

· 实验室研究 ·

浙江省散发猪链球菌病临床分离株
存在 89K 候选致病岛

朱水荣 王志刚 陈恩富 杨婷婷 张政 徐宝祥 金大智 何剑琴 王复彪

【摘要】 目的 对浙江省临床分离猪链球菌血清 2 型(SS2)菌株进行 89K 候选致病岛检测。
方法 用多种特异性引物进行 PCR 扩增检测,同时对 89K 的 3 个扩增片段进行测序,并结合有关资料进行生物信息学和流行病学分析。**结果** 8 株 SS2 菌株,均检出 89K(1&2)、89K(3&4)、89K(5&6)候选致病岛特异片段和种特异性 16S rDNA、*cps2J*、*mrp* 毒力基因,和 1998 年江苏省暴发疫情的菌株结果一致。ZJ0501 号 SS2 分离株 89K 候选致病岛的 3 个 PCR 扩增片段序列和 1998 年江苏省暴发疫情的菌株有 99% 以上的相似性,其中编码 DNA 重组蛋白的序列片段和病乳链球菌及无乳链球菌有较高的同源性。**结论** 近年来在浙江省临床分离 SS2 菌株中,存在 89K 候选致病岛片段。

【关键词】 猪链球菌血清 2 型;聚合酶链反应;89K 片段

The emergence of candidate pathogenicity island 89K DNA sequence of *Streptococcus suis* isolated from sporadic patients in Zhejiang province ZHU Shui-rong*, WANG Zhi-gang, CHEN En-fu, YANG Ting-ting, ZHANG Zheng, XU Bao-xiang, JIN Da-zhi, HE Jian-qin, WANG Fu-su. *The Institute of Microbiology, Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 Objective To identify the presence of candidate pathogenicity island 89K DNA sequence of *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) strains isolated from patient in Zhejiang province. **Methods** Genes and DNA fragments were amplified by PCR, using specific primers, and three amplified fragments of the 89K sequence were directly sequenced. The results were analyzed using software related to bioinformatics and epidemiology. **Results** 8 strains of SS2 all contained 89K sequence, *cps2J* and *mrp* virulent genes, and species-specific 16S rDNA. 3 amplified fragments of 89K candidate pathogenicity island of SS2 ZJ0501 were above 99% similar to SS2 strain identified from outbreaks in Jiangsu in 1998, and the gene fragment of coding DNA recombinant protein in the 89K sequence was highly homological with that of *S. dysgalactiae* and *S. agalactiae*. **Conclusion** In recent years SS2 strains isolated from patients with clinical symptoms in Zhejiang province had been detected to have contained candidate pathogenicity 89K DNA fragment.

【Key words】 *Streptococcus suis* serotype 2; Polymerase chain reaction; 89K DNA fragment

猪链球菌血清 2 型(SS2)是一种人畜共患病病原菌。1998-2005 年江苏、四川省 3 次暴发急性猪链球菌病疫情均由 SS2 引起^[1-3]。目前已知 SS2 可能致病因子有荚膜多糖、溶菌酶释放蛋白、细胞外因子、溶血素等 7 大类多达 24 种,但这些致病因子的检测尚不能明显区分引起 3 次暴发疫情的 SS2 和普通 SS2 菌株^[4]。采用传统的生化和血清学等分型方法,或是用现代的分型技术(脉冲场凝胶电泳和多位点序列分析)、核酸基因检测等方法也难以区分引起这三次流行的 SS2 和普通 SS2 菌株^[5-8]。对何

种致病因子引起该病及其致病机制尚未查明^[2-5],已发现猪链球菌有 35 个血清型^[9,10],菌株基因组的异源性和系统起源的多样性已有许多描述^[11,12],除了常见的重组元件如长重复序列和换位子之外,同一碱基 2~10 个延伸的不规则重组也常发生^[10]。最近,Chen 等^[4]报道,对来自链球菌中毒性休克综合征(strptococcal toxic shock syndrome, STSS)临床病例的 1998 年 SS2 江苏分离株(98HAH12)和 2005 年四川分离株(05ZYH33)做了全基因组序列测定,并与已测序的欧洲病例分离株(P1/7)比较,发现这两个中国强毒株比欧洲株多出一段 89K 序列片段,该片段为外插入重组片段,并指出可能是江苏、四川省 3 次流行的 SS2 一种重要致病因子,可能是引起我国 STSS 的关键致病岛。为此我们依据 89K 序列

