

马 芳,周明旭,张金秋,等. 苏北地区奶牛场无乳链球菌分离株毒力分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(5):142-149.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.05.027

# 苏北地区奶牛场无乳链球菌分离株毒力分析

马 芳<sup>1,2,3</sup>,周明旭<sup>1,2</sup>,张金秋<sup>1,2</sup>,杨世芳<sup>1,2</sup>,卢 宇<sup>1,2</sup>,邓碧华<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/  
国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014;

2. 江苏省动物重要疾病与人畜共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009; 3. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**奶牛乳腺炎导致奶牛产奶量下降和乳制品质量降低,是奶牛养殖业重要的经济性疾病,在全球范围内造成巨大经济损失。选取苏北奶牛场 3 株代表性无乳链球菌分离株,SAG-FX17 分离自临床型乳腺炎、CM31 分离自隐性乳腺炎和 CM41b 分离自隐性发展为临床型乳腺炎奶牛乳汁,研究比较 3 株细菌生长特性、毒力因子分布、形成生物被膜能力及其对奶牛乳腺上皮细胞的黏附、侵袭和胞内存活能力。试验结果表明,3 株分离株血清型均为 I a 型,2b 型菌毛,*gapC* 基因和 *cylE* 基因阳性,但仅 SAG-FX17 的  $\alpha$  相关蛋白家族为 Alp1 型,其他 2 株为未定型。研究发现 SAG-FX17 与奶牛乳腺上皮细胞(Mac-T)共孵育时生成生物被膜能力明显增强,且该菌对 Mac-T 细胞黏附率为 52.5%,显著高于 CM31 和 CM41b。侵袭试验结果表明,3 株细菌侵袭到细菌内部的能力很低,但侵袭到细胞内的细菌具有一定存活能力,侵入细胞 4 h 3 株分离株 SAG-FX17、CM31、CM41b 存活率分别为 24%、18%、86.7%。综上所述,无乳链球菌在奶牛乳腺上皮细胞表面形成生物被膜及其在胞内存活能力是影响细菌致病性的重要因素。

**关键词:**无乳链球菌;毒力因子;生物被膜;黏附;胞内存活能力;奶牛场;苏北地区

**中图分类号:**S852.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)05-0142-08

奶牛乳腺炎是奶牛最常发病、治疗费用最高的疾病,全世界约有 1/3 奶牛患有乳腺炎,导致牛奶产量和质量严重下降,造成巨大经济损失<sup>[1-2]</sup>。奶牛乳腺炎根据症状分为临床型乳腺炎和隐性乳腺炎。临床型乳腺炎发病急、症状明显;隐性乳腺炎一般难以直接观察到临床感染症状,不能及时隔离、治疗,容易被忽视,但其具备转化为临床型乳腺炎的风

险,给奶牛养殖业带来严重影响<sup>[3]</sup>。

奶牛乳腺炎的致病因素包括病原体、宿主和环境因素,其中细菌乳腺内感染为最主要因素<sup>[4]</sup>。宿主与病原微生物互相作用结果的不同,细菌感染引起乳腺炎临床表现不同,如金黄色葡萄球菌黏附侵袭到宿主细胞内部并逃避宿主先天性免疫反应,易导致隐性乳腺炎;大肠杆菌感染后大量增殖释放毒素引起宿主细胞因子释放,易导致临床型乳腺炎<sup>[5]</sup>。葡萄球菌和链球菌是导致奶牛乳腺炎最常见的和造成经济损失最大的致病菌,无乳链球菌虽然只在乳腺组织内生长和增殖,但该菌可以在乳腺组织外短时间存活,同时通常会导致隐性乳腺炎,因此牛场一旦感染,极易导致该菌传播扩散<sup>[6]</sup>。1887 年无乳链球菌作为奶牛乳腺炎致病菌首次被

收稿日期:2020-12-01

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31902243)。

作者简介:马 芳(1990—),女,山东莱芜人,博士,助理研究员,主要从事链球菌致病机制和免疫增强剂方面研究。E-mail:20180042@jaas.ac.cn。

通信作者:邓碧华,硕士,副研究员,主要从事疫苗佐剂方面研究。E-mail:dengbihua2000@163.com。

国饲料营养学术研讨会论文集,2002。

[24]姜贝贝,李华伟,王洪荣. 过瘤胃保护甜菜碱和过瘤胃保护胆碱对 1~3 月龄湖羊生长性能、消化性能、屠宰性能和脂肪沉积的影响[J]. 动物营养学报,2017,29(5):1785-1791。

[25]王 炳,申军士,叶均安,等. 奶牛日粮中物理有效中性洗涤纤维作用的研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2013,49(19):91-96。

[26]张幸开,乌日金. 日粮纤维在奶牛营养中的应用[J]. 中国奶牛,2011(17):43-46。

[27]楼 灿,姜成钢,马 涛,等. 饲养水平对肉用绵羊妊娠期消化代谢的影响[J]. 动物营养学报,2014,26(1):134-143。

[28]Durand M,Kawashima R. Influence of minerals in rumen microbial digestion[M]. Berlin:Springer,1980。

[29]Durand M,Komisarczuk S. Influence of major minerals on rumen microbiota[J]. The Journal of Nutrition,1988,118(2):249-260。

[30]赵天章,李慧英,闫素梅. 反刍动物饲料纤维物质瘤胃降解规律研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2011,31(9):158-160,164。

