

# 利用 16S rDNA 建立种特异性 PCR 快速检测鸭疫里默氏菌

曲丰发 蔡 畅 郑献进 张大丙\*

( 中国农业大学动物医学院 农业部预防兽医学重点开放实验室 北京 100094 )

**摘 要** 鸭疫里默氏菌感染是危害养鸭业的主要疾病,用表型指标鉴定鸭疫里默氏菌存在不足,因此有必要建立检测该菌的种特异性 PCR 法。利用已登录的鸭疫里默氏菌、大肠杆菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌的 16S rDNA 基因序列,设计了一对鸭疫里默氏菌 16S rDNA 基因的特异性引物 190f 和 843r,分别以基因组 DNA 和菌落提取液为模板,从 1~19 型鸭疫里默氏菌参考菌株和代表亚型、变异株和可能新型的国内分离株共 26 株细菌中均扩增出大小为 654bp 的特异性片段,而扩增鸭大肠杆菌、鸭沙门氏菌和禽多杀性巴氏杆菌等感染鸭的常见细菌的结果均呈阴性。分别将鸭疫里默氏菌基因组 DNA 和菌落提取液进行 10 倍梯度稀释,基因组 DNA 的最小检出量为 50pg,菌落最小检出量为 15CFU/mL。结果说明,该 PCR 法具有较好的特异性和敏感性,可用于快速鉴定鸭疫里默氏菌。

**关键词** 鸭疫里默氏菌;16S rDNA 种特异性 PCR

中图分类号:Q387 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)01-0013-05

鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)感染是家鸭、火鸡和其他多种鸟类的一种接触传染性疾病<sup>[1]</sup>。自从郭玉璞等 1982 年确定我国存在该病以来<sup>[2]</sup>,该病一直是危害我国肉鸭养殖业的主要疾病。RA 感染常导致较高的死亡率和淘汰率,其发生和流行给我国养鸭业造成了巨大的经济损失。

对 RA 感染进行准确诊断必需依靠细菌的分离和鉴定。鉴定 RA 通常检测其培养特性、形态染色反应、生理生化特征、菌体的某些化学组成等表型指标,但 RA 常缺乏特定的表型特征<sup>[3]</sup>,迄今还没有建立起选择性的培养基<sup>[4]</sup>,不同学者检测 RA 生化反应的结果也不一致<sup>[5]</sup>,在表型上 RA 与某些细菌还很相似<sup>[1]</sup>,因此,虽然从病死鸭中极易分离到 RA,采用某些表型指标也易与大肠杆菌、沙门氏菌等感染鸭的常见菌相区分<sup>[6]</sup>,但仅依据表型却不足以对 RA 做出准确鉴定。此外,检测细菌的表型必需首先进行细菌的分离培养,若检测污染的样品、研究 RA 的传播等流行病学问题时并不适用,故建立鉴定 RA 的分子方法十分必要。

由于 16S rDNA 基因分子结构上的高度保守性、分布的普遍性及其所含的大量信息,使 16S rDNA 基因成为了一个较为理想的基因分类靶序列<sup>[7]</sup>。对其序列进行分析、根据序列分析结果设计种特异性引物进行 PCR 扩增,已被证明在细菌分类鉴定上具有重要价值<sup>[8]</sup>。在 RA 的分类研究中,也已经用到

16S rDNA 序列分析法,但不同研究报道的序列同源性有一定差异<sup>[4,9]</sup>。我们对 1~19 型 RA 参考菌株和 7 个国内分离株的序列进行了测定和分析(未发表资料),结果显示,RA 种内不同菌株间 16S rDNA 基因的序列同源性为 99.1%~100%(GenBank AY871817~AY871842),而该菌与里默氏菌属内另一菌种即鸽子里默氏菌(*Riemerella columbina*)的序列相似性为 95.41%,所在黄杆菌科中,不同菌属间的 16S rDNA 序列同源性约为 81%~95.2%,提示在以 16S rDNA 序列相似性范围进行 RA 鉴定时,1% 以内的序列差异可作为其判断标准。

