

猪链球菌 2 型和 9 型双重 Basic-RPA 检测方法的构建与应用

张慧辉, 王可心, 李艳伟, 魏小兵, 王磊, 胡建和, 丁轲, 刘明成, 夏小静

(河南科技学院动物科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 【目的】通过构建猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 2 型和 9 型双重快速检测方法, 为监测 SS 的流行和传播的提供技术支持。【方法】分别以 SS2 特有荚膜多糖编码基因 (capsular polysaccharide 2J gene, *cps2J*) 和 SS9 特有荚膜多糖编码基因 (capsular polysaccharide 9H gene, *cps9H*) 为靶标设计引物和探针, 对反应体系和反应条件进行优化, 建立基础型重组酶聚合酶等温扩增 (Basic-recombinase polymerase amplification, Basic-RPA) 快速检测技术, 并对其特异性、灵敏度、重复性和临床应用效果进行评价。【结果】特异性结果表明, 构建的 SS2 和 SS9 双重 Basic-RPA 检测方法与其他常见病原体无交叉反应, 特异性良好。灵敏度结果显示, 该方法针对 SS2 和 SS9 检测限达到 $1 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$, 高于常规 PCR 的 $1 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ 。重复性结果显示该方法有良好的稳定性。用双重 Basic-RPA 方法对 41 例临床样品进行检测, 其检出率为 24.4%, 与单重 Basic-RPA 方法检测结果一致, 高于细菌分离方法的检出率 12.2%, 以及常规 PCR 方法的检出率 19.5%。【结论】构建的 SS2 和 SS9 的双重 Basic-RPA 检测方法, 特异性和稳定性好, 灵敏度高, 可应用于 SS 快速诊断和血清分型。

关键词: 猪链球菌; 基础型重组酶聚合酶等温扩增; 荚膜多糖; 血清分型; 双重检测

中图分类号: S852.61 文献标志码: A

Establishment and application of dual Basic-RPA detection method for differentiating *Streptococcus suis* serotype 2 and serotype 9

收稿日期: 2025-05-29 接受日期: 2025-08-27

基金项目: 河南省高校科技创新人才项目 (23HASTIT046); 河南省优秀青年科学基金项目 (232300421031); 国家自然科学基金面上项目 (32172876, 32473070)

作者简介: 张慧辉 (1970—), 女, 河南鲁山人, 副教授, 硕士, 主要从事动物病原与新兽药研发, E-mail: zhh-05@163.com;

王可心 (1999—), 女, 河北徐水人, 硕士, 主要从事动物病原与新兽药研发, E-mail: wkx15038306051@163.com。

通信作者: 刘明成 (1980—), 男, 河南信阳人, 实验师, 博士, E-mail: liumc@hist.edu.cn; 夏小静 (1986—), 男, 安徽庐江人, 副教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: quik500@163.com。

ZHANG Huihui, WANG Kexin, LI Yanwei, WEI Xiaobing, WANG Lei, HU Jianhe, DING

Ke, LIU Mingcheng, XIA Xiaojing

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology,
Xinxiang 453003, China)

Abstract: **【Objective】** To develop a dual rapid detection method for *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) and serotype 9 (SS9), thereby providing an effective tool for monitoring the prevalence and spread of *Streptococcus suis* (SS). **【Method】** The Capsular Polysaccharide 2J gene (*cps2J*) of SS2 and the Capsular Polysaccharide 9H gene (*cps9H*) of SS9 were targeted in this study. We designed specific primers and probes for *cps2J* and *cps9H*, optimized the reaction system and conditions, and established a basic recombinant enzyme polymerase isothermal amplification (Basic-RPA) technique for rapid detection. Furthermore, we evaluated the specificity, sensitivity, repeatability, and clinical applicability of this method. **【Result】** The sensitivity results showed that the detection limit of this method for SS2/9 reached $1 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, which is much higher than that of conventional PCR at $1 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Repeatability results showed the method has a good stability. The double Basic-RPA method was employed to analyze 41 clinical samples, yielding a detection rate of 24.4%. This result was consistent with that obtained using the single Basic-RPA method. Furthermore, the detection rate achieved by the double Basic-RPA method was higher than those obtained by the bacterial isolation method (12.2%) and conventional PCR method (19.5%). **【Conclusion】** The constructed dual Basic-RPA detection method of SS2 and SS9 has good specificity and stability and high sensitivity, providing a new method for the rapid diagnosis and serotyping of SS and laying the foundation for the development of a more complex multiplex detection system.

Key words: *Streptococcus suis*; Basic-recombinase polymerase amplification (Basic-RPA); serotype; capsule polysaccharides; dual detection

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是重要的人兽共患病病原体, 可引起包括脑膜炎、败血症、肺炎、心内膜炎、关节炎等多种疾病, 给全球养猪业造成了重大经济损失^[1-3]。SS

是革兰阳性菌，根据荚膜多糖（capsule polysaccharides, CPS）的差异，可分为 29 个血清型^[4]。SS2 被认为是致病性最强、报告病例最多的血清型^[5]。1968 年，人感染 SS 病例被首次报道，而在 1990 年，中国首次出现 SS2 菌株感染人的疑似病例^[6]。之后，江苏省和四川省分别于 1998 年和 2005 年暴发了人感染 SS2 的疫情^[7]。在东南亚地区，SS2 也是引起人脑膜炎的主要病原^[8]。除了 SS2 以外，SS9 作为次高致病亚型，已经在中国畜牧业发达地区形成了区域性流行态势^[9-12]。SS9 逐渐成为中国猪感染链球菌的主要血清型之一^[13-14]。随着人感染 SS9 导致败血性休克的严重病例被报道^[15]，表明由 SS9 造成的人兽感染需要引起足够的重视。目前，河南省猪场流行的 SS 血清型主要以 SS2 为主，其次是 SS7 和 SS9^[16]；而湖南省、广西壮族自治区等也以 SS2、SS9 为主^[17-18]。由此可见，建立一种针对 SS2 和 SS9 感染的快速检测方法十分必要。

