

牛化脓性隐秘杆菌病 PCR 诊断方法的建立

王密 周玉龙* 朴范泽

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 近几年犊牛化脓性肺炎发病率逐年升高, 经检测该病原以化脓性隐秘杆菌为主, 研究建立快速检测化脓性隐秘杆菌的 PCR 诊断方法。根据化脓性隐秘杆菌 16S rRNA 基因设计并合成一对特异性引物, 对 PCR 条件进行优化后通过特异性试验和敏感性试验检测其特异性和敏感性。扩增出 927 bp 目的基因, 最佳引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、退火温度 58°C、 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L, 特异性试验结果表明化脓性隐秘杆菌参考菌株能扩增出 927 bp 目的基因, 而大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、化脓链球菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌和变形杆菌等的扩增结果均为阴性。敏感性试验结果表明, PCR 的最低检出量为 42 个化脓性隐秘杆菌。建立的牛化脓性隐秘杆菌的 PCR 诊断方法, 具有较高的特异性和敏感性, 为化脓性隐秘杆菌引起的牛化脓性肺炎的快速诊断及流行病学调查提供了新的手段。

关键词: 化脓隐秘杆菌, 16S rRNA, PCR, 诊断方法

Establishment of PCR Method for Diagnosing Bovine *Arcanobacterium pyogenes*

WANG Mi ZHOU Yu-Long* PIAO Fan-Ze

(Heilongjiang Bayi Agricultural University College of Animal Science & Veterinary Medicine, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: Calf pneumonia apostematosa has increased in recent years and major pathogen was *Arcanobacterium pyogenes* by detecting. The purpose of this study is to develop a PCR method for *Arcanobacterium pyogenes* diagnosis. A pair of specific primer was designed and synthesized according to 16S rRNA of *Arcanobacterium pyogenes*. After PCR method was optimized, the specificity and sensitivity was assayed. The specific DNA fragment (927 bp) was successfully amplified with the following condition: 0.2 $\mu\text{mol/L}$ optimal concentration of primer, 58°C anneal temperature and 1.5 mmol/L Mg^{2+} concentration. The specific test results showed that *Arcanobacterium pyogenes* could be amplified to obtain 927 bp, however the amplified results of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus proteus* were negative. The results of sensitivity test indicated that the minimum detection limits of PCR were 42 *Arcanobacterium pyogenes*. The PCR diagnosis method of bovine *Arcanobacterium pyogenes* was successfully established and this method has high specificity and sensitivity. This research provides new means for the rapid diagnosis of the bovine purulent pneumonia and epidemiological in-

* 通讯作者: Tel: 86-459-6819200-8010; ✉: zhoyulong1980@163.com
收稿日期: 2010-03-22; 接受日期: 2010-06-17

vestigations.

Keywords: *Arcanobacterium pyogenes*, 16S rRNA, PCR, Diagnostic method

化脓隐秘杆菌(*Arcanobacterium pyogenes*, *A. pyogenes*)是一种多形性、无运动性的革兰氏阳性杆菌,曾经被认为是化脓棒状杆菌,而后被分类到放线菌属。Ramos 根据 16S rRNA 基因进行系统进化分析后将其重新分类到隐秘杆菌属^[1-2]。*A. pyogenes* 是牛呼吸道综合症(Bovine respiratory disease complex, BRDC)的主要细菌性病原体之一, BRDC 是引起世界范围内的舍饲牛发病和死亡的主要原因^[3]。*A. pyogenes* 是寄生在家畜上呼吸道、胃肠道和生殖道内的正常菌群,是一种重要的条件性致病菌,能引起猪、牛、羊、禽等多种动物及人类多种组织和器官的化脓性感染,如肺炎、乳房炎、子宫内膜炎、关节炎、外耳炎、膀胱炎及肝脏、肾脏脓肿等,给畜牧业的发展带来了严重的影响^[4]。