鉴定,后来发现该菌还可以造成人类尤其怀孕女性、早产儿和新生儿感染<sup>[7]</sup>。无乳链球菌又称为 B 族链球菌,属于革兰氏阳性菌,根据荚膜多糖抗原性与结构特点分为 10 个血清型(I a、I b、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 和 IX),其中 85%~90% 的临床分离株为 I a、I b、III 和 V 型<sup>[8]</sup>。

无乳链球菌感染机制主要包括以下 3 种机制:(1)定植和穿越组织屏障;(2)逃避宿主防御机制;(3)表达毒力因子<sup>[7]</sup>。细菌黏附乳腺上皮细胞并侵入到细胞内部是细菌引起乳腺炎的重要机制。无乳链球菌经乳头感染定殖于乳腺细胞和乳导管并大量繁殖,导致乳腺上皮细胞损伤。大量中性粒细胞涌入阻塞乳导管,影响泌乳和细菌排出,进而引起腺泡退化丧失泌乳机能。无乳链球菌编码大量毒力因子对该菌的致病力起到关键作用,如产生  $\beta$ -溶血素裂解细胞<sup>[8]</sup>。同时,毒力因子也在无乳链球菌黏附、入侵宿主细胞过程中存在关键作用,因此对临床分离细菌进行毒力因子检测有利于更好地评价细菌致病性,也为进一步研究细菌感染宿主的机制提供理论依据。

前期研究在苏北地区多个奶牛场进行采样,获得无乳链球菌 6 株,本试验对其中 3 株典型无乳链球菌(SAG-FX17 分离自临床乳腺炎奶牛乳汁,CM31 和 CM41b 分离自隐性乳腺炎奶牛乳汁,其中 CM41b 分离株宿主由阴性隐性感染转临床症状)进行研究比较,包括细菌毒力因子分布、生长特性及与细胞的互作特征等,为进一步研究无乳链球菌致奶牛乳腺炎的毒力机制提供理论支持,也为通过研制疫苗等方式预防奶牛无乳链球菌乳腺炎提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

无乳链球菌 SAG-FX17、CM31、CM41b 分别分离自苏北地区奶牛养殖场并由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所疫苗制造工程研究室保存<sup>[9]</sup>;奶牛乳腺上皮细胞 Mac-T 由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所疫苗制造工程研究室保存,37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。试剂 THB 培养基、胰蛋白酶为英国 Oxoid 公司产品;结晶紫染色液琼脂为南京翼飞雪生物科技有限公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;DMEM 为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;青霉素、链霉素为 Sigma-Aldrich 公司产品;2×

Taq Master Mix 为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品。

### 1.2 细菌培养

将 37℃ 180 r/min 过夜培养的细菌以 1:100 分别转接到 THB 液体培养基中,37℃ 180 r/min 振荡培养至对数期,5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体并用无菌 PBS(8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.136 mol/L NaCl、2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 2.6 mmol/L KCl)清洗 3 次,用于后续研究。

### 1.3 细菌生长曲线检测

将过夜培养的细菌以 1:100 分别转接到 100 mL THB 液体培养基中,37℃ 180 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取样检测其  $D_{600\text{ nm}}$ ,连续检测至细菌  $D_{600\text{ nm}}$  保持稳定。

### 1.4 提基因组

取 3 mL 过夜培养的细菌通过 5 000 r/min 离心 5 min 收集于 1.5 mL EP 管中,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取细菌基因组 DNA,最后以 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解,提取基因组作为 PCR 反应模板备用。

### 1.5 毒力基因检测

本研究对分离株的相关毒力基因包括荚膜多糖合成酶相关基因、 $\beta$  蛋白编码基因 *bac*、 $\alpha$  相关蛋白基因(*bca*、*alp1*、*rib*、*alp2*、*alp3* 和 *alp4* 的基因)、 $\beta$ -溶血素结构基因 *cylE*、菌毛骨架蛋白编码基因 *spb*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)编码基因 *gapC*、5a 肽酶编码基因 *scpB* 进行鉴定,仅模板用无菌超纯水为阴性对照组。本研究中所用的引物见表 1。PCR 扩增程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,45℃ 30 s,72℃ 3 min,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 乳酸脱氢酶(LDH)试验

将奶牛乳腺上皮细胞(Mac-T)培养于 96 孔板中长至 80% 以上单层细胞,用无血清的 DMEM 清洗细胞 3 次,每孔加入 200  $\mu$ L 无血清 DMEM。细菌以 MOI=10 感染细胞,孵育 3、4、5、6、24 h 用 LDH 活性检测试剂盒检测 450 nm 下上清液的吸光度,阴性对照为无细菌感染的细胞组。

### 1.7 细菌黏附 Mac-T 细胞试验

将 Mac-T 细胞培养于 24 孔板中长满至少 80% 的单层细胞用无血清的 DMEM 清洗细胞 3 次,每孔加入无血清 DMEM 500  $\mu$ L。细菌以 MOI=10 感染细胞,800 g 离心 10 min 使细菌与细胞充分接

