

胸膜肺炎放线杆菌基因分型方法的建立及其临床应用

陈 凡¹ 陈美玲¹ 陈焕春¹ 何启盖^{1*} Pat Blackall²

(¹华中农业大学 农业微生物国家重点实验室动物传染病室 武汉 430070)

(²澳大利亚动物保健研究所 昆士兰 4105)

摘 要 根据胸膜肺炎放线杆菌各血清型之间外毒素(Apx)、外膜脂蛋白(OmlA)、转铁蛋白 B(TbpB)的基因差异,分别对各血清型进行 PCR 扩增,得到不同的特异性片段,可区分开生物 I 型 13 个标准菌株血清型中的 8 个血清型。临床检测结果与血清学分型一致,将此分型系统用于临床送检的 126 份肺脏和 42 份扁桃体的病原学检测,可直接检测出胸膜肺炎放线杆菌感染。此方法还可以将一些尚未定型的菌株进行归类,弥补了血清学方法的不足,为细菌的流行病学调查提供了可靠的技术手段。

关键词 胸膜肺炎放线杆菌,PCR,基因分型,病原学检测

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0679-04

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)是猪传染性胸膜肺炎(*Porcine contagious pleuropneumoniae*)的病原体。可引起猪肺出血、坏死和纤维素渗出,导致发热、呼吸困难,生长缓慢。该菌的主要毒力因子有外毒素、脂多糖、荚膜多糖、外膜脂蛋白、脉酶和粘附因子等^[1],该病在世界上许多国家的养猪场中广泛存在,造成了很大的经济损失^[2]。

该菌分为两个生物型:生物 I 型(Biovar I)和生物 II 型(Biovar II)。其中生物 I 型的生长依赖 NAD,包括 APP1~12 和 APP15 共 13 个血清型;生物 II 型包括 APP-13 和 APP-14,不依赖 NAD。虽然所有的血清型都可使猪致病,但已证实生物 II 型的毒力要比生物 I 型弱,因此目前国内外的研究主要针对生物 I 型进行。准确地对多血清型病原菌进行分型,是正确选用优势菌株、制备型特异性疫苗、分子流行病学以及进行致病性研究的基础。该菌的血清学分型主要是根据荚膜多糖(CPS)和脂多糖(LPS)的差异进行的,但由于不同血清型之间存在共同的抗原表位,存在部分交叉反应,因而某些分离的菌株不能用血清学方法定型^[3]。本研究的目的在于建立一套 PCR 分型系统,可直接用于临床病料的诊断鉴定,缩短待检时间,为我国 APP 的流行病学调查提供一种可靠的手段。

1 材料和方法

1.1 标准菌株

本实验所用的标准细菌分别为血清 1 型(4074)、血清 2 型(4226)、血清 3 型(1421)、血清 4 型(M62)、血清 5 型(K17)、血清 6 型(FemØ)、血清 7 型(WF83)、血清 8 型(405)、血清 9 型(13261)、血清 10 型(13039)、血清 11 型(56153)、血清 12 型(1096)和血清 15 型(HS143)。均为澳大利亚动物保健研究所 Pat Blackall 教授和 Ross Bowle 博士惠赠。

1.2 PCR 模板的制备

细菌在 TM 培养基上增殖后^[4],用接种环挑取单一菌落,

溶于 40 μ L 无菌蒸馏水,煮沸 5~10min,冰浴 3min,12000r/min 离心 1min,上清液 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 PCR 反应体系的建立

设计针对外毒素、外膜脂蛋白和转铁结合蛋白 B 的引物,除反应程序和引物不同外,其它试剂如 dNTP,10 $\times$ Buffer, Taq Polymerase 均购自宝生生物工程公司(TaKaRa),引物由上海生物工程公司合成。

