

康舜, 庄鸿琨, 朱金鲁, 等. 猪链球菌血清7、8、9型三重荧光PCR检测方法的建立与应用[J]. 畜牧与兽医, 2026, 58(5): 109-116.

KANG S, ZHUANG H K, ZHU J L, et al. Development and application of a triplex real-time PCR assay for detection of *Streptococcus suis* serotypes 7, 8, and 9 [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2026, 58(5): 109-116.

猪链球菌血清7、8、9型三重荧光PCR检测方法的建立与应用

康舜^{1,2,3}, 庄鸿琨^{1,2,3}, 朱金鲁^{1,2,3}, 吴宗福^{1,2,3*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

2. 农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210014;

3. 世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在建立一种可同时检测猪链球菌血清7、8、9型的三重荧光PCR方法, 为实现猪链球菌临床样本灵敏、准确、快速分型提供技术支撑。基于猪链球菌多糖聚合酶基因(*wzy*)建立了一套三重荧光PCR检测方法, 通过标准曲线、特异性与敏感性试验对其进行评价, 并应用本方法检测临床样本, 同时与普通PCR结果进行比较。结果: 建立的三重荧光PCR检测方法可准确扩增目标血清型, 与其他常见血清型及其他常见细菌无交叉反应; 标准品质粒拷贝数的最低检测限为 1×10^2 copies/ μ L, 敏感性较普通PCR高 $10^2 \sim 10^4$ 倍; 对123份临床猪链球菌阳性样本进行检测, 发现其对血清7、8和9型的检出率分别为42.3% (52/123)、25.2% (31/123)和31.7% (39/123), 高于普通PCR方法的22.0% (27/123)、9.8% (12/123)和13.8% (17/123); 扁桃体样本存在多种目标血清型共检出现象, 其中9.8% (12/123)的样本同时检出3种目标血清型, 22.8% (28/123)同时检出2种, 24.4% (30/123)仅检出1种, 另有43.1% (53/123)未检出目标血清型。综上, 本研究成功建立了猪链球菌血清7、8、9型的三重荧光PCR检测方法, 具有良好的特异性、敏感性和重复性, 适用于临床样本的快速分型鉴定, 为猪链球菌的流行病学监测与综合防控提供了技术支持。

关键词: 猪链球菌; 血清7型; 血清8型; 血清9型; 荧光PCR

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)05-0109-08

Development and application of a triplex real-time PCR assay for detection of *Streptococcus suis* serotypes 7, 8, and 9

KANG Shun^{1,2,3}, ZHUANG Hongkun^{1,2,3}, ZHU Jinlu^{1,2,3}, WU Zongfu^{1,2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Key Lab of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China;

3. WOA Reference Lab for Swine Streptococcosis, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to establish a triplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Streptococcus suis* serotypes 7, 8, and 9, thereby providing technical support for sensitive, accurate, and rapid serotyping of clinical *S. suis* samples. In this study, a triplex real-time PCR assay was developed based on the capsular polymerase gene (*wzy*) of *S. suis*. The assay was evaluated through the establishment of a standard curve, as well as specificity and sensitivity tests. It was subsequently applied to detect *S. suis* in clinical isolates, and the results were compared with those obtained by conventional PCR. The results showed that the method specifically amplified the target serotypes without cross-reactivity with other common *S. suis* serotypes or bacterial species. The assay exhibited high sensitivity, with a detection limit of 1×10^2 copies/ μ L for the standard plasmid, and was 100 to 10 000 fold more sensitive than the conventional PCR. Using this assay, the 123 clinical *S. suis*-positive samples were analyzed, and the detection rates for serotypes 7, 8, and 9 by the triplex real-time PCR were 42.3% (52/123), 25.2% (31/123), and 31.7% (39/123) respectively, significantly higher than those of the conventional PCR (22.0%, 9.8%, and 13.8%). Codetection of multiple target serotypes were observed in tonsil samples, with 9.8% (12/123) of the samples positive for all three target serotypes, 22.8% (28/123) positive for two target serotypes, 24.4% (30/123) positive for only one target serotype, and

收稿日期: 2025-10-21; 修回日期: 2026-03-16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1800503)

第一作者: 康舜, 男, 博士研究生

* 通信作者: 吴宗福, 博士, 教授, 研究方向为兽医微生物与免疫, E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn.