目前,对 *A. pyogenes* 的检测主要采用细菌分离培养,该菌生长速度慢,需要 48 h 才能长出菌落,再通过系列的生化试验进行鉴定,费时费力,延误治疗时机,造成严重的经济损失。因此,建立一种灵敏度高、特异性好、快速准确的诊断方法已成为迫切需要。本试验从患有化脓性肺炎的病死牛体内分离获得 *A. pyogenes*, 利用 Oligo 6.0 软件设计了一对特异性引物,通过特异性试验和敏感性试验,建立了一种快速、准确的 PCR 诊断方法,为快速诊断 *A. pyogenes* 病提供了有效的手段。

1 材料

1.1 菌株

牛 *A. pyogenes* 黑龙江分离株 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4、HJ-5、HJ-6、大肠杆菌、葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌、化脓链球菌和变形杆菌为黑龙江八一农垦大学预防兽医学实验室保存。

1.2 培养基

按常规方法制备新鲜的 10% 的绵羊血液营养琼脂培养基;营养琼脂购自北京奥博星生物技术有限公司;脑心浸液培养基(BHI)购自 BD 公司;蛋白胨和酵母抽提物为 Oxoid 公司产品。

1.3 酶和试剂

Taq DNA 聚合酶(MBI)、DL2000 Marker

(TaKaRa); 特异性引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 细菌的培养

脱脂乳中冻存的菌种接种到血液琼脂培养基(含 5% 脱纤维绵羊血),采用烛缸法进行培养, 37°C 培养 36 h。再将活化后的纯培养物接种在含 5% 新生牛血清的 BHI 培养基中, 37°C 振荡培养 24 h, 备用。

2.2 引物

根据 *A. pyogenes* 黑龙江分离株 HJ-1-HJ-6 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号 GU372925-GU372930)应用 Oligo 6.0 软件设计一对特异性引物,目的基因大小为 927 bp,引物序列如下:

P1: 5'-GGGGCTTTTGTGTTTGGTGG-3' (70-90); P2: 5'-TCTCTGGCACATCGCAGTGTAT-3' (975-997)。

2.3 基因组 DNA 的提取

1 mL 菌液以 10000 r/min 的速度离心 5 min, 弃上清,加入 ddH₂O 100 μ L 重悬, 100°C 水浴 10 min, 再以 10000 r/min 的速度离心 10 min, 最后取上清为 DNA 模板,置 -20°C 保存待用。

2.4 16S rRNA 特异性基因的扩增

用设计的引物对实验菌株 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4、HJ-5 和 HJ-6 (6 株菌株基因序列均已上传 NCBI)进行 PCR 扩增。反应体系如下: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 上下游引物各 0.2 μ L, DNA 模板 2 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.125 U, 补水至 25 μ L。反应条件: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 60 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

2.5 PCR 最佳反应条件的确定

最佳引物浓度的确定: 引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 μ mol/L 加样, 反应条件同 2.4。最佳 Mg²⁺ (25 mmol/L) 浓度的确定: 分别为 0.5、1、1.5、2 mmol/L 加样, 反应条件同 2.4。最佳退火温度的确定: 经公式计算退火温度为 57°C; 进行梯度 PCR, 温度梯度为 48°C、50°C、52°C、55°C、57°C、58°C 加样, 反应条件同 2.4, 进行 PCR 扩增。取 PCR 产

物 2 μL 在 1% 的琼脂糖上进行电泳, 应用凝胶成像系统(Gel Doc 2000)观察结果, 根据目的基因条带的电泳亮度, 确定最佳引物浓度、 Mg^{2+} 浓度和退火温度。

2.6 特异性试验

大肠杆菌、葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌、化脓链球菌和变形杆菌基因组 DNA 的提取方法同 2.3, 进行 PCR 反应, 以 HJ-3 为参照菌株。

2.7 敏感性试验

A. pyogenes HJ-3 株, 1 μL 的含菌量为 4.2×10^{10} , 作 10 倍梯度稀释, 每个反应体系加 1 μL 细菌稀释液, 其余条件同上, 进行 PCR 反应, 观察结果。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增

HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4、HJ-5 和 HJ-6 等 6 株 *A. pyogenes* 分离株经 PCR 扩增均出现一条约 927 bp 的目的基因, 与预期大小相符(图 1), 6 株 *A. pyogenes* 分离株 DNA 提取量分别为 3.0–3.6 mg/L。

