

蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌 三重 PCR 检测方法建立与应用

胡 慧, 李田美, 姜艳芬*

(西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:针对蜡样芽孢杆菌(*B.cereus*)的 *hblA* 基因、产色葡萄球菌(*S.chromogenes*)的 *sodA* 基因和肺炎克雷伯氏菌(*K.pneumoniae*)的 *khe* 基因,建立了三重 PCR 检测方法。结果显示,退火温度为 54 °C, BC-*hblA*、SC-*sodA* 和 KP-*khe* 引物浓度分别为 0.6、0.2、0.1 μmol/L 为最佳扩增条件;对 *B.cereus*、*S.chromogenes* 和 *K.pneumoniae* 的基因组 DNA 最低检测限分别为 35.8、6.3、40.2 pg/μL, 菌液最低检测限分别为 9.9×10^3 、 1.1×10^3 、 1.0×10^4 CFU/mL。特异性试验显示,除这 3 种菌以外,大肠埃希氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、产气荚膜梭菌和腐败梭菌检测结果均为阴性。14 份临床乳房炎乳样的检测结果显示,三重 PCR 方法 *B.cereus*、*S.chromogenes* 和 *K.pneumoniae* 的阳性率分别为 35.7%(5/14)、14.3%(2/14)和 7.1%(1/14),其中蜡样芽孢杆菌的 PCR 检测阳性率高于细菌分离鉴定阳性率(28.6%),细菌分离鉴定与 PCR 检测方法的阳性符合率为 87.5%。结果表明,成功建立了能够同时检测蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的三重 PCR 方法,为引起乳房炎的病原菌的检测补充了新的方法,并为畜牧生产中这 3 种细菌的快速检测提供了有效方法。

关键词:奶牛乳房炎;蜡样芽孢杆菌;产色葡萄球菌;肺炎克雷伯氏菌;三重 PCR

中图分类号:S854.43;S857.26

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2022)07-0001-06

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2022.07.002

奶牛乳房炎是由理化因素刺激和多种病原微生物感染引起的一种乳腺疾病,严重威胁奶牛养殖业和乳制品行业发展,每年给全球造成的经济损失高达 350 亿美元^[1]。据统计,我国奶牛临床乳房炎发病率为 20%~75%,而在某些地区发病率甚至超过 75%^[2],引起奶牛乳房炎的病原菌种类繁多,以葡萄球菌属、肠杆菌属、链球菌属和芽孢杆菌属为主,由于地域、气候等因素的不同,各个地区主要致病菌也有所差异^[3-4]。

前期研究对陕西关中地区 3 个奶牛养殖场采集的 126 份临床乳房炎乳样进行细菌分离纯化、16S rDNA 鉴定和生化鉴定,共分离纯化得到 11 个属的病原菌,其中蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的分离率较高,分别为 15.9%、11.9% 和 4.8%,且肺炎克雷伯氏菌均分离自经过头孢唑肟和头孢噻唑轮换用药治疗的乳房炎乳样。蜡样芽孢杆菌已成为引起欧洲食物中毒事件的第三大常见

菌^[5],摄入被蜡样芽孢杆菌污染的食物会引起恶心、呕吐和腹泻,同时该菌也是引起奶牛乳房炎的重要环境致病菌,能依附于其他细菌加快黏附并定植于乳房上皮细胞中,导致乳腺的感染,严重者可致奶牛死亡。Fei P 等^[6]从奶牛场 350 个环境和生牛乳样本中共检测到 56 株蜡样芽孢杆菌,若管理和清洁不当,则是引起乳房炎的潜在威胁。产色葡萄球菌是牛、绵羊、山羊中常见的皮肤共生和机会性乳房炎病原体,同时也是奶牛乳房炎常见病原菌凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)中分离率最高的细菌,能产生多种肠毒素,引起乳房持续性的感染,导致乳体细胞计数增加和牛奶的品质下降,在欧洲和美国被认为是引起奶牛亚临床乳房炎的最常见非金黄色葡萄球菌之一^[7-8]。肺炎克雷伯氏菌是重要的条件性致病菌,广泛存在于自然界中,可引起严重的肺炎、血液感染、临床乳房炎^[9]。Gao J 等^[10]从中国 13 个省的 123 个奶牛场临床型乳房炎的奶样中共分离肺炎克雷伯