SS 的微生物学检测方法主要是进行分离培养及生化鉴定等，该方法费时费力，而且结果不稳定，还需要结合其他方法进行验证；免疫学检测方法主要有酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）和胶体金免疫层析法（gold immunochromatographic assay, GICA），但 ELISA 过程烦琐，样品制备难度大，耗时较长且灵敏度较低，GICA 则不稳定且灵敏度不高^[19]；分子生物学检测方法主要有 PCR 技术、环介导等温扩增技术（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）等。刘琪等^[20]建立了 SS 的 2 型、7 型和 9 型的多重 PCR 检测方法。李晓月^[21]建立了 SS 的 2 型、7 型和 9 型的荧光定量 PCR 检测方法。但是，二者都需要高昂的精密仪器和专业人员的操作，而且存在易污染和假阳性问题。LAMP 技术虽然克服了 PCR 技术的缺点，但引物设计要求复杂，而且易产生非特异性扩增。

重组酶聚合酶扩增技术（recombinase polymerase amplification, RPA）是一种新型的等温核酸扩增和检测技术^[22]，可分为基础 RPA（Basic-RPA）、实时荧光 RPA、侧向层析条检测 RPA、数字 RPA 和 RPA-CRISPR 联合检测。该技术基于重组酶（recombinase）和 DNA 聚合酶（polymerase）的协同作用，重组酶负责将引物插入双链 DNA 目标中，而聚合酶则沿着模板链延长并合成新链，替换原有互补链，循环重复上述过程达到指数扩增效果^[23]。RPA 具有反应条件温和（37~42 °C）、扩增速度快（15~30 min）、操作简便等优点，且只需便携式恒温器，降低了设备成本和复杂性^[24-26]。RPA 灵敏度高，兼容性强，可检测 1~10 个拷贝的小 DNA 靶标，对常见抑制剂具有高耐受性，并可以和下游的荧光检测、侧流免疫层析等方法结合^[27]。基于以上优点，RPA 被用于病原微生物等多个领域的检测。张闪闪等^[28]建立了 RPA-LFD 方法检测 SS，虽然有较高的灵敏度，但属于定性检测，而且不能确定血清型。

王璐^[29]建立了针对 SS2 的 RPA-Cas12a 检测方法，灵敏度较高，但只能检测 1 种血清型。

由于具备高效性、系统性、经济简便性等优点，双重检测方法被广泛应用于病原微生物的检测。马爱红等^[30]和史芳芳等^[31]分别建立了双重 LAMP 检测 2 种不同的病原体，但对于多血清型的病原体的检测来说，该方法还有一定局限性。双重 RPA 具备了双重 PCR 的灵敏度高和特异性强的优点，同时又避免了双重 PCR 和 LAMP 的缺点，非常适合病原微生物的现场快速检测，尤其对于 SS 这种多血清型且危害较大的人兽共患的病原体。基于此，针对 SS2 和 SS9 这 2 种致病性血清型，本研究以 *cps2J*、*cps9H* 为靶基因，通过构建一种双重 Basic-RPA 检测方法，通过对其特异性、灵敏度、重复性和临床应用效果进行评价。本研究构建的双重 Basic-RPA 检测方法，既能对 SS 进行定性检测，又可以对其进行分型研究，大大提高了检测效率，将为 SS 的快速诊断和血清分型提供技术支撑。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和样品 SS1、SS7 和 SS9 菌株由山东省滨州畜牧兽医研究院沈志强研究员惠赠，SS2 菌株由吉林大学雷连成教授惠赠。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, *A. hydrophila*, AH-1)、肠致病性大肠杆菌 (*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC, Isolated strain)、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS, Isolated strain)、沙门氏菌 (*Salmonella*, CVCC541)、巴氏杆菌 (*Pasteurella*, Isolated strain)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC49525)、猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP, CVCC259) 均由河南科技学院动物科技学院预防兽医学实验室保存。河南省不同地区规模化猪场采集的 41 份临床症状疑似猪链球菌感染的病猪扁桃体组织由河南科技学院动物医院保存。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒和 BHI 培养基购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; THB、TSB、LB 培养基、DNA 抽提剂购自北京索莱宝科技有限公司; DNA 上样缓冲液和 50×TAE 缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司; 琼脂糖购自上海贝晶生物技术有限公司; Taq PCR Master Mix II 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; TwistAmp™ Basic kit 购自 TwistDX 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取 将冻存的细菌进行解冻并在固体培养基上划线培养，然后挑取单菌落于液体培养基中培养。THB 培养基用于 SS；BHI 培养基用于 App；TSB 培养基用于 *Pasteurella* 和 Hps；LB 培养基用于 *A. hydrophila*、*E.coli*、*S. aureus* 和 *Salmonella*。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对处于对数生长期的细菌的 DNA 进行提取。将革兰氏阳性菌与阴性菌分别重复多次提取，可在一定程度上降低交叉污染的风险。用超微量核酸蛋白浓度分析仪测定各菌种 DNA 的质量浓度和纯度。

在进行双重 Basic-RPA 检测时，将所提取的各个细菌基因组 DNA 的质量浓度稀释至 10^1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，将 SS2 和 SS9 进行同体积混合，然后采用十倍倍比稀释法，进行梯度稀释，最终质量浓度依次为 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 引物的设计与合成 不同血清型的荚膜结构差异主要由 CPS 基因簇所决定，因此，本研究选取 SS2 和 SS9 的特异的荚膜多糖基因序列（*cps2J*, Accession Number: DQ410853.1; *cps9H*, Accession Number: JX986798.1）作为靶基因。从 GenBank 获取靶基因的基因序列并用 DNASTar 软件进行比对分析，并通过 NCBI BLAST 比对，根据《TwistAmp® DNA 扩增试剂盒分析设计手册》中引物设计的要求，使用软件 Primer5.0 进行引物设计，共设计 5 对引物（表 1），均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	序列 (5→3')	目的片段/bp
Primer name	Sequence	Fragment size
<i>CPS2J212</i>	F: GGAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAA	214
	R: AAAAGTAGCAAGTAACCCTCCCGACAAATC	
<i>CPS2J216</i>	F: GTTTGGAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAA	216
	R: AAGTAGCAAGTAACCCTCCCGACAAATCAC	
<i>CPS9H222</i>	F: TCAGACTGCATACAGGGCAGAAGTGCTAGG	222
	R: AAACGACTCCCCAAAGAATTGTGAAACGAC	
<i>CPS9H458</i>	F: AGGGCAGAAGTGCTAGGTGATATGATAAA	458

