

胸膜肺炎放线杆菌的实时荧光 PCR 检测

李树清¹, 易建平¹, 李 健¹, 胡永强¹, 王巧全¹, 陈志飞¹, 周筱华¹, 潘晓钟¹, 罗满林², 陈 敏¹

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; 实时荧光 PCR; 检测

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)09-0969-05

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App) 引起的危害养猪业的五大疾病之一。至目前为止 App 共报道有 2 个生物型 15 个血清型^[1]。所有型都可能致病, 但有显著差异^[2]。使用血清学方法监测猪传染性胸膜肺炎有其局限。一些猪细菌分离培养阳性, 但血清反应仍为阴性^[3], 对这些猪群只能使用病原分离进行确诊。亚临床感染及处于潜伏期的动物, 细菌在上呼吸道数量较少, 且受上呼吸道共生菌的影响, 使得分离 App 非常困难^[2]。因此, 简单、快速、准确、直接对样品进行检测的 PCR 方法应运而生, 但多见常规 PCR 报道, 荧光 PCR 仅见丹麦

Φystein 等^[2]的报道。本研究根据 App apxIVA 毒素基因的序列设计了引物和探针, 建立了检测 App 15 个血清型的实时荧光 PCR 检测方法, 并作了初步应用。

1 材料与方法

1.1 菌株

App 的 16 个参考菌株均引自丹麦兽医研究所, 血清型为 1~ 15 型, 其中 5 型为 5A 及 5B 2 株。另有 11 个国内 App 菌株及 8 个放线杆菌参考株及 5 株其它猪源致病菌如溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌等(表 1)。

表 1 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌和相关细菌菌株

Table 1 App and reference strains used in test

序号 No.	种名 Name	菌株 Strain	血清型 Serotype	来源 Origin
1	<i>A. pleuropneumoniae</i>	4074	1	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
2	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1536	2	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
3	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1421	3	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
4	<i>A. pleuropneumoniae</i>	M62	4	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
5	<i>A. pleuropneumoniae</i>	K17	5A	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
6	<i>A. pleuropneumoniae</i>	L20	5B	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
7	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Fem ϕ	6	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
8	<i>A. pleuropneumoniae</i>	WF83	7	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
9	<i>A. pleuropneumoniae</i>	405	8	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
10	<i>A. pleuropneumoniae</i>	13261	9	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
11	<i>A. pleuropneumoniae</i>	13039	10	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
12	<i>A. pleuropneumoniae</i>	56153	11	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
13	<i>A. pleuropneumoniae</i>	8329	12	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute

收稿日期: 2004-07-01

基金项目: 上海市科委标准专项资助项目(02DZ05026)

作者简介: 李树清(1964+), 女, 四川眉山人, 高级兽医师, 硕士, 从事进出口动物检疫工作。Tel: 021- 68544059; Fax: 021- 68546620; E-mail: lisq@shciq.gov.cn