收稿日期:2021-12-27

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2021NY-026)

作者简介:胡 慧(1997-),女,四川德阳人,硕士研究生,主要从事兽医公共卫生学研究。* 通讯作者

氏菌 124 株(51%)。该菌对 β -内酰胺类抗生素有耐药性^[11],并且能够迅速传播和转移,抗生素治疗效果不理想,从而导致乳腺的长期感染和产奶量大幅度降低^[12],且奶牛康复后也无法恢复正常生产水平,造成严重的经济损失。因此,致病菌的快速检测对于临床治疗与防控至关重要。

目前,国内外学者已针对乳房炎常见病原建立了单项^[13]以及多重 PCR 检测方法^[14-16],但尚无同时检测这 3 种病原菌的多重 PCR 方法报道,本研究建立了蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌及肺炎克雷伯氏菌的三重 PCR 方法,为畜牧生产及可能引起奶牛乳房炎的相应病原菌的检测提供高效、特异的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和引物 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产色葡萄球菌(*Staphylococcus chromogenes*)由西北农林科技大学兽医公共卫生实验室分离鉴定并保存;大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、沙门氏菌(CVCC2185)、金黄色葡萄球菌(ACCC 01011)、链球菌(CVCC 1887)、产气荚膜梭菌(CVCC49)、腐败梭菌 C55-1(CVCC60021),购自中国兽医微生物菌种保藏中心,由西北农林科技大学兽医公共卫生实验室保存。

根据 GenBank 中收录的基因序列信息并参考相关文献^[17-19],引用蜡样芽孢杆菌的溶血素基因 *hblA*、肺炎克雷伯氏菌的溶血毒素基因 *khe*、产色葡萄球菌的超氧化物歧化酶 *sodA* 引物序列,并由北京擎科生物科技有限公司合成。引物的序列、扩增片段长度见表 1。

表 1 三重 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for triplex PCR

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	长度/bp Length
BC- <i>hblA</i>	F-GGACACGATGTTAGAGCATTTGG R-GATACAGCGAGTAGTTTATTAGGGATT	995
KP- <i>khe</i>	F-ACTATACAGACAGATCATTCAACC R-TTAGGAGCAGTTAGAACTACAG	425
SC- <i>sodA</i>	F-GCGTACCAGAAGATAAACAACACT R-CATTATTTACAACGAGCCATGC	222

1.1.2 主要试剂 普通营养琼脂培养基、脑心浸出液肉汤培养基(BHD),青岛科源生物科技公司产品;DNA 标准 DL 2 000,近岸蛋白质科技有限公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有

限公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 生物显微镜,重庆中显光电仪器有限公司产品;PCR 仪、冷冻高速离心机,Eppendorf AG 公司产品;电泳仪,北京六一生物科技有限公司产品;生化培养箱,宁波江南仪器厂产品;NanoDrop OneC,Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 单项 PCR 检测方法的建立 蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯氏菌和产色葡萄球菌分别接种到 BHI 液体培养基,37 °C 培养 24 h,按照细菌基因组提取试剂盒推荐步骤提取细菌基因组 DNA。分别以 3 种菌的细菌基因组 DNA 为模板,以 ddH₂O 为阴性对照,进行单项 PCR 扩增。PCR 反应体系:2×ES Taq Mastermix 12.5 μ L,上、下游引物各 1.25 μ L(10 μ mol/L),DNA 模板 1 μ L,灭菌 ddH₂O 9 μ L。反应程序:94 °C 10 min;94 °C 30 s,52 °C 30 s,72 °C 45 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增完成后,将 PCR 产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像,观察结果并保存。