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心微生物所(朱水荣、王志刚、杨婷婷、张政、徐宝祥、金大智、王复彪),传染病防治所(陈恩富);浙江大学附属第一医院卫生部传染病重点实验室(何剑琴)

合成引物,对近年来浙江省散发 SS2 感染病例临床分离株进行 89K 片段的 PCR 检测,发现许多 SS2 菌株中存在 89K 片段。

材料与方 法

1. 菌株来源及相关资料:均来自浙江省近年来散发猪链球菌脑膜炎和 STSS 病例。本文中的 8 株 SS2 菌株(ZJ0501~ZJ0708)均从临床病例分离,经由各地(市)疾病预防控制中心(CDC)按规定送至浙江省 CDC。疑似 SS2 感染病例分别来自 6 个县区,病例无集中,非共同暴露,无二代病例及人-人之间的传播。1 例出现 STSS 症状。8 株菌经生化鉴定、血清学玻片凝集试验鉴定确认为 SS2 菌株,实验对照株分别由南京市 CDC(SS98002)、浙江省菌种室(ZJ07-1)和浙江大学[S(II)6030]提供,作为有或无 89K 等片段的实验对照。

2. 主要试剂与仪器:TaKaRa 公司的 DNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂;德国 Eppendorf 公司的 Mastercycler 梯度 PCR;美国 Thermo 公司的二氧化碳培养箱;法国梅里埃公司的 API-Strep 20 生化试剂条;丹麦 SSI 公司的 SS2 诊断血清。引物按照文献[4]及中国 CDC 提供的引物序列交由 TaKaRa 公司合成,引物序列及扩增片段长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增片段长度

扩增片段	引物碱基序列(5'~3')	扩增片段大小
89K(1&2)	P1 CAC GCA TCT CGT AGA GTT TGA C	2.0 kb
	P2 AGA TTG CGA GGC TTT TAG ATT G	
89K(3&4)	P3 TCG CCA CTA TGG TAT CTG CTT A	0.7 kb
	P4 GAT TGT GGA CCA TGC TGT TTA G	
89K(5&6)	P5 ATA AAT AGC CCC ATC CTC ATC A	1.0 kb
	P6 GCG TAG CTG CTT AGT GCT ACA A	
89K(1&6) ^a	P1 CAC GCA TCT CGT AGA GTT TGA C	1.5 kb
	P6 GCG TAG CTG CTT AGT GCT ACA A	
16S rRNA	P7 CAG TAT TTA CCG CAT GGT AGA TAT	294 bp
	P8 GTA AGA TAC CGT CAA GTG AGA A	
<i>cps2J</i>	P9 GTT GAG TCC TTA TAC ACC TGT T	459 bp
	P10 CAG AAA ATT CAT ATT GTC CAC C	
<i>mrp</i>	P11 GGT ATA CCT TGC TGG TAC CGT TC	532 bp
	P12 AGT CTC TAC AGC TGT AGC TGG	

注:^a 为 89K 嵌入片段插入点插入前的核酸序列

3. DNA 模板制备、PCR 扩增和电泳:采用热裂解法制备 DNA 模板。PCR 扩增总反应体系为 25 μ l,包括 Taq 酶(5 U/ μ l) 0.125 μ l, 10 \times PCR buffer(Mg²⁺ free) 2.5 μ l, Mg²⁺ 1.5 μ l, dNTPs 2 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l,模板 4 μ l,用 ddH₂O 补足至 25 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C

30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 35 个循环,以超纯水为阴性对照。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 mg/ml)电泳,同时用 Marker(50 bp、100 bp Marker 及 DNA Marker DL2000)电泳以作对照。电泳产物用 FR-200A 型全自动紫外与可见分析装置获取图像。

4. 测序和相似性分析:PCR 扩增小片段产物交由华大基因研发中心测序,PCR 扩增大片段产物交由上海英骏生物技术有限公司克隆并测序,所得序列经 DNASTar 软件和 DNAMAN 软件比对、分析、整理,并经 GenBank 的 BLAST 软件分析相似性。测序结果和注释内容登录注册 GenBank 数据库,序列号为:EU357804, U449499, EU589333。

