

# 猪链球菌种及其主要致病血清型 多重 PCR 检测方法的建立

王花茹<sup>1,2,3</sup>, 王长军<sup>1</sup>, 唐家琪<sup>1,2\*</sup>, 陆承平<sup>2</sup>, 潘秀珍<sup>1</sup>, 郭恒彬<sup>1</sup>

(1. 南京军区军事医学研究所, 南京 210002;

2. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 3. 山东省潍坊市畜牧局, 潍坊 261061)

**摘要:** 根据猪链球菌谷氨酸脱氢酶基因和血清型 1 型、2 型、1/2 型、7 型、9 型和 14 型的荚膜多糖编码基因核酸序列, 分别设计猪链球菌种和血清型特异性引物, 建立并优化多重 PCR 检测方法, 检测分析种属背景明确的 73 株菌株(其中猪链球菌 49 株、其他对照菌株 24 株)及临床分离样本 94 株(包括四川资阳临床分离样本 45 株)。其中 73 株种属背景明确菌株多重 PCR 种检测结果符合率为 87.5%, 6 种主要致病血清型检出率可达 100%。24 株对照菌株在种和血清型检测均为阴性。对 45 株四川猪链球菌病暴发现场分离菌株进行检测, 其中 41 株为猪链球菌 2 型。上述结果提示建立的多重 PCR 方法对猪链球菌种及主要致病血清型的检测具有较好的特异性和敏感性, 可用于猪链球菌病的快速诊断和流行病学调查。

**关键词:** 猪链球菌; 血清型; 荚膜多糖; 谷氨酸脱氢酶; 多重 PCR

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)06-0837-05

## A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Six Serotypes of *Streptococcus suis*

WANG Hua-ru<sup>1,2,3</sup>, WANG Chang-jun<sup>1</sup>, TANG Jia-qi<sup>1,2\*</sup>,

LU Cheng-ping<sup>2</sup>, PAN Xiu-zhen<sup>1</sup>, Guo Heng-bin<sup>1</sup>

(1. Military Medical Institute of Nanjing Command, Nanjing 210002, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. Weifang Animal Husbandry Bureau, Weifang 261061, China)

**Abstract:** A multiplex PCR assay for detection and identification of various *streptococcus suis* strains in tonsillar specimens from pigs was developed and evaluated. In this research five distinct DNA targets were chose: One target, based on the *gdh* gene, encoded the glutamate dehydrogenase of *streptococcus suis*, can be applied to the detection of *streptococcus suis* at species level. The other targets, based on SS capsular polysaccharide (*cps*) genes specific for serotypes 1 (and 14), 2 (and 1/2), 7, 9 were amplified by multiplex PCR. 73 isolates, which included 49 strains of *streptococcus suis* and 24 strains of negative control, and 94 clinical specimens (45 clinical strains in Sichuan) were detected by the multiplex PCR assay. In 73 *streptococcus suis* strains, 64 (87.5%) strains were *gdh*<sup>+</sup>. There were no PCR products in strains of serotypes 13, 19, 30, 32, 33, 34. The multiplex PCR could detect all strains of serotypes 1 (and 14), 2 (and 1/2), 7, 9. In 45 clinical strains in Sichuan, the PCR results of 41 strains were *gdh*<sup>+</sup> *cps*2<sup>+</sup>. These results indicated that the PCR can be used as a reliable species-specific molecular diagnostic reagent and a serotype-spe-

收稿日期: 2007-06-14

基金项目: 国家“十五”重大传染病科技攻关计划资助项目(2003BA712A03-05); 国家自然科学基金(30600533); 江苏省自然科学基金(BK2006014)

作者简介: 王花茹(1980-), 女, 山东烟台人, 硕士, 助理兽医师, 主要从事动物疫病诊断研究, E-mail: whuaru\_1980@163.com

\* 通讯作者: 唐家琪, Tel: 025-84526002, E-mail: tjq85@hotmail.com

cific method for the detection of *streptococcus suis* and six main serotypes 1,2,1/2,7,9 and 14, respectively. The PCR method has potential value for clinical and epidemiological applications.