1.2.2 三重 PCR 检测方法的建立

1.2.2.1 扩增条件的优化 以 3 种菌的混合 DNA 为模板,对 PCR 反应的引物浓度、退火温度等进行优化,以确定最佳反应体系和反应程序。反应体系为:2×ES Taq Mastermix 12.5 μ L,不同组合浓度的 3 对引物,模板 DNA 混合物 1 μ L,灭菌 ddH₂O 将反应体积补至 25 μ L。反应程序:94 °C 10 min;然后 94 °C 30 s,52 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。对退火温度(50、50.9、52.3、54.0、56.3、58.1、59.3、60 °C)、各引物浓度组合(BC-*hblA*、KP-*khe*、SC-*sodA* 引物浓度(μ mol/L)分别为 0.4、0.1、0.2;0.4、0.1、0.1;0.4、0.15、0.2;0.4、0.15、0.1;0.6、0.1、0.2;0.6、0.1、0.1;0.6、0.15、0.2;0.6、0.15、0.1)等反应条件进行优化,筛选出三重 PCR 扩增的最佳反应条件。

1.2.2.2 特异性试验 采用优化后的扩增条件及程序分别以蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、产气荚膜梭菌、腐败梭菌的 DNA 为模板,进行三重 PCR 扩增反应。

1.2.2.3 敏感性试验 将过夜培养的蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌菌液用平板法进行计数。然后直接取蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯氏菌、产色葡萄球菌菌液混合并进行 10 倍倍比稀释,以各梯度菌液作为模板,采用优化后的三重 PCR 扩增条件进行反应。此外,分别提取蜡样芽孢杆菌、产

色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌 DNA,并用 NanoDrop OneC 超微量紫外分光光度计测量 3 种细菌基因组 DNA 浓度,然后混合 3 种 DNA 并进行 10 倍倍比稀释,以各梯度 DNA 为模板,采用优化后的三重 PCR 扩增条件进行反应。

1.2.2.4 稳定性试验 应用建立的三重 PCR 方法,分别取蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌的 DNA 样品各 2 份,每隔 1 周进行 1 次试验,重复检测 3 次,验证三重 PCR 的稳定性。

1.2.3 样品采集及检测 2020 年 10 月,在陕西关中地区某奶牛场采集临床型乳房炎乳样共 14 份,采样前先经消毒液喷淋乳房及腹部体表以清除污物,再用消毒毛巾(一牛一巾)擦拭乳房和乳头部位,弃去前 3 把乳,收集 30 mL 乳汁于灭菌试管中,置于冰盒中于 6 h 内带回实验室。同时应用三重 PCR 方法和传统的分离培养及 16S rDNA 测序进行乳样细菌的检测。取奶样 1 mL 接入 9 mL 的 BHI 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养 6 h~8 h,提取细菌基因组 DNA,以 ddH₂O 为阴性对照,3 种细菌混合 DNA 为阳性对照,应用三重 PCR 方法检测;同时将乳样颠倒混匀,均匀涂抹于血平板上(50 mL/L 绵羊血),37 °C 培养 24 h。分别选择不同形态特征的菌落经革兰氏染色观察细菌的形态后,再划线接种到 BHI 琼脂培养 24 h~48 h。挑取经镜检确认纯化的菌落接种到 BHI 液体培养基,37 °C、180 r/min 过夜培养后划线,选取单菌落模板进行 16S rDNA PCR 扩增,符合测序标准的扩增产物送至北京擎科生物公司测序。测序结果在 NCBI 网站进行 Blast 序列比对,确定细菌种属。

