

# 牛巴氏杆菌病多重 PCR 检测技术的建立与应用

王豪杰<sup>1</sup>, 辛凌翔<sup>1</sup>, 任小侠<sup>1</sup>, 刘燕<sup>1</sup>, 姚文生<sup>1</sup>, 侯雪霞<sup>2</sup>, 李旭妮<sup>\*1</sup>, 朱良全<sup>\*1</sup>

1 中国兽医药品监察所, 北京 100081

2 永年区农业农村局, 河北 邯郸 057150

王豪杰, 辛凌翔, 任小侠, 刘燕, 姚文生, 侯雪霞, 李旭妮, 朱良全. 牛巴氏杆菌病多重 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5083-5091

Wang Haojie, Xin Lingxiang, Ren Xiaoxia, Liu Yan, Yao Wensheng, Hou Xuexia, LI Xuni, Zhu Liangquan. Establishment and application of multiplex PCR assay for bovine pasteurellosis[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5083-5091

**摘要:**【背景】牛巴氏杆菌病是由血清型(A、B、E)多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)引起的一种严重危害养牛业的重要传染病, 病原学聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法是诊断并防控该病的有效手段。【目的】建立检测血清型(A、B、E)多杀性巴氏杆菌的多重 PCR 方法, 为临床诊断牛巴氏杆菌病和病原分型提供技术支持。【方法】参考多杀性巴氏杆菌 *hyaD-hyaC* 基因、*bcbD* 基因和 *ecbJ* 基因特异区域, 设计 3 对特异性引物, 以温度梯度 PCR 法确定适宜退火温度( $T_m$ ); 采用棋盘试验优化引物浓度并初步建立多重 PCR 方法; 采用重组质粒标准品及阳性菌株菌液确定其敏感性(最小检测量); 以 8 种常见牛感染病原体[溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia hemolytica*) C1655、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) C237、产单核细胞李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*) C1597、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) C3053、都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*) C79351、副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*) C1625、牛传染性鼻气管炎病毒(bovine infectious rhinotracheitis virus) CAV1546 和牛支原体分离株(*Mycoplasma bovis*) C65-1]核酸样本确定其特异性; 制备 3 批诊断试剂, 对敏感性和特异性样品进行批间和批内试验, 确定其重复性; 运用建立的方法使用 3 种不同型号的 PCR 仪检测敏感性和特异性样品, 确定其适用性; 通过检测临床样本及人工模拟感染样本评价临床应用效果。【结果】在  $T_m$  为 55 °C 时, 3 对引物浓度分别为 0.25、0.30 和 0.20  $\mu\text{mol/L}$  条件下建立多重 PCR 方法较优, 可以同时检测多杀性巴氏杆菌血清 A 型(821 bp)、血清 B 型(203 bp)和血清 E 型(363 bp); 该方法敏感性高, 对重组质粒标准品 pMD-A、pMD-B 和 pMD-E 检测限分别为 43.080、3.710 和 4.350 copies/ $\mu\text{L}$ , 对阳性菌液最低检出限均为  $10^2$  CFU 细菌; 其特异性强, 仅对血清型(A、B、E)多杀性巴氏杆菌有特异性扩增条带, 同

基金项目: 中国兽医药品监察所-公益性专项(GY202103, GY202104); 新疆生产建设兵团重大科技项目(2017AA003)

Supported by: Public Welfare Special Project of China Institute of Veterinary Drug Control (GY202103, GY202104); Major Science and Technology Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2017AA003)

\*Corresponding authors: E-mail: LI Xuni: lxn20062006@126.com; ZHU Liangquan: 1367391894@qq.com

Received: 2022-09-10; Accepted: 2022-09-30; Published online: 2022-10-27

时对其他病原体均无扩增条带；该方法重复性良好，批间与批内试验均一致；临床样本及人工模拟感染样本检测结果显示与病原分离鉴定符合率为 100%。【结论】成功建立了一种可鉴定不同血清型的牛多杀性巴氏杆菌多重 PCR 检测方法。

**关键词：**牛巴氏杆菌病；多杀性巴氏杆菌；血清型；多重 PCR

## Establishment and application of multiplex PCR assay for bovine pasteurellosis

WANG Haojie<sup>1</sup>, XIN Lingxiang<sup>1</sup>, REN Xiaoxia<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, YAO Wensheng<sup>1</sup>, HOU Xuexia<sup>2</sup>, LI Xuni<sup>\*1</sup>, ZHU Liangquan<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

