

# 猪链球菌检测技术研究进展

李繁<sup>1#</sup>, 彭泽仁<sup>2,3,4#</sup>, 刘荣启<sup>1</sup>, 孙洁<sup>5</sup>, 吴宗福<sup>2,3,4\*</sup>

- 1 深圳市动植物疫病预防控制中心, 广东 深圳
- 2 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京
- 3 农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京
- 4 世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京
- 5 深圳海关动植物检验检疫技术中心, 广东 深圳

李繁, 彭泽仁, 刘荣启, 孙洁, 吴宗福. 猪链球菌检测技术研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 883-897.

LI Fan, PENG Zeren, LIU Rongqi, SUN Jie, WU Zongfu. Advances in detection methods for *Streptococcus suis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 883-897.

**摘要:** 猪链球菌(*Streptococcus suis*)是猪的重要致病菌, 能够引发猪的脑膜炎、败血症、关节炎等多种疾病, 给养猪业带来严重的经济损失。此外, 该菌也能感染人类, 导致疾病甚至死亡, 是重要的人兽共患病原菌。因此, 建立准确、快速、灵敏且简便的检测技术对于猪链球菌病的防控至关重要。目前, 国内外已开发出多种猪链球菌检测技术, 包括传统的微生物学、分子生物学、免疫学方法, 以及基于纳米材料的免疫传感器、CRISPR-Cas12a系统、基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱等新型检测技术。本综述概述了上述技术的原理、应用及其优缺点, 并探讨了猪链球菌检测技术未来的发展方向, 旨在为猪链球菌病的防控提供重要参考。

**关键词:** 猪链球菌; 免疫学检测; 分子生物学检测方法; CRISPR-Cas12a; 免疫传感器

资助项目: 深圳市科技计划(KCXFZ20230731094003006)

This work was supported by the Shenzhen Science and Technology Program (KCXFZ20230731094003006).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

Received: 2024-10-15; Accepted: 2024-12-02; Published online: 2024-12-30

## Advances in detection methods for *Streptococcus suis*

LI Fan<sup>1#</sup>, PENG Zeren<sup>2,3,4#</sup>, LIU Rongqi<sup>1</sup>, SUN Jie<sup>5</sup>, WU Zongfu<sup>2,3,4\*</sup>

1 Shenzhen Animal and Plant Disease Prevention and Control Center, Shenzhen, Guangdong, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing, Jiangsu, China

4 WOA Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, Nanjing, Jiangsu, China

5 Animal and Plant Inspection and Quarantine Technology Centre of Shenzhen Customs, Shenzhen, Guangdong, China

**Abstract:** *Streptococcus suis*, a major pathogen of pigs, can cause meningitis, septicemia, and arthritis, leading to serious economic losses in the pig industry. In addition, it can also infect humans and result in diseases or death, being a zoonotic pathogen. Therefore, accurate, rapid, sensitive, and simple detection methods are critical for the prevention and control of swine streptococcosis. At present, a variety of detection methods for *S. suis* have been developed, including traditional detection methods of microbiology, molecular biology, and immunology and emerging technologies such as nanomaterial-based immunosensors, CRISPR-Cas12a system, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. This review summarizes the principles, applications, advantages, and disadvantages of the above methods and introduces the future directions of *S. suis* detection methods, aiming to provide reference for the prevention and control of swine streptococcosis.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; immunological assay; molecular biological detection method; CRISPR-Cas12a; immunosensor

猪链球菌是一种革兰阳性菌，可引起猪的脑膜炎、败血症、关节炎等疾病，是猪的重要致病菌，对养猪业造成严重的经济损失；同时，该菌也能感染人类，导致脑膜炎、败血症甚至死亡，是一种重要的人兽共患病原菌<sup>[1-3]</sup>。根据荚膜多糖抗原的差异，猪链球菌可分为 29 种传统血清型(1-19、21、23-25、27-31、1/2)<sup>[4]</sup>、Chz 血清型<sup>[5]</sup>以及 33 种新荚膜基因簇(NCL1-20、21a、21b、22-32)，此外还存在部分未定型菌株<sup>[6-10]</sup>。截至目前，已报道的感染人类的血清型已达 11 种，分别为血清 1、2、4、5、7、9、14、16、21、24、31 型<sup>[11-13]</sup>。1968 年，丹麦首次报道了猪链球菌感染人类的病例，随后在亚洲、欧洲、南美洲、北美洲、大洋洲、非洲等

地区均有猪链球菌感染人类的报道<sup>[2,14]</sup>。在中国，1998 年江苏暴发了猪链球菌感染人类疫情，共感染 25 例，其中 14 例死亡<sup>[15]</sup>；2005 年四川也暴发了猪链球菌感染人类事件，共感染 215 例，其中 38 例死亡<sup>[16]</sup>；2006 年之后，中国猪链球菌感染人类的事件主要发生在广西等地区<sup>[17]</sup>。因此，开发准确、快速、敏感且简便的猪链球菌检测技术对于猪链球菌病的防控至关重要。

目前，国内外已经开发了多种用于猪链球菌检测的技术，包括传统的微生物学、分子生物学和免疫学方法，以及新兴的基于纳米材料的免疫传感器和 CRISPR-Cas12a 系统等技术。本文综述了这些技术的原理、应用及其优劣势，

并展望了猪链球菌检测技术的未来发展方向,旨在为猪链球菌病的防控提供参考。

## 1 传统微生物学检测技术

传统微生物学检测方法主要涉及对细菌的分离培养、生化鉴定和血清分型。将来自健康或发病动物的样品进行低温冷藏,并运送至实验室进行处理;样品经过匀浆后,将匀浆液加入到猪链球菌选择性液体培养基中,在 37 °C 条件下培养;随后将培养物划线接种于加入 5% 脱纤维绵羊血的猪链球菌选择性固体培养基上,37 °C 培养后,挑取呈现草绿色  $\alpha$  溶血环、针尖大小的菌落进行进一步的鉴定<sup>[1]</sup>。传统的生化鉴定方法可参考文献[18]。法国梅里埃公司将传统的生化鉴定试剂制备成微型化鉴定试剂盒,并基于统计学原理和计算机技术形成了 API 鉴定系统<sup>[19]</sup>。Haleis 等<sup>[19]</sup>从加拿大一名疑似猪链球菌感染患者的脑脊液中分离出疑似菌落,并通过 API20 链球菌系统鉴定为猪链球菌。然而,链球菌属细菌的生化试验反应较为活泼,菌株之间差异较大,且表型不稳定,因此还需要结合其他检测方法进行验证。例如,Hommeiz 等从病死猪中分离出 188 株猪链球菌,使用 API20 鉴定系统的阳性率仅为 90%<sup>[20]</sup>。

## 2 分子生物学检测技术

### 2.1 聚合酶链式反应(PCR)

聚合酶链式反应(PCR)技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简便等优点,可在短时间内提供准确的检测结果。该技术在猪链球菌检测中得到了广泛应用。

#### 2.1.1 普通 PCR

Okwumabua 等<sup>[21]</sup>根据猪链球菌 2 型谷氨酸脱氢酶基因(glutamate dehydrogenase gene, *gdh*)设计了引物,建立了 PCR 检测方法,但该方法

无法区分猪链球菌和类猪链球菌。随后, Ishida 等<sup>[22]</sup>基于猪链球菌重组/修复蛋白基因(*recN*)设计了引物,建立了更具特异性的检测方法,并通过与 *gdh* 的 PCR 检测对比,证实了 *recN* 的特异性,该基因也被广泛用于猪链球菌的临床检测和流行病学研究。然而,鉴于猪链球菌的遗传多样性,近年来发现某些 *recN* 阳性菌株并非猪链球菌,因此采用 *gdh* 和 *recN* 双阳性标准能更准确地鉴定猪链球菌。本课题组采用此双阳性标准,调查了屠宰场健康猪的感染情况,发现四川、重庆、江苏、浙江、广西地区的健康猪携带猪链球菌的阳性率分别为 10.80%、51.95%、55.65%、62.59%、84.21%<sup>[23-26]</sup>。与传统微生物学方法相比,普通 PCR 法更为快速简便,且具有较高的灵敏度和特异性。

