

# 多重 PCR 检测奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌、 无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌方法的 建立与应用

马保臣<sup>1</sup>, 秦卓明<sup>2</sup>, 蔡玉梅<sup>1</sup>, 董玉兰<sup>3</sup>, 柴同杰<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院, 济南 250000;

3. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:** 参照 GenBank 发表的序列, 在金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和停乳链球菌 16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域设计了 3 对引物, 参照念珠菌和隐球菌的 18S rRNA 的序列设计 1 对引物, 建立了检测金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母真菌 4 种乳腺炎主要致病菌的多重 PCR 方法。参照 Skladny 的方法制备模拟了细菌感染临床标本。结果表明: 本试验建立的多重 PCR 方法具有较好的特异性, 多重 PCR 方法检测乳样中的金黄色葡萄球菌的细菌最小浓度为  $10^4$  CFU/mL, 检测无乳链球菌、停乳链球菌和酵母真菌的细菌最小浓度分别为  $10^2$  CFU/mL、 $10^3$  CFU/mL 和  $10^3$  CFU/mL。通过对采自临床型乳腺炎(46 个)和隐性乳腺炎(167 个)动物共计 213 个乳样分别用传统细菌学培养法和多重 PCR 方法进行检测, 多重 PCR 对金黄色葡萄球菌和酵母真菌的检测具有更高的检出率( $P < 0.01$ ), 但该方法对无乳链球菌和停乳链球菌的检出率与培养法差异不显著( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 多重 PCR; 乳腺炎; 金黄色葡萄球菌; 无乳链球菌; 停乳链球菌; 酵母真菌

中图分类号: S855; S854.43

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1202-07

## Development of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and Yeasts in Bovine Mastitis Milk Samples

MA Bao-chen<sup>1</sup>, QIN Zhuo-ming<sup>2</sup>, CAI Yu-mei<sup>1</sup>, DONG Yu-lan<sup>3</sup>, CHAI Tong-jie<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University,

Tai'an, 271018, China; 2. Shandong Academy of Agricultural Sciences,

Ji'nan 250000, China; 3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural

University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A multiplex polymerase chain reaction(PCR) assay was developed for the simultaneous detection of the four major agents of bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and yeast. The target sequences of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus dysgalactiae* were the 16S to 23S rRNA spacer regions. The target sequence of yeast was 18S rRNA region. The results showed that the assay was specific. Simulation bacteria infection samples were made according to Skladny's method. The sensitivity of the multiplex PCR was lower in detecting *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*

收稿日期: 2005-10-28

基金项目: 德国政府基金会(DAAD)国际优秀学者资助项目[423-china, Mongolei](2004. 06—2006. 05)

作者简介: 马保臣(1978-), 男, 山东人, 博士, 主要从事奶牛疾病和分子生物学的研究, E-mail: baochenma@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 柴同杰

and yeast of the milk. The sensitivity of mutiplex PCR in detecting *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and yeasts was  $10^4$  CFU/mL,  $10^2$  CFU/mL,  $10^3$  CFU/mL and  $10^3$  CFU/mL respectively. The performance of the mutiplex PCR and traditional culture method were evaluated by examining 46 clinical mastitis milk samples and 167 subclinical mastitis milk samples. The results showed that mutiplex PCR was more sensitive than culture in detecting *Staphylococcus aureus* and yeasts ( $P < 0.01$ ), but was not different from the culture method in detecting *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae* ( $P > 0.05$ ).

**Key words:** Mutiplex PCR; mastitis; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus dysgalactiae*; yeasts

奶牛乳腺炎(Bovine Mastitis)是限制奶业发展的最重要疾病之一,是一种世界性并且引起严重经济损失的疾病,奶牛乳腺炎发生的重要原因是病原细菌的感染。目前,国内外对临床标本中病原菌的检验大多仍采用所谓的“金标准”——培养法,即采集标本后,先接种增菌培养液增菌,待出现阳性结果后,再分离单个菌落,通过形态学、生理学、生物化学、免疫学等方法最终确诊。该方法尽管较为准确,但存在敏感性较低,耗时较长,且易受细菌生理条件和抗生素使用限制等严重缺陷,故难以满足临床需求<sup>[1~2]</sup>。再者,当乳样病原菌刚刚侵袭时,细菌数目很少,或当乳中有大量的淋巴细胞或体细胞存在时,能引起亚临床感染而传统的细菌学培养可能为阴性<sup>[3]</sup>,PCR方法可以弥补细菌学培养的不足,利用该方法,病原菌能在数小时内检测出来,尤其是多重PCR方法既能节省试剂的用量又能缩短检测时间。近几年研究表明,金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌是引起乳腺炎的最重要病原<sup>[4]</sup>,因此建立多重PCR方法检测引起乳腺炎的主要病原是一项迫切任务。