续表

序号 No.	种名 Name	菌株 Strain	血清型 Serotype	来源 Origin
14	<i>A. pleuropneumoniae</i>	N273	13	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
15	<i>A. pleuropneumoniae</i>	3906	14	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
16	<i>A. pleuropneumoniae</i>	HS 143	15	丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
17	<i>A. pleuropneumoniae</i>	259	1	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
18	<i>A. pleuropneumoniae</i>	260	2	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
19	<i>A. pleuropneumoniae</i>	261	3	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
20	<i>A. pleuropneumoniae</i>	262	4	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
21	<i>A. pleuropneumoniae</i>	264	6	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
22	<i>A. pleuropneumoniae</i>	265	7	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
23	<i>A. pleuropneumoniae</i>	266	8	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
24	<i>A. pleuropneumoniae</i>	267	9	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
25	<i>A. pleuropneumoniae</i>	268	10	兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)
26	<i>A. pleuropneumoniae</i>	HUIZHOU	7	华南农业大学 South China Agricultural University
27	<i>A. pleuropneumoniae</i>	ZHUHAI	1	华南农业大学 South China Agricultural University
28	<i>A. lignieresii</i>	P670		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
29	<i>A. lignieresii</i>	P155		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
30	<i>A. lignieresii</i>	P671		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
31	<i>A. lignieresii</i>	ATCC 49236 (NCTC 4189)		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
32	<i>A. minor</i>	NM 305		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
33	<i>A. rossii</i>	ATCC 27072		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
34	<i>A. suis</i>	CAPM (CCM) 5586		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
35	<i>A. equuli</i>	NCTC 8529		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
36	<i>Mannheimia (Pasteurella) haemolytica</i>	NCTC 9380		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
37	<i>Pasteurella aerogenes</i>	ATCC 27883		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
38	<i>Pasteurella multocida</i>	CCUG 17976B		丹麦兽医研究所 Danish Veterinary Institute
39	<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 27336		上海出入境检验检疫局微生物室 Shanghai Export and Import Inspection and Quarantine Bureau
40	<i>E. coli</i>	ATCC 44338		上海出入境检验检疫局微生物室 Shanghai Export and Import Inspection and Quarantine Bureau

1.2 样品

华南农业大学分别于 2004 年 2 月 21 日、3 月 20 日提供 7 个肺组织病料和 1 个人工感染肺组织。上海检验检疫局动监处及浦江局于 2004 年 2 月 17 日至 6 月 7 日从上海大昌屠宰场、新龙猪场采集的临床健康的猪肺、扁桃体和鼻拭子等样品共 142 份。

1.3 引物

根据 GenBank 中 App 的 apxIVA 毒素基因序列, 设计了 1 对特异性引物 FP 和 RP 以及 TaqMarrMGB 探针, 序列见表 2, 引物和探针由上海基康公司合成。

表 2 试验所用引物和探针序列

Table 2 Primers and probe sequence used in test

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence	位置 Location
FP ^a	cggagaaaataacgatttgattattaa	254~ 280 ^c
RP ^b	gtgtgaataccaatttgaaccg	307~ 329 ^c
Probe	FAM attattaagtgaggataaagtc	284~ 305 ^c

a. 上游引物 forward primer; b. 下游引物 reverse primer; c. Nucleotide location in AF188867

1.4 细菌培养及 DNA 提取

1~ 12 型 App 菌株和 *A. minor* 涂布接种于

PPLO 琼脂平板^[4]上,其他菌株涂布接种于普通血琼脂平板,在 5% CO₂ 条件下,37 °C 培养 24 h 后用灭菌三蒸水洗下平板上的细菌菌落,离心后收集菌体用于 DNA 提取。细菌 DNA 按常规提取^[5]。

1.5 实时荧光 PCR

实时荧光 PCR 扩增体系 25 μ L(大连宝生物公司 TaKaRa real-time PCR core kit): 5 \times real time PCR Buffer(Mg²⁺ free) 5 μ L, Mg²⁺ solution(250 mmol/L) 0.5 μ L, dNTP mixture(各 10 mmol/L) 0.75 μ L, TaKaRa Ex-Taq HS(5U/ μ L) 0.25 μ L, 上、下游引物各(10 μ mol/L) 0.5 μ L, TaqMar MGB 探针(5 μ mol/L) 0.6 μ L, DNA(10~50ng/ μ L) 模板 1 μ L, 超纯水补至 25 μ L, 实时荧光 PCR 扩增在 ABI PRISM 7700 定量 PCR 扩增仪上进行。两步法扩增反应程序:50 °C 2 min, 预变性 95 °C 10 min; 然后 95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 循环 50 次。

1.6 灵敏度试验

紫外分光光度计测量 WF83(S7) 的 DNA 浓度,系列 10 倍稀释后进行荧光 PCR 反应,测试荧光 PCR 检测 DNA 的灵敏度。将 WF83(S7) 的细菌悬浮液系列 10 倍稀释后进行平板记数和 PCR 反应,检测 PCR 反应检测细菌的灵敏度。

