

# 多重 PCR 方法快速检测猪的 5 种呼吸道病原菌

薛云<sup>1,2</sup>▼, 赵战勤<sup>1,2</sup>▼, 陈杨<sup>1</sup>, 邹浩勇<sup>1</sup>, 何启盖<sup>1\*</sup>, 李文浩<sup>1</sup>, 熊金凤<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1</sup>

(1 华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2 河南科技大学动物科技学院 动物病原微生物学实验室, 洛阳 471003)

**摘要:** 猪胸膜肺炎放线杆菌(App)、副猪嗜血杆菌(Hps)、支气管败血波氏杆菌(Bb)、产毒性多杀巴氏杆菌(T<sup>+</sup>Pm)和猪肺炎支原体(Mhp)是最常见的几种猪呼吸道病原菌。笔者参照文献报道的基因序列设计针对 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 的特异性引物,对单一 PCR 条件进行系统优化后建立 5 重 PCR 方法。该多重 PCR 方法能对同一样品中 5 种病原菌的 DNA 模板进行扩增,且在 5 种病原菌之间没有交叉反应;对大肠杆菌等其它 6 种常见猪细菌性病原的检测结果均为阴性;对 5 种病原菌 DNA 模板检出的最小量均低于 160 pg,且能从攻毒小鼠(App、Hps、Bb 和 T<sup>+</sup>Pm)肺脏组织 8 h 增菌的培养物中快速检测出相应的病原菌。对中国华中地区 269 份临床样本的检测结果表明,5 种呼吸道病原菌在华中地区猪群中普遍存在,且混合感染情况十分严重。这些试验结果表明该多重 PCR 方法可用于猪呼吸道病原菌 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 的单一或混合感染的鉴别诊断及病原流行病学调查。

**关键词:** 猪;呼吸道病原;多重 PCR;检测

中图分类号:S858. 285. 1;S852. 61

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)08-1222-07

## Development of a Rapid Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Five Major Pathogenic Bacteria of Respiratory Tract Diseases in Swine

XUE Yun<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhan-qin<sup>1,2</sup>, CHEN Yang<sup>1</sup>, ZOU Hao-yong<sup>1</sup>, HE Qi-gai<sup>1\*</sup>,  
LI Wen-jie<sup>1</sup>, XIONG Jin-feng<sup>1</sup>, CHEN Huan-chun<sup>1</sup>

- (1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), *Haemophilus parasuis* (Hps), *Bordetella bronchiseptica* (Bb), *Toxigenic Pasteurella multocida* (T<sup>+</sup>Pm) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) are five kinds of the most common pathogenic bacteria which can cause a series of respiratory tract diseases in swine. Five pairs of specific oligonucleotide primers were designed according to the DNA sequences of App *apxIV*, Hps 16S rRNA, Bb *fla*, toxigenic T<sup>+</sup>Pm *toxA* and Mhp *ldh* reported in NCBI website. A multiple PCR detection method was established according to improved systems and programmes on the basis of five single PCR methods. No cross reaction was detected by the multiplex PCR method between these five bacteria templates and other common bacteria templates. The sensitivity of multiple PCR was lower than 160 pg genome template.

收稿日期:2008-11-20

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD06A12)

作者简介:薛云(1982-),女,湖北松滋人,博士,主要从事细菌分子生物学研究,E-mail: xueyun4@163.com;赵战勤(1980-),男,河南兰考人,博士,讲师,主要从事细菌分子生物学研究,E-mail: zhaozhanqin@126.com。▼对本研究具有同等贡献,为共同第一作者

\* 通讯作者:何启盖(1966-),E-mail: heqigai@yahoo.com

Using this multiple PCR method, bacteria could be detected from lung tissues of challenged mice with App, Hps, Bb and T<sup>+</sup> Pm respectively after being cultured for 8 h in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with 5% calf serum and NAD<sup>+</sup> factor. Simultaneous detection of pathogens in 269 clinical samples from the central area of China revealed the universal existence of App, Hps, Bb, T<sup>+</sup> Pm and Mhp. In conclusion, the multiple PCR assay showed excellent specificity, sensitivity and reduplication and could detect five pathogenic bacteria of respiratory tract in swine. We expected that this multiple PCR assay could be useful extensively for epidemiological survey and clinical differential diagnosis of five common respiratory diseases in swine.