2 结果

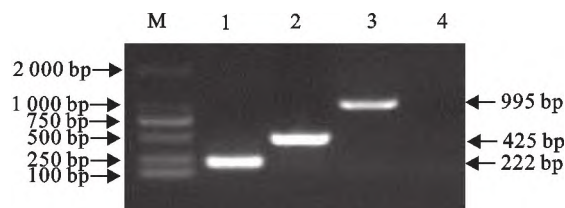
2.1 单项 PCR 的建立

分别对 3 种 DNA 进行单项 PCR 扩增后,蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯氏菌、产色葡萄球菌分别在 995、425、222 bp 处扩增出与目的条带大小相符的特异性条带(图 1),ddH₂O 阴性对照无扩增条带。

2.2 三重 PCR 检测方法的建立

2.2.1 退火温度的优化 将 3 种 DNA 等比例混合作为模板,选择不同的退火温度(50 °C~60 °C)进行三重 PCR 扩增,结果表明,退火温度在 52.3 °C~54.0 °C 扩增效果较好,确定 54.0 °C 为最佳退火温度(图 2)。

2.2.2 引物浓度的优化 取不同浓度的引物组合进行三重 PCR 反应,结果表明 BC-*hblA*、SC-*sodA*、KP-*khe* 引物浓度分别为 0.6、0.2、0.1 μmol/L 时扩增效果最好(图 3)。

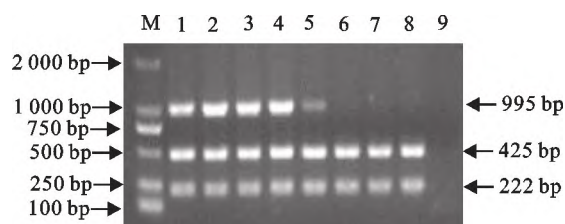


M.DNA 标准 DL 2 000;1.产色葡萄球菌;2.肺炎克雷伯氏菌;3.蜡样芽孢杆菌;4.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1.*S.chromogenes*;2.*K.pneumoniae*;3.*B.cereus*;4.ddH₂O

图 1 单项 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of single PCR amplification

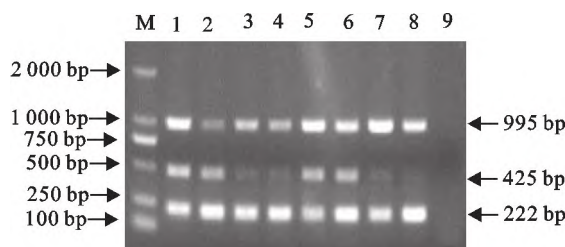


M.DNA 标准 DL 2 000;1~8,退火温度分别为 50、50.9、52.3、54.0、56.3、58.1、59.3、60 °C;9.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1-8. Annealing temperatures were 50, 50.9, 52.3, 54.0, 56.3, 58.1, 59.3 and 60 °C, respectively;9.ddH₂O

图 2 三重 PCR 退火温度的优化

Fig.2 Optimization of annealing temperature of the triplex PCR



M.DNA 标准 DL 2 000;1~8.BC-*hblA*、KP-*khe*、SC-*sodA* 引物浓度(μmol/L)的组合分别为 0.4、0.1、0.2;0.4、0.1、0.1;0.4、0.15、0.2;0.4、0.15、0.1;0.6、0.1、0.2;0.6、0.1、0.1;0.6、0.15、0.2;0.6、0.15、0.1;9.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1-8.Primer concentrations (μmol/L) for BC-*hblA*、KP-*khe*、SC-*sodA* were 0.4, 0.1, 0.2; 0.4, 0.1, 0.1; 0.4, 0.15, 0.2; 0.4, 0.15, 0.1; 0.6, 0.1, 0.2; 0.6, 0.1, 0.1; 0.6, 0.15, 0.2; 0.6, 0.15, 0.1 respectively;9.ddH₂O

