

用斑马鱼检测猪链球菌 2 型的致病力

濮俊毅, 黄新新, 陆承平

(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: 【目的】猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2, SS2) 菌株致病力各异, 以斑马鱼为实验动物, 建立了较为简便可靠的 SS2 致病力检测方法。【方法】选用 1 005 尾 AB 系斑马鱼 (*Danio rerio*) 以检测 SS2 不同分离株的致病力。检测 8 株基因型均为 *mrp⁺ef⁺*、对猪有致病力的 SS2 菌株。【结果】结果斑马鱼接种菌株 12 h 后呈败血症病变, 96 h 内对斑马鱼的半数致死量 (LD₅₀) 在 5.36×10^3 至 5.01×10^4 cfu 之间。上述接种菌株的斑马鱼均从体内重新分离到接种菌。同时检测 1 株基因型为 *mrp⁻ef⁻*、对猪无致病力的 SS2 菌株, 斑马鱼接种后 96 h 内不表现任何病变, 亦不出现死亡, 对斑马鱼的 LD₅₀>10⁶ cfu。SS2 有毒力株和无毒力株对斑马鱼的 LD₅₀ 差异极显著 ($P < 0.01$)。【结论】斑马鱼可作为研究猪链球菌 2 型菌株感染的动物模型。

关键词: 斑马鱼; 猪链球菌 2 型; 半数致死量

Virulence Detection of *Streptococcus suis* Type 2 in Zebrafish

PU Jun-yi, HUANG Xin-xin, LU Cheng-ping

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】Zebrafish (*Danio rerio*) is a new infection model for studying mammal pathogens. 【Method】One thousand and five 80-day-old AB line inbred zebrafish were grouped and infected intraperitoneally with 8 highly virulent strains (*mrp⁺ef⁺*) for pigs of *Streptococcus suis* type 2 (SS2). 【Result】The 50% lethal dose (LD₅₀) were in the range of 5.36×10^3 cfu to 5.01×10^4 cfu at 96 h. The SS2 strains caused high morbidity and mortality in zebrafish. Acute septicemia were observed in inoculated fish. The bacteria inoculated could be reisolated from the infected fish. One strain avirulent (*mrp⁻ef⁻*) for pigs was also inoculated but not lethal for fish, and its LD₅₀ was above 10⁶ cfu. There was a significant difference in LD₅₀ in the SS2 virulent strains and avirulent one ($P < 0.01$). 【Conclusion】Zebrafish is useful for further research of SS2 infection as a new animal model.

Key words: Zebrafish; *Streptococcus suis* serotype 2; 50% lethal dose

0 引言

【研究意义】猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2, SS2) 是一种重要的人畜共患传染病病原, 并且严重威胁养猪业的发展^[1]。而 SS2 的动物致病试验历来是个难题。用普通仔猪进行研究, 发病不规律, 又难以排除隐性带菌。常用的试验动物小鼠、家兔和豚鼠虽有作为 SS2 感染的动物模型报道^[2], 但可重复性差。【前人研究进展】斑马鱼作为遗传学、发育生物学研究的模式生物已经得到了较为广泛的应用^[3]。斑马鱼亦存在着较为完整的特异性免疫系统^[4], 而且体

型小, 易于实验室养殖, 便于开展大规模的试验。Jesse 等^[4]首创以斑马鱼为模型, 研究海豚链球菌 (*S.iniae*) 和化脓链球菌 (*S.pyogenes*) 的致病机理。【本研究切入点】斑马鱼是否对 SS2 易感, 是否也能借助斑马鱼模型来研究不同毒力的 SS2 菌株, 迄今尚未见报道, 值得研究。【拟解决的关键问题】建立 SS2 菌株感染研究的斑马鱼模型, 为研究 SS2 菌株致病机理、疫苗筛选等提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2005-11-20; 接受日期: 2006-11-23

基金项目: 国家“973”项目 (2006CB504403)

作者简介: 濮俊毅 (1981-), 男, 上海人, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: pujunyicn@yahoo.com。通讯作者陆承平 (1945-), 男, 上海市人, 教授, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。Tel: 025-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