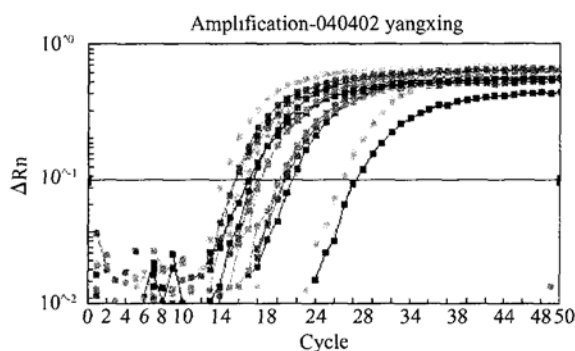
1.7 组织样品的 PCR 检测

取组织 0.5~1 g 剪碎,加入 1 mL PBS 缓冲液,匀浆。鼻拭子在 1 mL PBS 缓冲液中反复挤压。将挤下的液体和组织匀浆液 1 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀。上清 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清。沉淀加入 50 μ L PBS 和 1 μ L Tween-20, -20 °C 冷冻 15 min,取出立即置 100 °C 水浴中煮沸 5 min,重复冻煮 2 次,10 000 r/min 离心 5 min,取上清 1 μ L 进行 PCR 扩增。

2 结果

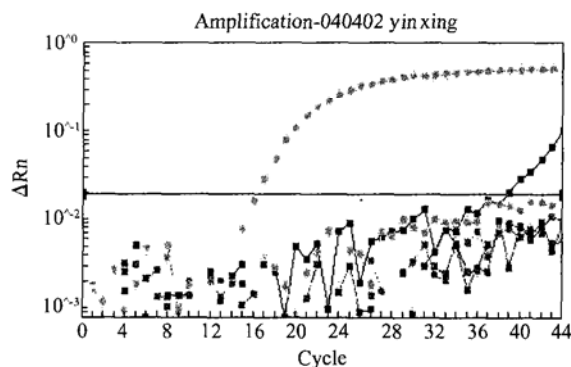
2.1 荧光 PCR 扩增

经实时荧光 PCR 扩增,16 个 App 参考株及 11 个国内 App 菌株都出现荧光增长曲线,有强的荧光信号,表现为阳性扩增,空白对照无扩增,见图 1。其它 13 个非 App 菌株则没有检测到荧光信号,表现为阴性,见图 2。图 2 中的扩增曲线为 App 阳性对照,空白对照无扩增。结果表明引物和探针可特异性地扩增检测 App。



Left-right, represent 27 stains of App, and negative control respectively
图 1 App 菌株的实时荧光 PCR 检测结果

Fig. 1 Amplification of *A. pleuropneumoniae* by real-time PCR



Left-right, Represent 13 reference strains, DNA of WF83, and negative control respectively
图 2 对照菌株的实时荧光 PCR 检测结果

Fig. 2 Amplification of reference strains by real-time PCR

2.2 灵敏度试验

实时荧光 PCR 检测不同浓度的 DNA 和不同稀释度菌悬浮液。WF83 的 DNA 稀释度分别为每微升含 DNA 12 ng、1.2 ng、120 pg、12 pg、1.2 pg、120 fg、12 fg、1.2 fg, 结果实时荧光 PCR 检测 12 fg~12 ng 都出现阳性扩增,1.2 fg 和空白对照无扩增,最低能检出 12 fg DNA。WF83 的菌悬液稀释度为每微升含 51 000 CFU、5 100 CFU、510 CFU、51 CFU、5.1 CFU、0.51 CFU、0.051 CFU。经检测,前 5 个稀释度出现阳性扩增,后 2 个稀释度及空白对照无扩增,最低能检出 5.1 CFU。