R: ATCCCAAATACGCTATGTAGACGAAGTGC

CPS9H304

F: AGACTGCATACAGGGCAGAAGTGCTAGGTG

304

R: ATCCTTTCTACATCATCATTTTCTCCATCAAA

1.2.3 单重 Basic-RPA 引物的筛选 采用 PCR 对表 1 的引物进行初步筛选, 随后根据 Basic-RPA 反应试剂盒说明书配置反应体系, 反应总体积为 50 μL : 缓冲液: 29.5 μL 、ddH₂O: 11.2 μL 、上游引物: 2.4 μL 、下游引物: 2.4 μL , 模板: 2 μL 、Mg²⁺: 2.5 μL 。在 39 °C 的恒温反应器中反应 20 min, 然后向各反应管中加入等体积 DNA 抽提剂进行 DNA 纯化, 8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 2 min, 上清液即为纯化的 DNA。取 5 μL 纯化的 DNA 上样, 进行琼脂糖凝胶电泳分析, 恒压 110 V 电泳 30 min。选择条带最清晰、无杂带且阴性对照无条带的引物进行后续研究。

1.2.4 双重 Basic-RPA 引物体积的优化 同时添加多对引物可能会出现非特异性扩增, 因此, 需对双重 Basic-RPA 体系进行优化, 保证试验的稳定性。使用控制变量法对双重 Basic-RPA 反应的引物体积比进行了优化。将 2 种血清型的引物体积 (μL) 设置了 9 组优化体系, V (CPS2J212/ μL) : V (CPS2J212/ μL) 分别为 2.4 : 0、2.4 : 0.6、2.4 : 1.2、2.4 : 1.8、2.4 : 2.4、1.8 : 2.4、1.2 : 2.4、0.6 : 2.4 和 0 : 2.4。扩增结束后, 加入等体积的 DNA 抽提剂进行提纯, 用质量分数 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 恒压 110 V 电泳 30 min, 确定引物最佳体积比。

1.2.5 双重 Basic-RPA 反应时间和温度的优化 使用 1.2.4 筛选的引物最佳体积, 分别对反应时间和温度进行优化。反应时间上, 分别选择 5、10、15、20、25、30、35、40 min 进行反应; 反应温度上, 分别选择 25、30、35、37、39、45 °C 进行反应。上述反应产物分别用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 恒压 110 V 电泳 30 min, 筛选最佳反应时间和温度。

1.2.6 双重 Basic-RPA 灵敏度试验 将 SS2 和 SS9 相同体积的 DNA 进行混合, 采用 10 倍系列稀释法, 梯度稀释为 10⁰~10⁻⁷ mg \cdot L⁻¹ 8 个质量浓度, 用所建立的双重 Basic-RPA 法进行检测, 评价该体系的最低检出限, 同时进行 PCR 检测, 将检测结果进行比较。

1.2.7 双重 Basic-RPA 特异性试验 用 1.2.5 优化的反应条件分别对 SS1、SS7、EPEC、*Salmonella*、Hps、*S. aureus*、App、*Pasteurella*、*A. hydrophila* 的 DNA 进行双重 Basic-RPA 反应，同时设 SS2 和 SS9 混合样本、单独的 SS2 和 SS9 样本为阳性对照，以检验该方法的特异性。

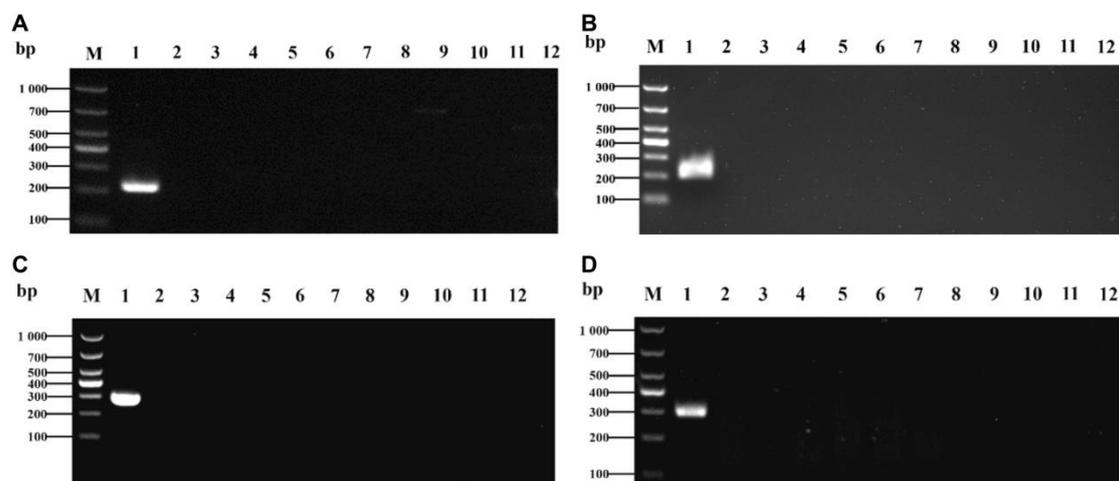
1.2.8 双重 Basic-RPA 重复性试验 SS2 和 SS9 的 DNA 以等体积混合，且质量浓度分别为 10、1、0.1 mg · L⁻¹ 进行双重 Basic-RPA 扩增，重复 3 次并对 3 组试验的扩增结果进行分析。

1.2.9 双重 Basic-RPA 临床样品检测 从河南省不同地区规模化猪场采集了 41 份临床症状疑似猪链球菌感染的病猪组织样品。提取样品 DNA 并以此为模板，按最适反应条件进行 Basic-RPA 检测。同时使用细菌分离培养和常规 PCR 进行对照检测。将检测结果进行比较，验证双重 Basic-RPA 方法的检测效果。