<sup>2</sup> Agricultural and Rural Bureau of Yongnian District, Handan 057150, Hebei, China

**Abstract:** [Background] Bovine pasteurellosis, caused by serotypes A, B, and E of *Pasteurella multocida* (Pm), is an acute infectious disease of cattle. Polymerase chain reaction (PCR) is an effective means to diagnose and control this disease. [Objective] To establish a multiplex PCR assay for rapid detection of serotypes A, B, and E of Pm and provide technical support for the rapid and accurate clinical diagnosis of bovine pasteurellosis. [Methods] According to the conserved regions of *hyaD-hyaC*, *bcbD*, and *ecbJ* genes of Pm, we designed three pairs of specific primers for PCR and determined the appropriate annealing temperature ( $T_m$ ) by temperature-gradient PCR assay. Chessboard test was employed to optimize the primer concentration and then a multiplex PCR assay was established. The recombinant plasmid standard and positive strain were used to determine the sensitivity (limit of detection) of the established assay. The nucleic acid samples of 8 common bovine pathogens (*Mannheimia hemolytica* C1655, *Escherichia coli* C237, *Listeria monocytogenes* C1597, *Staphylococcus aureus* C3053, *Salmonella dublin* C79351, *Mycobacterium paratuberculosis* C1625, bovine infectious rhinotracheitis virus CAV1546, and *Mycoplasma bovis* C65-1) were used to determine the specificity of the multiplex PCR assay. Three batches of diagnostic reagents were prepared to perform inter-batch and intra-batch tests on sensitive and specific samples to determine the repeatability of the assay. Three different models of PCR instruments were used to detect sensitive and specific samples with the established method to determine the applicability of the assay. The performance of the assay in clinical application was evaluated by detection of clinical samples and simulated infection samples. [Results] The optimal multiplex PCR assay was established under the following conditions:  $T_m$  of 55 °C and the three pairs of primers at the concentrations of 0.25, 0.30, and 0.20  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The established method could simultaneously detect Pm serotypes A (821 bp), B (203 bp), and E (363 bp). The multiplex PCR assay had high sensitivity. It showed the limits of detection of 43.080, 3.710, and 4.350 copies/ $\mu\text{L}$  for recombinant plasmid standards pMD-A, pMD-B, and pMD-E, respectively, as well as the limit of detection of  $10^2$  CFU for the positive bacterial liquid. Moreover, the established assay had strong specificity as it only produced bands for the serotypes A, B, and E of Pm and no bands for other

pathogens. The consistent results of the inter-batch and intra-batch tests indicated good repeatability of the assay. The detection results of clinical samples and simulated infection samples showed a 100% coincidence rate with the pathogen isolation and identification. **[Conclusion]** The multiplex PCR assay for the detection of serotypes A, B, and E of Pm was successfully established, which provided technical support for the identification and epidemiological investigation of Pm.

**Keywords:** bovine pasteurellosis; *Pasteurella multocida*; serotypes; multiplex PCR

牛巴氏杆菌病(pasteurellosis bovis)是由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)引起牛败血症和肺炎型为主的重要传染病, 该病呈世界性分布, 严重危害畜牧养殖业<sup>[1]</sup>。我国将该病列为多种动物共患疫病<sup>[2]</sup>。Carter 依据荚膜抗原的不同将多杀性巴氏杆菌分为 5 种血清型(A、B、E、D、F)<sup>[3]</sup>, 其中牛源荚膜 A 型菌以肺炎症状为主, 常可与溶血性曼氏杆菌等其他病原体发生混合感染<sup>[4-5]</sup>; 而牛源荚膜 B 型、E 型菌主要引起出血性败血症<sup>[6-7]</sup>。当前, 我国主要流行牛源荚膜 A 型和 B 型菌, 尤以 A 型菌为主<sup>[8]</sup>。但随着国际贸易及检疫引种需要, E 型菌传入风险较大。

随着分子生物学技术的发展, 基因扩增技术是鉴定细菌最可靠的方法之一<sup>[9]</sup>。然而, 目前我国仅有针对牛源荚膜 A 型、B 型菌 PCR 方法的报道<sup>[10]</sup>, 因此, 建立牛源荚膜 A 型、B 型和 E 型多杀性巴氏杆菌 PCR 检测方法显得尤为必要, 对国内外牛巴氏杆菌病的诊断、流行病学的调查和病原菌株的分离具有重大意义。

