

- [8] 刘奕. 基于机器学习的癌症诊断方法研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2017.
- [9] 郭利斌. 基于支持向量机算法的癌症组织拉曼光谱数据分析[D]. 福州: 福建师范大学, 2015.
- [10] 陈欣, 张国楠. 早期宫颈癌患者手术后外周血淋巴细胞计数变化的临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(3): 208-212.
- [11] 唐红, 吴伟莉, 金凤, 等. 外周血中性粒细胞及血小板与淋巴细胞的比值与局部晚期鼻咽癌预后及疗效的相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(1): 32-36.
- [12] AMRIT P S R, KAUR M, ZONUNSANGA B, et al. Pre-operative peripheral blood count in breast carcinoma: predictor of prognosis or a routine test[J]. Int J Breast Canc-

er, 2015, 2015: 964392.

- [13] 黄利军, 方佳峰, 吴珏堃, 等. 术前血清肿瘤标志物联合血常规指标对结直肠癌患者预后评估的价值[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(12): 1421-1426.
- [14] 王燕. 新疆喀什贫困地区维族妇女子宫颈癌及癌前病变的危险因素分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [15] 许驰, 何玉. 宫颈癌筛查方法的现状及进展[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(11): 1538-1541.
- [16] 周晖, 王东雁, 罗铭, 等. 《FIGO 2018 妇癌报告》——子宫颈癌指南解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(1): 95-103.

(收稿日期: 2020-02-12 修回日期: 2020-06-11)

• 短篇论著 •

1 例引起突发性耳聋的猪链球菌的鉴定及分子流行病学分析^{*}

郑礼杰¹, 李欣霖², 张 文², 陈建国¹, 谈忠鸣³, 许金凤^{4△}

(1. 江苏大学附属人民医院, 江苏镇江 212002; 2. 江苏大学医学院, 江苏镇江 212013; 3. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009; 4. 镇江市疾病预防控制中心, 江苏镇江 212000)

摘要:目的 分离鉴定 1 例突发性耳聋患者血液和脑脊液分离的猪链球菌并进行分子流行病学分析。方法 采用 VITEK-2 Compact 微生物系统进行初步鉴定和药敏试验, PCR 扩增细菌的 16S rRNA 基因、7 个管家基因及 4 种毒力基因。通过实时荧光定量 PCR 进行血清学分型, 多位点序列分型 (MLST) 进行序列分型 (STs)。结果 传统细菌鉴定方法和 16S rRNA 基因测定方法均鉴定为猪链球菌, 实时荧光定量 PCR 鉴定为猪链球菌 2 型, MLST 分型为 ST7, 毒力因子溶血素基因、细胞外蛋白因子编码基因、荚膜多糖编码基因均为阳性。结论 引起患者突发性耳聋的细菌为我国常见的猪链球菌 2 型, 属于 ST7 型强毒株。

关键词:猪链球菌; 突发性耳聋; 多位点序列分型; 毒力因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.023

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)17-2150-05

文献标识码:B

猪链球菌是一种兼性厌氧的革兰染色阳性细菌, 寄生在猪、牛、驴等哺乳动物、鸟类以及人类中, 可导致脑膜炎、败血症、心内膜炎、肺炎、关节炎等疾病, 是一种重要的人畜共患病原菌^[1-3]。近二十年, 由猪链球菌引起的人类感染显著增加, 被认为是新出现的动物传染性疾病^[4]。2002—2013 年全球共有 34 个国家 1 642 例猪链球菌病的报道, 90.2% 发生在亚洲, 8.5% 发生在欧洲^[5], 西方国家病例主要与职业接触有关, 而相当一部分亚洲病例则与食用生猪制品有关^[6]。根据荚膜多糖 (CPS) 抗原性的不同, 猪链球菌被分为 35 种血清型 (1—34 型以及 1/2 型)^[5]。目前, 对猪致病性较强的常见血清型有 1 型、2 型、1/2 型、7 型和 9 型等^[7]。根据 7 个管家基因 (aroA、cpn60、dpr、gki、mutS、recA、thrA) 核苷酸序列的不同, 应用

