

猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌多重实时荧光PCR方法的建立

刘艳艳^{#1}, 吕婷婷^{#1,2}, 吴家强^{1,2}, 刘飞¹, 任素芳¹, 张玉玉¹, 郝小静³, 蒋皓静⁴, 李华², 于江^{*1}

1 山东省农业科学院畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100

2 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014

3 青岛市畜牧工作站(青岛市畜牧兽医研究所), 山东 青岛 266100

4 青岛蔚蓝生物股份有限公司, 山东 青岛 266114

刘艳艳, 吕婷婷, 吴家强, 刘飞, 任素芳, 张玉玉, 郝小静, 蒋皓静, 李华, 于江. 猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌多重实时荧光PCR方法的建立[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5112-5125

Liu Yanyan, Lü Tingting, Wu Jiaqiang, Liu Fei, Ren Sufang, Zhang Yuyu, Hao Xiaojing, Jiang Haojing, Li Hua, Yu Jiang. Establishment of a multiplex real-time fluorescent PCR method for simultaneous detection of *Streptococcus suis* and *Pasteurella multocida*[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5112-5125

摘要: 【背景】猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)和猪多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)都是能引起宿主致病的人畜共患病原菌, 常出现混合感染, 临床诊断上易与猪瘟、猪丹毒等混淆。【目的】快速、有效鉴别猪链球菌病和猪多杀性巴氏杆菌病, 建立一种能同时检测2种病原的多重实时荧光定量PCR检测方法。【方法】基于猪链球菌的 *gdh* 基因和猪多杀性巴氏杆菌的 *plpE* 基因, 设计2对特异引物及 *TaqMan* 探针, 以细菌16S rRNA基因设计通用引物及探针, 通过对反应条件优化, 建立了一种能同时检测猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌的多重实时荧光定量PCR检测方法。【结果】该方法能够特异性地检测猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌, 与细菌分离后的测序结

基金项目: 国家自然科学基金(32202827); 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2022A17, CXGC2022E10); 山东省生猪产业技术体系(SDAIT-08-01); 山东省农业重大技术协同推广计划(SDNYXTTG-2022-02); 山东省重点研发计划(2022TZXD0041); 国家级高层次人才工程项目(W03020496); 泰山学者工程

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32202827); Agricultural Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2022A17, CXGC2022E10); Shandong Province Pig Industrial Technology System (SDAIT-08-01); Major Agricultural Technologies Cooperative Promotion Project of Shandong Province (SDNYXTTG-2022-02); Key Research and Development Project of Shandong Province (2022TZXD0041); National Talent Engineering Project (W03020496); Taishan Scholars Program

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: xmskyb@shandong.cn

Received: 2022-07-09; Accepted: 2022-11-08; Published online: 2022-11-17

果验证完全一致。此方法对重组质粒标准品的最低检出浓度分别为 4.53×10^2 copies/ μL 和 3.97×10^2 copies/ μL 。重复性试验结果显示, 该方法的组内和组间变异系数均小于 3%。【结论】本实验所建立的方法准确、简便、可靠, 能够用于 2 种病原菌的同时检测, 为猪链球菌病和猪多杀性巴氏杆菌病的防治提供了有效的检测工具, 具有重要的流行病学意义和临床应用价值。

关键词: 猪链球菌(SS); 猪多杀性巴氏杆菌(Pm); 多重实时荧光定量 PCR

Establishment of a multiplex real-time fluorescent PCR method for simultaneous detection of *Streptococcus suis* and *Pasteurella multocida*

LIU Yanyan^{#1}, LÜ Tingting^{#1,2}, WU Jiaqiang^{1,2}, LIU Fei¹, REN Sufang¹, ZHANG Yuyu¹, HAO Xiaojing³, JIANG Haojing⁴, LI Hua², YU Jiang^{*1}

1 Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China

2 College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China

3 Qingdao Animal Husbandry Workstation (Qingdao Animal Husbandry and Veterinary Research Institute), Qingdao 266100, Shandong, China

4 Qingdao Vland Biotech Limited Company, Qingdao 266114, Shandong, China

Abstract: [Background] *Streptococcus suis* (SS) and *Pasteurella multocida* (Pm) are zoonotic pathogens that can cause severe diseases in humans, which are easily confused with swine fever and swine erysipelas in clinical diagnosis because of mixed infections. [Objective] To establish a multiplex real-time fluorescent quantitative PCR assay for simultaneous detection of SS and Pm, so as to realize early diagnosis and treatment. [Methods] Two pairs of specific primers and *TaqMan* were designed based on the *gdh* gene of SS and the *plpE* gene of Pm. The universal primers and probe were designed based on the sequence of bacterial 16S rRNA gene. After optimization of the reaction conditions, a multiplex real-time fluorescence quantitative PCR method was established for the simultaneous detection of SS and Pm. [Results] This method can specifically detect SS and Pm, and the results was entirely consistent with the sequencing results after isolation of bacteria. The lower limits of detection for recombinant plasmid standards were 4.53×10^2 copies/ μL and 3.97×10^2 copies/ μL , respectively. The results of repeated experiments showed that the intra- and inter-group coefficients of variation were less than 3%. [Conclusion] The method established in this study was simple, accurate, and reliable. It can be used for the simultaneous detection of SS and Pm and provides an effective detection tool for the prevention and treatment of the diseases caused by SS and Pm.

Keywords: *Streptococcus suis*; *Pasteurella multocida*; multiplex real-time fluorescence quantitative PCR

猪链球菌(swine *Streptococcus suis*, SS)病是由多种不同血清型的链球菌引起的一种以脑膜炎、关节炎、心内膜炎为主要临床症状的急性的

人畜共患传染病^[1], 具有暴发猛烈、传播迅速的特点, 当病猪感染猪链球菌时体温能够骤然升高到 41 °C 以上, 几乎看不到典型的症状, 严重者

几小时内死亡^[2]。猪链球菌病是一种重要的人畜共患病,我国规定为三类动物疫病,猪链球菌病不仅给世界养猪业造成巨大的经济损失,同时还严重危害公共卫生安全^[3]。由于该病症状较为复杂,临床诊断易与猪瘟、猪丹毒、副伤寒混淆,一般根据病理变化结合临床资料只可作为初步诊断,确诊还需实验室诊断。

