

· 猪链球菌感染 ·

# 致病性猪链球菌主要毒力因子基因 多重 PCR 检测

王花茹 王长军 陆承平 潘秀珍 陶开华 唐家琪

**【摘要】** 目的 建立多重 PCR 体系,实现猪链球菌毒力相关因子基因 *cps*、*mrp*、*epf* (*epf*<sup>+</sup>) 和 *sly* 的同步检测。方法 根据上述毒力因子基因核苷酸序列,设计和合成 4 对特异性引物,通过体系和条件优化,建立多重 PCR 检测方法,并对 72 株种属背景明确的实验菌株(其中猪链球菌 48 株、阴性对照株 24 株)及 49 株猪临床分离的链球菌样本进行检测分析。结果 48 株猪链球菌中,*cps2* 检出率为 33.3% (16/48)、*mrp* 检出率为 29.2% (14/48)、*epf* 检出率为 25% (12/48)、*epf*<sup>+</sup> 检出率为 6.3% (3/48)、*sly* 检出率为 54.2% (26/48),上述检测结果与菌株的毒力因子背景情况完全相符;24 株阴性对照和 49 株猪临床分离样本毒力因子检测结果均为阴性。结论 多重 PCR 可用于猪链球菌毒力相关因子 CPS2、MRP、EF、Sly 的基因检测,特异性和敏感性好,为该病快速诊断和分子流行病学调查提供了新的技术手段。

**【关键词】** 猪链球菌 2 型;毒力因子;荚膜多糖;溶菌酶释放蛋白;胞外因子;溶血素

**Detection of virulence-associated factors of *Streptococcus suis* by multiplex PCR assay** WANG Hua-ru\*, WANG Chang-jun, LU Cheng-ping, PAN Xiu-zhen, TAO Kai-hua, TANG Jia-qi. \*Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China  
Corresponding author: TANG Jia-qi, Email: tjq85@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To rapidly and sensitively detect the four virulence-associated factors of *Streptococcus suis*, a multiplex PCR was developed. **Methods** In the process of this reaction, four distinct DNA targets were amplified. One target was based on the serotype 2 (and 1/2) specific *cps* gene and the others were based on *Streptococcus suis mrp*, *epf* (*epf*<sup>+</sup>) and *sly* gene, encoding the MRP, EF(EF<sup>+</sup>) and Sly proteins of *Streptococcus suis*. 72 isolates, which including 48 strains of *Streptococcus suis* and 24 strains of negative control, and 49 clinical specimens were detected by the multiplex PCR assay. **Results** All PCR products were detected by electrophoresis on 1.2% agarose gels. With the 48 *Streptococcus suis* strains, the positive detection rates of *cps2*<sup>+</sup>, *mrp*<sup>+</sup>, *epf*<sup>+</sup>, *epf*<sup>+</sup> and *sly*<sup>+</sup> were 16/48, 14/48, 12/48, 3/48 and 26/48, respectively. The results were confirmed by bacteriological examination. There were no specific amplification products including 49 clinical specimens and 24 negative control strains. **Conclusion** The results demonstrated that multiplex PCR was a highly specific and sensitive diagnostic tool for the detection of virulence-associated factors of *streptococcus suis*.

**【Key words】** *Streptococcus suis* serotype 2; Virulence-associated factors; Capsular polysaccharide; Muramidase released protein; Extracellular factor; Sulysin

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是重要的人畜共患病病原体,可以引起猪的脑膜炎、关节炎和人的急性脑膜炎、感染性中毒休克综合征等疾病。近年来,许多国家和地区不断有猪链球菌病爆发和流行的报道<sup>[1]</sup>。根据 SS 菌体荚膜多糖(capsular

polysaccharide, CPS)抗原特性差异,可将其分为 35 种血清型(1~34 型、1/2 型),主要致病血清型为 SS1、SS2、SS1/2、SS7、SS9 和 SS14<sup>[2]</sup>,其中以 SS2 流行最广、致病性最强<sup>[3,4]</sup>。1998 年,我国江苏某地区猪群中爆发一种急性传染病,病猪达数万头,并引发相关从业人员的感染,造成 16 人死亡,病原体经生化、毒力、PCR 指纹图谱等综合分析鉴定为 SS2<sup>[5]</sup>。研究发现,并不是所有的 SS 都有致病性,菌株致病性强弱与其是否表达毒力相关因子有很大关系。目前,已知的与 SS 致病性相关的毒力因子主要有荚