#### 2.1.2 多重 PCR (m-PCR)

多重 PCR (multiplex PCR, m-PCR)技术是在常规 PCR 基础上发展起来的,能同时扩增多个 DNA 片段,快速确定多种病原体或不同血清型,显著提高了检测效率。Silva 等<sup>[27]</sup>基于猪链球菌的管家基因 *gdh*、荚膜(1、2、7 和 9 型)合成相关基因(*cps*)以及毒力相关基因(*epf*、*mrp*、*sly* 和 *arcA*)建立了 m-PCR 检测方法。研究发现分离株存在 24 种不同的荚膜基因型,其中 45% 的侵袭性疾病发病猪来源的猪链球菌由 *cps2/mrp<sup>+</sup>/epf<sup>+</sup>/sly<sup>+</sup>* 和 *cps9/mrp<sup>\*</sup>/epf<sup>+</sup>/sly<sup>+</sup>* 两种基因型引起,该研究还首次发现了致病性 *cps9* 菌株的特定毒力相关基因型<sup>[27]</sup>。2012 年, Kerdsin 等建立了基于血清型特异性 *cps* 基因的多重 PCR 检测方法,通过 179 株人源猪链球菌及 109 株猪源猪链球菌验证发现,该方法可以区分来自人类和猪的 15 种血清型猪链球菌分离株<sup>[28]</sup>。2014 年, Kerdsin 等<sup>[29]</sup>基于前期研究开发了能够在 4 种反应中检测猪链球菌的所有传统血清型的多重 PCR 检测方法,采用 184 株人源猪链球菌和

109 株猪源猪链球菌进行验证, 发现 29 种血清型均能检测到。Liu 等<sup>[30]</sup>开发了基于多糖聚合酶基因 *wzy* 检测猪链球菌 *cps* 血清型的多重 PCR 方法, 能检测除血清 1、14、2、1/2 型外的所有血清型, 发现血清型 9、20 检测灵敏度为  $10^5$  CFU/mL, 其余血清型检测灵敏度为  $10^4$  CFU/mL。Qiu 等<sup>[7]</sup>建立了一种能同时识别 17 种新荚膜基因簇菌株 (novel capsular polysaccharide loci, NCL) 的多重 PCR 检测系统, 并通过 486 株猪链球菌分离株和 62 株非猪链球菌进行验证, 鉴定出 276 株携带 NCLs 基因簇的菌株。文德亮等<sup>[31]</sup>建立了可同时检测猪链球菌 2 型、副猪格拉菌、猪丹毒丝菌的多重 PCR 方法, 并评价了其灵敏度, 对猪链球菌 2 型质粒检测下限为  $3.5 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ ; 选择猪链球菌、副猪格拉菌、猪丹毒丝菌和其他 4 种细菌检测其特异性, 该方法特异性强; 采用该方法检测 72 份猪关节液样品, 其中 2 份呈猪链球菌 2 型阳性。

相较于普通 PCR 法, 多重 PCR 法检测范围更广, 能显著提高检测效率, 并降低检测成本, 更适用于临床检测。然而, 由于同一反应体系中引物的竞争作用, 其灵敏度可能会有所降低。

### 2.1.3 荧光定量 PCR 检测技术

荧光定量 PCR 技术不仅扩增效率高, 而且探针特异性强、灵敏度高, 该技术已广泛应用于病原微生物的检测<sup>[32]</sup>。该技术能解决免疫学检测的“窗口期”问题, 区分当前感染和既往感染, 这是抗体检测目前无法达到的。Nga 等<sup>[33]</sup>以 *cps2J* 为靶基因, 建立了靶向检测猪链球菌血清 2 型的实时荧光定量 PCR 检测方法, 采集了 114 份确诊的猪链球菌 2 型菌株感染患者的脑脊液样本进行验证, 灵敏度为 100%, 随后对收集的 238 份脑脊液 (cerebro-spinal fluid, CSF) 样本进行检测, 其中 101 份样品 (42.4%) 鉴定为猪链球菌 2 型。Srinivasan 等<sup>[34]</sup>针对猪链球菌纤

维连接蛋白结合蛋白基因 (*fbpS*) 开发了一种检测猪链球菌的荧光定量 PCR 检测方法, 评价发现该方法的灵敏度为  $<10$  拷贝/次; 检测猪链球菌和 42 种其他细菌发现, 该方法特异性较强, 采用 25 份脑脊液样本进行验证, 15 份样本为阳性, 10 份样本为阴性。雷宇平等<sup>[35]</sup>根据 GenBank 中已登录的 SS 抗原基因的保守区建立了荧光定量 PCR 方法, 灵敏度为 100 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 特异性较强; 采用该方法检测 30 份疑似猪链球菌感染的临床样本, 阳性率 90%, 显著高于传统分离方法。

实时荧光定量 PCR 技术的发明实现了从定性到定量的飞跃, 但该技术对仪器和检测人员的技术要求较高。

### 2.2 环介导等温扩增技术(LAMP)

环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种由日本学者 Notomi 于 2000 年开发的核苷酸扩增技术, 具有特异性强、灵敏度高、简单快速等特点, 且不需要昂贵设备<sup>[36]</sup>。Huy 等<sup>[37]</sup>针对猪链球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 基因设计了 LAMP 引物, 并验证了其对这 4 种细菌检测的灵敏度均为 100 CFU/mL; 采用奈瑟菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌测试方法的特异性, 结果发现 LAMP 对 4 种细菌的检测具有高度特异性, 与脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌和大肠杆菌无交叉反应。Zhu 等<sup>[38]</sup>根据猪链球菌血清 2 型菌株 05ZYH33 的 89 kb 毒力岛基因序列设计 4 条引物, 应用 LAMP 检测了 21 株 2 型菌株、18 株其他链球菌、9 株葡萄球菌、5 株其他种属菌株和 49 份未知样本, 发现 LAMP 法仅对含有 89 kb 毒力岛的 2 型菌株检测结果为阳性, 特异性较强; 应用 LAMP 检测 49 份不同来源样本 89 kb 毒力岛基因, 结果均为阴性, 其中 32 份为不明原因发热患者鼻咽拭

子, 15 份为正常急诊猪扁桃体咽拭子, 2 份为疑似猪链球菌 2 型感染患者的血样, 这与普通 PCR 和荧光定量 PCR 的结果一致。Arai 等<sup>[39]</sup>开发了一种针对 *recN* 的新型 LAMP 方法, 用于评估生猪肉中的猪链球菌, 使用不同血清型猪链球菌评估该方法的特异性, 所有血清型均呈阳性, 最低检出限为 5.4 CFU/反应; 采用该方法对 966 份样本进行检测, 其中 255 份样本检测到猪链球菌, 阳性率为 26.4%。

相较于 PCR 方法, LAMP 技术显著提高了扩增效率, 缩短了检测时间, 且设备简单、检测成本低、人员技术要求低, 但引物设计要求严格, 且有可能产生非特异性扩增<sup>[40]</sup>。

### 2.3 可视化重组酶聚合酶扩增-侧流层析技术(RPA-LFD)

重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种以 DNA 为模板的等温扩增技术(图 1A)<sup>[41]</sup>。该技术的重组酶与引物形成复合物, 在双链 DNA 序列中找到同源序列后, 将引物插入同源位点, 形成 D-loop 环结构, 此时单链结合蛋白稳定互补链, 使引物与模板链互补结合, 重组酶被分解, 在聚合酶的作用下, 合成新的互补链, 并置换原有互补链, 循环重复上述过程达到指数扩增效果<sup>[42]</sup>。侧流层析试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 是基于免疫识别杂交技术, 使待检测物中各组分通过毛细管作用力的移动速度差异, 在反应基质上实现分离的色谱系统。RPA-LFD 技术是在 RPA 反应中采用 2 种不同标记物标记的引物对[如生物素和荧光素 (carboxyfluorescein, FAM)]进行扩增, 得到带有 2 种不同标记物的核酸, 在试纸条的结合垫上添加能与 FAM 特异性结合的物质, T 线上喷涂能与生物素特异性结合的物质, C 线喷涂能与结合垫上物质结合的抗体, 用于质控, 通过目测观察结果, 适用于临