猪多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)是一种能引起猪、牛、羊、鸡、鸭、兔等多个宿主致病的革兰阴性的人畜共患性病原菌,能导致多种动物及人类感染发病^[4]。猪多杀性巴氏杆菌通常存在于猪的鼻腔、扁桃体、肺等部位,可导致猪肺疫和猪传染性萎缩性鼻炎等疾病,其中猪肺疫是一种非常急性的败血性传染病,主要病征为器官、组织的出血性炎症;猪传染性萎缩性鼻炎是由猪多杀性巴氏杆菌引起的一种慢性呼吸道传染病,临床症状表现为打喷嚏、流鼻血、生长迟滞,2种疾病均可引起猪群发病致死^[5]。猪多杀性巴氏杆菌在世界各国广泛流行,发病一般不受季节性干扰,以散发性、地方性为主要流行特点,对世界养猪业造成重大经济损失^[5]。

建立针对猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌快速检测的方法是成功防治这2种疾病的关键。鉴于SS和Pm均为猪呼吸道疾病综合征的常见重要病原体且往往为混合感染^[6],传统的诊断技术如细菌分离、免疫学试验等费时费力,不适于临床快速诊断,也不适于大规模的流行病学调查。因此,对这两种病原体引起的呼吸道疾病进行鉴别诊断显得尤为重要。当前,随着分子生物技术的快速发展,针对病原微生物的诊断建立了很多检测方法,包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术、核酸探针杂交技术等,但这些方法在某些方面存在着不足,如操作复杂、费时费力、开盖易造成产物污染、出现假阴性与假阳性结果导致准确率不高^[7]等。目前

实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)被公认是PCR诊断技术的一次质的飞跃,因其具有高敏感性、高特异性且耗时短的特点而广泛应用于实验室或者临床病原体的检测^[8]。当前研究中还未建立以SS和Pm为研究对象的双重荧光PCR检测方法,所以本研究对SS、Pm分别基于基因*gdh*和*plpE*设计引物及探针,建立三重实时荧光PCR检测方法,以期能够快速检测SS、Pm,为兽医临床诊断和流行调查等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

临床样本来自山东省寿光、烟台等不同地区养猪场的病死猪肺脏、扁桃体等组织。参考菌株猪链球菌2型、3型、7型、9型(SS2、SS3、SS7、SS9)、猪多杀性巴氏杆菌A型、D型、猪肺炎支原体、猪丹毒、副猪嗜血杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、大肠杆菌、化脓杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、副鸡禽杆菌、凝结芽孢杆菌、罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、卡氏杆菌和尿肠球菌均由山东省农科院畜牧兽医研究所保存。

动物组织提取试剂盒, Qiagen公司; 细菌DNA提取试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物与探针, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×qPCR Master Mix, DBI Bioscience公司; DNA测序由山东省农业科学院生物技术中心测序中心完成。

荧光定量PCR仪, ABI公司; PCR仪, 宝生物工程(大连)有限公司; 高速离心机, Eppendorf有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

采用细菌DNA提取试剂盒提取, 具体操作步骤见试剂盒说明书。提取的基因组DNA经紫

外分光光度计测定其纯度和浓度。测定 OD_{260}/OD_{280} 值均为 1.8–1.9 左右, 浓度在 10 ng/ μ L 以上, 说明 DNA 纯度较高, 浓度适中, 符合 PCR 扩增要求。

1.2.2 引物与探针设计及靶基因的获得

根据 GenBank 中登录的猪链球菌(SS) *gdh* 基因(FJ572237)和猪多杀性巴氏杆菌(Pm) *plpE* 基因(EF219455)为靶基因, 利用 Primer 3.0 软件设计引物及特异性 *TaqMan* 探针, 利用细菌 16S rRNA 基因设计通用引物及通用探针, 设计的引物及探针的核苷酸序列见表 1, 引物探针序列由上海捷瑞生物科技有限公司合成。

1.2.3 单重荧光 PCR 体系的建立

反应体系采用 20 μ L, 2 \times qPCR Master Mix 10 μ L, 对引物的浓度、探针浓度及退火温度进行筛选, 以确定最佳浓度和最佳退火温度。引物对浓度为 10 μ mol/L, 分别取 0.25、0.5、1 和 2 μ L,

探针 5 μ mol/L 取 0.5 μ L 进行梯度实验; 引物对浓度为 10 μ mol/L 取 0.5 μ L, 探针 5 μ mol/L 分别取 0.2、0.4、0.8 和 1 μ L 进行梯度实验; 退火温度 56、58、60、62、64、66、68 $^{\circ}$ C 按梯度进行扩增, 每次试验采取等量的模板, 根据 C_t 值、荧光信号和平台期等因素作为参考, 每个样品重复 3 次, 若结果稳定可确定为最佳的浓度和退火温度。

1.2.4 多重荧光 PCR 体系的建立

在 1.2.3 单重荧光 PCR 优化好的 PCR 反应条件和最佳引物浓度、最佳探针浓度的基础上进行组合调整, 以 C_t 值及荧光增量为考察依据, 进一步优化引物浓度、探针浓度, 使探针 Suis-*gdh* QP、PM-QP 及通用探针 16SP 荧光增量基本一致, C_t 值在 18–25 之间最佳。

1.2.5 标准品制作

猪链球菌基因组-标准品制备: 初始浓度为 20 ng/ μ L, 猪链球菌基因组大小为 2.007 Mb,

表 1 引物及探针的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers and probes

引物名称 Primer name	引物与探针序列 Primer and probe sequence (5'→3')	片段长度 Product size (bp)
猪链球菌特异上游引物 Suis- <i>gdh</i> QF Specific upstream primers of <i>Streptococcus suis</i> Suis- <i>gdh</i> QF	CCTCCGCCAGTTTGATGC	136
猪链球菌特异下游引物 Suis- <i>gdh</i> QR Specific downstream primers of <i>Streptococcus suis</i> Suis- <i>gdh</i> QR	GAAGGATTACCGTTTGCTGC	
猪链球菌的特异探针 Suis- <i>gdh</i> QP Specific probe of <i>Streptococcus suis</i> Suis- <i>gdh</i> QP	TAMRA-TCATTGATCCGCCAGCAAGCA-BHQ2	
猪多杀性巴氏杆菌特异上游引物 PM QF Specific upstream primers of <i>Pasteurella multocida</i> PM QF	TAGTTGCATGTAGCGGTGGT	184
猪多杀性巴氏杆菌特异下游引物 PM QR Specific downstream primers of <i>Pasteurella multocida</i> PM QR	AGGGGCTTGAAAGGAGGA	
猪多杀性巴氏杆菌的特异探针 PM QP Specific probe of <i>Pasteurella multocida</i> PM QP	JOE-CGCTGGAAATCGTGCTGACC-BHQ2	
细菌通用上游引物 16SF Universal upstream primers of bacteria 16SF	CGTATTACCGCGGCTGCTGG	220
细菌通用下游引物 16SR Universal downstream primers of bacteria 16SR	GATTAGATACCCTGGTAGTCC	
细菌通用探针 16SP Universal probe of bacteria 16SP	CY5-CCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTT-BHQ2	

