

· 实验室研究 ·

猪链球菌脉冲场凝胶电泳分析方法的建立

王丽丽 叶长芸 许彦梅 崔志刚 景怀琦 金东 杜华茂 张守印 白雪梅
赵爱兰 徐建国

【摘要】 目的 建立一种可共享的猪链球菌脉冲场凝胶电泳分析(PFGE)方法。方法 利用 PulseNet 技术优化猪链球菌 PFGE 分子分型方法,提出新的分析方案,包括胶块的制备、内切酶的选择、电泳条件等。利用 DNASTar 的 Mapdraw 软件对猪链球菌基因组序列进行分析,发现在 242 种内切酶中,*Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 种酶比较适合。结果 通过对 34 个血清型共 100 株菌的分析,发现使用 *Swa* I 可获得 59 种带型,使用 *Sma* I 可获得 53 种带型,使用 *Apa* I 可获得 43 种带型。其中以 *Swa* I 的分辨率最好。结论 提出猪链球菌的 *Swa* I PFGE 分析方法,并对条件进行优化,较原方法所需时间短、图像清晰,更具有可重复性,基本具备推广的条件。

【关键词】 猪链球菌;脉冲场凝胶电泳分析

Development of a protocol on pulsed field gel electrophoresis analysis for *Streptococcus suis* WANG Li-li, YE Chang-yun, XU Yan-mei, CUI Zhi-gang, JING Huai-qi, JIN Dong, DU Hua-mao, ZHANG Shou-yin, BAI Xue-mei, ZHAO Ai-lan, XU Jian-guo. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: YE Chang-yun, Email: yechangyun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To develop a PFGE protocol for *Streptococcus suis*. **Methods** We developed and optimized a PFGE protocol for *S. suis*, in terms of plug preparation, choice of restriction endonucleases and optimized electrophoresis parameters. By analyzing the genome sequences of *S. suis* P1/7 with Mapdraw of DNASTar, we found three restriction enzymes, *Swa* I, *Sma* I and *Apa* I, were more suitable than others. **Results** Analysis of 100 isolates of *S. suis* including 34 of 35 serotypes identified, 59, 53 and 43 patterns were obtained from *Swa* I, *Sma* I and *Apa* I restriction, respectively. The enzyme *Swa* I had the greatest power for discrimination ability. **Conclusion** By optimization of the protocol at various conditions, a rapid, reproducible, economic and practical PFGE method for *S. suis* was developed.

【Key words】 *Streptococcus suis*; Pulsed field gel electrophoresis analysis

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种人畜共患病的病原体,可引起人和动物间疫情^[1,3]。按照该菌荚膜多糖抗原类型,可以分为 35 个血清型^[4,5],而引起人间感染的主要是血清 2 型。1998-1999 年我国江苏省部分县(市),连续两年出现猪链球菌病的暴发^[6]。2005 年 6-8 月四川省发生人感染猪链球菌病暴发,报道有 204 人发病,38 人死亡,是迄今为止报道的最大的一起猪链球菌感染疫情,引起了国

内外广泛的关注^[7]。脉冲场凝胶电泳(PFGE)是细菌性传染病实验室监测和分析的重要技术。目前,国际上尚没有可推广的猪链球菌 PFGE 染色体 DNA 片段操作方案和统一的数据库,难以实现国内外各实验室之间菌株的比较。而已往文献发表的方法,重复性差,图像质量不符合分析软件的要求,不易推广,已不能满足实验室监测和流行病学分析的需要。因此,本研究的目的就是要建立一种可共享的、标准化猪链球菌 PFGE 分析方法。

材料与方法

1. 菌株:实验菌株包括 2005 年四川省猪链球菌病疫情分离菌株,我国贵州、广东、广西、江西等地分离菌株以及加拿大赠送的 34 个血清型参考菌株共 100 株。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470095);科技部“973”计划资助项目(2005CB522904)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

