情况, 并挑取单个菌落进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察形态学特征。

1.3 生化试验

参考生化微量反应管说明书进行操作和结果判定, 观察 SS4 和 SS2 对葡萄糖、乳糖、蔗糖、棉子糖、菊糖、蕈糖、山梨醇和甘露醇的发酵

情况, 以及对七叶苷、水杨素、马尿酸钠的水解情况。

1.4 小鼠致病性试验

取 100 只小鼠, 随机分为 20 组, 分别为 19 个试验组(对应 19 株 SS4)和 1 个对照组, 每组 5 只。试验组腹腔攻毒 9.0×10^8 CFU/mL 菌液, 每只 0.3 mL (即 2.7×10^8 CFU/只), 对照组注射等体积灭菌生理盐水。连续观察 7 d, 记录小鼠发病、死亡情况并回收细菌鉴定。从中筛选出致小鼠 100%死亡的菌株, 用累积法测定其对小鼠的 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} ^[3]。对死亡小鼠及时剖检, 采集肺、肝、脾、肾、胸腺、脑进行病理组织切片观察。

1.5 毒力基因检测

检测 6 种毒力基因, 包括胞外蛋白因子(*epf*)、溶菌酶释放蛋白(*mrp*)、溶血素(*sly*)、纤连蛋白结合蛋白(*fbps*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(*gapdh*)和毒力相关序列(*orf2*)^[6]。

1.6 生物被膜形成能力测定

采用结晶紫染色法测定生物被膜形成能力。生物被膜形成能力判定标准: 以阴性对照 OD_{600} 平均值加其 3 倍标准差为生物被膜形成能力临界点 OD_c 。 $OD_{600}\leq OD_c$, 无生物被膜形成成为阴性(-); $OD_c<OD_{600}<2OD_c$ 为弱阳性(1+); $4OD_c\geq OD_{600}\geq 2OD_c$ 为中等阳性(2+); $OD_{600}>4OD_c$ 为强阳性(3+)。在扫描电镜下观察生物被膜形态结构并拍摄照片^[7]。

1.7 多位点序列分型

扩增 7 个管家基因(*aroA*、*cpn60*、*dpr*、*gki*、*mutS*、*recA*、*thrA*)并测序, 上传至 SS MLST 数据库(<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus->

suis)获得对应的 ST 型;拼接管家基因序列,应用 MEGA 7.0 和 MegAlign 软件进行相似性分析和系统进化分析^[8]。

2 结果与分析

2.1 培养特性及形态学观察结果

19 株 SS4 和 2 株 SS2 在普通营养琼脂上均不能生长,在 5%小牛血清 TSA、5%绵羊血琼脂、5%兔血琼脂、5%马血琼脂上均能形成灰白色、半透明、表面光滑、边缘整齐的圆形露珠状隆起菌落。培养 12 h 后,SS2 菌落直径达 0.5 mm,SS4 菌落直径达 1.0 mm。当处于需氧、微需氧条件时,SS4 和 SS2 在 5%绵羊血琼脂上均为 α 溶血,在 5%兔血琼脂和 5%马血琼脂上均为 β 溶血;当处于厌氧条件时,在 5%绵羊血琼脂、5%兔血琼脂和 5%马血琼脂上均为 γ 溶血(图 1)。在光学显微镜下,SS4 和 SS2 均为革兰氏阳性球菌,成对或短链存在,个别散在(图 2)。

2.2 生化试验结果

由表 3 可知,19 株 SS4 和 2 株 SS2 均不发酵山梨醇和甘露醇,均可水解七叶苷和水杨素,均不水解马尿酸钠。SS4 与 SS2 生化差异主要体现在糖发酵方面。19 株 SS4 中,发酵 6 种糖类的菌株占 68.4% (13/19),分别为 AHhuai18-7、AHhuai18-8、AHhuai18-10、JSfang18-1、JSlai18-1、JSxi18-3、JSxu18-4、JSxu18-7、JSxu18-8、JSxu18-10、HBgu18-4、HBgu18-5 和 HBgu18-6;发酵 5 种糖类的菌株占 15.8% (3/19),分别为 AHshou18-2、JSxu18-5 和 JSxu18-9;发酵 4 种糖类的菌株占 10.5% (2/19),分别为 JSxu18-6 和 HBgu18-3;发酵 3 种糖类的菌株占 5.3% (1/19),为 AHshou18-1;而 2 株 SS2 (HF2 和 HF3)均可发酵 6 种糖类。表明 SS4 糖发酵能力较 SS2 弱。

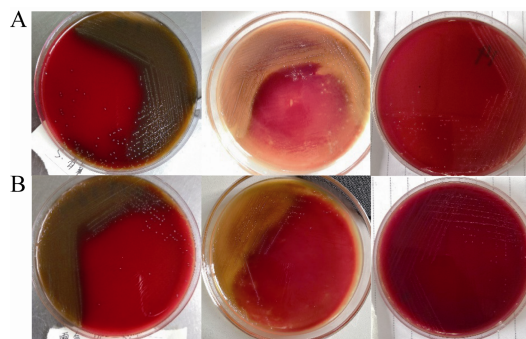


图 1 SS4 和 SS2 溶血特性 A:从左到右依次为 SS4 在 5%绵羊血琼脂(需氧, α 溶血)、5%兔血琼脂(微需氧, β 溶血)、5%马血琼脂(厌氧, γ 溶血)上溶血情况; B: 从左到右依次为 SS2 在 5%绵羊血琼脂(需氧, α 溶血)、5%兔血琼脂(微需氧, β 溶血)、5%马血琼脂(厌氧, γ 溶血)上溶血情况

Figure 1 Hemolytic characteristics of SS4 and SS2 strains. A: From left to right, there were SS4 hemolytic characteristics on 5% sheep blood agar (aerobic, α -hemolysis), 5% cony blood agar (microaerophilic, β -hemolysis), 5% horse blood agar (anaerobic, γ -hemolysis); B: From left to right, there were SS2 colony characteristics on 5% sheep blood agar (aerobic, α -hemolysis), 5% cony blood agar (microaerophilic, β -hemolysis), 5% horse blood agar (anaerobic, γ -hemolysis).