床快速检测(图 1B)<sup>[42]</sup>。LFD 方法能将扩增结果可视化, 因此可以将 RPA 结果与 LFD 方法相结合。张闪闪等<sup>[43]</sup>针对猪链球菌谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)建立了可同时检测猪链球菌所有血清型的可视化 RPA-LFD 技术。通过评价该方法的灵敏度和特异性发现, 猪链球菌 RPA-LFD 法检测灵敏度可达 100 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 优于常规 PCR 法; 利用优化后的 RPA 反应体系及条件对猪链球菌和其他 8 种常见致病菌进行检测发现, 不与 8 种其他常见病原菌发生交叉反应, 特异性较强; 利用临床 45 例疑似猪链球菌感染样本对 RPA-LFD 法进行评估发现, RPA-LFD 法检测猪链球菌阳性率为 42.2%, 高于普通多重 PCR 法的 40.0%, 具有较好的临床实用性。

RPA-LFD 作为一种快速、灵敏的恒温核酸扩增技术, 无需特殊仪器, 对检测人员技术要求低, 相较于 PCR 技术, 更适用于临床快速检测<sup>[44]</sup>。

## 3 免疫学检测技术

免疫学检测技术是基于抗原抗体特异性结合的原理, 通过猪链球菌表面特异性抗原刺激机体产生特异性抗体, 从而达到检测和诊断的目的。各种检测技术的特异性、敏感性、优缺点各不相同, 因此根据技术特点及检测对象选择合适的免疫学检测技术, 更适合临床快速检测(表 1)。

### 3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 广泛用于多种病原微生物的检测, 它根据抗原-抗体相互作用的原理, 利用酶和比色检测来量化目标分子, 主要用于检测和量化生物样品中特定的抗体或抗原。

Vecht 等<sup>[45]</sup>建立了 2 种双抗体夹心法 ELISA 用于检测猪链球菌, 使用特异性单克隆抗体针

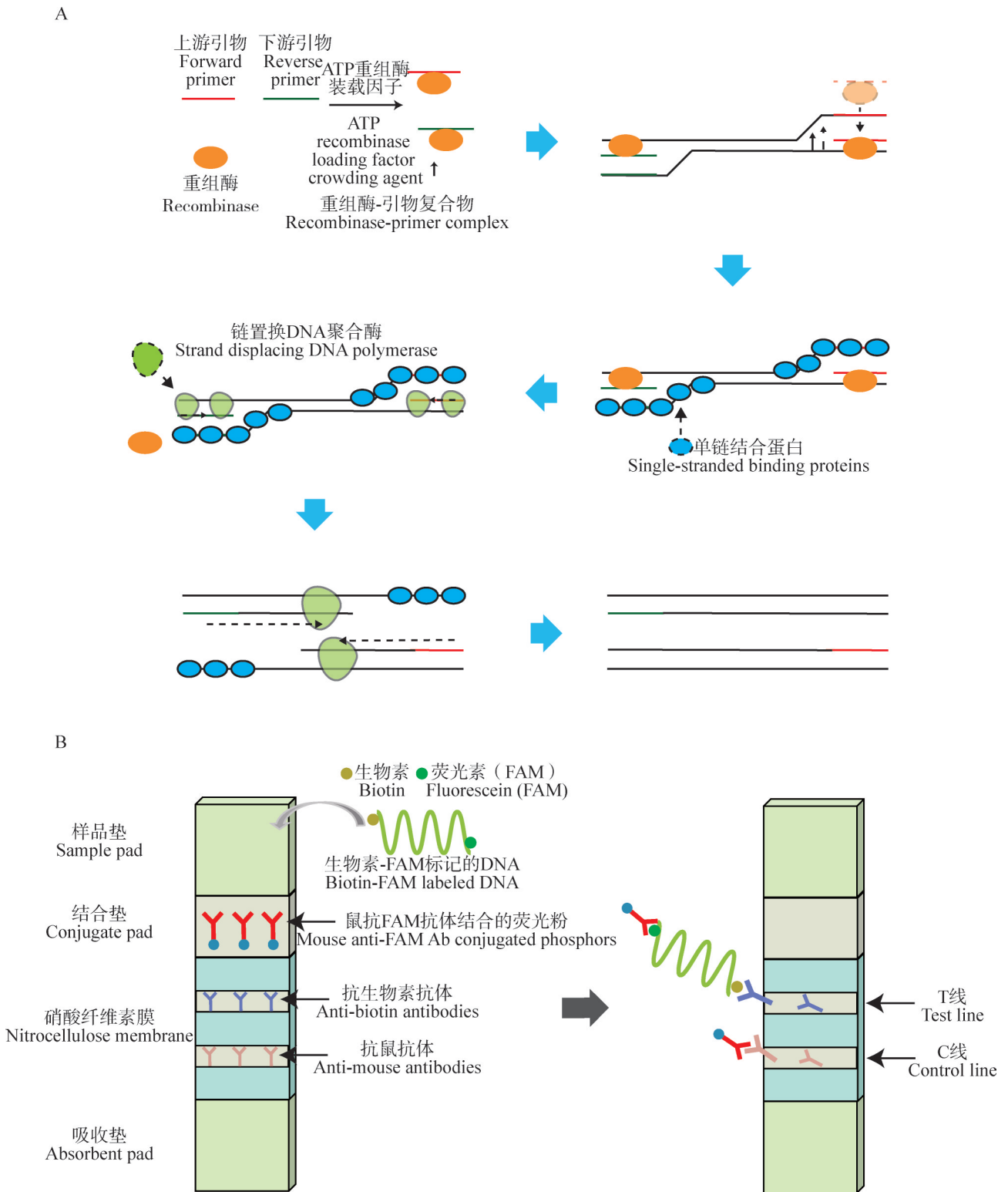


图1 RPA-LFD技术原理图。A: RPA原理图; B: LFD原理图。

Figure 1 RPA-LFD schematic diagram. A: RPA schematic diagram; B: LFD schematic diagram.

表1 免疫学检测技术

Table 1 Immunological detection techniques

免疫学检测技术 Immunological detection techniques	特异性 Specificity	灵敏度 Sensitivity	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
ELISA	强 High	高 High	操作简单;稳定性较好 Easy to operate; good stability	样品制备难度大;耗时长 Difficult sample preparation; time-consuming
GICA	强 High	较低 Low	操作简单;适合临床现场观察结果 Easy to operate; suitable for on-site clinical observation of results	稳定性较差;易受环境中离子浓度和pH值的影响 Poor stability; easily affected by ion concentration and pH in the environment
IMS	强 High	高 High	操作简便;从复杂样品中富集目标检测对象;稳定性好 Easy to operate; enrichment of target detection objects from complex samples; Good stability	磁珠存在非特异性吸附;磁珠回收率低 Non-specific adsorption of magnetic beads; low recovery rate of magnetic beads

对猪链球菌 2 型的 2 个毒力因子 MRP 和 EPF; 检测了 179 株猪链球菌血清 2 型、22 株猪链球菌血清 1-22 型、22 株其他链球菌、20 株其他细菌和 1 株酵母菌, 结果发现通过 ELISA 检测 MRP 和 EPF 蛋白的结果与免疫印迹结果相符, 表明所建立的 ELISA 方法可用于检测猪链球菌血清 2 型的致病菌株和非致病菌株。Del Campo Sepúlveda 等<sup>[46]</sup>将猪链球菌荚膜多糖作为抗原, 建立了针对猪链球菌血清 2 型抗体的 ELISA 检测方法 (capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA, CPS-ELISA), 并与全菌作为抗原的 ELISA 方法 (whole cell antigen-based ELISA, WCA-ELISA) 进行了比较, 发现 WCA-ELISA 的特异性非常低, 而标准化的 CPS-ELISA 在浓度为 0.1 mg/孔时, 显著减少了交叉反应。