1.1.1 菌株 SS2 江苏分离株 HA9801, 系由 1998 年从江苏某地患败血症死亡的猪体分离鉴定^[5]; 江苏分离株 JR05730 株, 四川分离株 ZY05719、ZY05721、ZY05722、260、ZG05464 株, 均系 2005 年 7 月从病猪或患者体内分离^[6], 由本室保存。ATCC43765 参考株由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠。上述菌株基因型均为 *mrp⁺ef⁺*。SS2 无毒株 T15, 由荷兰国家兽医研究所 Smith 博士惠赠, 对猪无致病力^[7], 其基因型为 *mrp⁻ef⁻*。

1.1.2 斑马鱼 斑马鱼采用 80 日龄 AB 纯系斑马鱼 1 005 尾, 由中国水产科学院珠江水产研究所提供。参照 Westerfield^[9]方法饲养。观察 1 周, 确认斑马鱼健康后进行试验。试验期间, 水温为 (29±1) °C。

1.1.3 酶和其它试剂 Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, PCR 产物胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, dNTPs 为南京生兴公司产品。各基因引物序列如下: *cps 2* 合成相关基因上游引物: 5'-tgatag tga ttt gtc ggg agg g-3', 下游引物: 5'-gag tat cta aag aat gcc tat tg-3'; *mrp* 基因上游引物: 5'-cag atg tgg acc gta gac c-3', 下游引物: 5'-gga taa tca cca gca gga a-3'; *ef* 基因上游引物: 5'-gct acg acg gcc tca gaa atc-3', 下游引物: 5'-tgg atc aac cac tgg tgt tac-3'。引物合成及测序均由 Invitrogen 公司完成。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 各菌株纯化鉴定后, 用 THB 血平板复苏菌株, 37°C 培养 24 h, 挑单菌落接种于 THB 肉汤, 培养 18 h, 再按 1% 量接种于 THB (Todd Hewitt Broth) 肉汤, 培养 12 h 后, 经 6 000 r/min 离心 15 min, 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH7.4) 洗两遍, 平板计数后备用。

1.2.2 斑马鱼的分组接种及病变观察 取各 SS2 菌株菌悬液, 10 倍稀释, 各设 6 个稀释度, 每个稀释度接种 15 尾斑马鱼, 腹腔注射接种 10 μl 悬液。同时设对照组, 注射等量 THB 肉汤培养基。接种后, 各组分开饲养于不同的水族箱中, 定时观察。

1.2.3 斑马鱼半数致死量 (LD₅₀) 的测定 接种后 96 h, 统计死亡数量, 按 Reed-Muench^[10]法计算 LD₅₀。

1.2.4 细菌的分离与鉴定 无菌操作从死亡斑马鱼脏器取样, 划线接种于 THB 平板培养。观察菌落形态, 染色镜检。

参照 Smith H E 等^[7,11,12]的方法, 设计相应的引物和反应体系, 用 PCR 方法分别检测分离菌落的荚膜多糖 (capsular polysaccharides, CPS) 合成相关、溶菌酶释放蛋白 (muramidase-released protein, MRP)、

胞外蛋白因子 (extracellular factor, EF) 基因, 测序验证。*Cps 2* 基因是一个重要的毒力因子, 具有 SS2 种属特异性, PCR 检测有相应大小的条带, 并测序验证后, 即视为 SS2 菌株。按文献方法抽提细菌基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板。PCR 反应体系: 细菌基因组 DNA 3 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 4 μl, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μl, 2 条引物各 0.5 μl (20 pmol·μl⁻¹), TaqDNA 聚合酶 (5U·μl⁻¹) 0.5 μl, ddH₂O 调整终体积至 50 μl。PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性, 55~57°C (因引物不同而异) 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min; 最后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 切下预计大小的条带进行胶回收纯化, 方法按照 TaKaRa 公司的胶回收试剂盒说明进行。测序结果于 DNASTAR 软件进行比对。

2 结果与分析

2.1 病理变化

斑马鱼在接种 HA9801 等 8 株 12 h 以后陆续出现病变, 肛门周围和腹部出现块状充血, 患鱼体表无其它明显病变。剖检观察到, 肝脏呈现苍白色, 腹腔内有较多积水, 具有典型的细菌性败血症病理变化。接种低剂量菌液的斑马鱼病变不明显, 或表现病变迟于高剂量组。接种 T15 株、对照组所有斑马鱼均不表现肉眼可见的病变, 也无一例死亡。