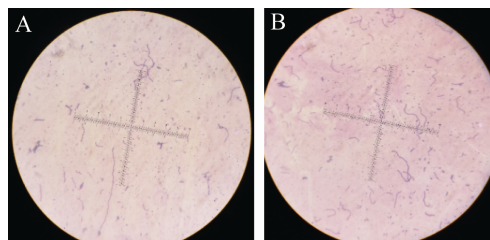


图 2 SS4 和 SS2 镜检形态(革兰氏染色, 1 000 \times)
Figure 2 Morphology of SS4 and SS2 strains (Gram staining, 1 000 \times). A: SS4; B: SS2.

2.3 小鼠致病性试验结果

19 株 SS4 攻毒后,除部分急性死亡未表现症状的小鼠外,多表现为精神沉郁、被毛粗乱、食欲下降、扎堆、转圈、死亡。19 株 SS4 中有 7 株(占 36.9%)对小鼠致死率为 100% (5/5),分别

表 3 SS4 和 SS2 生化试验结果

Table 3 Biochemical test results of SS4 and SS2 strains

菌株 Strains	项目 Items										
	葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	棉子糖 Raffinose	菊糖 Synanthrin	蕈糖 Mushroom sugar	山梨醇 Sorbitol	甘露醇 Mannitol	水杨素 Salicin	七叶苷 Esculin	马尿酸钠 Sodium hippurate
AHshou18-1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
AHshou18-2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
AHhuai18-7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
AHhuai18-8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
AHhuai18-10	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSfang18-1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSlai18-1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxi18-3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxu18-4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxu18-5	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
JSxu18-6	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
JSxu18-7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxu18-8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxu18-9	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JSxu18-10	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
HBgu18-3	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
HBgu18-4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
HBgu18-5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
HBgu18-6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
HF2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
HF3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

为 AHshou18-1、AHhuai18-8、AHhuai18-10、JSxu18-4、JSxu18-10、HBgu18-3 和 HBgu18-4。采用累积法测定 7 株 SS4 的 LD_{50} (图 3 和表 4), 7 株 SS4 的 LD_{50} 在 9.03×10^7 – 4.05×10^8 CFU/只范围内; 而 2 株 SS2 参考菌株(HF2 和 HF3)的 LD_{50} 分别为 1.50×10^8 CFU/只和 9.72×10^7 CFU/只^[9], 与 7 株毒力最强的 SS4 同处于 10^7 – 10^8 CFU/只数量级, 毒力相近。试验组小鼠肺脏充血明显, 肺泡壁增厚, 实质化; 肝细胞结构疏松, 水泡变性; 脾脏中淋巴细胞稀疏, 红骨髓界限不清; 肾小管上皮细胞疏松、水肿、脱落, 肾小球分叶明显,

局部出血明显; 胸腺细胞排列疏松, 皮质、髓质界限不清, 局部组织坏死; 脑组织中神经元细胞核固缩、坏死, 神经胶质细胞弥漫性增生。对照组小鼠各脏器结构正常, 未见明显炎症(图 4)。

2.4 毒力基因检测结果

由表 5 可知, 19 株 SS4 中, 携带 2 种毒力基因的菌株占 5.3% (1/19), 为 AHshou18-2; 携带 3 种毒力基因的菌株占 15.8% (3/19), 分别为 JSlai18-1、JSxi18-3 和 HBgu18-5; 携带 4 种毒力基因的菌株占 10.5% (2/19), 分别为 AHhuai18-7 和 JSxu18-7; 携带 5 种毒力基因的

