

## · 实验研究 ·

# 广西地区无症状猪中猪链球菌 2 型 分子流行病学研究

熊毅 刘棋 覃芳芸 白昀 朱伟 李华明 郭建刚 覃伦 潘杰 龙剑明 陈磊

**【摘要】** 目的 了解广西地区无症状猪中猪链球菌 2 型的带菌情况以及主要毒力因子的分布和抗药性。方法 从广西地区 10 个县区屠宰场采集无症状猪的扁桃体标本进行细菌分离、多重 PCR 鉴定和药物敏感性分析。结果 从采集到的 1179 份扁桃体标本中分离出 1105 株链球菌,其中猪链球菌 667 株,猪链球菌 2 型 33 株;对 33 株 2 型菌进行主要毒力因子检测,强毒型 *sly* + *mrp* + *epf* + 22 株,占 66.7%, *sly* + *mrp* + *epf* - 1 株, *sly* - *mrp* + *epf* - 7 株, *sly* - *mrp* + *epf* + 2 株, *sly* - *mrp* - *epf* - 1 株;33 株 2 型菌对青霉素、红霉素、万古霉素、庆大霉素、壮观霉素、恩诺沙星、环丙沙星、先锋霉素 VI、磺胺嘧啶钠、呋喃妥因、新霉素、丁胺卡那和四环素都存在不同程度的耐药性,其中先锋霉素 VI、青霉素、恩诺沙星相对敏感,分别有 93.9% (31/33)、87.9% (29/33) 和 81.8% (27/33) 的菌株在中度敏感以上,而耐药性强的是丁胺卡那和四环素,耐药菌株分别有 84.8% (28/33) 和 81.8% (27/33)。结论 广西地区无症状猪中猪链球菌 2 型带菌率较低,疫点与非疫点的带菌率没有明显差异;分离的菌株多以强毒型 *sly* + *mrp* + *epf* + 存在,对先锋霉素 VI 最敏感。

**【关键词】** 猪链球菌 2 型; 猪; 分子流行病学研究

**Study on the molecular epidemiology of streptococcus suis type 2 from healthy pigs in Guangxi** XIONG Yi\*, LIU Qi, QIN Fang-yun, BAI Yun, ZHU Wei, LI Hua-ming, GUO Jian-gang, QIN Lun, PAN Jie, LONG Jian-ming, CHEN Lei. \*Guangxi General Veterinary Prevention and Quarantine Services, Nanning 530001, China

Corresponding author: LIU Qi, Email: lqzz888@sina.com

**【Abstract】 Objective** In order to investigate the positive rate of *streptococcus suis* type 2 and the genes of their suilysin (*sly*), extracellular protein (*epf*) and muramidase-released protein (*mrp*) and to understand the antibiotic susceptibility of *S. suis* type 2. **Methods** *S. suis* type 2, isolated from slaughtered healthy pig's tonsil in 10 county area of Guangxi, were identified by Multiplex PCR, and the genes of their *sly*, *epf*, *mrp* and the antimicrobial sensitivity analysis were performed. **Results** 1105 strains of *Streptococcus* including 667 strains of *S. suis* and 33 strains of *S. suis* type 2 were detected from 1179 samples. In these *S. suis* type 2 strains, there were 22 strains of *sly* + *mrp* + *epf* + type, 1 strain of *sly* + *mrp* + *epf* - type, 2 strains of *sly* - *mrp* + *epf* + type, 7 strains of *sly* - *mrp* + *epf* - type and 1 strain of *sly* - *mrp* - *epf* - type. When these strains were subjected to be tested with penicillin, eritrocina, vacocin, gentamycin, spectinomycin, enraxacin, ciprofloxacin, cephalothin VI, sulfadiazine sodium, cyanin, mycfradin, amikacin and achromcin, some were found to be resistant to but most strains were susceptible to cephalothin VI, penicillin and enraxacin. There were 31, 29 and 27 strains over medium sensitivity, respectively, but 28 and 27 resistant strains to amikacin and achromcin were found. **Conclusion** The positive rate of *S. suis* type 2 in clinical healthy pigs was low (2.8%) and did not show obvious difference between the counties with or without a history of *S. suis* infection. All the isolated strains were susceptible to cephalothin VI, but most strains were virulent.