**Key words:** *streptococcus suis*; serotype; capsular polysaccharide; glutamate dehydrogenase; multiplex PCR

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是一种重要的人畜共患病病原体,能导致脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症和人的急性脑膜炎、感染性中毒休克综合征等疾病,对公共卫生和养猪业构成严重威胁,近年来已引起研究人员的广泛重视<sup>[1]</sup>。根据 SS 荚膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS) 抗原性的不同,可将其分为 35 个血清型 (1~34, 1/2), 其中,临床上的主要致病血清型为 SS1、SS2、SS1/2、SS7、SS9 和 SS14<sup>[2]</sup>。对于 SS 检测和分型,国内研究主要针对 SS2,对其他致病血清型鲜有报道。本研究通过鉴别 SS 谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH) 和主要致病血清型抗原编码 *cps* 基因的差异,设计 5 对寡核苷酸引物,拟建立多重 PCR 检测体系,以实现 SS 种和 6 种主要致病血清型的检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

种属背景明确的实验室保存菌株 73 株。其中 14 株为猪链球菌 2 型 (9801、HAbb、98002、98T003、98012 来自中国江苏, S10、8004、8011、8012、8014、8019、T15 和 7996 来自荷兰, S735 来自加拿大); 猪链球菌血清型标准参考株 35 株, 由加拿大 Marcelo Gottschalk 教授惠赠, 分别为 SS1 (SH28)、SS2 (R735)、SS1/2 (26S1)、SS3 (4961)、SS4 (2524)、SS5 (11538)、SS6 (6407)、SS7 (8074)、SS8 (14636)、SS9 (2083)、SS10 (4417)、SS11 (12814)、SS12 (8830)、SS13 (10581)、SS14 (13730)、SS15 (GRT639NCTC10446)、SS16 (2726)、SS17 (93A)、SS18 (C77)、SS19 (42A)、SS20 (86-5192 KALV)、SS21 (14A)、SS22 (88-1861)、SS23 (89-2479)、SS24 (88-3576-3)、SS25 (89-3576-3)、SS26 (88-4109-1)、SS27 (89-3259)、SS28 (89-590)、SS29 (92-1791)、SS30 (92-1400)、SS31 (92-4172)、SS32 (EA11F2-91)、SS33 (92-1721-15EA 1832)、SS34 (92-2742); 其他群链球菌 18 株、金黄色葡萄球菌 2 株、流感嗜血杆菌 2 株、沙门氏菌 1 株、类志贺菌 1 株, 购自解放军总医院微生物室。临床分离样本 94 株, 其中

1998—2003 年自江苏、上海猪群中分离, 由南京农业大学动物医学院微生物实验室保存 49 株; 另有 45 株系 2005 年 7 月由本试验室自四川资阳、内江、自贡等地发病猪/人分离。

菌种接种于 5 mL THB 培养基中, 置摇床上 37℃ 过夜培养。

### 1.2 主要试剂

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, PCR 扩增试剂盒 DRR001AM 为 (大连) 宝生物工程有限公司的产品, O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 为晶美生物有限公司产品。