鉴于此, 本实验室利用国家兽医微生物保藏中心保存的牛源荚膜 A 型、B 型和 E 型参考菌株, 根据 A 型、B 型、E 型菌分别含有的 *hyaD-hyaC* 基因、*bcbD* 基因和 *ecbJ* 基因的特异性基因序列, 设计 3 对特异性引物, 运用温度梯度 PCR 与棋盘试验优化退火温度、引物浓度等反应条件建立多重 PCR 方法, 以期为畜牧兽医从业者、动物出入境检疫工作者准确诊断该病提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及临床样品

牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida* Cart A) CVCC 390、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌(*P. multocida* Cart B) CVCC 391、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌(*P. multocida* Cart E) CVCC 393、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*) CVCC 1655、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) CVCC 237、产单核细胞李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*) CVCC 1597、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CVCC 3053、都柏林沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) CVCC 79351、副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*) CVCC 1625 和牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) CVCC AV1546 均由国家兽医微生物菌种保藏中心保存与供应; 牛支原体分离株(*Mycoplasma bovis*) C65-1 由本实验室保存。56 份疑似感染多杀性巴氏杆菌的组织样品及 100 份牛鼻、肛拭子采集于不同牛场; 18 份人工模拟感染样本及 3 份空白对照样品由本实验室制备。18 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠购自北京维通利华试验动物技术有限公司(中国兽医药品监察所实验动物福利伦理委员会; 批准号: 中监所(福)[2022]第 00203 号)。

### 1.2 主要试剂和仪器

pMD18-T 载体、*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 本实验室保存; DNA Marker、2 $\times$ Taq PCR Master

Mix, 北京博迈德基因技术有限公司; 组织基因组 DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。核酸蛋白测定仪 Nano-Drop, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Eppendorf Master-Cycler PCR 仪, 北京佰鸥创投生物科技有限公司; VeritiPro™ 热循环仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; C1000 Touch™ Thermal Cycler, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 中登录的牛源荚膜 A 型、B 型、E 型多杀性巴氏杆菌 *hyaD-hyaC* 基因(CP006976)、*bcbD* 基因(LIUP01000027)和 *ecbJ* 基因(AF302466)特异性基因序列设计引物(表 1), 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

### 1.4 病原核酸的提取

按照组织基因组 DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒与病毒 DNA 快速纯化试剂盒说明书提取细菌、病毒、组织及口腔拭子等临床样品的核酸, 于-80 °C 保存备用。

### 1.5 多重 PCR 反应体系的建立及优化

采用生物信息学软件 DNASTar 评价 3 对引物的  $T_m$ , 确定其退火范围; 然后利用温度梯度 PCR 与棋盘试验优化退火温度、引物浓度。多重 PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, 模板各 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.2–1.0 μL,

ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。多重 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50–60 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

### 1.6 重组质粒标准品的制备

以牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 为模板, 利用设计的 3 对特异性引物分别进行单一 PCR 扩增, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 连接至 pMD18-T 载体构建重组质粒 pMD-A、pMD-B 和 pMD-E, 经菌液 PCR 鉴定、测序加以验证。利用紫外分光光度计检测 3 种阳性质粒浓度, 分别计算其拷贝数。

### 1.7 特异性试验

分别以溶血性曼氏杆菌、大肠埃希氏菌、产单核细胞李氏杆菌、金黄色葡萄球菌、都柏林沙门氏菌、牛支原体分离株、副结核分枝杆菌和牛传染性鼻气管炎病毒的基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增。以牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌及重组质粒 pMD-A、pMD-B 和 pMD-E 混合物为阳性对照, 验证建立的多重 PCR 方法的特异性。

### 1.8 敏感性试验

#### 1.8.1 重组质粒标准品敏感性试验

将  $4.308 \times 10^6$  copies/μL 的重组质粒 pMD-A、 $3.710 \times 10^6$  copies/μL 的重组质粒 pMD-B 和