**【Key words】** *Streptococcus suis* type 2; Pigs; Epidemiology, molecular

猪链球菌 2 型是一种重要的人兽共患传染病的

病原体,1968 年丹麦首次报道了人感染猪链球菌<sup>[1-3]</sup>。我国 1990 年分离到猪链球菌 2 型<sup>[4]</sup>;1998、1999 年江苏省和 2005 年四川省发生人猪链球菌感染疫情<sup>[5-8]</sup>;广西地区 2005、2006 年有 4 个县发生了人感染猪链球菌 2 型的病例,为了解广西地区猪链球菌 2 型的带菌情况,对 10 个县屠宰场无症状猪进

基金项目:广西壮族自治区科技厅科技攻关与新产品试制资助项目(0632002-1)

作者单位:530001 南宁,广西壮族自治区兽医防疫检疫站(熊毅、刘棋、李华明);广西大学动物科学院(覃芳芸、白昀、朱伟、郭建刚、覃伦、潘杰、龙剑明、陈磊)

通讯作者:刘棋, Email: lqzz888@sina.com

行了猪链球菌 2 型的调查。

### 材料与方 法

1. 材料: ①培养基: 血琼脂平板由本实验室配制, 链球菌增菌培养基购自中国进出口商品检验技术研究所, 马血清购自大连宝生物公司; 猪链球菌 1 型、2 型、7 型和 9 型菌株由中国动物卫生与流行病学中心范伟兴博士惠赠; 马链球菌兽疫亚种、无乳链球菌和粪链球菌等均购自中国兽医药品监察所; 药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。②引物序列: 分析相应的序列设计了 7 对引物<sup>[9]</sup>, 由大连宝生物公司合成(表 1)。③主要试剂: dNTP、Taq 酶、蛋白酶 K、Marker DL2000、SDS、饱和酚、ddH<sub>2</sub>O 等均购自 TaKaRa 公司。

表 1 核酸扩增用引物序列一览表

引物	引物序列(5'~3')	片段长度 (bp)
sts1/sts2	GCGCAGGCGGTTTGATAAGTCG/ GTTACAAACTCTCGTGGTGTGAC	858
gdh1/gdh2	AATGTTCAAGTCAAC/ ACATGGAAGGGCAAT	725
cps2Ja/cps2Jb	GTTCTTCAGATTTCATCAACGGAT/ TATAAAGTTTGCAACAAGGGCTA	387
Cps2J1/ Cps2J2	CAAACGCAAGGAATTACGGTATC/ CATTTCCTAAGTCTCGCACC	236
ef1/ef2	GTGACAGAAGCAGAGACAGC/ CCAGCTAGGTCTCCTGCTC	572
mrp1/mrp2	CAGATGTGGACCGTAGACC/ GGATAATCACCAGCAGAA	316
sly1/sly2	GCTTTATTGCGTGTGAC/ CTGTTCTCCACCACTCCC	1099

### 2. 方法:

(1)样品采集: 于 2006 年 7-10 月采集广西地区 10 个县屠宰场集中屠宰猪的扁桃体标本 1179 份, 标本迅速进行增菌培养获得单个菌落。

(2)DNA 抽提: 取细菌液体培养物 1.0 ml, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 300 μl 的 PBS 液、160 μl 的 EDTA 混匀, 再加入 80 μl 10% SDS 和 10 μl(10 mg/ml) 的蛋白酶 K, 混匀后 52℃ 水浴 2 h。加等体积酚/氯仿抽提, 再用氯仿抽提 1 次, 加入 2 倍体积无水乙醇及 10% 体积醋酸钠 -20℃ 沉淀 2 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 70% 乙醇洗涤 2 次, 烘干后加入 50 μl ddH<sub>2</sub>O 即为模板, -20℃ 保存备用。

(3)三重 PCR 扩增<sup>[10-13]</sup>: 反应体系为 25 μl, 取模板 2.0 μl, 加 10× Reaction buffer 2.5 μl, dNTP(2.5

mmol/L) 2.0 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.5 μl, 引物 sts1/sts2 各 0.3 μl, cps2Ja/cps2Jb 各 0.5 μl, gdh1/gdh2 各 0.5 μl, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μl, 置 PCR 仪中, 95℃ 4 min, 94℃ 变性 60 s, 56℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 34 个循环, 72℃ 10 min。

(4)猪链球菌 2 型毒力基因多重 PCR<sup>[14,15]</sup>: 对三重 PCR 检测出的猪链球菌 2 型阳性菌株进行毒力基因检测, 反应体系为 25 μl, 取模板 2.0 μl, 加 10× Reaction buffer 2.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.5 μl, 引物 sly1/sly2 各 0.4 μl, ef1/ef2 各 0.8 μl, Cps2J1/Cps2J2 各 0.5 μl, mrp1/mrp2 各 0.4 μl, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μl, 置 PCR 仪中, 95℃ 4 min, 94℃ 变性 60 s, 56℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 34 个循环, 72℃ 10 min。

