

中国10省市健康母猪体内猪链球菌致病血清型分布及其耐药性研究

张纯萍 宁宜宝 张仲秋 宋立 丘惠深 高和义 范学政

【摘要】 目的 为调查中国健康母猪体内猪链球菌的主要致病血清型分布和不同血清型猪链球菌的耐药性差异。方法 采集国内10个省市的健康母猪扁桃腺体并从中分离鉴定出猪链球菌421株,经与标准血清的凝集反应了解其主要致病血清型分布,并用微量肉汤法对不同血清型的猪链球菌进行耐药性检测,经统计分析了解不同血清型猪链球菌的耐药性差异。结果 健康母猪体内所分离猪链球菌的优势(致病)血清型依次为9、3和7型,所占比例分别为26.6%、23.5%和15.7%。在能分型的其他血清型中,猪链球菌2型所占的比例为7.4%;耐药性研究结果表明,不同血清型的猪链球菌对抗菌药物的耐药性不同,猪链球菌2型对所测12种药物的敏感性最强。结论 健康母猪体内猪链球菌的致病血清型分布结果再次证明猪链球菌是一种条件性致病菌,不同血清型的猪链球菌感染应根据抗生素敏感性测试结果选用不同的药物进行合理防治。

【关键词】 猪链球菌;健康母猪;血清型;耐药性

Distributions of pathogenic capsular types and in vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy sows from 10 provinces in China
ZHANG Chun-ping*, NING Yi-bao, ZHANG Zhong-qiu, SONG Li, QIU Hui-shen, GAO He-yi, FAN Xue-zheng. *Department of Inspection Technology Research, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Corresponding author: NING Yi-bao, Email: ningyibao@ivdc.gov.cn

【Abstract】 **Objective** To determine the distributions of major pathogenic capsular types and in vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy sows in China. **Methods** Tonsil specimens of clinically healthy sows from 10 different provinces in China were collected, a total of 421 *S.suis* were isolated. Capsular types of *S.suis* were decided using the sera agglutination reaction. Antimicrobial susceptibility testing was performed using a broth microdilution method and the differences between serotypes were decided statistically. **Results** The prevalent capsular types of *S.suis* isolated from clinically healthy sows were 9 (26.6%), 3 (23.5%) and 7 (15.7%) types, respectively. 7.4% of isolates were confirmed to be *S.suis* type 2. Overall, differences in antimicrobial susceptibility among serotypes of *S. suis* were found. By comparison, lower resistance was observed for *S.suis* type 2 from clinically healthy sows. **Conclusion** The prevalence of pathogenic *S.suis* serotypes from clinically healthy sows again indicates *S.suis* is a conditional pathogenic bacterium. Differential prevention and treatment regimes should be considered according to antimicrobial susceptibility of different serotypes of *S.suis*.

【Key words】 *Streptococcus suis*; Clinically healthy sows; Capsular types; Antimicrobial susceptibility

猪链球菌是危害现代养猪业的一种条件性致病菌,也是一种重要的人畜共患病原微生物。根据荚膜多糖抗原的不同,通常将猪链球菌分为35个血清

型(1~34型和1/2型),但是Hill等^[1]的研究表明猪链球菌32型和34型的生化特点以及cpn60、16S rDNA的序列明显不同于其他血清型的猪链球菌,应该归属于*Streptococcus orisrattil*,而不是猪链球菌,因此目前来看,猪链球菌至少可分为33个血清型。但是并非所有血清型的猪链球菌都能引起猪发病,目前国外的研究发现1~3、7~9和1/2型为流行的优势致病血清型,其中猪链球菌2型是引起各养猪发达国家猪只发病的最主要血清型,也是感染人的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.008

基金项目: 国家科技攻关计划资助项目(2004BA519A60); 国家“十一五”科技支撑计划子课题资助项目(2006BAK02A03-1)

作者单位: 100081北京,中国兽医药品监察所检测技术研究室(张纯萍、宁宜宝、宋立、丘惠深、高和义、范学政); 中国动物疾病预防控制中心(张仲秋)