表 1 多重 PCR 检测引物

Table 1 Primers used for the multiplex PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Concentration of primers (μmol/L)	Amplified product size (bp)
CapA-F	TTTGTCATCATCGCAACGCC	0.25	821
CapA-R	ACGGGGTAGTCCTCAAATGC	0.25	
CapB-F	TTTGAGCAGCACCTCCGTAT	0.30	203
CapB-R	GCCCACAATTCAAATGCCCTT	0.30	
CapE-F	TCGCTTAGCGCACAAAGGAT	0.20	363
CapE-R	CCATTGGCATAGCTTGCTGC	0.20	

4.350×10<sup>6</sup> copies/μL 的重组质粒 pMD-E 各用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍倍比稀释且等体积混合后作为模板,利用优化的多重 PCR 检测,验证多重 PCR 检测重组质粒标准品的敏感性。

### 1.8.2 菌液敏感性试验

分别培养牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌标准菌株,并依次 10 倍倍比稀释,取 1 μL 作为模板进行多重 PCR 反应,检测多重 PCR 方法的菌液敏感性。

### 1.9 重复性及适用性试验

制备 3 批诊断试剂对敏感性和特异性样品进行批间和批内试验,验证其重复性。运用建立的方法使用 3 种不同型号的 PCR 仪检测敏感性和特异性样品,检测其适用性。

### 1.10 临床应用

#### 1.10.1 疑似感染样品及牛鼻、肛拭子样品的检测

应用建立的多重 PCR 方法对从不同牛场采集的 56 份疑似感染的组织样品、随机采集牛鼻、肛拭子各 50 份进行检测,并与病原分离鉴定进行比较,验证该方法的可行性。

#### 1.10.2 人工模拟临床样本的检测

用胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)培养强毒株 CVCC390、CVCC391、CVCC393,然后用生理盐水稀释至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6,并取 100 CFU 剂量腹腔注射小鼠各 6 只,共 18 只。待小鼠死亡后取肺脏、肝脏、脾脏组织各 6 份,按照 1:10 的体积比加入灭菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4, 含 1 mmol/L EDTA)研磨成组织匀浆,随后用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取核酸进行 PCR 检测。同时设置空白对照 3 只,注射 TSB 培养基 0.3 mL,同样剖杀小鼠取其组织进行研磨,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 多重 PCR 方法的建立及优化

经过生物信息学软件 DNASTar 分析得出,3 对引物的 T<sub>m</sub> 范围为 50–60 °C,在此范围内设置温度梯度,以牛源荚膜 A 型、B 型、E 型多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果显示, T<sub>m</sub> 为 55 °C 时为最适退火温度。运用棋盘法对引物浓度进行优化。优化后的 PCR 反应体系(20 μL): 2×Taq PCR Master Mix 10 μL,模板各 1 μL,上、下游引物终浓度见表 1, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。优化后的反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。以优化后的反应体系及条件进行了 PCR 扩增(图 1)。

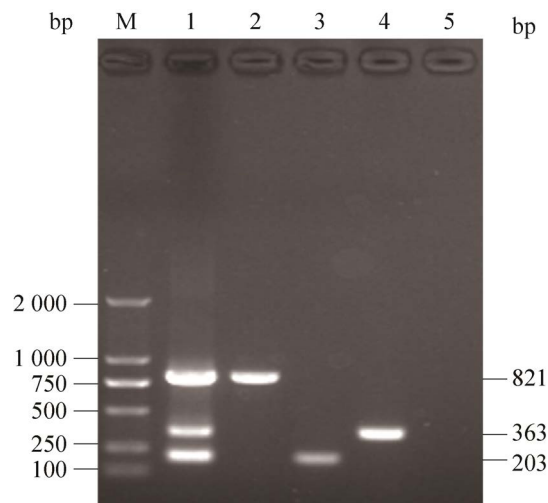


图 1 多重 PCR 结果电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 多重 PCR 产物; 2: 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌; 3: 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌; 4: 牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌; 5: 阴性对照

Figure 1 Electrophoresis map of multiplex PCR results. M: DL2000 DNA Marker; 1: Products of multiplex PCR; 2: *Pasteurella multocida* cart A; 3: *Pasteurella multocida* cart B; 4: *Pasteurella multocida* cart E; 5: Negative control.