本研究旨在利用前期测序结果,以 16S rDNA 为靶基因,建立快速检测 RA 的种特异性 PCR 法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**1~19 型 RA 参考菌株,由美国的 Sandhu 先生(Cornell University)馈赠,表 1 为菌株编号及来源,7 个 RA 分离株,菌株编号为 C449、C459、C598、C919、C515、C882 和 C900,从北京和河北的商品肉鸭分离,鸭大肠杆菌分离株 E<sub>Bj</sub>、E<sub>Hc</sub> 和 E<sub>Hu</sub>,分别从北京、河北和湖北的病死商品肉鸭分离获得,鸭沙门氏菌分离株 S<sub>Bj</sub>,分离自北京的商品雏鸭,禽多杀性巴氏杆菌 P<sub>Bj</sub>,由中国农业大学动物医学院微生物教研室提供。

\* 通讯作者。Tel:86-10-62733348;E-mail:zdb@cau.edu.cn

作者简介:曲丰发(1978-),男,山东烟台人,硕士研究生,主要从事兽医微生物系统发育学研究。E-mail:qufengfa@21.cn.cn

收稿日期:2005-05-30;接受日期:2005-08-03;修回日期:2005-08-02

表 1 鸭疫里默氏菌 1~19 型参考菌株

Table 1 The 19 representative strains of *Riemerella anatipestifer*

Serotype	Strains	Source	Serotype	Strains	Source
1	D-24105	DRL	11	D-28020	DRL
2	D-24046	DRL	12	8755	CCUG
3	D-26338	DRL	13	11693	CCUG
4	H-2565	HPRS	14	D-664	CVLS
5	D-24123	DRL	15	D-743	CVLS
6	P-2123	NADC	16	S-4801	DRL
7	D-27179	DRL	17	977/83	CVLS
8	D-26220	DRL	18	540/86	CVLS
9	H-1785	HPRS	19	30/90	CVLS
10	H-2199	HPRS			

DRL: Duck Research Laboratory, New York, USA; NADC: National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA; HPRS: Houghton Poultry Research Station, Houghton, England; CVLS: Central Veterinary Laboratory, Singapore; CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Sweden.

**1.1.2 主要试剂和培养基:** 细菌基因组 DNA 提取试剂盒为清华大学天为时代公司产品, *Taq* 酶购自 Promega 公司, dNTP 为 Genview 公司产品, TSA (Tryptic Soy Agar) 和 TSB (Tryptic Soy Broth) 为美国 Difco 公司产品。

## 1.2 PCR 扩增

**1.2.1 基因组 DNA 模板的制备:** 挑取 TSA 平板上单个菌落, 接种于 TSB, 37°C 快速振荡培养 20h, 离心取菌泥, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取各菌株的基因组 DNA, 作为 PCR 的模板。

**1.2.2 菌落提取液模板的制备:** 从培养 16h 的 TSA 平板上挑取 5~6 个菌落加入到 300 $\mu$ L 的 0.85% NaCl 溶液中, 漩涡混匀, 10000  $\times$  g 离心 5min, 弃上清, 沉淀重悬于 300 $\mu$ L 双蒸水或者 5% Chelex100 缓冲液中, 沸水浴中加热 15min, 12000g 离心 2min, 取上清作为 PCR 的模板。

**1.2.3 种特异性 PCR 引物的筛选:** 从 GenBank 中选取大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌的 16S rDNA 序列, 用 ClustalW 在线软件与 1、2、6、10 型 RA 参考菌株的 16S rDNA 序列进行分析, 定位差异明显的序列片段, 用引物设计软件 Primer Premier 5 在所定位区域筛选设计引物。各菌株登陆号见表 2。引物由上海英峻生物技术有限公司合成。

**1.2.4 扩增体系及程序:** 分别以细菌的基因组 DNA 和菌落提取液为模板, 利用设计好的种特异性引物, 进行 PCR 扩增。反应体系 (50 $\mu$ L): 10  $\times$  reaction buffer 5 $\mu$ L, 上下游引物各 20pmol, dNTP 各 10nmol, 2.5U 的 *Taq* 酶, 基因组 DNA 500ng 左右或者细菌裂解液 2 $\mu$ L 加水补足至 50 $\mu$ L。扩增反应程序: 94°C 5min; 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环; 72°C 10min。

表 2 构建种特异性引物所选细菌的 16S rDNA 基因的 GenBank 登陆号

Table 2 Accession number of 16S rDNA genes in GenBank of Bacteria strains for species specific primers

