

1例猪链球菌5型感染者分离菌的病原学诊断、分型及相关基因的检测

李曲文^{1,2,3},罗宏活⁴,黄梦颖^{1,2},谢芳钦^{1,2},林震宇^{1,2},徐海滨^{1,2},翁顺太^{1,2}

摘要:目的 对来自人感染猪链球菌患者血培养的分离株进行病原学分离鉴定,了解该菌株分子生物学特征,提供分子流行病学依据。**方法** 通过常规分离培养、生化鉴定、质谱检测分析、病原诊断基因及相关毒力基因检测和多位点序列分型技术(multi locus sequence typing, MLST)分析。**结果** 菌株为猪链球菌血清型5型,毒力基因携带模式为mrp+/ef-/sly+/gdh+/gapdh+/fbps-/orf2-, MLST分型为ST373,该分离株对氯霉素和四环素耐药。**结论** 猪链球菌血清型5型也可以引起人感染,可通过相关的分离培养鉴定以及相关的病原学基因进行快速诊断和流行病学研究。

关键词:猪链球菌;血清型5型;分子检测

中图分类号:R378.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2021)04-0346-05

Etiological diagnosis, typing, and detection of related genes in isolates from a case of *Streptococcus suis* type 5 infection

LI Qu-wen^{1,2,3}, LUO Hong-huo⁴, HUANG Meng-ying^{1,2}, XIE Fang-qin^{1,2},
LIN Zhen-yu^{1,2}, XU Hai-bin^{1,2}, WENG Shun-tai^{1,2}

(1. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian Key Laboratory of Zoonosis, Fuzhou 350001, China;

3. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

4. Sanming Center for Disease Control and Prevention, Sanming 365000, China)

Abstract: This study aimed to isolate and identify the pathogen from the blood culture of a person infected with *Streptococcus suis* 5, to understand the molecular biological characteristics of the strain, and to provide a basis for molecular epidemiology. We performed routine isolation and culture, biochemical identification, mass spectrometry analysis, detection of pathogen diagnostic genes and virulence-related genes, and multi locus sequence typing analysis. The strain was found to be *Streptococcus suis* serotype 5, the virulence gene carrying pattern was mrp+/ef-/sly+/gdh+/gapdh+/fbps-/orf2-, the MLST type was ST373, and the strain was resistant to chloramphenicol and tetracycline. Thus, *Streptococcus suis* serotype 5 can cause human infection and can be rapidly diagnosed through isolation, culture, and identification of related pathogenic genes.

Keywords: *Streptococcus suis*; serotype 5; molecular detection

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2019J01093), Construction Project of Fujian Institute of Preventive Medicine (No. 2019Y2001)

福建省自然科学基金科技项目(No.2019J01093),福建省预防医学研究院建设(No.2019Y2001)

第一作者:李曲文,Email:lqw0043@163.com;

ORCID: 0000-0002-6145-858X

作者单位:1.福建省疾病预防控制中心,福州 350001;

2.福建省人兽共患病研究重点实验室,福州 350001;

3.福建医科大学公共卫生学院教学实习基地,福州 350001;

4.三明市疾病预防控制中心,三明 365000

猪链球菌最早见于荷兰(1951)和英国(1954)报道,是一种能引起猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症和肺炎的病原菌,并可以引起人的感染,是一种呈世界广泛分布的人兽共患病^[1]。猪链球菌根据荚膜多糖抗原的不同共分为33个血清型。在猪和人体以猪链球菌血清型2型最常被分离到且是致病力最强,不同的血清型也不断的被发现可以引起人的感染,如血清1/2、7、9、14、31等也能引起人猪

链球菌感染^[2]。本文通过实验室诊断对1例猪链球菌5型的病例进行诊断及分子分型分析,阐述如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 菌株分离来自福建三明邓某某血液培养分离菌株。

1.2 主要试剂和仪器 血平板、VITEK2全自动微生物分析系统、GP卡、革兰染色液购自广东环凯公司,α-氰基-4-羟基肉桂酸基质(HCCA)购自德国Bruker公司,甲酸、乙腈和三氟乙酸购自美国Sigma公司。分子生物学试剂购自TaKaRa宝生物工程有限公司,引物序列及测序均由铂尚生物技术有限公司完成,MALDI-TOF MS-Microflex TM LT型(德国Bruker公司)。