结 果

1. PCR 扩增:

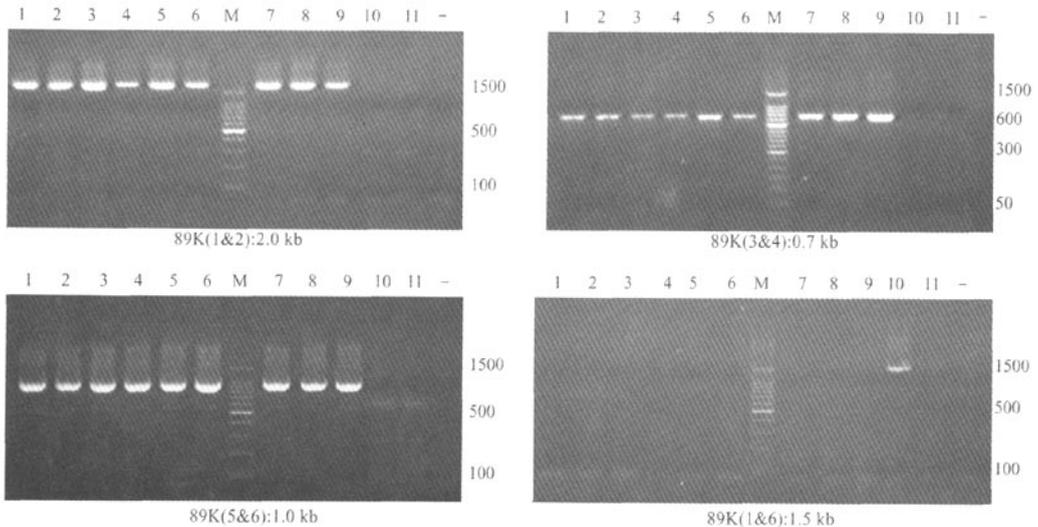
(1)89K 候选致病岛片段检测:8 株菌株经 PCR 检测,均检出 89K(1&2)、89K(3&4)、89K(5&6)候选致病岛 3 个特异条带,未检出 P1&P6 引物扩增条带[89K(1&6)],该结果与江苏对照株 SS98002 检测结果一致;浙江对照株 ZJ07-1 未检出 89K 候选致病岛特异条带但检出 P1&P6 引物扩增条带,而对照株丹麦 S(II)6030 未检出 89K 候选致病岛特异条带,也未检出 P1&P6 引物扩增条带(表 2 及图 1)。

(2)其他特异性基因检测:所有菌株(包括对照株)种特异性 16S rRNA 基因及特异性荚膜多糖基因(*cps2J*)检测均为阳性;对照株 2 和 3 未检测出溶菌酶释放相关蛋白编码基因(*mrp*),其他菌株均检出该基因(表 2)。

2. 3 个特异片段测序比对:选取 ZJ0501 菌株 89K 候选致病岛 3 个特异片段的 PCR 产物进行直接或克隆测序,获得的序列经 BLAST 比对,结果显示与 98HAH12 和 05ZYH33 株序列的相似性都在 99% 以上^[4]。1&2 片段 2017 bp 3 株完全一致。3&4 片段 672 bp 和 98HAH12 株的相同,但和 05ZYH33 株比,有 2 个 Indel 突变点引起溶细胞素 B 转移蛋白(cytolysin B transport protein)一个 26aa 片段的改变(表 3)。5&6 片段 932 bp 和 98HAH12 及 05ZYH33 株比,有 5 个突变点,都是 G/A 转换(表 3),其中 2 个位点是异义突变,分别引起核糖体 L7/L12 蛋白(ribosomal protein L7/L12)16 位的 A(非极性丙氨酸)/T(极性苏氨酸)变异和 70 位的 V(缬氨酸)/I(异亮氨酸)变异。

表2 8 株疑似 SS2 菌株及 3 株 SS2 对照株相应基因 PCR 扩增情况

菌株编号	来源地区	临床诊断	89K(1&2)	89K(3&4)	89K(5&6)	P1&P6 片段	mrp	16S rDNA	cps2J
ZJ0501	温岭	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0502	温岭	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0503	温岭	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0504	黄岩	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0505	路桥	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0606	东阳	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0707	新昌	脑膜炎	+	+	+	-	+	+	+
ZJ0708	诸暨	STSS	+	+	+	-	+	+	+
SS98002	江苏	-	+	+	+	-	+	+	+
ZJ07-1	浙江	-	-	-	-	+	-	+	+
S(II)6030	丹麦	-	-	-	-	-	-	+	+