**Key words:** swine; respiratory tract disease; multiplex PCR; detection

猪的细菌性呼吸道疾病是危害世界养猪业的重要疾病症候群。在现代养猪场,由于对饲养技术的调整不当,以及突发新的呼吸道综合征等,使得该类疾病日趋流行,危害日渐严重,给世界养猪业造成了巨大经济损失<sup>[1]</sup>。猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)、支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)、产毒性多杀巴氏杆菌(*Toxigenic Pasteurella multocida*, T<sup>+</sup> Pm)和猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)是猪最常见的 5 种呼吸道病原菌,分别引起猪的传染性胸膜肺炎、副猪嗜血杆菌病、进行性萎缩性鼻炎、波氏杆菌病和支原体肺炎,导致呼吸道的急慢性炎症,严重时引起猪只死亡<sup>[1-2]</sup>。在猪群中,这些病原菌之间的混合感染十分普遍,不仅提高了猪群呼吸道疾病的发病率和严重程度,也增加了疾病的复杂性和诊断难度<sup>[1-2]</sup>。因此,临床上迫切需要一种能同时鉴别多种病原菌混合感染的诊断方法。

病原菌的分离鉴定是一种可靠的诊断方法,但这些病原菌特别是 App、Hps 和 Mhp 的体外培养条件要求苛刻,生长缓慢,容易死亡,常因临床分离率较低而导致漏检<sup>[3-4]</sup>。随着分子生物学的发展,PCR 检测方法得到了越来越广泛的应用,使这些病原菌的检测越来越简便、灵敏和完善。已有报道分别以 App *apxIV* 基因<sup>[5]</sup>、Hps 16S rRNA 基因<sup>[6]</sup>、Bb *fla* 基因<sup>[7]</sup>、T<sup>+</sup> Pm *toxA* 基因<sup>[8]</sup> 和 Mhp *ldh* 基因<sup>[9]</sup> 为靶基因,建立单一 PCR 方法检测不同的病原菌。但除了检测 Bb 和 T<sup>+</sup> Pm 感染(萎缩性鼻炎, Atrophic rhinitis, AR)的二重 PCR 方法<sup>[10]</sup> 外,国内外均未见鉴别这几种病原菌混合感染的临床诊断方法。笔者根据已报道的 5 种呼吸道病原菌的特异性基因序列设计引物,旨在建立一种能同时诊断 5 种病原菌单一或混合感染的快速、方便、实用的多重

PCR 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 参考菌株猪霍乱沙门氏菌 C78-1、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和 Mhp R659 购自中国兽医药品监察所;参考菌株 App 4074、Hps 0322、T<sup>+</sup> Pm HN-13、Bb HH0809、猪链球菌 SC-1、大肠杆菌 ED1 等由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存并提供。

1.1.2 培养基 胰蛋白大豆琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA)和胰蛋白大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)培养基购自美国 BD 公司;KM2 培养基购自江苏农业科学院牧医所;犍牛血清购自杭州四季青公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD, 又称 V 因子)购自美国 Sigma 公司。添加了 NAD(终浓度 10 μg · mL<sup>-1</sup>)和胎牛血清(终浓度 5%, 体积比)的 TSB 培养基用于培养 NAD 依赖的 App 和 Hps。KM2 培养基用于培养 Mhp。其它细菌接种于含有 5% 犍牛血清的 TSB 培养基。

1.1.3 实验动物 4~5 周龄 KM 小鼠购自湖北省医学科学院实验动物中心。

1.1.4 仪器和试剂 Touchgene Gradient 型 PCR 仪为美国 Quixave 公司产品;超纯水系统为美国 Millipore 公司产品;DNA 回收试剂盒、基因组提取试剂盒购自北京 Tiangen 公司;Taq DNA polymerase、dNTPs、DNA Marker 等购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.5 病料 269 份猪肺脏病料,于 2005 年 3—6 月,采于湖北、河南、湖南 3 省规模化猪场中有呼吸道症状的猪群。发病猪多表现为咳嗽,打喷嚏,呼吸困难,鼻腔有分泌物,生长缓慢。部分猪表现体温升

