



猪链球菌分子流行病学研究方法

杨诗鑫^{1,2,3}, 卞晨^{1,2,3}, 吴宗福^{1,2,3*}

¹南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014

²农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210014

³世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京 210014

摘要: 猪链球菌(*Streptococcus suis*)是猪重要的细菌性病原, 它可以导致猪的脑膜炎、败血症和关节炎等症状, 给养猪业带来严重经济损失; 同时该菌还可感染人, 是一种人畜共患病原菌。应用分子流行病学方法, 阐明猪链球菌病的流行病学特征, 明确其毒力分型、时空分布、传播途径、传染源, 确定传播的遗传决定因素等, 将有助于猪链球菌病的防控。目前常用的分子流行病学方法主要有多位点序列分型、脉冲场凝胶电泳、全基因组测序和基于 PCR 的方法等。本文介绍了上述方法的原理以及在猪链球菌流行病学中的应用, 并分析这几种方法的优缺点, 从而为更好地揭示猪链球菌流行病学特征、制定猪链球菌病的防控策略提供参考。

关键词: 猪链球菌, 流行病学, 多位点序列分型, 脉冲凝胶电泳, 全基因组测序

猪链球菌是猪的重要细菌性病原, 兼性厌氧, 常以卵圆形、双链或短链形式存在, 有些菌株在液体培养基中培养呈现长链。该菌通常定殖在猪的上呼吸道, 尤其是扁桃体和鼻腔, 此外, 还可定殖于生殖道和消化道等部位^[1]。除了猪之外, 牛、马、鸟类、猫和犬等也会感染猪链球菌^[1]。猪链球菌还可通过伤口等途径感染与猪或受污染的猪肉制品接触的人, 导致脑膜炎、败血症等症状, 甚至急性死亡^[1]。自 1968 年在丹麦首

次出现猪链球菌人类病例以来, 世界各地陆续出现人感染猪链球菌病的病例, 截至 2020 年 9 月, 全球人感染猪链球菌病例已超过 1600 例, 大多来自流行率较高的东南亚和我国, 其中泰国占 36%、越南占 30%、中国占 22%^[2]。

根据荚膜多糖抗原的不同, 最初可将猪链球菌分为 35 个血清型(血清型 1/2, 1–34)。2005 年, Hill 等根据 16S rRNA 和 *cpn60* 基因序列, 将血清型 32、34 型划分为鼠口腔链球菌^[3]。2013 年

基金项目: 国家自然科学基金(31872469)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396517; E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

收稿日期: 2021-05-11; 修回日期: 2021-06-11; 网络出版日期: 2021-06-17

Tien le HT 等通过 DNA-DNA 杂交和 *sodA*、*recN* 基因测序, 发现 20、22、26 和 33 这 4 种血清型与其余的 29 种血清型有明显差异, 建议从猪链球菌中删除^[4]。2015 年, 血清型 20、22 和 26 型被归为副猪链球菌^[5]。2017 年, 血清型 33 型被命名为反刍链球菌^[6]。2015 年潘子豪等从患脑膜炎的仔猪体内发现猪链球菌新的血清型 Chz^[7]。随后 Zheng、Qiu、Huang 等又发现了 26 种新荚膜基因簇菌株, 命名为 NCL1-26^[8-11]。

猪链球菌致病血清型众多且复杂, 即使是同一血清型, 毒力差异也较大。因此, 仅依据荚膜多糖进行血清型分型无法准确地评估菌株毒力^[12]。为了更好地防控该病, 还需要利用分子流行病学研究方法, 明确猪链球菌的时空分布、暴发特点、传播途径、传染源、传播的遗传决定因素等信息^[13-14]。目前常见的方法有: 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST), 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), 全基因组测序(whole genome sequencing, WGS), 基于 PCR 的多种方法如多重 PCR、随机扩增片段长度多态性标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、PCR-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、多位点可变

数目串联重复序列分析(multilocus variable number tandem repeat analysis, MLVA)等。本文介绍上述分子流行病学方法的原理以及在猪链球菌流行病学中的应用, 并分析它们的优缺点, 为更好地揭示猪链球菌流行病学特征、制定猪链球菌病的防控策略提供参考。

