



# 基于多酶恒温快速扩增检测猪链球菌及其3种主要血清型方法的建立及应用

胡章玉,张永青,陈忆廉,许发芝,常馨月,方富贵,李 亮,孙 裴,刘雪兰\*

(安徽农业大学动物医学院,合肥 230036)

**摘 要:**猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)影响养猪业的重要病原菌之一。本文基于多酶恒温快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术建立快速检测SS及其血清2、7、9型3种主要临床血清型的新方法,该方法可在20~41℃温度下5~30 min内完成扩增,具有良好的特异性和敏感性;应用MIRA方法能够快速检测临床分离菌株中相应血清型,且与PCR方法的符合率为100%。上述结果表明,本研究所建立的MIRA方法可为临床诊断猪链球菌感染提供简便快捷的方法。

**关键词:**猪链球菌;血清型;多酶恒温快速扩增技术;快速检测

中图分类号: S852.611

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0564-05

## Development and Evaluation of the Multienzyme Isothermal Rapid Amplification Assays for Detection of *Streptococcus suis* and Its Three Serovars

HU Zhangyu, ZHANG Yongqing, CHEN Yilian, XU Fazhi, CHANG Xinyue, FANG Fugui, LI Liang, SUN Pei, LIU Xuelan\*

(College of Veterinary Medicine, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** *Streptococcus suis* (SS) is one of the important pathogens causing serious economic losses in the pig farming industry. Here, we developed a novel rapid detection method for detecting SS and serovars 2, 7 and 9 based on multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) technology. The MIRA assays were validated for detection of SS and its serovars within 5 to 30 min at 20-41 °C, with relative higher specificity and sensitivity. There are 100% agreement between our MIRA and PCR methods in the detection of clinical samples. Our results showed that the MIRA was a useful diagnostic method for rapid diagnosis of SS infection.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; serovars; MIRA; rapid detection

\* **Corresponding author:** LIU Xuelan, E-mail: liuxuelan203@163.com

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是影响全球养猪业的重要病原体之一,同时也是一种影响公共卫生的病原体。SS主要定植于猪的上呼吸道,尤其是

扁桃体和鼻腔,或通过伤口感染,引起猪的急性败血症、脑膜炎、关节炎、心内膜炎、肺炎等疾病<sup>[1]</sup>,对养猪业造成严重影响。SS结构较复杂,血清型众

收稿日期:2024-12-12

基金项目:安徽省高等学校科学研究重点项目(2022AH050898)

作者简介:胡章玉,本科生,主要从事病原微生物学研究,E-mail:2951231612@qq.com;张永青,硕士生,主要从事病原微生物学研究,E-mail:zhangyongqing0401@163.com。胡章玉和张永青是同等贡献作者

\* 通信作者:刘雪兰,主要从事病原微生物与免疫学研究,E-mail:liuxuelan203@163.com

多,临床上根据其荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)基因的差异将SS分为29个血清型,因各个血清型之间存在的毒力因子不尽相同,从而导致临床上的发病症状也有所不同,其中SS2型对猪和人的致病性较强,影响公共卫生安全,此外,SS7和SS9型的感染在国内区域流行呈上升趋势<sup>[2-4]</sup>,这对控制猪链球菌病的发生带来了新的挑战,因此对猪链球菌感染的快速检测十分重要。

由于SS的生化反应差异较大,传统分离培养及生化鉴定技术难以将其准确分类,免疫学检测方法因相当比例的菌株不能定型,具有很大的不稳定性,容易出现交叉反应。目前,以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为代表的分子生物学技术在临床应用最广泛<sup>[5]</sup>,多重PCR可以同时检测不同病原<sup>[6]</sup>,纳米PCR特异性强,操作方便,具有广阔的应用前景<sup>[7]</sup>,但上述方法均耗时长且操作复杂,依赖较为昂贵的仪器设备,因此,建立一种快速简便且对仪器设备要求不高的检测方法,对猪链球菌病防控具有重要意义。

