

鹅源巴氏杆菌的分离与鉴定

胡晓苗, 张丹俊*, 戴银, 赵瑞宏, 潘孝成, 周学利, 侯宏艳, 沈学怀, 朱传明

(安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的] 鉴定引起病死鹅肝脏表面出现大量针尖大、白色坏死点的致病菌。[方法] 取肝涂片镜检, 然后进行瑞氏-吉姆萨染色。用普通肉汤培养基和鲜血培养基进行分离和纯化, 然后用巴氏杆菌特异性引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物克隆至 PMD18-T 载体上, 送至生物公司进行测序。[结果] 序列同源性分析表明, 分离菌与多杀性禽巴氏杆菌的相似性为 99%, 结合生化试验结果确定其为多杀性巴氏杆菌。[结论] 研究可为鹅巴氏杆菌病的防治提供依据。

关键词 多杀性巴氏杆菌; 分离; 鉴定

中图分类号 S852.61*2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)06-0069-02

Isolation and Identification of *Pasteurella multocida* in Goose

HU Xiao-miao, ZHANG Dan-jun, DAI Yin et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To identify the pathogen that caused a large number of white necrosis of the needle point in the liver surface of dead geese. [Method] The microscopic examination of liver smear was observed, and Wright-Giemsa staining was conducted. After using ordinary broth and blood culture medium for separation and purification, PCR amplification was carried out by *Pasteurella multocida* specific primers. The purified product was cloned into PMD18-T vector, then sent to the biological company for sequencing. [Result] The similarity of the obtained sequencing result by comparison to *Pasteurella multocida* was 99%, which was determined as *Pasteurella multocida* combined with biochemical test results. [Conclusion] The research could provide basis for the prevention and control of pasteurellosis.

Key words *Pasteurella multocida*; Isolation; Identification

鹅巴氏杆菌病又称鹅霍乱, 是由多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, *Pm*) 引起的一种高度接触性、败血性传染病。该病发病急、死亡快, 其发病率和死亡率由于饲养管理、病原毒力等不同而存在差异。据不完全统计, 发病率高达 35%, 死亡率高达 70%, 如果出现混合感染, 死亡率可能更高, 严重威胁着我国养鹅业的健康发展。笔者取疑似感染巴氏杆菌病的病死鹅肝脏作为接种物, 接种在普通肉汤培养基和鲜血培养基上进行细菌分离和纯化, 通过生化试验鉴定挑选出生化反应相符的菌株进行保存备用。根据 GenBank 已发布的多杀性巴氏杆菌的 16S RNA 基因和 *OmpA* 基因设计 2 对引物^[1-3], 通过 PCR 检测鉴定是否为致病性巴氏杆菌。

1 材料与方法

1.1 病料 病料来源于安徽省农业科学院畜牧兽医研究所兽医临床诊断中心送检的鹅肝脏。

1.2 培养基与主要试剂 普通肉汤培养基、鲜血培养基由实验室自配; 琼脂糖、*Taq* Master Mix、DNA Marker 2000, 均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 细菌的分离与纯化 取疑似巴氏杆菌鹅的肝脏接种于普通肉汤培养基进行增菌培养, 然后挑取增菌液置于鲜血培养基上, 置于 37 °C 恒温培养箱内培养 24 h。挑取其中特征性可疑的菌落进行二次培养, 反复纯化 2 次, 得到其纯培养置于 4 °C 冰箱内保存备用。

1.4 染色镜检 从鲜血培养基上挑取 1 株纯化后的疑似菌

落进行涂片, 进行瑞氏染色镜检, 并观察其染色特性和形态。

1.5 引物的合成 根据 GenBank 已发布的巴氏杆菌的 16S RNA 和 *OmpA* 基因设计 2 对引物 (表 1), 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。利用设计的 2 对引物, 对菌株进行 PCR 检测。

表 1 设计的引物序列

Table 1 The sequence of designed primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5' - 3')	扩增片段长度 Length of amplified fragment//bp
<i>Pm</i>	Pf:ACTGAGGAATAATCAAGTTTAAAC	862
	Pr:AAAGACAGATTGGATTGATC	
<i>OmpA</i>	P1:CGCATAGCACATTGATCCTCC	201
	P2:CATAAACGCAATGACGAAACG	

1.6 PCR 检测鹅致病性巴氏杆菌 16S RNA 基因 PCR 反应体系如下: 菌液模板 1 μL, *Taq* Master Mix 10 μL, 上、下引物各 1 μL, 无菌 ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。利用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳进行观察, 拍照并记录电泳结果。

1.7 PCR 检测鹅致病性巴氏杆菌 *OmpA* 基因 PCR 反应体系如下: DNA 模板 1 μL, *Taq* Master Mix 10 μL, 上、下引物各 2 μL, 无菌 ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。利用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳进行观察, 拍照并记录电泳结果。

1.8 PCR 产物的纯化、克隆与序列分析 对 16S RNA 基因和 *OmpA* 基因的 PCR 产物按照 DNA 回收试剂盒说明书进行回收目的片段。然后, 进行 T 载体连接, 10 μL 体系包括

基金项目 安徽省农业科学院学科建设项目 (16A0411); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-40)。

作者简介 胡晓苗 (1971—), 男, 安徽望江人, 助理研究员, 博士, 从事兽医微生物与免疫学研究。* 通讯作者, 研究员, 从事畜禽传染病研究。

收稿日期 2017-12-22

PMD18-T 0.5 μL 、目的基因 4.5 μL 、solution I 5 μL 、16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。最后,转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞内,并涂布在含抗生素氨苄的培养基上置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养过夜,取经 PCR 检测出目的条带的菌落进行测序。测序工作由合肥安博森生物科技有限公司完成,对测序基因序列进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 病理剖检 病鹅剖检呈典型败血性变化,肝脏表面出现大量针尖大的白色坏死点(图 1)。