1 多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST)

MLST 原理是对猪链球菌的 7 个管家基因(*aroA*、*cpn60*、*dpr*、*gki*、*mutS*、*recA*、*thrA*)的核心序列区进行分析, 根据每个管家基因序列的不同, 给予不同编号, 7 个管家基因的编号为一组, 代表一种序列型并对其进行编号, 用 ST 表示。如目前全球分布最广泛的 ST1, 代表其 7 个管家基因的序列型均是 1, 7 个序列型相同的猪链球菌则被认定是同一种 MLST 分型, 若有 5 个以上相同序列型的则归入同一克隆复合体(clonal complexes, CC)^[15-16]。7 个管家基因的等位基因数量和功能见表 1。

2002 年 King 等选择 301 株不同血清型、分离部位和临床背景的猪链球菌分离株, 并从其中 294 株中筛选出 7 个管家基因位点,

表 1. 用于猪链球菌 MLST 分型的 7 个管家基因
Table 1. Seven housekeeping genes used for MLST of *S. suis*

Gene	Function	Number of alleles (Up to 24 Mar 2021)
<i>aroA</i>	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	368
<i>cpn60</i>	60 kDa molecular chaperone	479
<i>dpr</i>	Anti-oxidative stress protein	329
<i>gki</i>	Glucokinase	423
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair enzyme	425
<i>recA</i>	Homologous recombination factor	299
<i>thrA</i>	Aspartate kinase	344

最先确立了猪链球菌的 MLST 分型方法, 鉴定 92 个 ST 和 3 个主要的克隆复合体(ST1、ST27、ST87 复合体)^[16]。ST1 复合体(CC1)系统最大, 包含 ST1、ST7、ST27、ST28 等 14 个 ST, 共计 165 株分离株; ST27 复合体包含 49 株分离株; ST87 复合体包含 19 株分离株。CC1 中能导致脑膜炎、败血症和关节炎的分离株比例为 63.6%, 是 3 个主要克隆复合体中比例最高的, 推断 CC1 与侵袭性疾病密切相关, 而 ST27、ST87 复合体则可能与呼吸系统疾病相关^[16]。在 92 个 ST 中, 有 16 个 ST 中包含血清 2 型分离株, 有 7 个 ST 中包含血清 9 型分离株, 有 5 个 ST 中包含血清 7 型分离株。对部分菌株进行的毒力试验结果显示, ST 之间及同一 ST 内的菌株毒力并不相同。MLST 可以作为评估菌株毒力的分型方法, 对血清型分型的方法提供补充^[16]。截至 2020 年 9 月, 在所有鉴定出的克隆复合体中, 导致人和猪感染发病的最主要的克隆复合体有 CC1、CC20、CC25、CC28、CC104 和 CC221/234, 其中 CC1 主要分布在欧洲、亚洲的部分国家(如中国、柬埔寨、韩国、日本、泰国和越南)、澳大利亚和阿根廷^[17]。CC1 中的 ST1 虽然分布广泛, 但致病性较其单基因座变体 ST7 弱, 例如中国 1998 年和 2005 年导致人感染的猪链球菌血清 2 型均属于 ST7^[11]。

截至 2021 年 5 月, 猪链球菌 MLST 数据库已收录了 1619 个 STs (<https://pubmlst.org/ssuis/>), 其中包括本课题组首次发现的 ST1611 和 ST1612。随着高通量和低成本核酸序列测定的实现, MLST 已经成为猪链球菌基因分型的基本方法之一。MLST 可用于研究猪链球菌的流行病学, 对全球所有的猪链球菌进行有序统一的分型, 快

速识别猪群中潜在的强毒株, 为阐明病原菌的传播方式提供科学依据。除此之外, MLST 一个非常重要的优点是其序列数据可在实验室之间比较, 有助于明确猪链球菌的进化和种群结构^[17]。但它的缺陷是分辨力低, 对不同暴发或者没有直接流行病学关联的菌株区分能力较差^[18]。