## 1 材料与方方法

### 1.1 参考菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC 29062),无乳链球菌(CCM 55934),沙门氏菌(CCM3572),大肠杆菌(ATCC 12079)购自中国兽医药品监察所。停乳链球菌、白色念珠菌、乳房链球菌、产气荚膜梭菌、上皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、沙雷菌、芽孢杆菌、牛棒状杆菌、枸橼酸杆菌、假单胞菌、空肠弯曲菌、牛链球菌、化脓链球菌、犬链球菌、粪肠球菌、鸡葡萄球菌、李斯特杆菌、新型隐球菌、光滑念珠菌、克柔氏念珠菌、牛放线杆菌、巴氏杆菌、分枝杆菌、粪肠球菌和星形奴卡菌为本实验室保存,并 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存。

### 1.2 引物

根据 GenBank 收录的序列(U39769、U39765、U39767),参考金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和停乳链球菌在 16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域设计引物,扩增的片段长度分别为 420、270 和 200 bp。酵母样真菌参照念珠菌和隐球菌的 18S rRNA 发表的序列(DQ499512、DQ471323)设计引物,扩增的片段长度约为 730 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。*S. aureus*-F: 5'-TCTTCAGAAGATGCGGAATA-3'; *S. aureus*-R: 5'-TAAGTCAAACGTTAACATACG-3'。*S. agalactiae*-F: 5'-AAGGAAACCTGCCATTTG-3'; *S. agalactiae*-R: 5'-TTAACCTAGTTTCTTTAAAAC TAGAA-3'。*S. dysgalactiae*-F: 5'-TTTGAGAGGTCTTGTGGG-3'; *S. dysgalactiae*-R: 5'-GCGTTTTTCGGTTTATTTT-3'。*Yeast*-F: 5'-GGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAA-3'; *Yeast*-R: 5'-GCAGTAGTTAGTCTTCAGTA AATC-3'。

### 1.3 细菌 DNA 提取

细菌菌株接种于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜;5 000 g 离心菌体,悬浮于 567  $\mu\text{L}$  TE (10 mmol/L Tris HCl, 0.5 mmol/L EDTA, pH 8.0),加 30  $\mu\text{L}$  10% SDS 和 3  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的蛋白酶 K;55 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;加入等体积的酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)混匀,5 000 g 离心 10 min;吸取上层水相,加入等体积的氯仿/异丙醇(24:1)混匀,5 000 g 离心 10 min;吸取上层水相加入 1/10 体积的 3 mol/L 的乙酸钠(pH5.2)和 RNase A(终浓度达到 0.25~0.3 mg/ $\mu\text{L}$ ),37 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇 30 min;加入 2.5 倍体积的无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h;10 000 g 离心 15 min,倒掉上清;70%乙醇洗涤 2 次,超净台内风干沉淀,重新溶于 50  $\mu\text{L}$  TE 中。紫外分光光度计

结合电泳方法定量所提取的DNA为500 ng/ $\mu$ L,分装后-20℃放置备用。

#### 1.4 乳样中细菌DNA的提取

取300  $\mu$ L乳样加入到267  $\mu$ L NTE [0.1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA (pH 7.5)] 中,加30  $\mu$ L 10% SDS和3  $\mu$ L 10 mg/mL的蛋白酶K,37℃温育4 h,加入等体积的酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)混匀,静置3 min,10 000 g离心3 min,取上清,重复该步骤2次;取上清加入60  $\mu$ L 3 mol/L的乙酸钠(pH 5.2)和1.2 mL预冷的无水乙醇,-20℃放置30 min;4℃10 000 g离心15 min,70%的乙醇洗涤DNA,10 000 g离心5 min。模板DNA超净台内风干,溶于50  $\mu$ L TE中。