43.1% (53/123) negative for all target serotypes. In conclusion, we successfully established a triplex real-time PCR method for detection of *S. suis* serotypes 7, 8, and 9, which presented excellent specificity, sensitivity, and reproducibility. This method could be employed for rapid serotyping of clinical samples and it provided technical support for epidemiological surveillance and comprehensive control of *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*; serotype 7; serotype 8; serotype 9; real-time PCR

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 是危害养猪业的重要致病菌, 可导致猪脑膜炎、关节炎及败血症等疾病。同时, 该菌也是一种重要的人兽共患病原体, 对公众健康构成威胁^[1]。基于荚膜多糖 (CPS) 抗原的差异性, 猪链球菌的血清型可分为 29 种传统血清型 (1~19、21、23~25、27~31 及 1/2 型)^[2], Chz 血清型^[3], 以及 33 种新荚膜基因簇型 (NCL1~20、21a、21b 和 22~32)^[4-8]。目前, 猪链球菌中具有感染人风险的血清型共有 10 种, 分别为血清型 1、2、4、5、7、9、14、16、24 与 31 型^[9]。

猪链球菌不同血清型种群结构和致病特征不同^[10-12]。猪链球菌血清 7、8、9 型是常见的致病血清型, 近年来, 他们在全球范围内的流行率持续攀升, 成为养猪业与公共卫生领域的重要威胁, 其中, 血清 7 型是欧洲、北美及泰国发病猪群中的主要流行血清型之一^[13-18], 有感染人类的报告^[10]。本课题组前期研究发现, 血清 7 型最小核心基因组 (minimum core genome, MCG) 分群可分为 MCG 1、2、3、4 和 7-2, 60.5% 的菌株 (69/114) 属于 MCG 4 且分布于 9 个国家, 在 10 株 MCG 4 菌株中 8 株 (80%) 呈现强毒力, 提示该血清型具有较高的公共卫生安全风险^[10]。血清 8 型是西班牙、韩国、加拿大及巴西等国患病猪群中的主要流行血清型之一^[17,19-22], MCG 分群可分为 MCG 1、2、4 和 7-3, 75% 代表菌株 (9/12) 为强毒株, 显示其具备引发严重临床疾病的潜能^[11]。血清 9 型是欧洲及亚洲多国猪群中的主要流行血清型之一^[23-26], 其在泰国曾引起人类败血性休克^[27]; 75.8% (25/33) 的菌株表现为中高毒力, 提示该血清型具备潜在的人兽共患风险^[12]。目前, 尚缺乏一种可同时检测猪链球菌血清型 7、8 和 9 的灵敏检测方法。

鉴于猪链球菌血清 7、8、9 型的致病性及潜在的公共卫生威胁, 开发简便且精准的血清型鉴别技术具有迫切需求。本研究基于荚膜多糖合成基因簇中关键的多糖聚合酶基因 (*wzy*)^[28], 构建三重荧光 PCR 检测体系。该方法可实现 3 种血清型的同步快速鉴定, 为猪链球菌血清 7、8、9 型的流行病学监测与精准防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

本研究使用的 12 种猪链球菌传统血清型菌株包

括: 血清 1 型 WUSS023、血清 2 型 WUSS024、血清 4 型 WUSS026、血清 5 型 WUSS027、血清 7 型 WUSS029、血清 8 型 WUSS030、血清 9 型 WUSS031、血清 14 型 WUSS036、血清 16 型 WUSS038、血清 21 型 WUSS043、血清 24 型 WUSS046 及血清 31 型 2022WUSS008, 以上菌株由本实验室保存。菌株复苏于含 5% 无菌绵羊血的 Todd-Hewitt 肉汤 (THB) 琼脂平板, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。挑取单菌落接种于 THB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 条件下进行振荡培养。

1.2 主要试剂

THB 培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 2 × Rapid Taq Master Mix、2 × Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 荧光定量酶反应液购于宝生物工程 (大连) 有限公司。猪链球菌选择性培养基以 THB 培养基为基础, 并添加结晶紫、庆大霉素及萘啶酮酸作为选择性抑制剂, 其终浓度依次为 1.2、1.2 和 30 μg/mL。

1.3 引物设计与合成

根据猪链球菌血清型特异性多糖聚合酶基因 *wzy* 的保守特征, 本研究分别选取血清 7 型基因 (*cps7L*) (GenBank 登录号: KC537369), 血清 8 型基因 (*cps8K*) (GenBank 登录号: JX986797) 及血清 9 型基因 (*cps9J*) (GenBank 登录号: KC537370) 作为靶基因。采用 Beacon Designer 与 Oligo 7 软件, 设计筛选出一套具有高特异性和扩增效率的引物与探针组合。引物及探针由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 使用浓度均为 10 μmol/L。引物和探针见表 1。

1.4 标准质粒的制备

分别以猪链球菌 7、8、9 型基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *cps7L*、*cps8K* 及 *cps9J* 基因。荧光 PCR 反应体系 (25 μL): 2 × Phanta Max Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, 细菌菌液 DNA 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。将纯化后的目的片段与 pET-28a 载体连接, 构建重组质粒。在含卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定后送测序验证。将测序正确的重组质粒进行定量, 并 10 倍梯度稀释制备成浓度为 1.0×10⁸ copies/μL 至 1.0×10⁰ copies/μL 的标准品, 于 -20 °C 保存备用。