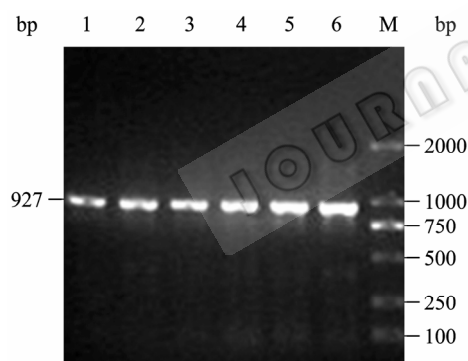


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of the PCR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: HJ-1; 2: HJ-2; 3: HJ-3; 4: HJ-4; 5: HJ-5; 6: HJ-6; 7: Negative control.

3.2 PCR 最佳反应条件

3.2.1 最佳引物浓度的确定: 引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时均扩增出目的基因, 条带亮度均好。根据节约原则, 把 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 作为最佳引物浓度(图 2)。

3.2.2 最佳 Mg^{2+} 浓度的确定: Mg^{2+} 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 时均扩增出目的基因, 其中 1.5 mmol/L 时亮度最好, 把 1.5 mmol/L 作为最佳 Mg^{2+} 浓度(图 3)。

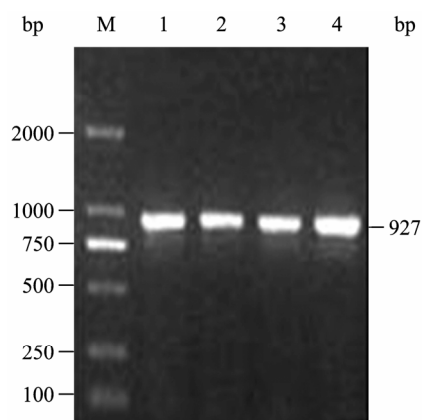


图 2 引物浓度结果

Fig. 2 Primer concentration

Note: M: DL2000 marker; 1: 0.2 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.3 $\mu\text{mol/L}$; 3: 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 4: 0.5 $\mu\text{mol/L}$.

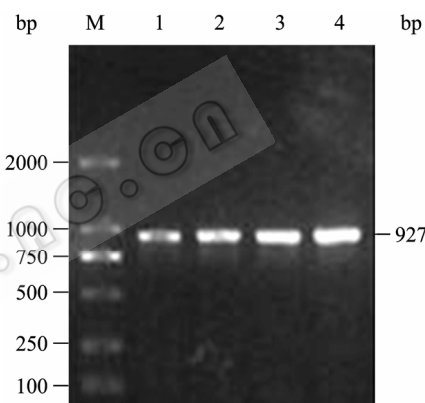


图 3 Mg^{2+} 浓度结果

Fig. 3 Mg^{2+} concentration

Note: M: DL2000 marker; 1: 0.5 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 1.5 mmol/L; 4: 2 mmol/L.

3.2.3 最佳退火温度的确定: 引物设计软件 Oligo 6.0 提供的退火温度为 57°C。温度梯度为 48°C、50°C、52°C、55°C、57°C、58°C 进行梯度 PCR, 均扩增出目的基因, 在 58°C 时亮度最好, 退火温度太低或太高, 都会影响扩增产物量, 因此把 58°C 作为最佳退火温度(图 4)。

3.3 特异性试验

A. pyogenes 与大肠杆菌、葡萄球菌阴性菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌、化脓链球菌和变形杆菌进行 PCR 反应, 只有 *A. pyogenes* 扩增出目的基因, 其他菌株扩增结果均为阴性(图 5)。

3.4 敏感性试验

A. pyogenes 倍比稀释, 进行 PCR 反应, 含菌量为 42 个时仍能扩增出目的基因(图 6)。

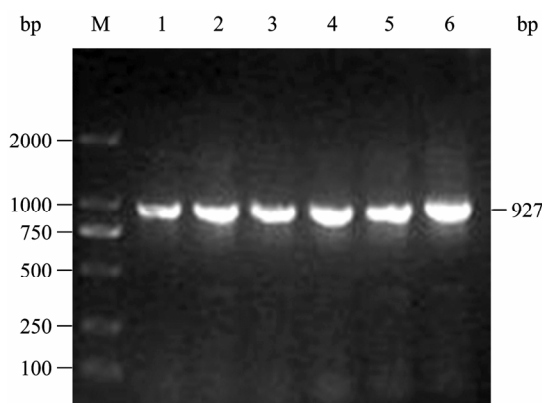


图4 退火温度结果

Fig. 4 Anneal temperature

Note: M: DL2000 marker; 1: 48°C; 2: 50°C; 3: 52°C; 4: 55°C; 5: 57°C; 6: 58°C.

