

四川省资阳市爆发的猪链球菌感染疫情中 病原菌的分离和鉴定

朱 虹, 何 君, 荆红波, 王争强, 端 青*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘 要 对四川资阳地区病猪标本、尸检肝标本和血清标本进行病原菌分离, 得到 10 株分离菌。经菌落形态和菌体形态观察、生化鉴定, 证明其中 3 株为猪链球菌 2 型(SS2)。通过对 3 株 SS2 胞外因子基因、溶菌酶释放蛋白基因、荚膜多糖基因和 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 结果分别在 626bp、885bp、487bp 和 297bp 处出现目的条带。为进一步了解分离的 SS2 菌株的特性, 使用 VITEK GPS-107 药敏卡进行药敏试验, 结果表明分离菌对青霉素-G、红霉素、万古霉素等多种抗生素敏感。分离菌感染 Balb/c 小鼠可引起动物死亡, 并出现胃肠肿胀、嘴部青紫以及皮下紫斑等症状, 与患者症状相似。小鼠脏器压片经革兰氏染色镜下观察可见阳性球菌。

关键词: 猪链球菌 2 型; 生化鉴定; PCR 扩增; 药敏试验; 动物试验

中图分类号: Q93-331 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2006)04-0635-05

猪链球菌病是一种由链球菌引起的猪各种疾病的总称, 病原纷繁复杂, 在我国主要以 C 群的马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus epui* subsp. *zooepidemicus*) 为主。近十几年来, R 群的猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) 在我国许多地方的发病率越来越高, 给养猪业带来的危害也越来越严重^[1]。1993 年, 黄毓茂等^[2]在广东省首次证实此病原体在我国的存在。1997 年, 上海市某猪场的新生仔猪和 15 日龄以内的哺乳仔猪发生不明原因死亡, 并导致相关从业人员感染, 后经病原体分离及鉴定证实此次疫情是由 SS2 所致^[3]。SS2 流行范围广, 对猪有很强的致病性, 主要引起断奶猪关节炎、脑膜炎、败血症和支气管肺炎, 以及成年猪无明显临床症状下突然死亡。

2005 年 6 月下旬以来, 四川省资阳、内江等部分地区发生了重大突发公共卫生事件, 患者相继出现急性发病、高热、头痛等全身中毒症状, 重者出现中毒性休克、脑膜炎等, 并导致多人死亡。根据现场流行病学调查初步认定, 疫情系由猪链球菌引起的人感染性疾病。

本实验室对中国疾病预防控制中心送来的此次疫情相关标本进行病原体分离, 并对分离到的 SS2 细菌进行了系统鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 四川资阳地区 4 头病猪肝、脾、肾和肺脏标本, 尸检肝标本 1 份和病人血清标本 5 份, 由中国疾病预防控制中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器 THB 营养肉汤购自 OXOID 生物公司, Taq DNA 聚合酶、dNTP 和分子量标准 DL2000 购自 TaKaRa 公司, PCR 扩增在 PE2400 热循环仪上进行, API 细菌生化鉴定仪、API 20 Strep 试纸条和 VITEK GPS-107 药敏卡购自法国梅里埃生物公司, Balb/c 小鼠(10 ~ 15g)由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 病原菌分离

猪脏器标本和人尸检肝标本剪碎匀浆, 用无菌 THB 营养肉汤稀释, 分别取上清划线接种 5% 新鲜羊血平板, 37℃ 孵箱培养 24 ~ 48h, 挑取可疑单个菌落扩大培养, 同时进行革兰氏染色。

1.3 生化鉴定试验

用生理盐水将待检细菌菌液稀释至 4 个麦氏单位, 使用 API 20 Strep 试纸条在 API 细菌生化鉴定仪鉴定, 方法步骤按照使用说明操作。

1.4 PCR 试验及序列测定

根据 GenBank 中 SS2 胞外因子 (Extracellular

* 通讯作者。Tel: 86-10-66948560; E-mail: duanq@nic.bmi.ac.cn

作者简介: 朱 虹 (1962 -), 女, 辽宁人, 副研究员, 研究方向为微生物学。E-mail: hongz62@yahoo.com.cn

其他作者: 姜永强, 苏裕心

收稿日期: 2005-10-21; 接受日期: 2005-12-07; 修回日期: 2006-03-20

factor, EF) 溶菌酶释放蛋白(Muraminidase released progein, MRP) 荚膜多糖(Capsular polysaccharides, CPS) 和 16S rRNA 基因分别设计引物, 引物序列^[4, 5]及扩增片段大小见表 1, 引物由北京奥科公司合成。