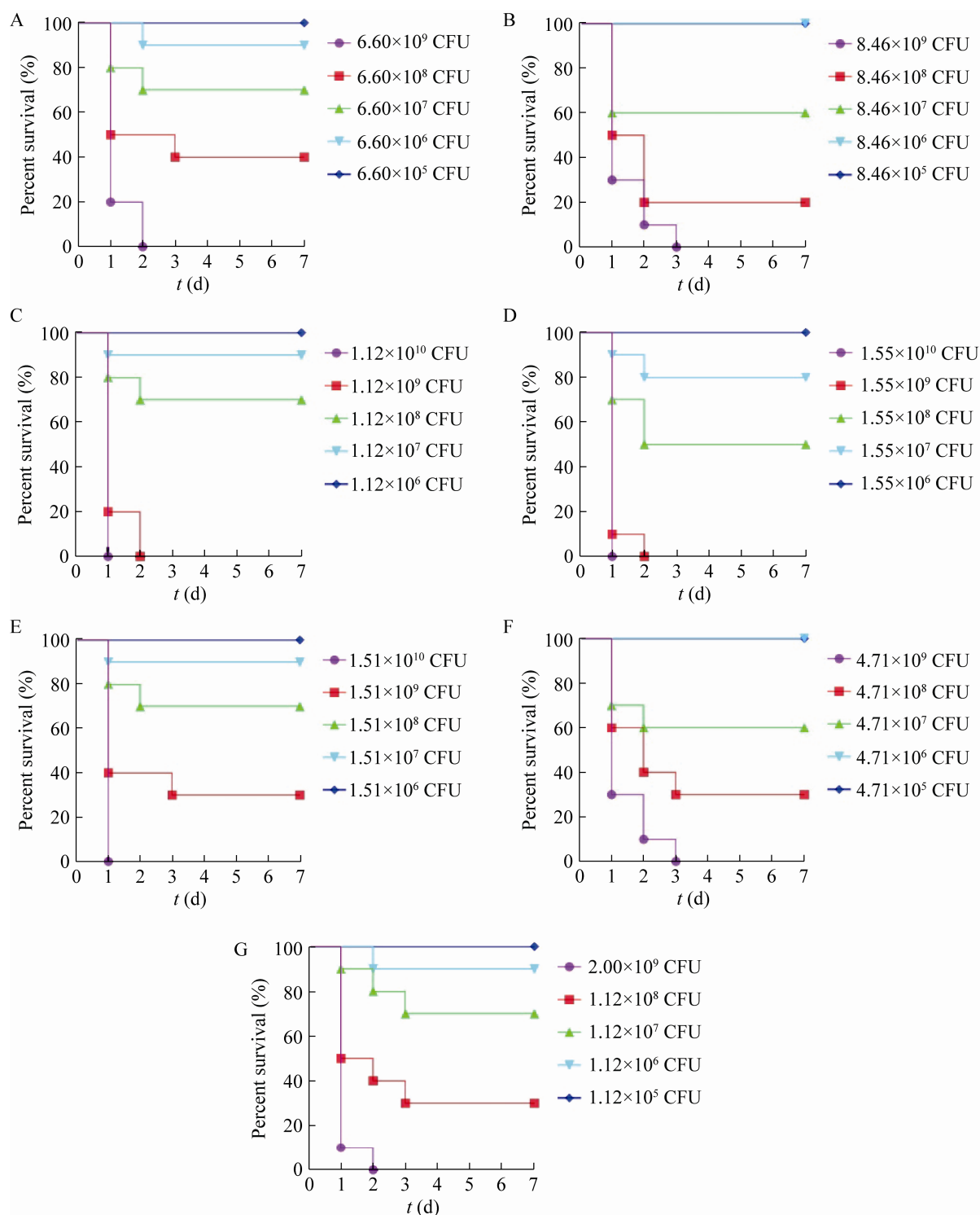


图3 小鼠生存曲线

Figure 3 Mouse survival curves. A: AHshou18-1; B: AHhuai18-8; C: AHhuai18-10; D: JSxu18-4; E: JSxu18-10; F: HBgu18-3; G: HBgu18-4.

表 4 7 株 SS4 对小鼠的 LD_{50} 测定结果Table 4 LD_{50} of 7 SS4 strains to mice

菌株 Strains	攻毒剂量 Dose (CFU)	死亡小鼠 数目(只) Mortality	存活小鼠 数目(只) Survival	累积死亡 数目(只) Cumulative mortality	累积存活数目(只) Cumulative survival	累积死亡率 Cumulative mortality rate (%)	LD_{50} (CFU)
AHshou18-1	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	
AHhuai18-8	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	
AHhuai18-10	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	
JSxu18-4	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	
JSxu18-10	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	
HBgu18-3	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	
HBgu18-4	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); $\lg LD_{50}$ =高于 50%累积死亡率的稀释度倒数的对数+距离比例 \times 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%); $\lg LD_{50}$ =logarithm of reciprocal dilution over 50% cumulative mortality+logarithm of distance ratio \times dilution.

