

猪链球菌 2 型的分离鉴定及猪场带菌情况调查

张广斌, 李 舫, 袁东芳, 沈美艳

(山东畜牧兽医职业学院, 山东潍坊 261061)

摘要: 2016年10月山东省潍坊市某猪场的产房仔猪出现疑似猪链球菌感染病例。为准确诊断和进一步防控猪链球菌病, 对病例进行了细菌分离培养、革兰氏染色、生化试验、16S RNA 基因鉴定和动物接种试验等, 最终鉴定为猪链球菌 2 型感染; 对该场的产房、保育猪舍、育肥猪舍、母猪舍进行鼻腔拭子采集, 以特异性引物通过 PCR 检测 16S RNA 基因和猪链球菌 2 型荚膜多糖基因 (*cps2*), 结果分离到了猪链球菌。检测发现, 该场除产房仔猪携带猪链球菌 2 型外, 其他猪舍均没有猪链球菌 2 型被检出。

关键词: 猪链球菌 2 型; 细菌鉴定; 带菌情况调查

中图分类号: S855.1+1 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2017) 09-0092-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.09.025

Isolation and Identification of *Streptococcus suis* type 2 and Investigation of Bacteria Carrying Status in a Swine Farm

Zhang Guangbin, Li Fang, Yuan Dongfang, Shen Meiyang

(Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang, Shandong 261061)

Abstract: A suspected case of *Streptococcus suis* infection was detected in piglets in delivery room of a farm in Weifang city of Shandong province in October 2016. For accurate diagnosis and further prevention and control of *Streptococcus suis* disease, the bacterium in the case was isolated and identified by culturing, Gram's staining, biochemical testing, gene identification and animal experiment. The results showed that the case was an infection of the *Streptococcus suis* 2 (SS2). Then, the nasal swabs were collected from the delivery room, weaning swine house, fattening house and the mother feeding stalls. Genes of 16S RNA and *cps2* were detected by PCR. The results indicated that only circulated SS2 in the delivery room, but not in the other houses.

Key words: *Streptococcus suis* type 2; identification of bacterium; investigation of germ-carrying condition

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, *S.suis*) 是一种革兰氏阳性、溶血性兼性厌氧球菌, 根据形态学、生化特征和菌体表面荚膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS) 抗原特性等的不同, 将其分为 35 个血清型 (1~34 和 1/2)。但 Hill 等^[1] 从基因水平证实其中的 32 及 34 型为鼠口腔链球菌 (*Streptococcus orisratti*), 因此现在一般认为有 33 个血清型, 其中 1、2、1/2、7、9、14 型具有致病性, 以 2 型 (SS2) 毒力最强, 分布范围最广^[2-4]。2016 年 10 月山东省潍坊市一猪场产房

仔猪出现疑似链球菌感染的散发病例。在进行诊断治疗的同时, 对该场的所有猪舍进行了猪链球菌带菌状况检测, 并为其提供了进一步的防控措施。

1 病猪和猪场情况

猪场产房仔猪 132 头, 20 日龄, 有 2 头出现症状。其中, 1 头精神略不振; 另 1 头不食, 呼吸急促, 咳嗽, 眼结膜潮红, 流泪, 鼻孔有较多量鼻液流出, 腹下皮肤呈紫红色, 有出血点。剖检病重猪见皮下组织出血, 鼻黏膜充血、出血, 气管充血, 肺充血肿胀; 全身各处淋巴结不同程度肿大、充血和出血; 心包有淡黄色积液, 心内膜有细小出血点;

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303041)

通信作者: 沈美艳

脾脏暗红色肿大；肾肿大，切面有小的出血点。

该猪场整体卫生状况良好，猪群整体无不适表现。产房温度较高，有刺激性气味，但保育舍、育肥舍和母猪舍空气良好，地面较为洁净。

2 主要试剂

PCR 试剂 (10×PCR Buffer、dNTPs、Taq 酶)、DL2000 DNA Marker，购自宝生物工程（大连）有限公司；THB 培养基、鲜血琼脂平板、多粘菌素 B、萘啶酮酸，均购自青岛海博生物技术有限公司；药敏纸片、细菌微量生化反应管、革兰氏染色液，购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

3 样品采集

3.1 病猪样品采集

无菌采集病猪的血液以及气管和肺组织，置于无菌容器中。

3.2 健康猪鼻腔拭子采集

对该猪场产房、保育舍、育肥舍、母猪舍的猪进行鼻腔分泌物采集。用无菌棉棒蘸取 THB 肉汤，在猪的鼻腔粘膜表面轻轻擦拭；收集鼻腔分泌物，用无菌剪刀剪取棉花头，置于装有 THB 肉汤培养基（含 15 μg/mL 多粘菌素 B，30 μg/mL 萘啶酮酸）的试管中。