多酶恒温快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术是一种新的等温扩增技术,在多种功能蛋白(解旋酶、单链结合蛋白、重组酶、DNA聚合酶)的协同作用下,于室温即可快速实现核酸扩增,对DNA模板不需要高温循环变性扩增,其反应过程始终在恒温下进行,对仪器的要求大大降低<sup>[8]</sup>。李盛杰和江海涛<sup>[9]</sup>建立了MIRA快速检测霍乱弧菌。本研究基于MIRA技术建立快速检测SS及其临床主要血清型2型(SS2)、7型(SS7)和9型(SS9)的方法,并将该方法应用于36份临床分离菌株的检测,为快速检测SS感染提供参考方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、肠外致病性大肠杆菌(*extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC)、肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*, SE)临床分离菌株均为安徽农业大学病原微生物实验室保存。36株疑似SS菌株分离自病死猪的脾脏、肺脏、脑、关节液等,大部分菌株分离自安徽合肥、宿州和六安等,江苏盱眙、来龙和草堰等,少数

来自广西贵港、山东泰安以及黑龙江绥化。

### 1.2 引物的合成与筛选

参考SS编码谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, *gdh*)基因以及NCBI上GenBank登录的SS2(BR001000.1)、SS7(BR001004.1)、SS9(BR001006.1)血清型的*Cps*基因的保守序列,通过Primer Premier 5.0软件设计MIRA扩增引物,序列均由安徽通用生物股份有限公司合成,引物信息见表1。

### 1.3 细菌基因组DNA的提取及MIRA反应体系的建立

按照细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)操作步骤对细菌培养物进行基因组DNA的提取并通过Nanodrop进行核酸浓度的测定。参考DNA恒温快速扩增试剂盒(潍坊安普未来生物科技有限公司)步骤并稍作修改进行MIRA体系配制和扩增反应。在每个反应管中加入Buffer A(5.9  $\mu$ L)、10  $\mu$ mol上游引物(0.4  $\mu$ L)、10  $\mu$ mol下游引物(0.4  $\mu$ L)、ddH<sub>2</sub>O和DNA模板(2.8  $\mu$ L)、Buffer B(0.5  $\mu$ L),充分混合并短暂离心后于37  $^{\circ}$ C金属浴进行扩增反应。反应结束后,向每个反应管加入2.0  $\mu$ L的6 $\times$ Loading buffer,置于56  $^{\circ}$ C孵育5 min,以2.0%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。

### 1.4 MIRA检测温度和时间的优化

设置反应温度分别为20、25、30、35、39、41  $^{\circ}$ C,反应时间分别为5~30 min进行MIRA反应,分析扩增结果确定最佳反应温度和时间。

### 1.5 MIRA检测特异性和灵敏性

选用SS及各种血清型的最佳引物对,以SS种属和SS2、SS7、SS9血清型的基因组DNA为模板进行MIRA扩增反应,以APP、HPS、Pm、ExPEC、SE等临床常见猪细菌性病原DNA为对照,分析其特异性。再以10<sup>n</sup>梯度稀释的基因组DNA为模板进行MIRA扩增,分析其灵敏度。

