

江苏省中部地区猪链球菌主要致病血清型分子流行病学调查

鞠爱萍 王长军 郑峰 潘秀珍 董亚青 葛俊超 陆承平 唐家琪

【摘要】 目的 了解江苏省中部地区正常猪群猪链球菌及主要致病血清型分布。方法 采集江苏省中部地区正常屠宰猪样本 303 份,用聚合酶链反应(PCR)法进行猪链球菌及主要致病血清型的检测,并对 3 株分离的猪链球菌菌株进行系统的生物学和分子遗传学鉴定。结果 303 份猪标本中,2005 年正常猪群中猪链球菌的携带率达 88.0%,其中 1(或 14)型、2(或 1/2)型、7 型和 9 型携带率分别为 9.6%、8.5%、11.3%、29.5%;2006 年正常猪群中猪链球菌的携带率为 82.5%,1(或 14)型、2(或 1/2)型、7 型和 9 型携带率分别为 17.6%、2.4%、25.8%、20.0%;3 株分离菌株均为 2 型,2a 毒力因子表现型为 $cps2^+ /gdh^+ /mrp^- /epf^- /sly^- /fbps^+ /orf2^+ /89k^-$, 2f、14e 毒力因子表现型均为 $cps2^+ /gdh^+ /mrp^- /epf^- /sly^- /fbps^- /orf2^- /89k^-$;3 株分离菌株对阿莫西林、氨苄西林、青霉素等高度敏感,但对阿米卡星和四环素有显著的耐药性;对 BALB/c 小鼠和家兔无明显致病性。结论 江苏省中部地区正常猪群中猪链球菌携带率处于较高水平,多种血清型同时存在,毒力因子表现型与流行毒力株有显著差异。

【关键词】 猪链球菌;聚合酶链反应;流行病学,分子

Study on molecular epidemiology of major pathogenic *Streptococcus suis* serotypes in middle part of Jiangsu province JU Ai-ping*, WANG Chang-jun, ZHENG Feng, PAN Xiu-zhen, DONG Ya-qing, GE Jun-chao, LU Cheng-ping, TANG Jia-qi. *Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

Corresponding author: TANG Jia-qi, Email: tjq85@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To determine the prevalence of *Streptococcus suis* and major pathogenic serotypes in middle part of Jiangsu province. **Methods** Tonsillar specimens from 303 slaughtered pigs aged 6 to 8 months were investigated for the presence of *Streptococcus suis* and major pathogenic serotypes by polymerase chain reaction (PCR) method. Bacteriological examination compared with molecular genetics identification for three *Streptococcus suis* isolates were also done. **Results** The overall carrier rate of *Streptococcus suis* was up to 88.0%, with the percentages of serotype 1(14), 2(1/2), 7 and 9 were 9.6%, 8.5%, 11.3% and 29.5% respectively in 2005. While in 2006, the prevalence of *Streptococcus suis* was 82.5%, with capsular types 1(14), 2(1/2), 7 and 9 were accounted for 17.6%, 2.4%, 25.8% and 20.0% of all the specimens. All the three isolates belonged to *Streptococcus suis* serotype 2, named 2a, 2f and 14e, which exhibiting the virulent phenotype $cps2^+ /gdh^+ /mrp^- /epf^- /sly^- /fbps^+ /orf2^+ /89k^-$, $cps2^+ /gdh^+ /mrp^- /epf^- /sly^- /fbps^- /orf2^- /89k^-$ and $cps2^+ /gdh^+ /mrp^- /epf^- /sly^- /fbps^- /orf2^- /89k^-$ respectively. These isolates were all susceptible to amoxicillin, ampicillin, penicillin and resistant to amikacin and tetracycline. Clinical signs were not noted in BALB/c mice and rabbit. **Conclusion** Prevalence of the *Streptococcus suis* among the healthy herds in the areas was very high, with various capsule types of *Streptococcus suis* involved in the same herds, and the virulent phenotype of these 3 isolates were very different from those prevalent *Streptococcus suis* serotype 2 virulent isolates frequently discovered from the epidemic areas.