2 结果与分析

2.1 SS2 和 SS9 单重 Basic-RPA 引物筛选

经过 PCR 初步筛选，分别选择 CPS2J212F/CPS2J212R 和 CPS9H304F/CPS9H304R 作为 SS2 和 SS9 的引物，并以对应菌株的 DNA 为模板，进行单重 Basic-RPA 反应。SS1、SS7 和其他 7 种细菌 DNA 设为对照组。结果如图 1 所示，无论是 PCR 还是单重 Basic-RPA，SS2 和 SS9 都只出现 1 条特异性条带，无非特异性条带出现。说明所选引物特异性好，和 SS 其他血清型及 7 种病原体均无交叉反应。



A. SS2 PCR 特异性结果；B. SS2 RPA 特异性结果。M. 1 000 DNA Ladder；1~12：SS2 阳性对照、SS1、SS7、

SS9、EPEC、*Salmonella*、Hps、*S. aureus*、App、*Pasteurella*、*A. hydrophila*、阴性对照。C. SS9 PCR 特异性结果；D. SS9 RPA 特异性结果。M. 1000 DNA Ladder；1~12：SS9 阳性对照、SS1、SS2、SS7、EPEC、*Salmonella*、Hps、*S. aureus*、App、*Pasteurella*、*A. hydrophila*、阴性对照。

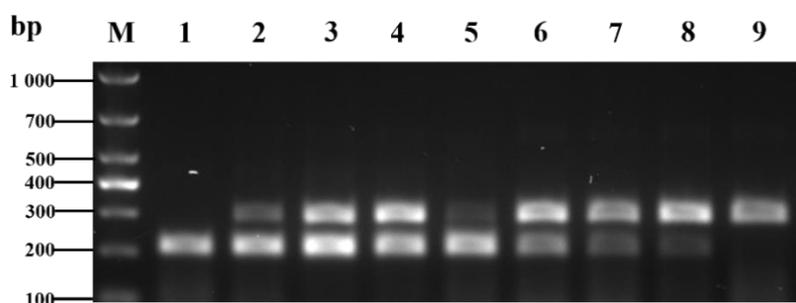
A. SS2 PCR specific results；B. SS2 RPA specific results；M. 1000 DNA Ladder；1~12：SS2 positive control, SS1, SS7, SS9, EPEC, *Salmonella*, Hps, *S. aureus*, App, *Pasteurella*, *A. hydrophila*, negative control. C. SS9 PCR specific results；C. SS9 RPA specific results；M. 1000 DNA Ladder；1~12：SS9 positive control, SS1, SS2, SS7, EPEC, *Salmonella*, Hps, *S. aureus*, App, *Pasteurella*, *A. hydrophila*, negative control.

图 1 SS2 和 SS9 PCR 与单重 Basic-RPA 特异性对比

Fig.1 SS2 and SS9 PCR and single Basic-RPA specificity results

2.2 SS2/9 双重 Basic-RPA 引物体积分析

保持其他条件不变，对 9 组不同引物体积进行反应，结果如图 2 所示，条带亮度随着 2 种引物体积的降低而逐渐增强。当 $V(\text{CPS2J212}/\mu\text{L}) : V(\text{CPS9H304}/\mu\text{L})$ 为 2.4 : 1.8 时，SS2 和 SS9 的电泳条带亮度较为一致，随后亮度逐渐减弱。经过重复试验对比，本研究最终选定 $V(\text{CPS2J212}/\mu\text{L}) : V(\text{CPS9H304}/\mu\text{L})$ 为 2.4 : 1.8 作为引物最佳体积。



M. 1000 DNA Ladder；1~9：引物体积 $V(\text{CPS2J212}/\mu\text{L}):V(\text{CPS9H304}/\mu\text{L})$ 分别为 2.4:0、2.4:0.6、2.4:1.2、2.4:1.8、2.4:2.4、1.8:2.4、1.2:2.4、0.6:2.4 和 0:2.4。

M. 1000 DNA Ladder；1~9：Primer volume $V(\text{CPS2J212}/\mu\text{L}):V(\text{CPS9H304}/\mu\text{L})$ are 2.4:0, 2.4:0.6, 2.4:1.2, 2.4:1.8, 2.4:2.4, 1.8:2.4, 1.2:2.4, 0.6:2.4, and 0:2.4 respectively.

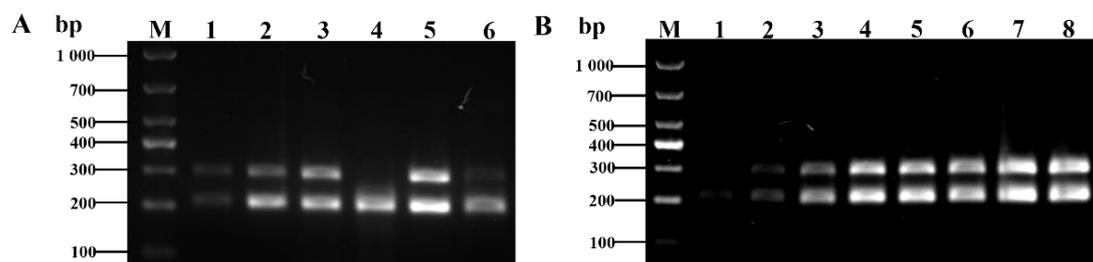
图 2 SS2/9 双重 Basic-RPA 引物体积优化

Fig.2 Optimization of primervolume of SS2/9 dual Basic-RPA detection methods

2.3 SS2/9 双重 Basic-RPA 反应温度和时间分析

根据 2.2 所得到的引物体积，分别对反应温度（25、30、35、37、39、45℃）和反应时间（5、10、15、20、25、30、35、40 min）进行优化。从图 3A 中可以看出，从 25℃ 开

