

## · 实验室研究 ·

## 猪链球菌分泌蛋白的免疫蛋白质组学研究

孙强正 罗霞 叶长芸 肖迪 郑翰 景怀琦 徐建国

**【摘要】 目的** 寻找猪链球菌(*S. suis*)SC84 菌株分泌蛋白中具有抗原活性的蛋白,为 *S. suis* 特异诊断抗原和新的疫苗候选抗原的筛选提供线索。**方法** 采用免疫蛋白质组学和介质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术,分析和鉴定 *S. suis*SC84 菌株分泌蛋白中能与感染病例恢复期血清发生免疫杂交的蛋白点。**结果** 在 *S. suis*SC84 菌株分泌蛋白的免疫杂交膜上,共发现 14 个具有抗原活性的蛋白点,其中 11 个点可以在考马斯蓝染色胶上找到匹配点。11 个蛋白点经质谱鉴定,分属于 8 种蛋白,全部定位于胞壁或胞外。其中溶菌酶释放蛋白、溶血素、细胞外因子为 *S. suis* 已知的抗原蛋白;5'-核苷酸酶、ribonucleases G 和 E、金属内肽酶等为新发现的具有抗原活性的蛋白;所有的蛋白均能在测序菌株 *S. suis* 05ZYH33 基因组中找到相应的编码基因。**结论** 在 *S. suis* 分泌蛋白中发现了新的具有抗原活性的蛋白,可能作为 *S. suis* 特异诊断抗原和疫苗候选抗原,用于诊断试剂和疫苗的研究。

**【关键词】** 猪链球菌;分泌蛋白;免疫蛋白质组学

**Immunoproteomic assay of secretive proteins from *Streptococcus suis* type2 strain SC84** SUN Qiang-zheng\*, LUO Xia, YE Chang-yun, XIAO Di, ZHENG Han, JING Huai-qi, XU Jian-guo. \*State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujg@public.bta.net.cn

**【Abstract】 Objective** To identify antigenic proteins secreted by *Streptococcus suis* (*S. suis*) type2 strain SC84. **Methods** Two-dimensional electrophoresis(2-DE), western-blot assay and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis were performed to search and identify antigenic proteins secreted by *S. suis* strain SC84, which triggered an outbreak of the disease in Sichuan province, China, in 2005. **Results** A total number of 14 western blot spots were found on PVDF membrane. 11 spots which could be found the existence of matching protein on coomassie G-250-stained 2-DE gel were identified by MALDI-TOF MS. The 11 proteins, all located at extra-cellular or cell wall, were classified into 8 kinds of proteins. Among of them, muramidase-released protein (MRP), sullysin (Sly) and extra-cellular factor (EF) were the known antigenic proteins, but several proteins such as putative 5'-nucleotidase, ribo-nucleases G and E, and predicted metal-loendo-peptidase were newly found antigenic proteins. All the identified protein were found to have had the coding gene in genomic of *S. suis* strain 05ZYH33, isolated from patients in Sichuan province, China in 2005. **Conclusion** The newly found proteins could be used as voluntary antigens for detection and vaccination of *S. suis*.

**【Key words】** *Streptococcus suis*; Secreted protein; Immunoproteomics

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种重要的人畜共患病病原体,可引起猪的脑膜炎、关节炎及败血症等疾病<sup>[1]</sup>,亦可引起人类的感染,导致脑膜炎及中毒性休克综合征等严重疾患<sup>[2]</sup>。近年来,猪链球菌病在我国一些省区时有发生或暴发,对养猪业及其从业人员造成重大伤害。特别是 2005 年,在

我国的四川等地发生由猪链球菌 2 型(序列 7 型,ST-7)引起的爆发性流行,造成 200 多人感染,38 人死亡<sup>[3]</sup>。目前,有多种策略用于猪链球菌疫苗开发,如灭活全菌、荚膜多糖等,但因为存在免疫次数多、不能产生广泛保护和免疫原性低等缺点,而影响了其实际应用<sup>[4-6]</sup>。因此,寻找在 *S. suis* 中广泛存在、具有抗原性和免疫原性的蛋白作为疫苗靶位,显得尤为重要。本研究采用免疫蛋白质组学的方法,研究引起 2005 年四川省猪链球菌病暴发的 *S. suis* SC84 菌株分泌蛋白中能和患者血清发生杂交反应的所有蛋白点,期为寻找新的疫苗和诊断靶位蛋白提供线索。

