



## 重庆地区兔腹泻病原菌分离鉴定及检测方法的建立

许国洋,沈克飞,徐登峰,付利芝,张素辉,王孝友,杨 柳

(重庆市畜牧科学院,重庆 402460)

**摘 要** 对重庆地区兔细菌性腹泻病原菌进行分离鉴定并建立相应检测方法,为该病的检测及防控奠定基础。通过临床诊断与细菌分离培养,对引起兔腹泻的病原菌进行分离,利用细菌通用引物扩增分离菌 16S rDNA 基因序列,测序分析后构建系统进化发育树。同时,依据各病原菌特异性序列设计引物,建立 PCR 检测方法。结果表明,共分离到 4 种病原菌,分子生物学鉴定为:铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌;依据铜绿假单胞菌外毒素 *eta* 基因、产气荚膜梭菌 *a* 毒素基因、金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 *nuc* 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *eae* 基因设计特异性引物,成功建立多重 PCR 检测方法,可从 4 种病原菌基因组混合物中扩增出大小分别为 1 043、324、200 和 609 bp 的目的条带,目的菌株最低检出浓度为  $10^3$  cfu · mL<sup>-1</sup>。对重庆地区 200 份临床样本进行检测,发现 4 种病原菌普遍存在,其中,金黄色葡萄球菌单独感染检出率高达 37.6%,与大肠杆菌的混合感染检出率达 28.0%。

**关键词** 兔腹泻;病原菌;分离鉴定;多重 PCR;混合感染;检出率

**中图分类号** S852.61

**文献标志码** A

**文章编号** 1004-1389(2018)08-1097-07

近年来,随着畜牧业的不断发展,养兔业已成为重庆地区一项发展潜力巨大的产业。但由于重庆地区的独特地理特征和湿热气候环境,为病原菌滋生创造了有利条件,成为疫病多发的主要诱因之一,严重影响养兔业的健康可持续发展。兔腹泻是一类临床上表现腹泻症状的疾病,表现为排粪频繁,粪便稀软,呈粥样或水样便,轻者食欲减退,精神不振,排粪稀软,呈粥样或水样,病兔全身反应较轻,虚弱、消瘦、不爱运动<sup>[1-3]</sup>;重者体温升高,食欲废绝,精神倦怠,严重腹泻,呈水样常混有血液或胶冻样黏液,粪便恶臭<sup>[4]</sup>,腹部触诊有明显疼痛反应,呈脱水和衰竭状态及自体中毒症状,结膜发绀,脉搏细弱,呼吸促迫,常因虚脱而死亡<sup>[5-6]</sup>。目前,兔腹泻病在重庆地区有流行趋势,多发于幼兔,给养兔业造成巨大经济损失。兔腹泻病种类多样,病因复杂,其中,由病原菌导致的细菌性腹泻最为重要<sup>[7]</sup>。兔细菌性腹泻主要包括大肠杆菌病、产气荚膜梭菌病、泰泽氏菌病、沙门氏菌病、金黄色葡萄球菌病和铜绿假单胞菌病等,其中,以大肠杆菌病和产气荚膜梭菌病发生率较

高<sup>[8]</sup>。由于兔细菌性腹泻各病原菌致病性与耐药性差异,导致其不同地区呈不同流行趋势,危害也各有差异,给疫病防控带来巨大困扰<sup>[9]</sup>。因此,明确病原、建立有效检测方法对该病的防控有重要意义。目前,兔细菌性腹泻的研究主要涉及病原特性和防治措施,有关诊断方法相对较少<sup>[10]</sup>。传统病原菌分离鉴定方法费时耗力,成本较高,且易出现漏检,不能达到快速诊断的目的。本研究对重庆地区兔细菌性腹泻病原菌进行分离鉴定,并建立检测方法,为该病的防控奠定理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

细菌基因组提取试剂盒、 $2 \times$  Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA marker、胶回收试剂盒和胎牛血清均购自天根生化科技(北京)有限公司;参照文献<sup>[11]</sup>的细菌 16S rDNA 基因序列通用引物,同时,参照铜绿假单胞菌外毒素 *eta* 基因<sup>[12]</sup>、产气荚膜梭菌 *a* 毒素基因<sup>[13]</sup>、金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 *nuc* 基因<sup>[14]</sup> 和大肠杆菌外膜蛋白 *eae* 基