始，条带亮度逐渐增强，39 °C 时条带亮度达到最强，之后逐渐变弱，因此选择 39 °C 为最佳反应温度。从图 3B 可以看出，从 5 min 开始，条带亮度逐渐增强，到 20 min 亮度最强，之后亮度略有减弱，但差异不大，为反应体系的时效性考虑，反应时间选择 20 min (图 4B)。



A. 反应温度优化; B.反应时间优化。M. 1000 DNA Ladder; 1~6: 反应温度分别为 25、30、35、37、39、45 °C; 1~8: 反应时间分别为 5、10、15、20、25、30、35、40 min。

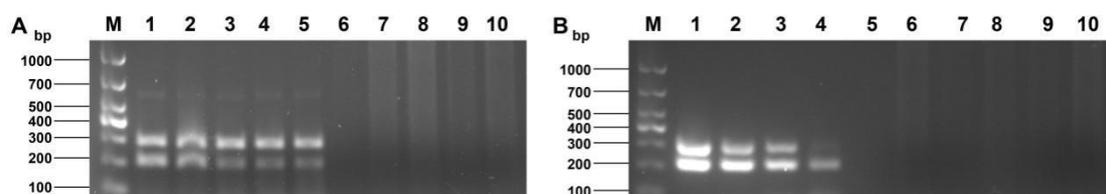
A. Reaction temperature optimization; B. Reaction time optimization. M. 1000 DNA Ladder; 1~6: reaction temperature 25, 30, 35, 37, 39, 45 °C; 1~8: reaction time 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min.

图 3 SS2/9 双重 Basic-RPA 反应温度及时间优化

Fig.3 Optimization of reaction temperature and time of SS2/9 dual Basic-RPA detection methods

2.4 SS2/9 双重 Basic-RPA 灵敏度分析

双重 Basic-RPA 与双重 PCR 的灵敏度检测结果如图 4 所示，随着模板 DNA 质量浓度的降低，条带亮度都逐渐减弱。对于双重 Basic-RPA，当模板质量浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，条带仍可见，如图 4A 所示。对于双重 PCR，模板质量浓度在 $1 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后无可见条带，如图 4B 所示。由此可见，双重 Basic-RPA 方法的灵敏度优于双重 PCR 方法。



A. 双重 Basic-RPA 灵敏度结果; B. PCR 灵敏度结果。M. 1000 DNA Ladder; 1~9: 模板 DNA 质量浓度分别为 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 10: 阴性对照。

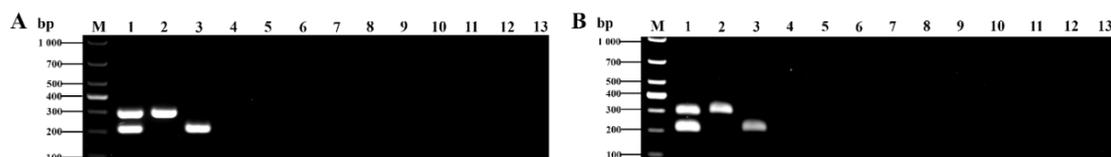
A. Dual Basic-RPA sensitivity results; B. PCR sensitivity results; M. 1000 DNA Ladder; 1~9: The template DNA concentrations 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 10: negative control.

图 4 SS2/9 双重 Basic-RPA 与 PCR 灵敏度对比

Fig.4 Sensitivity results of SS2/9 dual Basic-RPA and PCR

2.5 SS2/9 双重 Basic-RPA 特异性分析

使用双重 PCR 及双重 Basic-RPA 检测体系进行特异性检测，结果如图 5 所示。SS9 和 SS2 阳性对照、SS9 阳性对照和 SS2 阳性对照均出现清晰明亮的条带，阴性对照、SS1、SS7、EPEC、*Salmonella*、Hps、*S. aureus*、App、*Pasteurella* 和 *A. hydrophila* 未出现条带，和双重 PCR 的检测结果一致。这说明建立的双重 Basic-RPA 方法特异性良好。



A. PCR 特异性结果；B. 双重 Basic-RPA 特异性结果；M. 1000 DNA Ladder；1~13 分别为：SS9 和 SS2 阳性对照、SS9 阳性对照、SS2 阳性对照、阴性对照、SS1、SS7、EPEC、*Salmonella*、Hps、*S. aureus*、App、*Pasteurella*、*A. hydrophila*

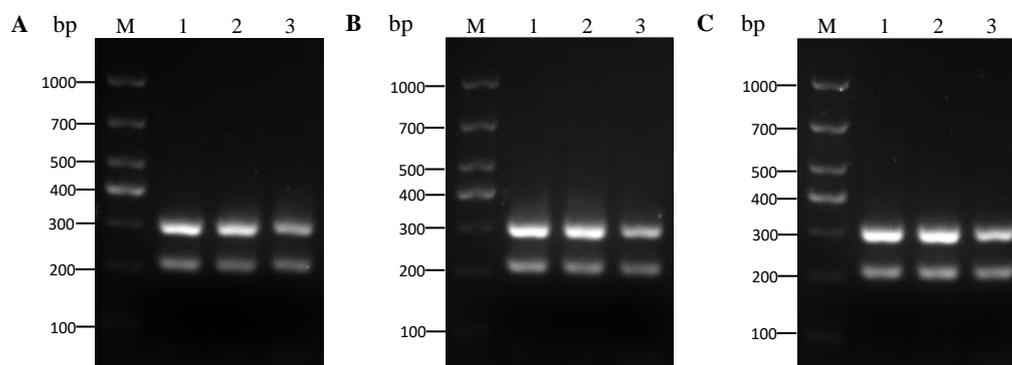
A. PCR specific results；B. Dual Basic-RPA specific results；M. 1000 DNA Ladder；1~13: positive control of SS9 and SS2, SS9 positive control, SS2 positive control, negative control, SS1, SS7, EPEC, *Salmonella*, Hps, *S. aureus*, App, *Pasteurella*, *A. hydrophila*

图 5 SS2/9 双重 Basic-RPA 与 PCR 特异性对比

Fig.5 Specific results of SS2/9 dual Basic-RPA and PCR

2.6 SS2/9 双重 Basic-RPA 重复性分析

重复性试验结果如图 6 所示，SS2 和 SS9 的 3 个不同质量浓度均扩增出条带，而且每个质量浓度的条带亮度基本一致。这说明本研究建立的 Basic-RPA 方法稳定性好。



A. 第 1 次扩增；B. 第 2 次扩增；C. 第 3 次扩增。M.1000 DNA Ladder；1~3: 模板 DNA 质量浓度分别为 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} ng/ μ L。

A. The first amplification；B. The second amplification；C. The third amplification.M.1000 DNA Ladder；1~3:

The template DNA concentrations 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} ng/ μ L.

