

猪链球菌种及其 1、2、7 型多重 PCR 检测方法的建立与应用

刘春生¹, 徐耀辉², 陈 陆¹, 刘春明², 王新娟¹,
高冬生¹, 王永生¹, 张九州¹, 王川庆¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 郑州牧业高等专科学校, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】建立致病性猪链球菌种及其 1、2、7 型的快速多重 PCR 检测方法, 并进行初步的临床应用。【方法】根据猪链球菌种特异的 *gdh* 基因序列及其 1(14)、2(1/2)、7 型特异的 *cps1I*、*cps2H*、*cps7H* 基因序列, 分别设计 4 对引物, 通过对单个基因 PCR 和多重 PCR 扩增条件、反应体系的优化, 建立了快速检测猪链球菌种及其 1(14)、2(1/2)、7 型的 4 重 PCR 方法。利用保存的猪链球菌不同血清型菌株和其他相关标准菌株作为参考菌株, 对建立的多重 PCR 方法进行特异性和敏感性试验。用所建立的 4 重 PCR 方法对河南省不同地市的 39 份猪扁桃腺样品进行检测, 并选取部分样品的 PCR 产物进行测序验证。【结果】所建立的 4 重 PCR 方法特异、敏感, 对猪链球菌 2 型的最低检出水平为 2.52×10^3 CFU/mL。临床检测及测序结果显示, 该多重 PCR 准确性较高。【结论】建立的 4 重 PCR 方法可用于猪链球菌主要致病血清型的快速检测。

【关键词】 猪链球菌; 种及血清 1、2、7 型; 多重 PCR; 鉴别

【中图分类号】 S855.9⁺9; S854.4⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0024-07

Development and application of multiplex PCR assay for rapid detection of *Streptococcus suis* species and its main pathogenic serotypes 1, 2 and 7

LIU Chun-sheng¹, XU Yao-hui², CHEN Lu¹, LIU Chun-ming²,
WANG Xin-juan¹, GAO Dong-sheng¹, WANG Yong-sheng¹,
ZHANG Jiu-zhou¹, WANG Chuan-qing¹

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China;

2 Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to develop rapid and specific multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* (*S. suis*) and its main pathogenic serotypes 1 (and 14), 2 (and 1/2) and 7. 【Method】 Four pairs of primers were designed in this multiplex PCR assay, which was based on the sequences of the species-specific gene coding for glutamate hydrogenase (*gdh*) of *S. suis* and serotypes-specific genes of *cps1I*, *cps2H* and *cps7H* coding for the capsule of *S. suis* serotypes 1 (and 14), 2 (and 1/2) and 7, respectively. By optimizing the single and multiplex PCR conditions and primers concentrations, a stable multiplex PCR assay was established. To evaluate the specificity, strains of other bacterial species related to *S. suis* or isolated from pigs were analyzed. The multiplex PCR assay was then applied to the detection of 39

* [收稿日期] 2010-03-03

[基金项目] 河南省重点科技攻关项目(072102130009); 国家科技部支撑计划项目(2006BAK02A21)

[作者简介] 刘春生(1983—), 男, 河南南阳人, 在读硕士, 主要从事动物传染病发病机理及其防制研究。

E-mail: lcs830304@163.com

[通信作者] 王川庆(1954—), 男, 河南濮阳人, 教授, 博士, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: wchuanqing@163.com

tonsils,and several PCR products were sequenced to confirm the PCR assay.【Result】The PCR assay was rapid,exact,specific and sensitive. When genomic DNA of *S. suis* serotype 2 was used as template for PCR, the detection threshold of the test was 2.52 CFU per assay.【Conclusion】The multiplex PCR assay can be applied in rapid detection of *S. suis* and its main pathogenic serotypes from tonsils.

Key words: *Streptococcus suis*; species, serotypes 1,2 and 7; multiplex PCR; differentiation