收稿日期:2018-02-17 修回日期:2018-04-23

基金项目:重庆市农业发展基金(16408);重庆市农业技术推广与服务补助资金(14461)。

第一作者:许国洋,男,助理研究员,从事畜禽疫病防控及分子生物学研究。E-mail:guoyangxu@126.com

通信作者:杨 柳,男,副研究员,主要从事畜禽疫病防控及分子生物学研究。E-mail:yangliuldz@163.com

因<sup>[15]</sup>设计特异性引物,引物均由上海生工生物工程

程有限公司合成,引物信息见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

名称 Name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size	参考基因 GenBank 登录号 GenBank ID of reference gene
细菌通用引物 <i>Bacteria universal primer</i>	F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R: 5'-ACGGGTACCTTGTTCGACTT-3'	1 500	
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F: 5'-AGTTGGTTCGCTGAACTGGC-3' R: 5'-TGCATCTCGTTGCTCTCGTG-3'	200	KC847698.1
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	P3 5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3' P4 5'-CCTCTGATACATCGTGAAG-3'	324	AB075767.1
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	F: 5'-TGGCATATGTATGGCAATTGTTTCA-3' R: 5'-GCTTGTGCTTCACTTTTCTTAAA-3'	609	DQ507382.1
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	F1: 5'-CTTCGCCACTTAATGCCAGC-3' F2: 5'-GGTCTCTATCAAACAAGATACACGA-3'	1 043	GU265555.1

1.2 菌株

链球菌 (CVCC1887)、多杀性巴氏杆菌 (HN13)和沙门氏菌(ATCC 25922)参考菌株均由重庆市畜牧科学院兽医兽药研究所提供。

1.3 病例来源

重庆市各区、县兔场腹泻病例的兔粪便或肠道内容物。

1.4 方法

1.4.1 病原菌分离培养及致病性分析 对疑似感染病例临床诊断后,采集病料,利用划线法接种于含有 φ=10%胎牛血清的 TSA 固体培养基,于 37 °C 恒温培养箱中培养,用生理盐水将分离到的各疑似病原菌菌液稀释为 10<sup>8</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>,通过腹腔注射 8 只小鼠,每只 0.2 mL,并设对照组,正常饲喂 7 d 后进行致病性分析,并从死亡小鼠心血或肝脏中进行病原菌的分离纯化。同时,对分离到的疑似菌株进行革兰氏染色鉴定。

1.4.2 16S rDNA 基因序列扩增及系统进化树构建 参照细菌基因组提取试剂盒说明书提取分离菌总 DNA,利用细菌通用引物扩增各分离菌株 16S rDNA 基因序列,反应体系为:DNA 模板 3 μL,上下游引物各 0.2 μL,2×Taq PCR Master Mix 25 μL,ddH<sub>2</sub>O 21.6 μL。反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 45 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI 中 BLAST 比对分析,并借助 MEGA 5.0 软件,利用 N-J 法构建系统进化树。

1.4.3 多重 PCR 检测条件优化 参照“1.4.2”对各菌株特异性引物进行鉴定,PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序分析。挑取各病原菌单菌落接种于含 φ=10%胎牛血清的 TSB 培养

液,37 °C 培养 24 h,用生理盐水将各菌株稀释为 10<sup>8</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>,提取基因组后,各取 2 μL 混匀作为模板进行多重 PCR 反应,参照文献[11]的方法分别针对引物浓度和退火温度进行多重 PCR 反应条件的优化,上下游引物均以 0.1 μmol · L<sup>-1</sup> 为浓度梯度,范围均为 0.1~0.5 μmol · L<sup>-1</sup>,退火温度以 2 °C 为梯度,范围为 50 °C~60 °C。

1.4.4 多重 PCR 引物特异性分析 分别提取参考菌株和病原菌株基因组 DNA,利用多重 PCR 最适反应条件扩增目的基因,进行引物特异性分析。

1.4.5 多重 PCR 反应灵敏度分析 制备 10<sup>8</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>各病原菌菌液,10 倍梯度稀释后,选取浓度为 10<sup>1</sup>~10<sup>5</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>,提取不同浓度病原菌基因组 DNA,同一浓度各取 2 μL 为模板,利用多重 PCR 最适反应条件进行灵敏度分析。