高,鼻梁变形,跛行,急性死亡等症状。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考文献报道或 GenBank 已公布的 App *apxIV* 基因、T<sup>+</sup>Pm *toxA* 基因、Bb *fla* 基因、Hps 16S rRNA 基因、Mhp *ldh* 基因序列,通

过 Primer Premier 5.0 软件(Premier Biosoft Inc., Canada)和 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)分析后设计 5 对引物(表 1)。引物由上海 Sangon 公司合成。

表 1 本研究所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

细菌	基因	名称	序列(5'→3')	大小/bp	序列号	位置	来源
Bacteria	Gene	Name	Sequence (5'→3')	Size	Assesion No.	Position	Reference
App	<i>apxIV</i>	app1	GCTCACCAACGTTTGCTCAT	377	4103165	7—383	本试验
		app2	GGGGACGTAACCTCGGTGATT				This work
Hps	16S rRNA	hps1	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	821	2116648	438—1 239	文献[6]
		hps2	GGCTTCGTCACCCCTCTGT				
Bb	<i>fla</i>	bb1	GCTCCCAAGAGAGAAAGGCT	235	3947513	61—295	文献[7]
		bb2	GGTGGCGCCTGCCCTATC				
T <sup>+</sup> Pm	<i>toxA</i>	tpm1	GGTCTTAGATGAGCGACAAGG	442	18026874	1 879—2 324	本试验
		tpm2	GCGCTATTACTTCCTTCGTTTC				This work
Mhp	<i>ldh</i>	mhp1	CCGTTGAAGCCTTGCTGTAT	287	49109	176—462	本试验
		mhp2	CGGTTAGTGTCTCCCGTTATG				This work

1.2.2 PCR 模板 优化 PCR 条件时,按试剂盒说明书提取细菌基因组,紫外线分光光度计定量,作为基因组模板。其它情况下,取 200  $\mu$ L 细菌液体培养物 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1 min,弃上清,将沉淀重悬于 50  $\mu$ L 无菌水中,100  $^{\circ}$ C 水浴 5 min,然后置冰上冷却 5 min,12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1 min,上清作为 PCR 模板。

1.2.3 单一 PCR 体系的优化 PCR 反应体系 25  $\mu$ L,10 $\times$  *Taq* Buffer(without Mg<sup>2+</sup>)为 2.5  $\mu$ L,分别配成含不同浓度 Mg<sup>2+</sup>、*Taq* DNA polymerase、dNTPs、引物和模板的 PCR 体系,最后用三蒸水补充至 25  $\mu$ L,每个梯度设 3 个重复。Mg<sup>2+</sup>、*Taq* DNA polymerase、dNTPs 和引物浓度变化的范围分别如下:Mg<sup>2+</sup>,0~10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; *Taq* DNA polymerase,0~16 U  $\cdot$  25  $\mu$ L<sup>-1</sup>; dNTPs,0~0.8 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>;引物 0~2.0  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>;均设 8 个梯度。

1.2.4 单一 PCR 程序的优化 95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后,按 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸的循环程序进行 25 次循环,最后 1 个循环结束后再延伸 5 min。分别在不同的退火温度和不同的延伸时间进行 PCR。退火温度变化范围为 50.0~60.9  $^{\circ}$ C,按 PCR 仪自动设温度梯度;延伸时间变化范围为 20~80 s,分 8 个梯度进行 PCR 扩增。

1.2.5 多重 PCR 的条件优化 按 1.2.2 所述方法提取 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 的基因组为模板,进行多重 PCR 扩增。使用单一 PCR 反应体系中确定的各成分范围的中间值(Intermediate value, Vi)作为多重 PCR 的最初反应体系(25  $\mu$ L),按 1.2.4 所述方法进一步优化多重 PCR 的反应条件。

1.2.6 多重 PCR 的特异性 按 1.2.2 所述方法提取 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 的基因组为模板进行多重 PCR,将扩增产物分别测序分析后判定该方法在 5 种病原菌之间的特异性。同时,对产类志贺毒素大肠杆菌 ED1、猪霍乱沙门氏菌 C78-1、猪 2 型链球菌 SC-1、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、非产毒巴氏杆菌 WH1 的基因组模板进行扩增并判定该方法对其它病原菌的特异性。