图 6 SS2/9 双重 Basic-RPA 重复性结果

Fig.6 Repeatability test results of SS2/9 dual Basic-RPA

2.7 SS2/9 双重 Basic-RPA 临床样品检测分析

对采集的 41 份猪组织样品，按照最佳反应条件进行双重 Basic-RPA 检测，同时与细菌培养、常规 PCR 和单重 Basic-RPA 相比较，结果如表 2 所示。细菌培养方法检测出 5 个样本，常规 PCR 方法共检测出 8 个阳性样本，其中，单独感染 2 型 5 份，9 型 2 份，2/9 共感染 1 份；单重 Basic-RPA 方法共检测出 10 个阳性样本，其中，单独感染 2 型 6 份，9 型 2 份，2/9 共感染 2 份；双重 Basic-RPA 方法共检测出 10 个阳性样本，其中，单独感染 2 型 6 份，9 型 2 份，2/9 共感染 2 份。由此可知，SS2/9 双重 Basic-RPA 方法与单重 Basic-RPA 检出率一致，优于细菌培养方法和常规 PCR 方法。

表 2 不同检测方法对 SS2/9 临床样品检测结果的对比分析

Table 2 Comparative analysis of detection results for SS2/9 clinical samples using different detection

methods		
检测方法	阳性病例数/份	阳性率/%
Test method	Number of positive cases	Positive rate
细菌培养	5	12.2
Bacterial isolation		
常规 PCR	8 (2 型感染 5, 9 型感染 2, 2/9 型共感染 1)	19.5
Conventional PCR		
单重 Basic-RPA	10 (2 型感染 6, 9 型感染 2, 2/9 型共感染 2)	24.4
Single Basic-RPA		
双重 Basic-RPA	10 (2 型感染 6, 9 型感染 2, 2/9 型共感染 2)	24.4
Dual Basic-RPA		

3 结论与讨论

SS 血清型较多，毒力因子复杂，临床症状多样，还常和其他病原体如猪瘟、副猪嗜血杆菌等混合感染^[32-33]。SS 不仅危害养猪业，还威胁公共卫生和食品安全。除了 SS2，SS9、

SS7 和 SS1 等也具有致病性，且各个血清型之间没有交叉保护性。因此，对 SS 的快速诊断对于 SS 的防控具有重要意义^[34]。

本研究在单重 Basic-RPA 检测体系的基础上，以 *cps2J*、*cps9H* 基因为靶标，设计了 2 对特异性引物建立了 SS2 和 SS9 双重 Basic-RPA 一管同步检测。和单重检测方法相比，双重 Basic-RPA 方法能同时检测 SS 的 2 种血清型，减少了检测时间，降低了检测成本，提高了检测效率^[35]。双重 RPA 检测方法要严格处理好反应条件的兼容性，如多个引物量的配比。本研究通过引物体积优化试验发现，当 $V(\text{CPS2J212}/\mu\text{L}) : V(\text{CPS9H304}/\mu\text{L})$ 在 2.4 : 1.8 时，扩增效率高，且高于 PCR，这为后续开发更多血清型的联检体系提供了重要参考。当多对引物存在时，需要考虑各对引物的 GC 含量，这和反应温度直接相关。本研究中 *cps2J* 和 *cps9H* 的 GC 含量分别为 40.8% 和 41.5%，均处于正常范围，*cps2J212* 与 *cps9H304* 组合在 39 °C 达到最高扩增效率。时间梯度试验表明，在 20 min 即可完成有效扩增，既保证了反应物充分反应，又避免了时间过长导致的非特异性扩增或反应物过度消耗，实现了检测效率与准确性的平衡。

特异性方面，通过精心设计引物，分别以 SS2/SS9 混合样品、SS2 单个样品、SS9 单个样品为阳性对照，以 SS1、SS7 和其他 7 种常见病原菌作为检测对象，结果仅目标菌阳性对照出现明显条带，其他菌都没有条带出现，充分证明该方法对 SS2 和 SS9 具有高度特异性。引物 CCPS2J212 与 CPS9H304 在 SS2 和 SS9 检测中表现出色，其在阴性对照中无扩增条带，有效避免了假阳性结果的出现。这一特性使得在临床复杂的 SS 感染环境中，能够准确识别出 SS2 和 SS9，为 SS 的精准诊断提供了坚实保障。

灵敏度方面，该双重等温扩增体系的检测限达到 0.001 mg L^{-1} ，展现出良好的低质量浓度样本检测能力。吴静波等^[36]建立的双重 PCR 技术对 SS 通用型和 2 型的检测限为 5 拷贝· μL^{-1} ，靳曼玉等^[37]建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 对 SS 的检测限为 75.34 拷贝· μL^{-1} ，均低于该方法的灵敏度。RPA 的引物长度一般为 30~38 nt，高于 PCR 的 17~25 nt。引物过短会降低重组率，影响扩增速度和灵敏度。和 PCR 相比，RPA 的反应过程简单且迅速，反应温度恒定，影响因素少，有助于灵敏度的提高。双重 Basic-RPA 检测方法的高灵敏度意味着在 SS 发病早期，病原菌载量较低时，也能够及时、准确地检测到，为疾病的早期防控争取宝贵时间，有效降低病原菌传播风险，减少 SS 的大规模爆发。

本研究建立的 RPA 体系与 LAMP 技术相比具有更灵活的设计空间，LAMP 需要 4 条引物且对茎环结构有严格要求，而本体系仅用 2 对标准引物即实现双重检测。与微流控芯片联用 PCR 技术相比^[38]，本方法不需要精密温控设备，检测成本降低约 70%。但本方法仍存在