copy 数 $= (6.02 \times 10^{23}) \times (30 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (2.007 \times 10^6 \times 660) = 1.36 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$; 猪多杀性巴氏杆菌-标准品制备: 初始浓度为 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 猪多杀性巴氏杆菌基因组大小为 2.3 Mb , copy 数 $= (6.02 \times 10^{23}) \times (30 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (2.3 \times 10^6 \times 660) = 1.19 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$; 将猪链球菌、猪多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 分别从 $1.36 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 和 $1.19 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 按 10 倍比逐级稀释 5 个梯度, 即 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 数量级拷贝数。以 5 个梯度标准品为模板进行实时荧光定量 PCR 检测, 生成标准曲线, 同时对待检样本进行精确定量。

1.2.6 多重荧光 PCR 特异性试验

为了进一步验证本试验建立的双重 PCR 和多重 PCR 的特异性, 分别以 2 种目的菌株猪链球菌(SS2、SS3、SS7、SS9)和猪多杀性巴氏杆菌 A 型、D 型、猪丹毒、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、大肠杆菌、化脓杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、副鸡禽杆菌、凝结芽孢杆菌、罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、卡氏杆菌、屎肠球菌细菌总基因组 DNA 为模板进行实时荧光 PCR 检测, 验证其引物和探针的特异性。

1.2.7 多重荧光 PCR 敏感性试验

将猪链球菌(SS) 2 型、猪多杀性巴氏杆菌(Pm) D 型的基因组 DNA 分别定量到 $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 按 10 倍比梯度稀释, 每个梯度均取 $2.0 \mu\text{L}$ 为模板量(即: 10 、 1 、 0.1 、 0.01 、 0.001 、 0.0001 、 0.00001 ng), 利用优化好的多重 RT-qPCR 体系进行检测。PCR 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 35 s, 在此收集荧光信号, 40 个循环, 确定该方法的最低检出浓度。

1.2.8 重复性试验

将猪链球菌 2 型基因组和猪多杀性巴氏杆菌 D 型基因组标准品 10 倍比稀释后, 选取

10^3 – $10^5 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 为模板, 每个稀释度做 3 次重复, 验证组内重复性。以相同条件将实验连续重复 3 次, 验证组间重复性。评估荧光定量 PCR 检测方法的重复性。

1.2.9 样本检测

采用所建立的同时针对猪链球菌(SS2)和猪多杀性巴氏杆菌 D 型的多重实时荧光 PCR 检测方法对 22 份临床可疑样本进行检测, 样本类型包括山东省寿光、烟台等地区的病料猪肺脏、扁桃体等组织, 同时使用细菌 16S rRNA 基因鉴定进行对比, 并计算二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 体系的建立

利用矩阵法优化后建立三重荧光定量 PCR 体系: $2 \times \text{TaqMan}$ Master Mix $10 \mu\text{L}$, Suis-gdh QF、Suis-gdh QR、PM QF、PM QR、16SF 和 16SR 终浓度分别为 $0.250 \mu\text{mol}/\text{L}$, Suis-gdh QP、PM QP 和 16SP 终浓度为 $0.125 \mu\text{mol}/\text{L}$, DNA 模板 ($10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $2 \mu\text{L}$, 双蒸水补足到 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 35 s, 在此收集荧光信号, 反应 40 个循环。

2.2 特异性验证结果

分别以 2 种目的菌株、不同血清型的猪链球菌(SS2、SS3、SS7、SS9)和猪多杀性巴氏杆菌 A 型、D 型、猪肺炎支原体、猪丹毒、副猪嗜血杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、大肠杆菌、化脓杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、副鸡禽杆菌、凝结芽孢杆菌、罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、卡氏杆菌、屎肠球菌细菌总基因组 DNA 为模板, 进行实时荧光 PCR 检测, 验证其引物和探针的特异性。其结果见表 2 及图 1–6, 结果表明, 本研究所设计的探针及引物具有很强的特异性, 能同时鉴定猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌, 但不能够区分 2 种目的菌株的血清型。

表 2 特异性验证试验

Table 2 Specificity verification test

菌种 Bacteria species	荧光定量 PCR 检测 C_t 值 Detection of C_t value by fluorescence quantitative PCR			结果 Result
	猪链球菌探针 <i>Streptococcus suis</i> probe Suis-gdh QP (TAMRA)	猪多杀性巴氏杆菌探针 <i>Pasteurella multocida</i> probe PM QP (JOE)	通用探针 Universal probe 16SP (CY5)	
	猪链球菌 2 型 <i>Streptococcus suis</i> serotype 2	10.58±0.36	N	
猪链球菌 3 型 <i>Streptococcus suis</i> serotype 3	11.32±0.19	N	15.32±0.23	猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>
猪链球菌 7 型 <i>Streptococcus suis</i> serotype 7	11.13±0.12	N	15.67±0.07	猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>
猪链球菌 9 型 <i>Streptococcus suis</i> serotype 9	10.67±0.32	N	14.97±0.12	猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>
猪多杀性巴氏杆菌 A 型 <i>Pasteurella multocida</i> type A	N	15.63±0.23	15.12±0.07	猪多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>
猪多杀性巴氏杆菌 D 型 <i>Pasteurella multocida</i> type D	N	14.93±0.14	14.92±0.33	猪多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>
副猪嗜血杆菌 <i>Haemophilus parasuis</i>	N	N	15.11±0.36	其他物种 Other species
猪胸膜肺炎放线杆菌 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	N	N	14.94±0.05	其他物种 Other species
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	N	N	15.33±0.36	其他物种 Other species
化脓隐秘杆菌 <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	N	N	15.04±0.07	其他物种 Other species
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	N	N	15.00±0.13	其他物种 Other species
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	N	N	15.68±0.21	其他物种 Other species
副鸡禽杆菌 <i>Avibacterium paragallinarum</i>	N	N	15.46±0.09	其他物种 Other species
凝结芽孢杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>	N	N	15.19±0.34	其他物种 Other species
罗伊氏乳杆菌 <i>Lactobacillus reuteri</i>	N	N	15.25±0.24	其他物种 Other species
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	N	N	15.10±0.13	其他物种 Other species
卡氏变形杆菌 <i>Proteus cibarius</i>	N	N	21.17±0.17	其他物种 Other species
屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	N	N	15.50±0.06	其他物种 Other species
猪肺炎支原体 <i>Mycoplasma</i>	N	N	15.41±0.27	其他物种 Other species
猪丹毒杆菌 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	N	N	15.29±0.14	其他物种 Other species

注: N: 该基因 PCR 结果为阴性

Note: N: PCR result of the gene is positive.