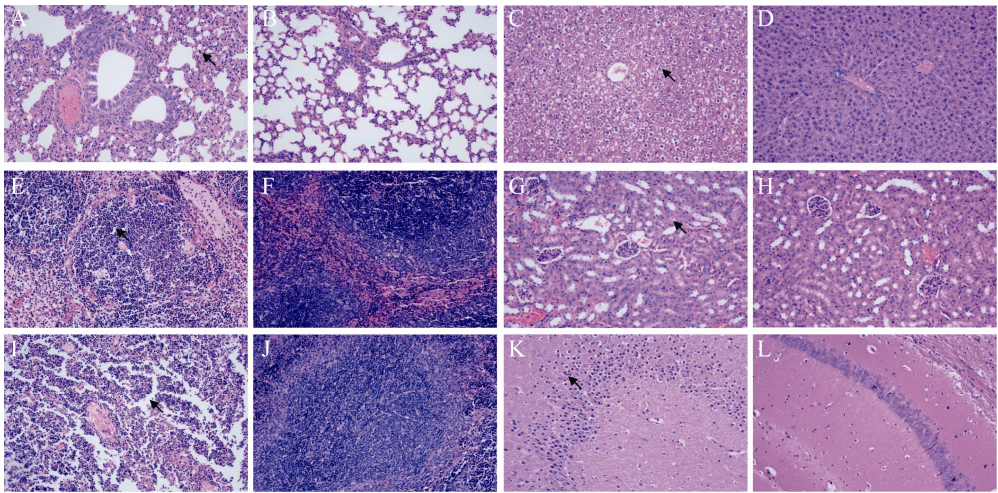


图 4 小鼠各脏器病理组织学变化(HE 染色, 200×) A、C、E、G、I、K 分别为试验组小鼠的肺、肝、脾、肾、胸腺、脑; B、D、F、H、J、L 分别为对照组小鼠的肺、肝、脾、肾、胸腺、脑; 黑色箭头表示病灶
Figure 4 Histopathological changes of mouse organs (HE staining, 200×). A, C, E, G, I and K are the lung, liver, spleen, kidney, thymus and brain of the test group, respectively; B, D, F, H, J and L are the lung, liver, spleen, kidney, thymus and brain of the control group, respectively. Black arrows show lesions.

表 5 19 株 SS4 和 2 株 SS2 毒力基因检测结果

Table 5 Detection results of virulence genes of 19 SS4 and 2 SS2 strains

菌株 Strains	毒力基因 Virulence genes						毒力基因检出数目 Number of virulence genes
	<i>epf</i>	<i>mrp</i>	<i>sly</i>	<i>gapdh</i>	<i>fbps</i>	<i>orf2</i>	
AHshou18-1	+	—	+	+	+	+	5
AHshou18-2	—	—	—	+	+	—	2
AHhuai18-7	—	—	+	+	+	+	4
AHhuai18-8	+	—	+	+	+	+	5
AHhuai18-10	+	—	+	+	+	+	5
JSfang18-1	+	+	+	+	+	+	6
JSlai18-1	—	—	—	+	+	+	3
JSxi18-3	—	—	—	+	+	+	3
JSxu18-4	+	+	+	+	+	+	6
JSxu18-5	+	+	+	+	+	+	6
JSxu18-6	+	—	+	+	+	+	5
JSxu18-7	—	—	+	+	+	+	4
JSxu18-8	+	+	+	+	+	+	6
JSxu18-9	+	+	+	+	+	+	6
JSxu18-10	+	—	+	+	+	+	5
HBgu18-3	+	+	+	+	+	+	6
HBgu18-4	+	+	+	+	+	+	6
HBgu18-5	—	—	—	+	+	+	3
HBgu18-6	+	—	+	+	+	+	5
HF2	—	—	+	+	+	+	4
HF3	+	—	+	+	+	+	5

注: +: 阳性; —: 阴性

Note: +: Positive; —: Negative.

菌株占 31.6% (6/19), 分别为 AHshou18-1、AHhuai18-8、AHhuai18-10、JSxu18-6、JSxu18-10 和 HBgu18-6; 携带 6 种毒力基因的菌株占 36.8% (7/19), 分别为 JSfang18-1、JSxu18-4、JSxu18-5、JSxu18-8、JSxu18-9、HBgu18-3 和 HBgu18-4; 毒力较强的 7 株 SS4 均携带 5–6 种毒力基因; *gapdh*、*fbps* 阳性率均为 100% (19/19), *orf2* 阳性率为 94.7% (18/19), *sly* 阳性率为 78.9% (15/19), *epf* 阳性率为 68.4% (13/19), *mrp* 阳性率为 36.8% (7/19); 共有 5 种毒力基因型, *epf+mrp+sly+gapdh+fbps+orf2+* 占 36.8% (7/19), *epf+mrp-sly+gapdh+fbps+orf2+* 占 31.6% (6/19), *epf-mrp-sly-gapdh+fbps+orf2+* 占 15.8% (3/19), *epf-mrp-sly+gapdh+fbps+orf2+* 占 10.5% (2/19), *epf-mrp-sly-gapdh+fbps+orf2-* 占 5.3% (1/19)。2 株 SS2 分别携带 4 种和 5 种毒力基因; *sly*、*gapdh*、*fbps*、*orf2* 阳性率均为 100% (2/2), *epf* 阳性率为 50% (1/2), *mrp* 阳性率为 0 (0/2); 共有 2 种毒力基因型, 分别为 *epf-mrp-sly+gapdh+*

fbps+orf2+ 和 *epf+mrp-sly+gapdh+fbps+orf2+*。

2.5 生物被膜形成能力测定结果

结晶紫染色结果显示, 19 株 SS4 均具有生物被膜形成能力, 2 株(JSxu18-4 和 JSxu18-10)生物被膜形成能力中等(2+), 占 10.5%; 其余 17 株生物被膜形成能力弱(1+), 占 89.5%; 2 株 SS2 生物被膜形成能力均为中等(2+)。

扫描电镜观察结果(图 5)显示, 生物被膜形成能力中等的 2 株 SS4 (JSxu18-4 和 JSxu18-10)和 2 株 SS2 (HF2 和 HF3)可在细胞爬片表面大量聚集, 周围有黏液样物质包绕, 形成凹凸不平的致密膜样结构, 边缘模糊; 生物被膜形成能力弱的 2 株 SS4 (HBgu18-4 和 AHhuai18-10)分布较松散, 周围黏液较少且边缘清晰。

2.6 多位点序列分型结果

由表 6 可知, 19 株 SS4 共有 3 种 ST 型, ST94 为优势 ST 型, 占 89.5% (17/19), 其次是 ST1158 和 ST1224, 各占 5.3% (1/19); 2 株 SS2 (HF2 和 HF3)有 2 种 ST 型, 分别为 ST1 和 ST7。

