

# 人源和猪源猪链球菌的同源性研究

朱凤才 杨华富 胡晓抒 汪华 王广和 宋亚军 杨瑞馥

**【摘要】** 目的 进一步鉴定菌种,评价人源株与猪源株猪链球菌的同源性。方法 对分离自猪无菌部位、患者血液和脑脊液的 7 株猪链球菌 II 型和标准猪链球菌 II 型,用菌体脂肪酸分析和随机引物基因扩增技术进行菌种的表现型和基因型分类。对其结果进行聚类分析和主成分分析。结果 随机引物基因扩增技术分析提示,被检的 7 株猪链球菌 II 型与标准株一致,均为猪链球菌 II 型;人源株与猪源株同源,分离自病人血液和脑脊液的菌株同源。这些结果在菌体脂肪酸分析中得到了进一步的确认。即基因型与表现型结果一致。结论 被检的 7 株猪链球菌 II 型与标准株均同源。

**【关键词】** 猪链球菌;菌体脂肪酸;基因

**Homogeneity study on the *Streptococcus suis* isolated from human and swine** ZHU Fengcai, YANG Huafu, HU Xiaoshu, et al. Jiangsu Provincial Center for Public Health, Nanjing 210009, China

**【Abstract】 Objective** To identify *S. suis* and to evaluate the homogeneity of isolates of *S. suis* from human and swine. **Methods** Culture, morphology, API biochemical tests and serum coagulate tests were used. All the 7 strains of streptococcus were confirmed to be *S. suis* serotype 2. Two strains and 1 strain were isolated from blood and cerebrospinal fluid (CSF) of patients, respectively, while the other 4 strains were obtained from the infected swine or their corpses. Seven strains of *S. suis* serotype 2 and reference strain SS2 were analyzed by randomly amplified polymorphic DNA analysis with six primers and Rep PCR with four primers and thalli fatty acid profile analysis. Cluster and principal compound analysis of results were performed with RAPD, Phylip and Treeview software. **Results** By analysis on RAPD patterns, a close relationship among 7 strains of *S. suis* serotype 2 and reference strain SS2 was discovered. Human-born strains and swine-born strains exhibit similar RAPD patterns. There was a same clonal relationship between strains originated from the blood and CFS of the patients. These results were confirmed by thalli fatty acid profile to have genotypic and phenotypic identity.

**Conclusion** Homogeneity exists among the 7 strains and reference strain SS2.

**【Key words】** *Streptococcus suis*; Thalli fatty acid profile; Gene

1998 年 7 月下旬至 8 月中旬,江苏省南通等地区发生了人和猪重症感染,导致了万余头生猪未能来得及治疗即死亡,与病、死猪密切接触者(主要是非职业性屠宰者)有 25 人发病,其中有 14 人死亡<sup>[1]</sup>。疫情发生后,从病人的血液和脑脊液,以及病、死猪的无菌部位分离到十余株链球菌。笔者用菌体脂肪酸分析和随机扩增 DNA 多态性分析(RAPD)技术对分离自不同地区和不同宿主的链球菌的表现型和基因型进行分析并与猪链球菌 II 型标准株进行比较,以期追踪人体病原的感染来源,以及对分离菌株进一步地进行鉴定和分类,现将研究情况报告如下。

## 材料与方法

### 一、菌株来源

被测链球菌菌株有 7 株,编号分别为 98001、98003、98005、98012、98015、98242、99001,其中 98001、98005、98242、99001 分离自南通海安病、死猪的内脏,98015 分离自海安病人的血液,98012 和 98003 分别分离自与海安相邻的如皋市两病人的血液和脑脊液。99001 为 1999 年分离株,余为 1998 年分离株。另用猪链球菌 II 型标准菌 SS2(来自德国)作对照,被检 7 株链球菌均经 API 20 Strep 生化和标准血清凝集试验,鉴定为猪链球菌血清 II 型。