## 2.2 重组质粒的构建

分别以牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌 DNA 为模板,利用设计的 3 对特异性引物进行单一 PCR 扩增,结果显示扩增的目的片段与预期一致,分别为 821、203 和 363 bp。将回收的 PCR 产物分别连接至 pMD18-T 载体,构建重组质粒 pMD-A、pMD-B 和 pMD-E,经 PCR 扩增和测序鉴定,结果显示扩增的 3 条目的片段与预期一致。利用紫外分光光度计检测 3 种重组质粒浓度分别为 341.60、121.10 和 224.20 ng/ $\mu\text{L}$ 。经换算分别对应  $4.308 \times 10^{10}$ 、 $3.710 \times 10^{10}$  和  $4.350 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ ,将质粒分装存放于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

## 2.3 特异性试验结果

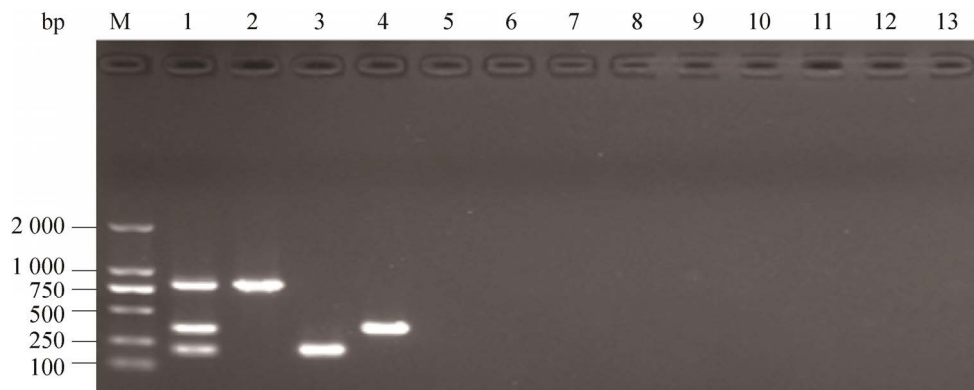
分别以溶血性曼氏杆菌、大肠埃希氏菌、产单核细胞李氏杆菌、金黄色葡萄球菌、都柏林株沙门氏菌、牛支原体分离菌株、副结核分枝杆菌和牛传染性鼻气管炎病毒的基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增,以牛源荚膜 A 型多

杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌及重组质粒 pMD-A、pMD-B 和 pMD-E 混合物为阳性对照。结果显示,阳性菌株均扩增出目的条带,而阴性菌株均未扩增出目的条带(图 2),表明该方法具有良好的特异性。

## 2.4 敏感性试验结果

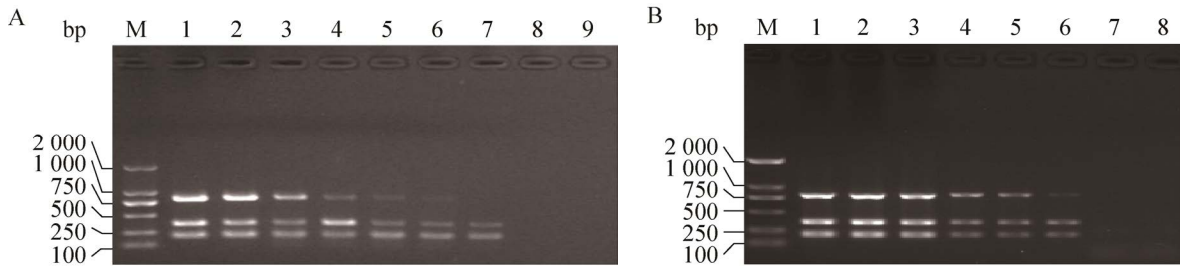
将  $4.308 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的重组质粒 pMD-A、 $3.710 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的重组质粒 pMD-B 和  $4.350 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的重组质粒 pMD-E 各用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍倍比稀释且等体积混合后作为 PCR 模板。结果显示, pMD-A 的检测下限是 43.080 copies/ $\mu\text{L}$ , pMD-B 的检测下限是 3.710 copies/ $\mu\text{L}$ , pMD-E 检测下限是 4.350 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3A)。

分别以稀释的阳性菌株菌液为模板进行多重 PCR 扩增,结果显示,牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌、牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌最低检出量均为  $10^2$  CFU (图 3B),表明该方法敏感性较高。