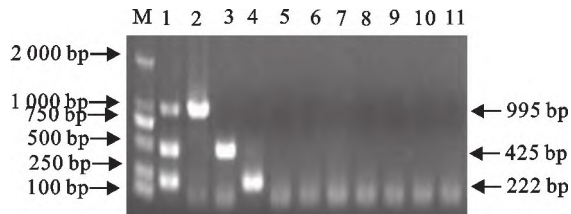
图 3 三重 PCR 引物浓度的优化

Fig.3 Optimization of primers concentration of the triplex PCR

2.2.3 特异性检测 采用优化好的扩增条件进行三重 PCR 的特异性检测,结果显示以产色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏菌 DNA 为模板均可扩增出特异的目的片段,而以其他常见细菌 DNA 和 ddH₂O 阴性对照均未扩增出相应的条带(图 4),表明建立的三重 PCR 方法的特异性较好。

2.2.4 敏感性检测 以蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球

菌、肺炎克雷伯氏菌菌液混合后 10 倍梯度稀释作为模板,采用优化好的扩增条件进行三重 PCR 反应,结果显示,该方法对蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌最低检测限为 9.9×10^3 、 1.1×10^3 、 1.0×10^4 CFU/mL(图 5)。

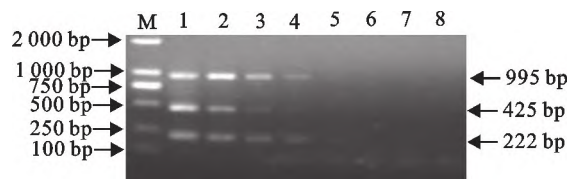


M.DNA 标准 DL 2 000;1~4.分别为混合 DNA、蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯氏菌、产色葡萄球菌;5~10.分别为大肠埃希氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、产气荚膜梭菌、腐败梭菌;11.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1-4.Mixed genomic DNA of *S.chromogenes*, *K.pneumoniae* and *B.cereus*; *B.cereus*, *K.pneumoniae*, *S.chromogenes*;5-10. *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *Streptococcus*, *C.perfringens*, *C.septicum*, respectively;11.ddH₂O

图 4 三重 PCR 的特异性检测

Fig.4 The specificity test of the triplex PCR

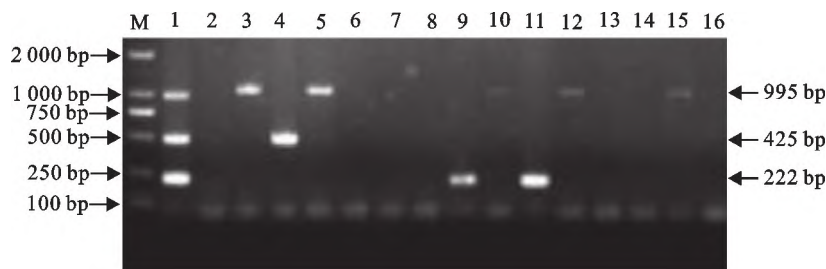


M.DNA 标准 DL 2 000;1~7.分别为混合菌液的 $10^0 \sim 10^6$ 倍比稀释;8.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1-7.Mixed bacterial solutions by $10^0 \sim 10^6$ times dilutions;8.ddH₂O

图 5 三重 PCR 菌液浓度的敏感性测定

Fig.5 The sensitivity test of the triplex PCR of bacterial culture concentration



M.DNA 标准 DL 2 000;1.混合 DNA;2~15.样品;16.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1.Mixed DNA;2-15.Samples;16.ddH₂O

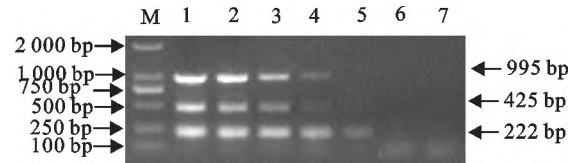
图 7 样品的三重 PCR 检测

Fig.7 Detection of samples by triplex PCR

3 讨论

食品安全问题受到人们的广泛关注,奶源的安全问题乃重中之重。大规模使用抗生素造成的抗生素残留以及细菌耐药性增高导致奶牛乳房炎治疗困

难,使得快速检测出主要致病菌成为奶牛乳房炎科学防控的前提。本实验室前期调查结果表明,陕西部分地区奶牛乳房炎乳样中蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌 DNA 最低检测限分别为 35.8、6.3、40.2 pg/ μ L(图 6)。