1.3 方法 通过血培养分离可疑菌株,并对分离菌株进行涂片革兰染色镜检及常规的生化鉴定以及常规PCR鉴定猪链球菌属基因(16S rRNA)、猪链球菌33(1~31型,33型,1/2型)种血清型基因鉴定;猪链球菌毒力相关的谷氨酸脱氢酶(gdh)、溶菌酶释放蛋白(mrp)、胞外因子(ef)、溶血素(sly)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapdh)、纤连蛋白/血纤蛋白原结合蛋白(fbps)及毒力相关序列(orf2)等基因、质谱鉴定等等。MLST分型用PCR扩增aroA、cpn60、dpr、gki、mutS、recA、thrA,PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳后测序。序列经提交MLST网站(<http://pubmlst.org/ssuis/>),确定序列分型(SequenceType,ST)型别,各基因引物序列见表1、表2,参考文献[3-5]。

表1 猪链球菌基因检测引物

Tab.1 Primers for gene detection of *Streptococcus suis*

Gene	Sequences(5'-3')	Tm/°C	bp	Gene	Sequences(5'-3')	Tm/°C	bp
16S rRNA-F	CAGTATTACCGCATGGTAGATAT	60	328	cps20-F	TAATCGTTGCCTTGAGCAT	51	938
16S rRNA-R	GTAAGATAACCGTCAAGTGAGAA			cps20-R	CGCTATATAAGGAAACCTCGG		
cps-1J-F	GGCGGTCTAGCAGATGCTCG	55	442	cps21-F	GGTGGCAAGGAGAGCAAAGT	57	325
cps-1J-R	GCGAACTAGTTAGCAATGAC			cps21-R	ACATGGTAAGGCCATTGCTGGA		
cpsJ 1/2-F	GATTGTCGGGAGGGTTACTTG	61	450	cps22-F	AGGATCGGTAAGTTAGGTACA	53	158
cpsJ 1/2-R	TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC			cps22-R	ATGCAGTAAAACACGAAAACAA		
cps3-F	TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA	63	1 273	cps23-F	TGCTCAACAAACGCAGCAA	53	454
cps3-R	ACCCCCAGAAGAGCCGAAGGA			cps23-R	TGACTGGTACATCTGCAGCC		
cps4-F	ACTTGGAGTTGTCGGAGTAGTGCT	61	783	cps24-F	ACCCGGAAAAACCAGGAGTT	55	500
cps4-R	ACCGCGATGGATAGGCCGAC			cps24-R	ACCAATCAATGCCAAGCGAC		
cps5-F	TGATGGCGGAGTTGGGTCGC	63	166	cps25-F	GGAGGAGCTGCGGGCTCATA	61	1 211
cps5-R	CGTAAACAACGCCAGCCG			cps25-R	TGGCCACAACCTGGATGCGTT		
cps6-F	TACGGTCTCCCTTGCCTGTA	57	325	cps26-F	CAAAATTCCCTGGATTAACGCTT	55	315
cps6-R	AACTCAGCTAGTGCTCCACG			cps26-R	CGATCTGAGGACTTATCAAGAA		
cps7-F	AGCTCTAACACGAAATAAGGC	56	251	cps27-F	CTACGCCAATCGAAGCCAGA	57	506
cps7-R	GTCAAACACCCCTGGATAGCCG			cps27-R	CCAGTAAGAAGCCTGTCGCA		
cps8-F	ATGGCGTTGGCGGGAGTT	59	320	cps28-F	GGACTTCGGTACCTTAGCGT	57	865
cps8-R	TTACGGCCCCCATCACGCTG			cps28-R	CTCCAGCACATTCCGTACC		
cps9-F	GGGCCACTCAATCAGAGC	56	507	cps29-F	GTGCGGGCGTTATTTTGGT	55	435
cps9-R	CATCCCATTCCAACACG			cps29-R	AGCCTTGCAACCCATTTCCT		
cps10-F	TTACGAGGGGATTCTGGGT	57	153	cps30-F	CTTTAATTGCTTGCAGCCCGT	55	170
cps10-R	CGGGACAACAGATGGAACCT			cps30-R	ATTGGGCTACCCATTGCA		
cps11-F	TACAGTGCTTGCAGCCCTAC	55	896	cps31-F	GGAGTGCTCTATGCCACCTT	57	550
cps11-R	CGACTTGTGCGCCCTGAT			cps31-R	GCATTGCCCTACAGCAAAC		
cps12-F	TGTGGCGATAGGACAACAGG	55	209	cps33-F	GAGTTGCGACCTATTATTCTCA	55	731
cps12-R	ACCAAGAAGTTCCGCCTGA			cps33-R	GAATTGAACAACGACTGCAATA		