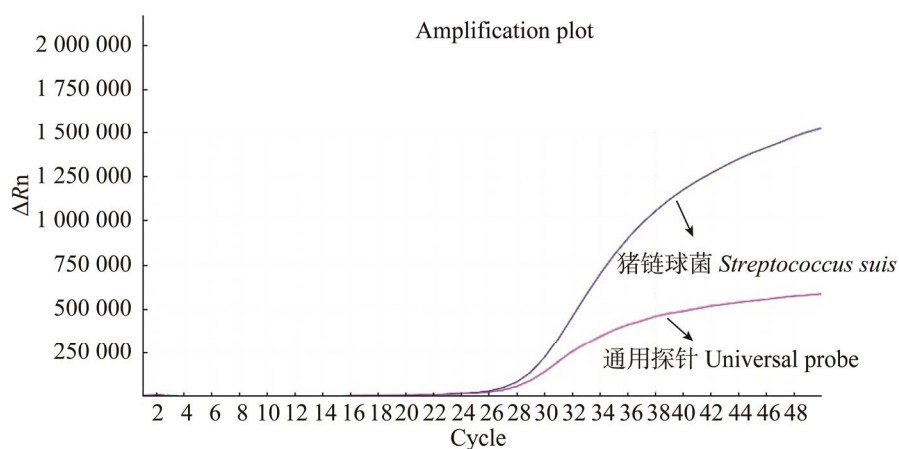


图 1 猪链球菌扩增曲线

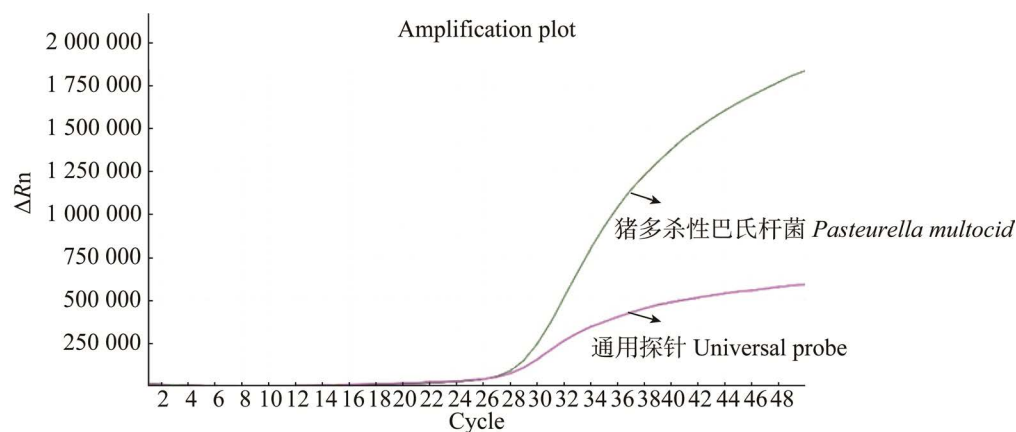
Figure 1 Amplification curve of *Streptococcus suis*.

图 2 猪多杀性巴氏杆菌扩增曲线

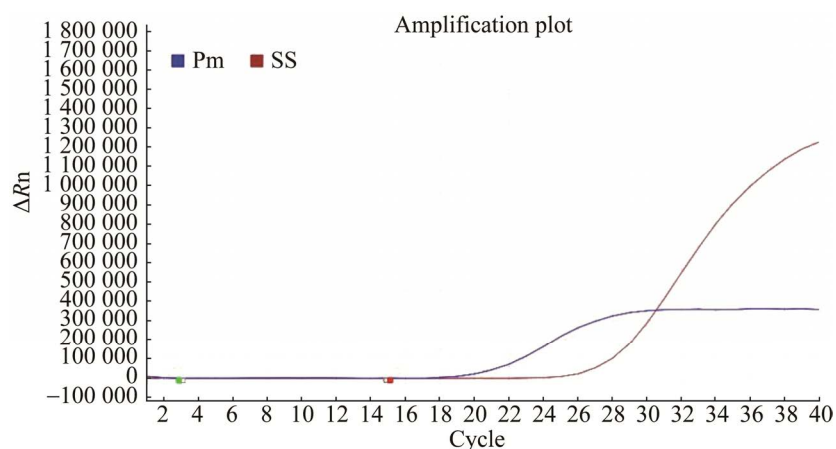
Figure 2 Amplification curve of *Pasteurella multocida*.

图 3 猪链球菌、猪多杀性巴氏杆菌双重荧光扩增曲线

Figure 3 Double fluorescence amplification curve of *Streptococcus suis* (SS) and *Pasteurella multocida* (Pm).

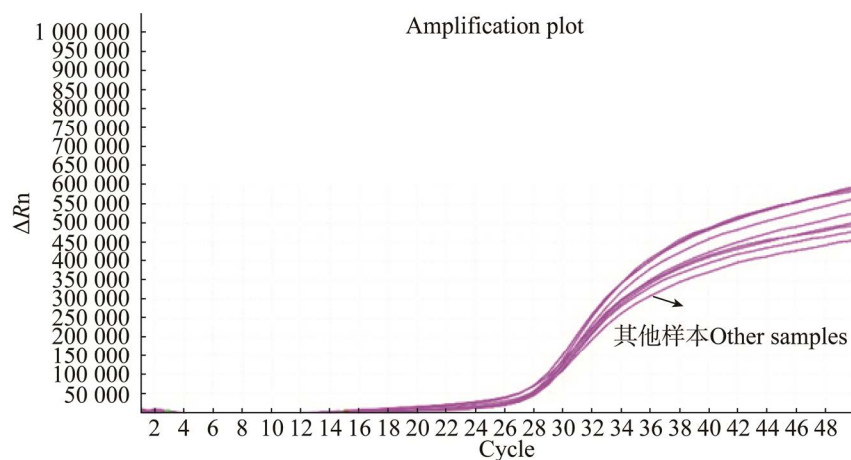


图 4 其他样本扩增曲线

Figure 4 Amplification curve of other samples.