基金项目:“十五”国家重要传染病科技攻关计划资助项目 (2003BA712A03-05)

作者单位:210002 南京军区军事医学研究所(王花茹、王长军、潘秀珍、陶开华、唐家琪);南京农业大学动物医学院(陆承平)

通讯作者:唐家琪,Email: tjq85@hotmail.com

膜多糖、溶菌酶释放蛋白 (muraminidase released protein, MRP)、胞外因子 (extracellular factor, EF) 和溶血素 (sullysin, Sly) 等。鉴于毒力因子检测在该病临床诊断及流行病学监测中的重要价值,且目前尚未形成标准化的检测鉴定方案,开展相关研究具有重要意义。基于此,本研究拟通过建立多重 PCR 检测体系,实现同步检测多种主要毒力相关因子的基因。

### 材料与方 法

1. 菌株: 种属背景明确的实验菌株 72 株, SS2 14 株 (9801、HAbb、98002、98T003、98012 分离自中国江苏; S10、8004、8011、8012、8014、8019、T15 和 7996 来自荷兰; S735 来自加拿大); SS 血清型标准参考株 34 株 (加拿大 Marcelo Gottschalk 教授惠赠); 其他群链球菌 18 株、金黄色葡萄球菌 2 株、流感嗜血杆菌 2 株、沙门菌 1 株、类志贺菌 1 株 (购自解放军总医院微生物室); 由南京农业大学动物医学院微生物实验室保存的 1998-2003 年从江苏、上海等地猪临床分离的链球菌样本 49 株, 其具体种属尚未确定 (表 1)。

2. 主要试剂: 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品,

PCR 扩增试剂盒为 (大连) 宝生物工程有限公司的产品, O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 和 O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix 均为晶美生物工程有限公司的产品。

3. 菌种培养: 挑取菌种接种于 5 ml THB 液体培养基中, 37℃ 置摇床培养过夜。

4. 引物设计合成: 根据 GenBank 检索的 *mrp*、*epf* (EF 编码基因)、*sly* 基因序列, 用 Primer premier 5 软件自行设计 3 对引物, 为尽可能获得相容性好的扩增条件, 设定引物 Tm 参数范围为 48℃ ~ 52℃, SS2 型特异性引物 *cps2J* 参照 Ogi Okwumabua 等的设计<sup>[6]</sup>。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 2)。

5. 模板的制备: 根据文献<sup>[7]</sup>稍加改进。取细菌培养物 1.5 ml 于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 沉淀用 TE 缓冲液 567 μl 重悬, 加 20% SDS 30 μl 和 20 mg/ml 蛋白酶 K 3 μl, 混匀, 37℃ 水浴 1 h, 加入 5 mol/L NaCl 100 μl 充分混匀, 再加入 CTAB/NaCl 溶液 80 μl 混匀, 65℃ 水浴 10 min, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸上清, 转移到新 EP 管中, 加等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清转