表 1(续)

Gene	Sequences(5'-3')	Tm/℃	bp	Gene	Sequences(5'-3')	Tm/℃	bp
<i>cpsl3-F</i>	CTGGTGCTGCAATTTCGCTT	53	1 135	<i>ef-F</i>	GCTACGACGCCCTCAGAAATC	56	626
<i>cps13-R</i>	GCAGACTAGCTGCAGTTCCA			<i>ef-R</i>	TGGATCAACCCTGGGTGTTAC		
<i>cps14-F</i>	AATCATGGAATAAGCGGAGTACAG	65	550	<i>mrp-F</i>	CAGATGTGGACCGTAGACC	56	316
<i>cps14-R</i>	ACAATTGATACGTCAAAATCCTCAC			<i>mrp-R</i>	GGATAATCACCAGCAGGAA		
<i>cpsl5-F</i>	GCAAGAAAGCTCCGGATGGA	57	274	<i>sly-F</i>	GCAGAAGGGACAACGTAGAAG	56	443
<i>cpsl5-R</i>	CAAGAGAGTGTGCAACCCCA			<i>sly-R</i>	GGACTGCTATTATGGACTGTTGA		
<i>cpsl6-F</i>	TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT	69	202	<i>gdh-F</i>	GCAGCGTATTCTGTCAAACG	56	688
<i>cpsl6-R</i>	TTTGTGCTGGAATCTCAGGCACC			<i>gdh-R</i>	CCATGGACAGATAA AGATGG		
<i>cpsl7-F</i>	ACTTGGGTTGGAATGGCGAA	55	906	<i>gapdh-F</i>	CAGTCAAAGCCGCAACC	56	571
<i>cpsl7-R</i>	ACCACCGAAAGTCAGGTAC			<i>gapdh-R</i>	CCACCGAAGCCAAGAGGT		
<i>cpsl8-F</i>	CGGGGCAGTCTTACTCATGG	55	432	<i>fbps-F</i>	CAAGGTTGGTCGGATA	56	720
<i>cpsl8-R</i>	ATGACAGCGAACCGACAGA			<i>fbps-R</i>	CCCGTCTGTTGCCAAGTAA		
<i>cpsl9-F</i>	AGCAGGGTTGCGTATGGCGG	61	1 024	<i>orf2-F</i>	CAAGTGTATGTGGATGGG	56	858
<i>cpsl9-R</i>	ACAAGCACCAGCAAAGACCGCA			<i>orf2-R</i>	ATCCAGTTGACACGTGCA		

表 2 7个管家基因引物

Tab.2 Primers for seven housekeeping genes

Gene	Sequences(5'-3')	Tm/℃	bp
<i>aroA-F</i>	TTC CAT GTG CTT GAG TCG CTA	55	482
<i>aroA-R</i>	ACG TGA CCT ACC TCC GTT GAC		
<i>cpn60-F</i>	TTG AAA AAC GTR ACK GCA GGT GC	52	466
<i>cpn60-R</i>	ACG TTG AAI GTA CCA CGA ATC		
<i>dpr-F</i>	CGT CTT TCA GCC CGC GTC CA	50	434
<i>dpr-R</i>	GAC CAA GTT CTG CCT GCA GC		
<i>gki-F</i>	GGA GCC TAT AAC CTC AAC TGG	55	480
<i>gki-R</i>	AAG AAC GAT GTA GGC AGG ATT		
<i>mutS-F</i>	CGC AGA GCA GAT GGA AGA TCC	40	526
<i>mutS-R</i>	CCC ATA GCT GTT TTG GTT TCA TC		
<i>recA-F</i>	TAT GAT GAG TCA GGC CAT G	50	398
<i>recA-R</i>	CGC TTA GCA TTT TCA GAA CC		
<i>thrA-F</i>	GAT TCA GAA CGT CGC TTT GT	52	523
<i>thrA-R</i>	AAG TTT TCA TAG AGG TCA GC		

2 结 果

2.1 革兰染色结果 革兰阳性球菌

2.2 生化鉴定 VITEK2 GP 卡, 89% 为猪链球菌 1 型/87% 猪链球菌 2 型。

2.3 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF- MS) 鉴定结果; 鉴定分值 (ScoreValue) 为 2.03(极好的鉴定为猪链球菌)。质谱峰图见图 1。