【Key words】 *Streptococcus suis*; Polymerase chain reaction; Epidemiological, molecular

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划课题资助项目(2006AA02Z455);国家自然科学基金资助项目(30600533、30670105、30671848);江苏省自然科学基金资助项目(BK2006014、BK2007013)

作者单位:210002 南京军区军事医学研究所(鞠爱萍、王长军、郑峰、潘秀珍、葛俊超、唐家琪);南京农业大学动物医学院(董亚青、陆承平)

通讯作者:唐家琪, Email: tjq85@hotmail.com

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是重要的人兽共患病病原体, 可引起仔猪的脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症、肺炎以及断奶仔猪的猝死, 并可感染人^[1]。根据菌体荚膜多糖抗原性的不同, 用协同凝集试验等将 SS 分为 35 个血清型^[2], 其中 1、2、1/2、7、9 和 14 型证明与致病性相关, 不同血清型的分布地区和范围均有不同^[3-5]。目前国内研究多数聚焦于 SS2 型, 而对其他血清型的研究较少。本研究从江苏省中部地区 (苏中地区) 屠宰点采集正常猪群样本, 了解 SS 血清型、毒力表型等分布情况。

材料与方法

1. 菌株: SS 血清型标准参考株 35 株, 由加拿大 Marcelo Gottschalk 教授惠赠。05ZYH33 为 2005 年分离自四川省资阳市, 血清型鉴定为 2 型, 由本实验室保存。2a、2f、14e 型为本次流行病学调查分离的血清型 2 型菌株。

2. 试剂、仪器和实验动物: 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, 聚合酶链反应 (PCR) 扩增试剂盒为 (大连) 宝生物工程有限公司的产品, 引物由赛百盛公司合成; 药敏纸片由杭州天和微生物试剂有限公司提供。BALB/c 小鼠、新西兰大白兔购自上海中科院实验动物中心。

3. 样本采集和 PCR 检测分析:

(1) 健康猪的样本采集: 于 2005 - 2006 年对来源明确的健康生猪, 屠宰后消毒棉签深入猪鼻腔和咽喉部刮取表面黏膜样本, 投入装有 1 ml THB 培养基的 EP 管中, 低温保存, 在 4 - 6 h 内送往实验室进行检测。

(2) 模板制备: 分别取每份样本 100 μl, 接种于 2 ml THB 培养基, 37℃ 增菌培养 3 h。取 1.5 ml 菌液离心后弃上清, 用 200 μl ddH₂O 重悬沉淀, 加 100 mg/ml 蛋白酶 K 3 μl, 42℃ 水浴 1 h 后煮沸 10 min, 离心取上清做 PCR 的模板。

(3) PCR 法检测 SS: SS 种和主要血清型特异性引物设计参考文献 [6-9], PCR 反应以参考株作为对照, 反应体系 25 μl: 10× PCR 缓冲液 2.5 μl, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 (2 U) 0.5 μl, 模板 2 μl, ddH₂O 调整终体积至 25 μl, 引物序列、退火温度及扩增片段大小见表 1。

(4) 菌株的分离纯化: 挑取经 PCR 检测为 SS2 阳性的样本, 划线接种于含 5% 羊血 THB 琼脂平

板, 37℃ 培养过夜。挑取形态可疑、呈针尖状的菌落接种 THB 液体培养基, 提取模板进行 PCR 鉴定、序列比对, 鉴定为阳性则保藏菌种。

(5) PCR 法检测毒力基因: 毒力基因 *orf2* 的引物序列参考文献 [10], *gdh*、*mrp*、*epf*、*sly* 引物参考文献 [11], *89k* 引物参考文献 [12], *fbp* 引物根据 GenBank 公布的序列用 Primer premier 5 软件自行设计。引物序列、退火温度及扩增片段大小见表 1, PCR 反应体系同前。