表 1 本研究中引物

基因	引物名称	引物序列 (5'→3')
荚膜分子分型	cpsI - Ia - 6 - 7 - F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA
	cpsI - 6 - R	CAATTCTGTCGGACTATCCTGATG
	cpsI - 7 - R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTGGA
	cpsL - F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT
	cpsL - R	TAGGAACATGTTCAATTAACATAGC
	cpsG - F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT
	CpsG - 2 - 3 - 6 - R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC
	CpsN - 5 - F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA
	CpsN - 5 - R	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT
	CpsJ - 8 - F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA
	CpsJ - 8 - R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT
	cpsJ - 2 - 4 - F	CATTTATTGATTACAGACGATTACATTGA
	cpsJ - 2 - R	CCTCTTCTCTAAAAATATTCCAACC
	cpsJ - 4 - R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTGA
	cpsI - 7 - 9 - F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
	cpsI - 9 - R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT
	cpsJ - 1b - F	GCAATTCTTAACAGAATATTACAGTTG
	cpsJ - 1b - R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG
α 相关蛋白基因	α - F	TGATACTTCACAGACGAAACAACG
	α - C - R	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC
	Rib - R	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA
	Alp - 1 - R	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG
	Alp2/3 - R	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC
	Alp4 - R	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC
菌毛骨架蛋白基因	BP - 1 - F	CTGTGCTAAACTTTAATAGTTTTGTGC
	BP - 1 - R	AGGCTATTTCTCTTTTCTTAAACATGG
	BP - 2a - F	CTATGATGTCTATTGCAGGTGGAA
	BP - 2a - R	GAGTACTTCTACTGAAATACCC
	BP - 2b - F	TTTAGCTTTAGCTCTACCATCAGG
	BP - 2b - R	CCCCTGCAATTATAGTGACAAGC
gapC	gapC - F	GTTTGCTGGTTCGCGTTCA
	gapC - R	GGTTTCGGTCGTATCGGTCGTCTT
β 蛋白编码基因 bac	bac - F	AAGGCTATGAGTGAGAGCTTGGAG
	bac - R	CTGCTCTGGTGTTTTAGGAACTTG
β - 溶血素结构基因 cylE	cylE - F	AGTCGTAGTGACAGGCAATCAC
	cylE - R	GGCTGCCATTTGGAGAGATAAGTA
C5 肽酶编码基因 scpB	scpB - F	GTTGCAGTGATTGATGCTGCT
	scpB - R	GAGGTCACAATGCTAACACCT

触,置于培养箱中作用 1 h。对照组为等量细菌与 DMEM 孵育 1 h。作用后,用无菌 PBS 清洗 3 次去掉没有黏附的细菌。细胞中加入 100 μL/孔无菌 0.5% TritonX-100 置于 37 ℃ 培养箱中孵育 5 min 裂解细胞释放细菌。黏附的细菌通过涂布 THB 平

板进行定量,黏附率 = ( 试验组细菌数量/对照组细菌数量) × 100% 。

1.8 细菌侵袭试验

将 Mac - T 细胞培养于 24 孔板中长满至少 80% 的单层细胞,用无血清的 DMEM 清洗细胞 3

次,加入无血清 DMEM 500  $\mu\text{L}$ /孔。细菌以  $\text{MOI} = 10$  感染细胞,800  $g$  离心 10 min 使细菌与细胞充分接触,置于细胞培养箱中作用 2 h。作用后,用无菌 PBS 清洗 3 次清洗掉没有黏附的细菌。细胞中加入 1 mL/孔含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素 G 的 DMEM 并作用 1 h 杀死细胞外细菌。孵育后用无菌 PBS 清洗 3 次,加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 0.5% TritonX-100 孵育 5 min 裂解细胞释放细菌,侵袭到细胞中的细菌通过涂布 THB 平板进行定量。对照组为等量细菌与 DMEM 孵育 2 h 后直接涂布 THB 平板定量。侵袭率 = (试验组细菌数量/对照组细菌数量)  $\times 100\%$ 。

### 1.9 细菌胞内存活试验

将 Mac-T 细胞培养于 24 孔板中长满至少 80% 的单层细胞,用无血清的 DMEM 清洗细胞 3 次,每孔加入无血清 DMEM 500  $\mu\text{L}$ 。细菌以  $\text{MOI} = 10$  感染细胞,800  $g$  离心 10 min 使细菌与细胞充分接触,置于细胞培养箱中作用 2 h,作用后用无菌 PBS 清洗 3 次清洗掉没有黏附的细菌。细胞中加入 1 mL/孔含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素 G 的 DMEM,分别孵育 1、2、3、4 h 杀死细胞外黏附的细菌。每个时间点试验孔细胞用无菌 PBS 清洗 3 次,加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 0.5% TritonX-100 孵育 5 min 裂解细胞释放胞内存活菌,涂布 THB 平板定量。细菌与 Mac-T 细胞作用 2 h 后,加入抗生素杀死胞外细菌,抗生素作用 1 h 所得细菌数定为胞内存活细菌总数为 100%,分别计算抗生素作用 2、3、4 h 后的细菌存活率分别记为  $\Delta 1$  h、 $\Delta 2$  h、 $\Delta 3$  h。 $\Delta n$  h 胞内存活率 = [抗生素杀菌第  $(n+1)$  h 活菌数量/抗生素杀菌 1 h 活菌数量]  $\times 100\%$ ,  $n = 1, 2, 3$ 。