Bacteria	Strains	Accession No.
<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 1	D-24105	AY871819
<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 2	D-24046	AY871818
<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 6	P-2123	AY871822
<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 10	H-2199	AY871826
<i>Escherichia coli</i>	BL21	AJ605115
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	AB035926
<i>Pasteurella multocida</i>	PM966	AY078997
<i>Salmonella enteritidis</i>	SE22	U90318
<i>Salmonella gallinarum</i>	ATCC7378	AF057360

## 1.3 PCR 敏感性检测

以 RA 血清 6 型参考菌株进行检测。测定  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  以确定其基因组 DNA 含量, 用双蒸水将基因组 DNA 从  $10^{-1}$  ~  $10^{-7}$  进行 10 倍梯度稀释, 各取 1 $\mu$ L 进行 PCR 扩增。从培养 16h 的 TSA 平板上挑取 5~6 个菌落加入到 300 $\mu$ L 的 0.85% NaCl 溶液中, 漩涡混匀, 用麦氏比浊法确定其菌落形成单位 (CFU) 数量, 用生理盐水从  $10^{-1}$  ~  $10^{-9}$  进行 10 倍梯度稀释, 离心去上清, 加同等体积双蒸水或 5% Chelex100 缓冲液, 煮沸后离心取上清, 各取 1 $\mu$ L 进行 PCR 扩增。

## 1.4 临床病例的检测

随机选取 3 个鸭场的病死肉鸭 12 只, 分别使用传统方法和 PCR 方法进行检测, 以验证所建立 PCR 方法的可靠性与敏感性。传统方法包括用 TSA 分离细菌、麦康凯鉴别培养、生化试验以及血清型鉴定, 生化指标包括糖发酵 (葡萄糖、麦芽糖、果糖、甘露糖、甘露醇、乳糖、蔗糖)、硫化氢、尿素酶、明胶液化、西蒙氏枸橼酸盐利用、硝酸盐还原、触酶, 结果判断参照文献 [1, 10]。病料中 PCR 模板的制备方法如下: 取病死鸭的脑或肝组织约 1mm<sup>3</sup>, 捣碎, 加 500 $\mu$ L 灭菌生理盐水, 漩涡混匀, 10000  $\times$  g 离心 5min, 弃上清, 重复一次。沉淀加 500 $\mu$ L 10% Chelex 100 缓冲液, 混匀, 56°C 作用 30min, 然后于 100°C 作用 10min, 12000  $\times$  g 离心 5min, 取上清 2 $\mu$ L 作为 PCR 反应模板。

## 2 结果

### 2.1 种特异性引物的筛选

在所选细菌的 16S rDNA 序列中, 存在 7 个主要的可变区, 分别位于 RA 16S rDNA 的 68~89、168~213、442~461、824~843、974~991、998~1020 和 1404~1454 碱基位。选定两个可变区即 168~213 位和 824~843 位设计引物, 引物分别位于 190~208 位和 843~825 位, 上游引物 (190f) 为 5'-GTATTGAAA

GCTCTGGCCG-3', 下游引物(843r)为 5'-TCGCTTAGTCTCTGAACCC-3'。

### 2.2 1~19 型 RA 参考菌株的检测结果

以基因组 DNA 为模板,如图 1 所示,19 个参考菌株均出现大小约 654bp 的单一一条带,与预期大小基本一致。

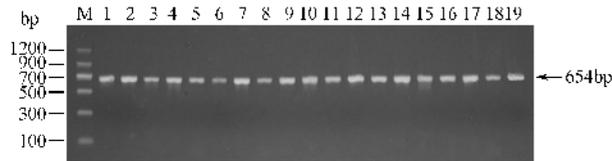


图 1 以基因组 DNA 为模板扩增 1~19 型 RA 参考菌株的 16S rDNA 基因

Fig.1 The amplification of 16S rDNA genes of *Riemerella anatipestifer* representative strains of serotypes 1~19 using genomic DNA as template. M. DNA Marker; 1~19. *Riemerella anatipestifer* representative strains of serotypes 1~19; 20. Negative control.

