

文章编号:1002-2694(2001)06-0092-03

人-猪链球菌感染性综合征的病原特征分析

杨华富 朱凤才 史智扬 庄菱 顾玲 郭喜玲 胡晓杼 汪华

摘要:目的 评价人源和猪源猪链球菌的药敏和致病力情况,分析这些菌株间的同源性。方法 用 K-B 法对这些菌株进行药敏试验;用菌株对家兔和小白鼠进行攻击试验;用菌体脂肪酸分析和随机 DNA 基因扩增分析技术进行菌株间的同源性研究。结果 人源和猪源猪链球菌对青霉素钾、氯霉素、头孢拉定、头孢唑新、头孢三嗪、头孢噻甲羧肟、菌必治、万古霉素、氨苄青霉素、红霉素敏感,对四环素、链霉素不敏感,小白鼠对这些菌株不敏感,而家兔敏感,接种这类菌株可致家兔死亡。菌体脂肪酸分析和随机 DNA 基因扩增分析提示:这些菌株间的以及与猪链球菌 2 型参考菌株间的亲缘关系很近,与血链球菌、无乳链球菌等 7 种链球菌及肠球菌的亲缘关系较远。结论 这些人源和猪源猪链球菌均为猪链球菌 2 型,致病力极强,人源与猪源猪链球菌同源。

关键词:猪链球菌 2 型;动物攻击试验;菌体脂肪酸;随机 DNA 基因扩增

ANALYSIS ON PATHOGENIC FEATURE OF SYNDROME INFECTED BY *S. SUI* FROM HUMAN AND SWINE

YANG Huafu, ZHU Fengcai, SHI Zhiyang, et al

(Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009)

ABSTRACT: Aim To evaluate the drug sensitivity and pathogenicity of *S. suis* from human and swine, to analyse the homogeneity of the strains of *S. suis*. Methods Drug sensitive test were carried by K-B; attack test were carried on rabbit and rat by *S. suis*; Study of homogeneity were carried through by Thalli fatty acid profile analysis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. Results *S. suis* from human and swine were sensitive to potassium penicillin, chloramphenicol, cefradine, cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, rocephin, vancomycin, ampicillin, erythromycin, but not sensitive to tetracycline and streptomycin. Rat was not sensitive to the strains, but rabbit was sensitive and went die after inoculated with *S. suis*. Thalli fatty acid profile analysis and randomly amplified polymorphic DNA analysis showed: the relationship among the strains were close, so between the strains and reference *S. suis* serotype 2, but the relationship between the strains and other 7 kinds of streptococcus, such as *S. sanguis*, *S. Agalactiae* etc, and with enterococcus were far. Conclusion All the strains of *S. suis* from human and swine are confirmed to be *S. suis* serotype 2, there pathogenicity are strong, homogeneity exist among *S. suis* from human and swine.

KEY WORDS: *S. suis* serotype 2, Animal attack test, Thalli fatty acid profile, Randomly amplified polymorphic DNA assay

中图分类号: R378⁺2 文献标识码: A

1998年7月下旬8月上旬,江苏海安、如皋等地发生了几十例原因不明的“急性中毒性休克性综合征”病人,死亡14例,与之同时,当地也发生了数万头生猪死亡^[1]。疫情发生后从病人的血液、脑脊液和病死猪的无菌部位组织中分离到链球菌,经生长特性和染色形态观察、API 20 Strept 生化试验和血清凝集试验证实该菌为猪链球菌 2 型。为了进一步鉴定菌株、分析该菌致病力的特征,评价人源和猪源菌株之间的同源性,对分离的菌株进行了深入研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 从4例病人血液、1例病人脑脊液以及7头病死猪的内脏(肝、脾、淋巴结等)中共分离到12株链球菌,经 API 20 Strept 生化条和血清凝集试验,初步鉴定此12株链球菌为猪链球菌 2 型。