猪链球菌(*Streptococcus suis*,SS)是一种重要的人兽共患病病原,可引起猪的脑膜炎、关节炎、败血症、心内膜炎、脑炎、流产、多发性浆膜炎和支气管肺炎^[1-3]。SS分为35个血清型,其中1、1/2、2、7、9、14型是其主要致病性血清型,危害尤为严重,可使发病猪的死亡率达80%。人也可以感染SS而导致败血症、脑膜炎、心内膜炎和永久性耳聋等,甚至死亡^[4-8],因此,SS在公共卫生方面引起了人们的极大关注。2005年,四川省首发人感染SS2型病例,并向周边省份蔓延,共导致43人死亡,造成了巨大的恐慌和经济损失。因此,对该SS的快速检测显得尤为重要。目前,常用的SS检测和分型方法有血清学方法和分子生物学方法,其中血清学方法需要特异的因子血清和纯的细菌培养物,不仅费时费力,而且结果不易判定。本试验选择猪链球菌种特异的*gdh*基因序列^[9]和1(14)、2(1/2)、7型特异的荚膜多糖(*cps1I*、*cps2H*、*cps7H*)基因序列^[10]作为检测靶标,旨在建立一种更加快速、准确的多重PCR检测方法,用于确定待检病菌是否为猪链球菌,同时鉴别其是否为猪链球菌血清1(14)、2(1/2)、7型,以期为该病的快速诊断及流行病学调查奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 SS 1 型参考菌株 SH28 和 2 型参

考菌株 S735,由中国动物卫生与流行病学中心范伟兴教授惠赠;SS 7 型菌株 AY-1、其他型猪链球菌、粪肠球菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、大肠埃希氏菌、志贺氏菌、卡氏杆菌、D 群链球菌,由河南农业大学传染病教研室分离、鉴定并保存;马链球菌兽疫亚种(C 群,CVCC562),购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂 DL2000 DNA Marker、*r Taq* DNA 聚合酶,均为宝生物工程(大连)有限公司产品;蛋白酶 K,为 Merck 公司产品;Bacto™ Todd Hewitt Broth(THB),购自 BD 公司;DNA 胶回收试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.1.3 病料 从河南新乡、驻马店、平顶山、周口、焦作、安阳、濮阳、商丘、南阳、洛阳、鹤壁等地区发病猪场的病猪上采集扁桃体样品(样品数分别为14、2、4、1、4、2、1、1、2、2、6份)备用。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 参照文献[7],以 Gen-Bank 中收录的猪链球菌 1(14)、2(1/2)、7 型特异的 *cps1I*、*cps2H*、*cps7H* 基因序列(序列号分别为:AF155804、EF539837、AF164515)为参考,利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 分别设计 3 对引物;猪链球菌种鉴定引物,参照文献[9]描述的方法设计;引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,其相关信息见表 1。

表 1 多重 PCR 引物
Table 1 Primer pairs of the multiplex PCR

引物 Primer	引物序列(5'→3') Sequence of the primers	长度/bp Length	扩增片段长度/bp Size	位置 Position
<i>gdh</i>	GCAGCGTATTCTGTCAAACG	20	689	199~218
	CCATGGACAGATAAAGATGG	20		868~887
<i>cps1I</i> (<i>cps14</i>)	GCGGTCTAGCAGATGCTC	18	441	4 397~4 414
	GCGAACTGTTACGAATGAC	19		4 837~4 819
<i>cps2H</i> (<i>cps1/2</i>)	GCTATCGATGGGACATCACACTGT	24	542	11 323~11 347
	CGGTAAGTAAGCCTCTGACGTTAT	24		11 864~11 841
<i>cps7H</i>	GCCCTCGTTGAATACAGC	18	232	3 154~3 177
	CGCAATCCACCTACCTCT	18		3 391~3 368

1.2.2 基因组 DNA 的提取 基因组提取方法参照文献[11]并稍加改动。将猪链球菌或疑似病例的扁桃体样品(3~5 mm³)接种于 5 mL THB 液体培养基中,37℃、195 r/min 恒温水浴培养过夜(扁桃

体样品为 5~8 h);取 200 μL 菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中,4℃、12 000 r/min 离心 1 min;弃上清液,将残余液滴吸净,加入 200 μL DNA 提取液(10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),100 mmol/L KCl,

2.5 mmol/L $MgCl_2$, 体积分数 1% Triton X-100, 体积分数 0.01% NP40, 120 $\mu g/mL$ 蛋白酶 K, 体积分数 1% Tween-20) 60 $^{\circ}C$ 水浴 1 h; 100 $^{\circ}C$ 煮沸 5 min, 冷却至室温, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清, $-20\text{ }^{\circ}C$ 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及其条件的优化 1) SS 及其 1、2、7 型的单一 PCR 扩增。反应体系: 10 $\times$ Buffer 5 μL 、 $MgCl_2$ (25 mmol/L) 5 μL 、dNTPs (10 mmol/L) 1 μL 、上游和下游引物 (20 $\mu mol/L$) 各 1 μL 、模板 DNA 2 μL 、*r Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , 加 ddH_2O 至 50 μL 。反应参数: 95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 48~62 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}C$ 终延伸 7 min。取 5 μL PCR 扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 然后在紫外检测仪下观察, 根据 PCR 扩增产物条带的亮度来确定最佳退火温度, 并用凝胶成像仪拍照保存。