通信作者: 宁宜宝, Email: ningyibao@ivdc.gov.cn

最主要血清型^[2,3]。然而这些致病血清型的猪链球菌也都能从健康猪体内分离到^[4]。由于猪链球菌病主要发生在哺乳和断奶仔猪,而健康的带菌母猪作为后代猪链球菌感染的主要来源,了解健康母猪体内猪链球菌的血清型分布(尤其是致病血清型的分布)以及不同血清型猪链球菌的耐药性情况对于仔猪猪链球菌病的防控和公共卫生具有重要意义。本试验分别从广东、广西、安徽、江西、山东、北京、河南、河北、辽宁和四川 10 个省市的 13 个种猪场采集临床健康母猪的扁桃体,从中分离鉴定出 421 株猪链球菌并对其致病血清型的分布进行调查,以期初步了解健康母猪体内猪链球菌的优势致病血清型分布,为猪链球菌病的防控提供必要流行病学资料;同时检测不同血清型的猪链球菌对抗生素的耐药性并进行统计分析,以了解主要致病血清型的猪链球菌之间的耐药性差异,为猪链球菌病的防控提供临床用药指导。

材料与方法

1. 材料:

(1)菌株:猪链球菌 421 株,全部分离自健康母猪的扁桃体;猪链球菌 1~3、7~9 型标准血清购自丹麦哥本哈根国立血清研究所;质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619 和金黄色葡萄球菌 ATCC29213,均购自中国药品生物制品检定所。

(2)抗生素:青霉素、红霉素、氨苄西林、盐酸恩诺沙星、四环素、延胡索酸泰妙菌素、替米考星、氯霉素和甲氧苄啶由中国兽医药品监察所提供;磺胺异恶唑和磺胺甲恶唑由中国药品生物制品检定所提供。氯洁霉素、头孢噻唑钠由齐鲁动物保健品有限公司提供。

2. 方法:

(1)血清学分型:根据标准血清的试验操作说明,采用改进后的玻片凝集试验进行,具体操作:①取一滴磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4),挑取新鲜菌落与其混匀,制成菌悬液;②取一滴标准血清与菌悬液混匀;③在混合物上立即加上盖玻片;④用相差显微镜(100×,油浸透镜)观察混合物,该反应可稳定 30 min;⑤如果观察到细菌出现膨胀且凝集,即可判定为阳性反应;⑥同时做不添加血清的阴性对照。

(2)耐药性测定:根据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)标准^[5,6],按照药敏测试的药物选择要求以及采样猪场的临床用药情况,共选择 12 种药物进行敏感性测试,测试方法为微量肉汤稀释法^[7]。

结 果

1. 血清分型:用相差显微镜在油镜下观察,与不加抗体血清的阴性对照相比,若添加标准血清后细菌出现膨胀(即有荚膜)且凝集在一起,即可判定为阳性反应。需要注意的是,由于猪链球菌 1/2 型与 1 型和 2 型血清均发生凝集反应,因此本试验将与 1 型(或 2 型)血清发生凝集的菌株继续与 2 型(或 1 型)血清进行凝集反应以确定是否属于 1/2 型。如果某菌株与 2 型和 1 型标准血清均发生凝集且出现菌体变大的现象,即可判定该菌株为猪链球菌 1/2 型,若仅与 1 型(或 2 型)标准血清出现阳性反应,则鉴定为 1 型(或 2 型)。

由健康母猪体内猪链球菌分离株的致病血清型分布结果可知(表 1),健康母猪体内分离的 421 株猪链球菌中不属于 1~3、7~9 和 1/2 型的猪链球菌仅有 65 株,占有猪链球菌分离株的 15.4%;而 84.5% 的猪链球菌分离株属于所测定的致病血清型(1~3、7~9 和 1/2 型)。其中最流行的致病血清型为 9 型,共有 112 株(26.6%)猪链球菌为此种血清型;其次为 3 型和 7 型,血清学凝集结果显示分别有 99 株和 66 株猪链球菌为这两种血清型,分别占全部猪链球菌分离株的 23.5% 和 15.7%。由此可见,猪链球菌 9、7 和 3 型不仅是健康母猪体内猪链球菌分离株的优势致病血清型,同时也是健康母猪体内猪链球菌分离株的优势血清型。