### 2.3 特异性检测

2.3.1 以细菌基因组 DNA 为模板进行检测:以 RA 1 型参考菌株(D24105)和 2 型参考菌株(D24046)为阳性组,用引物 190f 和 843r 检测 7 个 RA 分离株(C449、C459、C598、C919、C515、C882、C900)的 16S rDNA 基因,并设立鸭大肠杆菌分离株、鸭沙门氏菌分离株和禽多杀性巴氏杆菌菌株作为对照。如图 2 所示,阳性对照与 7 株国内分离株均出现大小约 654bp 的条带,而 3 株鸭大肠杆菌分离株、1 株鸭沙门氏菌分离株和 1 株禽多杀性巴氏杆菌菌株的扩增结果均为阴性。

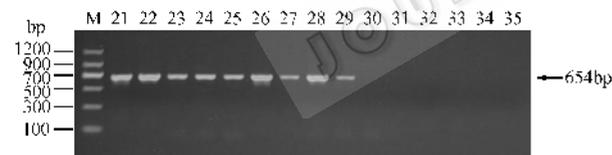


图 2 PCR 方法的特异性检测结果

Fig.2 The result of PCR specificity detection. M. DNA Marker; 21. D-24105; 22. D-24046; 23~29. C449, C459, C598, C919, C515, C882, C900; 30~32. *E. coli* strains E<sub>Bj</sub>, E<sub>He</sub> and E<sub>Hu</sub>; 33. *Salmonella* S<sub>Bj</sub>; 34. *P. multocida* P<sub>Bj</sub>; 35. Negative control.

2.3.2 以菌落提取液为模板的 PCR 扩增:由于 1、2、6、10 型 RA 是我国许多养鸭地区主要流行的血清型,故检测 1、2、6、10 型参考菌株的 16S rDNA 基因,并以鸭大肠杆菌分离株(E<sub>Bj</sub>, E<sub>He</sub>, E<sub>Hu</sub>)、鸭沙门氏菌分离株(S<sub>Bj</sub>)、禽多杀性巴氏杆菌菌株(P<sub>Bj</sub>)为对照。结果为 4 株 RA 菌株出现大小为 654bp 的产物条带,而 3 种对照菌未出现相应条带(图略)。

### 2.4 敏感性测定

以 6 型 RA 基因组 DNA 为模板时,10<sup>0</sup>~10<sup>-4</sup>倍稀释的模板呈现阳性结果(图 3),由于模板的起始浓度约为 0.5μg/μL,故其敏感性约为 50pg。以 6 型菌落裂解液为模板时,对应于 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup>倍稀释的

模板呈现阳性结果(图略),由于细菌的初始浓度为 1.5×10<sup>8</sup>CFU/mL,其敏感性为 1.5×10<sup>6</sup>CFU/mL;将各稀释度菌液离心后加入 5% Chelex 100 缓冲液,再煮沸获得模板,如图 4 所示,对应于 10<sup>0</sup>~10<sup>-7</sup>倍稀释的模板呈阳性结果,其敏感性为 15CFU/mL。

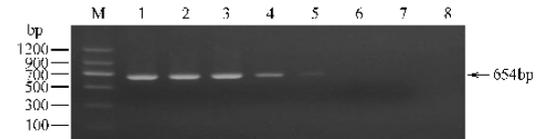


图 3 用 10 倍系列稀释的鸭疫里默氏菌基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增

Fig.3 PCR of 10 fold serially diluted *Riemerella anatipestifer* genomic DNA template using 16S rDNA gene primers 190f and 843r. M. DNA Marker; 1.5×10<sup>8</sup>ng/mL; 2.5×10<sup>4</sup>ng/mL; 3.5×10<sup>3</sup>ng/mL; 4.5×10<sup>2</sup>ng/mL; 5.5×10<sup>1</sup>ng/mL; 6.5ng/mL; 7.5×10<sup>-1</sup>ng/mL; 8.5×10<sup>-2</sup>ng/mL.