**图 2 多重 PCR 的特异性** M: DL2000 DNA Marker; 1: 多重 PCR 产物; 2: 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌; 3: 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌; 4: 牛源荚膜 E 型多杀性巴氏杆菌; 5: 溶血性曼氏杆菌; 6: 大肠埃希氏菌; 7: 产单核细胞李氏杆菌; 8: 金黄色葡萄球菌; 9: 都柏林株沙门氏菌; 10: 牛支原体分离菌株; 11: 副结核分枝杆菌; 12: 牛传染性鼻气管炎病毒; 13: 阴性对照

Figure 2 The specificity of multiplex PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1: Products of multiplex PCR; 2: *Pasteurella multocida* cart A; 3: *Pasteurella multocida* cart B; 4: *Pasteurella multocida* cart E; 5: *M. haemolytica*; 6: *Escherichia coli*; 7: *L. Monocytogenes*; 8: *S. aureus*; 9: *S. enteriditis*; 10: *Mycoplasma bovis*; 11: *M. paratuberculosis*; 12: IBRV; 13: Negative control.



**图 3 重组质粒标准品(A)和菌液(B)为模板的多重 PCR 敏感性** M: DL2000 DNA Marker。A: 重组质粒标准品为模板的多重 PCR 敏感性, 1-8: pMD-A、pMD-B、pMD-E 从  $10^6$ - $10^{-1}$ ; 9: 阴性对照。B: 菌液为模板的多重 PCR 敏感性, 1:  $10^7$  CFU; 2:  $10^6$  CFU; 3:  $10^5$  CFU; 4:  $10^4$  CFU; 5:  $10^3$  CFU; 6:  $10^2$  CFU; 7:  $10^1$  CFU; 8: 阴性对照

Figure 3 Multiplex PCR sensitivity using recombinant plasmid standard (A) and bacterial solution (B) as templates. M: DL2000 DNA Marker. A: Electrophoresis map of multiplex PCR sensitivity using recombinant plasmid standard as templates. 1-8: pMD-A, pMD-B and pMD-E from  $10^6$ - $10^{-1}$ ; 9: Negative control. B: Electrophoresis map of multiplex PCR sensitivity using bacterial solution as templates. 1:  $10^7$  CFU; 2:  $10^6$  CFU; 3:  $10^5$  CFU; 4:  $10^4$  CFU; 5:  $10^3$  CFU; 6:  $10^2$  CFU; 7:  $10^1$  CFU; 8: Negative control.

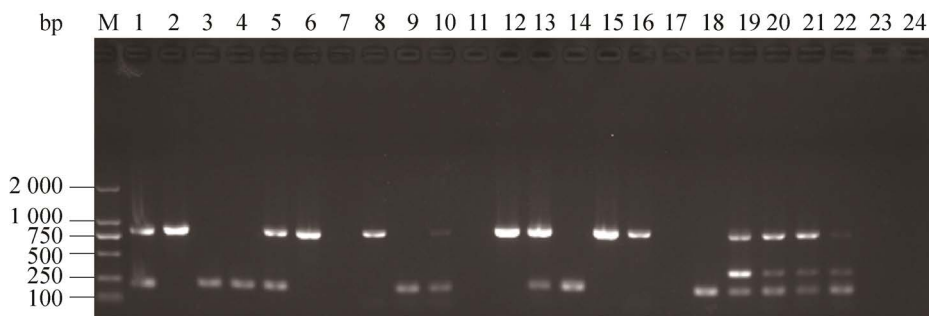
## 2.5 重复性及稳定性

制备 3 批诊断试剂对敏感性和特异性样品进行批间与批内试验。结果显示, 批间与批内试验均一致, 表明该方法重复性好。另外, 用 Eppendorf Master-cycler PCR 仪、VeritiPro™ 热循环仪、C1000 Touch™ Thermal Cyclers 分别检测敏感性和特异性样品, 结果显示, 3 种型号的 PCR 仪检测结果均一致, 表明该方法稳定性好。

## 2.6 临床应用评价结果

应用建立的多重 PCR 方法对从不同牛场采

集的疑似感染样品(56 份)及牛鼻、肛拭子样品(各 50 份)进行检测, 并与病原分离鉴定进行比较(图 4)。结果显示(表 2), 56 份疑似感染的样品中, 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌感染率为 58.93% (33/56), 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌感染率为 30.36% (17/56), 混合感染率为 23.21% (13/56)。牛鼻拭子(50 份)与肛拭子(50 份)样品中, 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌感染率为 23% (23/100), 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌感染率为 15% (15/100), 混合感染率为 11%



**图 4 部分临床样品及人工模拟样品检测结果** M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 临床样品; 7-12: 牛鼻拭子样品; 13-18: 牛肛拭子样品; 19-22: 人工模拟样品; 23-24: 空白样品

Figure 4 Test results of some clinical samples and artificial simulated samples. M: DL2000 DNA Marker; 1-6: Clinical samples; 7-12: Bovine nose swab sample; 13-18: Bovine anal swab sample; 19-22: Artificial simulation sample; 23-24: Blank sample.