### 1.10 细菌体外生物被膜培养与检测

将 Mac-T 细胞培养于 96 孔板中长至 80% 以上单层细胞,用无血清的 DMEM 清洗细胞 3 次,加入无血清 DMEM 200  $\mu\text{L}$ /孔,细菌以  $\text{MOI} = 10$  感染细胞。阴性对照为没有细菌感染的细胞组,同时设置仅有细菌没有细胞的组为空白对照。将 96 孔细胞板置于细胞培养箱孵育 24 h,孵育后将细胞板中的培养液弃去,用无菌 PBS 清洗 3 次,加 200  $\mu\text{L}$ /孔甲醇固定 15 min,自然风干用后加 200  $\mu\text{L}$ /孔 1% 结晶紫染色液染色 15 min, PBS 清洗 3 次,自然干燥后细胞板中的生物被膜用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照。

### 1.11 数据处理

采用 GraphpadPrism 5 软件和 SPSS V25.0 进行

绘图和数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌生长特性

3 株奶牛乳汁无乳链球菌分离株 SAG-FX17、CM31、CM41b 在 THB 液体培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养,试验重复 3 次。结果(图 1)显示,3 株细菌迟缓期、对数期和平台期的生长曲线没有明显区别。说明细菌生长特性不是导致 3 株无乳链球菌毒力差异的原因。

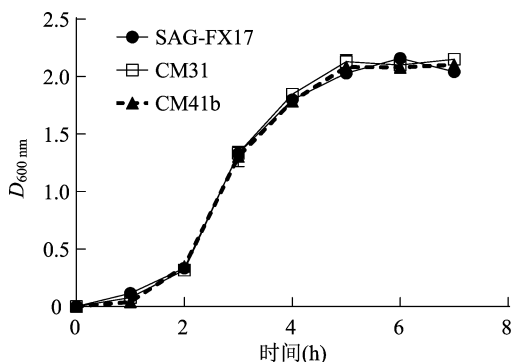
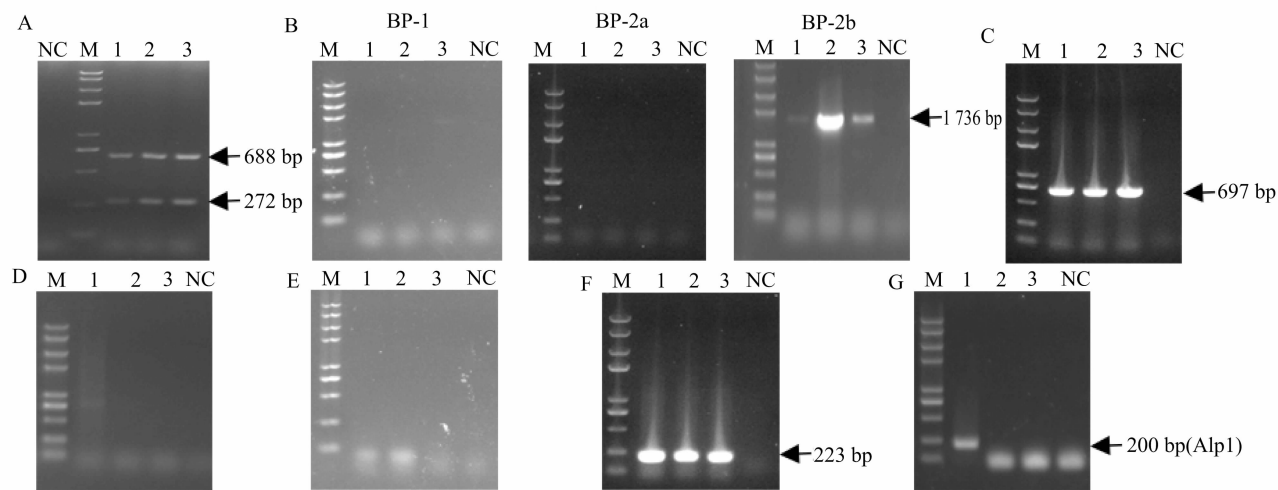


图1 细菌生长曲线

### 2.2 主要毒力因子鉴定

通过多重 PCR 对荚膜多糖合成酶相关基因鉴定,结果(图 2-A)表明,3 株无乳链球菌分离株 SAG-FX17、CM31、CM41b 均属于 I a 型。对无乳链球菌 3 种菌毛骨架蛋白 BP-1、BP-2a、BP-2b 基因 *sbp1*、*sbp2a*、*sbp2b* 进行检测,结果(图 2-B)表明 3 株菌都有 2b 型菌毛骨架蛋白基因 *spb2b*。PCR 检测无乳链球菌  $\beta$  溶血素编码基因 *cylE* 发现 3 株菌均携带该基因(图 2-C)。PCR 鉴定无乳链球菌  $\beta$  蛋白编码基因 *bac*,结果(图 2-D)显示 3 株菌均不携带该基因。*ScpB* 编码的 C5a 肽酶是一种灭活人 C5a 的丝氨酸表面结合蛋白酶,研究认为其可以阻止 C5a 与中性粒细胞结合,抑制炎症时吞噬细胞的化学攻击作用,结果(图 2-E)显示 3 株分离株 *scpB* 基因为阴性。无乳链球菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)编码基因 *gapC* 的 PCR 鉴定结果发现 3 株菌均为 *gapC* 阳性(图 2-F)。Alp 家族是  $\alpha$  相关蛋白家族的总称,目前鉴定发现包括 6 个成员:  $\alpha$ 、Rib、Alp2、Alp3、Epilons (Alp1) 和 Alp4 蛋白,这些蛋白仅重复序列数目不同,其他差异很小。通过 PCR 结果片段大小判断菌株 Alp 结果,其中结果阴性判定为未定型,研究结果(图 2-G)显示 3 株牛源无乳链球菌分离株 7 为 Alp1 型,其他 2 株为未定型。