表1 引物和探针序列

名称	引物和探针序列 (5'→3')	目的片段长度/bp
<i>cps7-F</i>	GGAGGAAGTATTGGAGAG	87
<i>cps7-R</i>	TCCACCTACAGTTTCAAC	
<i>cps7-P</i>	FAM-AGTTGATTCACACCGATACGACGAT-BHQ1	
<i>cps8-F</i>	GGTCGCAATGTTTATTGTCAG	74
<i>cps8-R</i>	GCGGCTCATAATCAATATTCC	
<i>cps8-P</i>	VIC-ACGCTGTTGCTCTAATCAATGC-BHQ1	
<i>cps9-F</i>	AGCCCTACTGTCGATAA	124
<i>cps9-R</i>	ACCACTCTAGAAACAAAGAC	
<i>cps9-P</i>	CY5-ACAAATCCCTTTAATTTACAGGCAAT-BHQ3	

1.5 三重荧光 PCR 方法标准曲线的建立

以 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^3$ copies/ μL 的阳性质粒作为模板, 使用表1所列引物与探针进行三重荧光 PCR 扩增。反应体系 (25 μL): qPCR Mix 14.5 μL ; 血清型引物及探针, *cps7-F* 0.4 μL 、*cps7-R* 0.4 μL 、*cps7-P* 0.2 μL 、*cps8-F* 0.9 μL 、*cps8-R* 0.9 μL 、*cps8-P* 0.45 μL 、*cps9-F* 0.9 μL 、*cps9-R* 0.9 μL 、*cps9-P* 0.45 μL ; 模板 5 μL 。扩增程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。获取各浓度梯度下的扩增动力学曲线, 以质粒拷贝数浓度的对数值为横坐标, C_t 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并据此计算该检测体系的相关系数 (R^2) 与扩增效率 (E)。

1.6 三重荧光 PCR 方法特异性与敏感性评估

按照 1.5 中建立的三重荧光 PCR 反应体系与程序, 以 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 的梯度稀释阳性质粒为模板, 分别进行荧光 PCR 与普通 PCR 检测, 以比较两种方法的检测灵敏度。选取了重要的致病血清型 (1、2、4、5、14、16、21、24 及 31 型) 作为对照 (菌株信息见 1.1)。血清 2 型是全球分布最广、致病性最强的血清型^[19]。血清 1、2、4、5、14 型为致病谱系中重要血清型, 与猪链球菌病密切相关^[29]。实验室前期研究表明, 血清 16、21、24、31 型是健康猪群中流行率较高的血清型^[30]。在种属特异性评估中, 选用副猪格拉菌 (*Glaesserella parasuis*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、巴氏链球菌 (*Streptococcus pasteurianus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和肠道沙门菌 (*Salmonella enterica*) 作为对照菌株, 将上述菌株按照 1.1 方法进行复苏和单菌落培养 8 h, 取菌液

作为模板进行特异性试验, 同时设立去离子水作为阴性对照, 以评估该方法的特异性。

1.7 三重荧光 PCR 方法重复性试验

按照 1.5 中建立的三重荧光 PCR 反应体系与程序, 以 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^5$ copies/ μL 的阳性质粒标准品为模板进行荧光 PCR。每个浓度设 3 个技术重复用于组内重复性分析, 并分 3 个不同时间点进行试验验证组间重复性。通过计算各浓度梯度下组内与组间 C_t 值的变异系数, 以评估该方法的重复性与稳定性。