1.2 药敏试验 K-B 琼脂扩散法。M-H 琼脂、质控菌株 ATCC49619、ATCC25922、ATCC25923、ATCC27853 和青霉素钾、氯霉素、头孢拉定、头孢唑新、头孢三嗪、头孢噻甲羧肟、菌必治、万古霉素、氨

作者单位:江苏省疾病预防控制中心(南京,210009)

苜青霉素、红霉素、四环素和链霉素等 12 种抗生素药敏纸片均购自中国药品生物制品鉴定所。

1.3 动物攻击试验 昆明小白鼠(18~20g、雄性)15只,随机分5组,每组3只,3组接种被测猪链球菌,1组接种 ATCC25922,1组注射生理盐水做对照。家兔(2kg左右)5只,3只接种测试菌,2只对照。方法:取细菌 18h 培养物制备成含量为 10^8 个/ml(比浊法)的菌悬液,分别注射家兔和小白鼠的腹腔,剂量小鼠为 0.1ml/只、家兔为 1.0ml/只。观察动物接种后的反应,连续观察 5d,对死亡的动物及时解剖,观察其内脏病理变化并对病变的内脏组织进行细菌培养。

1.4 菌体脂肪酸分析^[2,3] 取冷冻干燥的菌粉 5mg,加 5%氢氧化钠甲醇溶液 100 30min,然后冷却至室温,加 6mol/L 盐酸酸化至 pH2,加 14%三氟化硼甲醇溶液 4ml,用 10mol 氯仿-己烷(1:4)萃取,提取液加 Na_2SO_4 1g,用干燥氮气吹干提取液,加正己烷 100ml,每次取 2 μ l,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。对菌株的菌体膜脂肪酸构成指标及该系统内存的牛链球菌、唾液链球菌、化浓链球菌、血链球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、*S. mutans* 链球菌等 7 株链球菌及肠球菌的数据,进行聚类分析和主成分分析。

1.5 随机 DNA 基因扩增

1.5.1 引物 采用北京北方同正公司的 OPB3、OPB8、OPB10、OPB12、OPB13、OPB14 等 6 条 OP 类引物以及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的 REP1、REP2、ERIC1、ERIC2 等 4 条引物共组成 10 条引物作为进行随机 DNA 基因扩增用引物。

1.5.2 方法 参见文献^[4]。引物各 1 μ l、PCR buffer 3 μ l、Tap DNA 聚合酶 2U、dNTP (2mmol) 1 μ l、加 H_2O 至 30 μ l,混匀后,于下列条件扩增:90 预变性 3min,94 变性 40s,35 复性 40s,72 延伸 1min,共 45 个循环,最后一循环后于 72 延伸 7min,扩增引物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.3 结果分析 用 RAPD 读取数据,phylic 程序进行聚类分析,Treeview 软件生成聚类图。

2 结果

2.1 药敏试验 从人和猪分离到的 12 株猪链球菌株均对青霉素钾、氯霉素、头孢类(头孢拉定、头孢唑新、头孢三嗪、头孢噻甲羧胺)、菌必治、万古霉素、氨苄青霉素、红霉素敏感,对四环素、链霉素不敏感。

2.2 动物攻击试验 5 组小白鼠对人源和猪源的菌

株均无反应。3 只接种测试菌的 1 只家兔在接种后 10h 死亡,1 只在接种后 11.5h 时死亡,另 1 只无反应。2 只死亡家兔在死亡前 1~2h 反应迟缓,死前剧烈挣扎、抽搐,很快死亡。病理所见肝、脾肿大、瘀血和肺部出血,1 只死兔小肠严重肿胀,肠壁变薄,另一只肿胀不明显;并从 2 只死亡兔的肝、肾和胸腔血中检测到与接种菌株相同的链球菌。