2 脉冲凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE 是对完整的 DNA 用限制性核酸内切酶进行酶切, 将产生的不同大小的 DNA 片段在外加交变脉冲电场中重新定向, 其片段越大重排所需要的时间越长, 不断交替改变电场方向, 分开大小不同的 DNA 片段, 再经染色产生电泳条带图谱。PFGE 可以分离片段长度为 10 kb 到 10 Mb 的 DNA, 已成为研究细菌基因组结构和功能的重要手段。Tenover 等提出按电泳条带的差异对细菌亲缘关系分型的标准: 条带无差异, 说明为相同菌株; 有 2-3 条带的差异, 说明菌株间有相近关系; 4-6 条带的差异, 说明菌株间可能有相近关系; 有 6 条带及以上的差异, 视为无相关性^[19]。

Allgaier 等利用限制性核酸内切酶 *Sma* I 和 *Apa* I 对 3 组分离来源和临床背景不同的 99 株猪链球菌分离株进行 PFGE, 其中用 *Sma* I 酶切的 DNA 获得的条带为 6-13 条, 而用 *Apa* I 酶切的 DNA 获得的条带为 15-23 条^[20]。通过分析软件 UPGMA 对 *Sma* I 酶切的 PFGE 模式进行聚类分析, 可以分为 4 个组(A1、A2、B1、B2), 每组包括相似度至少为 20% 的分离株; 利用 *Apa* I 和 *Sma* I 酶切的两种 PFGE 模式构建的树状图几乎相似, 不同之处在于前者分化程度更高^[20]。根据

凝胶成像及分析数据显示, PFGE 可以区分不同血清型, 也可以区分同一血清型的不同分离株^[20]。2002 年 Berthelot 等首次使用限制酶 *Sma* I 对猪链球菌人源分离株进行 PFGE 分析, 123 株猪链球菌中共鉴定出 74 种 PFGE 脉冲型, 每个脉冲型包含 1 至 7 个菌株^[21], 发现血清型 1/2、3 和 9 型猪链球菌菌株都聚集在同一亚组中, 再次证明 PFGE 分型方法可用于确定猪链球菌菌株间的亲缘关系^[21]。

虽然 PFGE 具有分辨力强、易标准化、结果准确稳定、不受表型性状干扰等优点^[22], 但其也有缺陷, 例如: 对于大小相似的片段分辨率不是很高; 得到的亲缘关系只是指导作用, 而不是真正意义上的种系发生量度; 仅凭 PFGE 图谱差异不能排除菌株来自共同的传染源的可能性^[23]。目前, 由于 WGS 能为细菌分型提供更多信息, 如细菌的耐药性和毒力等, 越来越多的实验室正在从 PFGE 过渡到 WGS 进行细菌分型^[23]。此外, 与 MLST 相比, PFGE 操作烦琐, 由于参数设置的差异, 难以像 MLST 一样与其他实验室进行对比, 多为实验室内检测结果的比较, 适于分析引起暴发事件的猪链球菌菌株间的关联性; 而 MLST 操作简单, 通过全球数据库比对, 可以得到更多的关于进化和亲缘关系的信息, 在分析菌株的进化关系方面具有优势, 更适合用于全球长期的进化研究^[24]。

3 以 PCR 为基础的多种方法

基于 PCR 的方法具有快速、低成本的优势, 适用于筛选大量分离株, 可在大多数实验室中使用^[25-26]。因此, PCR 仍是最常用的检测和鉴定猪链球菌的方法^[25]。