ELISA 技术操作简单, 其敏感性、特异性、稳定性较好, 适用于临床大规模流行病学调查。然而, 该技术也存在样品制备难度大和耗时长等缺点。

### 3.2 胶体金免疫层析法(GICA)

胶体金免疫层析法 (gold immunochromatographic assay, GICA) 是以胶体金作为示踪标志物的一种免疫标记技术, 具有操作方便、可视化、不需要复杂的专用设备等优点。Yang 等<sup>[47]</sup>采用了标记有葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 的胶体金颗粒作为检测试剂, 开发了一种用于检测猪链球菌 2 型抗体的 GICA, 通过检测攻毒猪链球菌血清 2 型菌株后存活的 14 只猪血清和 24 只抗猪链球菌 2 型的高免血清样品, 该 GICA 的特异性和灵敏度分别为 97.1% 和 86.3%, 与 ELISA 结果高度一致。Ju 等<sup>[48]</sup>采用柠檬酸还原法制备胶体金颗粒标记的猪链球菌 2 型多克隆抗体, 建立了检测猪链球菌 2 型的 GICA, 胶体金的最佳抗体标记量为 22  $\mu\text{g/mL}$ , 包被抗体的最佳浓度为 2 mg/mL, 检测下限为  $10^6$  CFU/mL, 检测时间为 5-15 min, 与其他病原体及 15 种猪链球菌其他血清型无交叉反应, 说明该方法操作简便、灵敏度高、特异性强,

可用于猪链球菌 2 型的快速早期筛查和检测。Lu 等<sup>[49]</sup>基于 *htpsC* 基因开发了一种检测猪链球菌多种血清型的 GICA 法, 使用 15 nm 胶体金制备胶体金-多克隆抗体偶联物, 检测限为  $1 \times 10^3$  CFU/mL, 与大肠杆菌、肠炎链球菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、化脓性链球菌、无乳链球菌、粪肠杆菌等常见致病菌不发生交叉反应, 具有良好的特异性, 在 1、2、4、7、9、14 血清型菌株中, 除 9 型外, 其余均为阳性。

尽管 GICA 具有诸多优点, 但其稳定性易受环境中离子浓度和 pH 值的影响, 且灵敏度不高, 难以实现定量测定。

### 3.3 免疫磁珠技术(IMS)

免疫磁珠技术(immune microbead, IMS)是一种通过抗原抗体特异性反应及磁珠的磁性反应进行分离和富集的技术, 由于免疫磁珠粒径小、比表面积大, 因此可捕获较多的待测物, 并直接在其表面进行酶显色、荧光或同位素显示, 该技术具有快速、灵敏度高、重复性好等优点。此外, IMS 还可以消除基质干扰并从复杂样品中富集目标检测对象<sup>[50]</sup>。Gottschalk 等<sup>[51]</sup>开发了一种可以从扁桃体中富集猪链球菌血清 2 型或 1/2 型的 IMS 技术, 采用超顺磁聚苯乙烯珠包被针对猪链球菌血清 2 型或 1/2 型的单克隆抗体(MAb)或纯化的免疫球蛋白 G, 检出限为  $10^1$  CFU/0.1 g 扁桃体; 常规检测技术检测血清 1/2 型的阳性率为 46%, 检测血清 2 型的阳性率为 27%, 而 IMS 技术检测血清 1/2 型的阳性率为 100%, 检测血清 2 型的阳性率为 76%, 均显著高于常规检测技术, 这为猪链球菌 2 型或 1/2 型的分离提供了一种快速准确的方法。

免疫磁珠技术具有操作简便、分离效率高、稳定性良好等优点。然而, 磁珠存在非特异性吸附、回收率较低等问题, 需进一步优化 IMS

的应用效率及可靠性。

## 4 新型检测技术

### 4.1 基于纳米材料的免疫传感器

免疫传感器是基于抗原与抗体相互识别原理设计的生物传感器, 由受体、转换器及放大器三部分构成; 它借助抗体或抗原的高度特异性识别功能, 将生物分子信息转化为电化学信号, 实现对目标分子的快速、准确检测; 与传统的培养方法相比, 免疫传感器基于抗原-抗体特异性结合, 具有更高的灵敏度<sup>[52]</sup>。免疫传感器检测时间短, 通常仅需几分钟或几十分钟, 因此已广泛应用于病原检测领域<sup>[53-56]</sup>。此外, 该技术与新型纳米生物材料和纳米复合材料的联合应用, 进一步拓展了其应用范围。

一些纳米材料具有与生物酶相似的特性。例如, Pt-Pd 纳米材料(hollow Pt-Pd bimetal alloy nanoparticles, HPtPd)具有大的比表面积、良好的生物相容性和高的催化能力, 还能催化  $H_2O_2$  分解生成  $O_2$ , 作为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的模拟酶。因此, Wang 等<sup>[57]</sup>构建了超灵敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)免疫传感器检测猪链球菌 2 型, 其中 HPtPd 与葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)联合构成双酶系统(图 2)。在葡萄糖存在的情况下, GOD 从这种底物中产生  $H_2O_2$ , HPtPd 作为一种 HRP 模拟酶将  $H_2O_2$  分解为  $O_2$ ,  $O_2$  作为  $S_2O_8^{2-}$  的助反应物, 有效地放大了 ECL 信号并显著提高了灵敏度; ECL 免疫传感器的电化学发光强度与猪链球菌 2 型核酸浓度在 0.000 1–100 ng/mL 范围内呈线性相关, 检出限为 33 fg/mL<sup>[57]</sup>。与上述策略类似, Wang 等<sup>[58]</sup>制备了 L-半胱氨酸(L-Cys)连接富勒烯(C60)功能化空心钯纳米笼(PdNCs)的纳米复合材料(C60-L-Cys-PdNCs), 并固定在其上; GOD 从葡