4 小结与讨论

近几年, 在黑龙江省多个牛场爆发过以化脓性肺炎为特征的犊牛群发性病例, 经实验室诊断主要病原菌为 *A. pyogenes*。BRDC 的病因比较复杂, 主要有 3 方面的因素: 环境因素、宿主因素和传染性因素^[5-7]。当环境因素(应激、通风不良、拥挤和其他因素)或者病毒感染后使机体抗感染能力降低时激发细菌感染, 引起严重的下呼吸道疾病^[8-9]。引起 BRDC 的病毒主要包括牛疱疹病毒 1 型、牛呼吸道合胞体病毒、牛副流感病毒 3 型和牛病毒性腹泻病毒, 另外牛冠状病毒、牛腺病毒、牛细小病毒和牛鼻病毒也参与引起 BRDC^[10]。这些病毒引起 BRDC



图5 特异性试验结果

Fig. 5 The result of specificity test

注: M: DL2000 marker; 1: 阴性对照; 2: 隐秘杆菌; 3,4: 沙门氏菌; 5: 大肠杆菌; 6,7: 金黄色葡萄球菌; 8,9: 葡萄球菌; 10: 蜡样芽孢杆菌; 11: 绿脓杆菌; 12: 克雷伯菌; 13: 化脓链球菌; 14: 变形杆菌。

Note: M: DL2000 marker; 1: Negative control; 2: *Arcanobacterium pyogenes*; 3,4: *Salmonella*; 5: *Escherichia coli*; 6,7: *Staphylococcus aureus*; 8,9: *Staphylococcus*; 10: *Bacillus cereus*; 11: *Pseudomonas aeruginosa*; 12: *Klebsiella*; 13: *Pyogenic streptococci*; 14: *Proteus*.

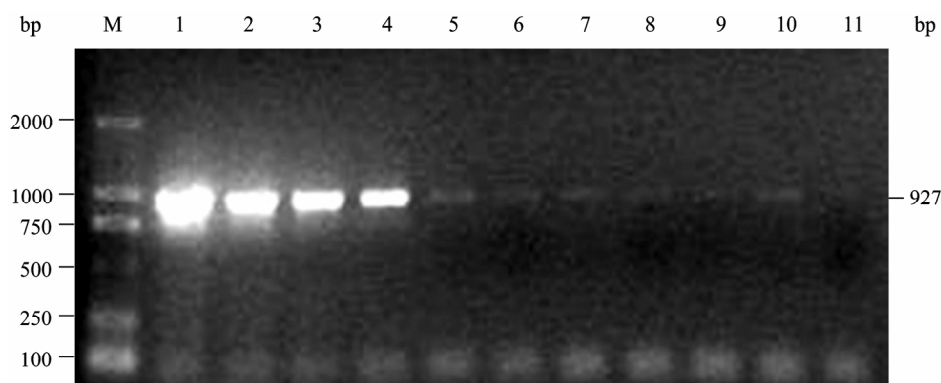


图6 敏感性试验结果

Fig. 6 The result of sensitivity test

Note: M: DL2000 marker; 1: 4.2×10^{10} ; 2: 4.2×10^9 ; 3: 4.2×10^8 ; 4: 4.2×10^7 ; 5: 4.2×10^6 ; 6: 4.2×10^5 ; 7: 4.2×10^4 ; 8: 4.2×10^3 ; 9: 4.2×10^2 ; 10: 4.2×10^1 ; 11: 4.2×10^0 .