M.DNA 标准 DL 2 000;1~6.分别为混合 DNA 的 $10^0 \sim 10^5$ 倍比稀释;7.ddH₂O

M.DNA Marker DL 2 000;1-6.Mixed DNA by $10^0 \sim 10^5$ times dilutions;7.ddH₂O

图 6 三重 PCR DNA 浓度的敏感性测定

Fig.6 The sensitivity test of DNA concentration of the triplex PCR

2.2.5 稳定性检测 应用建立的三重 PCR 方法在不同时间对每份样品重复检测 3 次,结果显示 3 次的检测结果是一致的,表明该方法具有良好的可重复性。

2.3 样品采集及检测

应用建立的三重 PCR 方法和传统细菌分离培养方法同时对 14 份临床乳房炎乳样进行检测。结果显示,传统的细菌分离培养方法检测蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的样品阳性率分别为 28.6% (4/14)、14.3% (2/14) 和 7.1% (1/14),三重 PCR 方法蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的阳性率分别为 35.7% (5/14)、14.3% (2/14) 和 7.1% (1/14)(图 7),其中蜡样芽孢杆菌的 PCR 检测阳性率高于细菌分离鉴定阳性率,总体细菌分离鉴定与 PCR 检测方法的阳性符合率为 87.5%。

芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏菌耐药情况较为严重。

近年来的研究建立了针对奶牛乳房炎的主要致病菌金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、无乳链球菌等的多重 PCR 方法。马保臣等^[15]建立的四重 PCR 方法对牛奶中金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌单项检测限度分别为 10^4 、 10^2 、 10^3 、 10^3 CFU/mL,该方法未进行 4 种病原菌混合样品的敏感性测定。Ashraf A 等^[16]建立了包括产色葡萄球菌在内的 9 种乳房炎病原菌的多重 PCR 方法,该方法虽然特异性强,敏感性达到 $50 \text{ pg}/\mu\text{L}$,但操作难度高且不易推广。陈亚明^[17]建立的单项 PCR 对无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌最低检测限为 $0.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$,对大肠埃希氏菌的最低检测限 $0.01 \text{ pg}/\mu\text{L}$,虽然单项 PCR 灵敏度高,但其建立的多重 PCR 敏感性较单项 PCR 方法低。Shome B R 等^[19]建立的多重 PCR 对细菌组合的牛奶稀释液提取的 DNA 进行检测时表皮葡萄球菌、产色葡萄球菌、溶血链球菌的最低检测限为 10^2 CFU/mL,与本研究菌液灵敏度相似,但该方法仍需在菌液浓度范围内提取细菌基因组 DNA 进行检测。王宇^[20]建立了金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌绿的重 PCR 方法,其灵敏度分别为 5.97×10^{-2} 、 6.68×10^{-2} 、 $5 \times 10^{-2} \text{ ng}/\mu\text{L}$,与本研究的 DNA 的最低检测量分别为 35.8、6.3、40.2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 的灵敏度相近。

本研究成功建立了能够同时检测蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的三重 PCR 方法,特异性好,对菌液以及 DNA 均具有较高灵敏度,对 3 种细菌菌液的最低检测量分别为 9.9×10^3 、 1.1×10^3 、 1.0×10^4 CFU/mL;对临床样品的检测与传统细菌分离鉴定相比较,检出率高。在检测乳房炎病原菌时如果没有检测到大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌或链球菌等常见病原菌,尤其经过常规用药未见效果时,建议应用本研究建立的方法进行检测以明确病原并采取相应的治疗措施。与传统的分离鉴定方法相比,本研究建立的三重 PCR 方法可以直接应用菌液作为模板进行 PCR 扩增而不需要提取细菌组 DNA,明显缩短了检测时间,为明确引起乳房炎的病原菌的检测补充了新的方法,并为畜牧生产中这 3 种细菌的快速检测提供了有效方法。