1.8 临床样本检测

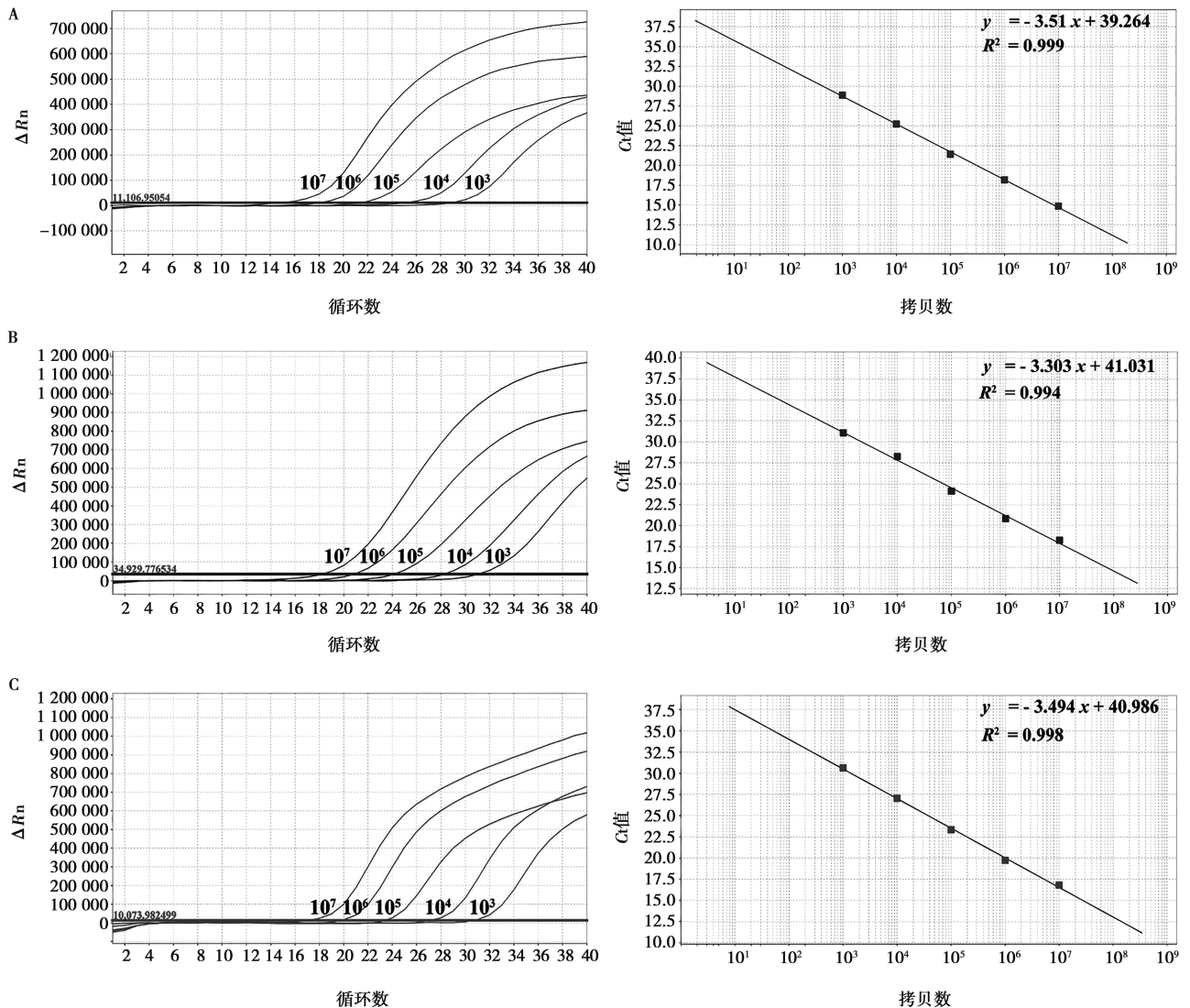
分别采用荧光 PCR 与普通 PCR 方法对 175 份健康猪扁桃体增菌液基因组进行检测, 以血清 7、8 及 9 型菌株基因组作为阳性对照, 等体积 PBS 增菌液基因组作为阴性对照, 并对两种方法的检测结果进行系统比对。样本 DNA 通过粗提法制备: 取适量扁桃体组织研磨后, 取 200 μL 匀浆液接种于 5 mL 猪链球菌选择性培养基中增菌 8 h, 随后提取基因组 DNA 用于后续检测。普通 PCR 检测增菌液基因组中猪链球菌种特异的重组修复蛋白 N (*recN*) 基因, 阳性则判定为猪链球菌阳性样本。分别采用三重荧光 PCR 和普通 PCR 方法检测猪链球菌阳性样本, 以猪链球菌血清 7、8、9 型菌液作为阳性对照, 去离子水作为阴性对照。普通 PCR 方法所用引物序列、反应体系及扩增程序参照文献 [31]。为评估本方法在病原学诊断中的适用性, 分别采用纯菌液和模拟临床扁桃体样本进行灵敏度验证。取对数生长期猪链球菌菌液 ($OD_{600} = 0.6$), 经平板计数后, 用 PBS 稀释制备样本, 使每 5 μL 模板中菌液中分别含有 50、100、200、500 活菌数。同时, 取猪链球菌阴性的扁桃体组织研磨匀浆, 将 180 μL 组织匀浆与 20 μL 菌液混合, 用 PBS 稀释制备样本, 使每 5 μL 模板中菌液中分别含有 50、100、200、500 活菌数。将上述不同浓度的两类样本作为模板进行检测, 评估该方法在菌液和扁桃体样本的检测灵敏度。

2 结果与分析

2.1 三重荧光 PCR 标准曲线的建立

采用表 1 中引物与探针, 以 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^3$ copies/ μL 的阳性质粒标准品为模板, 分别对 *cps7L*、*cps8K* 及 *cps9J* 基因进行扩增。以标准品拷贝数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。如图 1 所示, 各血清型标准曲线均表现出良好的线性关系。其中,

血清 7 型标准曲线方程为 $y = -3.51x + 39.264$ ($R^2 = 0.999$, $E = 92.72\%$); 血清 8 型为 $y = -3.303x + 41.031$ ($R^2 = 0.994$, $E = 100.83\%$); 血清 9 型为 $y = -3.494x + 40.986$ ($R^2 = 0.998$, $E = 93.31\%$)。结果表明, 本方法可特异性有效扩增目标基因, 标准曲线呈现优异的线性关系, 成功建立了针对猪链球菌血清 7、8、9 型的三重荧光 PCR 标准曲线。