1.4.6 临床样品检测 利用建立的多重 PCR 反应条件对临床采集的样本进行兔腹泻病原菌鉴定,并对病原菌多样性及流行情况进行分析。

2 结果与分析

2.1 临床症状

通过对患病兔的临床诊断,发现腹泻病例多为幼兔,腹泻程度不尽相同(图 1),且多数病例肠道出血较为严重,肠黏膜出现脱落现象(图 2)。

2.2 细菌分离及致病性试验

通过细菌分离培养共分离到 4 种疑似病原菌。小鼠攻毒试验发现,接种 12 h 后,各试验组部分小鼠开始出现精神萎靡、采食和饮水减少、蜷缩不动病症,24 h 后开始出现死亡,7 d 后,发现 4 种分离菌均可引起小鼠死亡,死亡率分别为 60%、80%、100% 和 50%,且从各死亡小鼠的心血和肝脏中均分离到目的菌株。经革兰氏染色发

现 3 株为杆状或短杆菌,1 株为球菌,2 株为 G<sup>+</sup> 菌(图 3-B、3-C),2 株为 G<sup>-</sup> 菌(图 3-A、3-D)。

### 2.3 基于 16S rDNA 的分离菌系统进化树分析

利用通用引物扩增各分离菌株 16S rDNA 基

因序列,Blast 比对发现 4 种菌株分别与铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌同源性较高,均高于 99%,且在系统进化树分析中也分别与其聚为一簇(图 4)。



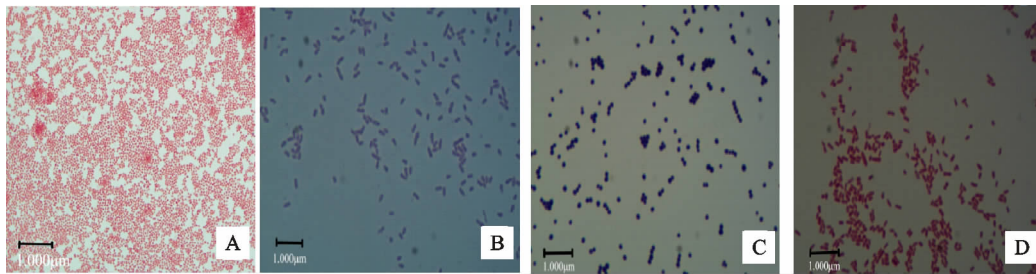
图 1 腹泻幼兔

Fig. 1 Diarrhea of young rabbit



图 2 肠道病变

Fig. 2 Intestinal lesion



A~D:细菌分离株 1~4(1 000×) Bacterial strain 1-4(1 000×)

图 3 革兰氏染色结果

Fig. 3 Gram stain result

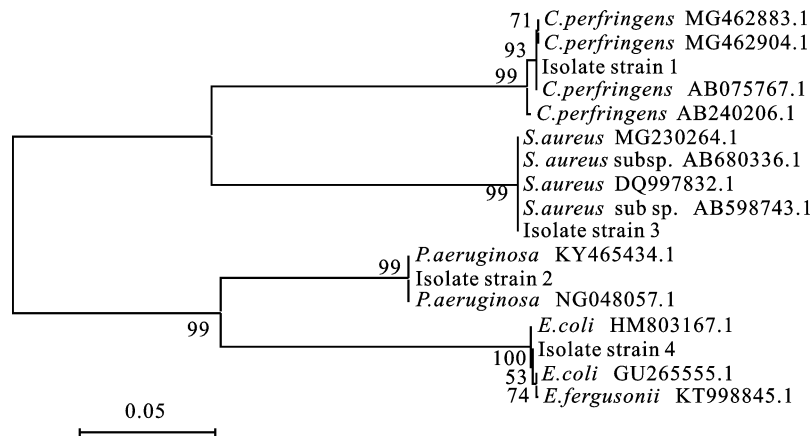


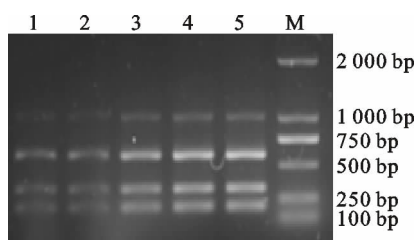
图 4 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences

### 2.4 多重 PCR 反应条件的优化

通过对各菌株特异性引物鉴定,发现均能有效扩增出目的条带。多重 PCR 反应条件优化结果显示:引物浓度 $\geq 0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,鉴定效果

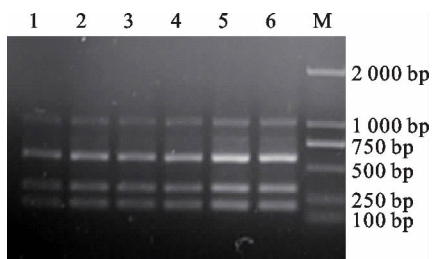
较好(图 5),退火温度 $\geq 58 \text{ }^\circ\text{C}$ 时效果较好(图 6),确定  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最适引物浓度,58  $^\circ\text{C}$ 为最适退火温度。



M. DL2000 marker; 1~5. 0.1~0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 5 引物浓度优化结果

Fig. 5 Result of annealing primers concentration in multiplex PCR



M. DL2000 marker; 1~6. 50  $^{\circ}\text{C}$ ~60  $^{\circ}\text{C}$

图 6 退火温度优化结果

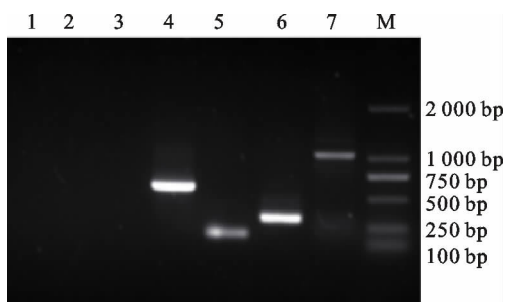
Fig. 6 Result of the annealing temperature in multiplex PCR

### 2.5 多重 PCR 检测的特异性分析

通过对多重 PCR 引物特异性鉴定,发现各引物仅在病原菌基因组的情况下可扩增出单一特异性条带,产物大小与预期结果一致。链球菌、多杀性巴氏杆菌和沙门氏菌均无扩增条带(图 7)。

### 2.6 多重 PCR 检测方法灵敏度分析

通过多重 PCR 反应体系灵敏度检测,发现各菌株浓度  $\geq 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,扩增效果较好,故该方法的最低检出浓度为  $10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  (图 8)。



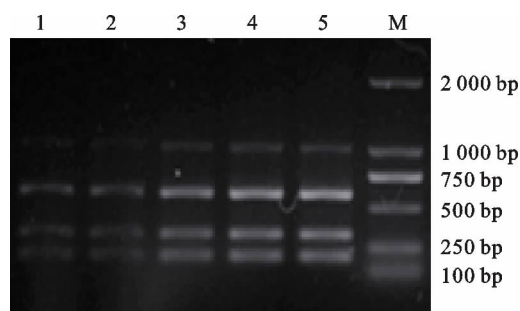
M. DL2000 marker; 1. 链球菌 *Streptococcus*; 2. 多杀性巴氏杆菌 *P. multocida*; 3. 沙门氏菌 *S. enterica*; 4. 金黄色葡萄球菌 *S. aureus*; 5. 铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*; 6. 产气荚膜梭菌 *C. perfringens*; 7. 大肠杆菌 *E. coli*

图 7 多重 PCR 的特异性检测

Fig. 7 Specificity test of multiplex PCR

### 2.7 临床样品检测

利用建立的检测方法,对临床采集的 200 份兔腹泻样品进行检测,发现混合感染样品检出率为 37%,单一病原菌感染样品检出率为 63%。其中,金黄色葡萄球菌单独感染检出率高达 37.6%,铜绿假单胞菌和产气荚膜梭菌单独感染检出率较低,分别为 6.5% 和 5.0%;混合感染样品中,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合感染检出率最高(28.0%),未发现铜绿假单胞菌和产气荚膜梭菌以及 4 种病原菌同时感染的样品,其他病原菌混合感染检出率均较低(图 9)。



M. DL2000 marker; 1~5.  $10^1 \sim 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 8 多重 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 8 Result of sensitivity assay of multiplex PCR