第一作者现工作单位:100013 北京市疾病预防控制中心

王丽丽、叶长芸、许彦梅、崔志刚同为第一作者

通讯作者:叶长芸,Email:yechangyun@icdc.cn

2. 主要试剂:限制性内切酶 *Xba* I、*Sma* I、*Apa* I、*Swa* I 等均为 BBI 公司或 TAKARO 或 Promega 生产。SeaKem Gold 琼脂糖购自美国 Cambraex Bio Science Rockland 公司; Brij35 购自 SERVA 公司;蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司;SDS 购自北京鼎国生物技术发展中心,进口分装;EDTA、Tris、硼酸购自上海生工生物工程技术有限公司;溶菌酶、脱氧胆酸钠、十二烷基肌氨酸钠购自 SIGMA 公司;其他相关试剂购自北京化工厂。试剂均为分析纯。

3. 主要仪器:脉冲场凝胶电泳仪为 CHEF MAPPER System 或者 DR III (Bio-Rad, USA);凝胶成像系统为 GEL Doc 2000 (Bio-Rad, USA);低温离心机为 Eppendorf Centrifuge 5810R;水浴摇床为 Grant OLS2000 (Grant, England);浊度仪为 Densimat (BioMerieux, France);比浊用试管为 REF352054 (BD 公司, USA);50 ml Screw-cap 试管为 Corning Centrifuge Tube (Corning 公司, USA);超纯水制造器为美国 MILLIPOR。制胶用模具、灌胶器 (Bio-Rad 170-3704)、10 孔梳子或 15 孔梳子及 screened-cap 为 Bio-Rad 公司提供。

4. 实验方法:

(1) 胶块制备过程中溶菌酶和蛋白酶 K 作用时间的比较研究: Vela 等^[8]的方法中胶块制备操作步骤较耗时,溶菌酶和蛋白酶 K 作用时间分别为 4 h 和过夜(≥ 12 h),为缩短胶块制备时间,本研究参照该方法,以四川省猪链球菌病疫情分离株 SC22 为实验菌株,对 PFGE 胶块制备过程中的溶菌酶和蛋白酶 K 进行不同作用时间梯度的比较研究。

(2) 不同内切酶的选择:有关猪链球菌 PFGE 分析的方法常用 *Sma* I 和 *Apa* I 两种内切酶。但使用 *Sma* I 酶切后电泳条带过少,使用 *Apa* I 酶切后电泳条带过多,不利于结果分析。本实验使用 DNASTar 的 Mapdraw 软件,分析各种内切酶对于已测序的猪链球菌 P1/7 的酶切位点,得到酶切位点数量在 10~100 的内切酶,包括 *Apa* I、*Xho* I、*Sac* II、*Pme* I、*Bbe* I、*Mlu* I、*Pac* I、*BssH* II、*Sma* I、*Nae* I、*Swa* I、*Rsr* II。使用上述 12 种内切酶对猪链球菌株 SC22 的同一个胶块进行酶切电泳,并分析了各种内切酶对猪链球菌酶切后电泳片段的分布情况。电泳参数为 1-50 s 18 h。

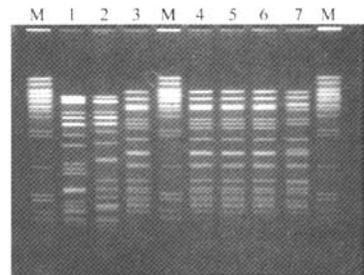
(3) 三种内切酶电泳参数的研究:通过设置不同电泳参数条件,对选用的 *Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 内

切酶进行了最佳电泳参数的优化,以便使限制性内切酶消化得到的猪链球菌染色体 DNA 片段电泳后分布均匀,便于分析。

(4) *Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 三种内切酶对 100 株猪链球菌的对比分析:对 100 株不同来源及血清型的猪链球菌用优化的 *Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 三种限制性内切酶和电泳条件进行分析。用这三种限制性内切酶对实验菌株染色体消化处理后进行脉冲场凝胶电泳,分别进行带型比较和聚类分析,判断三种酶的分辨率,以期确定最佳内切酶,建立猪链球菌脉冲场凝胶电泳的优化方法。