#### 1.5 PCR条件的优化

先用普通PCR方法对4种病原分别进行检测,设置不同的退火温度和时间,寻找最适的条件。然后综合4种病原检测的PCR最适条件,来确定多重PCR条件。

#### 1.6 乳样中模拟细菌感染临床标本的制备和敏感性检测

参照Skladny的报道<sup>[5]</sup>制备模拟细菌感染临床标本,并加以改进,操作如下:用细胞计数板计数4种细菌细胞悬液,调整细胞浓度至 $10^7$ /mL,然后连续10倍稀释至 $10^1$ /mL,分别取上述各浓度稀释菌液100  $\mu$ L加至900  $\mu$ L无菌牛奶,即得不同浓度(连续10倍稀释)的模拟细菌感染的临床标本。然后按照乳样细菌DNA的方法提取细菌DNA。

新培养的各细菌计数后,同时用生理盐水进行系列稀释,分别含菌 $10^6$ /mL~1/mL,混匀后按上述细菌DNA的提取方法提取DNA。然后进行多重PCR。

#### 1.7 临床乳样的来源与采集

检测的临床乳样来自5个奶牛场,分别为济宁2个奶牛场,青岛2个奶牛场,济南1个。参考文献<sup>[4]</sup>方法采样,其中临床型乳腺炎46个,隐性乳腺炎167个,共计213个乳样。

#### 1.8 乳样的细菌学培养与鉴定

将每份5 mL左右的乳样,2 000~3 000 r/min离心8 min,弃去管中的上层液体,留取底部沉淀物,无菌操作吸取0.1 mL沉淀物分别接种于5%绵羊鲜血琼脂培养基、沙堡弱氏琼脂,营养琼脂培养基、高盐甘露醇琼脂培养基。

1.8.1 金黄色葡萄球菌的分离培养与鉴定 能在

高盐甘露醇琼脂培养基成长,菌落细小,呈红色或黄色;在血液琼脂平板上能形成金黄色、湿润、光滑、隆起的中等大小的菌落,有溶血现象,染色镜检呈葡萄球状,参见文献<sup>[6]</sup>进行生化鉴定,分解甘露醇、乳糖、葡萄糖、麦芽糖、精氨酸水解酶、尿酶、蔗糖、D-松二糖,产酸不产气,透明质酸酶阳性,过氧化氢酶试验阳性,氧化酶试验阴性,不分解木糖、阿拉伯糖、纤维二糖、棉子糖、水杨苷、木糖醇。

1.8.2 无乳链球菌和停乳链球菌的分离培养与鉴定 在普通平皿上生长不良,鲜血平皿上生长较好,菌落为露滴状,圆形、隆起、半透明,呈 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ 溶血,染色镜检形态一致,成双或短链状、长链状排列。参见文献<sup>[6]</sup>进行生化鉴定,无乳链球菌能在40%胆汁中生长,CAMP试验阳性,水解马尿酸钠,不分解甘露醇、七叶苷、棉子糖和山梨醇。停乳链球菌不能在40%胆汁中生长,CAMP试验阴性,不水解马尿酸钠,不分解甘露醇、七叶苷、棉子糖和山梨醇。

1.8.3 酵母真菌的分离培养与鉴定 分离株在鲜血琼脂上培养24 h后,呈灰白色、乳白色或微黄色;在沙堡弱氏琼脂上开始像细菌样菌落,以后菌落增厚由乳白色变为奶油样、奶酪样。直接显微镜检查发现压滴标本中有大量球形孢子,有的有假菌丝,革兰氏染色阳性,乳酸酚棉蓝染色呈蓝色。菌体大小不一,为卵圆形、椭圆形、棒状或圆形,并可见到出芽或未出芽的芽生孢,参见文献<sup>[7]</sup>进行生化鉴定,分解蔗糖、葡萄糖、水杨苷,不分解麦芽糖、菊糖、七叶苷、乳糖和棉子糖,甲基红和枸橼酸盐试验阴性。

#### 1.9 多重PCR产物的鉴定

用多重PCR检测乳样时,在PCR产物420、270、200、730 bp各选取一个条带,进行凝胶回收,回收片段与pGEM-T easy载体进行连接,用PCR和酶切双重鉴定重组质粒,后由上海博亚生物工程有限公司进行测序。对测序结果进行同源性分析。

#### 1.10 统计学方法

对传统的细菌学培养方法与PCR方法检测的细菌数目用 $\chi^2$ 检验来分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR条件的优化和多重PCR条件的优化