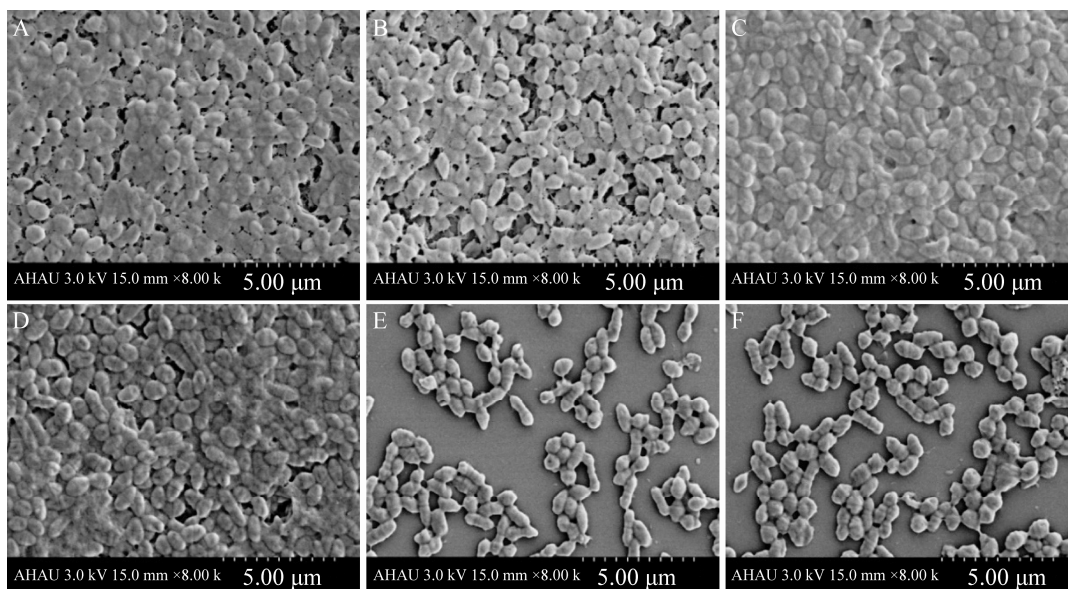


图 5 SS4 和 SS2 生物被膜扫描电镜观察结果(8 000×)

Figure 5 SEM observation of SS4 and SS2 strains (8 000×). A: JSxu18-4 (2+); B: JSxu18-10 (2+); C: HF2 (2+); D: HF3 (2+); E: HBgu18-4 (1+); F: AHhuai18-10 (1+).

表 6 19 株 SS4 和 2 株 SS2 多位点序列分型结果

Table 6 Multilocus sequence typing result of 19 SS4 and 2 SS2 strains

菌株 Strains	管家基因 Housekeeping gene							ST type
	<i>aroA</i>	<i>cpn60</i>	<i>dpr</i>	<i>gki</i>	<i>mutS</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>	
AHshou18-1	16	169	74	1	212	37	81	1 224
AHshou18-2	16	169	74	350	212	37	81	1 158
AHhuai18-7	8	21	5	45	44	22	4	94
AHhuai18-8	8	21	5	45	44	22	4	94
AHhuai18-10	8	21	5	45	44	22	4	94
JSfang18-1	8	21	5	45	44	22	4	94
JSlai18-1	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxi18-3	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-4	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-5	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-6	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-7	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-8	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-9	8	21	5	45	44	22	4	94
JSxu18-10	8	21	5	45	44	22	4	94
HBgu18-3	8	21	5	45	44	22	4	94
HBgu18-4	8	21	5	45	44	22	4	94
HBgu18-5	8	21	5	45	44	22	4	94
HBgu18-6	8	21	5	45	44	22	4	94
HF2	1	1	1	1	1	1	1	1
HF3	1	1	1	1	1	1	3	7

ST1、ST7、ST94 均已报道过，而 ST1158 和 ST1224 均为本研究新发现的 ST 型。

相似性分析和系统进化分析结果显示，SS4 中 2 种新发现的 ST 型(ST1158 和 ST1224)相似率高达 99.0%，处于同一小分支，亲缘关系相近；SS2 中 2 种 ST 型(ST1 和 ST7)相似率约 100%，处于同一小分支，亲缘关系相近。ST94 与 ST1、ST7 间相似率均为 97.1%，三者处于同一大分支，与 ST1158、ST1224 间相似率为 96.3%–96.4%，不在同一分支(图 6)。

3 讨论

19 株 SS4 和 2 株 SS2 均能在 5%血清 TSA、5%绵羊血琼脂、5%兔血琼脂、5%马血琼脂上

形成灰白色、半透明、表面光滑、边缘整齐的圆形露珠状隆起菌落，但是在培养相同时间后，SS4 菌落直径比 SS2 大。本研究中 19 株 SS4 均具有溶血性，但是并非所有菌株都携带编码 SLY 的 *sly* 基因，提示 SS4 中可能存在其他溶血相关蛋白。同一菌株在不同氧气条件下表现的溶血特性存在差异，在需氧、微需氧条件下表现为 α 溶血或 β 溶血，在厌氧条件下表现为 γ 溶血。这与牛源多杀性巴氏杆菌的溶血特性一致^[10]，究其原因可能是溶血相关基因的表达或溶血相关蛋白的活性受氧气影响。此外，同一菌株对不同动物红细胞所表现的溶血特性也存在差异。在需氧和微需氧条件下，SS4 和 SS2 在绵羊血琼脂上均为 α 溶血，在兔血和马血琼