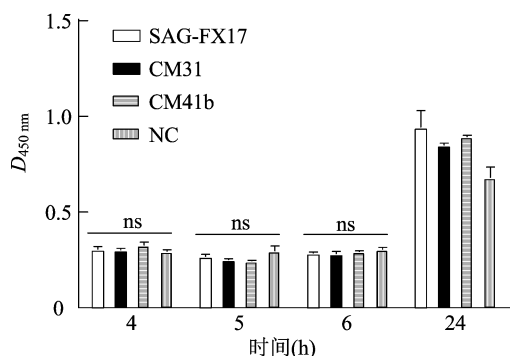


M—8 000 bp marker; 1—菌株 SAG-FX17; 2—CM31; 3—CM41b; NC—阴性对照

图2 无乳链球菌毒力因子 PCR 鉴定结果

### 2.3 LDH 细胞毒性试验

为了进一步验证细菌对细胞的毒性,对细菌孵育细胞 3、4、5、6、24 h 后培养基中 LDH 进行定量。细胞膜结构破坏后会导致胞浆中酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶释放到培养液中,通过对培养液中 LDH 的检测从而对细胞毒性进行定量。从图 3 可以看出,细菌感染细胞 6 h 内对细胞活性影响不大。24 h 后细菌对细胞的毒性明显增强,但由于培养基中没有加血清,所以阴性对照组细胞活性也明显降低。研究结果表明,体外试验中在感染前期细菌对细胞毒性较小,可以展开细菌对细胞的黏附、侵袭等研究。



NC—阴性对照; ns—与阴性对照相比没有明显的差异。图 5 同

图3 细菌作用 Mac-T LDH 检测

### 2.4 细菌黏附 Mac-T 细胞能力

黏附试验结果表明,3 株无乳链球菌对奶牛乳腺上皮细胞 Mac-T 的黏附能力具有显著差异( $P < 0.05$ )。从图 4 可以看出,分离株 SAG-FX17 对 Mac-T 的黏附率高达 52.5%;分离株 CM31 对 Mac-T 的黏附率在 18% 左右;而分离株 CM41b 对

Mac-T 的黏附率很低,仅在 7% 左右。

### 2.5 细菌侵袭 Mac-T 细胞能力

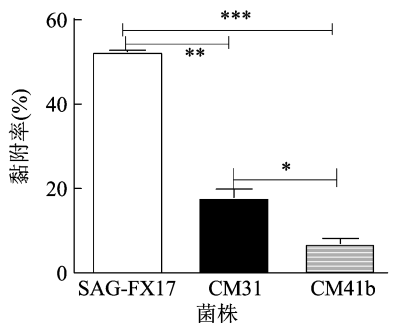
从图 5 可以看出,3 株牛源无乳链球菌分离株对奶牛乳腺上皮细胞 Mac-T 的侵袭力非常低,其中分离株 SAG-FX17 虽然对 Mac-T 的黏附率超过 50%,但该菌对细胞的侵袭率仅为 0.001% 左右。分离株 CM31 和 CM41b 对 Mac-T 的侵袭率仅为 0.000 3% 和 0.000 4%。该结果说明 3 株无乳链球菌均不易侵袭到奶牛乳腺上皮细胞内部。

### 2.6 细菌在 Mac-T 细胞中存活能力

从图 6 可以看出,侵入到乳腺上皮细胞内部的无乳链球菌具有一定的存活能力,分离株 SAG-FX17 在侵入细胞内 2 h ( $\Delta 1$ h) 约 49% 的细菌存活,3 h 后 ( $\Delta 2$  h) 胞内细菌明显地减少,仅 26% 的细菌存活,但 4 h 后 ( $\Delta 3$  h) 仍有 24% 的细菌存活。仅有 13% 的 CM31 侵入细胞 2 h 后存活,但 3、4 h 后细菌的存活率没有明显的变化,分别为 14%、18%,说明 CM31 分离株侵入细胞后大部分细菌会被杀死但仍有少量细菌能保持活力。分离株 CM41b 侵入细胞 2 h 后 54% 的细菌存活,3、4 h 后胞内细菌反而增加,分别为 88.4%、86.7%,说明细菌可能克服胞内杀菌活性,在细胞内存活并增殖。抗生素作用 1 h 所得细菌数定为胞内存活细菌总数,为 100%,分别计算抗生素作用 2、3、4 h 后的细菌存活率,记为  $\Delta 1$  h、 $\Delta 2$  h、 $\Delta 3$  h。