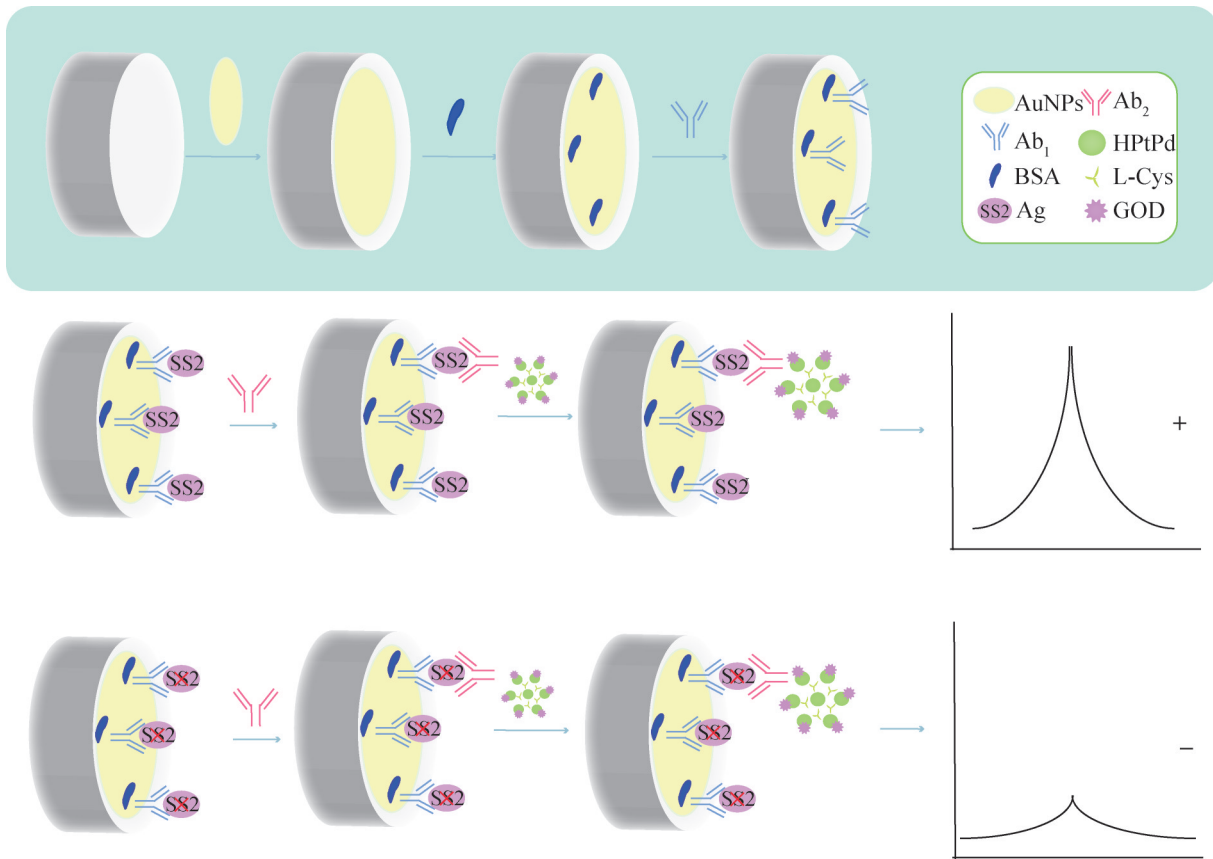


图2 ECL免疫传感器的制备及反应机理示意图

Figure 2 Preparation and reaction mechanism diagram of ECL immune sensor.

葡萄糖中产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ , PdNCs 分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成  $\text{O}_2$ , 从而增强  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  ECL 信号, 该方法对猪链球菌 2 型抗原的线性检测范围为 0.1 pg/mL–100 ng/mL, 检测限为 33.3 fg/mL, 能够实现猪链球菌 2 型抗原的灵敏检测。

#### 4.2 基于 CRISPR-Cas 平台的检测技术

微生物适应性免疫系统(CRISPR-Cas)是原核生物的一种天然免疫系统, 存在 6 种 CRISPR-Cas 类型和至少 29 种亚型<sup>[59]</sup>。CRISPR 序列被转录加工成小的 CRISPR RNA (crRNA), 指导 Cas 蛋白靶向并降解外源核酸<sup>[60-62]</sup>。一些 Cas 蛋白(如 Cas12a)在识别到靶标后被激活, 并切割周围非特异性单链 DNA, 这种现象被称为反式切割<sup>[63-64]</sup>。CRISPR 检测通过激活 Cas 蛋白的反式

切割活性, 切碎荧光标记探针, 发出荧光信号, 从而完成靶标核酸检测。Wang 等<sup>[65]</sup>通过结合 RPA 和 CRISPR-Cas12a 技术, 建立了一种可以检测猪链球菌血清 2 型和 1/2 型的方法(图 3)。Cards-SSJ 法是基于猪链球菌血清 2 型 *cps2J* 基因中高度保守的 302 bp 序列建立的检测方法, 采用 12 种常见猪病原体、29 种不同的猪链球菌血清型菌株及 10 株其他链球菌属菌株来验证该方法的特异性, 发现与这些菌株无交叉反应, 表明 Cards-SSJ 检测方法对猪链球菌血清 2 型和 1/2 型具有高度特异性; 该方法的检测限为 10 CFU, 但无法区分血清 2 型和 1/2 型<sup>[66]</sup>。为了区分猪链球菌血清 2 型和 1/2 型, Wang 等<sup>[65]</sup>随后根据 *cps1/2K* 基因的第 483 位点开发了一种

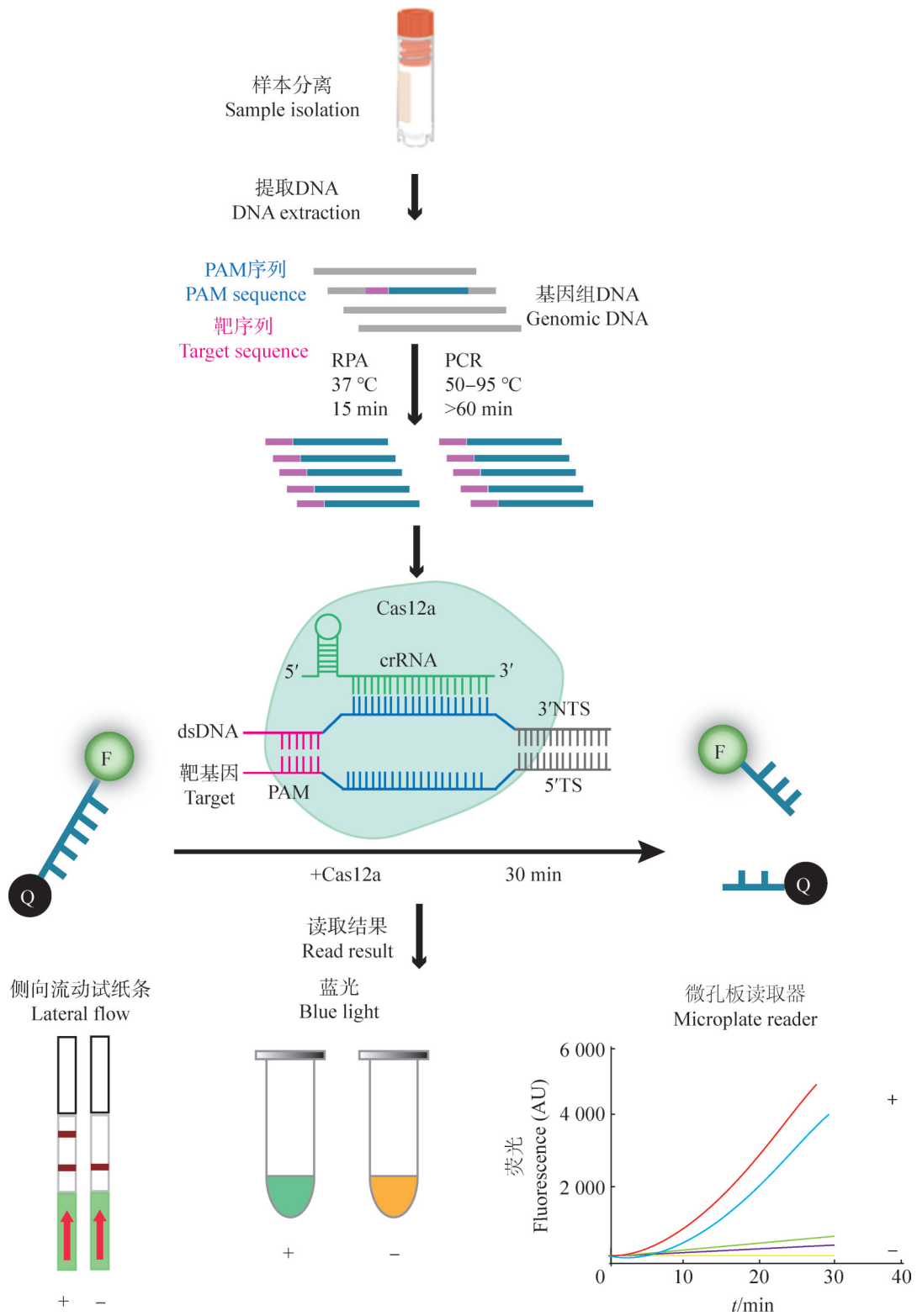


图3 Cards-SSJ/K方法原理图

Figure 3 Schematic diagram of the Cards-SSJ/K method.