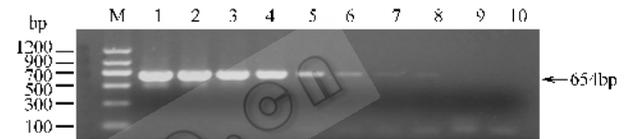


图 4 在 10 倍系列稀释的鸭疫里默氏菌中加入 Chelex 100 后煮沸的裂解液为模板的 PCR 扩增

Fig.4 PCR of *Riemerella anatipestifer* DNA template extracted from 10 fold serially diluted colony in which Chelex 100 was added using 16S rDNA gene primers 190f and 843r. M. DNA Marker; 1. 1.5×10<sup>8</sup>cfu/mL; 2. 1.5×10<sup>7</sup>cfu/mL; 3. 1.5×10<sup>6</sup>cfu/mL; 4. 1.5×10<sup>5</sup>cfu/mL; 5. 1.5×10<sup>4</sup>cfu/mL; 6. 1.5×10<sup>3</sup>cfu/mL; 7. 1.5×10<sup>2</sup>cfu/mL; 8. 1.5×10<sup>1</sup>cfu/mL; 9. 1.5cfu/mL; 10. 1.5×10<sup>-1</sup>cfu/mL.

### 2.5 临床病例的检测

应用传统方法和 PCR 方法共检测 12 份临床病例,阳性检出率分别为 3/12 和 4/12(表 3),结果表明所建立的 PCR 方法具有良好的可靠性和敏感性。

表 3 临床病例的传统和 PCR 方法的检测结果

Table 3 The results of clinical case detection using traditional

Specimen	and PCR methods				
	Bacteria isolation	Differential culture	Biochemical identification	Serotype identification	PCR identification
S1	+	+	+	11	+
S2	+	+	+	10	+
S3	+	+	+	11	+
S4	-	-	-	-	+
S5	-	-	-	-	-
S6	+	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-
S8	+	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-
S12	+	-	-	-	-

### 3 讨论

细菌 16S rDNA 由可变区和保守区交替组成,保守区在所有细菌中高度一致,而可变区序列则因菌种的不同而有较大变化,本研究利用 16S rDNA 的这一特点,综合考虑扩增片段长度、碱基组成及退火温度等因素,从可变区 2 区后半区和 4 区设计了一对引物 190f 和 843r,在本试验的反应条件下,从所选各血清型 RA 中均能扩增出约 654bp 的片段,而从鸭大肠杆菌、鸭沙门氏菌和禽多杀性巴氏杆菌的扩增结果均为阴性,证实所建立的 PCR 法具有很好的种特异性。BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 同源性搜索显示,两条引物亦具有较高的特异性,仅与黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 及金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 的部分菌种的对应区域具有较高的同源性,但迄今为止,尚未见这些细菌感染鸭的报道。目前,鸭疫里默氏菌和鸭大肠杆菌是危害养鸭业的主要病原菌,虽然鸭沙门氏菌和禽多杀性巴氏杆菌也是感染鸭的常见菌,但近年来这两种细菌分离率较低,而链球菌、葡萄球菌等其它细菌感染鸭的情况则属罕见。因此,选择大肠杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌作为引物设计和特异性检测的参照,有利于该法的临床应用。

研究中,无论以试剂盒提取的 RA 基因组 DNA 还是以 RA 菌落加热获得的上清液为模板,均获得了特异性的结果,但相对而言,以细菌基因组 DNA 为模板的扩增效果更好,若以菌落提取液为模板进行扩增则更为简便。然而,Sepp 等<sup>[11]</sup>(1994 年)认为,用双蒸水悬浮的细菌经过沸水浴处理,基因组 DNA 会发生降解,多数会裂解为 200bp 以下的短片段,不易扩增出目的基因。基因组之所以发生降解,主要是因为样品中的金属离子在高温和低离子强度的条件下对 DNA 降解的催化作用所致,在 Chelex 100 存在的条件下,金属离子被结合,可阻止其对 DNA 降解的催化作用。本实验的结果进一步证明了这一点。

用细菌分离和鉴定的传统方法以及 PCR 法对临床病料的检测结果表明,PCR 方法具有良好的可靠性和准确性,并且具有更高的敏感性,而简便快速的模板制备方法也使其在临床上具有相当大的实用价值。

迄今为止,国际上报道 RA 存在 21 个血清型<sup>[12-16]</sup>。1987 年,高福和郭玉璞(1987)首次确定我国存在 1 型<sup>[17]</sup>,1997 年至今,张大丙和郭玉璞先后鉴定出 1、2、6、7、10、11、13、14、15 和 17 型,其中 1、2、6、10 型是我国许多养鸭地区主要流行的血清型<sup>[18]</sup>。对分离株进行血清型鉴定亦是鉴定 RA 的一项重要指标,但是,在提出一个新的血清型时,还需首先