表 1 我国 10 省市的 13 个种猪场健康母猪体内猪链球菌分离株的致病血清型分布

血清型	菌株数	构成比(%)
1	22	5.2
2	31	7.4
3	99	23.5
7	66	15.7
8	9	2.1
9	112	26.6
1/2	17	4.0
其他	65	15.4
合计	421	99.9

在能分型的其他血清型中,分别有 31 株和 17 株分离株为猪链球菌 2 型(7.4%)和 1/2 型(4.0%);1 型分离株为 22 株,占有分离株数的 5.2%;9 株为猪链球菌 8 型(2.1%)。

2. 不同血清型的耐药性测定:由于部分血清型的猪链球菌株数较少,耐药性结果代表性差,因此本试验仅比较了菌株数在 30 株以上的猪链球菌血清型之间(即 2、3、7 和 9 型)的耐药性差异(表 2)。

表2 健康母猪体内不同致病血清型猪链球菌的耐药率(%)和MIC₉₀(μg/ml)值

药 物	2型		3型		7型		9型	
	MIC ₉₀	耐药率	MIC ₉₀	耐药率	MIC ₉₀	耐药率	MIC ₉₀	耐药率
青霉素	0.25	3.2	2	8.1	4	10.6	4	10.7
氨苄西林	0.25	0.0	0.5	5.0	0.25	3.0	0.5	5.4
红霉素	8	35.5	>8	40.4	>8	100.0	>8	80.4
氯洁霉素	4	38.7	>4	74.7	>4	100.0	>4	75.0
恩诺沙星	2	9.7	>4	41.4	>4	34.8	4	27.7
四环素	>8	90.3	>8	98.0	>8	100.0	>8	91.1
头孢噻吩	2	3.2	8	15.2	4	9.1	8	29.5
泰妙菌素	16	9.7	32	19.2	>32	30.3	>32	40.2
替米考星	64	35.5	>64	48.5	>64	75.8	>64	69.6
氟霉素	16	3.2	64	24.2	64	30.3	32	16.1
磺胺异恶唑	>512	71.0	>512	100.0	>512	89.4	>512	75.9
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	16/304	19.4	>16/304	89.9	>16/304	68.2	>16/304	49.1

由表2可知,4种血清型的猪链球菌对12种抗菌药物的耐药性不同,但是均对四环素和磺胺异恶唑表现为高度耐药,其中对四环素的耐药率均>90%,而对磺胺异恶唑的耐药率均>70%,4种血清型的猪链球菌对这两种药物的MIC₉₀值均大于所测定的最高药物浓度;与其他抗生素相比,4种血清型的猪链球菌对大环内酯类(红霉素、替米考星)、林克酰胺类(氯洁霉素)的耐药率也相对较高,其中7型和9型的猪链球菌对这两类抗生素的耐药率都在69%以上,而且MIC₉₀值也均大于测定的最高药物浓度;比较来看,4种血清型的猪链球菌对β-内酰胺类药物(包括青霉素、氨苄西林和头孢噻吩)的敏感性最高,而在这一类药物中,又以对氨苄西林最为敏感。*t*检验结果表明,猪链球菌2型与3、7、9型对抗菌药物耐药率之间的差异有统计学意义(*P*值分别为0.002、0.0004、0.0002),2型猪链球菌的耐药率明显低于其他三种血清型的耐药率;而3、7型与9型对抗生素的耐药性之间不存在明显的差异(*P*值分别为0.271、0.468和0.052)。对12种抗菌药物耐药率的 χ^2 检验结果表明,四种血清型的猪链球菌除对青霉素和氨苄西林的敏感性无明显差异外,对其余10种抗菌药物的耐药性均具有明显的差异(*P*<0.05)。