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(孙强正、罗霞、叶长芸、郑翰、景怀琦、徐建国),诊断室(肖迪)

通讯作者:徐建国,Email:xujg@public.bta.net.cn

孙强正、罗霞、叶长芸同为第一作者

## 材料与方 法

1. 菌株与培养条件: *S. suis* SC84 菌株(血清型 2 型, ST7 型)由本室保存, 为四川省猪链球菌病患者分离株; 常规培养采用 5% 绵羊血平皿(广州迪景微生物科技有限公司) 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养; *S. suis* 液体培养采用 Todd-Hewitt broth (THB) (Oxiod) 培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 静止培养。

2. 仪器和试剂: IPG 干胶条 (ReadyStrip™ IPG Strip, 7 cm, pH 值 4~7)、pH 值 3~10 和 pH 值 4~7 的 IPG 缓冲液、蛋白定量试剂盒 (Quick Start Bradford Protein Assay Kit)、矿物油、溴酚蓝等为 Bio-Rad 公司产品; 二硫苏糖醇 (DTT)、3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)、三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 等为 Sigma 公司产品; 测序级胰蛋白酶是 Roche 公司产品; PVDF、0.22 μm 低蛋白结合滤器为 Millipor 公司产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 二抗为华美生物公司产品; 其他试剂均为分析纯; 恢复期血清是从 2005 年四川省猪链球菌感染病例中分离, 由本室保存; 双向电泳第一向等电聚焦仪 Protean IEF Cell、第二向垂直板电泳仪 Protean II Xi 为 Bio-Rad 公司产品; 扫描仪为 Powerlook 2100xl (UMAX); 双向电泳凝胶图像分析软件为 PDQuest™ 2D analysis software (Bio-Rad); 质谱仪为 4700 MALDI TOF/TOF Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

3. 上清分泌蛋白样品的制备: 挑取血平皿上 *S. suis* SC84 单克隆菌株到 THB 液体培养基中静止培养 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 8 h, 1:100 稀释到 400 ml THB 液体培养基中培养 16 h ( $A_{600}$  约 1.0)。4℃ 6000 g 离心 10 min 收集上清。上清中加入蛋白酶抑制剂 1 片, DTT (终浓度 0.1%), 0.22 μm 低蛋白结合滤器过滤除菌, 加入三氯乙酸 (TCA, 终浓度 10%), 冰水中静置 3 h 沉淀蛋白; 4℃ 14 000 g 离心 40 min, 弃上清; 沉淀以预冷的丙酮洗 3 次, 冷冻真空干燥。沉淀蛋白以适量裂解液 (7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 0.2% DTT) 溶解; 以 Quick Start Bradford Protein Assay Kit 定量, 分装成小份, 直接上样或 -70℃ 保存备用。

4. 双向电泳: 第一相固相 pH 等电聚焦按照 BIO-RAD 操作手册进行, 程序分别为 50 V 12 h, 250 V 30 min, 500 V 30 min, 4000 V 3 h, 4000 V 20 000 Vh, 500 V 1 h; 胶条进行平衡和二相垂直板

SDS-PAGE 电泳; 每一蛋白样品进行并行两块胶双向电泳, 一块胶进行考马斯蓝染色, 另一胶块进行免疫杂交。图像采用扫描仪扫描采集, 运用 PDQuest 2D 7.4.0 软件进行分析。