两个问题。一是扩增产物需电泳确认，限制了现场即时检测应用。二是多重检测时引物间存在竞争抑制，需通过化学添加剂改善反应兼容性。因此，基于现有成果，后续研究可联合其他检测技术如 CRISPR/Cas12a 系统或 *PfAgo* 体系进行荧光信号输出，建立多重检测体系，可以减少目前研究的部分局限性，以开发更加高效灵敏的新型检测技术。

本研究构建了 SS 的 2 种血清型（SS2/9）的双重 Basic-RPA 检测体系，实现了 SS 的 2 种血清型的一管同步检测。反应时间控制在 20 min；检测限低至 0.001 mg L^{-1} ，低于传统 PCR 检测限；特异性检测显示与其他 7 种病原菌无交叉反应；重复性结果显示其重复性好；41 例临床样本检测中，在更短的时间内准确识别出混合感染病例。此检测方法为 SS 的精准防控提供了技术支撑，为开发更复杂的多联检体系奠定了基础。

1 参考文献 **References:**

2 [1] SHEN B, TONG L Y, QIU J, et al. Suppurative meningitis complicated with arthritis caused by *Streptococcus*
3 *suis* infection: a case report[J]. Infection and Drug Resistance, 2024, 17: 561-569.

4 [2] GUO G L, WANG Z H, LI Q, et al. Genomic characterization of *Streptococcus parasuis*, a close relative of
5 *Streptococcus suis* and also a potential opportunistic zoonotic pathogen[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 469.

6 [3] 蔡田, 罗行炜, 徐引第, 等. 猪链球菌对大环内酯类抗生素的耐药性研究[J]. 河南农业大学学报, 2019,
7 53(1): 73-81.

8 CAI T, LUO X W, XU Y D, et al. Research on the resistance of *Streptococcus suis* to macrolide antibiotics[J].
9 Journal of Henan Agricultural University, 2019, 53(1): 73-81.

10 [4] FENG Y J, ZHANG H M, WU Z W, et al. *Streptococcus suis* infection: An emerging/reemerging challenge of
11 bacterial infectious diseases?[J]. Virulence, 2014, 5(4): 477-497.

12 [5] ÁGOSTON Z, TERHES G, HANNAUER P, et al. Fatal case of bacteremia caused by *Streptococcus suis* in a
13 splenectomized man and a review of the European literature[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica,
14 2020, 67(3): 148-155.

15 [6] 张腾飞. 猪链球菌 2 型 *rel_{ss}* 基因和 *perR* 基因功能的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

16 ZHANG T F. Functional characterization of *rel_{ss}* and *perR* genes from *streptococcus suis* serotype 2[D]. Wuhan:
17 Huazhong Agricultural University, 2012.

18 [7] JIANG F, GUO J J, CHENG C, et al. Human infection caused by *Streptococcus suis* serotype 2 in China:
19 Report of two cases and epidemic distribution based on sequence type[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1):
20 223.

21 [8] 冯于童, 胡金旺, 董芳婷, 等. 猪链球菌中常见的毒力调节因子研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2025,
22 59(4): 580-591.

23 FENG Y T, HU J W, DONG F T, et al. Research progress of common regulators of virulence in *Streptococcus*
24 *suis*[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2025, 59(4): 580-591.

25 [9] KANG W M, WANG M L, YI X L, et al. Investigation of genomic and pathogenicity characteristics of
26 *Streptococcus suis* ST1 human strains from Guangxi Zhuang Autonomous Region (GX) between 2005 and 2020 in
27 China[J]. Emerging Microbes & Infections, 2024, 13(1): 2339946.

28 [10] HATRONJIT R, FITTIPALDI N, JENJAROENPUN P, et al. Genomic comparison of two *Streptococcus*
29 *suis* serotype 1 strains recovered from porcine and human disease cases[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 5380.

30 [11] LIANG P J, WANG M L, GOTTSCHALK M, et al. Genomic and pathogenic investigations of *Streptococcus*

31 *suis* serotype 7 population derived from a human patient and pigs[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1):
32 1960-1974.

33 [12] RIECKMANN K, SEYDEL A, KLOSE K, et al. Vaccination with the immunoglobulin M-degrading enzyme
34 of *Streptococcus suis*, Ide_{Ssuis}, leads to protection against a highly virulent serotype 9 strain[J]. *Vaccine*, 2019, 3:
35 100046.

36 [13] SÁNCHEZ DEL REY V, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL J F, MENTABERRE G, et al. Characterisation of
37 *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*)[J]. *The Veterinary Journal*, 2014, 200(3): 464-467.

38 [14] TANG F, PAN Z H, LI D Z, et al. Isolation and characterization of a *Streptococcus suis* serotype 9 from a wild
39 cat[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 275-282.

40 [15] KERDSIN A, HATRONJIT R, GOTTSCHALK M, et al. Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9
41 infection in humans[J]. *Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 2017, 50(4): 545-546.

42 [16] 徐引弟, 孙帅杰, 王治方, 等. 河南省猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(2):
43 501-509.

44 XU Y D, SUN S J, WANG Z F, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Streptococcus suis* in
45 Henan Province[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(2): 501-509.

46 [17] 姚清, 李润成, 卿任科, 等. 湖南省部分发病猪猪链球菌血清型的调查[J]. *养猪*, 2019(3): 113-115.

47 YAO Q, LI R C, QING R K, et al. Investigation on serotypes of *Streptococcus suis* in some diseased pigs in Hunan
48 Province[J]. *Swine Production*, 2019(3): 113-115.

49 [18] 马婷婷, 朱远致, 闭璟珊, 等. 广西部分地区猪群中猪链球菌分离株的毒力基因检测及毒力测定[J]. *黑
50 龙江畜牧兽医*, 2023(8): 81-85.

51 MA T T, ZHU Y Z, BI J S, et al. Virulence gene detection and virulence determination of *Streptococcus suis*
52 isolates in pigs in some areas of Guangxi region[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*,
53 2023(8): 81-85.

