

屠宰生猪体内猪链球菌 2 型带菌情况调查

黄绍谦, 俞伏松, 方勤美, 郭长铭, 朱继昌, 林天龙

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘 要: 应用猪链球菌 2 型定型 PCR 方法, 对从福建省 3 个屠宰场采集的临床健康的生猪鼻咽拭子样本共 121 份进行了检测, 同时对阳性样本进行了细菌分离鉴定及毒力基因检测。结果显示: 121 份样本中有 17 份为阳性, 检出率为 14.0% (17/121), 其中福州地区检出率为 10.9% (7/64), 宁德地区检出率为 11.8% (4/34), 莆田地区检出率为 26.1% (6/23)。3 株分离菌 *cps2J* 基因 PCR 特异性扩增产物大小均为 675 bp, 其核苷酸序列与 Genbank 中猪链球菌 2 型参考菌株的同源性高达 98%~100%, 毒力基因型为 *gdh*⁺/*cps2J*⁺/*mrp*⁺/*ef*⁻/*sly*⁻/*fbps*⁺/*orf2*⁺。调查结果表明, 福建省福州、宁德、莆田等地区生猪群中均存在猪链球菌 2 型携带者, 所分离到的 3 个猪链球菌 2 型菌株其毒力基因型为新的基因型。

关键词: 猪链球菌 2 型; PCR; 带菌情况

中图分类号: S 858.28

文献标识码: A

Carriers of *Streptococcus suis* type 2 among slaughtered pigs in Fujian

HUANG Shao-qian, YU Fu-song, FANG Qin-mei, GUO Chang-ming, ZHU Ji-chang, LIN Tian-long

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: One-hundred-twenty-one nasopharyngeal swab samples of slaughtered, clinically healthy pigs from 3 slaughter houses in different areas of Fujian were collected for isolation of *Streptococcus suis* type 2 (SS2) and detection of the virulence genotype with specific PCR. The results showed a total positive rate of SS2 of 14.0% (17/121) among the pigs sampled. The positive rates in Fuzhou, Ningde and Putian were 10.9% (7/64), 11.8% (4/34) and 26.1% (6/23), respectively. The PCR amplified products of the *cps2J* gene from 3 isolates were all 675bp in size. The *cps2J* gene nucleotide homology between the isolates and the SS2 strain, as published in Genbank, ranged from 98%—100%. The virulence genotypes of the 3 isolates were all *gdh*⁺/*cps2J*⁺/*mrp*⁺/*ef*⁻/*sly*⁻/*fbps*⁺/*orf2*⁺. The results suggested that the SS2 existed in the clinically healthy pigs in the selected areas of Fujian. The virulence genotype of the SS2 isolated in this study was not previously known.

Key words: *Streptococcus suis* type 2; PCR; prevalence

猪链球菌 2 型不仅可引起猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、肺炎、败血症和突然死亡, 还可感染相关人员并致死, 是一种重要的人畜共患病原^[1]。近些年来, 猪链球菌 2 型在我国部分地区时有暴发流行, 给养猪业和公共卫生安全造成重大危害。1998~1999 年在江苏省南通地区猪群大面积爆发猪链球菌 2 型病疫情, 造成当地 20 多人感染, 其中 10 多人因发病严重而死亡。2005 年四川省部分地区也相继爆发猪链球菌 2 型病疫情, 200 多人感染, 其中 30 多人死亡^[2]。为了解福建省生猪群中猪链球菌 2 型的携带情况, 对福建省 3 个地区屠宰场无临床症状生猪进行了猪链球菌 2 型的调查, 报

告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

猪链球菌 2 型 PFJ07 株, 分离自福建某猪场败血症的猪体内, 由本实验室分离保存。

1.2 生猪的鼻咽拭子样本采集

来源明确临床健康的生猪屠宰后用无菌棉签深入猪鼻腔和咽喉部刮取粘膜表面的粘液, 置于装有 5 mL THB 选择性培养基 (THB 液体培养基中加多粘菌素 B 至 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 蔡啉酮酸至 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的玻璃试管中, 即送实验室进行增菌培养。

收稿日期: 2009-09-17 初稿; 2009-10-19 修改稿

作者简介: 黄绍谦 (1984-), 男, 硕士, 研究方向: 动物传染病学 (E-mail: huang_shao_qian@163.com)

通讯作者: 林天龙 (1955-), 男, 研究员, 研究方向: 动物传染病学 (E-mail: lint05@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目 (2006NZ0003-2; 2006N0021; 2006F3024)