### 2.7 细菌形成生物被膜能力

3 株细菌在体外培养基中均不产生生物被膜,但当与细胞共孵育时分离株 SAG-FX17 形成生物被膜的能力明显增强(图 7)。说明该细菌可能通过



\*, \*\*, \*\*\* 分别表示在 0.05、0.01、0.001 水平差异显著。图 5、图 6 同  
图4 细菌对 Mac-T 细胞黏附能力

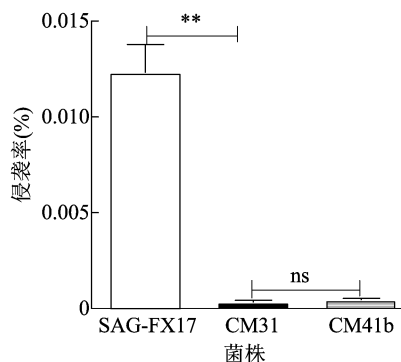


图5 细菌对 Mac-T 细胞侵袭能力

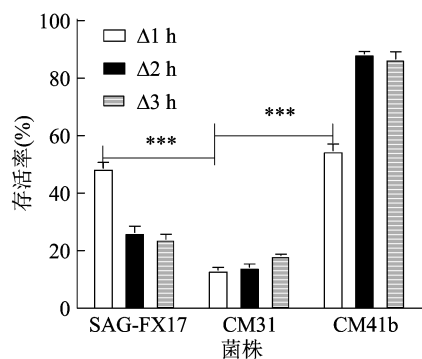
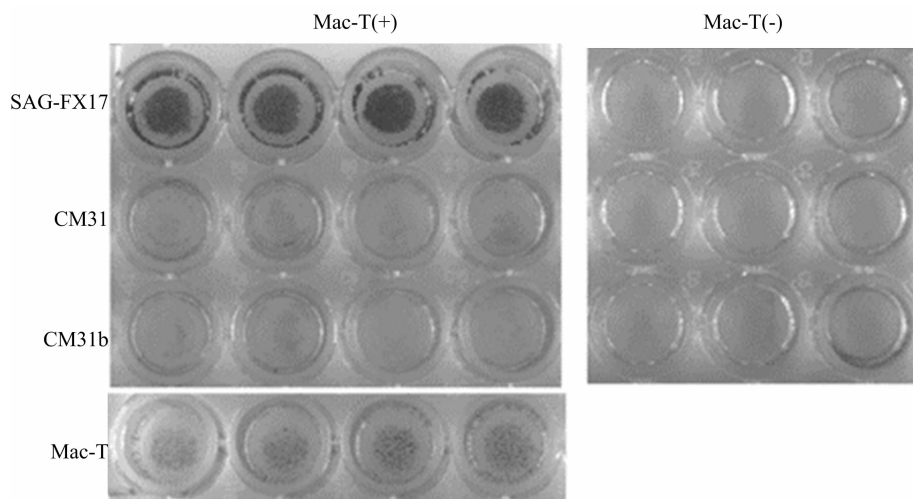


图6 细菌在 Mac-T 细胞内存活能力



Mac-T(+) 表示含有 Mac-T 细胞; Mac-T(-) 表示不含有 Mac-T 细胞

图7 细菌体外形成生物被膜能力

形成生物被膜黏附在奶牛乳腺上皮细胞表面,并增强细胞在体内的存活能力。

### 3 讨论与结论

无乳链球菌又称 B 族链球菌,能够感染人、鱼、奶牛等多种宿主。奶牛乳腺炎由多种致病因素,无乳链球菌是导致奶牛乳腺炎的主要致病菌,引起临床型或隐性乳腺炎,导致牛奶产量和乳制品质量明显下降,造成巨大的经济损失<sup>[10]</sup>。本研究选取分离自苏北奶牛养殖场且具有代表性的 3 株无乳链球菌作为研究对象,其中分离株 SAG-FX17 分离自临床型乳腺炎奶牛乳汁,CM31 和 CM41b 分离自隐性乳腺炎奶牛乳汁,其中 CM41b 分离株宿主由隐性转为临床型。因此比较 3 株代表性细菌的感染特性有利于进一步研究无乳链球菌的致病机制。

分泌毒力因子是无乳链球菌致病的重要机制之一,荚膜帮助细菌抵抗宿主吞噬细胞吞噬、逃避补系统的作用,是该菌主要的毒力因子<sup>[11]</sup>。根据

荚膜多糖的结构特征,无乳链球菌分为 10 个血清型,其中 I a 型和 III 型为造成新生儿疾病和奶牛乳腺炎最常见的血清型,尤其 I a 型为人源和牛源感染的主要血清型<sup>[12]</sup>,本研究中 3 株奶牛乳汁分离株均为 I a 型,说明 I a 型为该地区无乳链球菌流行株的优势血清型。无乳链球菌表面具有菌毛,分为 1 型和 2 菌毛,其中 2 型菌毛编码基因包括 2 种不同序列的等位基因(分为 2a 型和 2b 型菌毛)。菌毛由骨架蛋白 BP 与辅助蛋白 AP-1、AP-2 共同组装成完整结构,参与细菌黏附、侵袭等致病过程<sup>[13]</sup>,本研究中 3 株菌为 2b 型菌毛。*scpB* 基因编码的 C5a 肽酶是无乳链球菌常见的毒力因子,研究人源和牛源无乳链球菌时发现人源分离株菌含有该基因,而仅部分牛源分离株具有该基因<sup>[14]</sup>,本研究中 3 株菌缺乏该基因,可能为菌株适应宿主而缺失。*gapC* 蛋白具有 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)活性,是糖酵解的关键酶保守性高,在包括化脓链球菌、肺炎链球菌等致病性链球菌细胞壁蛋白研究中均有报