1.3.1 apx-PCR 参考文献[5,6],合成下列引物(表 1)。反应体系(50 μ L):10 $\times$ buffer 5 μ L,模板 5 μ L,140 μ mol/L dNTP,1.25U Taq 酶,引物 AIF、AIR、AIIIF、AIIR、XIIIBD-L、XIIIBD-R 各 0.25 μ mol/L,引物 AIIIF 和 AIIR 各 0.5 μ mol/L,引物 XIBD-L 和 XIBD-R 各 0.75 μ mol/L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.3.2 omlA-PCR 根据 GenBank 已登录的序列,参考文献[5],合成以下引物(表 2)。反应体系(50 μ L):10 $\times$ buffer 5 μ L,模板 5 μ L,100 μ mol/L dNTP,0.5U Taq 酶,引物 LPF 1 μ mol/L,引物 LP1R、LP2R、LP3R、LP4R 各为 0.5 μ mol/L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,53 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1.5min,共 28 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.3.3 tbpB-PCR 参考文献[7],根据登录的血清 7 型 tbp 基因序列合成两条引物(表 3)。反应体系(50 μ L):10 $\times$ buffer 5 μ L,模板 5 μ L,200 μ mol/L dNTP,2U Taq 酶,引物 tbpB-L 和 tbpB-R 各 1 μ mol/L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,45 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

上述 3 种 PCR 扩增产物均于 1.5% 琼脂糖凝胶中加入适量 EB 电泳观察。APP 标准菌株做 apx-PCR 时,同时作大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、巴氏杆菌(*Pasteurella*)、波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)对照。

基金项目 国家自然科学基金(30200011)、湖北省重点科技攻关项目(2001AA201B020)

* 通讯作者。Tel:86-27-87288629;Fax:86-27-87282608;E-mail:heqigai@yahoo.com

作者简介 陈 凡(1973-)男,湖北赤壁人,硕士研究生,主要从事动物传染病方面的研究。E-mail:chenfan@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期 2003-12-22,修回日期 2004-04-05

表 1 apx-PCR 中扩增外毒素各引物的序列及位置

Table 1 The primer pairs for amplification of Apx associated genes fragment

Primer	Assesion No.	Target gene	Sequence	Domain	Size/bp
AIF	X52899	apx I A	5'-ATGGCTAACTCTCAGCTCG-3'	59 ~ 77	826
AIR	X52899		5'-CGCTTTACCGATATTGCCTA-3'	885 ~ 904	
AIF	X61111		5'-TCATTCTCTACAGAATGGGG-3'	867 ~ 886	
AIR	X61111	apx II A	5'-CAACGAGTAACGCCAACTGG-3'	1936 ~ 1918	1069
AIF	X80055		5'-ACGGAAGTGTGTGTAACGG-3'	916 ~ 934	
AIR	X80055		5'-AGCAGCAACTTTAGTGCTTG-3'	1549 ~ 1530	
XIBD-L	X68595	apx III A	5'-GTATCGCGGGGATTCCGT-3'	4986 ~ 5003	635
XIBD-R	X68595		5'-ATCCGCATCGGCTCCCAA-3'	6433 ~ 6416	
XIIIBD-L	L12145		5'-TCCAAGCATGTCTATGGAACG-3'	5655 ~ 5675	
XIIIBD-R	L12145	apx III BD	5'-AACAGAATCAAAATCAGCTTGTT-3'	6623 ~ 6600	968

表 2 omlA-PCR 扩增外膜脂蛋白各引物的位置和序列

Table 2 The primer pairs for amplification of omlA associated genes fragment

Primer	Assesion No.	Sequence	Domain	Size/bp
LPF	U86675	5'-AAGGTTGATATGTCCGCACC-3'	214 ~ 231	809
LP1R	U86675	5'-TTTATAATGGTACCATCTTCGC-3'	1023 ~ 1005	
LP2R	U86676	5'-TTTACTAGAATGGTCATATTGC-3'	901 ~ 879	
LP3R	U86677	5'-TATTTGGAGCTGTTTTGTGTAT-3'	791 ~ 769	577
LP4R	U86679	5'-ACCTGCAATCTTATTATTAATCG-3'	632 ~ 610	418