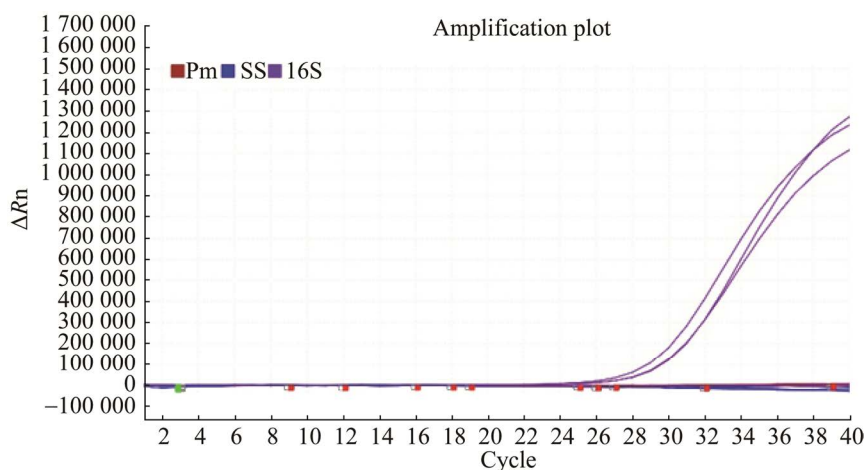


图 5 猪肺炎支原体、猪丹毒扩增曲线

Figure 5 Amplification curve of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

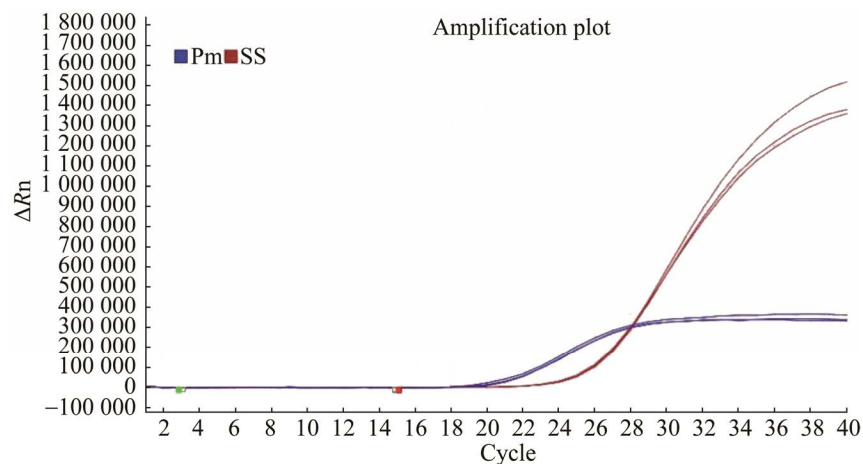


图 6 不同血清型猪链球菌、猪多杀性巴氏杆菌扩增曲线

Figure 6 Amplification curves of different serotypes of *Streptococcus suis* and *Pasteurella multocida*.

2.3 标准曲线的建立

将猪链球菌、猪多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 分别从 1.36×10^7 copies/ μL 和 1.19×10^7 copies/ μL 按 10 倍倍比逐级稀释 5 个梯度作为荧光定量模板, 获得标准曲线, 同时以超纯水作为阴性对照。以 C_t 值为纵坐标、标准品浓度为横坐标绘制标准曲线。猪多杀性巴氏杆菌标准曲线见图 7, 通过方程 $y = -3.547x + 21.167$ [相关系数(R^2)为 0.997, 扩增效率(Eff%)为 91.38] 计算待检样本猪多杀性巴氏杆菌的浓度或拷贝数; 猪链球菌标准曲线图见图 8, 通过方程 $y = -3.971x + 25.296$ [相关系数(R^2)为 0.990, 扩增效率(Eff%)为 90.30] 计算待检样本猪链球菌的浓度或拷

贝数。

2.4 敏感性试验结果

将猪链球菌(SS)、猪多杀性巴氏杆菌(Pm)的基因组 DNA 分别定量到 5 ng/ μL , 按 10 倍倍比梯度稀释, 每个梯度均取 2.0 μL 为模板量(即: 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 ng)进行实时荧光定量 PCR 检测, 评估本方法的检测限。如图 9、10 所示, 猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌灵敏度均为 0.001 ng, 结果表明本方法定量的检测限为 0.001 ng, 换算为猪链球菌、猪多杀性巴氏杆菌分别为 4.53×10^2 copies/ μL 和 3.97×10^2 copies/ μL , 说明本方法具有较高的灵敏度, 相较于普通 PCR 灵敏度更高。

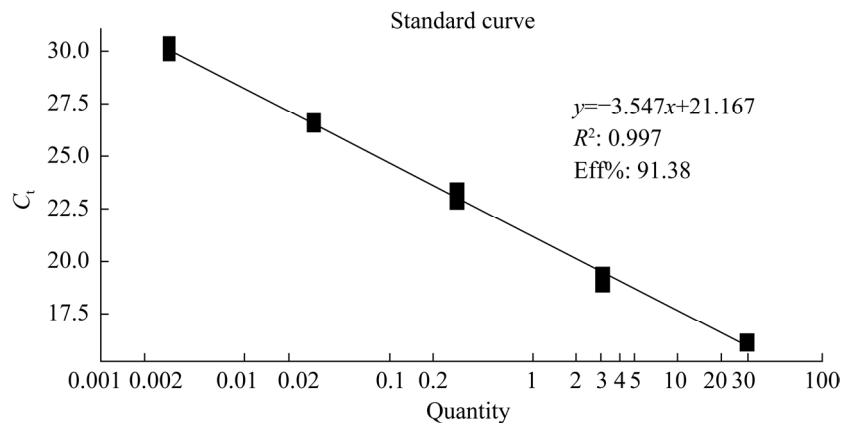


图 7 猪多杀性巴氏杆菌标准曲线图

Figure 7 Standard curve of *Pasteurella multocida*.