## 3 讨论

随着养兔业的不断发展,免疫病防控问题已成为主要制约因素。在饲养管理不当、养殖技术水平低的情况下,兔感染病原菌几率会显著提高<sup>[16]</sup>。兔细菌性腹泻无明显的季节性,以冬春季最易流行,发病率和死亡率均较高,多个品种均易发生。此外,兔腹泻病因复杂,种类多样,而针对兔细菌性腹泻的疫苗又相对较少,故快速有效的检测方法显得尤为重要<sup>[17]</sup>。传统的病原菌分离培养方法虽然能达到疫病诊断目的,但对试验设备、人员操作和病料采集等方面要求较高<sup>[18]</sup>。不同病原菌对培养条件的需求往往不一致,当病料中存在多个病原菌时,若在同一条件下进行培养,会出现病原菌间竞争效应,导致培养条件需求较高的病原菌难以分离,给疫病诊断带来困扰<sup>[19]</sup>。随着 PCR 技术在多个领域的应用,凭借高特异性、高灵敏性、操作简单等优势,在疫病诊断方面发挥重要作用。多重 PCR 技术,不仅具有普通 PCR 优势,并能同时对多个目的基因进行检测,在检测混合感染方面具有显著优势<sup>[11]</sup>。

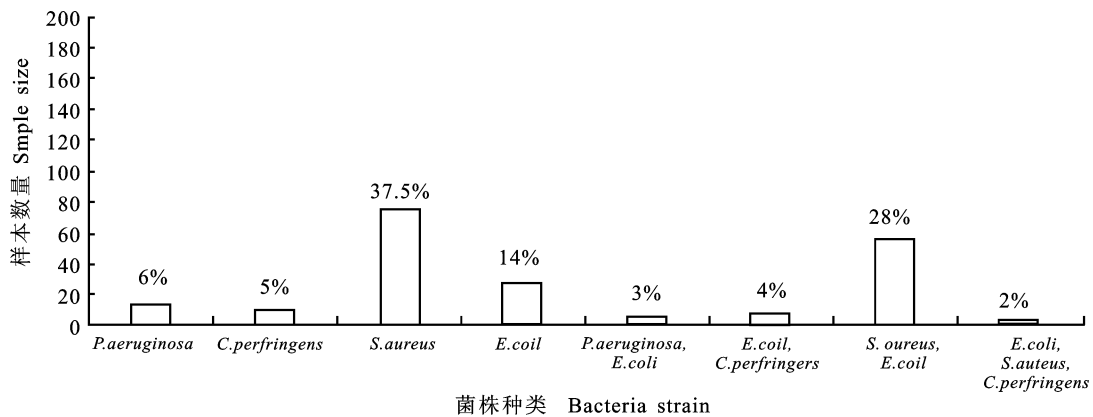


图 9 临床样本的多重 PCR 检测结果统计

Fig. 9 Multiple PCR test results of clinical samples

目前,关于兔细菌、病毒和寄生虫等感染引起的疫病检测研究较多,而混合感染检测方法相对较少。感染兔的病原菌种类较多,且易与其他病原菌、病毒和寄生虫发生混合感染,给兔健康养殖带来严重威胁。本研究通过对重庆地区兔腹泻临床样品检测发现,建立的多重 PCR 检测方法能有效针对铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌对兔的感染情况进行诊断,可以通过 1 次操作实现对病原菌单一或混合感染情况的快速诊断。检测结果表明,单一病原菌引起的兔腹泻病例较多,金黄色葡萄球菌检出率最高,与陈艳会等<sup>[20]</sup>对葡萄球菌的临床分离鉴定结果相一致;混合感染多为 2 种病原菌引起,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合感染最为严重,未检出铜绿假单胞菌与产气荚膜梭菌的混合感染,且未出现 4 种病原菌同时感染的情况。各病原菌临床检出率差别较大,其中,金黄色葡萄球菌单独感染检出率为 37.6%,混合感染样品中金黄色葡萄球菌检出率为 81.1%;大肠杆菌单独检出率仅为 14%,而混合感染样品中大肠杆菌检出率高达 100%,表明其最易与其他病原菌混合感染,这可能与部分大肠杆菌具有条件致病性有关。

兔细菌性腹泻病原检测常采用细菌分离培养技术与分子诊断技术相结合的方法,虽能达到对病原菌鉴定的目的,但耗时较长,对于培养条件要求较高的菌常出现漏检现象,造成检测结果误判,且对多个病原菌混合感染的情况不能达到快速诊断的目的,给疫病防控带来一定的困扰<sup>[19]</sup>。本研究建立的多重 PCR 检测方法操作简便,成本低且灵敏度高,给重庆地区兔细菌性腹泻的检测提供理论依据,也为该病的防控奠定基础。