3.1 针对 *gdh* 和 *recN* 基因的特异性 PCR

Okwumabua 等发现, 猪链球菌编码谷氨酸脱氢酶基因 *gdh* 高度保守, 针对该基因建立了检测猪链球菌的特异性 PCR 方法^[25]。随后, 研究人员发现这种方法无法区分类猪链球菌(如原血清型 20、22、26 和 32-34 型)和真正的猪链球菌^[12]。因此, 在 2014 年 Ishida 等针对编码重组/修复因子的 *recN* 基因, 建立检测猪链球菌的特异性 PCR 方法, 利用该方法可区分类猪链球菌和真正猪链球菌^[12]。由于猪链球菌与其种属相近的细菌常定植于猪扁桃体、鼻腔等部位, 为提高猪链球菌的分离率, 临床上从上述部位分离猪链球菌时, 本实验室通常采用 *gdh* 和 *recN* 双阳性的判定标准。本课题组用该方法, 自 2017-2019 年期间于江苏地区屠宰场采集健康猪扁桃体和鼻拭子样本 454 份, 阳性的样本为 311 份(68.5%), 共分离到猪链球菌单菌落 405 株; 采用血清特异性的 PCR 的方法进一步分型鉴定, 发现传统血清型有 342 株(84.44%), NCL 菌株有 20 株(4.94%), 未定型菌株有 43 株(10.62%)^[27-29]。

3.2 多重 PCR

2016 年 Hatrongjit 等设计一种多重 PCR 方法鉴定与人感染有关的猪链球菌克隆复合体, 这种方法具有低成本、快速、应用广等优点^[26]。研究人员对 62 个 CC104 特异性克隆片段分析后发现, 有 7 个重要的片段与 GenBank 数据库中已知的猪链球菌序列有较低的相似性, 并从中选取了 4 个序列(*hp1*、*mp*、*pep*、*col*)和由 Takamatsu 等设计出的引物 *srtBCD* 共同组成了多重 PCR 的引物, 使得在单个反应中能就同时区分 CC1、CC25、CC28、CC104、CC221/234 和 CC233/379^[26]。

3.3 随机扩增 DNA 片段多态性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLP)

RAPD 的原理是采用随机合成的寡核苷酸引物进行 PCR 扩增,产生的片段可反映基因组特征并用于构建系统发育树。RAPD 具有如下优点:对样品的需要量和质量要求不高;操作安全简便;无需预知被研究对象的基因组序列;一套引物可用于不同生物的检测等。但该方法不能分析基因型,只能表示样品是否有差异,无法分析产生差异的原因,而且影响实验的因素较多,重复性较差^[30]。

RFLP 的原理是检测 DNA 经限制性内切酶处理后形成特定大小的片段。基因内个别碱基的突变以及序列缺失、插入、重排会造成 DNA 核苷酸序列上的变化均可导致 RFLP 的产生^[31-32]。PCR-RFLP 是先扩增被检样品的 16S-23S rRNA 基因,然后酶切、电泳、观察结果,以此作为分型依据。

2019 年 Atcharaporn 等利用 RAPD 和 16S-23S rRNA PCR-RFLP,分析从猪源和人源猪链球菌的克隆复合体^[33]。结果显示,在一个给定的克隆复合体中大多数 ST 的 RAPD 和 PCR-RFLP 图谱相同,且 RAPD 较 PCR-RFLP 区分度更高^[33]。PCR-RFLP 将 684 份样品分为 4 个群:群 1 由 CC25、CC28、CC104 和 CC233/379 组成,群 2 由 CC221/234 组成,群 3 由 CC16 组成,群 4 由 CC1 组成;RAPD 则可以同时区分 CC1、CC16、CC25、CC28、CC104、CC221/234 和 CC233/379^[33]。这两种方法有助于筛选或预测对人和猪有致病性的多克

隆复合体,也可用于快速、低成本筛选大量分离株,但它们不能区分每个克隆复合体中的 ST^[33]。

3.4 多位点可变数目串联重复序列分析 (multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)