参考文献:

[1] GUO W J, LIU J X, LI W, et al. Niacin alleviates dairy cow mastitis by regulating the GPR109A/AMPK/NRF2 signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3321–3338.
 [2] 牛桂锋. 奶牛乳房炎的诊断与防控的研究进展[J]. *中国动物保健*, 2021, 23(8): 32–34.
 [3] DALANEZI F M, JOAQUIM S F, GUIMARES F F, et al. Influen-

ence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(4): 3648–3655.
 [4] 赵秋云, 安 乐, 邢福珊, 等. 陕西地区临床型奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *家畜生态学报*, 2016(1): 68–72.
 [5] GLASSET B, HERBIN S, GRANIER S A, et al. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections; epidemiologic and genetic survey[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0194346–4365.
 [6] FEI P, YUAN X, ZHAO S, et al. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from raw milk and cattle farm environments[J]. *Curr Microbiol*, 2019, 76(11): 1355–1360.
 [7] HUEBNER R, MUGABI R, HETESY G, et al. Characterization of genetic diversity and population structure within *Staphylococcus chromogenes* by multilocus sequence typing [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0243688–3705.
 [8] 赵华男, 瞿 玥, 韩 博, 等. 奶牛乳房炎源性产色葡萄球菌的肠毒素基因检测[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(5): 24–27.
 [9] MARTIN R M, BACHMAN M A. Colonization, infection and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 4.
 [10] GAO J, LI S M, ZHANG J, et al. Prevalence of potential virulence genes in *Klebsiella* spp. isolated from cows with clinical mastitis on large chinese dairy farms[J]. *Foodb Pathog Dis*, 2019, 16(12): 856–863.
 [11] TZOUVELEKIS L S, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOGIOU M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25: 682–707.
 [12] CHENG J, ZHANG J, HAN B, et al. *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis is cytopathogenic for bovine mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(4): 3493–3504.
 [13] 廖光华, 代佳君, 邓钰萍, 等. 基于 *nuc* 基因的奶牛乳房炎性金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法的建立[J]. *塔里木大学学报*, 2019, 31(4): 7–11.
 [14] 陈亚明, 杜玉兰, 聂 培, 等. 奶牛乳房炎 3 种主要致病菌三重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2014, 31(7): 82–85.
 [15] 马保臣, 秦卓明, 蔡玉梅, 等. 多重 PCR 检测奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌方法的建立与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 31(11): 1202–1208.
 [16] ASHRAF A, IMRAN M, YAQUB T, et al. A novel multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogenics associated with bovine mastitis[J]. *Mol Cell Probes*, 2017, 33: 57–64.
 [17] 陈亚明. 奶牛乳房炎致病菌分离鉴定及快速诊断试剂盒的研发与应用[D]. 广西南宁: 广西大学, 2014.
 [18] 冯 娜, 高 翔, 肖 敏, 等. 牛源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及遗传进化分析[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(11): 1358–1364.
 [19] SHOME B R, DAS MITRA S, BHUVANA M, et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogenics[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(6): 1349–1356.
 [20] 王 宇. 奶牛隐性乳房炎金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和绿脓杆菌的三重 PCR 检测方法建立及应用[D]. 四川成都: 四川农业大学, 2019.