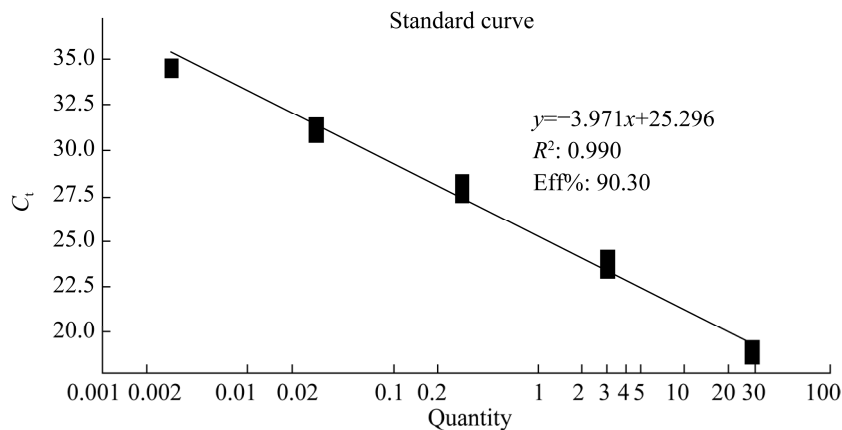


图 8 猪链球菌标准曲线图

Figure 8 Standard curve of *Streptococcus suis*.

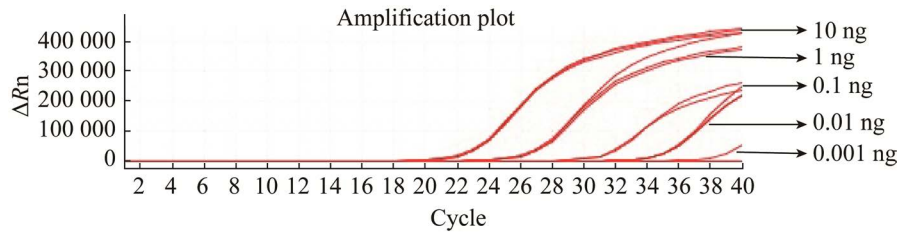


图 9 猪链球菌灵敏度

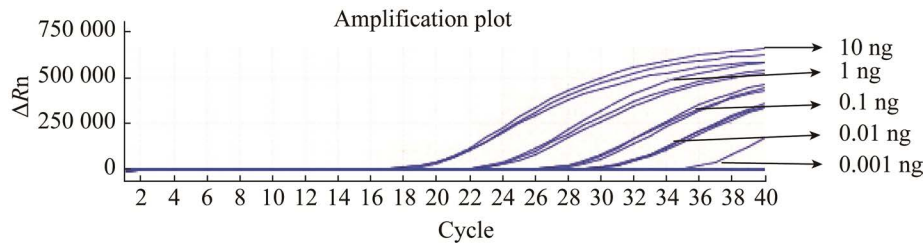
Figure 9 Sensitivity of *Streptococcus suis*.

图 10 猪多杀性巴氏杆菌灵敏度

Figure 10 Sensitivity of *Pasteurella multocida*.

2.5 重复性试验结果

选取浓度为 10^3 – 10^5 copies/ μ L 的基因组为模板进行多重荧光定量 PCR 检测, 分别做组内和组间重复性试验, 结果扩增 C_t 值的变异系数均小于 2.5% (表 3), 表明该方法稳定性及重复性良好。

2.6 样本检测结果

分别采用细菌分离鉴定、已报道的猪链球菌单重荧光定量 PCR 方法^[3]及猪多杀性巴氏杆菌的单重荧光定量 PCR 方法^[9]和多重荧光定量 PCR 方法对 22 份来自山东省寿光、烟台等不同

地区的病死猪肺脏、扁桃体等临床可疑样本进行检测, 经过结果比对发现, 22 份临床可疑样本中, 有一份样品多重荧光定量 PCR 检测结果为猪链球菌阳性, 结果与猪链球菌单重 PCR 检测结果一致, 但 C_t 值低于单重 PCR 检测结果, 而细菌分离培养未见猪链球菌单克隆; 另一份样品多重荧光定量 PCR 检测结果为猪多杀性巴氏杆菌阳性, 结果与猪多杀性巴氏杆菌单重 PCR 检测和细菌分离鉴定结果一致, C_t 值也低于单重 PCR 检测结果 (表 4、表 5)。该结果显示, 本研究

表 3 三重荧光定量 PCR 的重复性检测结果

Table 3 Reproducibility of triple fluorescence quantitative PCR

基因 Gene	稀释倍数 Dilutions	批内重复性 Intra-assay (C_t value)		批间重复性 Inter-assay (C_t value)	
		平均数 $\bar{X} \pm SD$	变异系数	平均数 $\bar{X} \pm SD$	变异系数
		Average $\bar{X} \pm SD$	Coefficient of variation (CV, %)	Average $\bar{X} \pm SD$	Coefficient of variation (CV, %)
<i>Gdh</i>	10^5	20.15±0.23	1.5	20.20±0.19	1.3
	10^4	23.27±0.18	1.1	23.46±0.17	0.9
	10^3	27.18±0.32	1.7	26.87±0.21	1.4
<i>PlpE</i>	10^5	19.35±0.15	0.8	19.63±0.25	1.6
	10^4	22.60±0.11	0.7	22.89±0.34	1.9
	10^3	25.34±0.16	1.1	25.66±0.45	2.1
16S rRNA	10^5	19.22±0.05	0.3	19.43±0.14	1.1
	10^4	22.36±0.12	0.9	22.68±0.05	0.4
	10^3	25.98±0.18	1.0	26.02±0.19	1.8

表 4 多重荧光定量 PCR 临床可疑样本检测结果

Table 4 Detection results of clinical suspicious samples by triple fluorescence quantitative PCR