MLVA 也是基于 PCR 原理。可变数目串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)是指存在于真核、原核生物基因组中的一种可遗传、不稳定且具有高度多态性的短核苷酸重复序列,MLVA 基于不同个体之间短序列重复数不同的原理,通过检测基因组上多个 VNTR 的重复数来区分菌株。通常采用 PCR 扩增细菌染色体上的多个 VNTR,结合毛细管电泳精确测定其重复数,随后使用聚类软件对不同菌株 VNTR 的重复数进行分析,以确定不同菌株间的亲缘关系。李伟等建立了猪链球菌血清 2 型菌株 MLVA 分型方法,用于分析中国的 ST7 菌株^[34]。他们使用软件和串联重复数据库,对 5 株血清 2 型菌株(GZ1、SC84、05ZYH33、98HAH12 和 P1/7)进行基因组序列分析,最终选定 9 个 VNTR 基因簇(TR1-9)将 166 株猪链球菌血清 2 型菌株分为 51 种 MLVA 型,来自中国的 144 株 ST7 菌株被分为 34 种 MLVA 型,这些 ST7 菌株除 TR9 基因簇外,TR1-8 序列均相同^[34]。虽然 MLVA 可以发现 PFGE 模式相似的菌株之间更详细的差异,但目前只有一个 TR9 位点可用于区分 ST7 菌株,因此还需要更多的菌株,优化该方法^[34]。

MLVA 具有如下优点:不同位点的串联重复序列的多态性不同,因此多个位点的 VNTR 分析具有较好的分辨能力;MLVA 以 PCR 为基础,所需的设备与技术较易获取和掌握;不同实验室之间的数据也可以进行交换、整合,并且不需要参

考菌株; 可获取大量的细菌全基因组序列, 有利于 VNTR 的识别和引物的设计^[34]。与 MLST 相比, MLVA 更适合猪链球菌暴发调查、跟踪感染来源及途径。

4 全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)

随着细菌基因组测序技术的发展, WGS 在病原菌的遗传进化、种群迁移和流行分析中被广泛应用^[35]。2016 年 Athey 等对 121 株 29 种猪链球菌血清型菌株进行 WGS, 将数据整合到猪链球菌血清分型的自动化软件中, 建立了识别所有 29 种猪链球菌血清型的方法^[36]。该方法可以区分血清型 1 和 14、血清型 2 和 1/2, 并确定菌株 MLST 型和毒力因子信息, 为猪链球菌病的监测、流行病学调查和防控提供参考。但是, 与血清学方法相比, 这种 WGS 方法的局限性在于它无法确定细菌是否能表达荚膜^[36]。2016 年广西发生猪链球菌感染人事件, 导致 2 人死亡, 黄文华等从患者身上分离出 6 株猪链球菌 C2227-C2232 并进行了 WGS, 分离株 C2227、C2229-C2232 属于 ST1, 分离株 C2228 属于 ST665, 首次证实 ST665 也可以感染人; 6 株菌均存在与免疫逃避或感染相关的 10 个毒力基因(*salk*、*salt*、*fhb*、*iga1*、*ef*、*mrp*、*sly*、*ssna*、*enda* 和 *scpa*)^[37]。深入研究发现, 这 6 株菌与猪链球菌血清 2 型毒力代表菌株 05ZYH33、SC84、98HAH33、BM407 和 P1/7 位于同一克隆分支中^[37]。进化树分析显示, C2229-C2232 位于同一个亚分支中, C2227 和 C2228 则分散在另外 2 个不同的亚分支中, 表明 C2227 和 C2228 更可

能代表偶发病例, 而不是暴发病例^[37]。与中国地区流行菌株 05ZYH33、SC84 和 98HAH33 相比, 这 6 株菌与越南分离菌株亲缘关系更密切^[37]。最近, 本课题联合国内同行, 对 52 株猪链球菌血清 31 型进行 WGS, 并结合 NCBI 来源的 23 株血清 31 型基因组信息, 通过系统进化树与核心基因组单核苷酸多态性分析发现, 血清 31 型从总群结构可分为 3 群, 中国分离株主要位于第 3 群属于 MCG7-2, NCBI 数据库上的国外菌株主要位于第 2 群属于 MCG7-3, 表明二者进化路径不同; MLST 分析发现, 31 型的 ST 型混杂; 所有国内来源的 52 株菌株都是多重耐药, 且第 3 群菌株耐药基因主要由前噬菌体携带, 与传统的认为猪链球菌耐药基因的携带主要依靠整合性接合元件和整合性可移动元件的观点不同^[38]。