表1 PCR 反应引物及目的片段大小

基因型	引物序列 (5'~3')	退火温度 (℃)	目的片段大小 (bp)
<i>cps1</i> (<i>cps14</i>)	Pup ttttagtagacgagggcggggt	52	461
	Pdn ttggcaagaactcattatcc		
<i>cps2</i> (<i>cps1/2</i>)	Pup tgatagtgattgtcgggaggg	55	557
	Pdn gagtatctaaagaatgcctattg		
<i>cps9</i>	Pup cgaaatcaaaagtgtatcagc	52	346
	Pdn ttctatccgaagtatctggg		
<i>cps7</i>	Pup agctctaacacgaataaggg	56	252
	Pdn gtcaaacaccctggatagccg		
16s	Pup taacagtatttaddgcatg	58	1326
	Pdn tacctgttaccgacttea		
<i>gdh</i>	Pup tcaagtcaaccgtggcta	50	657
	Pdn tattctgtcaaacgagcg		
<i>mrp</i>	Pup tgctgaaatacagagtc	49	970
	Pdn tgccadcataatcataccc		
<i>epf</i>	Pup aaaacggatgaagcggt	51	744
	Pdn aaaacggatgaagcggt		
<i>sly</i>	Pup ggtgcttadtgttcgaaa	48	622
	Pdn gcccafttatgtctatctct		
<i>fbp</i>	Pup atcgattcattaaataggttctctcgc	62	1722
	Pdn ggtaccatigtgttatttggacaccagaa		
<i>orf2</i>	Pup caagtgatgtggatggg	56	858
	Pdn atccagttgacacgtgca		
89k	Pup tcgccactatggatctgctta	58	720
	Pdn gattgtggaccatgctgttttag		

注: 其中 *cps1* (*cps14*)、*cps2* (*cps1/2*)、*cps9*、*cps7* 为血清型特异性引物, 16s 为菌种特异性引物, *gdh*、*mrp*、*epf*、*sly*、*fbp*、*orf2*、*89k* 为毒力基因引物

(6) 药敏实验: 用无菌棉签蘸取分离菌的肉汤培养物, 涂布于琼脂平板。稍干后, 无菌镊子夹取各种药敏纸片分别平贴在培养基表面, 37℃ 培养 20 - 24 h, 观察、测定抑菌环的大小。判定标准: 抑菌环直径在 15 mm 以上为高度敏感 (青霉素高敏为 20 mm 以上), 10 ~ 15 mm 为中度敏感, 10 mm 以下为低度敏感, 无抑菌环为不敏感。

(7) 动物试验: 取分离菌株 2a、2f、14e 及四川分离株 05ZYH33 的 18 h 血清肉汤培养物, 分别腹腔注射 BALB/c 小鼠 5 只 (体重 20 g 左右, 注射剂量 1 × 10⁸ CFU/只), 静脉注射家兔 2 只 (体重 2000 g,

注射剂量 1×10^8 CFU/只),对注射后的动物隔离饲养,观察其发病及死亡情况。以上试验均设血清肉汤培养物空白对照。

结 果

1. 2005 - 2006 年江苏省泰州地区 SS2 型 1(14)型、2(1/2)型、7 型和 9 型的流行分布情况:健康猪 SS 的检测结果显示,2005 年 200 头健康猪的 SS 检出率为 88.0% (176/200),1(14)型、2(1/2)型、7 型、9 型的检出率分别为 9.6% (17/176)、8.5% (15/176)、11.3% (20/176)、29.5% (52/176);2006 年 103 头健康猪的 SS 检出率为 82.5% (85/103),1(14)型、2(1/2)型、7 型、9 型的检出率分别为 17.6% (15/85)、2.4% (2/85)、25.8% (22/85)、20.0% (17/85)。

2. 细菌的分离纯化:通过平板菌落分离和 PCR 鉴定,获得 3 株 SS2 阳性分离物。分离菌株在 5% 羊血琼脂平板经 37℃ 培养,菌落直径为 1~2 mm,呈圆形、半透明、表面光滑、微隆起、灰白色,α 溶血。镜检为革兰阳性,THB 培养物以长链状排列为主,鲜血琼脂平板以成对排列为主,PCR 产物序列分析表明, *cps2J* 基因与国外分离株 SS2 10 (No. AF118389) *cps2J* 基因序列的相似性均为 99%。