1.2.7 多重 PCR 的敏感性 测定菌株 App 4074、Hps 0322、Bb HH0809、T<sup>+</sup>Pm HN-13 和 Mhp R659 基因组的 DNA 浓度,使用超纯水调整到 50 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>,然后分别以超纯水 5 倍梯度稀释为 10 000、2 000、400、80、16、3.2 pg  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>,各菌株每个梯度各取 2  $\mu$ L 加入 PCR 管中,使反应体系中同时含 5 种基因组 DNA 的量分别为 100 000、20 000、4 000、800、160、32 和 6.4 pg,PCR 后电泳分析结果。

1.2.8 多重 PCR 对病料样品的检测 使用 1 个半

数致死剂量(50% lethal dose, LD<sub>50</sub>) App(6.8 × 10<sup>7</sup> CFU)对一组小鼠(10 只)进行腹腔攻毒。另设 PBS 对照组(10 只)隔离饲养。将攻毒死亡小鼠和 PBS 对照组小鼠解剖,取肺进行病原菌的分离鉴定。同时,剪取一小块肺脏组织放入 5 mL 含有 5% 犊牛血清(无支原体)的 TSB 培养基中,在 37 °C、225 r · min<sup>-1</sup> 摇床培养 8 h 后按 1.2.2 方法制备模板进行多重 PCR 检测。按同样方法分别进行 Hps、Bb 和 T<sup>+</sup>Pm 的操作(注 LD<sub>50</sub>: Hps 1.8 × 10<sup>10</sup> CFU, Bb 5.6 × 10<sup>9</sup> CFU, T<sup>+</sup>Pm 1.2 × 10<sup>8</sup> CFU)。本研究中,考虑到 Mhp 可能对实验室造成的环境污染,所以没有进行 Mhp 的小鼠攻毒试验。

1.2.9 多重 PCR 对临床样本的检测 对采自湖北、河南、湖南 3 省具有呼吸道症状猪的 43 份肺脏病料按 1.2.8 所述方法制备模板进行多重 PCR 检测,同时进行病原菌的分离鉴定。对另外 269 份肺

脏病料仅进行多重 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 单一 PCR 扩增条件的确定

当使用 25 μL 的 PCR 反应体系时,5 种单一 PCR 反应均未扩增到非目的条带,但是其最适 Mg<sup>2+</sup> 浓度范围具有明显的差别(见图 1)。其中, hps1/2、bb1/2 和 mhp1/2 3 对引物在 0.25~10.0 mmol · L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 的 25 μL 反应体系中均能扩增到 Hps、Bb 和 Mhp 的目的基因片段;而 app1/2 和 tpm1/2 2 对引物仅能在 1.0~5.0 mmol · L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 的体系中扩增到 App 和 T<sup>+</sup>Pm 的目的基因片段(见图 1)。同样的方法确定了 5 种单一 PCR 反应退火温度、引物浓度、dNTPs 浓度和 Taq DNA polymerase 浓度的最佳范围(见表 2)。

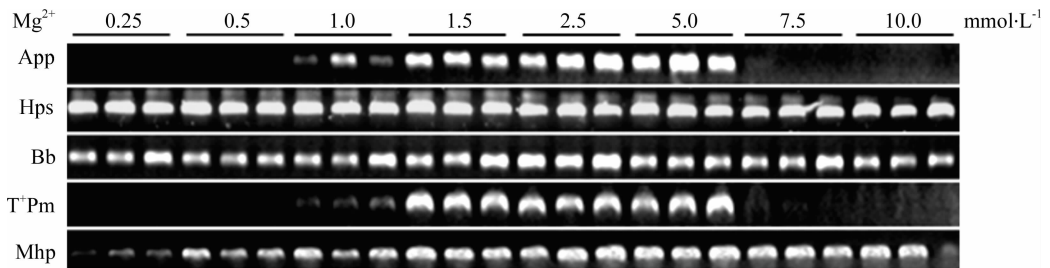


图 1 单一 PCR 反应体系最适 Mg<sup>2+</sup> 浓度范围的确定

Fig. 1 Determination of the proper concentration of Mg<sup>2+</sup> in five PCR reaction systems