Cards-SSK 法, 该方法可以通过荧光强度的不同区分血清 2 型和 1/2 型; 随后, 结合 Cards-SSJ 和 Cards-SSK 法, 评估了 Cards-SSJ/K 检测方法的临床实用性; 采用 Cards-SSJ/K、PCR、qPCR 方法检测了 104 份样本, Cards-SSJ/K 鉴定出 72 份阳性样本, qPCR 鉴定出 71 份阳性样本, 而 PCR 法仅检测出 31 份阳性样本, Cards-SSJ/K 和 qPCR 的检出率几乎一致, 远高于 PCR。相比于 PCR 和 qPCR 法, Cards-SSJ/K 只需要一个简单的温控装置即可完成放大过程, 相关人员只需要简单培训即可现场读取结果。因此, Cards-SSJ/K 方法简单、快速、方便, 非常适合临床检测。

### 4.3 融合机器学习的基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来发展起来的一种微生物诊断技术, 其基本构造包括进样系统、离子源、飞行时间分析器和离子检测器。其工作原理是: 离子源通过激光轰击待测样品, 形成带电荷的生物分子从而发生电离, 电离的生物分子在电场的作用下加速通过飞行管道, 根据到达检测器的时间及离子的数量得到质荷比值( $m/z$ )及信号值, 进而形成相应的峰图(图 4)<sup>[67]</sup>。MALDI-TOF MS 可根据微生物菌体内高丰度、表达稳定和进化保守的核糖体蛋白, 检测具有属、种或亚型特异性的生物信号, 从而实现细菌的快速、准确分型<sup>[68-70]</sup>。2015 年, MALDI-TOF MS 首次被评估为鉴定猪链球菌的替代工具<sup>[71]</sup>。2021 年, 这项技术被证实具有区分猪链球菌血清型的能力<sup>[72]</sup>。此外, 研究人员还结合机器学习进一步提高了 MALDI-TOF MS 技术的准确性。例如, Wang 等<sup>[67]</sup>通过融合随机森林机器学习算法建立了检测猪链球菌血清 2 型并区分其毒力的 MALDI-TOF MS 检测方法; 通过

对 137 株猪链球菌进行检测发现, 该方法在区分猪链球菌 2 型与其他血清型方面的准确率为 90.5%, 在区分 2 型中的毒力菌株和无毒力菌株方面的准确率为 92.7%。

MALDI-TOF MS 具有灵敏度高、分辨率高、图谱简明、速度快等优点, 而且其制样简便, 可实现微量化、大规模、并行化和高度自动化处理待检生物样品。然而, 该技术的设备复杂, 对实验室条件要求高, 因此较难推广于基层兽医的使用中。此外, 由于该技术依赖于数据库, 对于缺乏质谱数据库的细菌, 该方法无法进行鉴定。此外, 不良的样品或基质极易造成污染, 对检测结果产生严重影响。

## 5 总结与展望

当前, PCR 技术依然是检测猪链球菌病原的主流手段。然而, 该技术对专业人员、设备的依赖以及易污染等缺陷限制了其在基层的广泛应用。胶体金免疫层析法等免疫学检测技术虽然适用于临床快速诊断, 但其灵敏度和准确性仍有待提升。免疫传感器结合纳米材料展现出灵敏度高、体积小、操作便捷、自动化等优势; CRISPR-Cas 系统则以高灵敏度、强特异性及快速检测为特点; MALDI-TOF MS 技术同样具备高灵敏度、高分辨率、图谱简明、检测速度快等优点, 展现出良好的应用前景。尽管如此, 这些新型检测技术目前价格较为昂贵, 临床应用推广尚面临一定难度。在临床上, 猪链球菌常与其他病原如胸膜肺炎放线杆菌、副猪格拉菌等混合感染, 且不同血清型猪链球菌的混合感染也颇为常见(如血清型 2、4、5、7、8、9 型等)。因此, 未来临床诊断的发展方向应根据猪链球菌混合感染的情况, 建立准确、简便、快速、灵敏、特异且易于推广的检测方法。在实验室检测中, 应考虑应用猪链球菌抗体或核

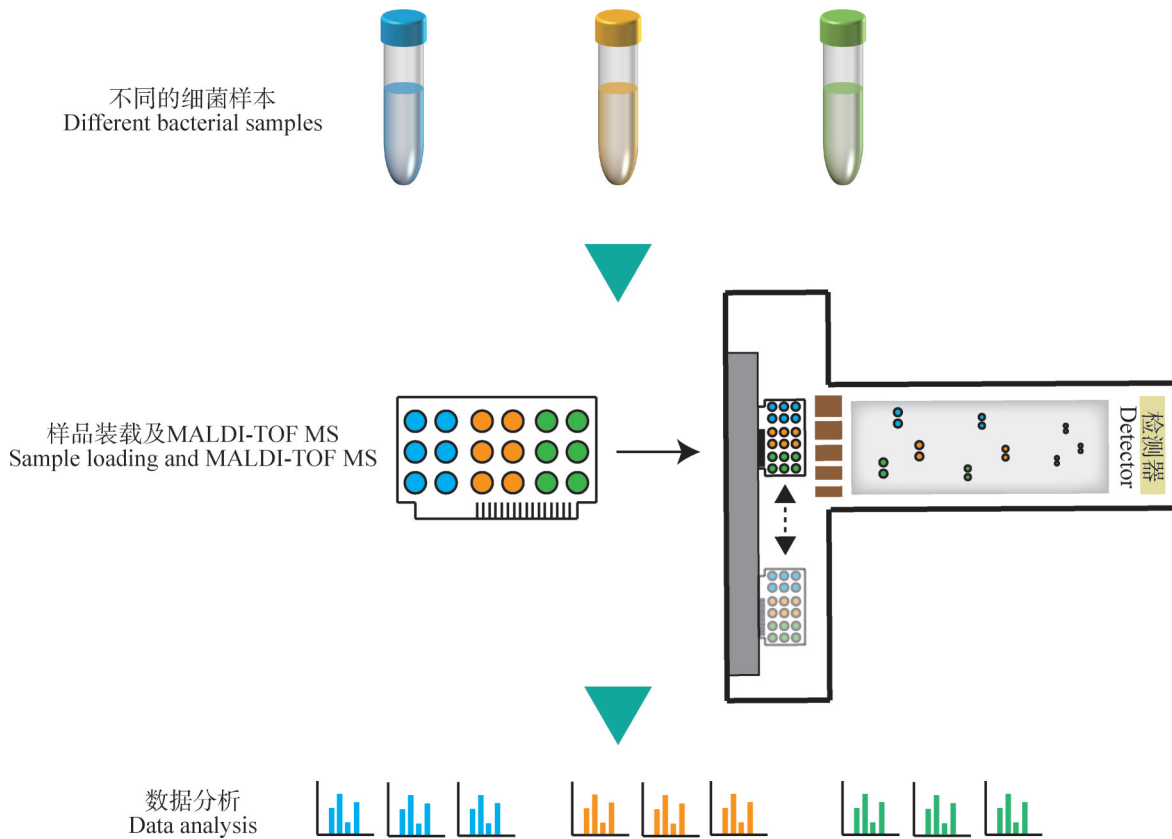


图4 MALDI-TOF MS方法原理图

Figure 4 Schematic diagram of MALDI-TOF MS.

酸类标准物质，以提高检测方法的准确性和可靠性。此外，微流控检测技术作为近年来发展起来的新型检测技术，具有样本需求量少、高通量、灵敏度高、易于集成和便携等优点，今后可考虑将该技术应用于猪链球菌检测。

### 作者贡献声明

李繁：论文设计；彭泽仁：论文撰写；刘荣启：论文设计；孙洁：论文撰写；吴宗福：论文审阅与修改。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### 参考文献

- [1] 陆承平, 吴宗福. 猪链球菌病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.  
LU CP, WU ZF. Swine Streptococcosis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [2] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER JP, XU JG, SEGURA M, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(6): e45.
- [3] SEGURA M, FITTIPALDI N, CALZAS C, GOTTSCHALK M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical?[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(7): 585-599.
- [4] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, ARAI S, OSAWA R, SEKIZAKI T, TAKAMATSU D. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*[J]. *Pathogens*, 2016, 5(3): 45.
- [5] PAN ZH, MA JL, DONG WY, SONG WC, WANG KC, LU CP, YAO HC. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 976-985.