### 1.3 PCR 方法

1.3.1 引物设计合成 根据 GenBank 检索的 *cps1* (*cps14*)、*cps9*、*gdh* 基因序列 (GenBank 登录号分别为 AF155804、AF155805、AF229683), 参考 Smith 确定的 *cps1*、*cps9* 特异性基因区间<sup>[3]</sup>, 采用 Primer premier 5.0 软件设计 3 对引物。为使各对引物在相同的扩增条件上具有尽可能高的相容性, 设定引物的 T<sub>m</sub> 参数范围为 50~52℃; SS2 (SS1/2)、SS7 型特异性引物引用已报道的序列<sup>[3-4]</sup> (表 1)。引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.3.2 模板的制备 根据文献<sup>[5]</sup>稍加改进。取细菌培养物 1.5 mL 于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 2 min; 沉淀用 TE 缓冲液 567 μL 重悬, 加 20% SDS 30 μL 和 20 mg/mL 蛋白酶 K 3 μL, 混匀, 37℃ 水浴 1 h; 加入 5 mol/L NaCl 100 μL 和 CTAB/NaCl 溶液 80 μL 混匀, 65℃ 水浴 10 min; 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 12 000 r/min 离心 10 min; 吸上清至新 EP 管中, 加等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 12 000 r/min 离心 10 min; 上清移至新 EP 管, 加 0.6 体积的异丙醇, 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 1 mL 70% 乙醇洗 2 次, 弃上清, 室温放置使乙醇挥发干净; 用 1 000 μL ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀。-20℃ 保存备用。

1.3.3 PCR 反应 在 0.2 mL EP 管中依次加入 10 × Buffer、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、2.5 mmol/L dNTPs、10 μmol/L 上下游引物 (*cps1*、*cps2*、*cps7*、*cps9*、*gdh*)、模板、Taq 酶, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 50 μL。

表 1 多重 PCR 引物  
Table 1 The primer in the multiplex PCR

基因 Gene	引物序列 Sequence of primers	位置 Location	序列长度/bp Sequence length
<i>gdh</i>	5'-TCAAGTCAACCGTGGCTA-3'	534-551	657
	5'-TATTCTGTCAAACGAGCG-3'	1 190-1 173	
<i>cps1(cps14)</i>	5'-TTTAGTAGACGAAAACGGGT-3'	4 554-4 573	461
	5'-TTGGCAAGAACTCATTATCC-3'	5 014-4 995	
<i>cps2(cps1/2)</i>	5'-TGATAGTGATTTGTCGGGAGGG-3'	13 909-13 929	557
	5'-GAGTATCTAAAGAATGCCTATTG-3'	14 465-14 443	
<i>cps9</i>	5'-CGAAATCAAAGTGTATCAGC-3'	4 155-4 174	346
	5'-TTCTATCCGAAGTATCTGGG-3'	4 500-4 481	
<i>cps7</i>	5'-AGCTCTAACACGAAATAAGGC-3'	3 334-3 354	252
	5'-GTCAAACACCTGGATAGCCG-3'	3 585-3 565	

优化反应条件:建立单个靶基因 PCR 反应体系,确定各检测体系反应参数的可调节范围;随后将上述单个靶基因 PCR 体系进行组合和条件优化,建立多重 PCR 体系。

1.3.4 产物鉴定 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

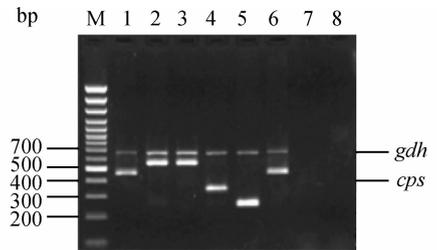
## 2 结果

### 2.1 多重 PCR 反应体系确定

以 SS 血清型参考菌株基因组 DNA 为模板,用设计的 *cps1(cps14)*、*cps2(cps1/2)*、*cps7*、*cps9* 和 *gdh* 引物分别建立单个靶基因的 PCR 检测体系,初步确定各基因检测体系反应参数的可调节范围。在此基础上,进行多重 PCR 体系的组合和条件优化。结果显示,较理想的多重 PCR 体系:0.2 mL 薄壁 EP 管中依次加入 10× Buffer 5.0 μL、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 3.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μL、10 μmol/L 上下游引物(*cps1*、*cps2*、*cps7*、*cps9* 和 *gdh* 分别为 0.6、1.2、0.5、1.2 和 0.4 μL)、模板 2 μL、Taq 酶 0.25 μL (1U),随后加水定容至 50 μL。扩增参数:95℃ 变性 10 min;94℃ 45 s,56℃ 50 s,72℃ 50 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。在上述条件下,6 种不同血清型菌株均可获得特异有效的扩增,而对对照菌株均未得到相应的扩增片段(图 1)