经多次摸索得出的多重PCR的最适条件见表1。多重PCR的最佳反应模式:94℃预变性3 min;然后94℃变性1 min,57.5℃退火40s,72℃延伸40 s,36个循环;72℃反应7 min。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

试剂 Reagent	参考菌株 Reference bacteria/ $\mu$ L	乳样细菌 Bacteria in milk/ $\mu$ L	PCR 反应浓度 Concentration in PCR
10 $\times$ buffer	5	5	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub>	5	5	2.5 mmol/L
4 $\times$ dNTP	5	5	0.2 mmol/L
各引物	0.8	0.8	0.4 $\mu$ mol/L
Taq DNA 聚合酶	0.5	0.5	0.10U/ $\mu$ L
模板	1.0	2.0	
双蒸水	22.7	21.7	

## 2.2 多重 PCR 的特异性检测

多重 PCR 通过对单种和多种细菌检测(见图 1~3)表明该方法具有较好的特异性,对照细菌都没有出现特异的条带。

## 2.3 多重 PCR 对 4 种乳腺炎病原菌提取 DNA 的敏感性检测

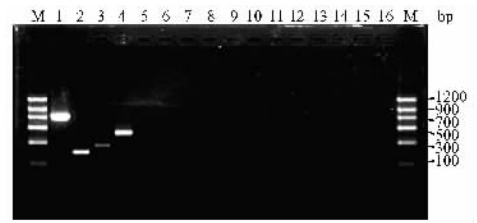
多重 PCR 对模拟标本的敏感性检测结果表明:用生理盐水稀释后,多重 PCR 对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母真菌的最小检测浓度都为 10<sup>2</sup>CFU/mL,而对牛奶中金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母真菌检测的最小浓度分别为 10<sup>4</sup>CFU/mL,10<sup>2</sup>CFU/mL,10<sup>3</sup>CFU/mL 和 10<sup>3</sup>CFU/mL。

## 2.4 用多重 PCR 和细菌学培养法对临床样品 4 种主要致病菌的检测

利用多重 PCR 和细菌培养法对 213 个乳样(临床型乳腺炎 46 个,隐性乳腺炎 167 个)的检测结果表明:该方法与传统的细菌培养法对无乳链球菌和停乳链球菌的检测结果基本一致,用 PCR 较培养法对金黄色葡萄球菌和酵母真菌的检测具有高的敏感性( $P < 0.01$ ),而对无乳链球菌和停乳链球菌两种方法的敏感性差异不显著( $P > 0.05$ )。部分样品的多重 PCR 检测结果见图 4,用细菌培养法和多重 PCR 对部分临床样品的检测结果对照见表 2。

## 2.5 多重 PCR 产物的测序分析

对于 PCR 产物 420、270、200、730 bp 的条带,经测序后,将序列与 GenBank 收录的目的片段的基



1. 白色念珠菌;2. 停乳链球菌;3. 无乳链球菌;4. 金黄色葡萄球菌;5. 大肠杆菌;6. 乳房链球菌;7. 克雷伯氏菌;8. 牛沙门氏菌;9. 沙雷菌;10. 芽孢杆菌;11. 牛棒状杆菌;12. 枸橼酸杆菌;13. 假单胞菌;14. 空肠弯曲菌;15. 李斯特杆菌;16. 产气荚膜梭菌;M. 分子量标准

1. *Candida albicans*; 2. *Streptococcus dysgalactiae*; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Staphylococcus aureus*; 5. *E. coli*; 6. *Streptococcus uberis*; 7. *Klebsiella spp*; 8. *Salmonella bovis/morbificans*; 9. *Serratia*; 10. *Bacillus*; 11. *Corynebacterium bovis*; 12. *Citrobacter Spp*; 13. *Pasturella*; 14. *Campylobacter jejuni*; 15. *Listeria monocytogenes*; 16. *Clostridium perfringens*; M. DNA marker

图 1 多重 PCR 对单种细菌的特异性检测

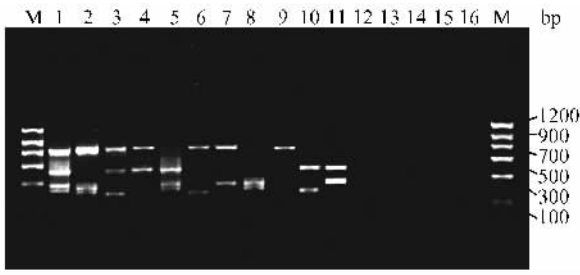
Fig. 1 Specificity of multiplex PCR to the single bacteria