2) SS 及其 1、2、7 型的 4 重 PCR 扩增。将不同体积 (0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 μL) 猪链球菌种及其 1、2、7 型引物, *r Taq* DNA 聚合酶 (0.50, 0.75 μL), $MgCl_2$ (4, 5, 6 μL) 和 dNTPs (1.0, 1.5, 2.0 μL) 进行方阵组合, 以便优化 PCR 反应体系。用优化的体系进行 PCR 扩增, 反应参数同上, 退火温度为 58 $^{\circ}C$ 。

1.2.4 PCR 产物的鉴定 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化扩增片段, 将回收的扩增产物送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。将所测序列与 GenBank 中收录的序列进行同源性比对, 根据同源性高低来鉴定 PCR 产物的正确性。

1.2.5 PCR 的特异性试验 1) 单一 PCR 的特异性。分别用 SS 1、2、7 型, 其他型 SS, C 群链球菌, D 群链球菌, 粪肠球菌, 大肠埃希氏菌, 沙门氏菌, 巴氏杆菌, 志贺氏菌和卡氏杆菌基因组 DNA 作为模板, 进行单一 PCR 反应, 以确定单一 PCR 的特异性。

2) 多重 PCR 的特异性。分别用 SS 1、2、7 型, 其他型 SS, C 群链球菌, D 群链球菌, 粪肠球菌, 大肠埃希氏菌, 沙门氏菌, 巴氏杆菌, 志贺氏菌和卡氏杆菌基因组 DNA 作为模板, 进行多重 PCR 反应, 以确定多重 PCR 的特异性。

1.2.6 多重 PCR 的敏感性试验 对 SS 2 型菌株 S735 菌液进行平板法计数, 然后进行 10 倍倍比稀释, 分别抽提其基因组 DNA 进行 PCR 反应, 以确定多重 PCR 的敏感性。

1.2.7 多重 PCR 的重复性检测 将保存的猪链球

菌不同血清型菌株的模板 DNA 在 3 d 内进行 3 次重复检测, 以确定多重 PCR 的重复性。

1.3 SS 多重 PCR 检测方法的临床应用

应用建立的多重 PCR 方法对 39 份病料进行检测, 同时对病料进行细菌分离鉴定。

1.4 SS 多重 PCR 检测方法的验证

抽取部分经多重 PCR 方法鉴定为阳性的样品的 PCR 扩增产物, 胶回收纯化目的基因片段, 送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定, 验证多重 PCR 的准确性。

2 结果与分析

2.1 SS 的单一 PCR 扩增

试验所确定的最佳退火温度为 58 $^{\circ}C$, 在该退火温度下, 分别以猪链球菌、SS 1 型菌株 SH28、2 型菌株 S735、7 型菌株 AY-1 为模板, 用单一 PCR 进行扩增, 凝胶电泳检测结果见图 1。由图 1 可知, 猪链球菌、1 型 SH28、2 型 S735、7 型 AY-1 的 PCR 扩增产物长度分别约为 689, 441, 542 和 232 bp, 与预期结果一致。

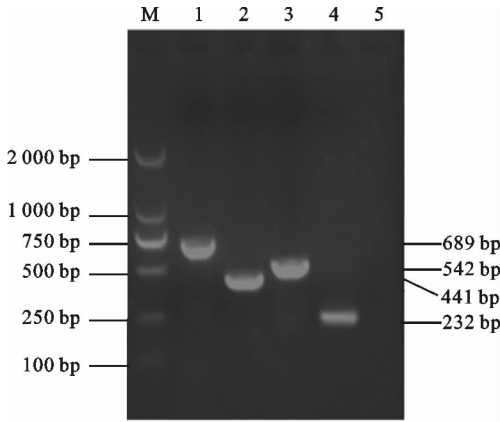


图 1 SS 种及 1、2、7 型的单一 PCR 扩增结果
M. DL2000 Marker; 1. 猪链球菌; 2. SS 1 型菌株;
3. SS 2 型菌株; 4. SS 7 型菌株; 5. 阴性对照