1.3 培养基及试剂

THB 液体培养基自制, chelex - 100 购自 Sigma 公司, *ExTaq* 酶、dNTP、DNA Marker (DL - 2000)、蛋白酶 K 均购自 TaKaRa 公司, 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海生物工程有限公司。

1.4 引物合成

参考倪秀艳等^[3]根据 *cps2J* 的序列设计合成引物, P1: 5' - CAAACGCAAGGAATTACGG-TATC - 3', P2: 5' - GAGTATCTAAAGAAT-GCCTATTG - 3', 预期扩增得到的基因目的片段长度为 675 bp, 由大连宝生物有限公司合成。

1.5 菌体培养

采集的样本或接种了猪链球菌 2 型的培养基置 37℃ 培养 16~18 h。

1.6 模板制备

1.6.1 煮沸法 取 1 mL 细菌培养物, 12 000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 去上清液, 沉淀用 150 μL 去离子水重悬, 并加入 3 μL (20 mg · mL⁻¹) 蛋白酶 K, 混匀, 56℃ 孵育 60 min, 100℃ 煮沸 10 min, 冰浴 3 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液做 PCR 扩增。

1.6.2 chelex - 100 改良法 取 1 mL 细菌培养物, 12 000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 去上清液, 沉淀用 150 μL 5% chelex - 100 缓冲液 (含 0.03% SDS, 1% 吐温-20, 1% NP-40) 重悬, 并加入 3 μL 蛋白酶 K (20 mg · mL⁻¹), 混匀, 56℃ 孵育 60 min, 振荡 5~10 s, 100℃ 煮沸 10 min, 冰浴 3 min, 轻轻振荡 5~10 s, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液做 PCR 扩增。

1.6.3 试剂盒法 按照试剂盒附带的说明书进行操作。

1.7 PCR 扩增及电泳鉴定

1.7.1 PCR 扩增反应体系及反应条件 反应在 PCR 仪上进行, 在 0.2 mL PCR 反应管中, 采用 20 μL 体系, 各反应成分分别为: 10×buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μL, 2.5 mM dNTP 1.6 μL, 10 μM *cps2J* 上游引物 0.5 μL, 10 μM *cps2J* 下游引物 0.5 μL, *ExTaq* 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.2 μL, 模板 2 μL, 补水至 20 μL。

反应条件: 95℃ 预变性 3 min 后进入循环, 94℃ 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。

1.7.2 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物 反应产物在 1% 琼脂糖上电泳, EB 染色, 在凝胶成像系统下拍照。

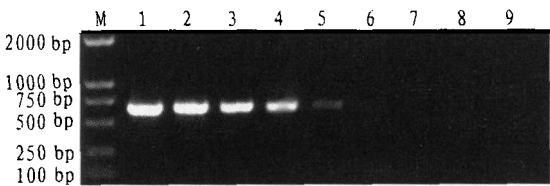
1.8 细菌分离与鉴定

挑取经 PCR 检测为猪链球菌 2 型阳性的菌液划线接种于绵羊血平板, 37℃ 培养 16~18 h, 选择性挑取 α 溶血、光滑圆形、针尖状大小菌落, 分别接种 2 mL 的脑心浸出液, 37℃ 培养 16~18 h。应用猪链球菌 2 型定型 PCR 检测各单菌落培养物。对筛选出的猪链球菌 2 型定型 PCR 阳性株进行形态学观察、PCR 鉴定、序列测定以及主要毒力基因检测试验。

2 结果与分析

2.1 模板制备方法比较

取猪链球菌 2 型菌株纯培养物, 用平板计数法确定起始浓度为 10⁸ CFU · mL⁻¹, 用培养基 1: 10 定量稀释, 浓度范围为 1 × 10⁸ ~ 1 × 10¹⁰ CFU · mL⁻¹, 分别取上述 3 种模板制备方法提取的 2 μL 模板在 20 μL 的 PCR 反应体系中扩增, 检测扩增下限。试剂盒提取法提取的模板 PCR 可检测到 1 × 10⁴ CFU · mL⁻¹ (图 1), Chelex - 100 改良法提取的模板 PCR 可检测到 1 × 10³ CFU · mL⁻¹ (图 2), 煮沸法提取的模板 PCR 可检测到 1 × 10⁴ CFU · mL⁻¹ (图 3), 由此可见, Chelex - 100 改良法的敏感性更好。



注: M - MarkerDL2000; 1 - 1 × 10⁸ CFU; 2 - 1 × 10⁷ CFU; 3 - 1 × 10⁶ CFU; 4 - 1 × 10⁵ CFU; 5 - 1 × 10⁴ CFU; 6 - 1 × 10³ CFU; 7 - 1 × 10² CFU; 8 - 1 × 10 CFU; 9 - 空白对照。(图 2、3 同)