表 3 tbpB-PCR 扩增 tbpB 基因的引物的位置和序列

Table 3 The primer pairs for amplification of tpbB gene fragment

Primer	Assesion No.	Sequence	Domain	Size/bp
tbpB-L	U16017	5'-ATGCATTTTAAACTTAATGCC-3'	206 ~ 226	1627
tbpB-R	U16017	5'-TGTTTTGACCAAGACAGCA-3'	1813 ~ 1833	

1.4 病原菌的分离和鉴定

对养殖场送检的疑为 APP 感染的猪肺脏和扁桃体 ,表面消毒后 ,剪取小块病料接种于含 NAD 的血琼脂平皿上 ,37℃ 培养过夜后挑取光滑、灰色、半透明的溶血菌落 ,于 TM 琼脂平皿扩大培养 ,观察 NAD 依赖性。阳性者继续做脲酶 ,甘露糖 ,木糖 ,葡萄糖 ,ONPG 的生化试验 均为阳性者判断为 APP。用琼脂扩散试验鉴定其血清型 ,同时用 PCR 分型系统作对比检测。

1.5 临床病料的检测

为了缩短细菌分离的周期 ,我们尝试了病肺直接培养检测的方法。取小块病料于 TMB 液体培养基中摇菌 ,培养 12h 按 1.2 方法制备模板 ,然后用本法逐级检测。先做 apx-PCR 呈阳性者则继续做 omlA-PCR 和 tpb-PCR ,如果 apx-PCR 结果为阴性 ,则不需再做其它实验。

2 结果

2.1 标准菌株在 PCR 分型系统中的结果分析

在 apx-PCR 中 5 对引物在同一体系中反应 ,产生 5 种不同的扩增片段 ,可将 13 个血清型的 APP 分为 5 组。血清型 1、5、9、11 为一组 ;血清型 2、4、6 为一组 ;血清型 7、8、12、15 为一组 ;血清型 3 和血清型 10 各分别为为一组。同时检测的大肠杆菌 ,沙门氏菌 ,巴氏杆菌 ,波氏杆菌 ,猪链球菌无任何扩增片段 (图 1)。

在 omlA-PCR 中 ,可扩增出 4 群特异性片段。血清型 1、9、11、12 为一组 (omlA I)血清 2 型单独为一组 (omlA II)血

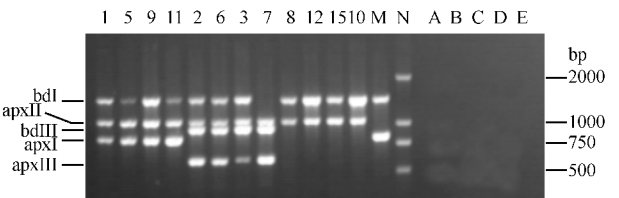


图 1 APP 标准菌株 apx-PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products form apx operons of the APP reference serotypes

The serotypes are placed in groups with similar apx gene patterns and the serotypes are indicated by numbers above lanes. The position of the amplicons of the apx genes are indicated by their abbreviations on the left side of the picture. M : Marker (TaKaRa ,2000bp); N :Negative. A : *Escherichia coli* ;B :*Bordetella bronchiseptica* ; C :*Salmonella* ; D :*Pasteurella* ; E :*Streptococcus suis* .

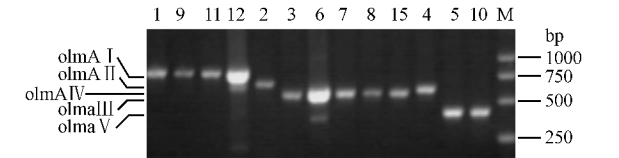


图 2 APP 标准菌株 omlA-PCR 扩增结果

Fig.2 PCR products form omlA gene of the APP reference serotypes

The serotypes are placed in groups with similar apx gene patterns and the serotypes are indicated by numbers above lanes. The position of the amplicons of the omlA genes are indicated by their abbreviations on the lefr side of the picture. M :Molecular weight marke(TaKaRa ,2000) ;N :Negative.