因序列相比较,同源性在 94%~99.8%,证明 PCR 产物 420、270、200、730 bp 的条带分别为金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母真菌的特异性的条带,其中金黄色葡萄球菌的临床分离菌株 F14 的 16S rRNA-23S rRNA 的序列已登入 GenBank,编号 DQ256396。

## 3 讨论

### 3.1 用 16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域设计引物检验金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和停乳链球菌的可行性

用 PCR 方法鉴定细菌,选取的扩增的片段应该是高度保守的,但在不同种的水平上应该是有差别的,16S rRNA 的一级结构高度保守,被广泛应用于种的鉴定<sup>[8]</sup>,16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域近年来被证实是在种的水平上鉴定细菌的理想区段<sup>[9,10]</sup>,这段区域的变异速度是 16S rRNA 的 10 倍<sup>[11]</sup>,这使不同种的细菌间存在差异。16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域来检测乳腺炎病原菌已有报道<sup>[3]</sup>。本试验也证明,多重 PCR 扩增 16S rRNA 与 23S rRNA 之间的区域具有很好的特异性,不同种的细菌没有扩增出目的条带。

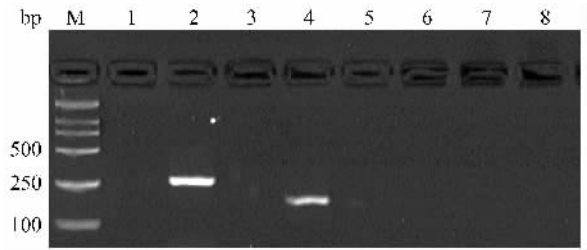


1. 白色念珠菌、停乳链球菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌；2. 白色念珠菌、停乳链球菌和无乳链球菌；3. 白色念珠菌、停乳链球菌和金黄色葡萄球菌；4. 白色念珠菌和金黄色葡萄球菌；5. 停乳链球菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌；6. 新型隐球菌和停乳链球菌；7. 光滑念珠菌和无乳链球菌；8. 停乳链球菌和无乳链球菌；9. 季也蒙念珠菌；10. 停乳链球菌和金黄色葡萄球菌；11. 无乳链球菌和金黄色葡萄球菌；12. 牛放线杆菌；13. 多杀性巴氏杆菌；14. 牛分枝杆菌；15. 粪链球菌；16. 星形奴卡菌；M. 分子量标准

1. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae*; 2. *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae*; 3. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus dysgalactiae*; 4. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*; 5. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae*; 6. *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus dysgalactiae*; 7. *Candida glabrata* and *Streptococcus agalactiae*; 8. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae*; 9. *Candida guilliermondii*; 10. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus dysgalactiae*; 11. *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus agalactiae*; 12. *Actinomyces bovis*; 13. *P. multocida*; 14. *Mycobacterium bovis* 15. *Streptococcus faecalis* 16. *Nocardia asteroides*; M. DNA marker

图 2 多重 PCR 对多种细菌的特异性检测

Fig. 2 Specificity of multiplex PCR to multi-bacteria



1. 牛链球菌；2. 无乳链球菌；3. 肺炎链球菌；4. 停乳链球菌；5. 化脓链球菌；6. 犬链球菌；7. 粪肠球菌；8. 鸡葡萄球菌；M. DL2000 分子量标准

1. *Streptococcus bovis*; 2. *Streptococcus agalactiae*; 3. *Streptococcus pneumoniae*; 4. *Streptococcus dysgalactiae*; 5. *Streptococcus pyogenes*; 6. *Streptococcus canis*; 7. *Enterococcus faecalis*; 8. *Staphylococcus gallinarum*; M. DL2000 DNA marker

图 3 多重 PCR 对球菌的特异性检测

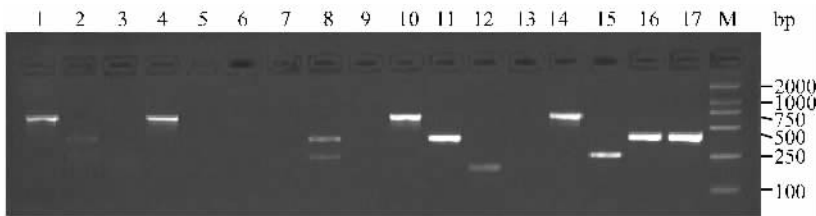
Fig. 3 Specificity of mutiplex PCR to cocci