图 1 试剂盒提取法提取的模板 PCR 的敏感性试验结果
Fig. 1 Sensitivity of PCR detection for *cps* by DNA extraction kit method

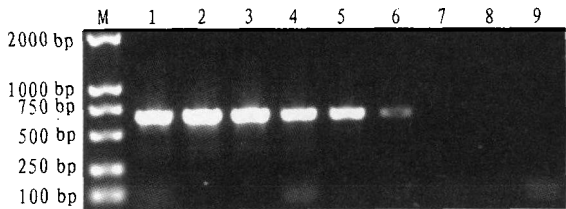


图 2 Chelex - 100 改良法提取的模板 PCR 的敏感性试验结果
Fig. 2 Sensitivity of PCR detection for *cps* by the modified Chelex - 100 method

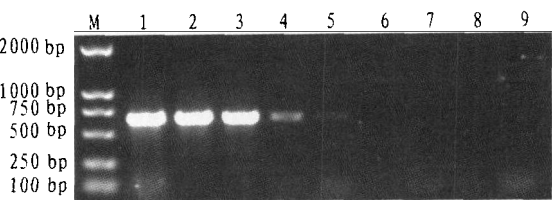


图 3 煮沸法提取的模板 PCR 的敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity of PCR detection for *cps* by immersion method

2.2 福建省 3 个地区猪链球菌 2 型的携带情况

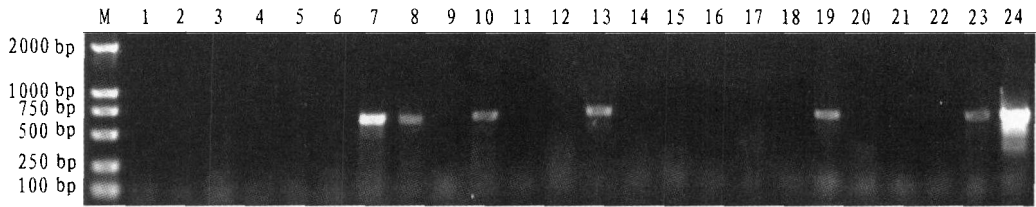
按照步骤 1.6.2 提取样本 DNA 模板，应用 PCR 方法对福建省 3 个地区 3 个屠宰场的 121 份临床健康生猪的鼻咽拭子进行猪链球菌 2 型检测（表 1）。从表 1 可以看出，3 个地区屠宰场所采集的生猪鼻咽拭子样本均有猪链球菌 2 型阳性样本，在 121 份的样本中，阳性样本 17 份，检出率为 14.0%（17/121），福州地区 64 份样本，猪链球菌

2 型阳性率为 10.9%（7/64）；宁德地区 34 份样本，猪链球菌 2 型阳性率为 11.8%（4/34）；莆田地区 23 份样本，猪链球菌 2 型阳性率为 26.1%（6/23）。对不同地区的猪链球菌 2 型阳性率进行比较，莆田地区的阳性率最高，宁德地区次之，福州地区最低。

表 1 福建省不同地区屠宰场猪鼻咽拭子猪链球菌 2 型的检测结果

Table 1 Test results of SS2 detection on nasopharyngeal swab samples from slaughtered pigs at different sites in Fujian

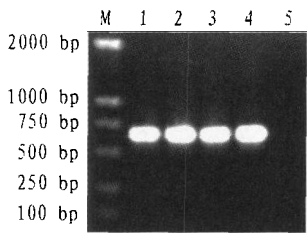
样本来源	样本总数 (份)	SS ₂ 阳性的样本数 (份)	阳性率 (%)
福州地区	64	7	10.9
莆田地区	23	6	26.1
宁德地区	34	4	11.8
总计/平均阳性率	121	17	14.0



注：M—MarkerDL2000；1~23—检测样品；24—阳性对照。

图 4 部分样品的检测结果

Fig. 4 Test results on representative samples



注：M—MarkerDL2000；1—PFJ080913；2—PFJ080942；3—PFJ080943；4—PFJ07；5—空白对照。

图 5 *cps 2J* 的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of *cps2J*

2.3 细菌分离与鉴定

分离菌的形态及培养特性符合链球菌的特点，PCR 扩增均出现长度为 675 bp 的特异性条带（图 1~图 5），其核苷酸序列与 Genbank 中猪链球菌 2 型参考菌株的同源性高达 98%~100%。3 株猪链球菌 2 型毒力基因型均为 *gdh*⁺/*cps2J*⁺/*mrp*⁺/*ef*⁻/*sly*⁻/*fbps*⁺/*orf2*⁺（另文发表）。