清型 3、4、7、8 和 15 为一组(omlAⅢ),但血清 4 型的扩增片段要大 50bp 左右,因而可以将其单独区分开来,将其归于第四组(omlAⅣ);血清型 5 和 10 为一组(omlAⅤ)。所以 omlA-PCR 也可以将 APP 的 13 个血清型分为 5 组(图 2)。

在 tbp-PCR 中,可将 13 个血清型分为两组,其中血清型 1、6 和 12 可扩增出 1.8kb 大小的片段(tbpBI),归为一组,而其它血清型的扩增产物为 1.7kb 大小的片段(tbpBII),归于另一组;APP-5 不能扩出特异性片段,可单独区分开来(图 3)。

可以看出,PCR 分型系统能将 APP 生物 I 型中的 8 个血清型完全区分开来,不能区分血清型 9 和 11,血清型 7、8 和 15。PCR 分型系统对 APP 标准菌株的分型模式(表 4)。

表 4 APP 标准菌株的 apx/omlA/tbpB PCR 分型模式

Table 4 The suggested typing patterns of APP standard strains											
PCR pattern	Serotype	apx I	apx II	apx III	omlA I	omlA II	omlA III	omlA IV	omlA V	tbpB I	tbpB II
1	1	+	+		+					+	
2	2		+	+		+					+
3	3		+	+			+				+
4	4		+	+				+			+
5	5	+	+						+		
6	6		+	+			+			+	
7	7,8,15		+				+				+
8	9,11	+	+		+						+
9	10	+							+		+
10	12		+		+					+	

2.2 病原菌的分离和血清型的鉴定

从湖南,河南,安徽等地猪场送检病料分离到 12 株 APP。用琼脂扩散实验检测,其中有 7 株为血清 2 型,2 株为血清 10 型,1 株为血清 3 型,还有 2 株因交叉反应多而不能定型;用 PCR 分型系统做对比检测,发现结果与血清学检测完全一致,2 株不能分型的菌株都归于 PCR 分型系统的模式 7,属于血清型 7、8 或 15。

2.3 临床病料的病原学检查

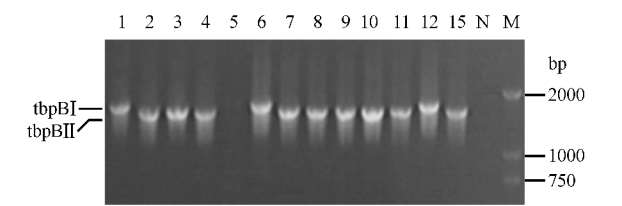


图 3 APP 标准菌株 tbpB-PCR 扩增结果
Fig.3 PCR products form tbpB gene of the APP reference serotypes
The serotypes are indicated by numbers above lanes. The amplicons of tbpB I was found among serotype 1、6、12, and the others were got the amplicons of tbpB II. The position of the amplicons of the tbpB genes are indicated by their abbreviations on the left side of the picture. M :Molecular weight marker ;N :Negative.

从临床送检的可疑病料中收集 126 份肺脏和 42 份扁桃体标本,按上述方法处理后,用 PCR 分型系统加以检测。结果肺脏检测出 25 份阳性标本,扁桃体检测出 11 份阳性标本。其中 26 份可以确定 APP 血清型,分别是血清 2 型 15 份,血清 5 型 2 份,血清 10 型 2 份,还有 7 份属于血清 7、8 和 15 型。其它阳性标本不能完全定型,但在一种或两种 PCR 中可扩增出特异性片段(表 5)。