结 果

1. 胶块制备过程中溶菌酶和蛋白酶 K 作用时间的研究:通过对胶块制备过程中设置溶菌酶 (15 min/30 min/1 h/1.5 h/2 h/3 h/4 h) 和蛋白酶 K (1 h/1.5 h/2 h/4 h/6 h/8 h/10 h/12 h) 不同作用时间梯度,观察到各种时间条件下酶切效果均较好。当溶菌酶和蛋白酶 K 作用时间缩短到 15 min 和 1 h 时仍然可得到清晰的条带(图 1)。因此,确定获得酶切片段较好的分离效果的溶菌酶和蛋白酶 K 的最佳作用时间为 15 min 和 1 h。

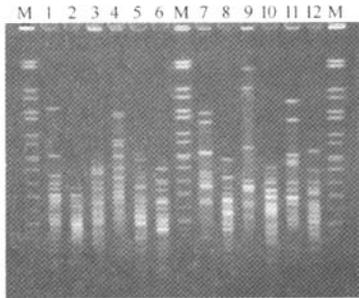


注:1~7 为溶菌酶和蛋白酶 K 作用时间,分别为 1 h/1.5 h, 1.5 h/1.5 h, 2 h/1.5 h, 15 min/1 h, 30 min/1 h, 1 h/1 h, 1.5 h/1.5 h 的消化结果;实验菌株为 SC22

图1 溶菌酶和蛋白酶 K 不同时间组合的消化作用

2. 内切酶的选择:使用 DNASTar 的 Mapdraw 软件,分析各种内切酶对于猪链球菌测序菌株 P1/7 的酶切位点,选择酶切位点在 10~100 的 12 种内切酶对猪链球菌 SC22 菌株的同一个胶块进行酶切电泳。电泳参数为 1-50 s 18 h。各内切酶的使用完全按照内切酶的使用说明书进行操作。从图 2 可见 *Pme* I、*Pac* I 及 *Swa* I 用作猪链球菌脉冲场凝胶电泳的限制性内切酶较理想。*Pme* I 得到 13 个条带,*Pac* I 可以得到 9 个条带,且条带分布较均匀,

但这两种内切酶较昂贵,不利于广泛使用;*Swa* I 可得到 15 个条带,数目适中,且条带分布较均匀,带型理想,价格合理,便于推广。因此将 *Swa* I 作为首选的限制性内切酶。同时将文献使用的 *Sma* I 和 *Apa* I 作为对比研究内切酶。

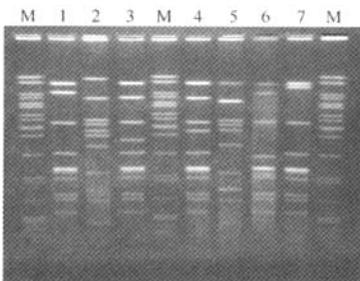


注:1~12 分别为 *Apa* I, *Xho* I, *Sac* II, *Pme* I, *Bbe* I, *Mlu* I, *Pac* I, *Bss*HI II, *Sma* I, *Nae* I, *Swa* I, *Rsr* II

图2 12 种内切酶对 SC22 菌株染色体的酶切图谱

3. 三种内切酶的电泳参数研究:

(1) *Sma* I:使用 *Sma* I 内切酶在使用脉冲参数为 1-30 s,电泳时间为 18 h 时,发现有些菌株分子质量约 1 兆的大片段处出现 2 个条带,提示电泳条件需要进一步改善。同时,为了改善大小片段之间差距较大,导致条带分布不均匀的情况,选用两阶段电泳。经过优化,证实将电泳参数设为 1-50 s 8 h; 5 s 10 h,可获得比较满意的结果(图 3)。