### 2.2 多重 PCR 检测结果

以 73 株种属背景明确的实验室保存菌株基因组 DNA 为模板,按上述体系进行多重 PCR。结果发现,根据谷氨酸脱氢酶基因设计的 SS 种特异性引物可检测出绝大多数 SS,总检出率为 87.5%,6 株检为阴性的菌株均为非致病性血清型(13 型、19 型、30 型、32 型、33 型、34 型)。20 株分属于 6 种主



M, Marker ; 1. SS1 ; 2. SS2 ; 3. SS1/2 ; 4. SS7 ; 5. SS9 ; 6. SS14 ; 7. *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ; 8. *S. pneumoniae*

图 1 猪链球菌多重 PCR 检测结果

Fig. 1 The results of multiplex PCR

要致病血清型的猪链球菌除观察到上述种特异性扩增片段外,还分别可观察到大小不一的代表血清型的第 2 条特异性扩增条带,产物大小约为 461、557、252、346 bp,其血清型分别可判定为 SS1(SS14)、SS2(SS1/2)、SS7、SS9,该结果与菌株实际型别符合率为 100%(表 2)。而以马链球菌兽疫亚种、乙型溶血性链球菌、粪链球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、沙门氏菌、类志贺菌和金黄色葡萄球菌等 24 株阴性对照株基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增,均未观察到代表猪链球菌种或血清型特异性的扩增产物(部分结果见图 2)。

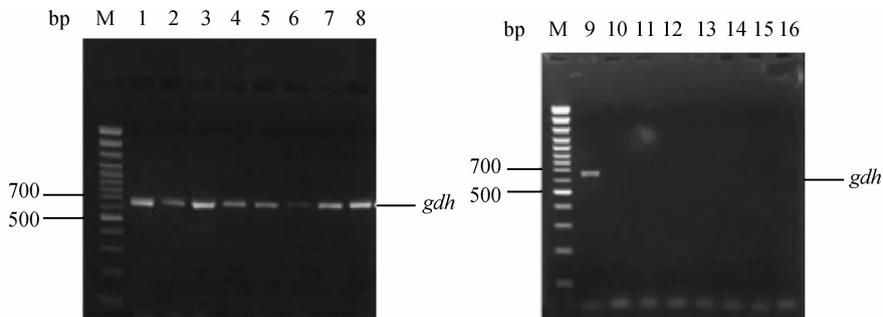
应用上述体系对 2005 年四川资阳猪链球菌病暴发现场分离的链球菌 45 株进行检测,结果发现 *gdh*<sup>+</sup>*cps2*<sup>+</sup> 阳性率高达 91%(41/45),对部分阳性菌株的 *gdh* 和 *cps2* 扩增基因进行序列分析,核苷酸同源性均为 98% 以上,表明引起此次疫病流行的病原体为 SS2(资料待发表);检测自上海江苏等地正常猪群分离的临床样本 49 株,其中 1 株检为 *gdh*<sup>+</sup>