讨 论

1. 猪链球菌的血清型分布:本研究中猪链球菌分离株的优势致病血清型依次为9、3和7型,这三种血清型也是健康母猪分离株的优势血清型;在其他主要致病血清型中,猪链球菌2型所占的比例为7.4%,这与国内对健康猪分离株的研究结果基本一致。鞠爱萍等^[8]用PCR方法对我国苏中地区2005年和2006年正常猪群中的1(14)、2(1/2)、7和9型猪

链球菌的携带情况进行调查,结果表明最流行的血清型均为猪链球菌7型和9型。在2005年,7型和9型的比例分别为11.3%和29.5%;而在2006年这两种血清型的比例分别为25.8%和20.0%,而2(或1/2)型在2005和2006年的分布则分别为8.5%和2.4%。在健康屠宰猪猪链球菌2型的流行病学方面,熊毅等^[9]用PCR方法检测了广西地区10个县屠宰猪扁桃体中猪链球菌的带菌情况,总共从667株猪链球菌中鉴定出猪链球菌2(或1/2)型33株(4.9%)。

但是病猪体内猪链球菌的血清型分布结果明显不同于健康猪分离株,大多数国家病猪分离株的优势血清型分布都以猪链球菌2型为主。Wisselink等^[10]检测欧洲7个国家(比利时、英国、法国、意大利、德国、西班牙和荷兰)411株分离自病猪的猪链球菌的血清型分布,其中最流行的血清型为2型,占有分离菌株的32%,其次是9型和1型。Martinez等^[11]研究了巴西51株病猪分离株的血清型分布,其中58.8%的菌株为2型,其次分别为3、7、1和14型。在加拿大和美国,猪链球菌2型也是从病猪体内分离到的主要血清型,其次分别为3型和7型^[12]。在我国,虽然缺乏病猪分离株的优势血清型调查资料,但是所发生的几次疫情均为猪链球菌2型感染所致,如2005年6—7月间,四川资阳等地暴发的猪链球菌2型疫情,导致人和猪的发病和死亡,造成严重损失。

2. 猪链球菌的耐药性:不同国家对猪链球菌分离株的耐药性研究结果不同,但是基本上都对大环内酯/林克酰胺类、磺胺类和四环素等药物的耐药性较强,而对β-内酰胺类药物则较为敏感,本研究的结果也证实了这一点。Vela等^[12]检测1999—2001年分

离自西班牙的 151 株猪链球菌对常用抗生素的耐药性, 87% 以上的猪链球菌对于四环素、磺胺类药物、大环内酯类药物和氯林可霉素耐药, 而对青霉素的耐药率仅为 4%; Tian 等^[13]对分离自丹麦病猪体内的 103 株 7 型菌株进行耐药性检测, 其中大部分菌株对青霉素敏感, 而对磺胺甲恶唑、红霉素、四环素的耐药率则较高。杨建江等^[14]对我国长春地区分离的 22 株猪链球菌的耐药性研究结果表明, 所有菌株都对青霉素敏感, 而对克林霉素都耐药, 80% 以上的菌株都对环丙沙星、红霉素、阿齐霉素和四环素耐药。

本研究结果还表明猪链球菌对抗菌药物的耐药性存在血清型之间的差异, 即不同血清型的猪链球菌对药物的敏感性不同, 有些存在明显的差异; 比较起来, 猪链球菌 2 型对抗菌药物的敏感性较高, 这与国外的研究结果一致。Wisselink 等^[15]用微量肉汤稀释法检测 404 株猪链球菌对常用的 10 种抗生素的耐药性, 结果表明, 猪链球菌对四环素、替米考星和甲氧苄啶/磺胺甲恶唑的耐药性与血清型具有明显的相关性。Vela 等^[12]证实猪链球菌 9 型对泰乐菌素和氯林可霉素的耐药性明显要比猪链球菌 2 型的耐药性高; 而 Aarestrup 等^[16, 17]也证明猪链球菌 2 型和 7 型对大环内酯类和四环素类药物的耐药性之间存在明显差异; 国内的研究结果也表明与其他耐药性结果相比, 猪链球菌 2 型的耐药性更低, 如研究人员对猪链球菌 2 型的药敏检测结果表明^[9, 18], 猪链球菌 2 型对药物的敏感性明显要高于其他未分型猪链球菌的敏感性^[19, 20]。