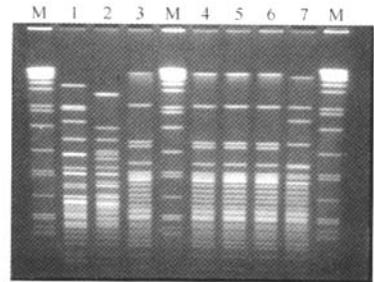
注:1~7 分别为猪链球菌株 P1/7, 89-1591, Hud limoge, Recims, 91-1804, 98015, SC84 的酶切结果

图3 *Sma* I 最佳电泳参数效果

(2) *Apa* I:参考文献[9]中使用的 *Apa* I 电泳参数为 0.1-25 s 21 h,通过多次实验优化,证实当电泳参数为 2-9 s 8 h, 7-12 s 11 h 时,经限制性内切酶 *Apa* I 消化的猪链球菌的染色体片段分布较为均匀,便于带型分析(图 4)。

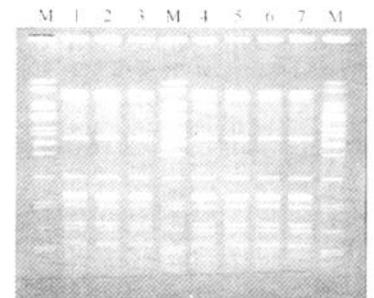
(3) *Swa* I:通过多种条件比较,证实当电泳参数为 4-60 s 4 h, 3 s 14 h 时,经限制性内切酶

Swa I 消化的猪链球菌的染色体片段分布较为均匀,便于带型分析(图 5)。



注:1~7 分别为猪链球菌株 94-3037, 91-1804, SC256, SC340, 98015, P1/7, M32 的酶切结果

图4 *Apa* I 最佳电泳参数效果



注:1~7 分别为猪链球菌株 94-3037, 91-1804, SC84, SC340, GDI, 98015, M32 的酶切结果

图5 *Swa* I 最佳电泳参数效果

经过优化,最终确定了适用于三种内切酶的最佳参数条件,总结见表 1。

表1 三种内切酶的电泳参数比较

项目	<i>Swa</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Apa</i> I
酶量(U)	50	50	50
酶切温度(℃)	25	25	37
酶切时间(h)	3	3	3
电泳参数(s/h)	4-60/4; 3/14	1-50/8; 5/10	2-9/8; 7-12/11

4. 三种限制性内切酶对猪链球菌株的对比分析:使用 *Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 三种限制性内切酶对实验选取的不同来源及血清型的 100 株菌分别进行酶切后电泳分析,同时进行带型和聚类分析。结果发现,100 株猪链球菌用 *Swa* I 分成了 59 种带型,用 *Sma* I 分成了 53 种带型,用 *Apa* I 酶切,其中有 96 株菌被分成了 43 种带型,有 4 株菌使用和其他两种内切酶相同的胶块,未能得到理想的条带。这三种内切酶对 34 个血清型的猪链球菌都能够很好的区分(表 2)。