#### 参考文献 Reference:

- [1] 马长旺,吴敏秋.引起兔腹泻的原因分析与防治对策[J].当代畜牧,2013,1(3):28-31.  
MA CH W, WU M Q. Analysis and control countermeasures of the causes of rabbit diarrhea[J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2013, 1(3): 28-31.
- [2] 赵泮峰,任战军,王洪阳,等.中草药添加剂对断奶幼兔生长性能和腹泻率的影响[J].西北农业学报,2012,21(1):43-47.  
ZHAO P F, REN ZH J, WANG H Y, et al. Effects of Chinese herbal additive on growth performance and diarrhea rate of weaned rabbits[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(1): 43-47.
- [3] 白春荣,陈福,李哲.仔兔传染性腹泻的控制技术[J].畜牧兽医杂志,2015,34(1):108-110.  
BAI CH R, CHEN F, LI ZH. Control technology of infectious diarrhea in young rabbits[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015, 34(1): 108-110.
- [4] 张少东,王艳艳.獭兔幼仔兔常见腹泻病的诊疗[J].中国养兔,2014,200(2):30-32.  
ZHANG SH D, WANG Y Y. The diagnosis and treatment of common diarrhea in young rex rabbit[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2014, 200(2): 30-32.
- [5] PILLIEN F, CHALARENG C, BOURY M, et al. Role of Adhesive Factor/Rabbit 2 in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* O103 diarrhea of weaned rabbit[J]. *Vet Microbiol*, 1996, 50(1/2): 105-150.
- [6] YUKIKO HARA-KUDO, YOSHIYUKI MORISHITA, YOSHIKI NAGAOKA, et al. Incidence of diarrhea with antibiotics and the increase of clostridia in rabbits[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1996, 58(12): 1181-1185.
- [7] 刘红霞.家兔 3 种常见细菌性腹泻病的综合防治[J].畜牧业,2011,264(4):82-82.  
LIU H X. Comprehensive prevention and control of three common bacterial diarrhoeal diseases in rabbits[J]. *Live-*



- stock and Poultry Industry*, 2011, 264(4): 82-82.
- [8] 王孝友, 杨睿, 徐登峰, 等. 兔绿脓杆菌的分离与鉴定[J]. 中国养兔, 2016, 211(1): 16-18.  
WANG X Y, YANG R, XU D F, *et al.* Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in rabbit[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2016, 211(1): 16-18.
- [9] 任永军, 邝良德, 邓小东, 等. 西南地区肉兔场主要疫病流行病学调查研究[J]. 中国养兔, 2013, 198(9): 18-19, 21.  
RENG Y J, KUANG L D, DENG X D, *et al.* Investigation and research on the main epidemic diseases in meat rabbit field in the southwest[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2013, 198(9): 18-19, 21.
- [10] 汪淑芳, 周春宇, 梁梓, 等. 规模兔场兔主要腹泻性疾病的诊断与治疗[J]. 江苏农业科学, 2009, 267(1): 223-225.  
WANG SH F, ZHOU CH Y, LIANG Z, *et al.* Diagnose and treatment of main diarrhea in rabbit on large scale breed[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2009, 267(1): 223-225.
- [11] 许国洋, 付利芝, 杨金龙, 等. 山羊淋巴结炎病原菌的分离鉴定及多重 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(2): 324-330.  
XU G Y, FU L ZH, YANG J L, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria of lymphadenitis in goat and establishment of multiplex PCR detection method[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(2): 324-330.
- [12] 李雅林, 宋文刚, 牛钟相, 等. 铜绿假单胞菌 PA-SD 株外毒素 A 基因 III 区的克隆及同源性比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 8-11.  
LI Y L, SONG W G, NIU ZH X, *et al.* Cloning and alignment of domain III fragment of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2003, 23(9): 8-11.
- [13] 吕长辉, 王方山, 孙佳芝, 等. 青岛地区规模化兔场产气荚膜梭菌流行株毒素型、遗传多样性和耐药性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 102-106.  
LÜ CH H, WANG F SH, SUN J ZH, *et al.* Investigation of the virulent genes, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Clostridium perfringens* isolated from large-scale rabbitry in Qingdao area[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(2): 102-106.
- [14] 胡瑜. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶的功能鉴定及表达调控[D]. 上海: 上海交通大学, 2013.  
HU Y. Functional identification and expression regulation of the thermonucleases in *Staphylococcus aureus* [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2013.
- [15] 史云, 计融. 肠致病性大肠杆菌的致病因子及致病机制的研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册), 2003, 30(4): 205-211.  
SHI Y, JI R. Research progress on pathogenic factors and pathogenic mechanism of enteropathogenic *E. coli* [J]. *Foreign Medical Sciences (Section Hygiene)*, 2003, 30(4): 205-211.
- [16] CHEN Y, ZHAO B, WU Y, *et al.* Impacts of diarrhea on the immune system, intestinal environment, and expression of PGRPs in New Zealand rabbits[J]. *PeerJ*, 2017, 27, 5: e4100.
- [17] DEZENGRINI R, WEIBLEN R, FLORES E F. Selection and characterization of canine, swine and rabbit cell lines resistant to bovine viral diarrhea virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 1(1): 51-57.
- [18] 王海荣, 陈勇, 柴同杰, 等. 几起兔腹泻疫情的诊断研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2008, 39(3): 350-354.  
WANG H R, CHEN Y, CHAI T J, *et al.* Diagnostic research of five epidemic situations of rabbits diarrhea[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2008, 39(3): 350-354.
- [19] 秦绪伟, 黄娟. 常见兔腹泻病的诊断与治疗[J]. 北方牧业, 2014, 468(20): 27.  
QIN X W, HUANG J. Diagnosis treatment of common diarrhoeal diseases in rabbit[J]. *Beifang MuYe*, 2014, 468(20): 27.
- [20] 陈艳会, 李旭, 胡昭伟. 兔葡萄球菌的分离与鉴定[J]. 养殖与饲料, 2017, 10(12): 88-89.  
CHEN Y H, LI X, HU ZH W. Isolation and identification of staphylococcus in rabbits[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2017, 10(12): 88-89.

## Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria of Rabbit Diarrhea in Chongqing and Establishment of Its Detection Method

XU Guoyang, SHEN Kefei, XU Dengfeng, FU Lizhi,  
ZHANG Suhui, WANG Xiaoyou and YANG Liu

(Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China)

**Abstract** The purpose of this study is to isolate and identify the pathogenic bacteria of rabbit diarrhea in Chongqing and establish its detection method. The pathogenic bacteria was isolated by the method of clinical diagnosis and bacterium separation technology. The 16S rDNA gene, which was augmented by universal primer for bacteria and used to build the phylogenetic tree, was carried out in the NCBI Blast comparison. And PCR detection method was established based on the specific primers of the bacterial strains. The molecular identification result showed that *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were successfully separated based on the phylogenetic analysis. The multiple PCR method which was established according to the gene of *eta*, toxin *a*, *nuc* and *ee*, could amply the purpose strip with a fragment of 1 043 bp, 324 bp, 200 bp and 609 bp. The minimum detectable concentration of the pathogenic bacteria could be checked out with the concentration of  $10^3$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. The 200 clinical samples test results showed that the four kinds of pathogenic bacteria were ubiquitous. And *Staphylococcus aureus* was independently checked out with the highest detection rate of 37.6%. In addition, the mixed infection of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was discovered with the detection rate of 28.0% by the method of multiple PCR. Four kinds of pathogenic bacteria of rabbit diarrhea were isolated based on the research. And the multiple PCR method which had been successfully established laid foundation for detection and prevention of rabbit bacterial diarrhea.

**Key words** Rabbit diarrhea; Pathogenic bacteria; Isolation and identification; Multiple PCR; Mixed infection; Detection rate

**Received** 2018-02-17      **Returned** 2018-04-23

**Foundation item** Chongqing Agricultural Development Foundation(No. 16408); Subsidy Project of Chongqing Agricultural Technology Promotion and Service(No. 14461).

**First author** XU Guoyang, male, research assistant. Research area: prevention and control of livestock and poultry diseases, molecular biology. E-mail: guoyangxu@126.com

**Corresponding author** YANG Liu, male, associate research fellow. Research area: prevention and control of livestock and poultry diseases, molecular biology. E-mail: yangliuldz@163.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)