2.3 菌体脂肪酸分析 选用分离自病人血液 2 株、分离自病人脑脊液 1 株及分离病死猪内脏的 3 株共计 6 株猪链球菌及猪链球菌 2 型参考株进行菌体膜脂肪酸分析,并与菌体脂肪酸自动化分析系统库内存的 7 种链球菌及肠球菌的有关数据进行聚类分析和主成分分析。聚类分析提示:6 株被测猪链球菌和猪链球菌 2 型参考株属于同一类,且距离很近;牛链球菌、唾液链球菌、血链球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、*S. mutans* 链球菌属及肠球菌于另外二类;猪链球菌与另二类链球菌距离较远。主成分分析提示,被测 6 株猪链球菌和猪链球菌 2 型的参考菌株聚在一起,与其它 7 种链球菌和肠球菌相差甚远,与聚类分析结果一致。

2.4 随机 DNA 基因扩增分析 7 株被测菌株、猪链球菌 2 型参考菌株与 2 株肠球菌,经 6 条 OP 类引物的逐个引物扩增,以及 ERIC1 + ERIC2、REP1 + REP2、ERPC1 + REP1 和 ERPC1 + REP2 的混合扩增后,经 RAPD 读取数据,经 phylic 软件聚类分析,再由 Treeview 软件生成聚类图。该聚类图提示,7 种被测菌株与猪链球菌 2 型参考菌株的遗传距离很近,小于 0.1%;与肠球菌相距很远。被测各菌株间的遗传距离顺序与菌体脂肪酸分析的结果高度一致。

3 讨论

猪链球菌可引起人和动物多种多样的疾病,严重引起链球菌中毒休克综合征(STSS),并致人死亡,国外已有报道^[5~7]。这次发生在江苏的猪链球菌急性中毒性休克综合征病例病情凶险,潜伏期短,病死率高。我们对从病人血液、脑脊液和病死猪的内脏标本中分离到的病原体经形态学、生化特性、血清凝集试验及菌体脂肪酸分析鉴定这些链球菌均是猪链球菌 2 型。家兔对这些链球菌高度敏感而对小白鼠则不敏感,结果符合猪链球菌的致病力特性。药物敏感试验显示不同地区、不同来源的 12 株菌对 12 种抗生素的耐药高度一致;同时菌体脂肪酸分析和随机 DNA 基因扩增结果表明:来自人和猪的菌株与猪链球菌 2 型参考株同源。综上所述,这是一次猪链球菌 2 型引起的由猪传染给(下转第 120 页)

阳性率一般在 38.79%~51.15%,只有牙周病患者 *E. g* 阳性率可高达 67.06%。Locke 液培养法大学生 *E. g* 阳性率 (77.68%) 明显高于涂片法 (46.43%) ($\chi^2 = 23.225, P < 0.01$),提示培养法检出率比涂片法高 31.25%,因经 48h 的培养虫体已部分繁殖;其次,培养的虫体多数活动呈带状、舌状或不规则形状,易于识别,因此提高了检出率。同是用培养法,对大学生与中专生的 *E. g* 感染率进行比较,大学生的 *E. g* 阳性率 77.68% (87/112) 较中专生 53.49% (46/86) 高 ($\chi^2 = 12.909, P < 0.01$),提示 *E. g* 的阳性率随年龄的增长而升高,其原因可能与接触感染机会增多有关。培养法 *E. g* 的培养液 Locke 液配制简单,进行人群流行病学调查时可批量取样带回实验室于 35℃ 培养 2~4d 后再检查,检查时间灵活,且检出率高;特别是教学上观察阿米巴运动,提前 2d 在学生中取样培养,至少有 50% 以上的阳性率,可供示教;也可把阳性标本转种到改良的 LES 培养基内培养,供研究用。

E. g 生长在龈沟、牙垢或患者的牙周袋内,靠口腔中的细菌分解残留在口腔中的食物而获得营养,在有菌的培养液中 *E. g* 靠液中细菌分解米粉,通过胞吞作用获得固态营养物质。通过电镜观察发现虫体的食物泡中常含有许多细菌,提示细菌可成为 *E. g* 的营养物,且某些细菌的存在可营造有利 *E. g*