5. 免疫杂交: 双向电泳后, 胶上蛋白采用湿法转移至 PVDF 膜上, 进行 Western-blot。具体步骤: 膜以封闭液 (PBS, 0.05% tween-20, 5% 脱脂奶粉) 封闭 2 h 后, 与封闭液稀释的患者血清 (1:100 稀释) 室温孵育 2 h, PBST (PBS, 0.05% tween-20) 洗 3 次, 每次 10 min; 与 HRP 标记的羊抗人 IgG 二抗 (1:50) 室温孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 每次 10 min。以 4-氯-1-萘酚 (4-chloro-1-naphthol, 4-CN) 作为显色底物进行显色, 显色膜扫描保存。每个样品重复 3 次, 3 次杂交均为阳性的蛋白点进行鉴定。另外, 取正常人血清作为阴性对照, 以剔去非特异杂交点。

6. 蛋白消化和蛋白点鉴定: 将考马斯蓝染色的胶与 Western-blot 显色的膜进行比对, 以确定胶上免疫反应蛋白点。从考马斯蓝染色胶上切取相应蛋白点进行蛋白酶切。使用 4700 MALDI TOF/TOF Proteomics Analyzer 在中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室进行质谱鉴定, 所得数据使用 MATRIX 软件 (www.matrixscience.com) 进行肽质量指纹图谱检索, 同时在 NCBI nr 数据库进行蛋白检索。因为实验菌株与 *S. suis* 测序株 05ZYH33 同为 2005 年四川省猪链球菌感染疫情分离菌株, 因此在所有匹配蛋白中首选 *S. suis* 05ZYH33 菌株蛋白。鉴定的蛋白序列使用 HMMs 软件 (<http://tigrblast.tigr.org/web-hmm/>) 进行蛋白功能预测; 使用 psortb v 2.0 (www.psort.org/psortb) 进行蛋白定位预测。

## 结 果

1. 上清分泌蛋白谱: 首先以 pH 值 3~10 IPG 胶条进行 2-D 分析, 经考马斯蓝染色、扫描和软件分析, 结果发现 *S. suis* SC84 菌株的上清分泌蛋白大多分布在 pH 值 4~7 的范围内 (资料未发表), 因此, 采用 pH 值 4~7 的胶条进行蛋白 2-D 电泳分析, 共检测到大约 100 个蛋白点 (图 1A)。样品进行 3 次重复试验, 得到的图谱有很高的重复性。

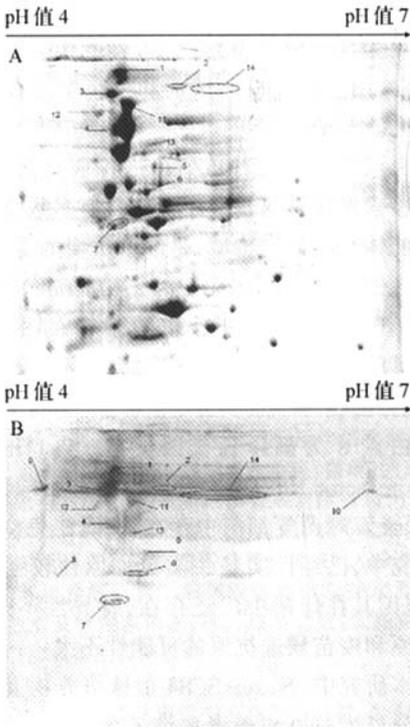
2. 上清分泌蛋白免疫杂交谱: 取上清分泌蛋白样品进行并行双向电泳, 一块胶进行考马斯蓝染色用于图谱分析和蛋白点的鉴定, 另一胶上蛋白转移至 PVDF 膜上, 与患者血清进行 Western-blot。经

显色后,杂交膜上共发现 14 个杂交点(图 1B),共有 11 个点可以与考马斯蓝染色胶上蛋白点匹配。切取这些蛋白点进行酶切、肽指纹图谱和质谱鉴定,其中 11 个蛋白鉴定成功,分属于 8 种蛋白(表 1)。经蛋白定位预测,8 种蛋白中有 6 种定位于胞壁或胞外,其余 2 种定位于胞外和胞质。鉴定成功的所有蛋白点均能在测序菌株 *S. suis* 05ZYH33 基因组中找到相应的编码基因。