### 1.6 临床分离菌株的MIRA检测

对36份SS临床分离菌株进行MIRA检测,并以PCR检测作为对照,比较两种方法的符合率。

## 2 结果

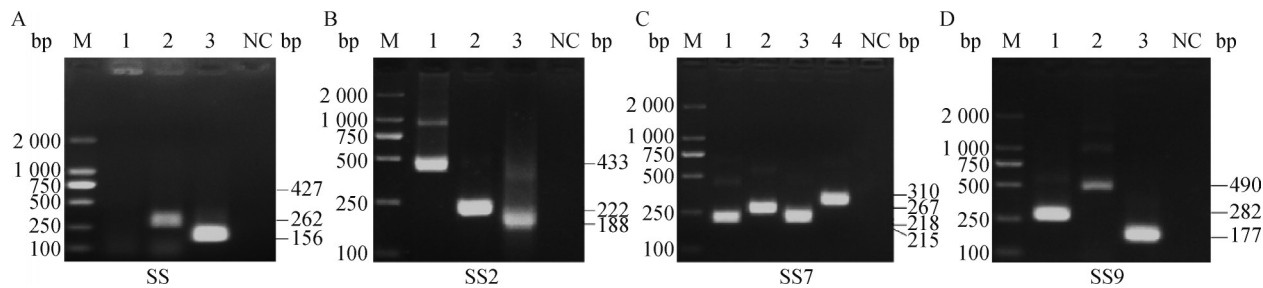
### 2.1 MIRA引物的筛选

针对SS以及SS2、SS7与SS9血清型的MIRA引物筛选结果如图1所示, MIRA引物中SS-F2/

表 1 用于 MIRA 检测 SS 及 3 种血清型的引物

Table 1 Primers for MIRA detection of SS and 3 serovars

| SS 及其血清型<br>SS and serovars | 名称<br>Name of primer | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence                                   | 片段长度/bp<br>Length |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------|
| SS                          | SS-F1/R1             | CAGAAACTGTCTTTATGCGATTGATT<br>AGTCATTAAATTGTGGACGAGAGAGCT        | 427               |
|                             | SS-F2/R2             | GTAGGCTAACTAAAGCGGGCGATTGG<br>ATTACGGGGTCATTTTGCCGAGTTCC         | 262               |
|                             | SS-F3/R3             | CCCATCCACCGTAAGACTAAGGTTTC<br>CTTAGTTAGCCTACTGCGTCCCTCCA         | 156               |
| SS2                         | SS2-F1/R1            | GGGGTTCGTATTAACCTACTTGGCGTA<br>TTAAGGGCATTTCAAGCGTTCCATTC        | 433               |
|                             | SS2-F2/R2            | ACTTTAGACTATGCTATAAGGGTTAGACGC<br>TTCTACTGTTGCAGATAGGACTACAATGAT | 222               |
|                             | SS2-F3/R3            | TTTAGGTTGGAATGGAACGCTTGAAATG<br>CTCTACTGTTGCAGATAGGACTACAATG     | 188               |
| SS7                         | SS7-F1/R1            | TAGAGGTAGGTGGATTGCGTTCTTG<br>AACACCCTGGATAGCCGTAATTGTA           | 215               |
|                             | SS7-F2/R2            | TAATAATGCCCTCGTGGAATACAGCTAAGT<br>GGTGCCATAAATCATCTGAATCCAAGAACG | 267               |
|                             | SS7-F3/R3            | TAGAGGTAGGTGGATTGCGTTCTTG<br>ATTCAAACACCCTGGATAGCCGTAATT         | 218               |
|                             | SS7-F4/R4            | TTAGTAGTAGGTGCTGGAGATGGTGGG<br>ATGTTACCCGCCATAATGTCTTCAATGC      | 310               |
| SS9                         | SS9-F1/R1            | TATCAGACTGCATACAGGGCAGAAG<br>ATCACAAGCAACCTGGGCAACAAAA           | 282               |
|                             | SS9-F2/R2            | TTGTCTCTCAAAATAAATCTAATCAGGGGC<br>GAATTGTGAAACGACTTGCTACTAGAGGAT | 490               |
|                             | SS9-F3/R3            | GGAAGTATTGGCAACGAAGAAGGGA<br>CACATCATCAACAGCCTCTATATCCGC         | 177               |



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;A~D. 分别为 SS、SS2、SS7 与 SS9 血清型的 MIRA 扩增结果;1~4. 利用不同引物进行 MIRA 扩增的结果;NC. ddH<sub>2</sub>O 为模板的 MIRA 对照

M. DL2000 DNA marker; A-D. MIRA primer screening for SS (A), SS2 (B), SS7 (C) or SS9 (D), respectively; 1-4. Products of MIRA amplification using different primers. NC. ddH<sub>2</sub>O as template for MIRA control

图 1 MIRA 检测 SS 血清型的引物筛选

Fig. 1 MIRA primers screening for SS and its serovars detection

R2、SS2-F2/R2、SS7-F3/R3 和 SS9-F3/R3 具有相对较高的扩增效率和良好的特异性,可用于后续试验。

## 2.2 MIRA 检测温度和时间的优化

优化 MIRA 检测反应条件的结果显示,在温度为 20~41 ℃ 时,应用 MIRA 均可检测出 SS 及其

SS2、SS7和SS9型,扩增速度快且效率较高的反应温度分别为30、35、30和35℃。应用MIRA扩增5 min即可检测出SS及SS2、SS7和SS9,但是目的条带相对较弱,延长反应时间至10 min以上可获得较为清晰的目的条带。由此可见,应用MIRA方法可快速检测SS及SS2、SS7和SS9。

### 2.3 MIRA检测的特异性分析

以猪源主要病原菌APP、HPS、Pm、ExPEC和SE等临床分离菌株为参考,用筛选出的MIRA引物对SS种属、SS2、SS7和SS9进行扩增。结果显示MIRA-SS、MIRA-SS2、MIRA-SS7和MIRA-SS9方法能够进行特异性检测,而与APP、HPS、Pm、ExPEC和SE等无明显交叉反应。显示了MIRA反应良好的特异性。