3 结论与讨论

本研究室已建立的 PCR 方法可直接应用纯菌液作为模板且敏感度可达 100 CFU/PCR 反应体系，但由于样本含其他杂菌，因此有必要先进行浓缩，再行提取 DNA 作为模板。细菌 DNA 提取方法众多，本实验室研究尝试使用 Chelex-100 改良裂解法、试剂盒法、水煮法，以期找到一种简易高效、稳定可靠的、适用于高灵敏度 PCR 的细菌 DNA 提取方法。试验结果表明，3 种方法均能裂解提取猪链球菌 2 型菌中的 DNA，并作为模板用于猪链球菌 2 型定型 PCR，Chelex-100 改良法裂解细菌后所扩增的条带较明亮清晰，效果满意，可检测到 1×10^3 CFU · mL⁻¹，敏感性比水煮法提高了 10 倍。用试剂盒法抽提细菌 DNA 再行 PCR 扩增，效果与 Chelex-100 改良法相同。但试剂盒抽提的步骤较繁杂，需经常转换管，且还要使用多种试剂，这都增加了 PCR 污染的可能性。故 Chelex-

100 改良裂解法是一种简便有效的方法，适合于猪链球菌2型扩增时提取模板。

本次调查是应用猪链球菌2型定型PCR方法，该PCR方法是针对猪链球菌2型特异性片段*cps2J*基因进行扩增，针对该基因合成的引物能扩增出相应的特异性目的片段并能从阳性样品中分离到猪链球菌2型，充分表明了本次调查所用的PCR方法具有很高的特异性，适用于猪链球菌2型的诊断及流行病学研究。

国内不同地区在正常猪体中猪链球菌2型的检出率差别较大。何孔旺等^[4]报道除少数猪群外江苏地区正常猪群中猪链球菌2型的带菌率普遍较高，为31.6%~77.0%，平均为40.9%，且疫区和非疫区差异不明显。应薇芳等^[5]对浙江部分地区屠宰场中的猪链球菌分布进行调查，结果表明猪链球菌2型的携带率为0.69%。李春玲等^[6]对华南地区的401份生猪扁桃体进行PCR检测发现猪链球菌2型的携带率为17.2%。熊毅等^[7]从广西地区10个县区屠宰场采集无临床症状猪的扁桃体样本进行细菌分离和多重PCR鉴定后发现猪链球菌2型的平均带菌率为2.8%。本研究首次对福建省屠宰场猪群猪链球菌2型进行调查，对来自3个地区的121份生猪鼻咽拭子进行PCR检测发现有17份猪链球菌2型阳性（14.0%），表明福建地区生猪群中携带有猪链球菌2型，且带菌率相对较高。同时，本研究对分离到的3株猪链球菌2型进行了毒力基因检测，发现其毒力基因型为国内发现的新的基因型

（另文发表）。国外相关学者认为人感染猪链球菌是动物源性职业病，亚临床症状携带菌的动物对屠宰人员是潜在的传染源^[8]。因此，检测生猪群中的猪链球菌2型对疫情防控和公共卫生具有指导意义。尽管生猪体内所携带的猪链球菌2型的致病性尚待进一步的研究，但也应引起相关部门的足够重视。

参考文献：

- [1] STAATS J J, FEDER I, OKWUMABUA O, et al. Streptococcus suis: past and present [J]. Vet Res Commun, 1997, 21 (6): 381-407.
- [2] 曹三杰, 段丽丽, 肖驰, 等. 猪2型链球菌毒力因子研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23 (1): 89-91.
- [3] 倪艳秀, 何孔旺, 王继春, 等. 猪链球菌2型的PCR快速检测 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22 (5): 474-476.
- [4] 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 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18 (5): 45-47.
- [5] 应薇芳, 赵焕灿, 钱娅, 等. 浙江部分地区屠宰场待宰猪链球菌的检测及药敏试验 [J]. 动物医学进展, 2007, 28 (6): 24-27.
- [6] 李春玲, 余炜烈, 贾爱卿, 等. 应用多重PCR检测屠宰猪扁桃体中的猪链球菌 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30 (5): 344-348.
- [7] 熊毅, 刘棋, 覃芳芸, 等. 广西地区无症状猪中猪链球菌2型分子流行病学研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28 (6): 593-596.
- [8] 唐晓萍, 吴忠亮, 华修国, 等. 上海地区屠宰场猪扁桃体致病性链球菌2型携带情况的调查 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2008 (1): 28-29.

（责任编辑：林海清）