Fig. 1 PCR amplifications of *S. suis* species and its serotypes 1, 2 and 7, respectively
M. DL2000 Marker; 1. *S. suis*; 2. SS type 1; 3. SS type 2;
4. SS type 7; 5. Negative control

2.2 SS PCR 产物序列的测定

测序结果表明, PCR 扩增的片段均为目的基因片段。

2.3 SS 单一 PCR 的特异性试验

特异性试验结果 (图 2) 表明, SS 种及其 1、2、7 型单一 PCR 仅对相应血清型菌株的基因组 DNA 模板有特异性扩增, 对 C 群链球菌、D 群链球菌、粪

肠球菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、志贺氏菌、卡氏杆菌基因组 DNA 模板均无任何扩增产物,

表明单一 PCR 具有很好的特异性。

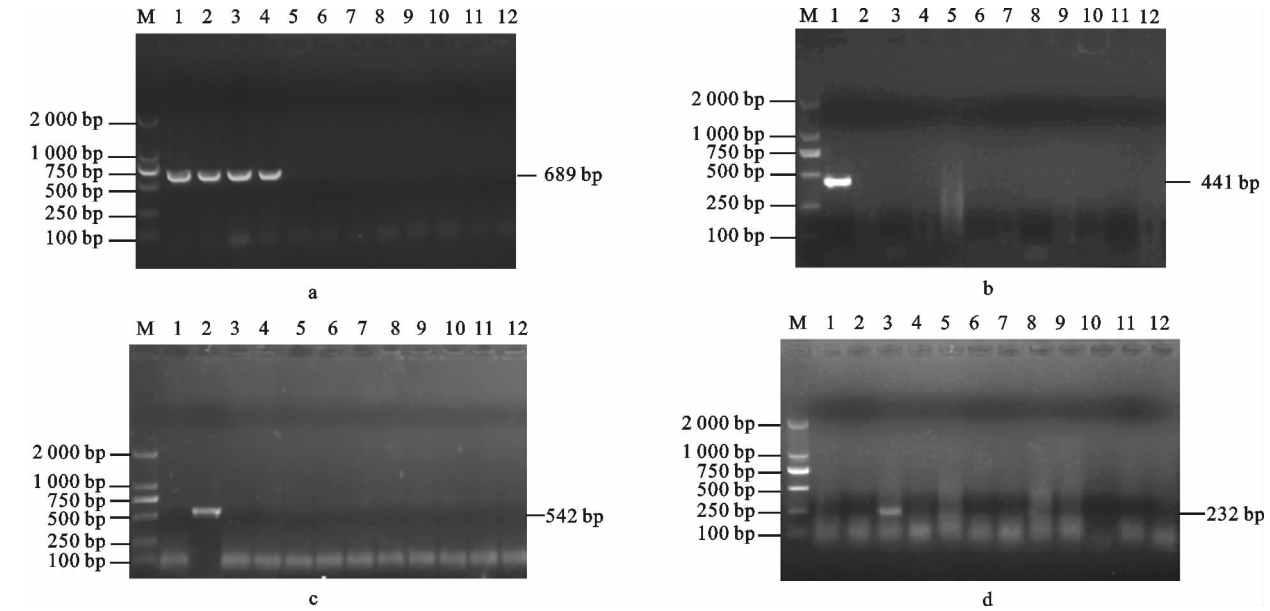


图 2 SS 种及其 1、2、7 型的特异性 PCR 扩增结果
a. SS 种特异性 PCR 扩增;b. SS 1 型特异性 PCR 扩增;c. SS 2 型特异性 PCR 扩增;d. SS 7 型特异性 PCR 扩增
M. DL2000 Marker;1. SS 1 型;2. SS 2 型;3. SS 7 型;4. SS;5. C 群链球菌;6. D 群链球菌;7. 粪肠球菌;
8. 大肠埃希氏菌;9. 沙门氏菌;10. 巴氏杆菌;11. 志贺氏菌;12. 卡氏杆菌
Fig. 2 Specific PCR amplification of *S. suis* species and its serotypes 1,2 and 7, respectively
a. Specific PCR amplification of *S. suis* species;b. Specific PCR amplification of *S. suis* serotype 1;
c. Specific PCR amplification of *S. suis* serotype 2;d. Specific PCR amplification of *S. suis* serotype 7
M. DL2000 Marker;1. SS type 1;2. SS type 2;3. SS type 7;4. SS;5. Group C *Streptococcus*;6. Group D *Streptococcus*;
7. *Enterococcus faecalis*;8. *Escherichia coli*;9. *Salmonella*;10. *Pasteurella*;11. *Shigella*;12. *Gallibacterium*