表 1 实验菌株背景及多重 PCR 实验结果

| 菌株名称                                  | 多重 PCR 结果   | 菌株名称                     | 多重 PCR 结果  | 菌株名称                                  | 多重 PCR 结果 |
|---------------------------------------|---|--------------------------|--|---------------------------------------|-----------|
| <i>S. suis</i> type 2                 |   | SS10(4417)               | -  | Other strains                         |           |
| 9801 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS11(12814)              | -  | 乙型溶血性链球菌                              | -         |
| HAbb <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS12(DAN 8830)           | 缺  | 屎肠球菌(249593)                          | -         |
| 98002 <sup>h</sup>                    | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS13(10581)              | -  | 屎肠球菌(251764)                          | -         |
| 98T003 <sup>h</sup>                   | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS14(13730) <sup>w</sup> | <i>mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | <i>E. faecali</i> (32220)             | -         |
| 98012 <sup>h</sup>                    | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS15(GRT639NCTC10446)    | <i>sly<sup>+</sup></i>                                 | <i>E. faecali</i> (135183)            | -         |
| S10 <sup>h</sup>                      | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS16(2726)               | -  | <i>E. faecali</i> (135196)            | -         |
| T15 <sup>n</sup>                      | <i>cps2<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i>                                 | SS17(93A)                | <i>sly<sup>+</sup></i>                                 | <i>E. faecali</i> (250063)            | -         |
| 7996 <sup>n</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i>                                 | SS18(C77)                | <i>sly<sup>+</sup></i>                                 | <i>E. faecali</i> (250928)            | -         |
| 8004 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS19(42A)                | <i>sly<sup>+</sup></i>                                 | <i>E. faecali</i> (251796)            | -         |
| 8011 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS20(86-5192 KALV)       | -  | <i>S. pneumoniae</i> (134130)         | -         |
| 8012 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS21(14A)                | -  | <i>S. pneumoniae</i> (134750)         | -         |
| 8014 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS22(88-1861)            | -  | <i>S. pneumoniae</i> (135185)         | -         |
| 8019 <sup>h</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS23(89-2479)            | -  | <i>S. equisubsp. zooepidemicus</i>    | -         |
| S735 <sup>w</sup>                     | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS24(88-3576-3)          | -  | <i>Streptococcus</i> group A(32132)   | -         |
| <i>S. suis</i> type reference strains |   | SS25(89-3576-3)          | -  | <i>Streptococcus</i> group B(32133)   | -         |
| SS1(SH28) <sup>n</sup>                | <i>sly<sup>+</sup></i>  | SS26(88-4109-1)          | -  | <i>Streptococcus</i> group C(32134)   | -         |
| SS2(R735) <sup>w</sup>                | <i>cps2<sup>+</sup> mrp<sup>+</sup> epf<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i> | SS27(89-3259)            | -  | <i>Streptococcus</i> group D(32135)   | -         |
| SS1/2(26S1) <sup>n</sup>              | <i>cps2<sup>+</sup> sly<sup>+</sup></i>                                 | SS28(89-590)             | <i>sly<sup>+</sup></i>                                 | <i>Streptococcus</i> group L(32141)   | -         |
| SS3(4961)                             | -   | SS29(92-1791)            | -  | <i>Shigella</i> (272101)              | -         |
| SS4(2524)                             | <i>sly<sup>+</sup></i>  | SS30(92-1400)            | -  | <i>Salmonella</i> (271004)            | -         |
| SS5(11538)                            | <i>sly<sup>+</sup></i>  | SS31(92-4172)            | -  | <i>H. influenzae</i> (124444)         | -         |
| SS6(6407)                             | -   | SS32(EA11F2-91)          | -  | <i>H. influenzae</i> (135204)         | -         |
| SS7(8074) <sup>n</sup>                | -   | SS33(92-1721-15EA 1832)  | -  | <i>Staphylococcus aureus</i> (135247) | -         |
| SS8(14636)                            | <i>sly<sup>+</sup></i>  | SS34(92-2742)            | -  | <i>Staphylococcus aureus</i> (135257) | -         |
| SS9(2083) <sup>n</sup>                | -   |                          |  |                                       |           |

注: h: 高毒力株; w: 弱毒力株; n: 无毒力株

表2 猪链球菌毒力相关因子基因多重 PCR 引物

| 毒力基因         | 引物序列                       | 退火温度(°C) | 基因位置          | 片段大小(bp)       |
|--------------|----------------------------|----------|---------------|----------------|
| <i>cps2J</i> | P1:tgatagtattgtcgggaggg    | 56.0     | 13 909~13 929 | 557            |
|              | P2:gagtattctaagaatgcctattg |          | 14 465~14 444 |                |
| <i>mrp</i>   | P1:tgctgaaatacagagtgc      | 49.6     | 392~409       | 970            |
|              | P2:tgccadcataatcataccc     |          | 1 361~1 344   |                |
| <i>sly</i>   | P1:gggtgcttadtgtgcgaaa     | 48.2     | 1 877~1 894   | 622            |
|              | P2:gcccafttatgtcattcct     |          | 2 498~2 481   |                |
| <i>epf</i>   | P1:aaaacggatgaagcgtt       | 51.2     | 2 613~2 630   | 744            |
|              | P2:aattagagctgccattgg      |          | 3 556~3 339   |                |
| <i>epf*</i>  | P1:同 <i>epf</i> 的 P1       | 50.9     |               | 1396,1623,2431 |
|              | P2:同 <i>epf</i> 的 P2       |          |               | 2655,3111      |