道, *gapC* 蛋白分泌到细菌表面后与宿主细胞外间质互作, 帮助细菌黏附侵袭<sup>[15]</sup>。β 溶血素不仅具有红细胞毒性而且能溶解多种真核细胞导致细胞死亡, 又称溶细胞素, 研究表明具有 β 溶血素的无乳链球菌菌株毒力明显高于非溶血性菌株。本研究中 3 株细菌 *gapC* 基因和 β 溶血素编码基因 *cylE* 均为阳性。α 相关蛋白家族是无乳链球菌重要的具有保护性表位的表面蛋白家族, 目前已鉴定出 6 个成员, 分别为 α、Rib、Alp2、Alp3、Epilons 和 ALP4 蛋白, 由等位基因编码, 同一个菌株只能表达 α 相关蛋白家族中的 1 个蛋白<sup>[16]</sup>。无乳链球菌 α 相关蛋白重复结构缺失可能因丢失保护性抗原帮助细菌逃避宿主免疫, 研究表明为在特定生存环境改变时 α 相关蛋白的多个重复序列发生自身变异, 其中具有较长的 α 相关蛋白的菌株对人的致病性提高, 说明 α 相关蛋白家族是与致病性相关的表面蛋白<sup>[17-18]</sup>。本研究中发现 3 株细菌仅 SAG - FX17 号分离株为 Alp1 型, 其他 2 株为未定型, 说明可能有新的无乳链球菌菌株出现。

细菌增殖过程包括迟缓期、对数期和平台期, 影响细菌的毒性和致病力。该研究发现, 临床型乳腺炎奶牛乳汁和隐性乳腺炎奶牛乳汁的无乳链球菌分离株的体外培养增殖过程没有明显区别, 说明细菌增殖不是影响 3 株细菌感染能力差异的主要原因。生物被膜是细菌黏附在基质表面, 分泌多糖、纤维蛋白、核酸、脂质等, 将自身包裹在其中形成大量细菌聚集膜样结构<sup>[19]</sup>。免疫细胞所识别的细胞表面分子被生物被膜包裹, 故不易被中性粒细胞、巨噬细胞等清除。细菌从游离态变为生物被膜态的过程中能够促进炎症反应, 导致细胞死亡甚至引起组织坏死<sup>[20]</sup>。生物被膜可以作为细菌“菌巢”, 在感染过程中随时释放游离态细菌, 是造成乳腺炎慢性炎症和复发性感染的重要原因<sup>[21-22]</sup>。无乳链球菌强毒株在体外培养中形成生物被膜, 但本研究发现 3 株细菌在体外培养基中培养时均不能形成生物被膜, 但临床型乳腺炎分离株 SAG - FX17 在体外与奶牛乳腺上皮细胞 Mac - T 共孵育时形成生物被膜的能力明显增强, 说明无乳链球菌在奶牛乳腺上皮细胞表面形成生物被膜可能增强细菌的感染能力。本研究还通过体外试验研究 3 株无乳链球菌对 Mac - T 的黏附侵袭及在细胞内的存活能力, 发现临床型乳腺炎分离株 SAG - FX17 黏附能力明显高于其他 2 株菌, 该结果与生物被膜结果一致, 细菌生物

被膜的形成可能促进细菌对细胞的黏附能力, 细菌在感染过程中形成生物被膜不仅能够抵御抗生素、抗菌肽等杀菌物质, 还可以增强细菌对奶牛上皮细胞的黏附能力, 从而有利于更多的细菌侵袭到细胞内部<sup>[23]</sup>。研究发现, 细菌黏附上皮细胞后发生细菌内化过程, 细菌利用并激活宿主细胞信号通路引起细胞骨架重排进入非吞噬细胞内部<sup>[24]</sup>。乳房链球菌与停乳链球菌侵袭乳腺上皮细胞过程中发现网格蛋白的内化作用<sup>[25]</sup>。同时, 细菌侵袭到细胞内部与黏附细胞能力并不是正相关, 致奶牛乳腺炎大肠杆菌侵袭乳腺上皮细胞能力较低, 但沙门氏菌侵袭能力很强<sup>[26]</sup>。本研究中 3 株细菌侵袭到细菌内部的能力很低, 仅为黏附细菌数目的 0.012% (SAG - FX17)、0.000 34% (CM31)、0.000 46% (CM41b), 但黏附的细菌越多, 侵袭到细胞内部的细菌越多。因此细菌在奶牛乳腺上皮细胞表面形成生物被膜, 增强细菌对上皮细胞的黏附侵袭能力可能是影响无乳链球菌致病性的重要因素。

虽然 3 株无乳链球菌不易侵袭到细胞内部, 但侵袭到细胞内的细菌均具有一定存活的能力。其中, 隐性乳腺炎分离株 CM31 在胞内存活能力最弱, 分离株 CM41b 在胞内存活能力最强, 侵入细胞 2 h 后 54% 的细菌存活, 3、4 h 增长为 88.4%、86.7%, 说明该细菌在细胞内具有一定增殖能力, 这可能是被该菌感染奶牛由隐性发展为临床型乳腺炎的原因之一。LDH 研究结果显示, 细菌与细胞互作的 6 h 内, 细胞保持较好的活性, 因此本试验中只研究黏附后 4 h 内细菌在细胞内的存活能力。细菌能否长时间在上皮细胞中存活或通过上皮细胞进入到乳腺组织内部还需要进一步研究。细菌侵袭到细胞内部并且在其中存活具有重大意义, 不仅与细菌致病性相关, 还影响仅具有胞外活性的抗生素对细菌性乳腺炎的治疗作用<sup>[27]</sup>。