(5)药敏试验: 对分离到的猪链球菌 2 型菌株进行纸片法药敏试验。

### 结 果

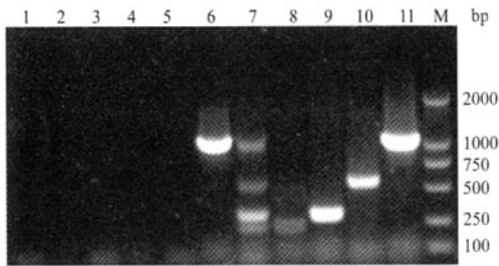
1. 猪链球菌 2 型检测结果: 三重 PCR 扩增链球菌 16S rRNA、猪链球菌 *gdh* 和猪链球菌 2 型的 *cps2J* 基因, 扩增片段分别为 858 bp、725 bp 和 387 bp; 猪链球菌 2 型为 858 bp、725 bp 和 387 bp 三条目的带; 猪链球菌亚种有 858 bp 和 725 bp 两条目的带; 链球菌而非猪链球菌亚种的只有一条 858 bp 目的带。本研究共采集了 1179 份猪扁桃腺标本, 检出 1105 株链球菌, 平均检出率是 93.7%, 最低的是 86.6%, 最高的是 98.8%; 667 株猪链球菌, 平均检出率是 56.6%, 最高的达 75.9%, 最低的有 44.5%; 猪链球菌 2 型有 33 株最高的县带菌率为 5.8% (表 2)。除了猪链球菌外还有 428 株其他链球菌亚种, 占 39.1%。疫点县的荔蒲、武宣、融安、东兰县的带菌率与非疫点县没有明显的差别。

2. 猪链球菌 2 型阳性株毒力因子检测结果: 对检测出的猪链球菌 2 型 33 株菌 4 个主要毒力因子 *sly*、*epf*、*mrp* 和 *cps2J* 进行多重 PCR 检测, 分别扩增出 1099 bp、572 bp、316 bp 和 236 bp 大小的目的片段(图 1、2)。PCR 扩增结果表明, 强毒型的 *sly* + *mrp* + *epf* 有 22 株, 占 66.7%, *sly* + *mrp* + *epf* - 的有 1 株, *sly* - *mrp* + *epf* - 的有 7 株, *sly* - *mrp* + *epf* + 的有 2 株, *sly* - *mrp* - *epf* - 的有 1 株, 结果见表 3。

表2 广西地区 1179 份猪扁桃体标本检测结果

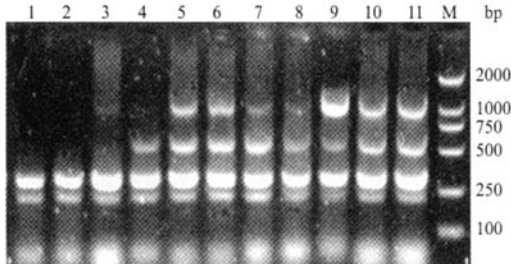
标本来源	标本份数	链球菌株数(%)	猪链球菌株数(%)	猪链球菌 2 型株数(%)
荔蒲 <sup>a</sup>	128	118(92.2)	57(44.5)	3(2.3)
桂林	112	97(86.6)	76(67.9)	4(3.5)
武宣 <sup>a</sup>	238	223(93.7)	114(47.8)	14(5.8)
象州	40	37(92.5)	25(62.5)	0(0)
东兰 <sup>a</sup>	84	83(98.8)	61(72.6)	2(2.9)
巴马	58	52(89.7)	44(75.9)	2(3.4)
融安 <sup>a</sup>	79	74(93.7)	49(62.0)	1(1.3)
柳江	133	130(97.7)	86(64.7)	4(3.0)
玉州区	146	140(95.9)	68(46.6)	1(0.9)
容县	161	151(93.8)	87(54.0)	2(1.2)
合计	1179	1105(93.7)	667(56.6)	33(2.8)

注：<sup>a</sup> 曾发生人猪链球菌病的疫点；括号内数据为检出率



注：M: Marker DL2000; 1: 无乳链球菌; 2: 粪链球菌; 3: 兽疫链球菌; 4~7: 分别为猪链球菌 1、7、9 和 2 型; 8~11: 分别是猪链球菌 2 型 *cps*、*mrp*、*epf*、*sly* 基因单一 PCR 结果