讨 论

蛋白点 1、2、3、13 为同一种蛋白——溶菌酶释放蛋白(muramidase-released protein, MRP),是 *S. suis* 重要的表面分子蛋白,MRP 蛋白与 A 群链球菌 M 蛋白一样,具有黏附、抗吞噬、调理及诱导细胞凋亡等多种生物学功能,故将 MRP 列为类 M 蛋白之列<sup>[7]</sup>。其相对分子质量( $M_r$ )为  $136 \times 10^3$ ,在其 N 端有分泌信号肽段,C 端有胞壁锚定结构域,成熟肽的  $M_r$  为  $110 \times 10^3$ <sup>[8]</sup>。MRP 存在于大多数 *S. suis* 毒性菌株中,而在无毒株中缺失,是重要的毒力因子,可作为细菌毒力的参考指标,用来区分致病株和非致病株<sup>[9]</sup>。研究表明,MRP 也是重要的保护性抗原,是疫苗研制的重要备选抗原,以全长 MRP 蛋白或截短的部分蛋白为抗原的亚单位疫苗相关研究已经开展。Wisselink 等<sup>[10]</sup>构建了 MRP 和 EF 的双价亚单位疫苗,对实验动物有很好的免疫原性和保护性;王海丽等<sup>[11]</sup>、欧瑜和陆承平<sup>[12]</sup>分别克隆表达了 MRP 蛋白部分氨基酸片段,表达的蛋白均具有良好的抗原性;范红结等<sup>[13]</sup>也克隆表达了 MRP 蛋白 N 端部分片段,表达的蛋白对 BALB/C 小鼠有很好的保护效果。

蛋白点 6 经鉴定为溶血素(Sly),是 *S. suis* 产生释放至胞外、具细胞毒性作用的毒素物质,属于巯基激活的细胞毒素家族,可与宿主细胞受体结合,导致细胞通透性增加和裂解,不仅直接造成细胞的破坏,且有助于细菌的扩散,这也是 *S. suis* 易侵入宿主血液导致菌血症和败血症的原因。Sly 是 *S. suis* 重要的毒力因子,Sly<sup>+</sup> 的菌株毒力强于 Sly<sup>-</sup> 的菌株<sup>[14]</sup>。Sly 也是一种重要的保护性抗原,可作为亚单位疫苗的候选抗原。Jacobs 等<sup>[15]</sup>对 *S. suis* 2 型的 Sly 进行了提纯,然后以提纯的 Sly 免疫 BALB/C 系小鼠,



注: A: 上清分泌蛋白 2-D 电泳胶考马斯蓝染色; B: 2-D 电泳胶上蛋白转到 PVDF 膜上,与 *S. suis* 感染患者血清杂交。胶上与免疫杂交点匹配的所有点进行 MALDI-TOF MS 分析

图1 *S. suis* SC84 菌株上清分泌蛋白 2-D 电泳和免疫杂交图谱

表1 *S. suis* SC84 菌株上清分泌蛋白中免疫蛋白点质谱鉴定及检索结果

蛋白序号	NCBI 登录号	编码基因在 <i>S. suis</i> 05ZYH33 基因位点标签 <sup>a</sup>	蛋白名称	等电点/分子量	蛋白功能分类 <sup>b</sup>	蛋白定位 <sup>c</sup>
1/2/3/13	gi 146318407	SSU05_0753	muramidase-released protein	4.87/135713.3	YSIRK type signal peptide	cellwall
4	gi 146319025	SSU05_1371	ribonucleases G and E	4.79/67045	LPXTG-motif cell wall anchor	extracellular
5	gi 146317812	SSU05_0513	predicted metalloendopeptidase	5.13/68102.4	peptidase family M13	extracellular/Cytoplasmic
6	gi 146319057	SSU05_1403	hemolysin	4.94/54830.6	thiol-activated cytolysin	extracellular
7	gi 146319202	SSU05_1548	hypothetical protein SSU05_1548	4.73/40570	receptor family ligand binding	extracellular
8	gi 146318184	SSU05_0530	translation elongation factor EF-Tu	4.86/43943.4	translation elongation factor Tu	extracellular/cytoplasmic
11	gi 146317835	SSU05_0177	extracellular protein	4.84/89960.2	YSIRK type signal peptide	extracellular
12	gi 146318654	SSU05_1000	putative 5'-nucleotidase	4.54/76914	5'-nucleotidase, C-terminal	cellwall