表 2 单一 PCR 反应条件的最佳取值范围

Table 2 Determination of the proper conditions of PCR in five reaction system

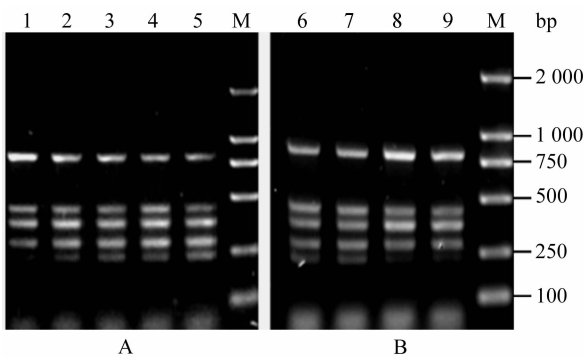
	T/°C	Mg <sup>2+</sup> / (mmol · L <sup>-1</sup> )	引物/ (μmol · L <sup>-1</sup> ) Primers	Taq / (U · 25 μL <sup>-1</sup> )	dNTPs / (mmol · L <sup>-1</sup> )	时间/s <i>t</i>
App	51.8~58.2	1.5~5.0	0.4~2.0	0.5~10.0	0.04~0.16	40~60
Hps	51.8~60.2	1.0~2.5	0.2~2.0	1.0~5.0	0.02~0.16	40~90
Bb	53.1~60.2	1.5~2.5	0.2~1.0	1.0~5.0	0.02~0.16	20~60
T <sup>+</sup> Pm	52.3~60.2	1.5~5.0	0.2~1.0	2.0~10.0	0.08~0.16	20~90
Mhp	53.1~60.2	2.5~7.5	0.2~1.0	1.0~5.0	0.08~0.16	20~60
Vi	57.6	2.5	0.7	3.5	0.12	50

### 2.2 多重 PCR 扩增条件的优化

单一 PCR 方法中所确定的各条件范围的中间值(Intermediate value, Vi)作为多重 PCR 方法的

初始条件(见表 2)。以 5 种病原菌的基因组为模板,设定退火温度梯度范围为 52~62 °C,进行五重 PCR 扩增。结果表明,当退火温度较高(≥60.2 °C)

时, Hps 对应的 DNA 带较弱; 当退火温度较低时 ( $\leq 56.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), Bb 对应的 DNA 带较弱; 当退火温度为  $58.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  时多重 PCR 各目的基因片段均得到较好的扩增结果, 所以确定其最佳退火温度为  $58.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (见图 2 A)。同时, 确定多重 PCR 最佳引物 (见图 2B)、 $\text{Mg}^{2+}$ 、*Taq* DNA polymerase 和 dNTPs 浓度以及最佳延伸时间等反应条件的最佳值。最终确定五重 PCR 的最佳反应体系:  $10\times$  *Taq* Buffer  $2.5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$   $2.5\text{ }\mu\text{L}$  ( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $2\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  *Taq* DNA polymerase  $2.0\text{ }\mu\text{L}$  ( $4\text{ U}\cdot\text{管}^{-1}$ ),  $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs  $1.5\text{ }\mu\text{L}$  ( $0.12\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物各  $1.0\text{ }\mu\text{L}$  ( $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 最佳反应程序:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min 后, 按  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $58.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 55 s 的程序进行 25 次循环, 第 25 次循环结束后再延伸 5 min, 最后在  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  暂时保存。



M. DL2000 Marker; 1.  $52.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 2.  $54.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 3.  $56.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 4.  $58.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 5.  $60.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 6.  $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 7.  $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 8.  $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 9.  $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

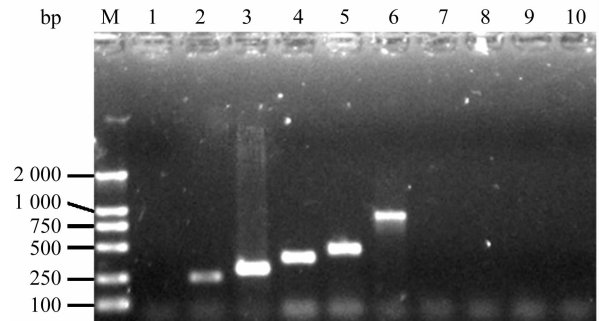
图 2 多重 PCR 最佳退火温度(A)和最佳引物浓度(B)的确定

Fig. 2 Determination of the annealing temperature and  $\text{Mg}^{2+}$  concentration in multiplex PCR