3. 分离株主要毒力相关基因检测:3 株 SS2 型分离株经 PCR 检测主要毒力相关基因,其中 *gdh* 均为阳性, *mrp*、*epf*、*sly* 均为阴性。菌株 2a 的 *fbp* 和 *orf2* 为阳性,而菌株 2f 和 14e 缺乏这 2 种毒力基因,89k 在这 3 株菌株中都缺乏,分离株 2a、2f、14e *gdh* 经 Blast 序列比对与国外参考株 *S. suis* AAH6 (No. EF198475) 相似性均为 99%, *fbp* 经 Blast 序列比对与 *S. suis* 89/1591 (No. AAH6AAFA02000010) 同源性为 100%, *orf2* 与 *S. suis* SH031238 (No. EF073056.1) 相似性为 93% (表 2)。

表2 分离株主要毒力因子表型

菌株	<i>gdh</i>	<i>mrp</i>	<i>epf</i>	<i>sly</i>	<i>fbp</i>	<i>orf2</i>	89k
2a	+	-	-	-	+	+	-
2f	+	-	-	-	-	-	-
14e	+	-	-	-	-	-	-
05ZYH33	+	+	+	+	+	+	+

4. 药敏实验:药敏试验结果显示,4 个(含参考株 05ZYH33)菌株对阿莫西林 (AMx)、氨苄西林 (AM)、青霉素 G (P)、万古霉素 (VA)、磺胺类药 (SXT) 及红霉素 (E) 高度敏感,抑菌直径均大于

20 mm;对环丙沙星 (CIP)、庆大霉素 (GM) 和克林霉素 (CM) 中度敏感,抑菌直径约 10~15 mm;而对阿米卡星 (AN) 和四环素 (TE) 产生了显著的耐药性,结果见表 3。

5. 动物试验:注射四川分离株 05ZYH33 的实验小鼠 5 只在 24 h 内全部死亡,2 只家兔分别于 48 h、72 h 死亡,剖检死亡小鼠、家兔,呈败血症症状,心、肝、脾等实质性脏器内均分离到接种菌,而分离菌株及对照组动物连续观察 2 周末见异常变化。

表3 4 株分离株药敏试验结果

药名	05ZYH33	2a	2f	14e
AMx	32	30	32	30
AM	32	30	31	30
CIP	15	14	16	16
P	30	30	30	28
TE	4	0	0	4
AN	8	8	6	8
VA	22	20	20	20
SXT	25	22	20	20
GM	15	14	12	15
S	12	10	10	10
E	35	30	28	26
CM	16	14	12	14

注:表内数据为抑菌直径(mm); S 为链霉素

讨 论

国外研究显示,SS 在猪场的携带率从 20.0%~90.0% 不等,2001 年韩国 SS2 在健康猪群中的携带率为 3.6%; 国外其他报道 SS2 携带率在 2.0%~7.0%^[13]。国内正常猪群中 SS2 的带菌率亦较高,非疫区平均为 42.0%,疫区平均为 39.0%^[14]。本研究发现,我国苏中地区正常猪群 SS 总带菌率高达 80.0% 以上,SS2 的带菌率分别为 8.5% (2005 年)、2.4% (2006 年)。上述数据表明,我国正常猪群中 SS 总体携带率处于较高水平。此外,由于 SS 主要定植于猪扁桃腺,本研究检测样本主要为鼻咽部拭子,结果可能略低于实际携带率。

尽管健康猪群的 SS 携带率与猪群是否暴发或流行 SS 病并没有直接的关系,但随着气候环境等因素的改变,一些致病血清型 SS 可能成为微小生态中的主要菌群成员,并导致暴发疫情,因此检测猪群的 SS 主要致病血清型带菌率对预防与控制有指导意义。由于 SS 血清型标准血清价格昂贵,操作繁琐,用于现场样本血清型的分布调查可行性差。目前,国内对 SS 的分子流行病学调查仅限于 2 型,其他血清型鲜见报道。本研究通过已建立的主要致