### 3.2 用 18S rRNA 区域的保守序列设计引物检验酵母真菌的可行性

真菌的 18S rRNA 高度保守,其保守区序列是真菌所共有的<sup>[12,13]</sup>,在真菌间未发现明显差异,而此保守区在细菌及人类基因组均未发现。该段序列用于真菌的检测可以避免和细菌、人的基因发生交叉反应,具有很强的特异性。本试验根据真菌的 18S rRNA 基因序列,在其保守区设计真菌通用引物,用于引起奶牛乳房炎的真菌的快速检测,为快速诊断真菌性乳房炎提供了有效的手段,同时也可以用于奶牛真菌感染的预防控制。

### 3.3 多重 PCR 方法检测的敏感性

用生理盐水和牛奶稀释各细菌后,多重 PCR 方



1,4,10,14. 酵母菌；2,8. 金黄色葡萄球菌和无乳链球菌；7,11,16,17. 金黄色葡萄球菌；12. 停乳链球菌；15. 无乳链球菌；M. DL2000 分子量标准  
1,4,10,14. Yeasts; 2,8. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*; 7,11,16,17. *Staphylococcus aureus*; 12. *Streptococcus dysgalactiae*; 15. *Streptococcus agalactiae*; M. DL2000 DNA marker

图 4 部分样品的多重 PCR 检测结果

Fig. 4 Mutiplex PCR amplifications from some of the milk samples

表 2 用培养法和多重 PCR 对临床样品的检测结果 (n=203)

Table 2 Detection of milk samples by culture and multiplex PCR (n=203)

细菌鉴定 Detection of bacteria	细菌学培养 Culture	多重 PCR Mutiplex PCR	P
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	阳性 Positive 17	31	$P < 0.01$
	阴性 Negative 186	172	
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	阳性 Positive 22	23	$P > 0.05$
	阴性 Negative 181	180	
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	阳性 Positive 4	5	$P > 0.05$
	阴性 Negative 199	198	
酵母样真菌 Yeasts	阳性 Positive 14	26	$P < 0.01$
	阴性 Negative 189	177	

法检测表现出不同的敏感性,用牛奶稀释后的 PCR 具有稍低的敏感性,灵敏性降低  $10 \sim 10^2$  倍。可能是牛奶中存在 PCR 反应的抑制剂,即使当牛奶的细菌 DNA 提取后,这种抑制作用仍然存在<sup>[3]</sup>。目前已经证明在尿液、粪便和血液中存在 PCR 的抑制物质,如在血液中的亚铁血红素和脂多糖具有干扰 Taq 聚合酶的作用<sup>[14]</sup>。乳样中存在何种物质干扰 PCR 的检测目前还不清楚。为避免乳中的物质对 PCR 的干扰作用,提高其灵敏性,在样品检测前进行培养是必要的,通过培养提高细菌的数目来提高检测的准确性和灵敏性。

### 3.4 多重 PCR 方法与传统培养方法有不同结果的原因分析

对临床样品的检测结果表明,用 PCR 较培养法对金黄色葡萄球菌和酵母真菌的检测具有高的敏感性 ( $P < 0.01$ ),而对无乳链球菌和停乳链球菌两种方法的敏感性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。可能是在乳腺感染金黄色葡萄球菌和真菌时,乳样中的细菌较少或被淋巴细胞、中性粒细胞吞噬,使培养呈阴性。金黄色葡萄球菌的细胞内寄生和 L 型的存在也可能是一个原因<sup>[4]</sup>。有些临床型乳腺炎样品来自含抗生素的乳样,细菌学培养阴性,但 PCR 的方法能检测到细菌。PCR 方法对真菌的检测的阳性率高于培养的另一原因可能是一些真菌的生长很困难,且临床常规培养选用的多为一些普通的真菌培养基,有些稀有真菌在这些普通培养基中很难生长,故这些真菌在培养中很难观察到<sup>[15]</sup>,培养法和 PCR 方法对无乳链球菌和停乳链球菌的检测结果基本一致,可能是无乳链球菌和停乳链球菌引起的乳腺炎乳样中有大量的菌体存在,使之容易检测<sup>[3]</sup>。