4 试验方法

4.1 细菌的分离、初步鉴定及敏感药物筛选

4.1.1 细菌分离培养和形态鉴定。无菌取病死猪的肺组织，分区划线接种于鲜血琼脂平板上，37℃ 培养 24 h，观察细菌生长特性。挑取单个菌落，对其进行革兰氏染色镜检，观察细菌形态。

4.1.2 细菌生化试验。挑取单个分离菌，将其接种于细菌微量发酵管中，37℃ 培养 18~24 h，观察并记录生化反应结果。

4.1.3 16S rRNA 基因鉴定。参照文献^[5]报道的方法合成 1 对用于扩增猪链球菌 16S rRNA 基因序列的特异性引物（表 1）。引物由宝生物工程（大连）有限公司合成。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应，PCR 反应体系（25 μL）包括：DNA 模板 1.0 μL，上、下游引物各 1.0 μL，Taq 酶 0.5 μL，dNTP 2.0 μL，10×PCR Buffer 2.5 μL，去离子水

18.0 μL。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，57℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1.5 min，扩增 35 个循环；72℃ 延伸 7 min，4℃ 终止反应。对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，将 PCR 产物回收测序。

4.1.4 动物接种试验。将分离菌的纯培养物接种于 THB 肉汤培养基中，37℃ 培养 18~24 h，然后计算活菌数。选取 15 只健康小白鼠，分为 3 组：第 1 组，每只腹腔注射菌液 0.2 mL（ 1.8×10^8 CFU/mL）；第 2 组，每只注射等量 THB 肉汤；第 3 组，为正常对照。小鼠攻毒后连续观察 7 d，记录其临床症状及死亡情况。

4.2 猪场带菌情况调查

4.2.1 增菌培养。将含有棉拭子的 THB 肉汤（含 15 μg/mL 多粘菌素 B，30 μg/mL 萘啶酮酸）置于 37℃ 振荡培养箱中培养 6~8 h，使菌液变浑浊。

4.2.2 DNA 提取。取 1 mL 细菌悬液，10 000 r/min 离心 2 min，弃上清，用 TE 洗涤 1 次，200 μL TE 重悬菌体，煮沸 10 min 后，10 000 r/min 离心 2 min，吸取上清液，将其作为 PCR 检测的模板。利用猪链球菌种 16S rRNA 基因的特异性引物进行 PCR 检测。

4.2.3 猪链球菌 2 型 *cps2* 基因检测。参照文献^[5-6]报道的方法合成猪链球菌 2 型 *cps2* 特异性引物（表 1），引物由宝生物工程（大连）有限公司合成。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系（50 μL）包括：DNA 模板 2.0 μL，上、下游引物各 2.0 μL，Ex Taq 酶 1.0 μL，dNTP 4.0 μL，10×PCR Buffer 5.0 μL，去离子水 34.0 μL。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，57℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1.5 min，扩增 35 个循环；72℃ 延伸 7 min，4℃ 终止反应。对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 猪链球菌的检测引物

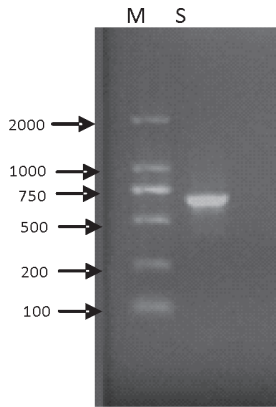
目的基因	引物序列 (5' → 3')	退火温度 (°C)	产物长度 (bp)
16S rRNA	P1: GCATAACAGTATTTACCGCATGGTAGAT P2: TTCTGGTAAGATACCGTCAAGTGAGAA	57	330
<i>cps2</i>	P1: CAAACGCAAGGAATTACGGTATC P2: GAGTATCTAAAGAATGCCTATTG	57	675

4.2.4 猪链球菌 *cps2* 基因检测。将 16S rRNA 基因检测阳性的样品进行 *cps2* 基因检测，PCR 反应体系和方法同 4.2.3，对 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

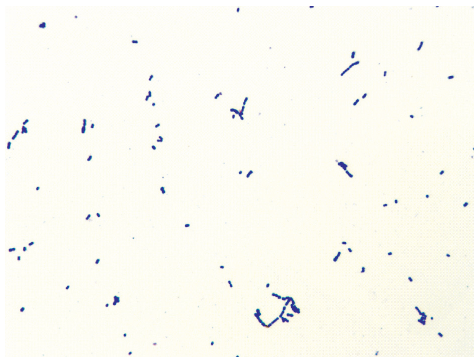
5 试验结果

5.1 病例中的细菌分离鉴定

从患病猪血液、肺脏中分离到具有 β -溶血环的革兰氏阳性链球菌。该分离菌能够分解葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖和甘露醇，不分解山梨醇、木糖和肌醇，甲基红试验阳性，不产生硫化氢，符合链球菌生化特征。用猪链球菌 16S rRNA 基因的特异性引物进行 PCR 扩增，对 PCR 产物测序后，利用 NCBI 的 BLAST 工具，将分离菌基因序列与数据库中的序列进行了同源性比对分析，结果显示该菌与猪链球菌序列（GenBank 序列号 CP007497.1）同源性为 99%。因此，结合革兰氏染色镜检结果，确定分离菌株为猪链球菌（图 1、图 2）。