多位点序列分型 (MLST) 技术将猪链球菌分为不同的序列类型 (STs)^[8], 目前已知的 STs 已有 700 多种。毒力相关基因纤溶酶释放相关蛋白编码基因 (mrp)、溶血素基因 (sly)、细胞外蛋白因子编码基因 (epf)、荚膜多糖编码基因 (cps) 等在猪链球菌致病过程中发挥重要作用^[9-10]。本研究对分离自江苏大学附属人民医院 (后简称“本院”) 的 1 例突发性耳聋患者血液和脑脊液中的猪链球菌进行病原学鉴定和药敏试验, 并进行分子流行病学分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例介绍 患者, 男, 59 岁, 因“突发性耳聋”入院就诊。入院时头部胀痛、头晕、听力下降、言语不清、双下肢乏力, 伴有恶心、呕吐。辅助检查: 白细胞 $5.7 \times 10^9/L$, 中性粒细胞计数 $5.3 \times 10^9/L$, 中性粒细

^{*} 基金项目: 江苏省社会发展重点研发项目 (BE2017693); 镇江市社会发展项目 (SH2019057); 镇江市第一人民医院院级课题 (Y2019010)。

[△] 通信作者, E-mail: 642095775@qq.com。

胞占比 93%，血小板 $20\times 10^9/L$ ；C-反应蛋白 116.50 mmol/L。予以阿昔洛韦抗病毒、用泼尼龙琥珀酸钠抑制免疫炎症等治疗。入院第 2 天，患者出现高热，体温最高 39.1℃，伴有畏寒、寒战，四肢及腹部紫癜，抽取外周血及脑脊液送微生物室培养，同时抗菌药物改为头孢呋辛钠联合环丙沙星。培养约 5 h 后，外周血和脑脊液培养瓶先后报阳，涂片提示革兰阳性链球菌，经 VITEK-2 Compact 微生物系统鉴定为猪链球菌，提示该患者为猪链球菌感染。转感染科治疗，据药敏试验结果调整抗菌药物，予以美罗培南抗感染治疗。患者出现听力障碍，请五官科会诊确定双耳全聋，予以鼓室内注射用泼尼龙琥珀酸钠治疗，效果欠佳。入院第 19 天，患者体温正常，头痛缓解、乏力减轻，感染治愈，但听力无法恢复。发病第 46 天，行右侧电子耳蜗植入术，患者恢复出院。

1.2 主要仪器与试剂 Bact/ALERT 3D 全自动血培养仪(法国生物梅里埃)，VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃)，PCR 扩增仪(Eppendorf 公司)，电泳仪(Bio-Rad 公司)，凝胶成像及分析系统(GENE 公司)。PCR 试剂盒(大连宝生物公司)，细菌 DNA 提取试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司)，猪链球菌核酸检测试剂盒及猪链球菌分型核酸测试剂盒(江苏硕世生物科技股份有限公司)，16S rRNA 基因引物、管家基因引物及毒力基因引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.3 细菌仪器表型鉴定及药敏试验 采集患者双臂

静脉外周血各 8~10 mL 及脑脊液 2 mL 分别注入血培养瓶，置 Bact/ALERT 3D 全自动血培养仪中孵育。培养 5 h 后，培养瓶陆续报阳，抽取培养瓶内容物，涂片革兰染色，同时接种哥伦比亚血平板和麦康凯平板。根据细菌革兰染色结果选择合适的鉴定和药敏卡，放置 VITEK-2 Compact 微生物系统进行鉴定和药敏试验。抗菌药物敏感性试验判读按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2018 年版要求进行，质控菌株为无乳链球菌 ATCC 13813 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。

1.4 猪链球菌靶基因检测 细菌 DNA 提取:按照试剂盒说明书提取目标 DNA，置-20℃冰箱保存备用。参照文献[11-12]合成下列引物:16S rRNA 基因前向引物:CCTACGGGNGGCWGCAG，反向引物:GAC-TACHVGGGTATCTAATCC，猪链球菌管家基因 aroA、cpn60、dpr、gki、mutS、recA、thrA(表 1)，猪链球菌毒力基因 cps、mrp、epf、sly(表 2)。16S rRNA 反应体系 20 μL，包含上下游引物各 1 μL、模板 1 μL、预混液 17 μL，反应条件为 94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s、48℃退火 30 s、72℃延伸 30 s，共 30 个循环，最后 72℃延伸 7 min。管家基因和毒力基因反应体系各 50 μl，包含上下游引物各 1 μL、模板 1 μL、预混液 47 μL，反应条件 95℃预变性 4 min，95℃变性 30 s、61℃退火 30 s(毒力基因 60℃)、72℃延伸 60 s，共 35 个循环，最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物送上海生物工程有限公司测序。