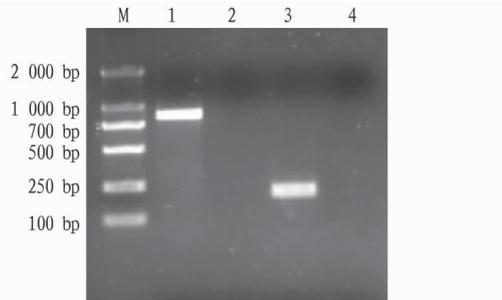


图 1 病鹅肝脏剖检结果

Fig.1 The autopsy results of diseased goose's liver

2.2 细菌分离与鉴定 接种于鲜血培养基上,呈现出半透明的灰白色、露珠样、微微隆起且表面光滑、边缘整齐的小菌落^[2]。从鲜血培养基上挑取其中单一的典型菌落进行瑞氏染色,通过镜检可见两极着色的短杆菌。

2.3 对巴氏杆菌进行 16S RNA 基因和 *OmpA* 基因检测 16S RNA 基因和 *OmpA* 基因的 PCR 扩增产物大小分别为 862 和 201 bp,与目的片段大小一致,检测结果如图 2 所示。



注:1. 16S RNA 基因扩增结果;3. *OmpA* 基因扩增结果;2 和 4 为只添加上下游引物、无模板的扩增结果

Note:1. 16S RNA gene's amplification results;3. *OmpA* gene's amplification results;2 and 4 were amplification results of forward and reverse primers without template

图 2 16S RNA 基因和 *OmpA* 基因的 PCR 检测结果

Fig.2 PCR detection results of 16S RNA and *OmpA* gene

2.4 同源性分析 对 16S RNA 基因序列进行 Blast 对比,其与多杀性巴氏杆菌 CP019081.1、CP007205.1、CP004392.1 的

同源性最高,达到 99%。对 *OmpA* 基因序列进行 Blast 对比,其与多杀性巴氏杆菌 CP020403.1、CP019081.1、KX161895.1 的同源性最高,达到 99%。因此,可确定分离菌为多杀性巴氏杆菌。

2.5 生化试验结果 对病料中分离出的细菌按照常规方法进行了生化鉴定,结果见表 2。

表 2 分离菌株的生化试验结果

Table 2 The biochemical test results of isolated bacteria

序号 No.	项目 Item	结果 Results	序号 No.	项目 Item	结果 Results
1	葡萄糖	+	6	甲基红	-
2	乳糖	-	7	V-P	-
3	甘露糖	+	8	H ₂ S	+
4	蔗糖	+	9	山梨醇	+
5	吡啶	+	10	肌醇	-

3 讨论

此鉴定方法应用于葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、禽流感等时均不能扩增出目的片段,却可从禽多杀性巴氏杆菌扩增出 862 和 201 bp 大小的特异性片段^[4-6],表明引物只对禽多杀性巴氏杆菌有特异性,敏感性强,基本不会出现杂菌干扰。生化鉴定是进行细菌鉴定分型的标准方法,但该方法所需要的时间过长,操作也相对繁琐,且所需要的仪器较多,耗费大量的人力和物力。应用 PCR 检测技术不仅可对纯培养物进行检测,又可直接从病料的初次培养物中进行检测,不必进行纯化培养,还可从病料组织中直接提取 DNA,操作简单,大大缩短检测所需时间,能达到准确、快速诊断的目的,对于及早采取有效的防治措施具有重要的实践意义^[7-9]。

参考文献

- [1] 李浩,刘阳,李长安.多杀性巴氏杆菌病研究进展[J].畜牧兽医杂志,2011,30(2):31-33.
- [2] 高明燕,徐步,赵宝华,等.多杀性巴氏杆菌检测、鉴定和分型研究进展[J].动物医学进展,2010,31(1):67-72.
- [3] 管宇,沈志强,刘吉山,等.应用 16S rRNA 基因测序法鉴定禽多杀性巴氏杆菌的研究[J].中国预防兽医学报,2003,25(5):349-352.
- [4] 元英芳,刘家森,张在平,等.禽多杀性巴氏杆菌 PCR 诊断方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2008(7):68-69.
- [5] 贺奕,储岳峰,赵萍,等.多杀性巴氏杆菌的分离和 PCR 鉴定[J].江西农业大学学报,2008,30(4):702-705.
- [6] 施少华,程龙飞,傅光华,等.检测禽多杀性巴氏杆菌 PCR 方法的建立[J].福建农业学报,2009,24(3):201-204.
- [7] 施少华,陈红梅,程龙飞,等.检测禽多杀性巴氏杆菌环介导等温扩增(LAMP)方法的建立[J].福建农林大学学报(自然科学版),2010,39(4):388-391.
- [8] 曾静雯,刘慧芳,沈琴芳,等.多杀性巴氏杆菌鉴定与特性研究的分子生物学方法[J].中国兽药杂志,2006,40(4):41-44.
- [9] KUMAR P, SINGH V P, AGRAWAL R K, et al. Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study[J]. Trop Anim Health Prod, 2009, 41(4):573-578.

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号,不要使用国家已废除了的单位。如面积用 hm^2 (公顷)、 m^2 (平方米),不用亩、尺²等;质量用 t (吨)、kg (千克)、mg (毫克),不再用担等;表示浓度的 ppm 一律改用 mg/kg 、 mg/L 或 $\mu\text{L}/\text{L}$ 。