表2 三种内切酶对部分猪链球菌的分型结果比较

菌株	不同酶切后的 PFGE 型别			血清型
9802	Swal 01	Smal 01	Apal 01	2
SC152	Swal 02	Smal 01	Apal 01	2
9801(SS2)	Swal 03	Smal 05	Apal 04	2
GX405	Swal 04	Smal 02	Apal 01	2
GZ1	Swal 05	Smal 10	Apal 10	2
GX1	Swal 06	Smal 11	Apal 02	2
GX407	Swal 07	Smal 12	Apal 11	14
JX2	Swal 08	Smal 04	Apal 03	2
FRU95	Swal 09	Smal 03	Apal 01	2
780094	Swal 11	Smal 04	Apal 01	2
GZ2	Swal 12	Smal 13	Apal 01	2
Hud limoge	Swal 13	Smal 14	Apal 01	2
Recims	Swal 14	Smal 15	Apal 01	2
P1/7	Swal 15	Smal 04	Apal 01	2
GX2	Swal 16	Smal 02	Apal 05	2
shanghaihouguang	Swal 17	Smal 16	Apal 12	2
11611	Swal 18	Smal 02	Apal 01	2
RC1	Swal 19	Smal 17	Apal 13	8
ATCC43765	Swal 20	Smal 06	Apal 07	2
770628	Swal 21	Smal 07	Apal 01	2
89-1591	Swal 22	Smal 18	Apal 14	2
91-1804	Swal 23	Smal 08	Apal 08	2
94-3037	Swal 24	Smal 09	Apal 09	2
s1/2	Swal 25	Smal 19	Apal 15	1/2
NJ25	Swal 27	Smal 21	Apal 13	2
s10	Swal 28	Smal 22	Apal 17	10
s11	Swal 29	Smal 23	Apal 18	11
s12	Swal 30	Smal 24	Apal ??	12
s13	Swal 31	Smal 25	Apal 19	13
s14	Swal 32	Smal 26	Apal 20	14
s15	Swal 33	Smal 27	Apal 21	15
s16	Swal 34	Smal 28	Apal ??	16
s17	Swal 35	Smal 29	Apal 22	17
s21	Swal 36	Smal 30	Apal 23	21
s18	Swal 37	Smal 31	Apal 24	18
s19	Swal 38	Smal 32	Apal 25	19
s20	Swal 39	Smal 33	Apal 26	20
s22	Swal 40	Smal 34	Apal 27	22
s23	Swal 41	Smal 35	Apal 28	23
s24	Swal 42	Smal 36	Apal 29	24
s25	Swal 43	Smal 37	Apal 30	25
s26	Swal 44	Smal 38	Apal 31	26
s27	Swal 45	Smal 39	Apal 32	27
s28	Swal 46	Smal 40	Apal 33	28
s29	Swal 47	Smal 41	Apal 34	29
s3	Swal 48	Smal 42	Apal 35	3
s30	Swal 49	Smal 43	Apal 36	30
s32	Swal 50	Smal 44	Apal 37	32
s33	Swal 51	Smal 45	Apal ??	33
s34	Swal 52	Smal 46	Apal 38	34
s4	Swal 53	Smal 47	Apal 39	4
s5	Swal 54	Smal 48	Apal 40	5
s7	Swal 55	Smal 49	Apal 41	7
s8	Swal 56	Smal 50	Apal 42	8
TD10	Swal 57	Smal 51	Apal 43	2
s9	Swal 58	Smal 52	Apal ??	9
SS2-H	Swal 59	Smal 01	Apal 01	2
s6	Swal 60	Smal 53	Apal 44	6
s31	Swal 61	Smal 54	Apal 45	31

注:?? 表示用 *Apa* I 酶切未能获得理想条带

分型结果比较显示,被 *Apa* I 分在同一个型别 (*Apa* I 01) 的 12 株猪链球菌,用 *Sma* I 可分为 8 种不同的型别,用 *Swa* I 可分为 12 种不同型别。9 株猪链球菌能被 *Sma* I 分为 3 种型别 (*Sma* I 01, *Sma* I 02, *Sma* I 04), 而用 *Swa* I 却能将其区分

为 9 种不同的型别(表 2)。可以看出,这三种限制性内切酶虽然都可以用于猪链球菌的 PFGE,但三种酶的分辨率明显有所不同。*Sma* I 可将 *Apa* I 区别不开的 PFGE 型别加以辨别,而 *Swa* I 则又能将 *Sma* I 难以区分的菌株加以分开,因而就猪链球菌来说, *Swa* I 的区分能力明显高于 *Sma* I 和 *Apa* I。