表 2 多重 PCR 检测结果  
Table 2 Results of multiplex PCR

基因型 Genotype	产物大小/bp The size of M-PCR products	多重 PCR 结果 M-PCR results
$gdh^+ cps1^+$	657,461	SH28(SS1)、13730(SS14)
$gdh^+ cps2^+$	657,557	9801(SS2)、Habb(SS2)、98002(SS2)、98T003(SS2)、98012(SS2)、S10(SS2)、T15(SS2)、7996(SS2)、8004(SS2)、8011(SS2)、8012(SS2)、8014(SS2)、8019(SS2)、S735(SS2)、R735(SS2)、26S1(SS1/2); NJAU-19* ; 2005 年 7 月底 41 株四川资阳临床分离样本
$gdh^+ cps7^+$	657,252	8074(SS7)
$gdh^+ cps9^+$	657,346	2083(SS9)
$gdh^+ cps^-$	657	4961(SS3)、2524(SS4)、11538(SS5)、6407(SS6)、14636(SS8)、4417(SS10)、12814(SS11)、GRT639NCTC10446(SS15)、2726(SS16)、93A(SS17)、C77(SS18)、86-5192 KALV(SS20)、14A(SS21)、88-1861(SS22)、89-2479(SS23)、88-3576-3、(SS24)、89-3576-3(SS25)、88-4109-1(SS26)、89-3259(SS27)、89-590(SS28)、92-1791(SS29)、92-4172(SS31)
$gdh^- cps^-$	—	10581(SS13)、42A(SS19)、92-1400(SS30)、EA11F2-91(SS32)、92-1721-15EA 1832(SS33)、92-2742(SS34); 乙型溶血性链球菌、249593(屎肠球菌)、251764(屎肠球菌)、32220( <i>E. faecali</i> )、135183( <i>E. faecali</i> )、135196( <i>E. faecali</i> )、250063( <i>E. faecali</i> )、250928( <i>E. faecali</i> )、251796( <i>E. faecali</i> )、135185( <i>S. pneumoniae</i> )、ATCC35246( <i>S. equisubsp. zooepidemicus</i> )、32132( <i>Streptococcus group A</i> )、32133( <i>Streptococcus group B</i> )、32134( <i>Streptococcus group C</i> )、32135( <i>Streptococcus group D</i> )、32141( <i>Streptococcus group L</i> )、272101( <i>Shigella</i> )、134130( <i>S. pneumoniae</i> )、134750( <i>S. pneumoniae</i> )、271004( <i>Salmonella</i> )、124444( <i>H. influenzae</i> )、135204( <i>H. influenzae</i> )、135247( <i>Staphylococcus aureus</i> )、135257( <i>Staphylococcus aureus</i> ); 48 株上海、江苏等地临床分离的样本; 2005 年 7 月底 4 株四川临床分离样本

括号内为菌株血清型; \* . 南京农业大学动物医学院微生物室保存的猪临床分离的链球菌样本, 编号为 19

Characters in brackets mean the serotype of strain. \*. The specimen named 19 is saved by College of Veterinary Medicine of Nanjing Agricultural University



M. Marker; 1. SS31; 2. SS26; 3. SS21; 4. SS18; 5. SS15; 6. SS10; 7. SS6; 8. SS3; 9. SS11; 10. SS32; 11. SS33; 12. SS34; 13. *E. faecali*(32220); 14. *S. equisubsp. zooepidemicus*; 15. *S. pneumoniae*(134130); 16. *Salmonella*(271004)

图 2 特异性试验结果

Fig. 2 The specificity test of multiplex PCR

阳性,初步确认为 SS,进一步分析发现,该菌株不表达 MRP、EF/EF\* 和溶血素等毒力因子,表明该菌株可能属于 6 种主要致病血清型以外的其他血清

型,这在一定程度上提示我国除了存在 SS2 外,还存在其他血清型的携带和流行。

### 3 讨 论

在我国江苏某地区,SS2 致使数万头猪病死,并有十多名从业人员感染致死<sup>[6]</sup>,使该病的侦检和防治研究受到高度关注。目前,SS 的检测和分型主要采用血清学和分子鉴定方法。血清学方法费时费力,敏感性低,且特异性血清制备困难,难以推广应用。限制性内切酶分析(REA)、多位点酶切电泳(MEE)、随机扩增多态 DNA 分析(RAPD)和聚合酶链式反应(PCR)等分子鉴定方法陆续应用于 SS 的检测和分型研究,但由于检测结果与菌株致病性方面的判断标准不一,目前尚未形成统一的标准检测、分型方案。在我国,对 SS 血清型鉴别的研究未见报道,因此建立一个统一的猪链球菌种和主要致病血清型的标准监测方法有重要意义。