2.2 LD₅₀ 的计算

接种后观察 96 h, 记录斑马鱼死亡情况。接种 10~12 h 之后, HA9801 株等 8 株 SS2 接种最小稀释度组斑马鱼开始出现上述肉眼可见病变, 并大量死亡。其余各稀释度接种鱼在 96 h 内陆续出现病变, 死亡数量随稀释梯度递减。斑马鱼的死亡数在接种后 24 h 内达到高峰, 36 h 后逐渐趋向缓和, 48 h 后基本没有增加。

对斑马鱼有致病力的各 SS2 菌株 LD₅₀ 值从 5.36×10³ 至 5.01×10⁴ 不等。T15 株接种组各稀释度以及空白对照组的斑马鱼, 观察不到任何病变, 也无死亡。LD₅₀ 按最大接种量, 计作 >10⁶ cfu。具体数据见下表。

各菌株 LD₅₀ 的比较, ZG05464 株 LD₅₀ 值最低, 而 260 株 LD₅₀ 值最高。ZY05719、ZY05721 和 ZG05464 3 个菌株的 LD₅₀ 较为接近。

3.3 细菌的分离与鉴定

从接种死亡的斑马鱼分离到形态和接种菌一致的菌落。

表 9 株猪链球菌 2 型对斑马鱼的半数致死量

Table 50% lethal dose of *Streptococcus suis* type 2 strains in zebrafish

菌株 Strain	未稀释菌液浓度 Infection dose(cfu)	接种斑马鱼数 Amount of zebrafish inoculated	总死亡率 Total death rate(%)	半数致死量 50% 50%lethal dose (cfu)
HA9801	2.5×10^7	180	45.56	1.85×10^4
ZY05719	1.5×10^7	180	52.22	8.69×10^3
ZY05721	1.37×10^7	90	42.22	6.92×10^3
ZY05722	1.64×10^7	90	35.56	2.98×10^4
260	4.0×10^6	90	33.33	5.01×10^4
ZG05464	1.8×10^7	90	40	5.36×10^3
JR05730	1.33×10^7	90	33.33	2.05×10^4
ATCC43765	4.2×10^6	90	36.67	3.14×10^4
T15	5.0×10^5	90	0	$>10^6$

所有接种株与相应分离得到的菌落均能 PCR 扩增出约 387 bp 的条带,经测序验证,确为 *cps* 基因,证实所有菌株均为 SS2。除 T15 株以外,其它菌株均能扩增出约 316 bp, 626 bp 的条带,经测序验证,为 *mrp* 和 *ef* 基因。接种菌与鱼体分离株基因型均为 *mrp*⁺*ef*⁺。

3 讨论

尽管对 SS2 的很多毒力基因已有所认识,但是在毒力株、弱毒力株和非致病性菌株之间的毒力差异仍不能用这些因子加以解释^[13-16]。测定 SS2 各菌株的致病力最好的办法莫过于动物试验,但比较许多菌株的毒力,需要大量的猪或豚鼠,费用较高,使用斑马鱼替代是较为理想的方法。本实验表明斑马鱼对猪链球菌 2 型致病菌株易感,可用以测定其 LD₅₀,在国内外尚属首次报道。

本试验所测得的 SS2 对斑马鱼的 LD₅₀ 在 5.36×10^3 至 5.01×10^4 cfu 之间。Jesse 等^[4]报道的海豚链球菌 (*S.iniae*) 对斑马鱼的 LD₅₀ 则为 10^3 cfu。海豚链球菌本身即水生动物致病菌,其 LD₅₀ 较低合乎逻辑。

本试验比较了对猪有强致病力的菌株与无毒株对斑马鱼的致病力。无毒株与有毒力株 LD₅₀ 结果差异极显著 ($P < 0.01$)。PCR 检测证实,对斑马鱼有致病力的 SS2 均为 *mrp*⁺*ef*⁺,兼有该两种基因的 SS2 菌株一般被认为是强致病力菌株。对猪只具有高致病性的菌株同样对斑马鱼有高致病性,提示两种宿主对 SS2 菌株的易感性存在一定平行关系,斑马鱼在一定程度上可以取代猪作为研究 SS2 的动物模型。在猪链球菌 2 型致病机理的研究中,大量使用斑马鱼检测并比较 SS2 不同分离株、人工突变株的致病力,显然更为经济、方便。