表 1 猪链球菌 MLST 分型引物列表

管家基因	引物序列	序列长度(bp)
aroA	前向引物:5'-TTCCATGTGCTTGAGTCGCTA-3'	366
	反向引物:5'-ACGTGACCTACCTCCGTTGAC-3'	
cpn60	前向引物:5'-TTGAAAAACGTRACKGCAGGTGC-3'	318
	反向引物:5'-ACGTTGAAIGTACCACGAATC-3'	
dpr	前向引物:5'-CGTCTTTCAGCCCGCGTCCA-3'	336
	反向引物:5'-GACCAAGTTCTGCCTGCAGC-3'	
gki	前向引物:5'-GGAGCCTATAACCTCAACTGG-3'	321
	反向引物:5'-AAGAACGATGTAGGCAGGATT-3'	
mutS	前向引物:5'-CGCAGAGCAGATGGAAGATCC-3'	339
	反向引物:5'-CCCATAGCTGTTTTGGTTTCATC-3'	
recA	前向引物:5'-TATGATGAGTCAGGCCATG-3'	354
	反向引物:5'-CGCTTAGCATTTTCAGAACC-3'	
thrA	前向引物:5'-GATTCAGAACGTCGCTTTGT-3'	336
	反向引物:5'-AAGTTTTCATAGAGGTCAGC-3'	

1.5 MLST 数据库比对 将扩增产物测序后得到的序列与 MLST 数据库中的序列进行比对分析,得到各管家基因的等位基因数。将得到的 7 个等位基因数

上传至数据库查询具体的 ST 型别,并将 ST 型别结果上传至数据库。

1.6 猪链球菌核酸和猪链球菌分型核酸检测 按照

试剂盒说明书操作,进行实时荧光定量 PCR。

表 2 毒力基因特异引物 PCR 引物序列及退火温度

毒力基因	特异性引物	退火温度(℃)	目标序列长度(bp)
mrp	前向引物:5'-GGTATACCTTGCTGGTACCGTTC-3'	60	532
	反向引物:5'-AGTCTCTACAGCTGTAGCTGG-3'		
sly	前向引物:5'-CCCAGTTCAAGCCGCATTTA-3'	60	495
	反向引物:5'-GAAGATTGCGAGCATTTCTCTG-3'		
epf	前向引物:5'-GCTACGACGGCCTCAGAAATC-3'	60	626
	反向引物:5'-TGGATCAACCACTGGTGTTAC-3'		
cps	前向引物:5'-GGCGGTCTAGCAGATGCTCG-3'	60	450
	反向引物:5'-GCGAACTGTTAGCAATGAC-3'		

2 结 果

2.1 细菌分离培养和染色镜检 报阳血标本接种后,经培养箱 35 ℃ 孵育 24 h,哥伦比亚血平板上长出灰白透明色,针尖样露珠大小,光滑湿润,边缘整齐有 α 溶血环的菌落(图 1)。经革兰染色,镜下观察为成双排列或短链状的革兰阳性球菌,呈散在、成对或短链状分布(图 2)。

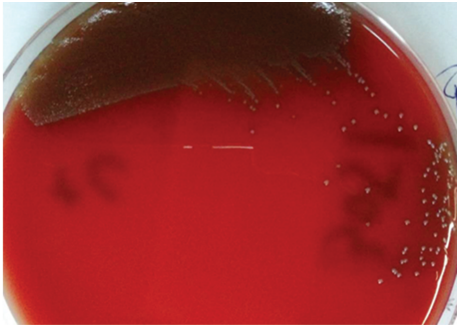


图 1 菌落生长形态

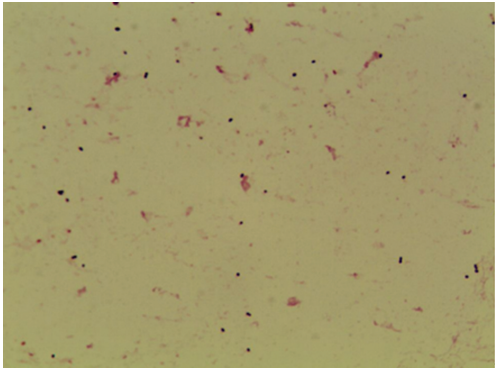


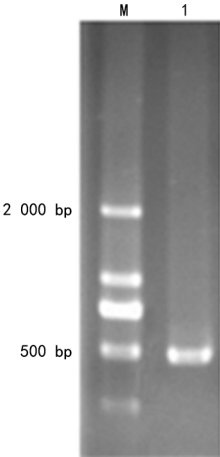
图 2 菌株革兰染色镜检

2.2 鉴定和药敏试验结果 VITEK-2 Compact 系统鉴定为猪链球菌,鉴定率仅为 50%。药敏试验结果:氨苄西林、环丙沙星、利奈唑胺、青霉素、万古霉素、美罗培南均敏感。