表 2 临床样品及人工模拟样品检测结果

Table 2 Test result of clinical samples and artificial simulated samples

Sample	Multiplex PCR method		Pathogen isolation		Coincidence rate (%)
	Serotype	Positive rate	Serotype	Positive rate	
56 suspected infected samples	A	58.93% (33/56)	A	58.93% (33/56)	100
	B	30.36% (17/56)	B	30.36% (17/56)	100
	A+B	23.21% (13/56)	A+B	23.21% (13/56)	100
	Negative	10.71% (6/56)	Negative	10.71% (6/56)	100
50 bovine nose swab samples	A	20% (10/50)	A	20% (10/50)	100
	B	14% (7/50)	B	14% (7/50)	100
	A+B	10% (5/50)	A+B	10% (5/50)	100
	Negative	66% (33/50)	Negative	66% (33/50)	100
50 samples of bovine anal swabs	A	26% (13/50)	A	26% (13/50)	100
	B	16% (8/50)	B	16% (8/50)	100
	A+B	12% (6/50)	A+B	12% (6/50)	100
	Negative	58% (33/50)	Negative	58% (33/50)	100
18 artificial simulated infection samples	A	100% (6/6)	A	100% (6/6)	100
	B	100% (6/6)	B	100% (6/6)	100
	E	100% (6/6)	E	100% (6/6)	100
3 negative control samples	A, B, E	0	A, B, E	0	100

(11/100)。通过人工模拟感染样品检测发现,相应攻毒组织中检测的准确性为 100%。此外,该方法与病原分离鉴定一致,表明其具有良好的临床应用效果。

### 3 讨论与结论

牛巴氏杆菌病主要由牛源荚膜 A 型、B 型、E 型多杀性巴氏杆菌单一或混合感染,导致牛高致病性、高死亡率的共患性疾病<sup>[11-12]</sup>。心、肝、脾、肺、肾是牛巴氏杆菌病重要的靶组织,而拭子是该病风险评估与流行病学调查中最易采集、最容易监测的样本。当前,牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌虽在我国流行率较高,但其致病力与牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌相比较低<sup>[13]</sup>。同时,本实验室通过对牛攻毒试验也证明了血清 A 型多杀性巴氏杆菌致病力低于血清 B 型(A 型攻毒后牛未出现死亡, B 型攻毒后仅 1 d 牛全部死亡)。因此,快速确定菌种血清型对畜牧养殖场进行风险评估意义较大。Carter<sup>[3]</sup>

虽然依据多杀性巴氏杆菌荚膜抗原的不同利用间接血凝试验进行分群,但该方法耗时、繁杂,不利于现场检测。Townsend 等<sup>[11]</sup>虽已建立了对多杀性巴氏杆菌分型的多重 PCR 方法,但发现其敏感性较低。

本研究针对牛源多杀性巴氏杆菌的 *hyaD-hyaC* 基因、*bcbD* 基因和 *ecbJ* 基因的特异性区域设计筛选出 3 对新的特异性引物,通过优化反应条件,建立了可以同时检测牛源荚膜 A 型、B 型、E 型多杀性巴氏杆菌的多重 PCR 方法。该方法特异性强,仅对荚膜 A 型、B 型、E 型的多杀性巴氏杆菌有特异性扩增片段,而对溶血性曼氏杆菌、大肠埃希氏菌等 8 种病原体均无扩增条带。其敏感性较高,重组质粒标准品最低检测下限分别达到 43.080、3.710 和 4.350 copies/ $\mu\text{L}$ ,阳性菌液最低检测下限均为  $10^2$  CFU 细菌。在提取基因组 DNA 时,同条件下对 3 种荚膜型多杀性巴氏杆菌进行离心,荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌呈漂浮絮状,这可能与