按常规方法提取分离菌的基因组, PCR 反应体系按照 *Taq* DNA 聚合酶使用说明配制。反应条件

表 1 猪链球菌 2 型 PCR 扩增的目的基因引物序列、退火温度及扩增片段大小

Table 1 Primer sequence of target gene, anneal temperature and PCR product of SS2			
Target gene	Primer sequence(5' ~ 3')	Anneal temperatur(°C)	PCR product(bp)
EF	EF-1 :GCTACGACGGCCTCAGAAATC	60	626
	EF-2 : TGGATCAACCACTGGTGTAC		
MRP	MRP-1 : ATCAGAATCACCACTTTTGG	45	885
	MRP-2 : TCATACCCAGTAAATACACG		
CPS	Stscpsau :GTTGAGTGCTTTATACACCTGTT	56	487
	Stscpsad :CAGAAAATTGATATTGTCCACC		
16S rRNA	Stsp16su :CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT	56	297
	Stsp16sd :GTAAGATACCGTCAAGTGAGAA		

1.5 药敏试验

使用 VITEK GPS-107 药敏卡对分离的 SS2 菌株做药敏试验, 操作按照使用说明进行。

1.6 动物试验

取一株 SS2 分离菌, 37℃ 培养 24h, 扩大培养, 用生理盐水洗下菌苔, 稀释菌液至 2 × 10⁸ cfu/mL, 腹腔接种 Balb/c 小鼠 2 × 10⁸ cfu/0.5mL/只, 共 6 只。同时设生理盐水对照组, 共 6 只。观察小鼠接种后发病症状及死亡情况。

2 结果

2.1 细菌分离

病猪标本处理后进行病原菌分离, 共分离得到 10 株细菌, 后经鉴定证明其中 SS2 3 株(来源于 3 头病猪), 咽峡炎、粪肠等其它链球菌 6 株, 肺炎克雷伯氏菌 1 株。病人肝标本和血清标本未分离到病原菌。随后, 我们对 3 株 SS2 进行了系统鉴定。

2.2 菌落形态和菌体形态

SS2 在血平板培养 24h 后, 形成圆形凸起、湿润、表面光滑、边缘整齐的透明小菌落, 直径约为 0.5 ~ 1mm, 周围有不透明草绿色 α 溶血环(图版 II - A-a)。菌体革兰氏染色为阳性球菌, 呈两个或多个链状排列(图版 II - A-b)。

2.3 生化鉴定试验

SS2 分离株生化鉴定结果见表 2。API V3.3.3 软件分析表明, 我们所分离的 SS2 与软件专家系统

为 95℃ 10min; 94℃ 45s, 72℃ 1min, 共 35 个循环; 72℃ 保温 7min, 各对引物的退火温度见表 1。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。MRP 基因扩增产物纯化后克隆到 T 载体, 挑取阳性克隆进行序列测定。

中 SS2 生化反应特性的符合率为 99.9%, 因而鉴定我们所分离的细菌为 SS2。

表 2 生化鉴定结果

Table 2 Results of biochemistry characterization			
Substrate	Result	Substrate	Result
VP	-	RIB	-
HIP	-	ARA	-
ESC	+	MAN	-
PYRA	+	SOR	-
α-GAL	+	LAC	+
β-GUR	+	TRE	+
β-GAL	-	INU	-
PAL	-	AMD	+
LAP	+	GLYG	+
ADH	+		

Note: VP(Sodium pyruvate); HIP(Hippuric acid); ESC(Esculin ferric titrate); PYRA(Pyroglutamic acid-βnaphthylamide); α-GAL(6-bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside); β-GUR(Naphthol ASBI-alucuronic acid); β-GAL(2-naphthyl-βD-galactopyranoside); PAL(2-naphthyl phosphate); LAP(L-leucine-β-naphthylamide); ADH(L-arginine); RIB(D-ribose); ARA(L-arabinose); MAN(D-mannitol); SOR(D-sorbitol); LAC(D-lactose); TRE(D-trehalose); INU(Inulin); AMD(Starch(2)); GLYG(Glycogen).