注: <sup>a</sup> 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找蛋白编码基因在 *S. suis* 05ZYH33 中的基因位点标签; <sup>b</sup> 使用 HMMs 软件 (<http://tigrblast.tigr.org/web-hmm/>) 进行蛋白功能预测; <sup>c</sup> 使用 psortb v 2.0 ([www.psort.org/pssortb](http://www.psort.org/pssortb)) 进行蛋白定位预测

使小鼠得到了完全的免疫保护,证明 *S. suis* 2 型的 Sly 具有重要的免疫保护作用,并推测 Sly 对其他类型的 *S. suis* 有交叉保护作用。Jacobs 等<sup>[16]</sup>对 Sly 和其他胞外抗原对猪的免疫保护作用进行了对比,结果显示 Sly 的免疫保护作用明显优于其他抗原。

ribonucleases G 和 E 为一种细菌包膜蛋白,具有 2 个膜结构域,定位于细胞外(表 1),它与 surface antigen spl(Sao)的氨基酸相似性为 83%。Sao 是 Li 等<sup>[17]</sup>发现的能与病猪血清发生杂交的猪链球菌表面蛋白,具有革兰阳性菌膜锚定蛋白典型特征,结构中含有植物病原体内经常出现的一段保守的非毒性结构域。Sao 蛋白具有 *S. suis* 特异性,由 Sao 蛋白免疫仔猪能够诱发明显的体液免疫反应<sup>[17]</sup>。虽然在随后的保护性研究中并没有发现保护性,但可作为病原菌感染的标志性蛋白,用于特异诊断试剂的研发。本研究提示有必要对 ribonucleases G 和 E 蛋白进行深入研究,探索其免疫活性和保护性,为进一步疫苗和特异诊断试剂的开发奠定基础。

蛋白点 11 经鉴定为细胞外蛋白(extracellular protein),又称为细胞外因子(extracellular factor, EF),其  $M_r$  为  $110 \times 10^3$ ,仅存在于培养物上清中,是 *S. suis* 重要的毒力因子,同 MRP、Sly 一起,成为区分毒力株与非毒力株的标志蛋白。在一些国家(特别是欧洲国家),MRP+、EF+ 血清 2 型菌株与猪的感染和严重临床表现密切相关,而 MRP-、EF- 血清 2 型菌株主要从健康猪中分离<sup>[18]</sup>。EF 也是一种重要的保护性抗原,Wisselink 等<sup>[10]</sup>以提纯的 MRP、EF 蛋白免疫实验动物,结果发现免疫动物对猪链球菌毒力株的攻击具有很好的保护性,提示 EF 作为亚单位疫苗的可行性。

蛋白点 12 为 5'-核苷酸酶,是一类参与能量代谢的酶,将蛋白质序列在 BLAST 中进行结构域检索,发现它具有 3 个结构域,分别是 5'-核苷酸酶、钙调素样磷脂酸酶和双功能-UDP 水解酶。它与 *S. suis* 89/1591 的革兰阳性球菌表面蛋白(surface protein from gram-positive cocci)的相似性为 98%;与血链球菌 SK36 5'-核苷酸酶的相似性为 62%。在以前的研究中,没有报道 5'-核苷酸酶具有抗原性,在本项研究中首次被鉴定具有抗原性,可以作为判定病原菌感染的标志性蛋白和疫苗研究的候选抗原,值得进一步研究。

蛋白点 5 为金属内肽酶(predicted metalloendopeptidase),属于肽酶家族 M13。肽酶家

族 M13 广泛存在于哺乳动物组织和细菌中,而在细菌中参与消化牛奶。经 BLAST 检索发现,金属内肽酶氨基酸序列与 *S. suis* 测序株 98HAH33、89/1591 金属内肽酶蛋白的相似性最高,分别为 100% 和 98%;其次为贝氏梭状芽胞杆菌(*Clostridium beijerinckii*) NCIMB 8052 的 endothelin-converting enzyme 1 蛋白(34%),*Flavobacterium bacterium* BBFL7 的 endopeptidase M13 family(33%),而在其他菌属中没有发现相似性高的蛋白。因此,金属内肽酶蛋白为 *S. suis* 的特异蛋白,可能作为 *S. suis* 的标志蛋白,用于特异诊断试剂和疫苗候选保护性抗原的研究。