样本名称 Samples name	猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>	猪多杀性 巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	单重荧光定量 PCR 检测 C _t 值 Detection of C _t value by single fluorescence quantitative PCR		多重荧光定量 PCR 检测 C _t 值 Detection of C _t value by multiple fluorescence quantitative PCR			拷贝数 Copies
			猪链球菌 探针 <i>Streptococcus suis</i> probe SS-probe (FAM)	猪多杀性巴 氏杆菌探针 <i>Pasteurella multocida</i> probe Kmt1-probe (FAM)	猪链球菌 探针 <i>Streptococcus suis</i> probe Suis-gdh QP (TAMRA)	猪多杀性巴 氏杆菌探针 <i>Pasteurella multocida</i> probe PM QP (JOE)	通用探针 Universal probe 16SP (CY5)	
阳性对照 Positive control	+	-	23.83±0.27	N	20.31±0.38	N	18.84±0.31	1.80×10 ⁵
阳性对照 Positive control	-	+	N	21.76±0.18	N	18.91±0.15	17.42±0.26	1.27×10 ⁶
新 1 (血) Xin 1 (blood)	-	-	N	N	N	N	21.45±0.28	
新 2 (血) Xin 2 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.13±0.35	
小 (血) Xiao (blood)	-	-	N	N	N	N	25.32±0.08	
大 (血) Da (blood)	-	-	N	N	N	N	24.78±0.18	
青 x (血) Qing x (blood)	-	-	24.46±0.39	N	21.45±0.27	N	25.54±0.36	5.96×10 ⁴
寿 1 (血) Shou 1 (blood)	-	-	N	N	N	N	24.60±0.25	
寿 2 (血) Shou 2 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.58±0.09	
寿 3 (血) Shou 3 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.16±0.04	
烟 3 (血) Yan 3 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.24±0.20	
烟 4-1 (血) Yan 4-1 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.75±0.37	
烟 4-2 (血) Yan 4-2 (blood)	-	-	N	N	N	N	25.60±0.17	
烟 4-3 (血) Yan 4-3 (blood)	-	-	N	N	N	N	26.25±0.27	
胎儿 Pig foetuses	-	-	N	N	N	N	24.94±0.09	
肠 Pig intestines	-	-	N	N	N	N	25.52±0.35	
青 (病料) Qing (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	26.93±0.25	
青 4 (病料) Qing 4 (tissues and organs)	-	+	N	19.48±0.34	N	17.56±0.22	25.38±0.06	6.68×10 ⁶
青 5 (病料) Qing 5 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	24.82±0.09	
寿 1 (病料) Shou 1 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	25.18±0.42	
寿 2 (病料) Shou 2 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	25.01±0.36	
寿 3 (病料) Shou 3 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	24.41±0.18	
烟 1 (病料) Yan 1 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	23.93±0.29	
烟 2 (病料) Yan 2 (tissues and organs)	-	-	N	N	N	N	20.14±0.34	

注: +: 该病料细菌分离检测结果为阳性; -: 该病料细菌分离检测结果为阴性; N: 表示该基因 PCR 检测结果为阴性

Note: +: The result of bacterial isolation and detection of the disease material was positive; -: The result of bacterial isolation and detection of the disease material was negative; N: PCR result of the gene is positive.

表 5 细菌分离、单重荧光 PCR 与多重荧光定量 PCR 临床可疑样本比对符合情况

Table 5 Bacterial isolation and comparison of clinical suspicious samples between single fluorescent PCR and multiple fluorescent quantitative PCR

检测方法 Methods	阳性病例 Positive cases (pcs)		符合率 Coincidence rate (%)
	猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>	猪多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	
	细菌分离 Bacteria isolation	0	
单重荧光定量 PCR Single fluorescence quantitative PCR	1	1	100

所建立的方法与细菌分离的结果符合率达到 95.45%，与猪链球菌单重荧光定量 PCR 方法符合率达到 100%，与猪多杀性巴氏杆菌的单重荧光定量 PCR 方法符合率达到 100%，说明该方法具有较强的准确性和灵敏性。

3 讨论与结论

猪链球菌危害严重，是一种条件性致病菌，亚临床的病原携带者是猪链球菌的主要传染源^[10]。该病原对我国的食品生产安全、畜牧业生产安全及相关从业人员存在着巨大的威胁。因此，增加猪链球菌的检测力度，对临床和生产方面防控猪链球菌病有着重要的意义。猪多杀性巴氏杆菌是巴氏杆菌属的主要代表菌，可引起猪的萎缩性鼻炎和出血性败血症等多种疾病^[11]。目前，随着集约化程度的不断升高，由 Pm 引起的多种疾病在我国许多地区有不同程度的发生和流行，对养猪业的危害日趋严重，因此，有效预防和控制 Pm 的发生和传播对于我国养殖业的发展具有重要意义。临床上 Pm 易与猪链球菌、胸膜肺炎放线菌、猪繁殖与呼吸综合征病毒等混合感染或继发感染，导致猪群发病率和死亡率明显上升，严重制约全球生猪养殖业的健康发展^[12-14]。由于养殖场在发病后多使用大量抗生素，导致细菌分离培养困难、分离鉴定准确性低，再加上一些细菌对生长条件要求苛

刻，生长缓慢，给疾病的诊断带来挑战。鉴于 Pm 和 SS 均是生猪养殖中常见的重要病原体，而且两者往往是混合感染，传统的诊断技术运用最多的是普通 PCR，操作简单、成本较低、但是不能同时检测 2 种病原，不适于临床快速诊断；多重荧光定量 PCR 在临床上检测敏感性和特异性较高，能够大规模检测猪群传染性疾病的患病情况，因此，建立一种准确快速鉴定猪上述 2 种呼吸道常见病原体的方法十分必要^[15]。本研究结合 qPCR 分子生物学技术手段，建立了同时检测两种病原菌的三重荧光定量 PCR 方法。

猪链球菌 *gdh* 基因是新近发现的一个与猪链球菌毒力相关的因子，属于谷氨酸脱氢酶蛋白家族，暴露于菌体的细胞壁上，对细菌致病性研究有重要意义^[16]。猪链球菌不同血清型之间的 *gdh* 基因核苷酸序列高度保守，基因序列的相似性约为 96%–100%，该蛋白抗原可作为检测猪链球菌的重要标志性抗原，可快速准确地检测猪链球菌的感染^[17]，对于该病的流行病学研究具有重要意义。*plpE* 基因存在于所有血清型的 Pm，而且是该菌的特异保守基因，不同血清型 Pm 的 *plpE* 基因序列相似性在 92% 以上，适合于 Pm 病原的检测^[18]。本研究选取 SS 的保守基因 *gdh* 和 Pm 的 *plpE* 基因建立了三重荧光定量 PCR 方法，该方法能够更准确地检测 SS 和 Pm 这 2 种病原菌，实现检测方法的特异性和高效性。

本研究设计细菌通用引物及通用探针,可以有效避免因 PCR 抑制因素而造成假阴性,三重实时荧光 PCR 同时对 2 种细菌加以鉴别。本方法在提供猪链球菌和猪多杀性巴氏杆菌定性检测的同时可以精确定量,并且灵敏度高、重复性好、检测周期短,能在 1.5 h 内完成检测,实现实时监测,具有较好的应用前景,可为病原微生物鉴定和降低养殖经济损失提供科学可靠的方法。