各菌株之间的 LD₅₀ 也有差异,可作为量化评价 SS2 致病力的参考标准之一。本试验比较了国内外不同分离株,结果显示 ZG05464 株对斑马鱼的致病力最强,而 260 株对斑马鱼的致病力相对最弱。其它致病菌株的致病力介于两者之间,除 260 株外,其余中国分离株的致病力均高于 ATCC43765。细菌分离时间不同,所传代次对致病力可能有所影响,尚需进一步试验证实。

Jesse 等^[4]探讨了斑马鱼背肌内注射、腹腔内注射和浸泡等接种途径对 LD₅₀ 的影响。笔者发现,背肌内注射难以确保注射剂量,注射液体易回溢;此外拔鳞浸泡虽是鱼类免疫常用的途径,但由于斑马鱼体型较小,应激大,影响最终结果。相比而言,腹腔内注射较易操作,且应激反应较小,注射后 8 h 之内不出现死亡,是最佳的接种途径。

4 结论

斑马鱼可用于检测猪链球菌 2 型菌株的致病力,是研究该菌感染的动物模型,使用方便,动物数量可符合统计学要求。

References

- [1] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, Chengappa M M. *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary Research Communications*, 1997, 21 (6): 381-407.
- [2] Vecht U L, van Leengoed M G, Verheyen R M. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (part one). *Veterinary Quarterly*, 1985, 7: 315-321.
- [3] Astrid M, van der Sar, Ben J A, Christina M J E. Van denbroucke-Grauls and Wilbert B. A star with stripes: zebrafish as an

- infection model. *Trends in Microbiology*, 2004, 12 (10): 451-457.
- [4] Jesse D M, Melody N N. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis. *Acta Tropica*, 2004, 91(1): 53-68.
- [5] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. 南京农业大学学报, 1999, 22(2): 67-70.
- Yao H C, Chen G Q, Lu C P. Pathogenic properties of a *Streptococcus suis* strain isolated in 1998. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(2): 67-70. (in Chinese)
- [6] 陆承平, 姚火春, 范红结, 华修国, 孙建和, 顾宏伟, 王楷宸, 赵冉, 濮俊毅, 张 炜. 猪链球菌致病性研究及其公共卫生意义. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4): 361-362.
- Lu C P, Yao H C, Fang H J, Hua X G, Sun J H, Gu H W, Wang K C, Zhao R, Pu J Y, Zhang W. Pathogenicity and public health of streptococcus suis. *China Preventive Medicine*, 2006, 7(4): 361-362. (in Chinese)
- [7] Smith H E, Vries R, van't Slot R, Mari A S. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microbial Pathogenesis*, 2000, 29: 127-134.
- [8] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology*, 2000, 76: 259-272.
- [9] Westerfield M. *The Zebrafish Book: Guide for the Laboratory Use of Zebrafish(Danio rerio)*. 3rd ed. Eugene: University of Oregon Press, 1995: 9-25.
- [10] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
- [11] Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Bert J T, Wisselink H J, Smith H E. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Veterinary Microbiology*, 1997, 58: 53-60.
- [12] Wisselink H J, Smith H E, Zurwieden N S, Peperkamp K, Vecht U. 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. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74: 237-248.
- [13] Vecht U, Arends JP, Vander Molen E J, Van leengoed L A. Differences in virulence between two strains of *S treptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 1989, 50 (7): 1037-1043.
- [14] Williams A E, Blakemore W F, Alexander T J L. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Research Veterinary Sciences*, 1988, 45: 394-399.
- [15] Francisco J Pallarés, Patrick G H, Cameron S S, James A R, Tanja O, Peter J T, Joann M K, Dee M, Dagmar E F, Lorraine J H. Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2003, 67: 225-228.
- [16] Lamont M H, Edwards P T, Windsor R S. Streptococcal meningitis in pigs: results of a five year survey. *Veterinary Record*, 1980, 107: 467-469.

(责任编辑 林鉴非)