2.4 PCR 试验及序列测定

将分离到的 3 株 SS2 提取基因组模板, 分别用 EF、MRP、CPS 和 16S rRNA 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 3 株菌扩增产物呈阳性, 分别在 626bp、885bp、487bp 和 297bp 处出现目的条带, 阴性对照无扩增条带。MRP 基因扩增产物纯化后连接到 T 载体并进行序列测定, 经 Blastn 与 GenBank 比对, 结果可知 3 株分离菌与 *S. suis* HA9801 分离株相应基因序列只有一个碱基差异, 同源性在 99% 以上。

2.5 药敏试验

SS2 分离株的药敏试验结果见表 3。

表 3 药敏试验结果

Table 3 Result of drug sensitivity test

Antibiotics	Minimal inhibitory concentration (MIC)	Result
Cefazolin	≤8	S
Clindamycin	≤0.25	S
Erythromycin	≤0.25	S
Levofloxacin	≤1	S
Nitrofurantoin	≤32	S
Penicillin-G	≤0.03	S
Tetracycline	≥16	R
Vancomycin	≤0.5	S

S :sensitive ; R :resistant .

2.6 动物试验

小鼠腹腔接种 SS2 分离株 10h 内死亡 1 只 ,20h 后死亡 4 只 ,存活 1 只。小鼠死亡时出现腹部严重胀肚、嘴部青紫、四趾有明显出血点 ,解剖后发现胃肠道胀气 ,皮肤下形成深紫色病变 ,脏器压片可见大量革兰氏阳性球菌(图版 II -B)。生理盐水对照组小鼠正常。

3 讨论

猪链球菌病是世界各国常见的一种传染病 ,对养猪业影响很大。在我国导致该病的病原菌主要为 C 群链球菌 ,且多为马链球菌兽疫亚种 ,临床上也多表现为关节炎型。1997 ~ 1999 年间 ,上海、江苏等地暴发了由 SS2 引起的传染病 ,导致猪大批死亡 ,且发生人员感染并致死。2005 年 6 月下旬以来 ,四川省资阳、内江等部分地区发生了多起人员死亡的重大疫情 ,患者临床上主要表现为急性起病、高热、伴有头痛等全身中毒症状 ,重者出现中毒性休克、脑膜炎。患者有以下共同特征 : (1) 均为 40 岁至 50 岁的壮年农民 ,发病前身体健康 ; (2) 发病前均有直接接触病、死猪的历史 ; (3) 均出现高热、皮下淤血、测不到血压等休克症状。此次疫情呈现发病急、病程短、病死率高的特点。现场流行病学调查初步认定 ,疫情系由猪链球菌引起的人感染 ,后来得到了病原学证实。

我们从病猪标本中分离得到病原菌 ,经形态学观察、生化试验和分子生物学方法鉴定为 SS2。荚膜多糖 (CPS)、溶菌酶释放蛋白 (MRP) 和胞外因子 (EF) 是 SS2 重要的毒力因子^[6]。通过 PCR 扩增 ,分离株 CPS、MRP 和 EF 基因呈阳性 ,此结果表明分离

菌株为强毒株^[7]。药敏试验显示 ,SS2 分离株对头孢唑啉、克林霉素、红霉素、左氧氟沙星、呋喃妥因、青霉素 G 和万古霉素等多种抗生素敏感 ,此次疫情中患者曾大量使用抗生素 ,因此尸检标本和血清标本中均未分离出细菌。

Sanford 等研究人员通过长达 4 年的研究发现 ,猪链球菌感染可造成心脏和中枢神经系统的损伤。此次四川疫情患者以急性起病、发热、畏寒、恶心、腹痛、腹泻、皮肤黏膜瘀点 (斑)、眼角膜充血及脑膜炎、颈项强直为主要临床症状 ,部分患者病程进展迅速 ,出现中毒性休克和多器官衰竭而死亡^[8]。小鼠和家兔是最常用于 SS2 病理学研究的实验动物^[6] ,我们将 SS2 分离株腹腔接种小鼠 ,小鼠在 20h 内死亡 ,并出现严重胀肚、嘴部青紫、脚趾出血等现象 ,解剖后发现皮下紫斑。小鼠所有脏器压片和细菌分离均得到 SS2 ,说明动物产生了严重的菌血症。我们也将 SS2 分离株接种家兔 ,家兔接种后 48h 内死亡 ,死亡时动物全身痉挛 ,前肢呈蜷缩状 ,后肢强直 ,尾巴笔直上翘 ,呈明显的神经中毒症状。从动物试验可以看出 ,动物感染 SS2 引发的症状与患者十分相似 ,相关的组织病理学观察还在进行中。