注:1~8:ZJ0501~ZJ0708; 9~11:分别为江苏株 SS98002、浙江株 ZJ07-1 和丹麦株 S(II)6030; -:阴性对照; M:分别为 50 bp、100 bp、DNA DL2000 Marker

图1 89K 基因的 PCR 扩增电泳图谱

表3 89K 候选致病岛部分序列的 SNP 变化特点

变异位点 ^a 变异类型	DNA 片段						
	3&4		5&6				
	19+	53	80	242	349	451	804
	In-Del	In-Del	A/T	V/I	Silent ^b	Silent ^b	Silent ^b
ZJ0501	-	a	g	g	g	a	g
98HAH12	-	a	a	a	a	g	a
05ZYH33	t	-	a	a	a	g	a

注:^a 变异位点参考 EU357804,EU449499;^b 非编码区突变

3. DNA 整合/重组/倒位蛋白基因区域的系统发生分析:对 89K 的 1&2 片段内的编码 DNA 整合/重组/倒位蛋白 (DNA integration/recombination/inversion protein) 的 850 bp 区域进行 Blast 筛选和系统发生分析,发现猪链球菌 ZJ0501 株 (及 98HAH12、05ZYH33 株) 和病乳链球菌 (*S. dysgalactiae*) 及无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 2603 株相似性为 95.6%~95.7%,与化脓链球菌 (*S. pyogenes*) M1 株等相似性为 79.8%~80.6%,和无乳链球菌 NEM316 株相似性为 78.6% (图 2)。猪链球菌 ZJ0501 株和病乳链球菌及无乳链球菌

2603 株在该区域有较高的同源性。

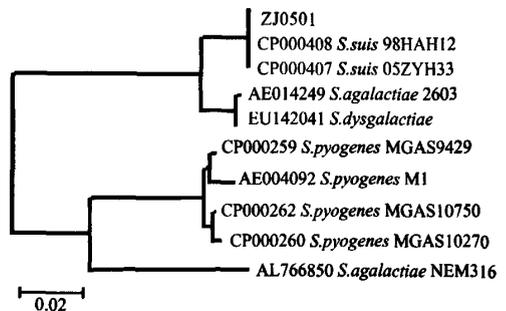


图2 89K 中编码 DNA 整合/重组/倒位蛋白 850 bp 核酸区域的 NJ 系统发生树分析

讨论

自 1968 年丹麦学者首次报道人感染猪链球菌导致脑膜炎病例,到 2007 年止在全世界范围内已导致超过 409 例人感染 SS2 的病例发生^[1]。SS2 菌株可分为强毒力株、弱毒力株和无毒力株,但从分离株

表型或基因型分析,难以明确判定菌株毒力类型。不同国家、地区研究人员应用传统或分子生物学手段对 SS2 的致病因子进行大量研究,但对何种致病因子引起该病及其致病机制尚未查明^[5-8]。Chen 等^[4]对来自中国 30 株和来自欧美(荷兰、加拿大、德国)10 株 SS2 分别进行 89K 序列片段的检测,发现 89K 候选致病岛仅存在于 1998 - 1999 年江苏省 SS2 暴发疫情分离株及 2005 年四川省 SS2 暴发疫情分离株中(均为高毒力株),而在那些来自中国的低毒力株、无毒株以及来自欧洲的高毒力株、无毒株中均未检测到。指出含 89K 片段目前仅在中国 SS2 暴发疫情分离株中检测到,认为含有该片段的 SS2 菌株可能是导致 3 次在中国发生大规模 STSS 暴发疫情的强毒力株,该片段为 SS2 菌株的候选致病岛,可作为判定菌株毒力强弱的指标。但 Xiong 等^[13]依据没有 89K 候选致病岛的欧洲 P1/7 株的全基因组序列,设计许多引物 PCR 扩增 406 个 2.2~10.6K 的核酸片段覆盖全基因组序列,对来自 1998 年江苏省和 2005 年四川省 STSS 暴发疫情的 4 个分离株进行 WGPS scanning 分析,结果所有 4 株菌都产生基于欧洲 P1/7 株的全基因组序列期望大小的片段,认为中国 3 次发生大规模 STSS 暴发疫情的强毒力株不存在 89K 候选致病岛。但是,我们分析发现, Xiong 等^[13]使用的引物尚不能覆盖欧洲 P1/7 株的全基因组 8 个空档片段(共约 8856nt),并且有 33 个引物既用于 forward 也用于 reverse 引物。特别是在 89K 插入区域,有两对相邻引物的中间引物既是正向引物又是反向引物,不能产生部分相互重叠的片段;如果这一中间引物可能出现非特异性扩增,则可能导致无法发现 89K 片段。