- [6] ZHENG H, JI SB, LIU ZJ, LAN RT, HUANG Y, BAI XM, GOTTSCHALK M, XU JG. Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(12): 4111-4119.
- [7] QIU XT, BAI XM, LAN RT, ZHENG H, XU JG. Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(24): 7102-7112.
- [8] HUANG JH, LIU X, CHEN H, CHEN L, GAO XP, PAN ZH, WANG J, LU CP, YAO HC, WANG LP, WU ZF. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant nontypeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(2): 995-1003.
- [9] BOJARSKA A, JANAS K, PEJSAK Z, OTULAK-KOZIEL K, GARBACZEWSKA G, HRYNIEWICZ W, SADOWY E. Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 240: 108534.
- [10] KRÁLOVÁ N, FITTIPALDI N, ZOUHAROVÁ M, NEDBALCOVÁ K, MATIAŠKOVÁ K, GEBAUER J, KULICH P, ŠIMEK B, MATIAŠOVIC J. *Streptococcus suis* strains with novel and previously undescribed capsular loci circulate in Europe[J]. Veterinary Microbiology, 2024, 298: 110265.
- [11] LIU ZY, XU QH, LIANG PJ, PENG ZR, YAO HC, ZHENG H, WU ZF. The characteristics of population structure and antimicrobial resistance of *Streptococcus suis* serotype 8, a non-negligible pathotype[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e2495-e2505.
- [12] LIANG PJ, WANG ML, GOTTSCHALK M, VELA AI, ESTRADA AA, WANG JP, DU PC, LUO M, ZHENG H, WU ZF. Genomic and pathogenic investigations of *Streptococcus suis* serotype 7 population derived from a human patient and pigs[J]. Emerging Microbes & Infections, 2021, 10(1): 1960-1974.
- [13] ZHU JL, WANG JP, KANG WM, ZHANG XY, KERDSIN A, YAO HC, ZHENG H, WU ZF. *Streptococcus suis* serotype 4: a population with the potential pathogenicity in humans and pigs[J]. Emerging Microbes & Infections, 2024, 13(1): 2352435.
- [14] PERCH B, KRISTJANSEN P, SKADHAUGE K. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis[J]. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, 1968, 74(1): 69-76.
- [15] TANG J, BAI W, ZHU J, GUO HB. Epidemiological and pathogenic study on the outbreak of toxic shock syndrome and meningocephalitis caused by swine *Streptococcus*[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2004, 19(1): 59-63.
- [16] YU HJ, JING HQ, CHEN ZH, ZHENG H, ZHU XP, WANG H, WANG SW, LIU LG, ZU RQ, LUO LZ, XIANG NJ, LIU HL, LIU XC, SHU YL, LEE SS, CHUANG SK, WANG Y, XU JG, YANG WZ, GROUPS SSS. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6): 914-920.
- [17] KANG WM, WANG ML, YI XL, WANG JP, ZHANG XY, WU ZF, WANG Y, SUN H, GOTTSCHALK M, ZHENG H, XU JG. Investigation of genomic and pathogenicity characteristics of *Streptococcus suis* ST1 human strains from Guangxi Zhuang Autonomous Region (GX) between 2005 and 2020 in China[J]. Emerging Microbes & Infections, 2024, 13(1): 2339946.
- [18] Robert A, Whiley JMH. *Streptococcus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria[J]. John Wiley & Sons and Bergey's Manual Trust, 2009. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00612.
- [19] HALEIS A, ALFA M, GOTTSCHALK M, BERNARD K, RONALD A, MANICKAM K. Meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 14, North America[J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(2): 350-352.
- [20] HOMMEZ J, DEVRIESE LA, HENRICHSEN J, CASTRYCK F. Identification and characterization of *Streptococcus suis*[J]. Veterinary Microbiology, 1986, 11(4): 349-355.
- [21] OKWUMABUA O, O'CONNOR M, SHULL E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(1): 79-84.
- [22] ISHIDA S, TIEN LHT, OSAWA R, TOHYA M, NOMOTO R, KAWAMURA Y, TAKAHASHI T, KIKUCHI N, KIKUCHI K, SEKIZAKI T. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 107: 66-70.
- [23] 都玉, 刘召颖, 彭泽仁, 吴宗福. 重庆屠宰场猪链球菌感染的调查[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(6): 58-65.
- DU Y, LIU ZY, PENG ZR, WU ZF. Investigation on *Streptococcus suis* infection in some slaughterhouses of Chongqing[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(6): 58-65 (in Chinese).
- [24] 刘召颖, 朱夏雨, 牛洪颖, 万欣, 吴宗福. 浙江某市屠宰场猪链球菌血清型、耐药及致病特征[J]. 微生物学报, 2022, 62(8): 3236-3250.
- LIU ZY, ZHU XY, NIU HY, WAN X, WU ZF. Serotypes, antimicrobial resistance, and pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* isolated from a slaughterhouse in an area of Zhejiang Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 3236-3250 (in Chinese).
- [25] 彭泽仁, 吴宗福. 广西、四川两地屠宰场猪链球菌致病特征分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4714-4725.
- PENG ZR, WU ZF. Pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* isolated from slaughterhouses in Sichuan and Guangxi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4714-4725 (in Chinese).
- [26] 许杨, 王瑞光, 彭泽仁, 吴宗福. 2023年江苏地区屠宰场健康猪源猪链球菌致病与耐药特征[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 211-224.
- XU Y, WANG RG, PENG ZR, WU ZF. The pathogenic and antimicrobial resistance characteristics of *Streptococcus suis* isolates from healthy pigs at slaughterhouses in Jiangsu Province, 2023[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 211-224.
- [27] SILVA LMG, BAUMS CG, REHM T, WISSELINK HJ, GOETHE R, VALENTIN-WEIGAND P. Virulence-

- associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(1/2/3): 117-127.
- [28] KERDSIN A, DEJSIRILERT S, AKEDA Y, SEKIZAKI T, HAMADA S, GOTTSCHALK M, OISHI K. Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61(Pt 12): 1669-1672.
- [29] KERDSIN A, AKEDA Y, HATRONJIT R, DETCHAWNA U, SEKIZAKI T, HAMADA S, GOTTSCHALK M, OISHI K. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63(Pt 6): 824-830.
- [30] LIU ZJ, ZHENG H, GOTTSCHALK M, BAI XM, LAN RT, JI SB, LIU HC, XU JG. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72070.
- [31] 文德亮, 俞向前, 叶承荣, 何随彬, 陈亮, 朱建国, 浦坚华, 宋德义. 猪关节病重要病原体多重PCR检测方法的建立及应用[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(9): 100-103.  
WEN DL, YU XQ, YE CR, HE SB, CHEN L, ZHU JG, PU JH, SONG DY. Establishment and application of multiplex PCR detection method for important pathogens of porcine arthropathy[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(9): 100-103 (in Chinese).
- [32] TANG YL, ZHANG XY, WU W, LU ZY, FANG WH. Inactivation of the *sodA* gene of *Streptococcus suis* type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4): 360-366.
- [33] NGA TVT, NGHIA HDT, TU LTP, DIEP TS, MAI NTH, CHAU TTH, SINH DX, PHU NH, NGA TTT, CHAU NV, CAMPBELL J, HOA NT, CHINH NT, HIEN TT, FARRAR J, SCHULTS C. Real-time PCR for detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in cerebrospinal fluid of human patients with meningitis[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70(4): 461-467.
- [34] SRINIVASAN V, McGEE L, NJANPOP-LAFOURCADE BM, MOÏSI J, BEALL B. Species-specific real-time PCR assay for the detection of *Streptococcus suis* from clinical specimens[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016, 85(2): 131-132.
- [35] 雷宇平, 王仲兵, 杨治平, 张仲萍, 王治维, 胡明明. 猪链球菌荧光定量PCR检测方法的建立及临床应用[J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(12): 84-87.  
LEI YP, WANG ZB, YANG ZP, ZHANG ZP, WANG ZW, HU MM. Establishment of fluorescence quantitative PCR for *Streptococcus suis* detection and its clinical application[J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(12): 84-87 (in Chinese).
- [36] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [37] HUY NT, HANG LTT, BOAMAH D, LAN NTP, van THANH P, WATANABE K, HUONG VTT, KIKUCHI M, ARIYOSHI K, MORITA K, HIRAYAMA K. Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 337(1): 25-30.
- [38] 朱水荣, 王志刚, 余昭, 张政, 梅玲玲, 杨婷婷, 卢亦愚. 应用 LAMP 技术鉴定 <sup>89</sup>K 毒力岛 2 型猪链球菌菌株[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(7): 659-667.  
ZHU SR, WANG ZG, YU Z, ZHANG Z, MEI LL, YANG TT, LU YY. Discriminating strains of *Streptococcus suis* serotype 2 of 89K pathogenicity island by loop-mediated isothermal amplification technology[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26(7): 659-667.
- [39] ARAI S, TOHYA M, YAMADA R, OSAWA R, NOMOTO R, KAWAMURA Y, SEKIZAKI T. Development of loop-mediated isothermal amplification to detect *Streptococcus suis* and its application to retail pork meat in Japan[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 208: 35-42.
- [40] MATSON RS. ELISA essentials: surfaces, antibodies, enzymes, and substrates[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2612: 19-31.
- [41] LI YL, LI L, FAN XX, ZOU YL, ZHANG YQ, WANG QH, SUN CY, PAN SD, WU XD, WANG ZL. Development of real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification (RPA) for rapid detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples and its comparison with real-time PCR test[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 17760.
- [42] ZHANG SS, WANG CY, MENG KY, LIU J. Recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) designed for rapid detection of canine distemper virus[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2024, 86(5): 584-591.
- [43] 张闪闪, 何斌, 李书光, 刘明成, 姜金庆, 胡建和, 雷连成, 沈志强, 夏小静. 可视化 RPA-LFD 技术快速检测猪链球菌[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(2): 538-547.  
ZHANG SS, HE B, LI SG, LIU MC, JIANG JQ, HU JH, LEI LC, SHEN ZQ, XIA XJ. Rapid detection of *Streptococcus suis* with visual RPA-LFD technology[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(2): 538-547 (in Chinese).
- [44] DRAIN PK, HYLE EP, NOUBARY F, FREEDBERG KA, WILSON D, BISHAI WR, RODRIGUEZ W, BASSETT IV. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(3): 239-249.
- [45] VECHT U, WISSELINK HJ, ANAKOTTA J, SMITH HE. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Veterinary Microbiology*, 1993, 34(1): 71-82.
- [46] del CAMPO SEPÚLVEDA EM, ALTMAN E, KOBISCH M, D'ALLAIRE S, GOTTSCHALK M. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA[J]. *Veterinary Microbiology*, 1996, 52(1/2): 113-125.
- [47] YANG JX, JIN ML, CHEN JF, YANG Y, ZHENG P, ZHANG AD, SONG YF, ZHOU HB, CHEN HC. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Streptococcus suis* type 2 antibody[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, 19(4): 355-361.
- [48] JU Y, HAO HJ, XIONG GH, GENG HR, ZHENG YL, WANG J, CAO YY, YANG YH, CAI XH, JIANG YQ.

- Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 133(2/3/4): 207-211.
- [49] LU YW, WANG SB, CAI XS, CAO M, LU QY, HU D, CHEN Q, XIONG XH. A rapid colloidal gold immunochromatographic assay based on polyclonal antibodies against HtpC protein for the detection of *Streptococcus suis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1294368.
- [50] FEDIO WM, JINNEMAN KC, YOSHITOMI KJ, ZAPATA R, WENDAKOON CN, BROWNING P, WEAGANT SD. Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148(2): 87-92.
- [51] GOTTSCHALK M, LACOUTURE S, ODIERNO L. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 from swine tonsils[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(9): 2877-2881.
- [52] KWON SJ, KIM E, YANG H, KWAK J. An electrochemical immunosensor using ferrocenyl-tethered dendrimer[J]. *Analyst*, 2006, 131(3): 402-406.
- [53] LI L, LIANG LZ, WU H, ZHU XH. One-dimensional perovskite manganite oxide nanostructures: recent developments in synthesis, characterization, transport properties, and applications[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2016, 11(1): 121.
- [54] JIN YD. Multifunctional compact hybrid Au nanoshells: a new generation of nanoplasmonic probes for biosensing, imaging, and controlled release[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(1): 138-148.
- [55] SKRABALAK SE, CHEN JY, SUN YG, LU XM, AU L, COBLEY CM, XIA YN. Gold nanocages: synthesis, properties, and applications[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41(12): 1587-1595.
- [56] HANSEN JA, MUKHOPADHYAY R, HANSEN JØ, GOTHELF KV. Femtomolar electrochemical detection of DNA targets using metal sulfide nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(12): 3860-3861.
- [57] WANG HJ, YUAN R, CHAI YQ, CAO YL, GAN XX, CHEN YF, WANG Y. An ultrasensitive peroxydisulfate electrochemiluminescence immunosensor for *Streptococcus suis* serotype 2 based on l-cysteine combined with mimicking bi-enzyme synergetic catalysis to *in situ* generate coreactant[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 43: 63-68.
- [58] WANG HJ, BAI LJ, CHAI YQ, YUAN R. Synthesis of multi-fullerenes encapsulated palladium nanocage, and its application in electrochemiluminescence immunosensors for the detection of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Small*, 2014, 10(9): 1857-1865.
- [59] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(8): 490-507.
- [60] GAO P, YANG H, RAJASHANKAR KR, HUANG ZW, PATEL DJ. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition[J]. *Cell Research*, 2016, 26(8): 901-913.
- [61] NUÑEZ JK, HARRINGTON LB, KRANZUSCH PJ, ENGELMAN AN, DOUDNA JA. Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 535-538.
- [62] SWARTS DC, van der OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(2): 221-233.e4.
- [63] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [64] LI SY, CHENG QX, LIU JK, NIE XQ, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a has both *Cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491-493.
- [65] WANG L, SUN J, ZHAO JY, BAI JY, ZHANG YL, ZHU Y, ZHANG WJ, WANG CL, LANGFORD PR, LIU SG, LI G. A CRISPR-Cas12a-based platform facilitates the detection and serotyping of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Talanta*, 2024, 267: 125202.
- [66] DEKKER N, DAEMEN I, VERSTAPPEN K, de GREEFF A, SMITH H, DUIM B. Simultaneous quantification and differentiation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 by quantitative real-time PCR, evaluated in tonsillar and nasal samples of pigs[J]. *Pathogens*, 2016, 5(3): 46.
- [67] WANG ZH, ZHOU Y, GUO GL, LI Q, YU YF, ZHANG W. Promising potential of machine learning-assisted MALDI-TOF MS as an effective detector for *Streptococcus suis* serotype 2 and virulence thereof[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(11): e0128423.
- [68] BIZZINI A, GREUB G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16(11): 1614-1619.
- [69] NOMURA F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2015, 1854(6): 528-537.
- [70] CROXATTO A, PROD'HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(2): 380-407.
- [71] PÉREZ-SANCHO M, VELA AI, GARCÍA-SECO T, GOTTSCHALK M, DOMÍNGUEZ L, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL JF. Assessment of MALDI-TOF MS as alternative tool for *Streptococcus suis* identification[J]. *Frontiers in Public Health*, 2015, 3: 202.
- [72] CHAIDEN C, JARESITTHIKUNCHAI J, KERDSIN A, MEEKHANON N, ROYTRAKUL S, NUANUALSUWAN S. *Streptococcus suis* serotyping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0249682.