移到新 EP 管,加 0.6 体积的异丙醇,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇 1 ml 洗两次,弃上清,室温放置使乙醇挥发干净,用 ddH<sub>2</sub>O 1000 μl 溶解沉淀, -20°C 保存备用。

6. PCR 反应:在 0.5 ml 的薄壁 EP 管中依次加入 10× buffer、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、2.5 mmol/L dNTP、10 μmol/L 上下游引物(*epf*、*sly*、*cps2*、*mrp*)、模板、Taq 酶,最后加去离子水定容至 50 μl。先建立并优化单个靶基因 PCR 检测体系,继而进行多重 PCR 体系组合和条件优化。

7. 产物鉴定:PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 结 果

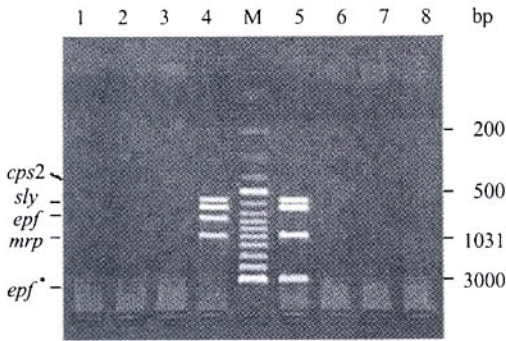
1. PCR 反应体系建立和优化:以 SS2 参考菌株 S10 和 S735 菌株基因组 DNA 为模板,用设计的 *cps2J*、*mrp*、*epf*(*epf\**) 和 *sly* 引物,分别建立单个靶基因的 PCR 检测体系。结果显示,用上述引物对建立的 PCR 可特异性扩增 S10 和 S735 菌株 *cps2*、*mrp*、*epf*(*epf\**) 和 *sly* 基因片段,大小分别约为 500 bp、900 bp、700 bp(2000 bp) 和 600 bp,与预期扩增基因片段大小一致;而以马链球菌兽疫亚种、乙型溶血性链球菌、粪链球菌、肺炎链球菌、链球菌 A 群(32132)、链球菌 B 群(32133)、链球菌 C 群(32134)、链球菌 D 群(32135)、链球菌 L 群(32141) 和金黄色葡萄球菌等菌株的基因组 DNA 为模板进行扩增,均未观察到相应扩增产物,表明引物有较好的特异性。

在此基础上,对多重 PCR 检测体系进行组合和条件优化。实验发现,反应体系中引物浓度是全体靶基因均得到有效扩增的关键。*epf* 基因引物浓度变化对 PCR 产量影响较小,但其浓度大于 0.1 μmol/L 时,则出现非特异性条带,理想的 *epf* 引

物浓度为 0.1 μmol/L; *mrp* 基因引物终浓度高于 0.075 μmol/L 时, *epf* 基因的扩增产量受到显著抑制,将 *mrp* 终浓度降为 0.04 μmol/L 时, *mrp* 和 *epf* 基因扩增产量均较为理想。在确定了 *epf* 和 *mrp* 引物量的基础上,进而尝试不同浓度下的 *cps2* 和 *sly* 引物对多重 PCR 组合效率的影响,确定 *cps2* 和 *sly* 较为理想的终浓度均为 0.1 μmol/L。较理想的多重 PCR 反应体系设定为:10× buffer 5.0 μl、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 3.0 μl、2.5 mmol/L dNTP 4.0 μl、10 μmol/L 上下游引物 *epf*、*sly*、*cps2* 各 0.5 μl、10 μmol/L *mrp* 引物 0.2 μl、DNA 模板 1 μl、Ex Taq 酶 0.25 μl(1 U),加去离子水定容至 50 μl。扩增参数为:95°C 变性 10 min 后进入循环反应,94°C 45 s、55°C 50 s、72°C 3 min,35 个循环后,72°C 延伸 10 min。在上述条件下,4 种毒力因子基因均可获得有效特异的扩增。