本研究结果表明, 健康母猪体内猪链球菌分离株的优势血清型依次为 9、3 和 7 型, 所占比例分别为 26.6%、23.5% 和 15.7%; 7.4% 的猪链球菌为猪链球菌 2 型; 不同血清型的猪链球菌对抗菌药物的耐药性不同, 仅对青霉素和氨苄西林的耐药性没有明显差异, 对另外的 10 种抗菌药物的耐药性均存在明显的差异, 总体来看, 猪链球菌 2 型对抗菌药物最为敏感。不同血清型猪链球菌之间的耐药性差异提示, 针对不同血清型的猪链球菌所引起的疾病, 要采用不同的抗生素防治方案。

(本研究的统计学分析得到沈青春博士的大力协助, 特此志谢)

参 考 文 献

[1] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, et al. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol*, 2005, 107: 63-69.

[2] Higgins R, Gottschalk M. Distribution of *Streptococcus suis*

capsular types in 1996. *Can Vet J*, 1997, 38: 302.

[3] Prieto C, Pena J, Suarez P, et al. Isolation and distribution of *Streptococcus suis* capsular types from diseased pigs in Spain. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1993, 40: 544-548.

[4] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 1997, 21: 381-407.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, approved standard, 2nd ed, M31-A2; Wayne, PA, 2002.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteen informational supplement, M100-S15; Wayne, PA, 2005.

[7] Zhang CP, Ning YB, Zhang ZQ, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Vet Microbiol*, 2008, 131: 386-392.

[8] 鞠爱萍, 王长军, 郑峰, 等. 江苏省中部地区猪链球菌主要致病血清型分子流行病学调查. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(2): 151-154.

[9] 熊毅, 刘棋, 覃芳芸, 等. 广西地区无症状猪中猪链球菌 2 型分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(6): 593-596.

[10] 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. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 237-248.

[11] Martinez G, Pestana de Castro AF, Ribeiro Pagnani KJ, et al. Clonal distribution of an atypical MRP+, EF*, and suilysin+ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Can J Vet Res*, 2003, 67: 52-55.

[12] Vela AI, Moreno MA, Cebolla JA, et al. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Vet Microbiol*, 2005, 105: 143-147.

[13] Tian Y, Aarestrup FM, Lu CP. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Vet Microbiol*, 2004, 103: 55-62.

[14] 杨建江, 韩文瑜, 雷连成, 等. 长春地区猪链球菌对大环内酯和林克酰胺类耐药的分子机制研究. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20: 698-701.

[15] Wisselink HJ, Veldman KT, Van den Eede C, et al. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 2006, 113: 73-82.

[16] Aarestrup FM, Rasmussen SR, Artursson K, et al. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet Microbiol*, 1998, 63: 71-80.

[17] Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol*, 1998, 60: 59-66.

[18] 宋立, 高光, 宁宜宝, 等. 猪链球菌 II 型四川分离株对抗菌药的敏感性分析. *中国兽药杂志*, 2005, 39: 1-5.

[19] 何华西. 猪链球菌病的诊疗. *中国兽医杂志*, 2001, 37: 22-23.

[20] 王丽平, 陆承平, 唐家琪. 猪链球菌对大环内酯类抗生素的耐药性及耐药谱. *南京农业大学学报*, 2004, 27: 81-84.

(收稿日期: 2008-11-19)

(本文编辑: 张林东)