M.DNA 标准 DL2000; S. 鼻拭子分离纯化菌 DNA
图 1 产房猪链球菌 2 型检测结果



革兰氏阳性球菌，呈双或短链排列
图 2 产房猪链球菌 2 型纯化菌株革兰氏染色结果

5.2 动物试验

菌液接种组小鼠于接种后 6 h 出现精神萎靡，体温升高，36 h 后全部死亡。剖检见全身出血，取心血凝块涂片后革兰氏染色镜检，视野中可见大量呈蓝紫色短链状球菌。THB 接种组和无接种组小鼠正常。

5.3 猪场中猪链球菌带菌情况调查

该猪场产房内 16S rRNA 基因和 *cps2* 基因检出率分别为 60% 和 5%，保育舍、育肥舍和母猪舍的猪链球菌 16S rRNA 基因检出率较低，未检出 *cps2*（表 2）。

表 2 不同猪舍 16S rRNA 和 *cps2* 基因检测结果

目的基因	产房		保育舍		育肥舍		母猪舍	
	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
16S rRNA	12/20	60%	1/20	5%	2/20	10%	0/20	0%
<i>cps2</i>	1/20	5%	0/20	0%	0/20	0%	0/20	0%

6 讨论

该猪场为猪链球菌 2 型感染散发。由于对发病猪进行了及时隔离和治疗，未再次出现病例。因此，及时正确的诊断、隔离和敏感药物的使用对猪链球菌防控非常重要。患病猪作为传染源，如在早期进行隔离，并做好猪舍内消毒管理，就可以很好地阻止本病在猪群中的传播。

所有品系的猪均可感染猪链球菌。2~6 周龄仔猪感染后，会引起典型的临床症状或突然死亡，而成年猪和母猪感染后，往往没有明显的临床症状。在该猪场所有猪舍进行猪链球菌的检测中发现，该场各猪舍卫生状况良好，猪舍地面干燥，除产房外，猪舍内无明显刺激气味。由于该场曾发生过有猪链球菌感染，除对产房仔猪未进行猪链球菌疫苗外，对其他舍的猪群均进行了免疫。该养殖场对易感性高的幼龄仔猪未进行免疫，而且为了保温导致通风不良，这是导致此次猪链球菌感染的重要原因。因此，科学的饲养管理、良好的生物安全措施和有效的免疫接种对猪链球菌病的控制行之有效。而养殖过程舍内空气质量与保温这对矛盾需要谨慎处理。

在对该猪场进行猪链球菌带菌情况调查中, 育肥舍、保育舍和母猪舍均未检出猪链球菌 2 型, 说明该菌的传播能力很弱。同时检测到有 16S rRNA 基因检测阳性样品, 说明该场存在其他血清型的猪链球菌。在猪链球菌各血清型中, 2 型的毒力最强, 1、1/2、7、9、14 型也具有一定的致病性, 因此猪场中其他血清型链球菌的存在, 同样是一种威胁。建议猪场进行多价疫苗接种, 对免疫效果进行检测, 进一步加强卫生消毒, 完善生物安全措施, 这将对整个猪场链球菌病的防控更加有效。

参考文献:

[1] HILL J E, GOTTSCHALK M, BROUSSEAU R, et al. Biochemical analysis, cpn 60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 107 (1/2) : 63-69.

[2] GOTTSCHALK M, SEGURA M. The pathogenesis of

the meningitis caused by *Streptococcus suis*: Unresolved questions[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 76: 259-272.

[3] LI G, LU G J, QI Z M, et al. Morin Attenuates *Streptococcus suis* Pathogenicity in Mice by Neutralizing Suilylin Activity. *Frontier in Microbiology*[J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 20 (8) : 1-11.

[4] GOTTSCHALK M, SEGURA M, XU J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. *Anim. Health Res. Rev.*, 2007, 8 (1) : 29-45.

[5] ZHU H D, ZHOU J M, NI Y X, et al. Contribution of Eukaryotic-Type Serine/Threonine Kinase to Stress Response and Virulence of *Streptococcus suis*[J]. *Plos One*, 2014, 9 (3) : 1-12.

[6] NGO T H, TRAN T B C, HO D T N, et al. The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in *Streptococcus suis* isolated from humans in southern Vietnam, 1997-2008[J]. *Infectious diseases*, 2011, 11 (6) : 1471-2334.