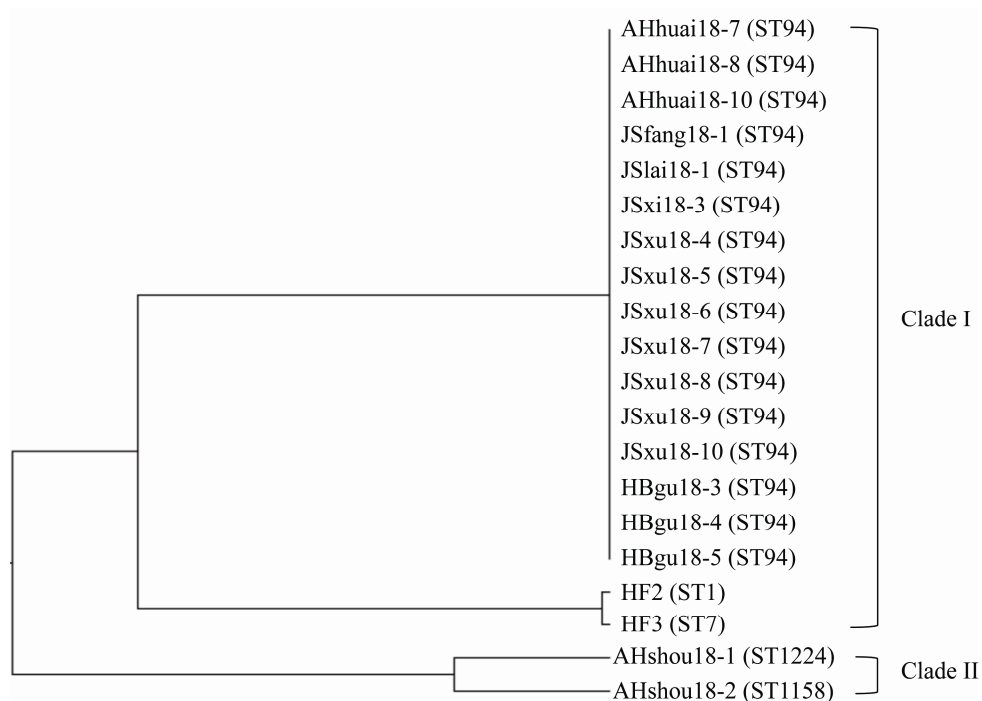


图 6 19 株 SS4 和 2 株 SS2 ST 型 UPGMA 进化树 各分支后依次为菌株编号和 ST 型

Figure 6 UPGMA evolution tree based on the STs of 19 SS4 and 2 SS2 strains. Strain number and ST type followed each clade.

脂上均为 β 溶血, 表明 SS4 和 SS2 对绵羊红细胞的敏感性比兔血、马血低。这和肠球菌的溶血特性一致^[11], 提示链球菌属的不同菌种间具有相似的溶血特性。

已有多项研究报道, SS4 具有致病性, 可致人和猪群发病^[1,4]。在本研究中, 19 株 SS4 感染小鼠后, 除部分急性死亡的小鼠外, 多出现转圈的典型神经症状, 而且剖检可见脑充血、肿大, 病理组织切片可见神经元核固缩、坏死, 神经胶质细胞弥漫性增生。表明 SS4 可穿透小鼠血脑屏障而引起脑损伤。孙珂等^[3]和 Arends 等^[4]也报道过 SS4 引起新西兰兔和人脑膜炎。此外, SS4 感染小鼠后可引起小鼠胸腺萎缩, 病理组织切片可见胸腺细胞排列疏松, 皮质、髓质界限不清, 局部组织坏死。Wang 等^[12]研究发现, SS2 感染小鼠后, 通过 p53 和半胱天

冬酶依赖性通路诱导胸腺细胞凋亡, 而胸腺细胞的凋亡导致外周血中 T 细胞群体异常和细胞因子分泌失调, 从而导致机体免疫抑制, 这提示 SS4 或许也能通过攻击胸腺引起免疫抑制。毒力是病原微生物引起动物机体不同程度病变的能力。根据试验动物感染 SS 后表现的临床症状, 可将其分为 3 类菌株: 强致病力菌株(引起脑膜炎)、弱致病力菌株(引起肺炎、关节炎等)和无致病力菌株(不引起发病)^[13]。Wei 等^[14]以小鼠为动物模型建立 SS 毒力判定方法: 腹腔注射 5×10^8 CFU/只剂量组, 死亡率大于 0 的菌株判为强毒株; 注射 3×10^9 CFU/只剂量组死亡率达 100%, 而注射 5×10^8 CFU/只剂量组死亡率为 0 的菌株判为中等毒力菌株; 注射 3×10^9 CFU/只剂量组发生死亡但死亡率小于 100%判为弱毒株。根据上述方法可以判定 19 株 SS4 均为强

毒株。虽同为强毒株，毒力也有差异。 LD_{50} 是准确、直观评价菌株毒力大小的重要单位。本研究中毒力最强的 7 株 SS4 的 LD_{50} 为 9.03×10^7 – 4.05×10^8 CFU/只，2 株 SS2 参考菌株 (HF2 和 HF3) 的 LD_{50} 分别为 1.50×10^8 CFU/只和 9.72×10^7 CFU/只，同处于 10^7 – 10^8 CFU/只数量级，表明 SS4 强毒株和 SS2 强毒株毒力相近。