2.4 药敏实验结果 对氨苄西林、氨苄青霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、利奈唑胺、万古霉

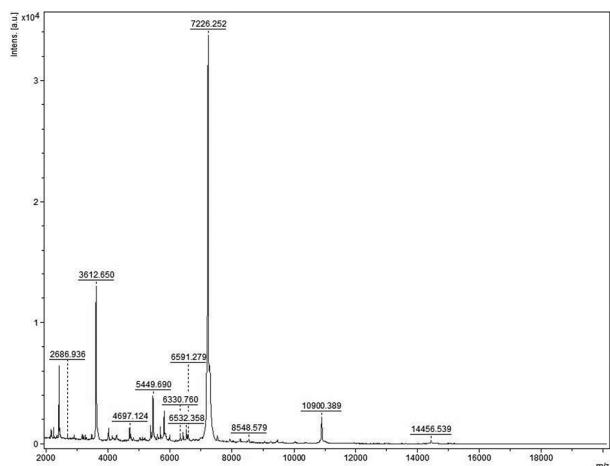


图 1 质谱峰形图

Fig.1 Peak shapes of the mass spectrum

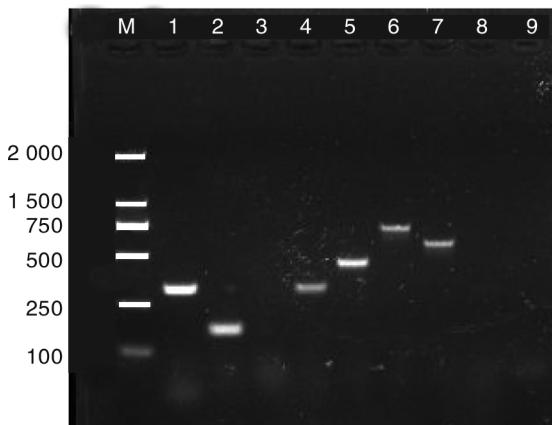
M: DL2000; 1.16S rRNA; 2. *cps5*; 3. *ef*; 4. *mrp*; 5. *sly*; 6. *gdh*; 7. *gapdh*; 8. *fbps*; 9. *orf2*

图 2 猪链球菌的检测电泳图

Fig.2 Electropherogram of *Streptococcus suis* detection

素、替加环素等抗生素体外药敏实验均为敏感;而对氯霉素和四环素两种药物显示为耐药。

2.5 猪链球菌相关基因及毒力基因鉴定结果 菌株猪链球菌相关基因鉴定结果:16S rRNA(+)cps5(+),并经与NCBI上猪链球菌Cps5序列比对与

strain:11538序列100%相似。提示该菌株为猪链球菌血清型5型;毒力基因携带模式:*ef*(-)*mrp*(+)*sly*(+)*gdh*(+)*gapdh*(+)*fbps*(-)*orf2*(-)。电泳结果见图2、3。

TPA_inf: Streptococcus suis DNA, capsular polysaccharide locus, serotype: 5, strain: 11538

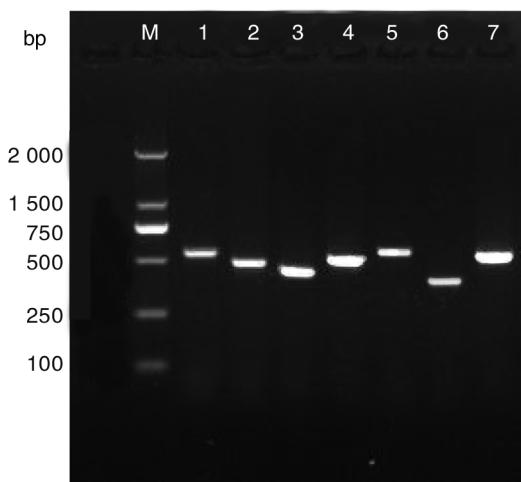
Sequence ID: BR001003.1 Length: 29176 Number of Matches: 1