表 5 PCR 分型系统检测扁桃体和肺脏标本结果

Table 5 Detection of APP infection with PCR typing system form tonsils and lungs								
Sample	No.	Postive	Typing No.	Pattern 2	Pattern 5	Pattern 7	Pattern 9	Untypable
Tonsil	42	11	7	4	0	2	1	4
Lung	126	25	19	11	2	5	1	6

3 讨论

胸膜肺炎放线杆菌常用的血清学分型方法有乳胶凝集试验^[8]、琼脂扩散试验^[9]和间接血凝试验^[10]。因为交叉反应的存在,任何一种血清学方法都不能将 APP 菌株完全分开。虽然通过倍比稀释的办法可以消除一些交叉反应,但相当费时^[11,12]。

以 PCR 为基础的基因分型系统,从细菌的毒力因子入手,将 APP 进行区分归类。Apx-PCR 根据启动基因和结构基因(CA)以及分泌相关基因(BD)的差异,可以将 13 种生物 I 型的标准菌株分为五群。除血清 8 型外,各血清型所分泌的毒素与免疫学检测结果一致。血清 8 型的差异可能是所选用的菌株不同造成的,用血清学方法所确定的血清型,同型之间不同菌株分泌的外毒素也可能存在差异。此外,除血清 3 型外,所有的 APP 生物 I 型都可扩增出 ApxBD I,根据这

一特性可将血清 3 型与其它血清型区分开来。在 omlA-PCR 中有一条共同的上游引物,可将生物 I 型 APP 分为四群,血清型 3、4、6、7、8 和 15 为一群,但血清 4 型的 PCR 产物要比血清型 3、6、7、8 和 15 大 50bp 左右,这一结果与 Osaki 1997 年所做的 omlA 基因的 PCR-RFLP 的结果是一致的。tbpB-PCR 可将 APP13 个血清型分为两群,它能将血清 1 型与血清 9 和 11 型区分开,这是血清学方法很难做到的。该分型系统不能区分血清 9 和 11 型,血清 7、8 和 15 型也不能分开,说明本系统所检测的 3 种毒力因子在这些血清型之间具有高度的同源性。要将所有的血清型完全分开,还需从其它更多方面入手,寻找基因间的差别。

Hennessy 等 1993 年报道了用随机引物 PCR 的方法对 APP 进行分型,可以将 12 种生物 I 型菌株区分开,但是这种方法重复性差,而且需要纯化好的细菌,不能用于临床应用。Lo 等试图从 CPS 基因找出型特异性差异,但只能将血清 5 型

与其它血清型区分开来。Hernanz 等根据 *aroA* 基因的序列差异建立了 PCR-RFLP 的分型技术,能将 12 个生物型菌株分成 3 群,但该法过于复杂,且临床应用未得到证实^[13,14]。我们建立的这套 PCR 分型系统能将所有生物 I 型中的 8 个血清型区分开,并且可直接用于临床检测。*apx* 是 APP 的主要毒力因子,因而我们将其作为第一道筛选 PCR,这样既简化了操作,又可保证结果的可靠性。

从临床检测病料的结果来看,APP 感染后病原的检出率在 23% 左右,扁桃体的检测率要比肺脏高。说明 APP 侵入呼吸道后,扁桃体是其主要的寄宿器官,因而对隐性感染猪群的病原学检查具有重要的意义。不能分型的阳性病料中,在一种到两种 PCR 中能扩增出特异性片段,但却不能归于 APP 标准菌株所建立的 10 个模式中,有可能是 APP 细菌在环境压力下毒力因子产生了变异,也有可能是某些与 APP 有同源性的细菌所产生的。

由于 APP 在外界不易存活,细菌往往在标本送检过程中大量死亡,给细菌的分离带来困难。PCR 分型系统具有很高的敏感性,可直接从病料入手,能够更加全面迅速的进行病原学检测,很好的解决了这一难题。同时,与传统的血清学方法结合,能更好的对 APP 进行分型。从我们的检测结果看,目前我国主要的流行菌株是血清 2 型,与用 IHA 所做的血清学调查结果不同^[15],而与欧美早期的 APP 流行情况相似,这一结果表明我国 APP 的流行与近 20 年来从国外引进种猪存在一定的关系。