### 2.3 多重 PCR 的特异性

五重 PCR 对 App、Hps、Bb、 $\text{T}^+$  Pm 和 Mhp 的 5 种菌体模板均能扩出目的带, 且没有其它非特异性反应 (见图 3)。将 5 种 PCR 产物回收测序, 发现其与 NCBI 上相对应 *apxIV*、16S rRNA、*fla*、*toxA* 和 *ldh* 基因序列 (4103165、2116648、3947513、18026874、49109) 的同源性均在 99% 以上, 分别为 377/377、819/821、235/235、442/442 和 285/287 bp (测序结果略)。这表明所设计的 5 对引物在相对应的 5 种病原微生物之间没有交叉反应。另外, 该 PCR 方法对产类志贺毒素大肠杆菌 ED1、猪霍

乱沙门氏菌 C78-1、猪 2 型链球菌 SC-1、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、非产毒巴氏杆菌 WH1 基因组的扩增结果均为阴性 (见图 3), 表明所设计的 5 种引物在其它 5 种常见的病原菌之间也没有交叉反应。



M. DL2000 Marker; 1. 猪肺脏组织; 2. Bb; 3. Mph; 4. App; 5. Pm; 6. Hps; 7. 大肠杆菌 ED1; 8. 猪霍乱沙门氏菌 C78-1; 9. 猪链球菌 SC-1; 10. 葡萄球菌 ATCC25923

M. DL2000 Marker; 1. Lungs of porcine; 2. Bb; 3. Mph; 4. App; 5. Pm; 6. Hps; 7. *Escherichia coli* ED1; 8. *Salmonella choleraesuis* C78-1; 9. *Streptococcus suis* SC-1; 10. *Staphylococcus aureus* ATCC25923

图 3 多重 PCR 的特异性检测

Fig. 3 Specificity test of multiplex PCR

### 2.4 多重 PCR 的敏感性

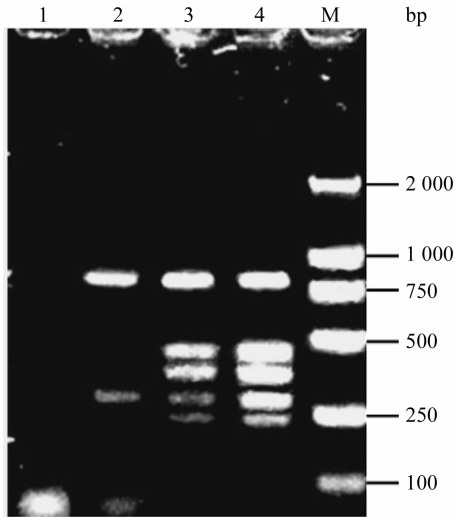
提取 5 种病原菌基因组 DNA, 以超纯水作 5 倍梯度稀释后分别取  $2\text{ }\mu\text{L}$  为模板, 使用优化后的多重 PCR 方法进行扩增。结果显示多重 PCR 能同时检测到 160 pg 的 App、Hps、Bb、 $\text{T}^+$  Pm 和 Mph 的基因组 DNA, 其中 Hps 和 Mph 的最低检出限为 32 pg (见图 4)。

### 2.5 感染小鼠肺脏组织的多重 PCR 检测

将 App、Hps、Bb 和  $\text{T}^+$  Pm 攻毒死亡小鼠进行剖检, 无菌取一小块组织进行增菌培养。多重 PCR 方法对 App、Hps、Bb 和  $\text{T}^+$  Pm 攻毒组死亡小鼠的肺脏组织增菌培养物的检测结果均为阳性, 而隔离饲养的 PBS 对照组的检测结果为阴性, 与同时进行的细菌分离鉴定结果一致。这表明该五重 PCR 方法能从病料的 8 h 增菌培养物中快速检测出相应的病原菌, 可考虑用于临床病例的快速诊断和流行病学调查。

### 2.6 猪样本临床检测结果

采用常规的细菌分离鉴定方法, 从其中 43 肺脏病料共分离到 6 株 Hps、3 株 Bb 和 1 株 Mhp, 没有分离到 APP 和  $\text{T}^+$  Pm。五重 PCR 从 43 份肺脏病