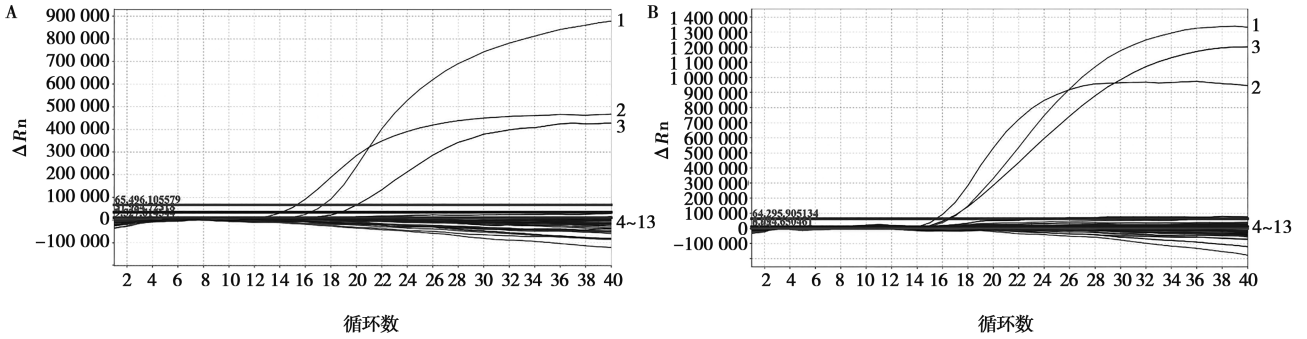
A. 猪链球菌血清 7 型; B. 猪链球菌血清 8 型; C. 猪链球菌血清 9 型。

图 1 三重荧光 PCR 扩增曲线与标准曲线

2.2 三重荧光 PCR 特异性试验

以猪链球菌血清 1、2、4、5、14、16、21、24 及 31 型及其他种细菌的菌液作为模板, 血清 7、8、9 型菌液作为阳性对照, 去离子水作为阴性对照进行特异性试验。如图 2 所示, 血清 7、8、9 型菌液出现典型扩增曲线, 猪链球菌其他血清型及副猪格拉克、

胸膜肺炎放线杆菌、巴氏链球菌、金黄色葡萄球菌、马链球菌兽疫亚种、无乳链球菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、肠道沙门菌和去离子水均未无扩增曲线和 Ct 值。上述结果表明, 本方法特异性良好, 可有效区分目标血清型, 适用于临床样本中猪链球菌血清 7、8、9 型的精准鉴定。



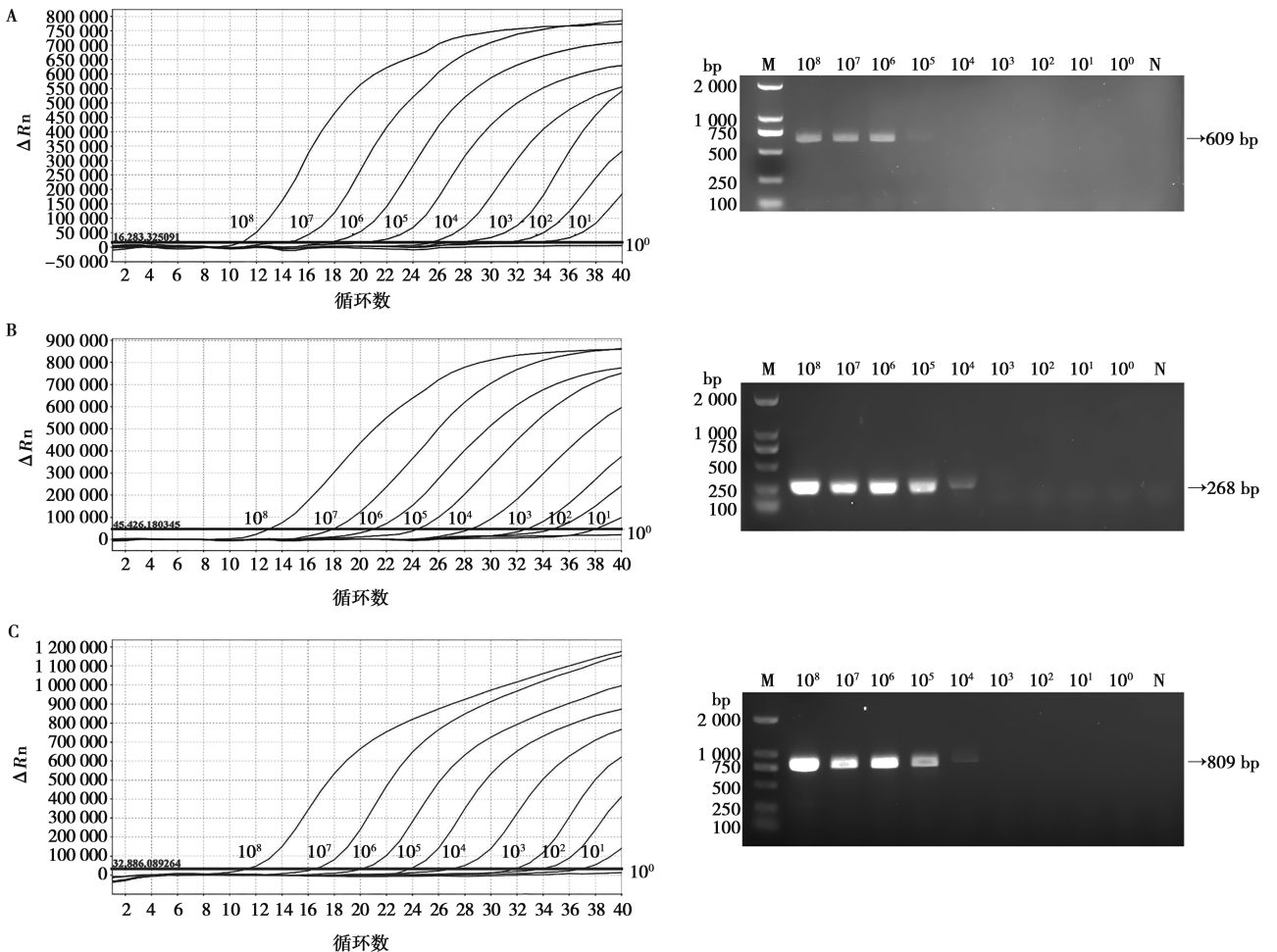
A. 猪链球菌不同血清型检测：1. 猪链球菌血清9型；2. 猪链球菌血清7型；3. 猪链球菌血清8型；4~13. 猪链球菌血清1型 WUSS023、2型 WUSS024、4型 WUSS026、5型 WUSS027、14型 WUSS036、16型 WUSS038、21型 WUSS043、24型 WUSS046、31型 2022WUSS008、阴性对照（以 H₂O 为模板）；B. 不同菌种的检测：1. 猪链球菌血清9型；2. 猪链球菌血清7型；3. 猪链球菌血清8型；4~13. 副猪格拉菌、胸膜肺炎放线杆菌、巴氏链球菌、金黄色葡萄球菌、马链球菌兽疫亚种、无乳链球菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、肠道沙门菌、阴性对照（以 H₂O 为模板）。