生长的理化环境,可见 *E. g* 生长与细菌间起着协同作用。在 14 株 *E. g* 培养液中分离出 12 种细菌, FJ₁₋₅ 虫株,每 4d 转种一次,可存活 6~48 个月,分离的细菌主要有产气肠杆菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌,与分别加入 *E. g* 培养管中,最有利于促进 *E. g* 生长、繁殖的细菌试验结果相一致(表 2),并发现有 *E. g* 生长的培养液表面一定有一层菌膜; FJ₆₋₈ 株因培养液中少细菌,加入了产气肠杆菌使虫体存活 1~5 个月; FJ₉ 虫株虽分离出斯氏假单胞菌和肺炎克雷伯菌,但培养液不利细菌生长,菌少,培养液表面无菌膜可见,虫体仅活 8d; FJ₁₀₋₁₄ 虫株培养液,无菌生长,培养液表面更无菌膜形成,虫体仅 4d 便消失。Gannon 等报道培养 *E. g* 的 4 株共生菌中,小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 能分解培养基中的米粉为虫体所利用,促进虫体生长。Gannon 的 *E. g* 培养基成分含有胃粘蛋白和酪蛋白胰酶水解物,与我们采用的改良的 LES 培养基成分不同,可适宜不同细菌的生长。

上述试验提示,采用简易制备的含 20% 小牛血清 Locke 液进行培养检查,可提高 *E. g* 的检出率;在改良的 LES 培养基中加入适量的产气肠杆菌、铜绿假单胞菌或大肠埃希菌,可提高 *E. g* 培养的成功率和存活时间。

2001 年 5 月 27 日收稿 2001 年 8 月 14 日修回

(上接第 93 页)人的人-猪共患疾病,经检索国内尚无由猪链球菌引起人感染发病的报道。

本次分离的猪链球菌,刚分离时细菌形态为典型的革兰氏阳性链球菌,二代培养后细菌染色形态发生很大变化,不典型,变为革兰氏阴性,不成链,菌株很难鉴定,这些菌株一度曾被误鉴定为血链球菌^[8]。因此对这些菌株进一步鉴定和分子生物学特征分析很有必要。菌体脂肪酸分析:6 株被测菌株与猪链球菌 2 型参考菌株脂肪酸成份高度一致,与 7 株其它标准链球菌相差甚远。随机 DNA 基因扩增分析提示:7 株被测菌株与猪链球菌 2 型标准菌株的遗传距离很近,变异度均小于 0.1%。说明人源和猪源菌高度同源,人源和猪源链球菌的药敏结果的高度一致也佐证了这一点。

(感谢姚火春、宋亚军、王广和同志对本工作的支持)

4 参考文献

- 胡晓抒,朱凤才,汪华,等.人-猪链球菌感染性综合征研究[J].中华预防医学杂志,2000,34(3):150.
- 朱厚基,周方,唐光江,等.细胞脂肪酸气相色谱鉴别细菌的研究[J].中华微生物学报,1987,27(2):95.
- 周方,朱厚基,唐光江,等.全细胞脂肪酸气相色谱法鉴别莫拉氏和军团杆菌[J].中国科学(B辑),1986,10:1051.
- Chatellier S, Gottchalk M, Higgins R, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2):362.
- Gener W, Bialek B. Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir worker [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989, 8(4):306.
- Leelarascme A, Hilakul C, Tien GS. *Streptococcus suis* toxic-shock syndrome and meningitis [J]. J Med Assoc Thai, 1997, 80(1):63.
- 姜淑贤,尚德秋.链球菌中毒休克综合征和超抗原[J].中国公共卫生,1996,12(2):92.
- 王广和,王坚,沈艳云,等.人、猪血液链球菌研究报告[J].中国人兽共患病杂志,1999,(4):143.

2001 年 7 月 3 日收稿 2001 年 9 月 7 日修回