2.4 SS 多重 PCR 检测方法的建立

优化后的多重 PCR 反应体系为:10 × Buffer 2.5 μL,MgCl₂ 2.5 μL,dNTPs 2 μL,*gdh* 上、下游引物各 0.6 μL,*cps1* I (*cps14*)引物各 0.5 μL,*cps2H*(*cps1/2*)引物各 0.5 μL,*cps7H*引物各 0.6 μL,模板 DNA 1 μL,*r Taq* DNA 聚合酶 1.25 U,加 ddH₂O 至 25 μL。在最佳反应体系下,各目的条带清晰(图 3),说明扩增效果较好。

2.5 SS 多重 PCR 检测方法的特异性试验

特异性试验结果(图 4)表明,多重 PCR 仅对相应血清型菌株的基因组 DNA 模板有特异扩增,对 C 群链球菌、D 群链球菌、粪肠球菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、志贺氏菌、卡氏杆菌基因组 DNA 模板均无任何扩增产物,表明多重 PCR 具有很好的特异性。

2.6 SS 多重 PCR 检测方法的敏感性试验

SS 2 型参考菌株 S735 的密度为 2.52 × 10⁷ CFU/mL,10 倍系列稀释后提取其基因组 DNA 为

模板进行 PCR 扩增,分别取 5 μL 扩增产物上样电泳,可见该多重 PCR 的敏感性可达 10⁻⁴(图 5),即 2.52 × 10³ CFU/mL。

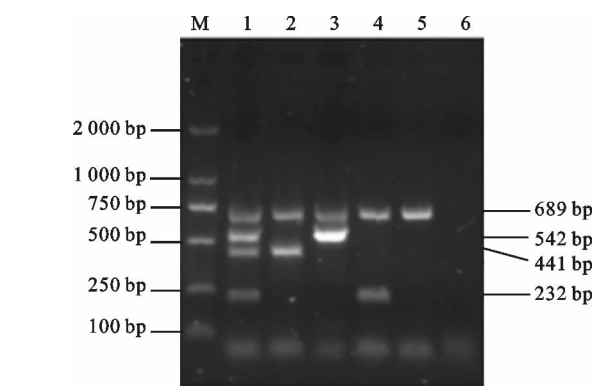


图 3 SS 的多重 PCR 扩增结果
M. DL2000 Marker;1. SS 1 型,SS 2 型,SS 7 型的混合样;
2. SS 1 型;3. SS 2 型;4. SS 7 型;5. SS;6. 阴性对照
Fig. 3 Results of multiplex PCR assay of *S. suis*
M. DL2000 Marker;1. SS type 1,2,7 mixture;2. SS type 1;
3. SS type 2;4. SS type 7;5. SS;6. Negative control

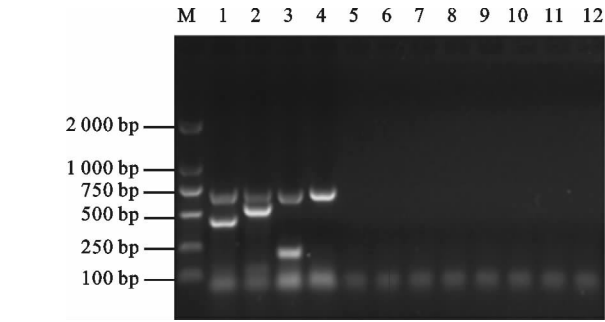


图 4 SS 多重 PCR 的特异性试验结果

M. DL2000 Marker;1. SS 1 型;2. SS 2 型;3. SS 7 型;4. SS;
5. C 群链球菌;6. D 群链球菌;7. 粪肠球菌;8. 大肠埃希氏菌;
9. 沙门氏菌;10. 巴氏杆菌;11. 志贺氏菌;12. 卡氏杆菌

Fig. 4 Specificity detection of the multiplex
PCR assay of *S. suis*

M. DL2000 Marker;1. SS type 1;2. SS type 2;3. SS type 7;
4. SS;5. Group C *Streptococcus*;6. Group D *Streptococcus*;
7. *Enterococcus faecalis*;8. *Escherichia coli*;
9. *Salmonella*;10. *Pasteurella*;11. *Shigella*;12. *Gallibacterium*