图2 三重荧光 PCR 特异性验证

2.3 三重荧光 PCR 敏感性试验

选取 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μ L 的阳性质粒作为模板进行敏感性试验。普通 PCR 对血清 7、8、9 型的最低检测限为 1.0×10^6 、 1.0×10^4 和 1.0×10^4 copies/ μ L。选取 1.0×10^2 、 1.0×10^1 和 1.0×10^0

copies/ μ L 3 个低浓度梯度的阳性质粒作为模板，探究三重荧光 PCR 敏感性下限，每个浓度设置 20 个重复，结果显示，对 3 种目标血清型基因的最低检测限均可达到 1.0×10^2 copies/ μ L，表明荧光 PCR 方法具备更高的检测灵敏度，可用于低拷贝数样本的准确检测。



A. 猪链球菌血清7型；B. 猪链球菌血清8型；C. 猪链球菌血清9型。

图3 三重荧光 PCR 与普通 PCR 敏感性比较

2.4 三重荧光 PCR 方法重复性试验

选取 1.0×10^7 、 1.0×10^6 和 1.0×10^5 copies/ μL 3 个浓度梯度的阳性质粒作为模板, 分别进行组内与组间重复性试验。计算各浓度水平 Ct 值的平均值、标

准差及变异系数。如表 2 显示, 所有浓度梯度下 Ct 值的组内和组间变异系数均低于 5%, 表明本方法具有优良的重复性和操作稳定性, 满足荧光 PCR 检测要求。

表 2 荧光 PCR 方法的重复性

血清型	标准品/ (copies · μL^{-1})	组内重复性测定		组间重复性测定	
		Ct 值	变异系数/%	Ct 值	变异系数/%
7	10^7	15.267±0.177	1.16	15.138±0.115	0.76
	10^6	17.968±0.271	1.51	18.191±0.262	1.44
	10^5	21.255±0.472	2.22	21.131±0.513	2.43
8	10^7	17.917±0.628	3.51	17.966±0.346	1.93
	10^6	21.290±0.161	0.76	21.147±0.359	1.70
	10^5	24.465±0.788	2.98	24.503±0.235	0.96
9	10^7	17.131±0.534	3.12	17.248±0.327	1.89
	10^6	20.947±0.844	4.03	20.618±0.290	1.41
	10^5	24.003±0.491	2.05	24.019±0.316	1.31

2.5 临床样本检测及与传统方法对比

采集昆山市与丹阳市健康猪的扁桃体样本共 175 份, 其中猪链球菌阳性 123 份。对两种方法的检测结果及符合率进行比较分析, 表 3 结果显示, 在猪链球菌阳性的样本中, 三重荧光 PCR 对血清 7 型、8 型和 9 型的检出率分别为 42.3%、25.2% 和 31.7%, 显著高于普通 PCR 方法的 22.0%、9.8% 和 13.8%。扁桃体样本存在多种目标血清型共检出现象, 其中 9.8% (12/123) 的样本同时检出 3 种目标血清型, 22.8% (28/123) 同时检出 2 种, 24.4% (30/123) 仅检出 1 种, 另有 43.1% (53/123) 未检出目标血清型。此外, 在普通 PCR 检测阴性而三重荧光 PCR 检测阳性的扁桃体样本中分离到 4 株菌, 其中 7 型菌株 1 株, 8 型菌株 1 株, 9 型菌株 2 株。在纯菌液和扁桃体样本中, 本方法对血清 7 型、8 型、9 型的检测灵敏度分别为 50 活菌数、200 活菌数、500 活菌数。本方法在复杂样本基质中仍表现出良好的检测性能, 表明本方法适用于临床样本的快速检测。综上所述, 本研究所建立的三重荧光 PCR 方法在检测灵敏度、特异性及检测效率方面均表现出显著优势。