参 考 文 献

[1] 刘 军 ,冯书章 ,尹铁勇 ,等 .猪链球菌 2 型和 9 型菌株的多重 PCR 检测 .中国人兽共患病杂志 ,2005 ,21(6) :510 - 514 .

[2] 黄毓茂 ,黄引贤 ,余志东 ,等 .2 型猪链球菌病的初步研究 .中国畜禽传染病 ,1993 ,7(5) :1 - 3 .

[3] 张苏华 ,王永康 ,刘佩红 ,等 .猪链球菌 2 型上海分离株的病原特性鉴定 .中国预防兽医学报 ,2001 ,23(4) :265 - 269 .

[4] Marois C , Bougeard S , Gottschalk M . Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs . J Clin Microbiol , 2004 , 42 :3169 - 3175 .

[5] Smith H , Veenbergen V , Velde J , et al . The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1 , 2 , and 9 : development of rapid serotype-specific PCR assays . J Clin Microbiol , 1999 , 37 :3146 - 3152 .

[6] 徐建国 ,景怀琦 ,叶长芸 ,等 .高致病性猪链球菌感染及我国防治工作中存在的问题 .中华流行病学杂志 ,2005 ,26(9) :629 - 632 .

[7] 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 .

[8] 祝小平 ,祖荣强 ,陈志海 ,等 .四川省人感染猪链球菌死亡病理特征分析 .中华流行病学杂志 ,2005 ,26(9) :633 - 635 .

Isolation and identification of *Streptococcus suis* serotype 2 from sick-pig samples of Sichuan province

ZHU Hong ,HE Jun ,JING Hong-bo ,WANG Zheng-qiang ,DUAN Qing*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity , Institute of Microbiology and
Epidemiology , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071 , China)

Abstract : *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) is a major pathogen frequently associated with infections in pigs. There are presently 35 serotypes of *S. suis* (serotype 1 to 34 and serotype 1/2) recognized on the basis of capsular antigens. Few people were reported to infect with SS2 in the past years. However , an accidental case happened in Sichuan province of China in 2005. Some people got ill and died , and all of them were closely contacted with sick pigs. Based on clinical features and epidemiologic data , this case could be caused by SS2 infection. Liver , spleen , kidney , lung and serum samples were collected and used for pathogen isolation and identification in laboratory , three strain bacteria were isolated. The three strains of SS2 showed typical morphology of SS2 on blood agar and under microscope with Gram stain. They were also agglutinated with standard serum of SS2. Biochemical characteristics of the three bacteria were tested using API 20 strep and analyzed by API software (version 3.3) , results showed they were SS2. Four pairs of primer were designed , which were exactly matched the extracellular factor gene , muraminidase released protein gene , capsular polysaccharides gene and 16S rRNA gene respectively. These primers were used on polymerase chain reaction (PCR) , and the PCR products were 626bp , 885bp , 487bp and 297bp on agarose gel , respectively. Drug sensitivity test were also done and results showed that they were sensitive to cefazolin , clindamycin , erythromycin , levofloxacin , nitrofurantoin , penicillin-G , and vancomycin and resistive to tetracycline. Balb/c mice infected with the isolated SS2 strain showed swelling in stomach and intestine , cyanochroia at mouth and suggillation under skin , which were similar to the clinical features of patients. *Streptococcus suis* serotype 2 were also found on lung sheeting sample under microscope with Gram stain. Rabbits infected with the isolated SS2 showed the similar clinical features with mice.

Keywords : *Streptococcus suis* serotype 2 ; Biochemistry characterization ; PCR amplification ; Sensitivity test ; Animal experiment

* Corresponding author. Tel 86-10-66948560 ; E-mail : duanq@nic.bmi.ac.cn

Other authors : JIANG Yong-qiang , SU Yu-xin

Received 21 October 2005 / Accepted 7 December 2005 / Revised 20 March 2006