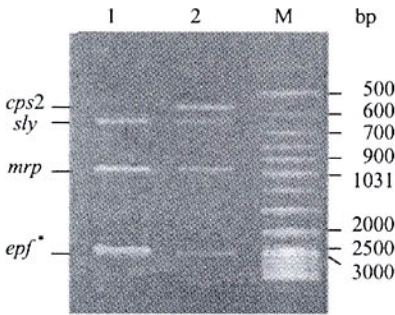
2. 多重 PCR 检测结果:对 48 株 SS 按上述体系进行多重 PCR 反应, *cps2* 检出率为 16/48、*mrp* 检出率为 14/48、*epf* 检出率为 12/48、*epf\** 检出率为 3/48、*sly* 检出率为 26/48。14 株 SS2 菌株中,来自于荷兰的 2 株无毒力菌株 T15、7996 的 PCR 检测结果为 *cps2*<sup>+</sup> *sly*<sup>+</sup>;来自于加拿大的弱毒力株 S735 的 PCR 检测结果为 *cps2*<sup>+</sup> *mrp*<sup>+</sup> *epf*<sup>+</sup> *sly*<sup>+</sup>;11 株来自于荷兰和中国江苏的强毒力株均检为 *cps2*<sup>+</sup> *mrp*<sup>+</sup> *epf*<sup>+</sup> *sly*<sup>+</sup> 阳性(部分结果见图 1)。由加拿大 Marcelo Gottschalk 教授惠赠的 34 株 SS 血清型标准参考株, *cps2* 检测阳性率为 2/34(SS2 和 SS1/2),与理论概率相符; *sly* 检出率为 12/34; *mrp*、*epf\** 检出率为 2/34,检出 *epf\** 基因的菌株为分属于 SS2 菌株中的 R735 和属于 SS14 的 13730(图 2),上述结果与菌株毒力因子表达背景资料相符。24 株链球菌其他群、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等种属的菌株和 49 株猪临床分离的链球菌样本均未检出任何特

异性的扩增条带。



1: *S. equisubsp. zooepidemicus*; 2: *E. faecalis*; 3: *S. pneumoniae*; 4: S10 (557 bp, 626 bp, 744 bp, 970 bp); M: O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus; 5: S735 (557 bp, 626 bp, 744 bp, 2655 bp); 6: *Streptococcus* group A (32132); 7: *Streptococcus* group D (32135); 8: *Staphylococcus aureus*

图1 参考菌株多重 PCR 扩增结果



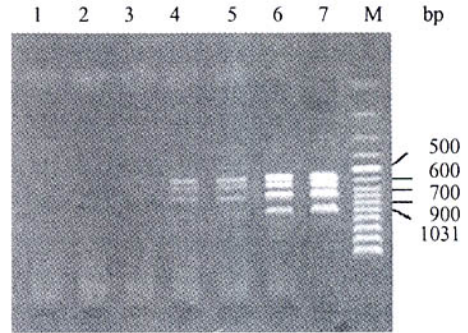
1: 13730 (626 bp, 970 bp, 2655 bp); 2: R735 (557 bp, 626 bp, 970 bp, 2655 bp); 3: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix

图2 参考株 *epf\** 基因的 PCR 检测

此外,应用该体系检测 2005 年四川资阳猪链球菌病爆发现场分离链球菌 12 株,均为 *cps2*<sup>+</sup> *mrp*<sup>+</sup> *epf*<sup>+</sup> *sly*<sup>+</sup>,进一步对 *cps2* 扩增基因进行序列分析,核苷酸同源率为 99%,表明引起该次疫病流行的病原体为 SS2(资料待发表)。