图1 猪链球菌毒力因子 PCR 扩增结果



注：M: Marker DL2000; 1: G42; 2: G121; 3: LZ174; 4: R147; 5: G6; 6: G148; 7: LZ181; 8: Y134; 9: P25; 10: R146; 11: RA80

图2 猪链球菌主要毒力因子多重 PCR 扩增结果

表3 广西地区猪链球菌 2 型毒力因子检测结果

标本来源	毒力因子				
	<i>sly</i> + <i>epf</i> + <i>mrp</i> +	<i>sly</i> + <i>epf</i> - <i>mrp</i> +	<i>sly</i> - <i>epf</i> + <i>mrp</i> +	<i>sly</i> - <i>epf</i> - <i>mrp</i> +	<i>sly</i> - <i>epf</i> - <i>mrp</i> -
荔蒲	2	0	0	1	0
桂林	2	0	0	2	0
武宣	11	0	1	2	0
象州	0	0	0	0	0
东兰	2	0	0	0	0
巴马	1	0	0	1	0
融安	1	0	0	0	0
柳江	1	1	0	1	1
玉州区	1	0	0	0	0
容县	1	0	1	0	0
合计	22	1	2	7	1

3. 药敏试验结果: 用 13 种药敏纸片进行药敏试验, 本次分离的广西地区猪链球菌 2 型菌株都有耐药菌株存在, 相对的先鋒霉素 VI、青霉素、恩诺沙星较敏感, 分别有 93.9% (31/33)、87.9% (29/33) 和 81.8% (27/33) 的菌株在中度敏感以上, 而耐药性强的是丁胺卡那和四环素, 耐药菌株有 84.8% (28/33) 和 81.8% (27/33), 结果见表 4。

表4 广西地区 33 株猪链球菌 2 型菌株药敏试验结果

药物名称	敏感菌株数	中度敏感菌株数	耐药菌株数
先鋒霉素 VI	22	9	2
恩诺沙星	5	22	6
青霉素	0	29	4
环丙沙星	5	21	7
红霉素	5	20	8
壮观霉素	13	11	9
呋喃妥因	15	8	10
新霉素	4	17	12
万古霉素	15	5	13
庆大霉素	10	5	18
磺胺嘧啶钠	3	7	22
四环素	1	5	27
丁胺卡那	3	2	28

### 讨论

本次调查主要运用了两个多重 PCR 方法, 第一个三重 PCR 方法可以区分链球菌属、猪链球菌亚种和猪链球菌 2 型, 第二个四重 PCR 用于猪链球菌 2 型中 *cps*、*sly*、*mrp* 和 *epf* 4 个主要毒力基因的判定, 在两个多重 PCR 中都设计了猪链球菌 2 型的特异性片段 *cps2J* 基因扩增引物, 但这两对引物所在的位置及扩增片段的大小不一样, 在这次研究中两对引物都扩增出了相应的目的片段, 这充分表明了本研究所用的多重 PCR 方法具有很高的特异性, 完全适合于猪链球菌 2 型的诊断及流行病学研究。

本次调查从无症状猪的扁桃体标本中分离链球菌的平均检出率是 93.7%, 猪链球菌分离出 667 株, 平均检出率是 56.6%; 除了猪链球菌外还有 428 株其他链球菌亚种, 占 39.1%; 检出猪链球菌 2 型 33 株, 最高的县带菌率为 5.8%; 疫点县的荔蒲、武宣、融安、东兰县的带菌率与非疫点县没有明显的差别, 而过去有很多报道猪链球菌 2 型广泛存在于猪的呼吸道中, 猪活体棉拭子、扁桃体带菌检出率多数在 50% 以上<sup>[16,17]</sup>, 此次广西地区无症状猪中猪链球菌 2 型的平均带菌率只有 2.8%, 这表明该地区无症状猪链球菌 2 型带菌率较低。在过去十多年中, 我们一直未能从广西地区发病猪中分离到猪链球菌 2

型,只在 2006 年 4 月从发病的脑炎型猪脑中分离到 1 株猪链球菌 2 型,这与本调查结果一致,说明广西地区猪链球菌病不是以猪链球菌 2 型为主要病原体。

猪链球菌 2 型毒力因子分析显示,强毒型 *sly* + *epf* + *mrp* + 最多<sup>[18]</sup>,有 22 株,弱毒的 *sly* - *epf* - *mrp* - 型最少,只有 1 株;这表明广西地区猪链球菌 2 型是以强毒株为主,不同菌株的毒力因子 *sly*、*epf* 和 *mrp* 存在与否不尽相同,特别是 *epf* + *mrp* + 型中也存在 *sly* - 的菌株,因此毒力因子与菌株的毒力强弱关系有待进一步研究。