2.3 猪链球菌 16S rRNA 基因检测结果 16S rRNA 基因检测得到一条约 450 bp 的条带(图 3),测序后得到的序列同美国国立生物技术信息中心(NC-

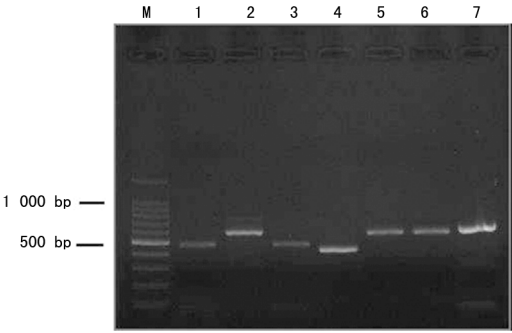
BI) 数据进行比对,显示与猪链球菌(登录号:MH699317.1)的同源性为 98.35%。

2.4 猪链球菌 MLST 分型结果 7 个管家基因电泳均得到清晰条带(图 4),约 500 bp,与目标条带一致。aroA、cpn60、dpr、gki、muts、recA、thrA 等位基因数量分别为 1、1、1、1、1、3,与 MLST 数据库中的序列进行比对分析,发现此次分离到的菌株为 ST7 型。



注:M 为 DNA Marker;1 为 16S rRNA。

图 3 疑似猪链球菌菌株 16s rRNA 基因电泳图



注:M 为 DNA Marker;1 为 dpr;2 为 thrA;3 为 cpn60;4 为 recA;5 为 gki;6 为 aroA;7 为 mutS。

图 4 猪链球菌菌株 PCR 电泳图

2.5 猪链球菌核酸和分型核酸检测 实时荧光定量 PCR 鉴定此菌株为猪链球菌血清型 2 型(图 5、图 6)。

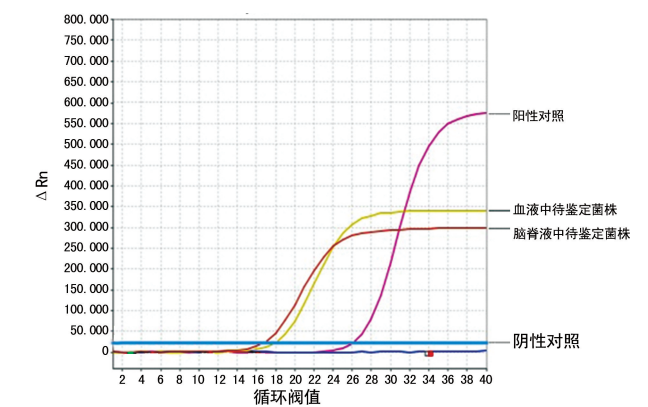


图 5 实时荧光定量 PCR 结果为猪链球菌

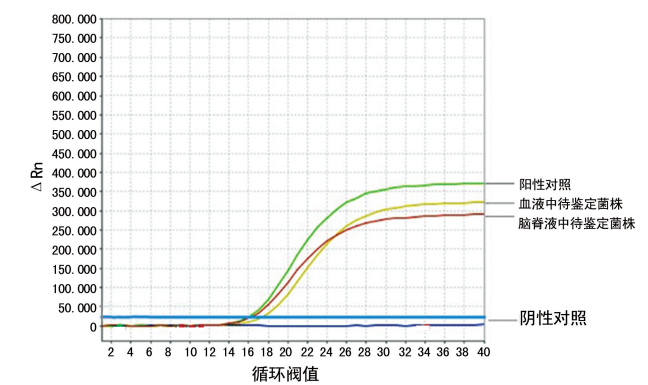
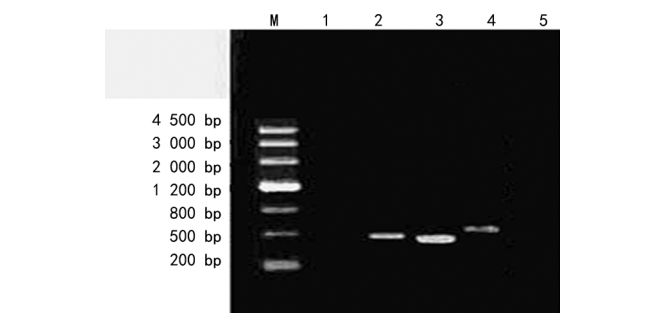