通常使用 Simpson 指数来计算和比较分型方法的分辨能力^[9-11]。 $D = \sum (nj/n)^2$, 式中 n_j 为属于 j 带型的菌株数, n 为所研究的菌株总数。基因组的多样性用 λ 表示, $\lambda = 1 - D$, 说明随机选入的两个样本被分为不同性别的可能性。 λ 越大,说明这种分型方法的分辨率越高。由于 Simpson 指数适用原则之一为常见菌株在试验用菌株总数的比例应 $< 5\%$, 我们的实验分析结果显示,2005 年四川省疫情分离的猪链球菌带型完全一致,所以我们选用 81 株猪链球菌菌株的 PFGE 结果进行统计学分析。从计算得出的三种内切酶的分辨率比较结果可以看出, *Swa* I 的分辨率高于 *Sma* I, *Sma* I 高于 *Apa* I (表 3)。

表3 三种内切酶的分辨率比较

内切酶	带型株数	菌株数	D	λ
<i>Swa</i> I	59	81	0.0477	0.9523
<i>Sma</i> I	53	81	0.0863	0.9137
<i>Apa</i> I	43	81	0.1666	0.8334

讨 论

Vela 等^[8] 于 2003 年和 Florence 等^[12] 于 2002 年分别报道了使用 PFGE 方法分析猪链球菌,从而研究该菌的遗传多样性。Vela 等对 10 个血清型的 302 株菌进行分析,发现使用 *Apa* I 酶切,可分成 39 种带型;使用 *Sma* I 酶切,可以分成 36 种带型。Florence 等使用 *Sma* I 对 5 个血清型的 123 株菌进行酶切,得到 74 种带型。我们使用 Vela 等描述的方法,对 2005 年四川省人感染猪链球菌疫情分离菌株和其他地区的分离菌株进行分析时发现,在 1-30 s 18 h 电泳条件下,有小部分菌株在 1 兆左右的位置的大片段,可能是 2 个分子质量较接近片段。考虑改变电泳参数,这 2 个片段能够区分开。鉴于传染病预防控制的需要,发展适用性强的猪链球菌 PFGE 分析方法很有必要。为此,我们从胶块的制备、内切酶的选择、电泳条件的改变以及几种内切酶的综合比较分析等方面摸索了猪链球菌 PFGE 的最佳方案。

实验首先使用 DNASTar 的 Mapdraw 软件对猪链球菌已经公布的基因组序列进行分析,通过对

242 种内切酶的分析,发现能够适用于猪链球菌的内切酶有 25 种,其中以 *Sma* I 和 *Swa* I 为佳。*Swa* I 可产生 36 个分子质量为 414 bp 至 362.9 kb 之间的片段,比较适宜使用 PFGE 分析。我们推荐使用 *Swa* I 作为实验用限制性内切酶进行猪链球菌 PFGE,这是因为在多种常用稀有位点的限制性内切酶中,*Swa* I 酶切电泳后可以分析的片段数目为 15 条左右,片段大小适中,分布较为均匀,对于分析比较有利,即产生片段的分子质量梯度和数目优于 *Sma* I;而且价格较适合,可大范围推广。

我们对 100 株菌进行 PFGE 分型。使用 *Swa* I、*Sma* I、*Apa* I 酶切电泳后,把得到的不同菌株的 PFGE 图像用 BioNumerics (Version 4.0) 数据库软件处理,读取数据后应用统一的 Marker (国际参考菌株 H9812) 校准,再选用 UPGMA 方法进行聚类分析。结果发现,使用 *Swa* I 将 100 株实验菌株分成 59 种带型,使用 *Sma* I 可分成 53 种带型,使用 *Apa* I 酶切可分成 43 种带型,有 4 株分别为血清型 9、12、16 和 33 的菌株使用和其他两种内切酶相同的胶块,电泳后只能得到一个大片段,即使使用抑制 DNA 降解的化学物质也不能得到理想的条带。这说明 *Apa* I 对于这四种血清型菌株的消化分辨能力较差。根据分辨率的概念,分析结果证实,对于猪链球菌菌株的 PFGE 分析,三种内切酶中 *Swa* I 的分辨率最好,其次是 *Sma* I, *Apa* I 的分辨率最差。