M. DL2000 Marker; 1.  $6.4 \text{ pg} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$ ; 2.  $32 \text{ pg} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$ ; 3.  $160 \text{ pg} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$ ; 4.  $800 \text{ pg} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$

图 4 多重 PCR 的敏感性检测

Fig. 4 Sensitivity assay of multiplex PCR

料中检测到其中 4 种细菌,分别为 Hps 13 份、Bb 6 份、T<sup>+</sup>Pm 1 份和 Mhp 6 份。所有分离到 5 种病原菌的病料使用多重 PCR 方法均检测到了相应的病原菌。所有 PCR 产物回收测序,发现与 NCBI 上对应序列的同源性也均在 99% 以上(测序结果略)。这验证了该多重 PCR 方法的特异性和敏感性,其检出率远远高于常规的细菌分离鉴定方法。

五重 PCR 方法从另外 269 份临床发病猪的肺脏样本中检测到所有 5 种病原菌。将第 1 份 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 阳性的 PCR 产物回收测序,发现与 NCBI 上对应序列的同源性也均在 99% 以上(测序结果略)。在 269 份样本中有 167 份检测为阳性(见表 3),其中 76 份病料存在 5 种病原菌的混合感染情况,占阳性病料的 45.6%(见表 3)。最常见的混合感染菌是 Mhp,占 37.7%(63/167),其次是 Hps,占 31.1%(52/167)、Bb 占 30.5%(51/167)、T<sup>+</sup>Pm 占 1.8%(3/167),App 占 1.8%(3/167)(见表 3)。最常见的混合感染组合是 Mhp/Hps,占 19.2%(32/167);其次是 Mhp/Bb,占 16.8%(28/167),Bb/Hps 占 12.0%(20/167)。在 76 份共混合感染病料中,有 10 份检测为三重感染,占阳性病料的 6.0%(10/167),分别为 Mhp/Hps/Bb 9 份和 Mhp/T<sup>+</sup>Pm/Bb 1 份。这表明,华中地区猪群呼吸道感染病原菌的种类较多,且极其复杂。

表 3 269 份猪肺脏病料的 PCR 检测结果

Table 3 Multiplex PCR detection of 269 lung samples from clinical porcine suffering respiratory diseases

	App	Hps	Bb	T <sup>+</sup> Pm	Mhp
App	1				
Hps	0	36			
Bb	1	20	21		
T <sup>+</sup> Pm	0	0	2	0	
Mhp	2	32	28	1	23

### 3 讨论

近年来,猪的细菌性呼吸道疾病已成为危害世界规模化养猪业的重要猪病症候群。这些疾病症状相似,不易区分,给临床鉴别诊断造成较大困难<sup>[2-4]</sup>。在这种情况下,采用多重 PCR 方法通过一次操作即能检测出单一病原感染或混合感染,进而有针对性地采取药物治疗或合适的免疫预防措施,无疑对养猪生产具有明显的现实意义。出于这个目的,笔者针对 5 种常见的猪呼吸道病原菌 App、Hps、Bb、T<sup>+</sup>Pm 和 Mhp 的相关基因选择特异性引物,通过系统摸索和优化各种条件,在一步 PCR 反应中能同时检测 5 种呼吸道病原菌的特异基因,建立了同时鉴别上述 5 种呼吸道病原菌的多重 PCR 方法,最终的临床检测结果表明该多重 PCR 方法具有快速、敏感、特异的优点,可用于临床病例的快速诊断和流行病学调查。

猪体内存在多种致病和非致病菌,其中某些细菌基因与笔者检测的致病菌高度同源,因此目的基因的特异性是关键。笔者选取有明显致病性的 T<sup>+</sup>Pm 的特异基因 *tox A* 基因,而未选取多杀巴氏杆菌属特异性基因作为目的基因,以与非产毒多杀巴氏杆菌相区分<sup>[8, 10]</sup>。App 可分泌毒素 ApxI、ApxII、ApxIII 和 ApxIV 中的一种或多种,但仅有 ApxIV 存在于所有 15 个血清型的 App 中,且仅在动物体内表达,是猪只发生感染的重要依据<sup>[11-12]</sup>。因此,选用的 *apxIV* 目标基因可以针对 App 所有血清型。*fla* 基因是 Bb 编码黏附因子鞭毛的重要保护性抗原基因<sup>[7, 13]</sup>,该基因具有种属特异性<sup>[14]</sup>。本研究针对 Hps 所选取的 16S rRNA 基因特异区段被证明是其特有的,足以与其它细菌区分<sup>[6]</sup>。Mhp 的 *ldh* 基因编码乳酸脱氢酶,具有强免疫原性<sup>[15]</sup>,且能与