### 二、菌体脂肪酸分析

取冷冻干燥的菌粉 5 mg,加 5% 氢氧化钠甲醇溶液 5 ml 100℃ 30 min,然后冷却至室温,加 6 mol/L 盐酸酸化至 pH2,加 14% 三氟化硼甲醇溶液 4 ml,用 10 mol 氯仿-己烷(1:4)萃取,提取液加硫酸钠 1 g,用

作者单位 210009 南京,江苏省疾病预防控制中心(朱凤才、杨华富、胡晓抒、汪华);海安县卫生防疫站(王广和);军事医学科学院微生物流行病学研究所(宋亚军、杨瑞馥)

干燥氮气吹干提取液 加正己烷 100 ml,每次取 2 μl 提取液在美国 MIDI 公司 SHERLOCK 全自动细菌鉴定系统中进行菌体膜脂肪酸气相色谱分析。对各菌株的菌体膜脂肪酸的构成指标进行聚类分析和主成分分析。

### 三、随机扩增 DNA 多态性技术方法

1. 引物 :10 条引物分别为 OPB3, OPB8, OPB10, OPB12, OPB13, OPB14, REP1, REP2, ERIC1, ERIC2。其中 OP 类引物购自北京北方同正公司, ERIC 和 REP 类引物由军事医学科学院微生物流行病学研究所分子微生物实验室提供。

2. 模板制备 :用碘化钠裂解玻璃粉吸附法制备 DNA 模板。

3. 扩增条件 :见参考文献<sup>[2]</sup>。引物各 1 μl(50 pmol/L),模板 5 μl(约 50 ~ 100 ng),PCR 缓冲液 3 μl, Taq DNA 聚合酶 2 U, dNTP(2 mmol/L)1 μl,加水至 30 μl,混匀后扩增,共 45 次循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

4. 结果分析 :用 RAPD 读取数据,Phylip 程序进行聚类分析,Treeview 软件生成聚类图。

## 结 果

### 一、菌体脂肪酸分析

6 株被测猪链球菌及标准猪链球菌 II 型与菌体脂肪酸自动分析系统内置库内有关标准菌的脂肪酸成分数据的聚类分析和主成分分析提示 :分离自海安病人血液的 98015 株与分离自海安病死猪的 98005 株为同一克隆株 ;98015 株与同一地区分离自猪的另一株 98242 也非常接近 ;分离自如皋不同病人的血液和脑脊液的 98012 株与 98003 株为同一克隆株 ;1998 年分离自如皋的两病人的菌株与 1999 年分离自海安病死猪的 99001 株的菌体脂肪酸构成也非常近,被测 6 株猪链球菌与猪链球菌 II 型标准菌株一致或非常接近,而与系统库内置的牛链球菌、唾液链球菌、化脓链球菌、血链球菌、无乳链球菌、缓症链球菌和 *S. mutans* 链球菌对照相差甚远。

### 二、RAPD 分析

7 株被检菌株与猪链球菌标准菌株 SS2 菌株经 6 条 OP 类引物的逐个引物扩增,以及 ERIC1 + ERIC2、REP1 + REP2、ERIC1 + REP1 和 ERIC1 + REP2 的混合扩增后,经 RAPD 读取数据,Phylip 软件聚类分析,再由 Treeview 软件生成图 1。由图 1 提示,7 株被检菌株与猪链球菌 II 型标准菌株的遗传距离很

近,变异度小于 0.1% ;分离自海安病、死猪的 98005 株和分离自海安病人的 98015 株为同一克隆株,此 2 株与分离自海安的病死猪的 98024、98001、99001 三株菌的遗传距离也很近 ;分离自如皋病人的血液与脑脊液的 98012 株和 98003 株为同一克隆株。1999 年分离自海安病死猪的 99001 株与 1998 年分离自如皋病人的 2 株菌的距离较近。