3. 多重 PCR 检测敏感性:取 Greeff 实验室标准株 S10 的培养菌液用 THB 平板法计数,培养液 10 倍连续稀释,分别提取细菌基因组 DNA,进行单重和多重 PCR 分析。结果显示,扩增 *sly* 基因的单重 PCR 体系敏感性最高,其检测下限为 10<sup>0</sup> cfu/ml; *cps2* 次之,检测下限可达到 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>1</sup> cfu/ml;再次为 *epf* 和 *mrp*,检测下限均为 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>2</sup> cfu/ml。总体而言,多重 PCR 体系检测敏感性略有下降,检测下限为 10<sup>1</sup> ~ 10<sup>3</sup> cfu/ml(图 3)。需要说明的是,采用不同来源的 Taq 酶, *cps2*、*mrp*、*epf* 和 *sly* 检测下限均可

发生 1~2 个数量级的波动;使用高质量的 Taq 酶时,单重 PCR 检测下限可达到 10<sup>0</sup> cfu/ml,多重 PCR 检测下限可达 10<sup>1</sup> cfu/ml。



1~7: PCR products amplified from 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> cfu/ml; M: O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus

图3 多重 PCR 敏感性分析

### 讨论

SS2 不同分离株致病性差异较大,高致病菌株可引起猪的脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症和仔猪的突然死亡,并可引发人类感染,甚至死亡;低致病株和非致病菌株常以携带状态见于猪的呼吸道。菌株致病性强弱主要取决于其表达的毒力蛋白,目前已知的毒力相关蛋白有 CPS、MRP、EF、Sly、纤维素、粘合蛋白等,其中前四种受到研究者广泛关注。

本研究自行设计引物,建立了可以准确检测 SS 4 种毒力因子基因的多重 PCR 方法,通过对不同种属的 72 株菌株及 12 株爆发现场分离物进行印证检测,结果与各菌株的遗传背景完全相符,检测符合率可达 100%。上述结果表明,多重 PCR 敏感性和特异性好,可用于 SS 毒力相关因子 *cps2* 及 *mrp*、*epf*、*sly* 的基因检测,为 SS2 快速诊断和分子流行病学调查提供了新的技术手段。进一步分析发现,48 株已知背景的 SS 中,11 株强毒力菌株 *mrp*、*epf* 均检为阳性,且均属 SS2;3 株弱毒力株 *mrp*、*epf*<sup>\*</sup> 均检为阳性,其中 2 株为 SS2,1 株为 SS14;其他无毒力株 *mrp*、*epf*(*epf*<sup>\*</sup>) 均为阴性。该结果提示,毒力因子 MRP、EF(EF<sup>\*</sup>) 及 CPS2 与菌株毒力有一定的相关性。

此外,猪链球菌 EF 及其类似物 EF<sup>\*</sup> N 端 833 氨基酸(1~2499 nt)几乎完全相同(98%),但 EF<sup>\*</sup> C 末端含有多个串连重复的氨基酸单元(R1~R11),根据所含重复序列数量和排列不同,可将其分为五种,对应蛋白相对分子质量(M<sub>r</sub>)分别为

195×10<sup>3</sup>、180×10<sup>3</sup>、175×10<sup>3</sup>、160×10<sup>3</sup> 和 155×10<sup>3</sup>[8]。有研究者认为这种多态特性与菌株毒力相关,可能参与细菌逃避宿主的适应性免疫应答。但由于其鉴别需要设计多对引物进行 PCR 或序列分析,增加了操作的难度和复杂性,限制了相关研究进展。本试验通过全面分析 *epf* 和 *epf*\* 基因序列,发现 EF 和 5 种 EF\* 共有的序列,上游位于 *epf* 和 *epf*\* 的 1~2859 nt 处,下游位于 *epf* 的 3153~4423 nt 和 *epf*\* 的 5474~6744 nt 处,进而设计了一对 *epf* 和 *epf*\* 通用的检测引物,上游引物位于 2613~2630 nt,下游引物位于 *epf* 的 3556~3339 nt。应用该对引物成功检出 3 株 *epf*\* 菌株,大小为 2655 bp。理论上,应用该引物可正确鉴别出 6 种不同基因型别的菌株,预期扩增片段 *epf* 为 744 bp,而 *epf*\* 可有 1396 bp、1622 bp、2431 bp、2655 bp 和 3111 bp 五种大小。但由于缺少部分 *epf*\* 标准株及受样本量限制,该引物的适用性尚需进一步验证。