54 [19] 李繁, 彭泽仁, 刘荣启, 等. 猪链球菌检测技术研究进展[J]. *微生物学报*, 2025, 65(3): 883-897.

55 LI F, PENG Z R, LIU R Q, et al. Advances in detection methods for *Streptococcus suis*[J]. *Acta Microbiologica
56 Sinica*, 2025, 65(3): 883-897.

57 [20] 刘琪, 王娟, 周如月, 等. 猪链球菌 2、7、9 型多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国动物传染病学
58 报*, 2016, 24(3): 35-40.

59 LIU Q, WANG J, ZHOU R Y, et al. Development and utilization of a multiple PCR assay for identification of
60 serotypes 2, 7 and 9 of *Streptococcus suis*[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2016, 24(3): 35-40.

61 [21] 李晓月. 华中及周边地区猪链球菌病流行病学调查与分析及猪链球菌 2、7、9 型荧光定量 PCR 分型方
62 法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.

63 LI X Y. . Epidemiological investigation and analysis of swine *Streptococcus* disease in central China and
64 surrounding areas and establishment of a fluorescent quantitative PCR typing method for *Streptococcus suis*
65 serotype 2, 7 and 9[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024.

66 [22] CHEN X Y, WANG Y C, ZHU J, et al. A sensitive and rapid assay for *Mycoplasma hominis* detection based
67 on recombinase polymerase amplification[J]. *Clinical Laboratory*, 2021, 67(4): 33865261.

68 [23] ZHANG S S, WANG C Y, MENG K Y, et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick
69 (RPA-LFD) designed for rapid detection of canine distemper virus[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2024,
70 86(5): 584-591.

71 [24] 焦健, 夏炎, 武雪莉, 等. 基于逆转录重组酶聚合酶扩增技术的苹果病毒新型快速检测方法[J]. 河南农
72 业大学学报, 2021, 55(6): 1097-1103.

73 JIAO J, XIA Y, WU X L, et al. A novel rapid detection method for apple viruses based on reverse transcriptase
74 polymerase amplification[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2021, 55(6): 1097-1103.

75 [25] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of
76 the recombinase polymerase amplification[J]. *The Analyst*, 2018, 144(1): 31-67.

77 [26] LILLIS L, SIVERSON J, LEE A, et al. Factors influencing recombinase polymerase amplification (RPA)
78 assay outcomes at point of care[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2016, 30(2): 74-78.

79 [27] DENG W P, WANG S L, WANG L P, et al. Laboratory evaluation of a basic recombinase polymerase
80 amplification (RPA) assay for early detection of *Schistosoma japonicum*[J]. *Pathogens*, 2022, 11(3): 319.

81 [28] 张闪闪, 何斌, 李书光, 等. 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):
82 538-547.

83 ZHANG S S, HE B, LI S G, et al. Rapid detection of *Streptococcus suis* with visual RPA-LFD technology[J]. *Acta*
84 *Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(2): 538-547.

85 [29] 王璐. 猪链球菌 2 型 RPA-Cas12a 检测方法的建立及初步应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2023.

86 WANG L. Establishment and Preliminary application of RPA-Cas12a based detection method for *Streptococcus*
87 *suis* serotype 2[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2023.

88 [30] 马爱红. 羊痘病毒与羊口疮病毒双重 LAMP 检测方法的建立[D]. 银川: 宁夏大学, 2024.

89 MA A H. Establishment of a dual LAMP detection method for *Capripox* virus and *Orf* virus [D]. Yinchuan:
90 Ningxia University, 2024.

91 [31] 史芳芳, 王雷. 草莓枯萎病和炭疽病的双重 LAMP 快速病原鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(6):
92 1215-1221.

93 SHI F F, WANG L. Rapid pathogen identification of *Fusarium* wilt and anthracnose in strawberry(*Fragaria*
94 *ananassa*) by double LAMP[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(6): 1215-1221.

95 [32] XIA X J, QIN W H, ZHU H L, et al. How *Streptococcus suis* serotype 2 attempts to avoid attack by host
96 immune defenses[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2019, 52(4): 516-525.

97 [33] WANG Q, ZHOU H, HAO Q F, et al. Coinfection with porcine circovirus type 2 and *Streptococcus suis*
98 serotype 2 enhances pathogenicity by dysregulation of the immune responses in piglets[J]. Veterinary
99 Microbiology, 2020, 243: 108653.

100 [34] SEGURA M. *Streptococcus suis* research: progress and challenges[J]. Pathogens, 2020, 9(9): 707.

101 [35] 田兴苗, 王健霖, 郭磊, 等. 鸡毒支原体和滑液囊支原体双重 LFD-RPA 快速检测方法的建立[J]. 生物
102 技术通报, 2024, 40(7): 117-124.

103 TIAN X M, WANG J L, GUO L, et al. Establishment of dual LFD-RPA rapid detection method for *Mycoplasma*
104 *gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(7): 117-124.

105 [36] 吴静波, 南文金, 黄健强, 等. 猪链球菌通用型和 2 型双重荧光定量 PCR 快速检测技术的建立和应用[J].
106 畜牧兽医学报, 2018, 49(2): 368-377.

107 WU J B, NAN W J, HUANG J Q, et al. Development of a rapid duplex real-time PCR assay for *Streptococcus suis*
108 and *S.suis* serotype 2[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(2): 368-377.

109 [37] 靳曼玉, 高树基, 李金朋, 等. 猪链球菌和副猪嗜血杆菌双重 Taq Man 荧光定量 PCR 检测方法的建立与
110 应用[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(10): 1052-1058.

111 JIN M Y, GAO S J, LI J P, et al. Establishment and application of duplex Taq Man real-time PCR assay for
112 *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(10):
113 1052-1058.

114 [38] DONG X X, CHAO Y J, ZHOU Y, et al. The global emergence of a novel *Streptococcus suis* clade associated
115 with human infections[J]. EMBO Molecular Medicine, 2021, 13(7): e13810.