## 4 结 论

本试验建立了对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、

停乳链球菌和酵母真菌的多重 PCR 方法,通过特异性检验、灵敏性检验以及临床应用证明该方法可行,可作为临床上一种快速检测乳腺炎病原菌的方法。

### 参考文献:

- [1] Lenoard J, Lascdea S R, Dryyia D. Quanlitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children and its diagnostic significance[J]. J Clin Microbiol, 1984, 19(2):187.
- [2] Teng k, Li M, Yu W, et al. Comparison of PCR with culture for detection of ureaplasma urealylicum in clinical samples from patients with urogeniteid infections [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(9): 2 232.
- [3] Phuektes P, Mansell P D, Browning G F. Mutiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis[J]. J Dairy Sci, 2001, 84: 1 140~1 148.
- [4] 马保臣,李建基,王春璈. 奶牛急性乳腺炎病原菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(11): 22~24.
- [5] Skladny H, Buchheidt D, Baust C, et al. Specific detection of aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12): 3 865~3 871.
- [6] 曹澍泽. 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1991. 120~158.
- [7] 周庭银,赵 虎. 临床微生物学诊断与图解[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001.
- [8] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143~169.
- [9] Gürtler V, Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S—23S rD-

- NA spacer region[J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt1): 3~16.
- [10] Jensen M A, Webster J A, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction analysis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 3: 186~194.
- [11] Leblond-Bourget N, Philippe H, Mangin I, *et al.* 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46: 102~111.
- [12] Vanittanakom N, Vanittanakom P, Hay R J. Rapid identification of *Penicillium marneffeii* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(5): 1 739~1 742.
- [13] Gaudio P A, Gopinathan U, Sangwan V, *et al.* Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(7): 755.
- [14] Toye B, Woods W, Bobrowska M, *et al.* Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 2 356~2 358.
- [15] 胡 军,王 矿,卢新亚,等. 病原性真菌 PCR 检测方法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2004, 39(2): 310~312.

## 动物疫情速递

### 保加利亚发生蓝舌病

2006年10月19日,保加利亚驻 OIE 代表 Nikola T. Belev 博士报告了该国的蓝舌病疫情。疫情始于 2006年10月11日,并于当天得到确认,但不属临床病例,依靠实验室检测作出诊断。疫区位于 Burgas 省, Brashlian、Byala voda 和 Kalovo (2 起) 3 个村庄的山羊受到感染; Evrenozovo、Rezovo 和 Zvezdets 3 个村庄的牛被感染。实验室诊断在保加利亚国家蓝舌病参考实验室进行,手段为竞争 ELISA。此次疫情源自带菌者。保加利亚采取的措施:控制节肢动物、检疫、国内限制移动、筛查、区域化、感染房舍/设施消毒。

### 美国发生马传染性子宫炎

2006年10月16日,美国农业部动植物卫生检疫局副局长 Ron DeHaven 博士向 OIE 报告了马传染性子宫炎疫情。疫情于 2006年10月4日开始并确认,诊断系根据实验室检测作出,不是临床病例。疫区位于威斯康星州 Dane 郡的 Mount Horeb。共发现 2 例病例和 16 例临床健康的疑似动物。感染动物是 2 匹自东欧进口的利比扎种马。这 2 匹马一直在 Dane 郡的一个马繁殖和研究场所,正是在这里,在一次繁殖健康试验中它们被发现呈马生殖道泰勒氏杆菌 (*Taylorella equigenitalis*) 阳性。实验室诊断在国家兽医服务实验室进行,采用方法为细胞培养后病原分离。此次疫情感染来源:引入新的动物或动物产品;合法的动物移动。采取的控制措施:检疫和感染房舍/设施消毒。

### 英国发生新城疫

2006年10月13日,英国环境、食品及农村事务部动物卫生局官员 Debby Reynolds 博士向 OIE 报告了新城疫疫情。病原是禽副黏病毒 1 型鸽变异株。本次暴发于 2006年9月21日开始,2006年10月13日确认。疫区位于苏格兰 Lothian,感染动物为 2 000 只室养的供人消费的灰色的鹁鸽(17 000 只疑似动物)。实验室诊断在设于 Surrey 郡 Weybridge 的兽医实验所国家实验室进行,方法为病毒分离。疫情源自接触野生动物。采取的控制措施:扑杀、国内控制移动、筛检、区域化和感染房舍/设施消毒。据分析,该禽副黏病毒 1 型鸽分离株具有毒性裂解位点 RRQKRF,进一步的试验正在进行中。