图 6 实时荧光定量 PCR 结果为猪链球菌 2 型

2.6 毒力基因检测结果 琼脂糖凝胶电泳结果显示,本菌株表现为 sly+/cps+/epf+(图 7)。



注:M 为 DNA Marker;1 为 mpr;2 为 sly;3 为 cps;4 为 epf;5 为阴性对照。

图 7 毒力基因 PCR 电泳图

3 讨论

大多数猪链球菌在羊或牛血琼脂平板上呈 α 溶血,在马血平板上呈 β 溶血^[6],镜下呈卵圆形或球形,大小 1.0~1.5 μm,单个、成对或链状出现。临床可以通过细菌学、免疫学或者分子生物学的方法对猪链球菌进行鉴定,并需注意与肺炎链球菌、草绿色链球菌、D 群链球菌、肠球菌等鉴别。本研究中,菌落形态和镜下特征与猪链球菌相符,但机器鉴定率仅为 50%,这或许与细菌生化反应不充分或猪链球菌培养条件有关,后续 16S rRNA 结果与猪链球菌同源性为 98.35%,确定该病原菌为猪链球菌。与 VITEK-2 Compact 的传统细菌鉴定方法相比,16S rRNA 基因序列分析方法具有鉴定准确率高、灵敏度高的优

点^[13],适用于临床重要且难以鉴定的菌株。

猪链球菌在猪中有较高的流行性,在人类不常见,但一旦感染病情往往很严重。人群普遍易感,主要通过开放性伤口传播,如人皮肤或黏膜的创口接触病死猪的血液和(或)体液、加工处理病猪肉引起发病,或因吃了未煮熟的病猪肉或内脏而感染。人感染猪链球菌后主要的临床综合征为脑膜炎^[5],其次是败血症、关节炎、心内膜炎和眼内炎^[14-15],严重病例发展为不可逆的中毒性休克,病死率可达 62.7%^[6]。脑膜炎最常见的后遗症是听力丧失和(或)前庭功能障碍,报道的耳聋发生率在欧洲和亚洲分别为 50% 和 73%^[16]。本病例患者以“突发性耳聋”入院,入院第 2 天出现高热、头痛头晕、恶心呕吐并伴有肢体乏力,四肢及腹部紫癜,血液和脑脊液中分离出猪链球菌,符合脑膜炎合并败血症的临床表现^[6],按照药敏试验结果,患者经积极治疗,病情好转,但仍致不可逆的双耳全聋,不得不行电子耳蜗植入。该患者虽然没有直接接触病死猪,但在发病前 3 d 从农贸市场购得猪肺在家自行加工煮食,入院检查时发现患者手指指甲处有“倒刺”,推测猪链球菌从此伤口进入人体并大量繁殖引起血源性感染和脑膜炎。

据统计,2002—2013 年全球报道的 1 642 例人感染猪链球菌的病例中,最常见的血清型为 2 型,占 74.7%,其次为 14 型;猪链球菌分型导致的中毒性休克称为链球菌中毒性休克样综合征^[5]。基础研究也证实,猪链球菌 2 型可通过中性粒细胞逃避自然免疫监视和消灭^[17]。近年来我国报道的临床病例也以猪链球菌 2 型和 9 型为主^[18],特别是江淮地区优势血清型为 2 型^[19]。在猪链球菌的分型中,实时荧光定量 PCR 在敏感性、特异性和重复性方面具有显著的优势^[20],本研究采用实时荧光定量 PCR 分别进行猪链球菌核酸、猪链球菌 2 型核酸检测,确定为血清型 2 型,符合我国流行情况。

迄今为止,世界范围内报道的 STs 已经有 700 多种。在欧洲,人和猪的感染病例中最常见的 ST 型为 ST1,而亚洲和阿根廷主要为 ST7^[5]。2002—2013 年,中国大陆猪感染病例中最常见的是猪链球菌 2 型 ST7 型^[5]。2006—2016 年,中国大陆地区散发的 76 例临床病例分离出的猪链球菌中,主要流行的是 ST1 型和 ST7 型^[21]。将本菌株管家基因信息上传至 MLST 数据库进行比对,结果为 ST7 型。可见 MLST 技术的发展和普及使得不同 STs 的全球分布数据可以共享和比较,对本地区细菌流行病学也有更好的认识和促进作用。