病血清型 PCR 检测方法,发现苏中地区正常猪群中血清 1(或 14)型、7 型、9 型的携带率明显高于 2 型,2006 年分别达 17.6%、25.8% 和 20.0%,这种多种血清型并存的现象对于流行区猪链球菌的进化和致病特征的影响值得关注。

由于链球菌在环境中普遍存在,抗菌药物普遍应用,菌株的抗药性特别引人关注,本次调查中分离的 SS2 对 AM_x、AM、P、VA、SXT 及 E 高度敏感,对 AN 和 TE 产生了耐药性,细菌的耐药性与质粒关系密切,Cantin 等^[15] 研究发现大约 60.0% 的 SS 分离株携带大小为 1.5~35 kb 的质粒,我国分离株中是否存在质粒以及质粒与抗性基因之间的关系仍需继续深入研究。

已知的与 SS 致病性相关的毒力因子主要有荚膜多糖(CPS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、溶血素(SLY)和纤连蛋白结合蛋白(FBPS)以及毒力相关序列 *orf2* 等。本研究室对 2005 年四川省流行的强致病株 05ZYH33 进行了全基因组测序,现测序已全部完成并对基因组进行了初步注释(GenBank 测序号为 NC 009442),与 Sanger 研究中心公布的标准株 P1/7 全基因组序列进行比较后发现有一个约 89 kb 的核酸片段为 98HAH12 和 05ZYH33 染色体所特有,生物信息学分析该段序列具有毒力岛(PAI)的特征^[12]。SS 的致病性主要与毒力因子有关,而毒力因子在不同毒力菌株中的分布有较大差异,临床分离菌株经常存在一种乃至全部毒力基因缺失的现象,而典型的强毒株如本研究室保存的 05ZYH33 和 HAbb 等都带有上述 7 种主要毒力基因。本次流行病学调查中分离的 SS2 菌株缺失 5~6 种毒力因子,并且对 BALB/c 小鼠和家兔均不致病,而四川省分离株 05ZYH33 对小鼠及家兔均有致病性,可以推断本研究分离的 3 株 SS2 为无毒株。综上所述,该地区正常猪群中 SS 的携带率处于较高水平,无毒 SS2 普遍存在,多种致病血清型同时存在,毒力因子表型与流行毒力株有显著差异。

参 考 文 献

- [1] Staat JS, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present. Vet Res Commun, 1997, 21: 381.
- [2] Tarradas C, Luque I, De Andrés D, et al. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. J Vet

Med B, 2001, 48(5): 347-355.

- [3] Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. Vet Microbiol, 2000, 74: 237-248.
- [4] Allgaier A, Goethe R, Wisselink HJ, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 445-453.
- [5] Berthelot-Herauld F, Morvan H, Keribin AM, et al. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suliyisin 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.
- [6] 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.
- [7] Smith HE, Veenbergen V, Velde JVD, et al. The *cps* genes of *Streptococcus suis* serotype 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3146-3152.
- [8] Smith HE, van Bruijnsvoort L, Buijs H, et al. Rapid PCR test for *Streptococcus suis* serotype 7. FEMS Microbiology Letter, 1999, 178: 265-270.
- [9] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. PLoS Med, 2006, 3(5): e151.
- [10] 李干武, 姚火春, 陆承平. 在猪链球菌 2 型江苏分离株中发现新的 *orf2* 毒力相关基因. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 295-298.
- [11] 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.
- [12] Chen C, Tang J, Dong W. A glimpse of *Streptococcal toxic shock syndrome* from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. PLoS ONE, 2007, 2(3): e315.
- [13] Han DU, Choi CS, Ham HJ, et al. Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea. Canadian J Vet Res, 2001, 65: 151-155.
- [14] 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.
- [15] Cantin M, Harel J, Higgins R, et al. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates. J Vet Diagn Invest, 1992, 4(2): 170-174.

(收稿日期: 2007-08-30)

(本文编辑: 尹廉)