2.7 SS 多重 PCR 方法的重复性检测

图 6 显示,相同样品连续 3 次的 PCR 扩增结果基本一致,表明所建立的多重 PCR 方法具有良好的重复性。

2.8 SS 多重 PCR 方法的临床检测

对河南省范围内 39 份送检的病猪扁桃体样品进行多重 PCR 检测,部分临床样品的检测结果见图 7。由表 2 可知,39 份样品中共检测出猪链球菌阳性

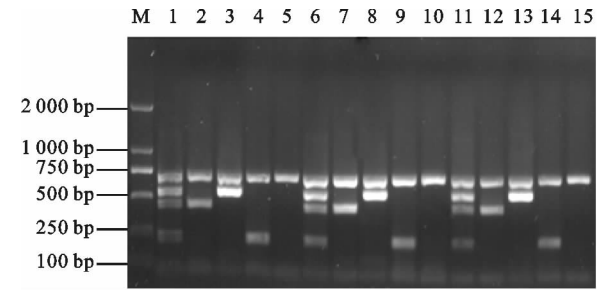


图 6 SS 多重 PCR 的重复性检测

M. DL2000 Marker;1. SS 1 型、SS 2 型、SS 7 型的混合样;
2. SS 1 型;3. SS 2 型;4. SS 7 型;5. SS;
6~10. 分别为 1~5 第 1 次重复的扩增结果;
11~15. 分别为 1~5 第 2 次重复的扩增结果

Fig. 6 Repeated amplification of
the multiplex PCR assay

M. DL2000 Marker;1. SS type 1,2,7 mixture;
2. SS type 1;3. SS type 2;4. SS type 7;5. SS;
6~10. The first repeated amplification of
the multiplex PCR assay;
11~15. The second repeated amplification of multiplex PCR assay

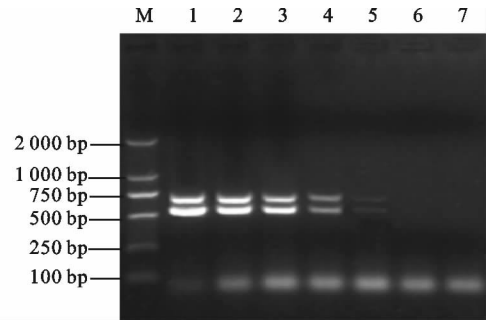


图 5 SS 2 型多重 PCR 的敏感性试验结果

M. DL2000 Marker;1~7. 分别为 10^0 , 10^1 , 10^2 ,
 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 倍稀释的 SS 2 型样品

Fig. 5 Sensitivity of the multiplex PCR assay on
the genomic DNAs of SS 2

M. DL2000 Marker;1~7. SS 2 genomic DNAs of
 2.52×10^7 CFU/mL diluted by 10-fold series
from 10^0 to 10^6

样品 38 份,其中 2 型(含 1/2 型)9 份,7 型 3 份,未检出 1 型。

2.9 SS 多重 PCR 检测方法的验证

对 SS 多重 PCR 检测方法进行验证,所有测序结果均与预期一致,序列已递交 GenBank,登录号为 GU358478—GU358486,这从分子水平上验证了该多重 PCR 的特异性。

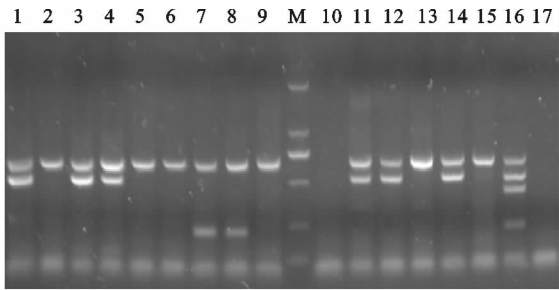


图 7 部分 SS 病料的多重 PCR 检测结果

M. DL2000 Marker;1. 来自南阳的病料;2~3. 来自洛阳的病料;
4~8. 来自鹤壁的病料;9~10. 来自新乡的病料;
11~12. 来自平顶山的病料;13. 来自焦作病料;14~15. 来自驻马店病料;16. SS 1 型、2 型、7 型混合样;17. 阴性对照

Fig. 7 Clinical detection results of partial samples detected
by the multiplex PCR assay