蛋白点 7 为 *S. suis* 05ZYH33 株假定蛋白,经蛋白功能检索发现其氨基酸序列中含有多数受体所具有的与配体结合的结构域,是细菌重要的受体组份。它与无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) 2603V/R 中 ABC 型支链氨基酸运载体蛋白的相似性为 68%。可能作为药物作用的靶蛋白,用于 *S. suis* 特异药物的开发。

蛋白点 8 为翻译延长因子 EF-Tu(translation elongation factor EF-Tu),它在链球菌、肠球菌、乳球菌、脑膜炎双球菌等细菌中存在,在既往免疫蛋白质组学研究中,已经证实是一类免疫原性较强的标志蛋白,但因其在全球菌中广泛存在,特异性不强,作为检测抗原和疫苗候选抗原的可能性不大。

在本研究中,*S. suis* SC84 菌株培养物上清中共有 8 种分泌蛋白可与患者血清发生杂交,具有很好的抗原活性,其中 ribonucleases G 和 E、5'-核苷酸酶及金属内肽酶为最新发现的具有抗原活性的蛋白。但是,这些蛋白是否具有很好的免疫原性和保护性,需要进一步研究证实。

#### 参 考 文 献

- [1] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol*, 2000, 76: 259-272.
- [2] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, 10: 131-137.
- [3] Ye C, Zhu X, Jing H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 1203-1208.
- [4] Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci*, 1988, 45: 349-352.
- [5] Torremorell M, Pijoan C, Dee S. Experimental exposure of young pigs using a pathogenic strain of *Streptococcus suis* serotype 2 and evaluation of this method for disease prevention. *Can J Vet Res*, 1999, 63: 269-275.
- [6] Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg(London)*, 1980, 85: 275-285.
- [7] Pancholi V, Fischetti VA. Major surface protein on group A

- streptococci is a glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*, 1992, 176:415-426.
- [8] Smith HE, Vecht U, Gielkens AL, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1992, 60: 2361-2367.
- [9] Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun*, 1991, 59:3156-3162.
- [10] Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec*, 2001, 148:473-477.
- [11] 王海丽, 王长军, 陆承平, 等. 猪链球菌 2 型人源分离株截短的溶菌酶释放蛋白基因的克隆及原核表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22:178-180.
- [12] 欧瑜, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白基因片段的克隆与表达. *农业生物技术学报*, 2002, 10:72-75.
- [13] 范红结, 陆承平, 唐家琪, 等. 猪链球菌 2 型 *mrp* 基因免疫功能片段的克隆、表达及动物试验. *微生物学报*, 2002, 44:44-57.
- [14] Billington SJ, Jost BH, Songer JG. Thiol-activated cytolytins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 182:197-205.
- [15] Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (sulysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*, 1994, 65:1742-1748.
- [16] Jacobs AA, van den Berg AJ, Loeffen PL. Protection of experimentally infected pigs by sulysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec*, 1996, 139:225-228.
- [17] Li Y, Martinez G, Gottschalk M, et al. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun*, 2006, 74:305-312.
- [18] 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.

(收稿日期:2007-12-14)

(本文编辑:张林东)

## · 疾病控制 ·

## 一起水型细菌性痢疾暴发的调查

孟昭远 李平 徐志元 高元鹏 李海燕

2005 年 6 月天津市武清区汉沽港镇发生以发热、腹泻、恶心、呕吐和脓血便为主要症状的病例,共确诊患者 1189 例,经流行病学调查确认是一起由于生活饮用水源污染而导致的福氏志贺痢疾杆菌 3a 型细菌性痢疾(菌痢)的暴发。