其自身黏稠的特性有关, 进而影响核酸的提取浓度。若多重 PCR 方法敏感性低则导致检测不准确。此外, 该方法重复性及稳定性好, 运用 3 种不同型号的 PCR 仪进行批间与批内试验, 其结果均一致。最后, 利用建立的多重 PCR 方法对采集的临床样品与人工模拟样品进行了检测, 结果 56 份疑似感染的样品中, 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌感染率为 58.93%, 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌感染率为 30.36%, 混合感染率为 23.21%。牛鼻拭子(50 份)与肛拭子(50 份)样品中, 牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌感染率为 23%, 牛源荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌感染率为 15%, 混合感染率为 11%。对相应攻毒组织中检测的准确性为 100%, 均与病原分离鉴定一致, 表明该方法在临床诊断中具有良好的应用价值。

综上所述, 本研究建立的多重 PCR 方法可对疑似患病牛、健康监测牛鼻、肛拭子、奶液等样品进行快速诊断和病原分型, 可为防控牛巴氏杆菌病提供有力的技术支撑, 具有广阔的应用前景。

## REFERENCES

- [1] 林立山, 黄秦, 才灵杰, 马家乐, 姚火春, 潘子豪. 牛源多杀性巴氏杆菌的分离与初步鉴定[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2240-2248  
Lin LS, Huang Q, Cai LJ, Ma JL, Yao HC, Pan ZH. Isolation and diversity analysis of bovine *Pasteurella multocida*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2240-2248 (in Chinese)
- [2] 《一、二、三类动物疫病种名录》及《三类动物疫病防治规范》发布[J]. 中国水产, 2022(8): 23-26  
“List of Class I, Class II and Class III Animal Diseases” and “Specification for Prevention and Control of Class III Animal Diseases” were released[J]. China Fisheries, 2022(8): 23-26 (in Chinese)
- [3] Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types[J]. American Journal of Veterinary Research, 1955, 16(60): 481-484
- [4] Snyder E, Credille B. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in bovine respiratory disease[J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2020, 36(2): 253-268
- [5] Zhang WL, Liu XD, Liu MC, Ma B, Xu L, Wang JW. Development of a multiplex PCR for simultaneous detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Trueperella pyogenes*[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2017, 65(3): 327-339
- [6] Cuevas I, Carbonero A, Cano D, García-Bocanegra I, Amaro MÁ, Borge C. Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 222
- [7] Elsayed MSAE, Eldsouky SM, Roshdy T, Said L, Thabet N, Allam T, Mohammed ABA, Nasr GM, Basiouny MSM, Akl BA, et al. Virulence determinants and antimicrobial profiles of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and humans in Egypt[J]. Antibiotics: Basel, Switzerland, 2021, 10(5): 480
- [8] Cirone F, Padalino B, Tullio D, Capozza P, Lo Surdo M, Lanave G, Pratelli A. Prevalence of pathogens related to bovine respiratory disease before and after transportation in beef steers: preliminary results[J]. Animals: an Open Access Journal from MDPI, 2019, 9(12): 1093
- [9] Peng Z, Wang XR, Zhou R, Chen HC, Wilson BA, Wu B. *Pasteurella multocida*: genotypes and genomics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2019, 83(4): e00014-e00019
- [10] 李霄阳, 许建, 刘文晓, 章振华, 徐福洲, 陈小玲, 李永清. 牛源多杀性巴氏杆菌主要荚膜群和脂多糖基因型两组三重 PCR 检测方法[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(1): 97-104  
Li XY, Xu J, Liu WX, Zhang ZH, Xu FZ, Chen XL, Li YQ. Two sets of triplicate PCR assays detecting major capsular serogroups and lipopolysaccharide genotypes of bovine *Pasteurella multocida*[J]. China Animal Health Inspection, 2022, 39(1): 97-104 (in Chinese)
- [11] Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(3): 924-929
- [12] Frucchi APS, Dall Agnol AM, Bronkhorst DE, Beuttemuller EA, Alfieri AA, Alfieri AF. Bovine coronavirus co-infection and molecular characterization in dairy calves with or without clinical respiratory disease[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 895492
- [13] McFadden AMJ, Christensen H, Fairley RA, Hill FI, Gill JM, Keeling SE, Spence RP. Outbreaks of pleuritis and peritonitis in calves associated with *Pasteurella multocida* capsular type B strain[J]. New Zealand Veterinary Journal, 2011, 59(1): 40-45