Range 1: 15637 to 15802 GenBank Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score 307 bits(166)	Expect 1e-79	Identities 166/166(100%)	Gaps 0/166(0%)	Strand Plus/Plus	
Query 2	TGATGGCGGAGTTGGCTCGCTGTTATTAGTGGAAATCAGGAATTGACCTGTTGA			61	
Sbjct 15637	TGATGGCGGAGTTGGCTCGCTGTTATTAGTGGAAATCAGGAATTGACCTGTTGA			15696	
Query 62	TAGAGTTAAAATTGGTCTAACGTCATATCGGCGTCAATGCTATCATACTGCCAGGAGT			121	
Sbjct 15697	TAGAGTTAAAATTGGTCTAACGTCATATCGGCGTCAATGCTATCATACTGCCAGGAGT			15756	
Query 122	AACCATAAGGAAATAATTGTATTATTGGCGGCTGGGGGGTTGTTACG			167	
Sbjct 15757	AACCATAAGGAAATAATTGTATTATTGGCGGCTGGGGGGTTGTTACG			15802	

图3 Cps5序列比对结果

Fig.3 Cps5 sequence alignment results

2.6 MLST结果 *aroA-cpn60-dpr-gki-mutS-reca-thrA*基因等位基因谱为8-30-5-45-44-22-109,经比对序列分型,型别为ST373。7个基因电泳结果见图4。



M:DL2000;1:*aroA*;2:*cpn60*;3:*dpr*;4:*gki*;5:*mutS*;6:*recA*;7:*thrA*

图4 MLST电泳图

Fig.4 Electropherogram of MLST

3 讨论

猪链球菌是一种可以从猪传染人的病原体,主要通过皮肤伤口感染。虽然猪链球菌有33个血清

型,但并不是所有的血清型都能引起人的感染,2型是最常见的致病血清型,也是我国主要的流行菌株,但其他血清型如1,1/2,7,9,31等均有陆续的报道人感染猪链球菌^[6-8]。对菌株的快速、准确鉴定以及相关的分子诊断分析对于疫情处置和临床诊疗具有重要的临床意义。

如何快速的对分离株的鉴定是实验室首要任务,通过传统的细菌常规分离培养、生化鉴定该菌株为阳性链球菌,VITEK 2-compact分析系统是近年来由梅里埃研发的可简便、快速鉴定猪链球菌的一种方法。本文中分离到的菌株通过VITEK 2-GP生化鉴定提示89%为猪链球菌1型/87%猪链球菌2型,为进一步验证鉴定结果,经MALDI-TOF-MS质谱鉴定其鉴定分值为2.03,极好的鉴定结果判定为猪链球菌属。为进一步了解菌株所属的血清基因型别,因血清凝集实验经常会出现血清交叉凝集现象,故而本实验直接经常规PCR进行猪链球菌属基因(16S rRNA)及以聚合酶链反应(PCR)为基础的荚膜分型糖(CPS)对猪链球菌的33(1~31型,33型,1/2型)种血清型基因分型结果为16S rRNA阳性,CPS5阳性,判断为猪链球菌血清型5。

为了解福建省首次分离到的这一株猪链球菌5型病例菌株的致病性,分析了*ef*、*mrp*、*sly*、*gdh*、*gapdh*、*fbps*、*orf2*等毒力基因。由于不同的毒力基因编码的蛋白具有不同的功能,*mrp*基因是编码

胞外因子的有助于细菌突破血脑屏障,而 *ef* 是一种粘附素,能黏附上皮细胞并诱导上皮细胞融合和凋亡,MRP 和 EF 是判断猪链球菌其毒力强弱的重要毒力因子,本次分离到的菌株为 *mrp*+/*ef*-/,表明该菌株为弱毒株;*sly* 基因编码的溶血素是具有溶血活性且可破坏微血管内皮细胞和上皮细胞,有利于细菌在组织中的侵袭扩散,同时谷氨酸脱氢酶(GDH)是细菌能量代谢的一个重要分子,也是诊断猪链球菌感染的一个重要诊断因子和具有免疫保护抗原。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是一种糖酵分解反应酶,具有增强细胞骨架结构、促进细菌与宿主细胞之间的信号转导作用^[8-9],*sly*+/*gdh*+/*gapdh*+3个基因均为阳性表明菌株具有在感染组织内侵袭并导致宿主的致病性。而 *fbps* 基因表达的是纤连蛋白和血纤蛋白原的结合蛋白(*fbps*),*fbps* 参与细菌粘附、定植和感染的重要基础^[10],毒力相关序列 *orf2* 在强弱毒株之间的序列存在差异,这两个基因均为阴性,这种差异可能与菌株致病性有关^[11]。不同菌株的毒力基因携带模式并不一定相同,此次血培养分离株猪链球菌毒力基因携带模式:*mrp*+/*ef*-/*sly*+/*gdh*+/*gapdh*+/*fbps*-/*orf2*- ,与实验室以往分离的猪链球菌 2 型菌株具有一定的差异性,需要进一步的分析及今后的动物实验以验证毒力基因跟致病性的相关性。