REFERENCES

- [1] 杨春蕾,董志民,李秀丽,燕晓翠,田向学,池晶晶,任卫科,张蕾,鄢明华. 天津地区 2 型猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 822-829
Yang CL, Dong ZM, Li XL, Yan XC, Tian XX, Chi JJ, Ren WK, Zhang L, Yan MH. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Streptococcus suis* serotype 2 in Tianjin[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 822-829 (in Chinese)
- [2] 李成延. 猪链球菌病流行特点及防治方法[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2022(4): 67-69
Li CY. Based on the epidemiological characteristics of *Streptococcus suis* and the analysis of control methods[J]. Graziery Veterinary Sciences (electronic version), 2022(4): 67-69 (in Chinese)
- [3] 雷宇平,王仲兵,杨治平,张仲萍,王治维,胡明明. 猪链球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(12): 84-87
Lei YP, Wang ZB, Yang ZP, Zhang ZP, Wang ZW, Hu MM. Establishment of fluorescence quantitative PCR for *Streptococcus suis* detection and its clinical application[J]. China Animal Health Inspection, 2017, 34(12): 84-87 (in Chinese)
- [4] 乔鹏芸. 猪源多杀性巴氏杆菌的分型及其毒力特性研究[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2017
Qiao PY. Determination of the types and virulence of *Pasteurella multocida* isolates from swine[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2017 (in Chinese)
- [5] 林跃华. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 养猪, 2016(2): 94-96
Lin YH. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Pasteurella multocida* from swine[J]. Swine Production, 2016(2): 94-96 (in Chinese)
- [6] 阮胜男,于学祥,孙琪,库旭钢,何启盖,江云波. 猪多杀性巴氏杆菌和链球菌混合感染的诊治及防控[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(9): 78-82, 87, 164
Ruan SN, Yu XX, Sun Q, Ku XG, He QG, Jiang YB. Diagnosis, treatment, prevention and control of mixed infection of *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in pigs[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(9): 78-82, 87, 164 (in Chinese)
- [7] 宋立,高志强,杨承槐,宁宜宝,张鹤晓,吴丹,张利峰,刘洋. 猪链球菌 2 型荧光 PCR 检测方法 with 常规检测方法的比较[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(6): 8-10, 19
Song L, Gao ZQ, Yang CH, Ning YB, Zhang HX, Wu D, Zhang LF, Liu Y. Comparison of detection of *Streptococcus suis* serotype 2 by real-time PCR and conventional detection methods[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(6): 8-10, 19 (in Chinese)
- [8] 彭召红. 实时荧光定量 PCR 技术在细菌学检测方面应用进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(56): 197-198
Peng ZH. Application progress of real-time quantitative PCR in bacteriological detection[J]. Journal of Clinical Medical Literature, 2018, 5(56): 197-198 (in Chinese)
- [9] 许腾林,邢桂玲,刘家森,刘大飞,李志杰,姜骞,康洪涛,田进,郭东春,曲连东. 多杀性巴氏杆菌 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(8): 706-710
Xu TL, Xing GL, Liu JS, Liu DF, Li ZJ, Jiang Q, Kang HT, Tian J, Guo DC, Qu LD. Development and application of *TaqMan* real-time PCR assay for the detection of *Pasteurella multocida*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(8): 706-710 (in Chinese)
- [10] 马万里,张绍军,肖文同,王丽霞,路璐,韩庆安,张玉新. 规模猪场猪呼吸道疾病综合征相关病原感染的血清学调查[J]. 兽医导刊, 2010(8): 25-27
Ma WL, Zhang SJ, Xiao WT, Wang LX, Lu L, Han QA, Zhang YX. Serological investigation of pathogen infection related to porcine respiratory syndrome in large-scale pig farms[J]. Veterinary Orientation, 2010(8): 25-27 (in Chinese)
- [11] 刘本金,郑亚婷,许腾林,姜骞,刘家森,康洪涛,田进,郭东春,曲连东. 同时检测多杀性巴氏杆菌及其荚膜 A 型的双重 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(5): 501-506
Liu BJ, Zheng YT, Xu TL, Jiang Q, Liu JS, Kang HT, Tian J, Guo DC, Qu LD. Development and application of duplex *TaqMan* real-time PCR assay for the detection of *Pasteurella multocida* and its capsular type A[J].

- Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(5): 501-506 (in Chinese)
- [12] 付梦玉, 林丽萍, 郭道初, 张凤英, 吴国平. 一株临床 2 型猪链球菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(7): 1897-1904
Fu MY, Lin LP, Guo DC, Zhang FY, Wu GP. Isolation, identification and biological characteristics analysis of a strain of clinical *Streptococcus suis* serotype 2[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(7): 1897-1904 (in Chinese)
- [13] 姜睿姣, 周丽军, 邬旭龙, 张鹏飞, 罗梓丹, 肖璐, 王印, 姚学萍, 杨泽晓, 罗燕. 副猪嗜血杆菌及巴氏杆菌双重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(5): 489-494
Jiang RJ, Zhou LJ, Wu XL, Zhang PF, Luo ZD, Xiao L, Wang Y, Yao XP, Yang ZX, Luo Y. Establishment of duplex fluorescent quantitative PCR for *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(5): 489-494 (in Chinese)
- [14] Blondeau JM, Fitch SD. Mutant prevention and minimum inhibitory concentration drug values for enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin tested against swine pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis*[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210154
- [15] He Y, Zhao P, Chu YF, Gao PC, LU ZX. Development of multiplex-PCR for identification of *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2010, 2(S2): 25-27
- [16] Wilkie I W, Harper M, Boyce J D, Adler B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012, 361: 1-22
- [17] 熊景峰. HPS、SS2 和 Pm 的三重 PCR 检测方法建立及三联灭活疫苗的研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2019
Xiong JF. Establishment of triple PCR method for detection of HPS, SS2 and Pm and study on inactivated vaccine[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [18] 黄海燕, 王印, 彭娟, 宋勇, 蒋梅, 钟霏, 李丽瑞. 猪源多杀性巴氏杆菌 PCR 鉴定方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(7): 1111-1116
Huang HY, Wang Y, Peng J, Song Y, J M, Zhong F, Li LR. Development of PCR identification method for *Pasteurella multocida* from porcine[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2012, 43(7): 1111-1116 (in Chinese)