时分为单独感染、几种病毒混合感染和细菌病毒混合感染等。Thomson 认为牛呼吸道疾病的细菌性病原仅有溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌,但是随着研究的不断深入,目前的细菌性病原已经增加到了 6 种,包括溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、昏睡嗜血杆菌、牛支原体和 *A. pyogenes*, 以及最近研究证明的 *Bibersteinia trehalosi* (以前名称 *Pasteurella trehalosi*, 海藻糖巴氏杆菌), 这些细菌都寄生在牛的鼻、咽或扁桃体, 由于应激或病毒感染之后大量繁殖, 被吸入肺以后引起肺炎^[11-12]。

目前, 国内关于 *A. pyogenes* 引起的犊牛化脓性肺炎的研究较国外滞后, 病原诊断上主要依据传统的细菌培养, 挑选可疑菌落就有很大的盲目性, 生化鉴定又不稳定, 容易造成误诊。PCR 技术现已广泛应用于微生物检测, 具有简便、快速、敏感性高和特异胜强的优点, 具体表现在该方法不需要严格的细菌培养条件, 对细菌浓度要求也不高。它能大量扩增低拷贝甚至是单拷贝基因序列, 很容易被琼脂糖凝胶电泳检测, 许多有轻微差别疾病的诊断也可通过 PCR 方法在相对短的时间内得出结论。本试验对 *A. pyogenes* 16S rRNA 基因序列进行分析, 设计一对特异性引物, 建立了针对 *A. pyogenes* 的 PCR 检测方法, 最佳引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 最佳 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, 最佳退火温度 58°C。该 PCR 方法特异性较强, 与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、化脓链球菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌和变形杆菌等没有交叉反应, *A. pyogenes* 容易和化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌等引起的化脓性病变相混淆, 给临床鉴别诊断带来较大的困难, 通过该 PCR 方法可以从病原学上进行有效区分。该 PCR 方法敏感性高, 含有 42 个 *A. pyogenes* 仍然可以扩增出目的基因, 应用该 PCR 方法对分离出 *A. pyogenes* 的 10 份病死牛肺脏进行检测结果均能扩增出特异性的目的基因, 两种方法的符合率达到 100%, 对分离出的 *A. pyogenes* 进行鉴定时不需要做基因组的提纯, 可以直接将少量的菌落置双蒸水中混匀, 取 2 μL 即可当作模板, 简便而快速, 明显缩短了该病的确诊时间。

目前, 针对 *A. pyogenes* 病还没有一套有效的检测方法, 本试验建立的 PCR 方法简便、快速、特异

性强、敏感度高, 为 *A. pyogenes* 病的临床诊断提供了可靠的依据, 对该病的预防和控制具有重要的意义。

参考文献

- [1] Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 2006: 7000.
- [2] Ramos CP, Foster G, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1997(47): 46-53.
- [3] Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(2): 145-148.
- [4] Hasan Basri ERTA, Aye KILIC, G  kbe OZBEY, et al. Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from abscessed cattle kidney and identification by PCR. *Turk J VetAnim Sci*, 2005(29): 455-459.
- [5] Snowden GD, Van Vlek LD. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic and economic factors. *J Anim Sci*, 2006(84): 1999-2008.
- [6] Ellis JA. The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2001, 17(3): 535-550.
- [7] Dyer RM. The bovine respiratory disease complex a complex interaction of host, environmental and infectious agents//Infectious Disease in Food Animal Practice. New Jersey: The Compendium Collection, Veterinary Learning Systems, Trenton, 1993: 52-61.
- [8] Lin XQ, Storz J. Antibody responses of cattle with respiratory coronavirus infections during pathogenesis of shipping fever pneumonia are lower with antigens of enteric strains than with those of a respiratory strain. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(5): 1010-1013.
- [9] Thomson RG. The pathogenesis and lesions of pneumonia in cattle//Infectious Disease in Food Animal Practice. New Jersey: The Compendium Collection, Veterinary Learning Systems, Trenton, 1993: 79-86.
- [10] Smith JA, Baker JC, Wikse SE. Lower Respiratory Diseases, Large Animal Internal Disease. 2nd edition. Missouri: Mosby, 1996: 631-650.
- [11] Thomson RG. Pathogenesis of pneumonia in feedlot cattle//Loan RW Bovine Respiratory Disease: A Symposium. College Station, TX: Texas A&M University Press, 1984: 326-346.
- [12] Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(2): 145-148.