GDH 是连接细菌碳代谢和氮代谢的一个关键酶,是能量代谢过程中十分重要的功能分子。GDH 与 16S rRNA、23S rRNA 一样在种间具有高度保守性,可用于种的鉴定,在相关病原体诊断中已得到应用<sup>[7-8]</sup>。本研究应用软件分析 *gdh* 基因序列后,设计了 SS 种特异性引物,并利用此引物对菌株进行检测研究。结果显示,SS 的总检出率为 87.5%,受检菌株中所有致病血清型(1 型、2 型、1/2 型、7 型、9 型和 14 型)均可正确检出,显示其在 SS 分子诊断方面具有较大应用价值,但实际应用时应注意结合临床资料,防止漏检少数稀有血清型的菌株。

有学者提出 *cps* 与 SS 的侵袭力有关,认为它能大大降低机体对 SS 菌体的吞噬机会。随后,研究人员根据 *cps* 抗原特性的差异,陆续将 SS 分为 35 个血清型(1~34,1/2),并通过大量现场调查分析认为引发猪链球菌病的主要致病血清型为 SS1、SS2、SS1/2、SS7、SS9、SS14;1999 年 Simth 等对 6 种主要血清型 *cps* 的特异性核酸区进行了较系统的研究<sup>[3-4]</sup>,从而使 SS 核酸分型趋于成熟。本研究针对 SS1、SS2、SS1/2、SS7、SS9、SS14 的 *cps* 特异性区间设计 4 对引物,成功应用于 20 株不同血清型菌株的检测,符合率为 100%。该方法的建立为在我国系统开展 SS 血清型的分子流行病学调查奠定了基础。

1998 年,Chatellier 等对 35 株血清型标准参考株 16S RNA 进行同源性分析发现,其中 32 种血清型亲缘关系较近,可归为一大类;其余 3 种血清型 SS32、SS33、SS34 在亲缘关系上与其它链球菌更为

接近,建议对上述 3 种血清型重新进行种属定位<sup>[9]</sup>。本试验在优化多重 PCR 体系过程中发现,以 SS32、SS33、SS34 3 种血清型菌株 DNA 为模板,改变扩增条件始终未观察到特异性扩增条带,而与 SS 种属亲缘关系相近的粪肠球菌和屎肠球菌在某些宽松的扩增条件下却可获得较弱的扩增条带,这在一定程度上支持 Chatellier 教授的观点。

### 参考文献:

- [1] STAATS J J, FEDER I, OKWU M O, et al. *Streptococcus suis*: past and present[J]. Vet Res Commun, 1997, 21: 381-407.
- [2] WISSELINK H J, JOOSTEN J J, SMITH H E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 2 922-2 929.
- [3] SMITH H E, VEENBERGEN V, VELDE J V D, et al. The *cps* genes of *streptococcus suis* serotype 1, 2 and 9; Development of rapid serotype-specific PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3 146-3 152.
- [4] SMITH H E, VAN BRUIJNSVOORT L, BUIJS H, et al. Rapid PCR test for *streptococcus suis* serotype 7 [J]. FEMS Microbiology Letter, 1999, 178: 265-270.
- [5] SAMBROOK J, FRETSCHE E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] 朱 进, 唐家琪, 郭恒彬, 等. 急性暴发流行中毒休克综合征病原体生物学特性及鉴定[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19: 84-86.
- [7] OKWU M O, PERSAUD J S, 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(2): 251-257.
- [8] OKWU M O, O'CONNOR M, SHULL E. A polymerase chain reaction assay specific for *streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218: 79-84.
- [9] CHATELLIER S, HAREL J, GOTTSCHALK M, et al. Phylogenetic diversity of *streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 581-589.