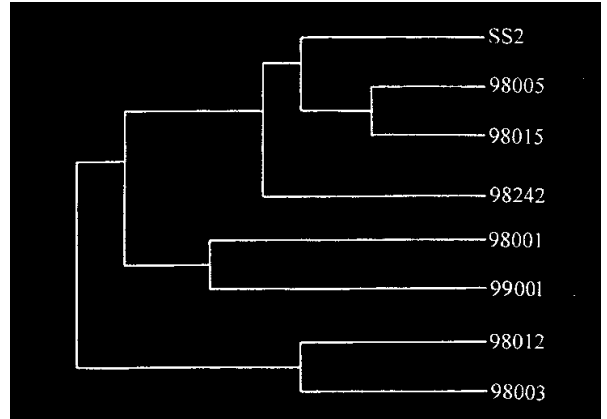


图1 随机扩增 DNA 多态性分析的聚类图

## 讨 论

近十余年,欧美各国相继报道重症链球菌感染病例,国内少有此类报道<sup>[3]</sup>,由猪传染给人的引起人体重症链球菌感染的主要病原是猪链球菌 II 型,国外多数学者把它当作屠夫的职业病<sup>[4,5]</sup>。自 1968 年首次报道了猪链球菌 II 型引起人体严重感染病例后,已有数十个国家报道了此类病例,在 1968 ~ 1989 年间,全球有 108 例猪链球菌 II 型所致人体感染病例<sup>[6]</sup>。但国内迄今尚未见此类人体病例报道,因此,有关猪链球菌 II 型的资料较少。

由于猪链球菌 II 型与其他链球菌(如血链球菌)绝大多数的生化特征一致,使该菌的菌种鉴定相当困难,曾经一度让我们把它定为血链球菌<sup>[7]</sup>。因此,从分子生物学角度,对该菌的表现型和基因型进行菌种的进一步确认很有必要。

我们利用菌体膜脂肪酸构成差异,进行菌体脂肪酸气相色谱分析,以期进行表现型分类。同时,设计 10 条引物进行随机引物 PCR,以期进行基因型分类,在设计引物时,引物数远多于国外同类研究中的 OPB7、OPB10、OPB17 三个引物<sup>[2]</sup>。并且,在采用只有 10 个碱基的具有普遍性的 OP 类引物的同时,还设计了有 22 个和 18 个碱基的具有相对特异性的

ERIC、REP 类引物 ,这两类引物同时进行随机引物 PCR ,使其基因型分类更加细致 ,更有针对性。

从菌体脂肪酸的聚类分析与主成分分析来看 :被检的 6 株链球菌与猪链球菌 II 型标准株一致 ,均为猪链球菌 II 型 ;人源株与猪源株同源 ;分离自病人血液和脑脊液的菌株同源。这些结果在随机引物 PCR 的基因型聚类图中得到了进一步的确认 ,即表现型与基因型结果一致。

本文所采用的表现型与基因型分析方法 ,有助于对菌种进一步鉴定 ,有助于追踪病原体的起源、发展情况 ,为今后科学地防止该菌感染具有重要意义。所采用的方法对开展类似病原的研究具有借鉴价值。

## 参 考 文 献

- 1 胡晓抒,朱凤才,汪华,等.人-猪链球菌感染性综合征研究.中华预防医学杂志,2000,34:150-152.
- 2 Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. J Clin Microbiol, 1999, 37: 362-366.
- 3 姜淑贤,尚德秋.链球菌中毒性休克综合征和超抗原.中国公共卫生,1996,12:92-94.
- 4 Robertson ID, Blackmore DK. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol Infect, 1989, 103:157-164.
- 5 Leelarasamee A, Nilakul C, Tien GS, et al. *Streptococcus suis* toxic-shock syndrome and meningitis. J Med Assoc Thai, 1997, 80:63-68.
- 6 Dupas D, Vignon M, *Streptococcus suis* meningitis: A severe noncompensated occupational disease. J Occup Med, 1992, 34: 1102-1105.
- 7 王广和,王坚,沈艳云,等.人、猪血液链球菌病研究报告.中国人兽共患病杂志,1999,165:143-145.

(收稿日期 2000-07-03)