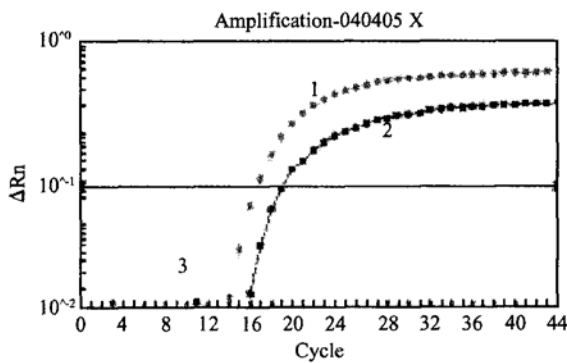
2.3 样品的荧光 PCR 检测

从上海和广州的扁桃体、喉、肺组织及鼻拭子等 150 份样品中检出 App 阳性 23 份(表 2),其中阳性扁桃体检测结果参见图 3,图中 App 阳性对照(1)和

扁桃体样品(2)有扩增,空白对照(3)无扩增。

表3 检测的样品
Table3 samples detected by real-time PCR

来源 Origin	样品 Sample	组织 Tissue	阳性样品 Positive samples
华南农业大学 South China Agricultural University	7	肺 Lung	7
APP 人工感染 Pig infected using App	1	肺 Lung	1
上海屠宰场 Slaughterhouse in Shanghai	68	鼻拭子 Nasal swab	11
上海屠宰场 Slaughterhouse in Shanghai	21	扁桃体 Tonsil	1
上海屠宰场 Slaughterhouse in Shanghai	33	肺 Lung	2
上海猪场 Pig farm in Shanghai	4	肺 Lung	0
上海猪场 Pig farm in Shanghai	4	扁桃体 Tonsil	0
上海猪场 Pig farm in Shanghai	4	淋巴结 Lymph node	0
上海猪场 Pig farm in Shanghai	4	喉 Larynx	0
上海猪场 Pig farm in Shanghai	4	鼻拭子 Nasal swab	1
总计 Total	150		23



C1. DNA of App(WF83); B1. Tonsillar sample from Shanghai; C5. No DNA template

图3 上海扁桃体样品的实时荧光 PCR 检测
Fig.3 Amplification of tonsillar sample from Shanghai by real-time PCR

3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来,各国学者对 App 的分子生物学检测技术进行了大量的研究。Marc 等^[6]、Marianne 等^[7]、Trine 等^[4]建立了检测部分 App 血清型的方法。1999 年瑞士 Schaller 首次报道了编码 App 毒素 Apx IVA 的基因 apx IVA^[8],并于 2001 年建立了检测 App 14 个血清型的 PCR 方法^[9]。国内刁祥等建立了可检测 App12 个血清型的核酸探针检测技术^[10]。常规 PCR 方法使用 EB,易造成环境污染。另外,样品中 App 含量一般较低,要使用

套式 PCR 才能检出,需要的时间较长。随着荧光 PCR 仪的普及,越来越多的疾病使用荧光 PCR 进行检测。实时荧光 PCR 检测 App 时,除了引物需匹配外,扩增序列也必须与探针的序列完全一致才能得到阳性的荧光信号,因此特异性更好,优于一般的 PCR 方法。本试验采用这一技术,在国内首次用于检测 App,而且检测了 App 的全部 15 个血清型的菌株。目前只有丹麦学者根据外膜脂蛋白的基因序列建立可检出 14 个血清型荧光 PCR 的报道^[2]。

3.1 样品的前处理

实时荧光 PCR 检测对细菌培养物的要求不高,细菌的菌悬液就可以直接进行 PCR 扩增。但是组织样品检测时,样品中蛋白和脂类等的影响比较大,样品必须经过适当的处理。否则影响结果的可重复性。因此在样品检测时,用样品处理液采用的 3 个稀释度(原液, 10×, 100×),最大限度地减少组织成分中抑制因子的影响。