1. 对象与方法:采用统一的调查表对所有病例进行流行病学个案调查,同时选择健康人为对照,对可能的危险因素进行病例对照研究。采集病例粪便样本 17 人份,按常规实验方法分离培养病原菌。采集汉沽港镇深井水原水、管网水、蓄水池水及管网末梢水,进行细菌总数、大肠菌群数、志贺菌、沙门菌和霍乱弧菌检测。

## 2. 结果:

(1) 基本情况:汉沽港镇中心在汉沽港村,由 4 个街区及村落组成。居民生活饮用水为深井自来水,从蓄水池,二次提水到水塔,并下设自来水管网。

(2) 流行病学调查:首例腹泻患者于 6 月 1 日发病,至 6 月 6 日期间每日发病十余例。6 月 7-12 日每日发病例数从 20 多例逐渐上升到 50 例,6 月 15 日病例陡升至 120 例,流行高峰持续到 6 月 18 日。6 月 17 日采取综合性防疫措施后,病例数逐日下降,至 6 月 24 日以后无新发病例报告。此次疫情历时 24 d,确诊患者 1189 例,罹患率为 3.66% (1189/32 505)。病例中男性 683 例,女 506 例,男女比为 1:0.74。其中以 10~20 岁年龄组发病数最多,达 500 例,占总发病数的 42.05%;其次为 0~10 岁 332 例(27.92%)。此次疫情波及范围大,全镇 18 个村街均有病例,主要集中在汉沽港村的 4 个街区,占病例总数的 66.53% (791/1189)。发病率呈以一街为最高,周围村落逐渐降低的特点。一街的发病率高达 8.15% (509/4495),四街发病率为 5.98% (114/1907),六道口村发病率为 4.36% (244/5593),其他街区和村落的发病率为 2.00%~3.51%。

(3) 实验室检测:17 份患者粪便标本中 4 份培养出福氏志贺痢疾杆菌 3a 型,另 13 份粪便标本细菌培养呈阴性(其

中有 8 例应用了抗生素)。发病例数最多街村的深井水水源细菌培养全部阴性。仅在一街蓄水池水、末梢水检测大肠菌群最大可能计数(MPN) > 1600/100 ml,严重超标(正常值 MPN < 2/100 ml),粪大肠菌群阳性,并检出福氏志贺痢疾杆菌 3a 型,与患者粪便培养菌型(流行菌株)一致。证实水源污染是本次菌痢暴发的直接原因。

(4) 水源现场调查与处理:对输水管网检查发现汉沽港镇一街南至蓄水池段管网破裂渗漏,且管网渗漏处原为垃圾坑。6 月 17 日后迅速对自来水供水系统消毒和技术改造,及时更换破裂处管道;在蓄水池内缘建防渗墙,防止蓄水池渗漏;对蓄水池、水塔、自来水管网进行饮水消毒;对另一处经过污水段的水下管网改地上架高,防止水源污染。此外,还采取隔离传染源(患者)、外环境消毒、高暴露人群预防性投药等以切断传播途径为主导的综合性防疫措施。此后未再出现二代续发病例。

3. 讨论:本次疫情调查表明,饮用水地下管网破裂是导致此次疫情的直接原因。疫情发生的最早时间是 6 月 1 日,但乡村及个体医生未及时发现报告疫情,直到 6 月 14 日武清区卫生防病站才收到疫情报告,是导致此次疫情流行的时间长、范围大、病例多的原因之一。汉沽港一街为镇政府所在地,工商业较发达,流动人口较多,卫生条件差。我国每年报告的菌痢与感染性腹泻发病例数几乎占到法定传染病的 1/4<sup>[1]</sup>,有文献报道多达 60% 的感染性腹泻疫情是由水污染造成的<sup>[2]</sup>,且多发生于乡镇地区。这些地区由于改水改厕不彻底,或者根本没有改水改厕,使自来水、井水或河塘水极易受到污染,造成暴发疫情。

## 参 考 文 献

- [1] 法定传染病疫情报告. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n272757/index.html>.
- [2] 黄诚孝,周勤. 15 起肠道传染病暴发疫情分析. *浙江预防医学*, 1999, 11(12):3-4.

(收稿日期:2007-11-13)

(本文编辑:张林东)