其它种类的支原体(如猪鼻支原体)相区分<sup>[9]</sup>。另外,使用 Blast 软件分析发现所选取的目的基因片段与本基因的同源性均在 99% 以上,而与相应菌其它基因、其它类似细菌和鼠、猪等动物的基因组均没有同源性,表明这几个目的基因片段均为高度保守的特异基因片段,PCR 试验结果也证实其无非特异性反应。

在引物设计方面,通过软件多方面的对比分析,选取的 5 对引物 GC 含量相似,Tm 值相似,引物之间没有明显的相互干扰和交叉反应。更重要的是,笔者通过大量前期试验确定了单一 PCR 的最佳反应条件范围,选取了各自最佳反应范围的交集,理论上适合多重 PCR 反应。最后获得的多重 PCR 反应的最佳反应条件,也与根据单一 PCR 的条件得出的推论相符,但略有区别。这些工作保证了多重 PCR 反应条件的最适性,也最终克服了多重 PCR 常见的引物之间交叉干扰,导致敏感性降低的缺点<sup>[16]</sup>。鉴于在有些情况下,临床病料组织中的菌体数量可能很少,笔者通过组织块在液体培养中预培养富集菌体,使待检细菌模板拷贝数增加,可以相应提高检出率,这对早期感染或隐性携带者的活体检测很有帮助。

多重 PCR 方法的小规模临床检测结果表明,华中地区猪群的呼吸道病原菌的混合感染十分严重。猪群呼吸道感染病原菌的种类较多,且极其复杂,这也部分代表了全国猪群的整体状况。临床检测结果也表明该多重 PCR 方法比常规的细菌分离鉴定具有更好的敏感性,可用于临床病例的快速诊断和流行病学调查,有望成为一种实用、快速的检测方法。

#### 参考文献:

- [ 1 ] National Animal Health Monitoring System. Swine '95: grower/finisher. Part II. Reference of 1995 U. S. grower/finisher health and management practices [M]. U. S. Department of Agriculture, Fort Collins, Colo USA, 1996:14-16.
- [ 2 ] MOORKAMP L, NATHUES H, SPERGSR J, et al. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 175(2):273-275.
- [ 3 ] 赵德明,张仲秋,沈建忠,主译. 猪病学[M]. 第 9 版. 北京:中国农业出版社,2008:633-817.
- [ 4 ] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 第 5 版. 北京:中国农业出版社,2006:245-269.
- [ 5 ] GRAM T, AHRENS P, ANDREASEN M, et al. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the apx and omlA genes — evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 75(1):43-57.
- [ 6 ] OLIVEIRA S, GALINA L, PIJOAN C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(3):495-501.
- [ 7 ] HOZBOR D, FOUQUE F, GUIISO N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction [J]. *Res Microbiol*, 1999, 150(5):333-341.
- [ 8 ] NAGAI S, SOMENO S, YAGIHASHI T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(4):1004-1010.
- [ 9 ] CARON J, OUARTANI M, DEA S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4):1390-1396.
- [10] REGISTER K B, DE JONG K D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(2-4):201-210.
- [11] CHO W S, CHAE C. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37(1):56-60.
- [12] CHO W S, CHAE C. Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *J Comp Pathol*, 2001, 125(1):34-40.
- [13] MATTOO S, CHERRY J D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2):326-382.
- [14] PARKHILL J, SEBAIHIA M, PRESTON A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* [J]. *Nature genetics*, 2003, 35(1):32-40.
- [15] MAES D, SEGALES J, MEYNS T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs [J]. *Vet Microbiol*. 2008, 126(4):297-309.
- [16] MURDOCH D R. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections [J]. *APMIS*, 2004, 112(11-12):713-727.