M. DL2000 Marker;1. Tonsil from Nanyang;
2~3. Tonsils from Luoyang;4~8. Tonsils from Hebi;
9~10. Tonsils from Xinxiang;11~12. Tonsils from Pingdingshan;
13. Tonsil from Jiaozuo;14~15. Tonsils from Zhumadian;
16. SS type 1,2 and 7 mixture;17. Negative control

表 2 39 份病猪扁桃体样品的检测结果

Table 2 Results of detecting 39 palatine tonsils samples from diseased pigs

地市 Area	病料份数 No. of samples	<i>gdh</i> 阳性 <i>gdh</i> ⁺	<i>cps1I</i> 阳性 <i>cps1I</i> ⁺	<i>cps2H</i> 阳性 <i>cps2H</i> ⁺	<i>cps7H</i> 阳性 <i>cps7H</i> ⁺
新乡 Xinxiang	14	13	0	0	0
驻马店 Zhumajian	2	2	0	1	0
平顶山 Pingdingshan	4	4	0	3	0
周口 Zhoukou	1	1	0	1	0
焦作 Jiaozuo	4	4	0	0	0
安阳 Anyang	2	2	0	0	1
濮阳 Puyang	1	1	0	0	0
商丘 Shangqiu	1	1	0	0	0
南阳 Nanyang	2	2	0	1	0
洛阳 Luoyang	2	2	0	1	0
鹤壁 Hebi	6	6	0	2	2
总计 Total	39	38	0	9	3

3 讨 论

猪链球菌按荚膜抗原的差异可分为 35 个血清型,包括 1~34 和 1/2 型,其谷氨酸脱氢酶基因是新近发现的猪链球菌进化上极其保守的基因,据报道,在猪链球菌 35 个血清型中,都存在 *gdh* 基因^[9,12]。该基因具有种特异性,比以前以 16S rDNA 为检测靶标的鉴定结果更可靠,可以准确区分猪链球菌与其他菌。另据文献报道,*cps1* 基因中 1F、1G、1I、1J 4 个开放性阅读框(ORF)是猪链球菌 1 和 14 型特有的;*cps2* 基因中 2F、2H、2I、2J 4 个 ORF 在猪链球菌 2 型和 1/2 型中高度保守,与其他型同源性极低^[10]。而猪链球菌 7 型 *cps* 基因中的 7H 开放性阅读框是可区别于其他型的基因片段。正是基于这些基因特点,本研究设计了 4 对特异性的引物,建立了 4 重 PCR,以快速、准确地检测猪链球菌种及其主要致病性血清型 1(14)、2(1/2)、7 型。特异性试验结果表明,该方法具有很好的特异性,用猪链球菌 2 型对该多重 PCR 方法的敏感性进行评价,结果显示,其敏感度可达 2.52×10^3 CFU/mL。验证试验结果进一步表明,该方法的特异性和准确性较好。该检测方法适合于纯细菌分离培养物、扁桃体组织等样本的检测,不仅能够检测出猪链球菌感染,而且能够同时区分主要致病性血清型,在实践中可以缩短鉴定细菌的时间。因此,该方法可以应用于猪链球菌的口岸进出境检疫,以及快速诊断和分子流行病学调查。

猪链球菌常存在于健康猪和病猪的扁桃体中,据报道,健康猪扁桃体的带菌率为 35%~70%^[13],甚至 100%^[14]。病猪扁桃体带菌率是否会更高,国内尚未见报道。本试验检测结果表明,病猪扁桃体

猪链球菌的带菌率很高,达 97%(38/39),这可能是由于病猪免疫力低下,使该菌继发感染所致。本试验共检出猪链球菌 2(1/2)型 9 份(23.1%),7 型 3 份(7.7%),未检测出 1(14)型,亦未检测到 2 型与 7 型混合感染,其余大部分(26/39,66.7%)是这些血清型之外的其他血清型,而据报道,这些血清型基本上是非致病的^[15]。然而,病原的携带(率)与疾病的发生缺乏明显的相关性^[16],即使是致病性血清型的猪链球菌,其毒力也有高、中、低甚至无毒之分。因此,从病猪体内分离到的这些致病血清型猪链球菌以及其他型猪链球菌在动物疾病中所扮演的角色,仍需作进一步细致的研究。

据报道,猪链球菌血清 1(14)、2(1/2)、7、9 型是病猪中经常流行的血清型,其与动物致病性有很大关系^[15]。本研究结果表明,利用本试验所建立的方法,从河南省各地市检测到的流行菌株主要为猪链球菌 2 型,特别是在黄河以南地区;在被检的 11 个地市的猪扁桃体样品中,仅鹤壁、安阳检出猪链球菌 7 型,迄今为止尚未在河南省检出猪链球菌 1 型。