表2 应用MIRA检测SS临床分离菌株的结果

Table 2 Detection of SS Clinical isolates using MIRA or PCR assays

| 检测方法             | 总数(n) | SS阳性数(n)    | SS2阳性数(n)    | SS7阳性数(n)    | SS9阳性数(n)    | 符合率/%            |
|------------------|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| Detection method | Total | SS positive | SS2 positive | SS7 positive | SS9 positive | Coincidence rate |
| MIRA             | 36    | 30          | 2            | 1            | 10           | 100              |
| PCR              | 36    | 30          | 2            | 1            | 10           | 100              |

## 3 讨 论

猪链球菌病是影响养猪业的一种重要的细菌病,死亡率可高达90%<sup>[10]</sup>,给养猪业造成了较大的经济损失。SS不同的血清型菌株中存在的主要毒力因子不同,导致患病动物发病的临床症状也不同,对能否及时采取应对措施带来了挑战。因此,迫切需要建立一种快速、有效和简便的检测方法。目前,临床上多采用PCR、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等方法检测SS,如裴嘉琪<sup>[11]</sup>建立了多重PCR检测SS,最低检测限为100 pg·μL<sup>-1</sup>;刘博婷等<sup>[12]</sup>建立的LAMP方法检测SS2型时,相较于普通PCR检测方法,具有更高的准确性,但该方法也容易出现假阳性的情况。

MIRA方法是一种新兴的等温扩增技术,具有反应时间短、反应温度容易实现、操作简便等优点,由于不需要使用复杂的反应仪器,反应在常温下或水浴锅就可以进行,具有良好的应用前景。在近些年的研究中,MIRA广泛应用于检测各种物质,如Wang等<sup>[13]</sup>建立了MIRA快速检测海豚链球菌的方法并将MIRA方法与侧向流动试纸条相结合;Sun

### 2.4 MIRA检测灵敏性分析

将SS(718 ng·μL<sup>-1</sup>)及SS2(718 ng·μL<sup>-1</sup>)、SS7(96 ng·μL<sup>-1</sup>)、SS9(191 ng·μL<sup>-1</sup>)基因组DNA进行10<sup>0</sup>~10<sup>-7</sup>梯度稀释后进行MIRA扩增。结果显示,MIRA-SS和MIRA-SS2最低可检测7.18 pg·μL<sup>-1</sup> DNA,而MIRA-SS7和MIRA-SS9最低检测限为0.96 pg·μL<sup>-1</sup>和1.91 pg·μL<sup>-1</sup>。

### 2.5 MIRA的临床分离株检测结果分析

为了验证MIRA在临床检测的应用,应用所建立的MIRA方法对36份临床分离的疑似SS菌株进行检测。结果显示,有30份呈SS阳性,其中2株为SS2型;1株为SS7型阳性;10株为SS9型,与PCR方法结果一致,两种方法的符合率均为100%(表2)。这表明所建立的MIRA检测SS以及SS2、SS7、SS9等方法可应用于SS临床分离菌株的检测。

等<sup>[14]</sup>在将MIRA-LFD方法应用于检测乙型肝炎的临床样本时,在37℃仅需10 min即可扩增出靶基因,反应灵敏度为10 pg,准确度为100%。Chen等<sup>[15]</sup>采用RT-MIRA检测将处理时间显著缩短至20 min;Hu等<sup>[16]</sup>在使用MIRA-LFD方法检测鲍曼不动杆菌时,将检测限降低至6 CFU·mL<sup>-1</sup>,显著优于RT-PCR,并且与其他弧菌无交叉反应,准确度为100%。

在本研究中建立的MIRA用于SS及其主要血清型的检测技术,可在反应温度为室温20℃即可检测到目的条带,表明本研究建立的MIRA方法在较低温度也可实现对SS的检测。在反应时间方面,MIRA仅反应5 min即可检测出SS,表明MIRA检测具有明显的即时性,能够节约反应时间。在特异性方面,本研究所建立的MIRA方法均能特异性检测出SS及相应血清型,与其他病原无交叉反应,且灵敏性分析结果显示,检测限低至7.18 pg·μL<sup>-1</sup>(SS2)、0.96 pg·μL<sup>-1</sup>(SS7)和1.91 pg·μL<sup>-1</sup>(SS9),具有良好的灵敏性。综上所述,本研究建立的MIRA方法可应用于临床快速检测SS及其临床主要血清型SS2、SS7、SS9,为防控猪链球菌病提供新