本研究同时还对猪链球菌的 7 个管家基因(*aroA-cpn60-dpr-gki-mutS-recA-thrA*)进行分析,经提交网站(<http://pubmlst.org/ssuis/>)分析得出该菌株的等位基因谱为 8-30-5-45-44-22-109,序列分型为 ST373 型别。人感染猪链球菌血清型 5 型报道比较少,在泰国、瑞典、美国、日本曾有报道过,但此次分离菌株的 MLST 型别为 ST373,与泰国分离 ST181 和日本 ST752 型别不一样,非同一来源菌株^[10-12],且也不是我国分离株常见的 ST7 型或者 ST1 型,应该引起我们今后工作中的重视。同时为了解该猪链球菌 5 型菌株的药物敏感情况,通过体外药敏实验提示对氯霉素和四环素耐药,对氨苄西林、氨苄青霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、利奈唑胺、万古霉素、替加环素等药物为敏感,与文献报道的其他猪链球菌耐药结果基本一致^[13-16]。

综上所述,福建省此次分离到的猪链球菌血清型 5 型,也提示了 5 型也可以引起人体感染,应加以重视。虽然生化鉴定及质谱分析均能鉴定到猪链球菌属,但如需要进一步分析到血清型,可采取 PCR 方法对荚膜分型糖(CPS)进行血清型基因鉴定,并

可测定相关的毒力基因判断强弱毒株,同时由于 MLST 方法可以快速实现互联网共享,可用于对猪链球菌 5 型的分子流行病学分析。

利益冲突:无

引用本文格式:李曲文,罗宏活,黄梦颖,等.1例猪链球菌 5 型感染者分离菌的病原学诊断、分型及相关基因的检测[J].中国人兽共患病学报,37(4):346-350,361. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.034

参考文献:

- [1] 纪少博,白雪梅,刘凯,等. 我国不同地区健康猪猪链球菌检出率调查[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(5):423-426.DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2013.05.001
- [2] Li Q, Zhang Y, Dechao D, et al. Characterization and functional analysis of PnuC that is involved in the oxidative stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype[J]. Veterinary Microbiology, 2018,216:198-206.DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.013
- [3] 张纯瑶,解倩倩,宋子杰,等.猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2019,1(1):69-72.DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.12.0133
- [4] 孙珂,倪艳秀,祝昊丹,等.猪链球菌 4 型分离株生物学特性研究[J].中国畜牧兽医,2019,46(1):80-88.DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.01.010
- [5] Kerdsin A, Akeda Y, Takeuchi D, et al. Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018,37(5):917-925. DOI: 10.1007/s10096-018-3208-8
- [6] 王淑杰,段贵鑫,刘永刚,等.一株血清 31 型猪链球菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国预防兽医学报,2018,40(4):347-349.DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.201705005
- [7] 袁芳艳,谭臣,雷丽,等.猪链球菌 2 型毒力因子 *gapdh* 基因的克隆表达及与 Hela 细胞互作蛋白的筛选[J].安徽农业科学,2014,42(36):12821-12824.DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2014.36.010
- [8] Kaicheng W, Zongfu W, Huochun Y, et al. Identification and detection of serotype-specific genes; Effective serotyping of Streptococcus[J]. Cur Clin Microbiol Reports, 2017,4(1):29-35.DOI: 10.1007/s40588-017-0055-9
- [9] Daisuke Taniyama, Mayu Sakuraia, Tetsuya Sakaia, et al. Human case of bacteremia due to *Streptococcus suis* serotype 5 in Japan: the first report and literature review[J]. IDCases, 2016,6:36-38. DOI: 10.1016/j.idcr.2016.09.011
- [10] Kerdsin A, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, et al. Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand[J]. Lancet, 2011, 378:960.DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60923-9
- [11] Gustavsson C, Rasmussen M. Septic arthritis caused by *Streptococcus suis* serotype 5 in pig farmer[J]. Emerg Infect Dis, 2014,20:489-490.DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2014.08.002

(下转第 361 页)