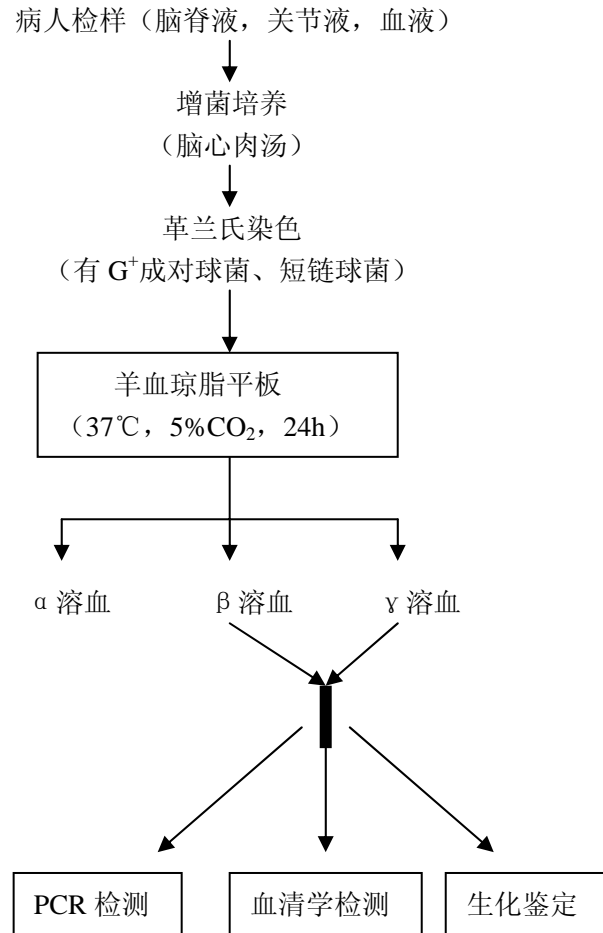


猪链球菌 2 型检验程序



一、 分离步骤和程序

1. 可采集病人的血，腹水，脑脊液或者是尸检标本；病、死猪的肝脏、脾脏、腹水、心血。4℃保存。
2. 制作肝脏、脾脏的触片，或用腹水、血液、脑脊液涂片，火焰固定后进行革兰氏染色，油镜下观是否有成对或短链状革兰氏阳性球菌。
3. 取有成对或短链状革兰氏阳性球菌的标本接种选择增菌培养液（含 15 微克/毫升多粘菌素 B，30 微克/毫升萘啶酮酸的脑心培养基），或直接划线接种含两种抗生素的羊血琼脂平板培养基，在蜡烛缸或 CO₂ 培养箱中培养。

二、血清学检测

1. 用兰氏分型乳胶凝集链球菌试剂盒进行分群
2. 用猪链球菌 1-34 个型血清进行分型

取一滴猪链球菌诊断血清悬滴于载玻片上，与一滴菌悬液充分混合，或用接种环（牙签也可）刮取单个菌落直接与血清混合，观察是否出现凝集反应，同时用生理盐水做对照。

三、生化反应

可用 API 生化鉴定系统的 api-strep 手工鉴定条进行鉴定，该方法可直接鉴定到种。普通实验室可以重点做 VP, 七叶苷水解试验，6.5%的氯化钠生长试验，45 度、10 度生长试验，胆汁耐受（麦康凯培养基）。结果依次为阴性，阳性，阴性，阴性，阴性，阴性，可初步认为猪链球菌。可送交到有条件的单位做进一步鉴定。

具有参考价值的生化反应项目有：

3.1 生长特性

10℃	45℃	6.5%NaCl	PH9.6	麦康凯培养基 (胆汁耐受)	
不生长	不生长	不生长	不生长	不生长	

3.2 发酵试验

棉子糖 RAF	乳糖 LAC	甘露糖 MNS	山梨醇 SOR	阿拉伯糖 ARA	核糖 RBS
+	+	—	—	—	—
葡糖 INU	甘露醇 MAN	丙酮酸 PRV	甘油 Glycerol	松三糖 melezitose	马尿酸盐 hippurate
+	—	—	—	—	—

四、基因鉴定，包括使用 PCR 技术和对 PCR 产物进行序列分析

可挑取分纯的菌落或在选择平板上湿润的可疑菌落，直接进行 PCR 检测。

1、检测猪链球菌种特异性 16S rRNA。

上游引物: cagtattaccgcatgtagatat

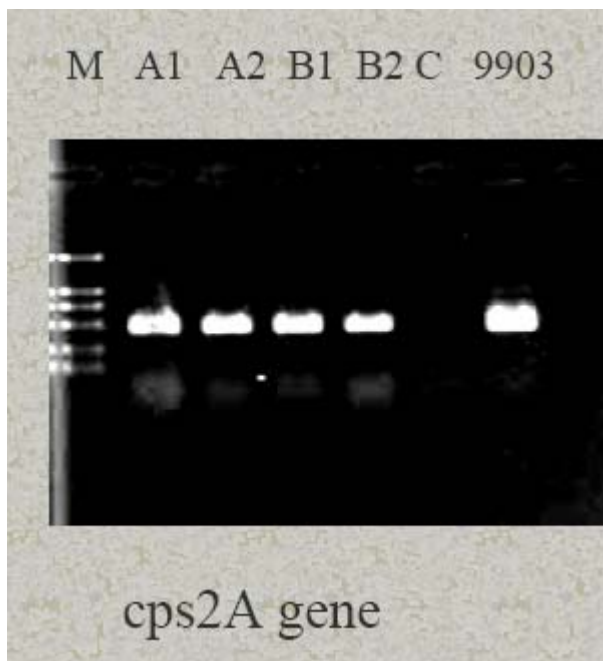
下游引物: gtaagataccgtcaagtgagaa



2、检测猪链球菌荚膜多糖基因 (cps2A)

上游引物: gttgagtccttatacacctgtt

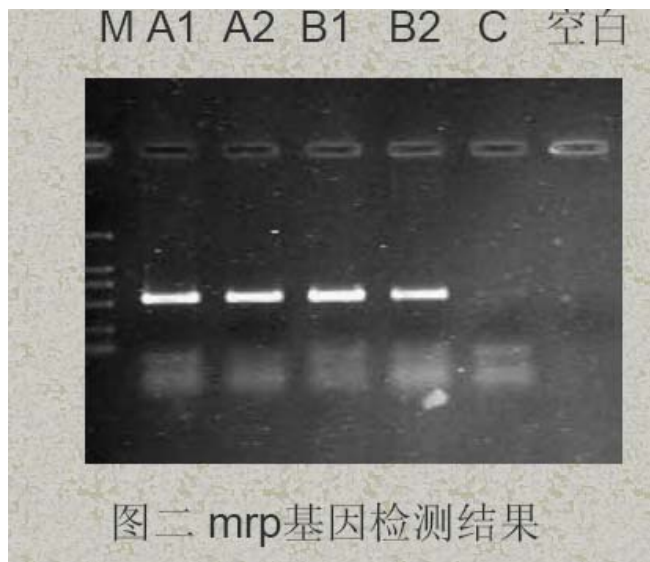
下游引物: cagaaaattcatattgtccacc



3、检测溶菌酶释放相关蛋白编码基因片段（mrp）

上游引物： ggtatacctt gctggtaccg ttc

下游引物： agtctctaca gctgtagctg g



4、PCR 反应的条件：

94℃预变性 5 分钟；94℃、30 秒，60℃、30 秒，72℃、30 秒，25 个循环，最后延伸 72℃、5 分钟。取 5 微升扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
国家传染病预防控制重点实验室
2005 年 7 月 25 日