SS 毒力因子众多，可分为表面/分泌因子类、酶/蛋白酶类、转录/调节因子类和其他类，其协同影响 SS 致病性。本研究对常见的 6 种 SS 毒力基因进行检测，结果显示，19 株 SS4 均携带 2–6 种毒力基因，毒力最强的 7 株菌 (HBgu18-4、JSxu18-4、HBgu18-3、AHhuai18-8、AHhuai18-10、AHshou18-1 和 JSxu18-10) 均携带 5–6 种毒力基因；共有 5 种毒力基因型，*epf*+*mrp*+*sly*+*gapdh*+*fbps*+*orf2*+ 型检出率最高。SS 具有高度动态、开放的泛基因组，不同菌株之间常发生基因组大规模重排，因此，携带多种毒力基因且毒力基因型多样的 SS 对养殖业和人类的潜在威胁更大，值得关注。从毒力基因功能来看，与黏附、代谢功能密切相关的 *fbps*、*gapdh* 基因在 SS4 和 SS2 中检出率均为 100%。同时，这 2 种毒力基因也广泛存在于其他血清型 SS 中^[15]。表明黏附、代谢能力在 SS 生存、繁殖、感染宿主并致病的过程中起重要作用。*epf*、*mrp*、*sly* 是 SS 的毒力标志基因，主要影响 SS 黏附力、侵袭力及在血液中的存活能力^[16]。目前有关这 3 种毒力基因在 SS4 中分布情况的报道较少。Huan 等^[15]在一株分离自江苏淮安健康猪组织的 SS4 中未检测到 *epf*、*mrp*、*sly* 基因；孙珂等^[3]对 5 株分离自上海、江苏、广东发病猪组织 SS4 和 5 株分离自江苏健康猪组织的 SS4 进行毒力基因检测，结果显示，*epf*、*mrp*、*sly* 基因在发病猪分离株中阳性率分别为 0%、0%、100%，在健康猪分离株中阳性

率分别为 0%、0%、40%。然而本研究中 19 株 SS4 均分离自发病猪组织，*epf*、*mrp*、*sly* 基因检出率分别为 68.4%、36.8%、78.9%，均高于上述报道，提示 SS4 中毒力标志基因分布情况可能与猪体健康状态相关。此外，*mrp* 和 *sly* 基因编码的 MRP 和 SLY 均参与 SS 致脑膜炎过程。MRP 可以与纤维蛋白原相互作用促使 SS 穿透血脑屏障，SLY 能够特异性与脑微血管上皮细胞互作，结合胞外基质蛋白，利于细菌定殖，并且能刺激免疫细胞释放蛋白因子，提高脑微血管通透性^[16-18]。在本研究中，*mrp* 和 *sly* 基因在 19 株 SS4 中阳性率分别为 36.8% 和 78.9%，但是所有菌株均能引起小鼠神经症状和全身感染。

SS 为抵御不良环境常以被膜态形式存在。在本研究中，19 株 SS4 和 2 株 SS2 均具有生物被膜形成能力，SS4 以成膜力弱(1+)为主，SS2 均为成膜力中等(2+)。SS 生物被膜的形成与菌株黏附功能相关，受多种黏附基因调控，如 *fbps* 和 *gapdh*^[19]。本研究中 19 株 SS4 和 2 株 SS2 均携带 *fbps* 和 *gapdh* 基因，这从基因层面初步揭示了 SS4 和 SS2 均具有生物被膜形成能力的原因。此外，JSxu18-4 (2+) 和 JSxu18-5 (1+) 同为 *fbps*+*gapdh*+ 型菌株，生物被膜形成能力也有差异，提示 SS 生物被膜形成能力不仅与 *fbps* 和 *gapdh* 基因存在与否相关，还可能受基因表达量影响。细菌生物被膜形成能力与致病性密切相关。一方面，细菌可依靠生物被膜抵抗宿主免疫应答，同时持续、缓慢释放浮游菌，引发慢性感染；另一方面，生物被膜的存在会影响细菌释放毒力因子，从而导致菌株毒力减弱^[7]。张寿明^[20]研究发现 SS 生物被膜能促发小鼠脑膜炎，感染被膜态 SS 的小鼠表现为严重的共济失调、身体僵直和抽搐，而且脑膜炎相关细胞因子(CCL2、IL-6、TLR2)水平高。这为研究 SS4