猪链球菌的一种胆固醇依赖性细胞溶血素,被认为是一种重要的毒力因子,具有细胞毒性、黏附、侵袭、胞内存活等作用,在感染和宿主免疫应答中发挥重要作用^[8]。cps 可编码荚膜多糖,在细菌侵袭、抵抗

吞噬作用、脑膜炎的形成中发挥重要作用^[10]。随着研究进展,不同的荚膜多糖合成基因位点陆续被确认^[22]。sly、epf、mrp 是目前常用的与 STs 相关的毒力标记,主要跟猪链球菌 2 型菌株相关^[5]。因此,本研究选取 cps-2、sly、epf、mrp 进行毒力基因检测,结果除 mrp 外均为阳性,表明此分离株为 sly+/cps+/epf+强毒株。

参考文献

- [1] YANASE T, MORII D, KAMIO S, et al. The first report of human meningitis and pyogenic ventriculitis caused by *Streptococcus suis*; A case report[J]. J Infect Chemother, 2018, 24(8): 669-673.
- [2] 刘朋, 程子龙, 陈萌, 等. 驴源猪链球菌 2 型的分离和鉴定及 MLST 分型[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(10): 1920-1925.
- [3] TANIYAMA D, SAKURAI M, SAKAI T, 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.
- [4] FILIPPITZI M E, GOUMPERIS T, ROBINSON T, et al. Microbiological Zoonotic Emerging Risks, Transmitted Between Livestock Animals and Humans (2007—2015) [J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(4): 1059-1070.
- [5] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER J, XU J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3(6): e45.
- [6] JACEK D, VIOLETTA Z C, JACEK S, et al. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II - Pathogenesis[J]. Ann Agric Environ Med, 2018, 25(1): 186-203.
- [7] PAN X, GE J, LI M, et al. The Orphan Response Regulator CovR; a Globally Negative Modulator of Virulence in *Streptococcus suis* Serotype 2[J]. J Bacteriol, 2009, 191(8): 2601-2612.
- [8] HAAS B, GRENIER D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge [J]. Med Maladies Infect, 2017, 48(3): S399077X-S16307788X.
- [9] SCHWERK C. Murimidasase-released protein of *Streptococcus suis*; new insight into its impact on virulence[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1078-1080.
- [10] JEAN-PHILIPPE A, DOMINIC D, DAVID R, et al. Role of the *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide in the interactions with dendritic cells is strain-dependent but remains critical for virulence[J]. PLoS One, 2018, 13(7): e200453.
- [11] KING S J, LEIGH J A, HEATH P J, et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Pig Pathogen *Streptococcus suis*; Identification of Virulent Clones and Potential Capsular Serotype Exchange[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3671-3680.
- [12] 谈忠鸣, 鲍昌俊, 潘红星, 等. 快速 PCR 检测猪链球菌 2 型方法的研究及应用[J]. 江苏预防医学, 2012, 23(6): 9-11.
- [13] WATTS G S, CLARK Y K, SLEPIAN M J, et al. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria[J]. J Appl Microbiol, 2017, 123(6): 1584-1596.
- [14] WANG Y, SUN L. *Streptococcus suis* biofilm; regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(21): 9121-9129.
- [15] RAYANAKORN A G, BEY H G, LEE L H, et al. Risk factors for *Streptococcus suis* infection; A systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13358.
- [16] LAN H V T, NGO H, TIEN H N, et al. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Outcomes of *Streptococcus suis* Infection in Humans[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(7): 1105-1114.
- [17] ZHAO J, PAN S, LIN L, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 strains can induce the formation of neutrophil extracellular traps and evade trapping[J]. Fems Microbiol Letters, 2015, 362(6): 2707-2712.
- [18] 石大丽, 葛晨玲, 朱远致, 等. 广西部分地区猪链球菌血清型及其毒力因子流行性调查分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(4): 1116-1126.
- [19] 杨龙斌, 毛天骄, 吴华健, 等. 江淮地区猪链球菌和肠球菌分离株的鉴定、分型及药物敏感性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, (1): 131-137.
- [20] 李建达, 于江, 张玉玉, 等. 猪链球菌 2 型实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(12): 3107-3113.
- [21] ZHOU Y, DONG X, LI Z, et al. Predominance of *Streptococcus suis* ST1 and ST7 in human cases in China, and detection of a novel sequence type, ST658[J]. Virulence, 2016, 8(6): 1031-1035.
- [22] ZHENG H, QIU X, ROY D, et al. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada[J]. Veterinary Res, 2018, 48(1): 1-10.

(收稿日期: 2020-02-16 修回日期: 2020-05-20)