综上所述, 具有代表性的 3 株无乳链球菌分别为临床型乳腺炎奶牛乳汁分离株 SAG - FX17、隐性乳腺炎奶牛乳汁分离株 CM31 和隐性转临床型乳腺炎奶牛乳汁分离株 CM41b, 其血清型均为 I a 型, 具有 2b 型菌毛, CM31、CM41b 未检测到任何一种目标 α 相关蛋白基因, 说明可能有新无乳链球菌菌株出现。分离株 SAG - FX17 可以在奶牛乳腺上皮细胞上形成生物被膜, 增强了细菌黏附乳腺上皮细胞的能力, 增强该菌致病性和对杀菌物质的抗性, 可能是该分离株导致奶牛临床型乳腺炎的主要原因。

分离株 CM41b 在细胞内具有较高的存活能力,可能是该菌感染奶牛由隐性发展为临床型乳腺炎的重要原因。因此,形成生物被膜和侵袭到细胞内部并存活对细菌性乳腺炎发展具有重要意义。本研究为进一步揭示无乳链球菌致奶牛乳腺炎的致病机制提供了理论依据,也为该病的预防和治疗提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis; old and recent therapeutic approaches [J]. *Current Microbiology*, 2016, 72 (4): 377 – 382.
- [2] Hogeveen H, Steeneveld W, Wolf C A. Production diseases reduce the efficiency of dairy production; a review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis [J]. *Annual Review of Resource Economics*, 2019, 11: 289 – 312.
- [3] 侯瑞强. 奶牛隐性乳腺炎及其防治 [J]. *当代畜牧*, 2018 (20): 36 – 37.
- [4] Lakew B T, Fayera T, Ali Y M. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2019, 51 (6): 1507 – 1513.
- [5] Aitken S L, Corl C M, Sordillo L M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution [J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2011, 16 (4): 291 – 304.
- [6] 骆巧, 吕倩, 罗正中, 等. 奶牛场无乳链球菌传播途径新发现 [J]. *中国奶牛*, 2020 (4): 22 – 24.
- [7] Shabayek S, Spellerberg B. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 437.
- [8] Pietrocola G, Arciola C R, Rindi S, et al. *Streptococcus agalactiae* non – pilus, cell wall – anchored proteins; involvement in colonization and pathogenesis and potential as vaccine candidates [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 602.
- [9] 周明旭, 左晓昕, 徐悦, 等. 江苏某牛场奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定、耐药性及保守抗原分析 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2019, 40 (6): 54 – 60.
- [10] Reyes J, Chaffer M, Sanchez J, et al. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98 (8): 5294 – 5303.
- [11] Imperi M, Pataracchia M, Alfaroni G, et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (I a to I X) of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80 (2): 212 – 214.
- [12] 曾淑娟, 赵文利, 王辉, 等. 新生儿败血症无乳链球菌分型的研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30 (34): 6028 – 6030.
- [13] Lauer P, Rinaudo C D, Soriani M, et al. Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus* [J]. *Science*, 2005, 309 (5731): 105.
- [14] Moliveira I M, de Mattos M C, Pinto T A, et al. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed – field gel electrophoresis pattern [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006, 12 (9): 887 – 893.
- [15] Kerro – Dego O, Pryslak T, Perez – Casal J, et al. Role of GapC in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156 (3/4): 443 – 447.
- [16] Radtke A, Bruheim T, Afset J E, et al. Multiple – locus variant – repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157 (3/4): 398 – 404.
- [17] Shabayek S, Abdalla S, Abouzeid A M. Serotype and surface protein gene distribution of colonizing group B *Streptococcus* in women in Egypt [J]. *Epidemiology and Infection*, 2014, 142 (1): 208 – 210.
- [18] Kong F, Gowan S, Martin D, et al. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes; relationship to molecular serotypes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (2): 620 – 626.
- [19] Silvestre I, Borrego M J, Jordão L. Biofilm formation by ST17 and ST19 strains of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Research in Microbiology*, 2020, 171 (8): 311 – 318.
- [20] Watters C, Fleming D, Bishop D, et al. Host responses to biofilm [J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2016, 142: 193 – 239.
- [21] Melchior M B, Vaarkamp H, Fink – Gremmels J. Biofilms; a role in recurrent mastitis infections? [J]. *Veterinary Journal*, 2006, 171 (3): 398 – 407.
- [22] Fan H J. Advances in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16 (12): 2834 – 2847.
- [23] Ma F, Yi L, Yu N, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 biofilms inhibit the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 86.
- [24] Calvino L F, Oliver S P. Characterization of mechanisms involved in uptake of *Streptococcus dysgalactiae* by bovine mammary epithelial cells [J]. *Veterinary Microbiology*, 1998, 63 (2/3/4): 261 – 274.
- [25] Almeida R A, Matthews K R, Cifrian E, et al. *Staphylococcus aureus* invasive of bovine mammary epithelial cells [J]. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79: 1021 – 1026.
- [26] Döpfer D, Almeida R A, Lam T J, et al. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis *in vitro* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74 (4): 331 – 343.
- [27] Kamaruzzaman N F, Chong S, Edmondson – Brown K M, et al. Bactericidal and anti – biofilm effects of polyhexamethylene biguanide in models of intracellular and biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1518.