参 考 文 献

- 1 Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 1997, 21: 381-407.
- 2 Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2922-2929.
- 3 Chanter N, Jones PW, Alexander TJL. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*-a speculative review. *Vet Microbiol*, 1993, 36: 39-55.
- 4 Clifton-Hadley FA, Alexander TJL. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type II in pigs. *Vet Rec*, 1980, 107: 40-41.
- 5 朱进,唐家琪,郭恒彬,等.急性爆发流行中毒休克综合征病原体生物学特性及鉴定. *中华传染病杂志*, 2001, 19: 84-86.
- 6 Okwumabua Ogi, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218: 79-84.
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁,黎孟枫,等译.分子克隆实验指南.第 3 版.北京:科学出版社,1998.
- 8 Smith HE, Reek FH, Vech U, et al. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strain. *Infect Immun*, 1993, 61: 3318-3326.

(收稿日期:2005-06-30)

(本文编辑:孙强正)

· 疾病控制 ·

甘肃省庄浪县一起流行性脑脊髓膜炎爆发的调查

张有良 阎峻 王植霖

2005 年 3 月初,甘肃省庄浪县发生了一起流行性脑脊髓膜炎(流脑)爆发疫情,发病 4 例,死亡 3 例。首例发生于 2 月 17 日,为诊断疑似流脑病例,3 月 1、5、6 日各发生 1 例。患者临床表现为发热、头痛、恶心、喷射状呕吐和颈项强直、全身发红、结膜充血、全身大量瘀点、瘀斑、视物模糊等。首发病例于病后第三日双目失明。死亡病例均于发病 6~24 h 内死亡,病情极为凶险,进展迅速,临床诊断为暴发型流脑。病例分布于该县郑河、盘安两个乡的两个村的两户居民中。病例年龄分布为 4 岁 2 例,死亡 2 例;5 岁 2 例,死亡 1 例。男、女各 2 例。发病乡及发病儿童近年均无流脑疫苗接种史。所有病例均未采集到咽拭子标本,1 例临床采集脑脊液检测,但未做特异性流脑 IgM 抗体和病原检测。采集密切接触者咽拭子标本送中国疾病预防控制中心,检测出 C、B 和 A 群三种脑膜炎奈瑟菌株。

流行病学分析:①1996 年以来,平凉市累计发生流脑 110 例,年散发病例 3~28 例,年均 11 例。发病高峰期为 3~4 月份,占全年总病例数的 46.36%。2005 年 3 月发病 7 例,明显高于历年同期 1~3 例的发病水平。②爆发性疫情表现

为家庭和时间的聚集性,病情凶险,进展迅速,高病死率,分布于交通闭塞、偏远贫困的山区农村地区,且死亡病例多未到正规医院及时就诊,于 24 h 内死亡,为该市多年来所罕见。③未查明明确的传染源,两个乡的病例间的传播途径不明。由于该地不具备实验室检测条件,病情急,未能及时采集到患者的标本进行病原检测,但在密切接触者样品中检出 C 群和 A 群、在健康人群中检测出 B 群和 A 群脑膜炎奈瑟菌。据此及病情的凶险性、进展迅速、高病死率等特征分析,该起爆发性疫情由 C 群引发的可能性较大。④经济、医疗卫生条件落后,群众防病意识不强是影响流脑爆发和高病死率的重要社会因素。该县为国家级贫困县,发病乡及家庭的经济十分拮据,居住条件差,被褥、衣物等不常清洗更换,卫生状况不良。患者均有不同程度的营养不良。调查认为,个体医生不仅对流脑诊疗技术有限,且传染病防治意识淡薄,未能做出正确判断和合理处理,延误了病情。

该起流脑爆发后,各级政府极为重视,卫生、教育等各有关部门立即组织开展了调查处理工作,措施果断、及时,没有造成疫情蔓延和流行。

(收稿日期:2005-05-30)

(本文编辑:张林东)