的快速扩增技术。

#### 4 结 论

本研究基于MIRA技术建立了可快速检测SS及SS2、SS7、SS9等临床血清型的新方法,该方法可在20~41℃温度下5~30 min内完成扩增,具有良好的特异性和敏感性,为临床防控SS提供快速诊断方法。

#### 参考文献 (References):

- [1] XU L, WANG X Y, LEI Z Y, et al. Spinal canal infection caused by *Streptococcus suis* in human; a case report[J]. *BMC Infect Dis*, 2022, 22(1): 369.
- [2] TAN M F, TAN J, ZHANG F F, et al. Exogenous glycogen utilization effects the transcriptome and pathogenicity of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 938286.
- [3] 姜志康, 韩先杰, 郭皖露, 等. 猪链球菌7型的分离鉴定及致病性研究[J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(2): 182-187.  
JIANG Z K, HAN X J, GUO W L, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 7 [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2025, 55(2): 182-187. (in Chinese)
- [4] 陶攀, 贾爱卿, 张桂红, 等. 猪链球菌9型菌株的分离鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(6): 93-96.  
TAO P, JIA A Q, ZHANG G H, et al. Isolation and identification of *Streptococcus suis* serotype 9 strain in swine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(6): 93-96. (in Chinese)
- [5] SHUAI W, PARK B J, KIM S H, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* using Dynabeads® anti-*Listeria* combined with real-time PCR in soybean sprouts[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 99: 533-539.
- [6] 詹存林, 王庚, 孙秀秀, 等. PRRSV、SS和Pm多重TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立与初步应用[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(2): 231-236.  
ZHAN C L, WANG G, SUN X X, et al. Establishment and preliminary application of PRRSV, SS and Pm multiplex TaqMan real-time PCR detection methods [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(2): 231-236. (in Chinese)
- [7] 张昆丽, 林本夫, 席振军, 等. 猪链球菌纳米PCR检测方法的建立和应用[J]. *华北农学报*, 2021, 36(4): 212-217.  
ZHANG K L, LIN B F, XI Z J, et al. Establishment of a nano PCR assay for detection of the *Streptococcus suis* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36(4): 212-217. (in Chinese)
- [8] HENG P F, LIU J K, SONG Z, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using a novel multienzyme isothermal rapid amplification technique [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 11027785.
- [9] 李盛杰, 江海涛. 多酶恒温核酸快速扩增技术在霍乱弧菌检测中的应用[J]. *南京晓庄学院学报*, 2021, 37(6): 49-52.  
LI S J, JIANG H T. Application of multi-enzyme isothermal rapid amplification in the detection of *Vibrio Cholera* [J]. *Journal of Nanjing Xiaozhuang University*, 2021, 37(6): 49-52. (in Chinese)
- [10] 杨风萍, 董贵, 黄文峰. 猪链球菌病的防控[J]. *养猪*, 2023(4): 92-95.  
YANG F P, DONG G, HUANG W F. Prevention and control of porcine streptococcal disease [J]. *Swine Production*, 2023(4): 92-95. (in Chinese)
- [11] 裴嘉琪. 一种同时检测猪链球菌6个耐药基因的多重PCR方法的建立及初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.  
PEI J Q. Establishment and preliminary application of a multiple PCR simultaneously detecting six resistance genes of *Streptococcus suis* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [12] 刘博婷, 李娜, 彭凌, 等. 副猪嗜血杆菌与猪链球菌2型双重LAMP检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(9): 1080-1085.  
LIU B T, LI N, PENG L, et al. Development of duplex LAMP assay for the simultaneously detection of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* type 2 [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(9): 1080-1085. (in Chinese)
- [13] WANG Y F, NIU J J, SUN M M, et al. Rapid and sensitive detection of *Streptococcus iniae* in *Trachinotus ovatus* based on multienzyme isothermal rapid amplification [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7733.
- [14] SUN M L, LAI H Y, CHONG N Y, et al. Simple and feasible detection of hepatitis B virus via combination of multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipstick strip [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 763079.
- [15] CHEN H, ZHAO Z G, LIANG L, et al. Development of two novel on-site detection visualization methods for murine hepatitis virus based on the multienzyme isothermal rapid amplification [J]. *Microb Pathog*, 2024, 193: 106776.
- [16] HU W W, HE J W, GUO S L, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive multienzyme isothermal rapid amplification with a lateral flow dipstick assay for detection of *Acinetobacter baumannii* in spiked blood specimens [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1010201.

(编辑 白永平)