表 3 普通 PCR 与荧光 PCR 检测临床样本比较结果

血清型	荧光 PCR 检测方法		普通 PCR 检测方法	
	阳性数/样本量	阳性率/%	阳性数/样本量	阳性率/%
7	52/123	42.3	27/123	22.0
8	31/123	25.2	12/123	9.8
9	39/123	31.7	17/123	13.8

3 讨论

猪链球菌是一种重要的人兽共患病原体, 血清型众多, 且不同血清型在种群结构及致病特征上存在显著差异^[32]。尽管血清 2 型致病性最强, 但近年来研究表明, 其在发表猪中分离率呈下降趋势; 相反, 其他致病血清型如 7、8、9 型分离率则持续上升, 其在流行病学中的重要性日益突出。此外, 由于血清型 2 与 1/2 型的 *wzy* 基因序列完全一致, 难以仅依赖该基因建立特异性的血清型 2 检测方法, 因此需要结合其他方法加以区分^[33]。

血清 7、8、9 型与猪的脑膜炎、关节炎、败血症及心内膜炎等多种严重疾病密切相关, 并已在欧洲、北美及亚洲多国成为优势流行株。德国 2015—2016 年从发病与健康猪体内分离 522 株菌株, 血清 7、8、9 型的分离率分别居第 3 (12.3%)、第 5 (5.4%) 和第 2 (16.9%)^[13]。加拿大 2015—2020 年从发病猪分离的 680 株分离株中, 血清 7、8、9 型分离率也分别位列第 3 (8%)、第 9 (4%) 和第 7 (5%)^[34]。1960—2020 年对来自欧美亚澳 3 070 株分离株群体基因组研究表明, 共鉴定出 10 个广泛传播的致病谱系, 血清 7、8 和 9 型的菌株分别有 90.32% (84/93)、88.46% (92/104) 和 72.45% (142/196) 属于致病谱系^[29]。本课题组于 2021—2023 年对来自昆山及丹阳地区的 139 株健康猪源分离株进行监测, 结果显示未检出血清 2 型; 血清 7、8 和 9 型的分离率分别位居第 4 (6.47%)、第 7 (2.88%) 和第 3

(7.91%)^[30]。上述结果表明,需加强对血清7、8、9型的监测。

普通PCR是猪链球菌血清分型的主要方法之一,但其检测灵敏度相对较低。本研究通过系统优化引物和探针的浓度条件,建立了一种可同时检测猪链球菌血清型7、8和9的三重荧光PCR检测方法。该方法具有良好的特异性、敏感性和重复性,可实现3种血清型的快速、准确鉴别。在对123份猪链球菌阳性样本的检测中,本方法对血清型7、8和9的检出率均显著高于普通PCR,且在复杂样本基质中仍表现出良好的检测性能,适用于临床样本的快速检测。相比之下,普通PCR每次反应仅能检测一种血清型,并需通过凝胶电泳进行结果判读,操作过程烦琐、耗时较长。三重荧光PCR则可实现多靶标同步扩增与实时判读,显著提升了检测的便捷性与效率。

综上所述,本研究通过优化反应体系和反应条件,成功建立了一种可同时检测猪链球菌血清型7、8和9的三重荧光PCR方法。该方法能够快速、准确地鉴别3种血清型,具有良好的特异性、灵敏性和稳定性。该研究为猪链球菌血清型7、8和9的流行病学监测与防控提供了一种高效、可靠的检测技术,对促进养猪业的可持续健康发展以及应对潜在的公共卫生风险具有应用价值。

参考文献:

- [1] GOTTSCHALK M, XU J, CALZAS C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5 (3): 371–391.
- [2] SEGURA M, ARAGON V, BROCKMEIER S L, et al. Update on *Streptococcus suis* research and prevention in the era of antimicrobial restriction: 4th international workshop on *S. suis* [J]. *Pathogens*, 2020, 9 (5): 374.
- [3] PAN Z, MA J, DONG W, et al. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81 (3): 976–985.
- [4] ZHENG H, JI S, LIU Z, et al. Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81 (12): 4111–4119.
- [5] QIU X, BAI X, LAN R, et al. Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82 (24): 7102–7112.
- [6] HUANG J, LIU X, CHEN H, et al. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66 (2): 995–1003.
- [7] BOJARSKA A, JANAS K, PEJSAK Z, et al. Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108534.
- [8] KRÁLOVÁ N, FITTIPALDI N, ZOUHAROVÁ M, et al. *Streptococcus suis* strains with novel and previously undescribed capsular loci circulate in Europe [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 298: 110265.
- [9] DE PAUL BAKPATINA-BATAKO M V, LI K, LACOUTURE S, et al. Human *Streptococcus suis* infections, south America, 1995–2024 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2025, 31 (7): 1277–1286.
- [10] LIANG P, WANG M, GOTTSCHALK M, et al. Genomic and pathogenic investigations of *Streptococcus suis* serotype 7 population derived from a human patient and pigs [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1960–1974.
- [11] LIU Z, XU Q, LIANG P, et al. The characteristics of population structure and antimicrobial resistance of *Streptococcus suis* serotype 8, a non-negligible pathotype [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): e2495–e2505.
- [12] 许杨. 苏南两地屠宰场猪链球菌感染调查及血清9型致病与耐药特征分析 [D]. 南京; 南京农业大学, 2024.
- [13] PRÜFER T L, ROHDE J, VERSPOHL J, et al. Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996–2016 [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (1): e0210801.
- [14] UNTERWEGER C, BAUMS C G, HÖCHER M, et al. Clinical situation, diagnosis and prevention of a *Streptococcus suis* serotype 7 problem on a farm [J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2014, 127 (5/6): 194–201.
- [15] NUTRAVONG T, ANGKITITRAKUL S, JIWAKANON N, et al. Identification of major *Streptococcus suis* serotypes 2, 7, 8 and 9 isolated from pigs and humans in upper northeastern Thailand [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2014, 45 (5): 1173–1181.
- [16] TIAN Y, AARESTRUP F M, LU C P. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 103 (1/2): 55–62.
- [17] TARRADAS C, PEREA A, BORGE C, et al. Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain [J]. *Vet Rec*, 2004, 154 (21): 665–666.
- [18] MACLENNAN M, FOSTER G, DICK K, et al. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland [J]. *Vet Rec*, 1996, 139 (17): 423–424.
- [19] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER J P, XU J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent: an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3 (1): 1–20.
- [20] OH S I, JEON A B, JUNG B Y, et al. Capsular serotypes, virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from pigs in Korea [J]. *J Vet Med Sci*, 2017, 79 (4): 780–787.
- [21] GOTTSCHALK M, LACOUTURE S. Canada: distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs [J]. *Can Vet J*, 2015, 56 (10): 1093–1094.
- [22] COSTA A TR, LOBATO F C F, ABREU V L V, et al. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs [J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2005, 47 (2): 113–115.

- [23] HAN D U, CHOI C, HAM H J, et al. Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea [J]. *Can J Vet Res*, 2001, 65 (3): 151-155.
- [24] SEDANO S A, CANTALEJO M G C T, LAPITAN C G A R, et al. Epidemiology and genetic diversity of *Streptococcus suis* in smallhold swine farms in the Philippines [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 21178.
- [25] NGO T H, TRAN T B C, TRAN T T N, et al. Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e17943.
- [26] THONGKAMKON P, KIATYINGANGSULEE T, GOTTSCHALK M. Serotypes of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in Phayao Province, Thailand [J]. *BMC Res Notes*, 2017, 10 (1): 53.
- [27] KERDSIN A, HATRONJIT R, GOTTSCHALK M, et al. Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2017, 50 (4): 545-546.
- [28] LIU Z, ZHENG H, GOTTSCHALK M, et al. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e72070.
- [29] MURRAY G G R, HOSSAIN A S M M, MILLER E L, et al. The emergence and diversification of a zoonotic pathogen from within the microbiota of intensively farmed pigs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120 (47): e2307773120.
- [30] 许杨, 王瑞光, 彭泽仁, 等. 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.
- [31] 刘召颖, 朱夏雨, 牛洪颖, 等. 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.
- [32] 刘嘉楠, 蒲晚霞, 马家乐, 等. 猪链球菌多血清型保守毒力因子的筛选与鉴定 [J]. *南京农业大学学报*, 2026, 49 (2): 353-363.
- [33] ROY D, ATHEY T B T, AUGER J P, et al. A single amino acid polymorphism in the glycosyltransferase CpsK defines four *Streptococcus suis* serotypes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 4066.
- [34] LACOUTURE S, OLIVERA Y R, MARIELA S, et al. Distribution and characterization of *Streptococcus suis* serotypes isolated from January 2015 to June 2020 from diseased pigs in Québec, Canada [J]. *Can J Vet Res*, 2022, 86 (1): 78-82.

· 信息 ·

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术 欢迎订阅 2026 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊，由原中央大学畜牧兽医系编辑出版，著名兽医学家罗清生教授首任主编。始终遵循“为社会服务，为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合，普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选《中文核心期刊要目总览》、“中国科技核心期刊”和“中国农林科技核心期刊”，先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、全国高校优秀期刊、江苏省高校优秀科技期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

读者对象：畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

主要内容：主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

征订办法：本刊为月刊，大 16 开，定价：28.00 元，全年 12 期共 336.00 元。邮发代号：28-42，全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地址：江苏省南京市江北新区滨江大道 666 号南京农业大学行政楼 A320《畜牧与兽医》编辑部

邮编：211800

电话：025-84395701 (编辑部)

E-mail：muyizz@njau.edu.cn