本研究根据 Chen 等^[4]中报道的序列合成引物,进行 89K 片段检测,结果发现被检 8 株菌株中均检出 89K 片段,可见在江苏、四川省引起大规模 STSS 暴发疫情的这类菌株,目前已流行于浙江省一些市县,流行形式主要为散发,临床症状主要表现为脑膜脑炎及重症 STSS。本研究认为这类菌株的存在或扩散(或再次出现),可能是造成近年来浙江省散在 SS2 病例发生的根本原因。

89K 候选致病岛 3 个 PCR 扩增片段的测序结果显示,浙江省 1 个分离株的 3&4 片段 2 个 Indel 突变,引起溶细胞素 B 转移蛋白一个 26aa 片段的改变,可区分四川分离株,但和江苏株相同;5&6 片段的 5 个突变特征,属于首次发现,其中核糖体 L7/

L12 蛋白 16 位的 A/T 变异,在其他链球菌的一些种类是 S(极性丝氨酸)变异。这些突变引起的多肽片段的改变、氨基酸残基的变化等变异与菌株的生物学特性、可能导致的临床症状及流行病学特征的关系有待进一步的研究。89K 内的 DNA 重组蛋白基因的亲缘分析显示,与病链球菌及无乳链球菌有较高的同源性,为进一步研究起源关系提供了依据。

这类含 89K 候选致病岛菌株为何未在浙江省引起暴发,在我国其他地区是否也存在,是原有菌株在生物进化过程中发生了基因突变,还是大片段重组? 都有待于进一步的深入研究。鉴于含有 89K 片段致病株已在江苏、四川省引发 3 次 SS2 暴发疫情,导致许多病例死亡,后又在浙江省散发流行且菌株出现一些基因突变迹象。可见这些菌株可能会发生毒力水平的变化,可能会造成很大的人群危害和社会经济影响,对我国公共卫生构成新的威胁,必须引起各方面高度重视。

(注:在本文作者修改此文期间, Li 等^[14]通过动物实验证实了我国江苏、四川省 SS2 暴发疫情高致病株特有的 89K 致病岛中的 *SalK/SalR* 基因是中国高致病 SS2 株表达完整毒力所必备的)

参 考 文 献

- [1] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(3): 201-209.
- [2] 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.
- [3] 尤玉民, 沈健. 人-猪链球菌感染性综合症的流行病学研究. *中国初级卫生保健*, 2001, 15(7): 20-21.
- [4] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE*, 2007, 2(3): e15.
- [5] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, 3(5): e151.
- [6] Yu HJ, Jing HQ, Chen ZH, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 914-920.
- [7] Ye CY, Zhu XP, Jing HQ, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(8): 1203-1208.
- [8] Sriskandan S, Slater JD. Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the East. *PLoS Med*, 2006, 3(5): e187.
- [9] Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, et al. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *Vet Diagn Investig*, 1995, 7: 405-406.
- [10] Sekizaki T, Takamatsu D, Osaki M, et al. Different foreign genes incidentally integrated into the same locus of the *Streptococcus suis* genome. *Bacteriol*, 2005, 187(3): 72-83.
- [11] Chatellier S, Harel J, Zhang Y, et al. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Bacteriol*, 1998, 48: 581-589.
- [12] Okwumabua O, Staats J, Chengappa MM. Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). *J Clin Microbiol*, 1995, 33(4): 968-972.
- [13] Xiong Z, Wei C, Yang J, et al. Comparative analysis of whole genome structure of *Streptococcus suis* using whole genome PCR scanning. *Sci China Ser C-Life*, 2008, 51(1): 21-26.
- [14] Li M, Wang C, Feng Y, et al. *SalK/SalR*, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS ONE*, 2008, 3(5): e2080.

(收稿日期: 2008-04-07)

(本文编辑: 张林东)