引起小鼠脑膜炎的原因提供了新的参考。

国内外常用的 SS 分型方法有血清分型和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。与基于荚膜多糖位点的血清分型相比, MLST 可以对所有 SS 分离株分型, 包括血清未定型菌株。SS 的 ST 型多样, 在不同血清型 SS 中流行情况各异, 而且与血清型呈交叉相关。本研究结果显示, 2 株 SS2 参考菌株分别为 ST1 和 ST7, 这与国内外 SS2 分离株流行情况相符^[2]; 19 株 SS4 的优势 ST 型为 ST94, 这与国内外报道的 SS4 分离株流行情况并不完全相同。我国江沪和华南地区发病猪中 SS4 优势 ST 型为 ST850, ST94 仅检出 1 株, 也来源于发病猪, 健康猪中优势 ST 型为 ST1006, 泰国、美国发病猪中 SS4 分离株流行 ST 型均为 ST94, 与本研究结果一致^[2-3,5,21]。表明 SS4 流行 ST 型与分离地区和猪体健康状态等因素相关。SS 作为链球菌属成员, 具有高度动态、开放的泛基因组, 常通过选择、抗原变异和基因水平转移方式发生进化, 因此基因型多样^[22]。本研究中, 19 株 SS4 有 3 种 ST 型, 除流行的 ST94 外, 其余 2 种(ST1158 和 ST1224)均为新发现的 ST 型。在局部地区 SS4 分离株中流行的 ST94 菌株与同一血清型的 ST1158 和 ST1224 菌株管家基因相似率低, 处于不同进化分支, 亲缘关系远, 与 SS2 中流行的 ST1、ST7 菌株管家基因相似率高, 处于同一进化分支, 亲缘关系近。说明 SS4 和 SS2 之间可能存在基因水平转移, 使得不同血清型菌株间亲缘关系相近, 也进一步说明 MLST 比血清分型更适用于跨区域地研究 SS 种群结构和遗传进化关系, 可为疾病溯源提供理论依据。

4 结论

19 株 SS4 分离株的培养及形态学特性均一,

生化特性多样, 毒力基因型和 ST 型组成复杂, 普遍具有生物被膜形成能力, 对小鼠具有强致病性。

REFERENCES

- [1] Prüfer T L, 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, Lyu 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]. Clinical 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, 2018, 37(5): 917-925
- [6] 李丽, 黄良宗, 谢博, 张海龙, 顾万军. 9 型猪链球菌广东株的分离鉴定和基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(4): 1016-1026
Li L, Huang LZ, Xie B, Zhang HL, Gu WJ. Isolation, identification and gene sequence analysis of *Streptococcus suis* serotype 9 strain from Guangdong[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(4): 1016-1026 (in Chinese)
- [7] 陈传荣, 韩敏敏, 张乃嘉, 王婉冰, 姚焱彬, 肖珊, 李郁. 腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜与耐药性及毒力的相关性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2234-2241
Chen CR, Han MM, Zhang NJ, Wang WB, Yao YB, Xiao S, Li Y. Association of biofilm formation with drug-resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated

- from diarrhea piglet[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2234-2241 (in Chinese)
- [8] King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(10): 3671-3680
- [9] 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 型制苗用菌株的筛选[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)
- [10] 邹灵秀. 牛源 A 型多杀性巴氏杆菌溶血特性分析及灭活疫苗候选菌株筛选[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2013
- Zou LX. Characterisation of the haemolytic phenotype of bovine *Pasteurella multocida* serotype A and screening of the inactivated vaccine candidate strain[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2013 (in Chinese)
- [11] 康立超, 韩素娟, 王静梅, 薄新文, 马勋. 羊源肠球菌溶血性的检测[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 924-928
- Kang LC, Han SJ, Wang JM, Bo XW, Ma X. Detecting hemolysis of *Enterococcus* from sheep[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 924-928 (in Chinese)
- [12] Wang SJ, Lyu C, Duan GX, Meng FD, Yang YB, Yu Y, He XJ, Wang ZZ, Gottschalk M, Li GW, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 infection causes host immunomodulation through induction of thymic atrophy[J]. Infection and Immunity, 2020, 88(4): 1-22
- [13] 张振苹. 黄河口地区致病性猪链球菌分离鉴定与主要毒力因子的 PCR 检测[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2010
- Zhang ZP. Isolation and identification of pathogenic *Streptococcus suis* of the Huanghe river mouth area and detection of virulence associated factors by PCR assay[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [14] Wei ZG, Li R, Zhang AD, He HK, Hua YF, Xia J, Cai XH, Chen HC, Jin ML. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 137(1/2): 196-201
- [15] Huan H, Jiang L, Tang L, Wang Y, Guo S. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* strains from swine in Jiangsu province, China[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(6): 1606-1612
- [16] Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2/3/4): 819-825
- [17] He ZX, Pian YY, Ren ZQ, Bi LL, Yuan Y, Zheng YL, Jiang YQ, Wang FK. Increased production of suilysin contributes to invasive infection of the *Streptococcus suis* strain 05ZYH33[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 10(6): 2819-2826
- [18] 孙莹莹. 脑膜炎型与非脑膜炎型猪链球菌诱导宿主炎症细胞因子分泌的比较[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2016
- Sun YY. Comparison of inflammatory cytokines secretion induced by meningitis and non-meningitis *Streptococcus suis*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2016 (in Chinese)
- [19] 王帅. 芦丁干预 *S. suis* 生物被膜的形成及其对 *cps* 基因簇和毒力基因表达的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017
- Wang S. Rutin inhibits the formation of *S. suis* biofilm and its effects on the expression of *cps* gene cluster and virulence genes[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [20] 张寿明. 生物被膜对猪链球菌脑膜炎形成的影响和 MS2 纯化技术筛选猪链球菌 RNA 结合蛋白[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2018
- Zhang SM. Influence of biofilm on *Streptococcus suis* meningitis in a mouse model and MS2 purification technique for enriching *Streptococcus suis* RNA binding protein[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [21] Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG. Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(9): 1-42.
- [22] Shelyakin PV, Bochkareva OO, Karan AA, Gelfand MS. Micro-evolution of three *Streptococcus* species: selection, antigenic variation, and horizontal gene inflow[J]. BMC Evolutionary Biology, 2019, 19(1): 83