参 考 文 献

- [1] Tascon R I, Vazquez-Boland J A, Gutierrez-Martin C B, et al. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia SEM*, 1996, **12**: 171 - 184.
- [2] Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol*, 1997, **58**: 239 - 249.
- [3] Nicolet J. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can Vet J*, 1988, **29**: 578 - 580.
- [4] 陈 凡,何启盖,陈焕春,等. 胸膜肺炎放线杆菌诊断抗原

的制备及初步临床应用. 华中农业大学学报, 2003, **22**: 478 - 482.

- [5] Frey J, Beck, Vanden Bosch M, et al. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol cell Probes*, 1995, **9**: 277 - 282.
- [6] Gram T, Ahrens P, Andreassen M. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes -evaluation of isolates from lings and tonsils of pigs. *Vet Microbiol*, 2000, **75**: 43 - 57.
- [7] Victor A, de la Puente-Redondo, Noeni Garcia del Blanco, et al. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *thpA* and *thpB* genes. *Res Microbiol*, 2000, **151**: 669 - 681.
- [8] Giese S B, Stebaek E, Nielsen R. Identification of *actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by monoclonal or polyclonal antibodies in latex agglutination. *Acta Vet Scand*, 1993, **34**: 223 - 225.
- [9] Nielsen R. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes—cross protection experiments. *Nord Vet Med*, 1984, **36**(7 - 8): 221 - 234.
- [10] Nielsen R. Serological and immunological of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus paraaemolyticus*. *Acta Vet Scand*, 1974, **5**: 80 - 89.
- [11] Blackall P J, Bowles R, Pahoff J L, et al. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. *Aust Vet J*, 1999, **77**(1): 39 - 43.
- [12] Mitui T, Onaga H, Nagasawa Y, et al. Studies on *Haemophilus* infection in swine I. *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicitation of the latex agglutination test to the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. *Vet Microbiol*, 1981, **6**: 339 - 349.
- [13] Kristina J, Hennessy, John J, et al. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clinical Microbiol*, 1993, **31**: 1155 - 1159.
- [14] Carmen Hernenz Moral, Alberto Cascon Soriano, Maria Sanchez Salazar, et al. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J Clinical Microbiol*, 1999, **37**: 1575 - 1578.
- [15] 逯忠新,柳纪省,赵 萍,等. 猪传染性胸膜肺炎血清抗体的检测. 中国兽医科技, 2001, **31**(5): 16 - 17.

Development of Genotyping System for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Its Clinical Application

CHEN Fan¹ CHEN Mei-Ling¹ CHEN Huan-Chun¹ HE Qi-Gai^{1*} Pat Blackall²

(¹ Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Animal Health Institute, Queensland, Yeerongpilly 4105, Australia)

Abstract: To develop a PCR system based on the genes of the three exotoxins (*apx*), outer membrane proteins (*omlA*), and transferring binding protein (*thpB*) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Founding that the resultant patterns of the reference strains for serovars 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 12 of biovar I of *Actinobacillus pleuropneumoniae* tested in this study to be distinguished. However, the reference strains for serovars 7, 8 and 15 could not be distinguished nor could the reference strains for serovars 9 and 11. The method can also be used to directly detect *A. pleuropneumoniae* infection in lung and tonsil tissue. The detection results of 42 tonsils and 126 lungs showed the potential clinical application of the genotyping system.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PCR, Genotype, Pathogeny diagnosis

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (2001AA201B020)

* Corresponding author. Tel: 86-27-87288629; Fax: 86-27-872872608; E-mail: Heqigai@yahoo.com

Received date: 12-22-2003