猪链球菌血清 9 型菌株分离鉴定及强毒株筛选

李倩倩, 梁 玗, 刘锦锦, 金 清, 龙云志, 杨 柳, 黄 英, 余道兵, 宋文博, 黄 超*, 汤细彪*
(武汉科前生物股份有限公司, 湖北武汉 430000)

摘要:为了筛选猪链球菌血清 9 型(SS9)强毒株并研究其生物学特性,对全国各地发病猪的病料中进行猪链球菌分离培养。通过形态学观察、革兰氏染色镜检、PCR 鉴定及血清型分型确定了 29 株猪链球菌血清 9 型菌株,分别命名为 SS9-1~SS9-29。通过玉米大蜡螟幼虫和 Balb/c 小鼠对 29 株猪链球菌血清 9 型菌株进行初筛和复筛,筛选出 2 株猪链球菌血清 9 型强毒株,分别为 SS9-20、SS9-22。为进一步了解 SS9-22 的生物学特性,对其进行生长曲线绘制、毒力基因检测及小鼠致病性试验。结果显示,SS9-22 菌株在 37 °C 培养 6 h 时,菌液密度可达到最高值。毒力基因检测发现 SS9-22 的毒力基因型为 *gapdh*⁺/*stx*⁺/*fbps*⁺/*orf2*⁺/*mrp*⁻/*89K*⁻/*gdh*⁺/*epf*⁺。SS9-22 菌株经腹腔接种 Balb/c 小鼠,24 h 内可引起小鼠精神萎靡、扎堆、被毛耸立、运动迟缓、死亡等临床症状,该菌株的 LD₅₀ 为 3.2×10⁷ CFU,表明该菌株为强毒株。研究结果丰富了猪链球菌的菌种库,为猪链球菌血清 9 型的防控提供研究材料,为后续猪链球菌 9 型的致病机制研究及疫苗的开发奠定了基础。

关键词:猪链球菌 9 型;分离鉴定;毒力基因;致病性试验

中图分类号:S852.611;S858.28

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2022)07-0006-08

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种人兽共患病病原体,在临床上,可引起猪脑膜炎、关节炎、败血症或急性死亡等,而且易与其他细菌和病毒性病原混合感染,造成养猪业的巨大经济损失^[1]。该菌

收稿日期:2021-07-04

基金项目:湖北省技术创新专项重大项目(2018ABA109)

作者简介:李倩倩(1993-),女,安徽安庆人,硕士,主要从事猪病临床疾病的疫苗研发工作。* 通讯作者

Establishment and Application of Triplex PCR Method for Detecting *B.cereus*, *S.chromogenes* and *K.pneumoniae*

HU Hui, LI Tian-mei, JIANG Yan-fen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: A triplex PCR assay was developed for detecting the hemolytic gene (*hblA*) of *Bacillus cereus*, the superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Staphylococcus chromogenes* and the hemolytic enzyme gene (*khe*) of *Klebsiella pneumoniae*. The results showed that the optimized annealing temperature was 54 °C with the optimized concentrations of BC-*hblA*, SC-*sodA*, KP-*khe* primer pairs 0.6 μmol/L, 0.2 μmol/L and 0.1 μmol/L, respectively. The thresholds of detection of the triplex PCR assay were 35.8 pg/μL, 6.3 pg/μL and 40.2 pg/μL of genomic DNA of *B.cereus*, *S.chromogenes* and *K.pneumoniae*, as well as 9.9×10³ CFU/mL, 1.1×10³ CFU/mL, 1.0×10⁴ CFU/mL of bacterial cultures, respectively. The specificity test showed that *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *S.treptococcus*, *C.perfringens*, *C.septicum* were all negative except the 3 pathogens. To detect 14 milk samples from mastitis, the positive rates detected by the triplex PCR of *B.cereus*, *S.chromogenes*, *K.pneumoniae* were 35.7% (5/14), 14.3% (2/14), 7.1% (1/14), respectively, whereas the positive rate of *B.cereus* was higher than that of isolation rate (28.6%), the positive coincidence rate between bacterial isolation and triplex PCR detection was 87.5%. In summary, a triplex PCR method was established for the detection of *B.cereus*, *S.chromogenes* and *K.pneumoniae* that may cause bovine mastitis in this study, which provided an alternative method for the quick detection in animal husbandary.

Key words: bovine mastitis; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus chromogenes*; *Klebsiella pneumoniae*; triplex PCR