3.2 低含菌量样品的检测

样品中 App 的 CFU 水平高低不一,而实时荧光 PCR 的拐点与 DNA 原始量有关。含量越大,拐点出现越早,含量越低,拐点出现越晚。试验中只有个位数细菌时,拐点大约在 35 左右,此时难以判断结果。因此,试验中将菌含量低、不易判定结果的样品先进行套式 PCR 的第一轮扩增,其产物再用于实时荧光 PCR 检测,取得了比较理想的结果。

3.3 与细菌分离的比较

检测的 1 份人工感染肺组织和 149 份临床样品,选择 44 份进行菌株分离,结果仅从人工感染肺组织和 7 份华南农业大学肺组织病料中分离到 App 菌株(华南农业大学肺组织菌株由华南农业大学分离出)。说明从急性发病的组织或人工感染组织中易分离到 App 菌株,很难从临床健康的猪组织中分离到菌株,与国外学者的观点一致(与 Pat Blackall 私人通信)。这也是建立 PCR 诊断方法的意义所在。

3.4 与套式 PCR 的比较

建立实时荧光 PCR 检测方法的同时,作者也建立了套式 PCR 方法(另文报道)。两个检测方法的灵敏度为同一个数量级。用两种方法检测了 150 份样品,前者有 23 份阳性,而后者有 28 份阳性,且 28 份的阳性完全覆盖了 23 份的阳性。从试验的结果看,套式 PCR 比实时荧光 PCR 更为敏感,其原因可能是处理样品中的组织成分对套式 PCR 的结果影响较小的缘故。因此,App 的细菌鉴定作者建议用实时荧光 PCR,可在短时间内出结果。至于样品的检测,则建议用套式 PCR,或用套式的第一轮产物再进行实时荧光 PCR,这样可减少漏检。

致谢:上海出入境检验检疫局动食中心转基因实验室潘良文、沈禹飞、张舒亚给予无私的帮助,微生物实验室李晓红女士提供了大肠杆菌和肺炎球菌。张树宏先生给予菌株生化鉴定指导;华南农业大学传染病教研室提供了分离菌株及病料;上海检验检疫局动监处及浦江局提供检测样品;本文承蒙南京农业大学陆承平教授审阅,在此一并致谢。

参考文献:

[1] Blackall P J, Klaasen H, Van Den Bosch H, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15 [J]. *Vet Microbiol*, 2002,

84: 47~ 52.

- [2] Øystein A, Jannie J, Dorte T L. Evaluation of 5' nuclease assay for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 260~ 265.
- [3] Gram T, Ahrens P, Andreassen M. 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.
- [4] Trine G, Peter A. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(2): 443~ 448.
- [5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 39~ 40.
- [6] Marc S, Edmond G L, Roger C L. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction [J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(6): 1 183~ 1 187.
- [7] Marianne B, Johannes F, Van D S, et al. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(11): 2 749~ 2 754.
- [8] Schaller A, Kuhn R, kuhnert P, et al. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Microbiol*, 1999, 145: 2 105~ 2 116.
- [9] Schaller A, Steven P D, Graeme J E, et al. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apx IVA* [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 79: 47~ 62.
- [10] 刁有祥, 丁家波, 姜世金, 等. 地高辛标记探针检测猪胸膜炎放线杆菌的研究与应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 585~ 589.

The Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Real-time PCR

LI Shu-qing¹, YI Jian-ping¹, LI Jian¹, HU Yong-qiang¹, WANG Qiao-quan¹,
CHEN Zhi-fei¹, ZHOU Xiao-hua¹, PAN Xiao-zhong¹, LUO Man-lin², CHEN Min¹

(1. Shanghai Export and Import Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;
2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Primers FP/ RP and TaqMan-MGB Probe were designed from sequence of *apxIVA* gene specific to all serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A real-time PCR method was developed for detecting *Actinobacillus pleuropneumoniae*, which can amplify all strains of APP. The sensitivity is 12fg DNA or 5. 1CFU bacteria. This method can be directly used for detection of APP without DNA extraction.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; real-time PCR; detection