药物敏感性试验表明,广西地区猪链球菌 2 型对常用的一些药物都存在一定程度上的耐药性,特别是丁胺卡那和四环素,这可能与猪饲料中经常添加药物以及治疗时药物应用不规范有关。同时本次研究的菌株都是从无症状猪中分离到的,它们能长期存在于扁桃体会产生一定的抗药性,因此合理使用药物对猪链球菌病的防治也非常关键。

参 考 文 献

[1] De GA, Buys H, van AL, et al. Response regulator important in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog*, 2002, 33(4):185.

[2] Robert Higgins, Marcelo Gottschalk. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J*, 2001, 42(3):223.

[3] 陆承平. 猪链球菌病与猪链球菌 2 型. *科技导报*, 2005, 23(9): 9-10.

[4] 黄毓茂, 黄引贤. 2 型猪链球菌的血清学鉴定. *中国兽医学报*, 1995, 15(1):63-65.

[5] 何家惠, 诸长贵, 徐鹤遐, 等. 猪急性败血型链球菌病的诊断及病原鉴定. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15 增刊:190-191.

[6] 王广和, 杨瑞霞, 华春涛, 等. 一种新的人兽共患病病原菌——血液链球菌. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15 增刊:204-206.

[7] 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(22):67.

[8] Yu HJ, Jing HQ, Chen ZH, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infect Dis*, 2006, 12(6): 914-920.

[9] 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等. 译. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002:611-700.

[10] 赵华梅, 潘秀珍, 王长军, 等. 猪链球菌 2 型谷氨酸脱氢酶基因的克隆表达及酶活性测定. *中国人兽共患病杂志*, 2006, 22(1):22-25.

[11] Okwumabua O, Persaud JS, Reddy PG. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001, 8(2):251-257.

[12] 张秀亮, 沈琴芳, 郑新添, 等. 猪链球菌的鉴定及其 PCR 分型方法的建立. *黑龙江畜牧兽医*, 2005, (9):86-87.

[13] Wisselink HJ, Reek FH, Vecht U, et al. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Vet Microbiol*, 1999, 67(3):143-157.

[14] Florence BH, Morvan H, Keribin AM, et al. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and sulysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res*, 2000, 31(5):473-479.

[15] 王花茹, 王长军, 陆承平, 等. 致病性猪链球菌主要毒力因子基因多重 PCR 检测. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(9):640-644.

[16] Henk J, Wisselink, Jeroen J, et al. 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(8):2922-2929.

[17] 何孔旺, 倪艳秀, 王继春, 等. 猪链球菌 2 型的分子流行病学研究. *中国人兽共患病杂志*, 2002, 18(5):45-47.

[18] Martinez G, Pestana de Castro AF, Jordao Ribeiro Pagnani K, et al. Clonal distribution of an atypical MRP+, EF\*, and sulysin+ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Canadian J Vet Res*, 2003, 67(1):52-55.

(收稿日期:2006-10-25)

(本文编辑:尹廉)

· 阅读信息 ·

本刊近期连载“流行病学与计算机应用”系列讲座

近年来知识和信息已经达到每 4-5 年更新一次的速度。流行病学虽然隶属自然科学,但许多内容介于自然科学与社会科学、信息科学与生物科学、电子与分子之间。流行病学学科的进步依赖于边缘学科的发展,同理,相辅相成,流行病学的发展也促进其他学科的进步。我国政府提出“以信息化带动工业化,以信息化推动现代化”的决策,使信息化的步伐大大加速。我国各地的信息化,电子政务、商务,远程教育、医疗,家庭网络等都在蓬勃兴起。在流行病学方面,急性传染病网络直报已经形成,生命统计系列软件也在编制。上海地区已在应用健康档案的贮存和分析及恶性肿瘤、糖尿病的报告、管理软件。浙江省已开发出细菌学检索和致癌剂结构分析的软件。随着硬、软件的不断开发,计算机在流行病学上的应用将会愈来愈广泛和深入。为了适应时代的发展,复旦大学预防医学研究所组织了海内外流行病学专家编写了《流行病学与计算机应用》一书。为了便于更多的读者阅读,本刊为先睹为快,从中有目的选择了部分内容,由复旦大学预防医学研究所俞顺章教授编写,本刊将在 2007 年第 7 期起以“系列讲座”形式逢单月刊出。敬请读者关注。