通常情况下,对病原菌株分析可以区分由单一菌株引起的疫情暴发,还是由菌株互不关联的散发感染。本研究结果也证实,三种内切酶都可以将四川省疫情分离的菌株聚为一类,证明 PFGE 强大的分辨能力。但对于同期的散发病例,三者的分辨率不同,三种酶切带型的比较可以明显地看出,使用 *Swa* I 能够将广西等地区分离的菌株与四川省疫情分离的菌株相区别,而 *Sma* I 和 *Apa* I 则将其中某些菌株分为同一个带型,不能准确的区分病原菌株。

Simpson 指数分析证实, *Swa* I 的分辨率高于 *Sma* I, *Sma* I 高于 *Apa* I。同时,由于猪链球菌被 *Sma* I 酶切电泳后,条带数目过少,分辨率较差,不能区分不相关的菌株;猪链球菌被 *Apa* I 酶切电泳后,条带数目过多,条带分布不均匀,分辨率差,不容易分析;而猪链球菌被 *Swa* I 酶切电泳后,条带数目适中,经调整脉冲参数后条带分布较均匀,分辨率较好,便于软件分析。由此证实 *Swa* I 可以作为猪链

球菌 PFGE 的首选限制性内切酶。

我们同时观察到,相同血清型猪链球菌的 PFGE 带型存在差异,说明相同血清型猪链球菌的遗传性已存在很大异质性,单独使用血清分型则不能鉴别这些菌株,而 PFGE 却能区分同属于一个血清型,但基因组存在差异的菌株。

通过对实验条件和技术参数进行优化,我们发现,在溶菌酶和蛋白酶 K 分别为 15 min 和 1 h 的时间组合效果最佳。使用 *Swa* I 酶切在脉冲参数为 4-60 s 4 h,继而 3 s 14 h 时可产生比较好的分离效果。与以往的研究方法相比,本研究建立的方法省时省力,能够在 24-30 h 得到 PFGE 分型结果;使用的试剂价格低,便于推广;使用所选的 *Swa* I 内切酶消化的猪链球菌染色体 DNA 的条带数目适中,分布均匀,反映的信息较多。

总之,我们发展了一种以 *Swa* I 作为内切酶的猪链球菌的 PFGE 分析方法,并构建了猪链球菌的 PFGE 带型基础数据库。当疫情发生时,通过分离菌株 PFGE 带型与数据库数据的比对,可以快速有效地了解菌株的 PFGE 型别,有利于追踪传染源,可用于全国范围内猪链球菌监测。

参 考 文 献

- [1] Hui AC, Ng KC, Tong PY, et al. Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience. Clin Neurol Neurosurg, 2005, 107 (5):366-370.
- [2] Kay R, Cheng AF, Tse CY. *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. QJM, 1995, 88(1):39-47.
- [3] 胡晓抒,朱凤才,汪华,等.人-猪链球菌感染性综合征研究.中华预防医学杂志,2000,34(3):150-152.
- [4] Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Bacterioses and mycoses. Vol 1. Pan American Health Organization, 2003:257-265.
- [5] US Department of Energy Joint Genome Institute. JGI Microbes: *Streptococcus suis*. 2004. Available at: http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/strsu/strsu.home.html.
- [6] 汪华,胡晓抒,朱凤才,等.人-猪链球菌感染性综合征的流行病学调查.现代预防医学,2000,27(3):312-314.
- [7] 祝小平,祖荣强,陈志海,等.四川省人感染猪链球菌病死亡病例特征分析.中华流行病学杂志,2005,26(9):633-635.
- [8] Vela AI, Joaquin G, Carmen T, et al. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 2003, 41(6):2498-2502.
- [9] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26(11):2465-2466.
- [10] Saunders BD, Fortes ED, Morse DL, et al. Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. Emerg Infect Dis, 2003, 9(6):672-680.
- [11] Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J Clin Microbiol, 2001, 39(11):4190-4192.
- [12] Berthelot-Héroult F, Marois C, Gottschalk M, et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolates from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 2002, 40(2):615-619.

(收稿日期:2008-01-21)

(本文编辑:张林东)