5 总结

综上所述, MLST 操作简单, 易于在各实验室间进行数据比对, 适合于对全球猪链球菌进行有序统一的分型。PFGE 适用于分析引起局部暴发事件的猪链球菌间的关联性。PCR 相关方法具有快速、低成本的优点, 易于在常规实验室诊断中应用, 在确定猪链球菌克隆复合体方面具有显著优势。WGS 具有准确度高的优点, 结合基因组学、临床流行病学数据与系统发育组学, 已广泛用于研究猪链球菌菌株的种群结构、遗传多样性、病原特性及溯源等, 为猪链球菌病防控提供了重要的技术基础。上述这些方法的综合应用将有助于丰富猪链球菌流行病学, 为猪链球菌病的防控和疫苗研制奠定基础。

参考文献

- [1] 陆承平, 吴宗福. 猪链球菌病. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [2] Gajdács M, Németh A, Knausz M, Barrak I, Stájer A, Mestyán G, Melegh S, Nyul A, Tóth Á, Ágoston Z, Urbán E. *Streptococcus suis*: an underestimated emerging pathogen in Hungary? *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1292.
- [3] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary Microbiology*, 2005, 107(1/2): 63–69.
- [4] Tien LHT, Nishibori T, Nishitani Y, Nomoto R, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA–DNA homology and sodA and recN phylogenies. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/3/4): 842–849.
- [5] Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 2): 438–443.
- [6] Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(9): 3660–3665.
- [7] Pan ZH, Ma JL, Dong WY, Song WC, Wang KC, Lu CP, Yao HC. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 976–985.
- [8] Zheng H, Ji SB, Liu ZJ, Lan RT, Huang Y, Bai XM, Gottschalk M, Xu JG. Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(12): 4111–4119.
- [9] Qiu XT, Bai XM, Lan RT, Zheng H, Xu JG. Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(24): 7102–7112.
- [10] Zheng H, Qiu XT, Roy D, Segura M, Du PC, Xu JG, Gottschalk M. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 10.
- [11] Huang JH, Liu X, Chen H, Chen L, Gao XP, Pan ZH, Wang J, Lu CP, Yao HC, Wang LP, Wu ZF. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 995–1003.
- [12] Ishida S, Tien LHT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 107: 66–70.
- [13] Riley LW, Blanton RE. Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: definitions, approaches, and scope of the field. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.ame-0001-2018.
- [14] Segura M. *Streptococcus suis* research: progress and challenges. *Pathogens*, 2020, 9(9): 707.
- [15] Hatrongjit R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Kerdsin A. Tools for molecular epidemiology of *Streptococcus suis*. *Pathogens*, 2020, 9(2): 81.
- [16] 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(10): 3671–3680.
- [17] Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 312–316.
- [18] Groves MD, Jordan D, Chapman TA, Jassim RA. Multilocus sequence typing of Australian *Streptococcus suis* type 2 by MALDI-TOF mass spectrometry analysis of PCR amplicons. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(3/4): 394–397.
- [19] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(9): 2233–2239.
- [20] Allgaier A, Goethe R, Wisselink HJ, Smith HE, Valentin-Weigand P. Relatedness of *Streptococcus suis*

- isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(2): 445–453.
- [21] Berthelot-Herault F, Marois C, Gottschalk M, Kobisch M. Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(2): 615–619.
- [22] Xia XJ, Wang X, Wei XB, Jiang JQ, Hu JH. Methods for the detection and characterization of *Streptococcus suis*: from conventional bacterial culture methods to immunosensors. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(12): 2233–2247.
- [23] Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): a review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 74: 103935.
- [24] Gona F, Comandatore F, Battaglia S, Piazza A, Trovato A, Lorenzin G, Cichero P, Biancardi A, Nizzero P, Moro M, Cirillo DM. Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster analysis. *Microbial Genomics*, 2020, 6(4). DOI: 10.1099/mgen.0.000347.
- [25] Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(1): 79–84.
- [26] Hatrongjit R, Kerdsin A, Gottschalk M, Hamada S, Oishi K, Akeda Y. Development of a multiplex PCR assay to detect the major clonal complexes of *Streptococcus suis* relevant to human infection. *Journal of Medical Microbiology*, 2016, 65(5): 392–396.
- [27] 高雪萍. 江苏某市屠宰场猪链球菌流行病学调查及 NCLs 菌株病原特性分析. 南京农业大学硕士学位论文, 2018.
- [28] 陈浩. 猪链球菌新荚膜基因簇(NCL)菌株分离鉴定及 NCL4 菌株 WUSS351 基因组分析. 南京农业大学硕士学位论文, 2019.
- [29] 沈艳玲. 猪链球菌血清 31 型致病与耐药特征. 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- [30] Wang YQ, Xu LX, Zhang ZB. The standardization of RAPD. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(4): 57–60. (in Chinese) 汪永庆, 徐来祥, 张知彬. RAPD 技术的标准化问题. 动物学杂志, 2000, 35(4): 57–60.
- [31] Luo LW, Yan MH, You CP, Zhang J. Progress in research on typing methods of bacteria. *Chinese Journal of Microecology*, 2020, 32(7): 836–841, 857. (in Chinese) 罗力文, 鄢明辉, 游春苹, 张娟. 细菌分型方法研究进展. 中国微生态学杂志, 2020, 32(7): 836–841, 857.
- [32] Mogollon JD, Pijoan C, Murtaugh MP, Kaplan EL, Collins JE, Cleary PP. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(11): 2462–2466.
- [33] Kidchana A, Meekhanon N, Hatrongjit R, Gottschalk M, Kerdsin A. Application of random amplified polymorphism DNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism to predict major *Streptococcus suis* clonal complexes isolated from humans and pigs. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 43: 34–39.
- [34] Li W, Ye CY, Jing HQ, Cui ZG, Bai XM, Jin D, Zheng H, Zhao AL, Xu YM, Gottschalk M, Xu JG. *Streptococcus suis* outbreak investigation using multiple-locus variable tandem repeat number analysis. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54(7): 380–388.
- [35] Zhou HJ, Kan B. Progress in application research of bacterium genome-based subtyping. *Disease Surveillance*, 2016, 31(8): 668–675. (in Chinese) 周海健, 阚颀. 细菌基因组分型方法的应用研究进展. 疾病监测, 2016, 31(8): 668–675.
- [36] Athey TBT, Teatero S, Lacouture S, Takamatsu D, Gottschalk M, Fittipaldi N. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 1–8.
- [37] Huang WH, Wang ML, Hao HJ, Yang RF, Xie JJ, Su JH, Lin M, Cui YJ, Jiang YQ. Genomic epidemiological investigation of a *Streptococcus suis* outbreak in Guangxi, China, 2016. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 68: 249–252.
- [38] Wang XM, Sun JJ, Bian C, Wang JP, Liang ZJ, Shen YL, Yao HC, Huang JH, Wang LP, Zheng H, Wu ZF. The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Streptococcus suis* cps31. *Veterinary Microbiology*, 2021, 259: 109149.

Molecular epidemiological methods of *Streptococcus suis*

Shixin Yang^{1,2,3}, Chen Bian^{1,2,3}, Zongfu Wu^{1,2,3*}

¹ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

² Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

³ OIE Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

Abstract: *Streptococcus suis* is an important bacterial pathogen for pigs. It can cause meningitis, sepsis and arthritis in pigs, leading to severe economic losses to the pig industry. In addition, *S. suis* can also infect humans and is considered a zoonotic pathogen. In order to better prevent and control the disease caused by *S. suis*, it is necessary to use molecular epidemiological methods to elucidate the epidemiological characteristics of *S. suis*, including virulence typing, temporal and spatial distribution, transmission route, source of infection, and genetic determinants of transmission. At present, there are several commonly used methods including multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, whole genome sequencing, and PCR-based methods. This article introduces the principles of the above-mentioned methods and the application examples in the epidemiology of *S. suis*, and analyzes their advantages and disadvantages, which contributes to better revealing the epidemiological characteristics of *S. suis*, and providing a reference for formulating prevention and control strategies for the disease caused by *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*, epidemiology, multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, whole genome sequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872469)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396517; E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

Received: 11 May 2021; Revised: 11 June 2021; Published online: 17 June 2021