本研究建立的多重 PCR 具有快速、敏感、简便以及同时鉴别多种血清型的特点,因此,有助于对猪链球菌病的流行病学研究、检验检疫、快速诊断、菌株鉴别以及有效防控措施的制定,对疫情监测、防止疫情扩散、食品安全及公共卫生具有重要意义和应用价值。

[参考文献]

[1] Chanter N, Jones P W, Alexander T J L. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*: a speculative review [J]. Vet Microbiol, 1993, 36: 39-55.

[2] Higgins M, Gottschalk R. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1997 [J]. Can Vet J, 1998, 39: 299-300.

- [3] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions [J]. Vet Microbiol, 2000, 76: 259-272.
- [4] Fittipaldi N, Collis T, Prothero B, et al. *Streptococcus suis* meningitis, Hawaii [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15 (12): 2067-2069.
- [5] Ishigaki K, Nakamura A, Iwabuchi S, et al. A case of *Streptococcus suis* endocarditis, probably bovine-transmitted, complicated by pulmonary embolism and spondylitis [J]. Kansenshogaku Zasshi, 2009, 83(5): 544-548.
- [6] Navacharoen N, Chantharochavong V, Hanprasertpong C, et al. Hearing and vestibular loss in *Streptococcus suis* infection from swine and traditional raw pork exposure in northern Thailand [J]. J Laryngol Otol, 2009, 123(8): 857-862.
- [7] Haleis A, Alfa M, Gottschalk M, et al. Meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 14, North America [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(2): 350-352.
- [8] Hidalgo A, Palacios R, Santos J. *Streptococcus suis* meningitis in Spain [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009, 27(3): 195.
- [9] Ogi Okwumabua, Michael O'Connor, Eileen Shull. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218: 79-84.
- [10] Hilde E Smith, Vincent Veenber Gen, Joeke Van Der Velde, et al. The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9, development of rapid serotype-specific PCR assays [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 10(37): 3146-3152.
- [11] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, et al. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3169-3175.
- [12] Ogi Okwumabua, Julia S P, Reddy P G. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001, 8: 251-257.
- [13] 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, 2008, 30(5): 344-348. Li C L, Yu W L, Jia A Q, et al. Carrier rate of *Streptococcus suis* in palatine tonsils of slaughter pigs in south China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(5): 344-348. (in Chinese)
- [14] Sandy A, Marcelo G, Lisa T, et al. *Streptococcus suis* a common cohabitant [J]. Pig Progress, 2001, 9: 8-9.
- [15] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries [J]. Vet Microbiol, 2000, 74: 237-248.
- [16] Arends J P, Hartwig N, Rudolph M. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs [J]. Clin Microbiol, 1984, 20: 945-947.

(上接第 23 页)

- [11] 刘树范, 周 彬. 肿瘤病理学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 85-86. Liu S F, Zhou B. Tumor pathology [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Joint Press, 1997: 85-86. (in Chinese)
- [12] 杨竹林, 李永国, 黄 生, 等. 胃癌组织中 PCNA 评分和 Bcl-2p53 蛋白表达及相互关系 [J]. 中国肿瘤临床, 1997, 24(11): 811. Yang Z L, Li Y G, Huang S, et al. Analysis of PCNA in stomach cancer tissue and express of Bcl-2p53 [J]. Chinese Cancer Clinic, 1997, 24(11): 811. (in Chinese)
- [13] 冯福才, 黄 文, 王继德, 等. 胃癌组织 P53 蛋白和 PCNA 的表达意义 [J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(10): 624. Feng F C, Huang W, Wang J D, et al. Clinical significance of P53 protein and PCNA expression in gastric carcinoma tissues [J]. China National Journal of Gastroenterology, 1997, 5(10): 624. (in Chinese)
- [14] Hall P A, Lane D P. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry [J]. J Pathol, 1994, 172(1): 1.
- [15] Rodrigus N R, Rowan A, Smith M E F, et al. p53 mutation in colorectal cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(19): 7555.
- [16] Visakorpi T, Kallionemi O, Heikkinen A, et al. Small subgroup of aggressive highly proliferating prostatic carcinoma defined by p53 accumulation [J]. J Natl Cancer Institute, 1992, 84(2): 883.