进行菌种的准确鉴定,例如早期的 4 型和 1995 年提出的 20 型就因不属于 RA 而被先后排除<sup>[11-15]</sup>。在此方面,种特异性 PCR 方法亦可发挥相应的作用。本研究中的 7 个国内分离株均来自于自然发病和死亡的商品肉鸭,其中,菌株 C882 和 C900 不属于 1~19 型,由于未能获得 20 型和 21 型参考菌株,尚不能确定其血清型。菌株 C449、C459、C598、C919 与 10 型参考菌株 H2199 之间既存在明显的抗原差异又具有或近或远的血清学相关性,故这 5 个菌株被鉴定为血清 10 型的 5 个亚型<sup>[19,20]</sup>。菌株 C515 分别与 10 型和 19 型参考菌株存在单向低度交叉凝集反应,但与 1~19 型参考菌株之间均无可见的交叉沉淀反应,极似 1~19 型外的一个血清型,但该菌株却与菌株 C598 存在高度抗原相关性,暂被称为 C598 的变异株<sup>[21]</sup>。这些亚型菌株、变异株和未定型菌株均经过鉴别培养、形态染色反应以及生化反应的检测,被鉴定为 RA。运用本研究建立的特异性 PCR 方法进行检测,以及对其 16S rDNA 进行序列分析的结果表明,传统方法和分子方法鉴定 RA 分离株的结果是一致的。

致谢 感谢中国农业大学动物医学院郭玉璞教授在实验中给予指导,感谢美国康奈尔大学 Sandhu 博士馈赠鸭疫里默氏菌 1~19 型参考菌株,感谢中国农业大学动物医学院查振林老师提供禽多杀性巴氏杆菌。

### 参 考 文 献

- [1] Seger P, Mannheim W, Vancanneyt M, et al. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA homology group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, **43**(4): 768-776.
- [2] 郭玉璞,陈德威,范国雄. 北京鸭小鸭传染性浆膜炎的调查. *畜牧兽医学报*, 1982, **13**(2): 107-114.
- [3] Ryll M, Christensen H, Bisgaard M, et al. Studies on the prevalence of *Riemerella anatipestifer* in the upper respiratory tract of clinically healthy ducklings and characterization of untypable strains. *Journal of Veterinary Medicine*, 2001, **48**: 537-546.
- [4] Tsai HJ, Liu Y, Tseng CS, et al. Genetic variation of the *ompA* and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*, 2005, **34**(1): 55-64.
- [5] Hinz KH, Ryll M, Köhler B, et al. Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar micro-organisms from various hosts. *Avian Pathology*, 1998, **27**: 33-42.
- [6] 张大丙,郭玉璞. 北京地区鸭传染性浆膜炎的流行病学调查. *中国预防兽医学报*, 1999, **21**(4): 260-263.
- [7] 何亮,陈群,曾忠铭,等. 通过特异 PCR 扩增和 16S rDNA 序列分析检测动弯杆菌. *微生物学报*, 2005, **41**(1): 27-30.
- [8] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**: 697-703.

- [ 9 ] Subramaniam S , Kuhnert P , Frey J. Phylogenetic position of *Riemerella anatipestifer* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 1997 , **47** : 562 – 565.
- [ 10 ] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京 : 科学出版社 2001 370 – 398.
- [ 11 ] Sepp R , Szabo I , U da H , *et al.* Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *Journal of Clinical Pathology* , 1994 , **47** ( 3 ) : 318 – 323.
- [ 12 ] Sandhu TS , Leister ML. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from poultry in different countries. *Avian Pathology* , 1991 , **20** : 233 – 239.
- [ 13 ] Loh H , Teo TP , Tan HC. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from ducks in Singapore : a proposal of new serotypes. *Avian Pathology* , 1992 , **21** : 453 – 459.
- [ 14 ] Pathanasophon P , Sawada T , Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology* , 1995 , **24** : 195 – 199.
- [ 15 ] Ryll M , Hinz KH. Exclusion of strain 670/89 as type strain for serovar 20 of *Riemerella anatipestifer*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* , 2000 , **113** ( 2 ) : 65 – 67.
- [ 16 ] Pathanasophon P , Phuektes P , Tanticharoenyos T , *et al.* A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology* , 2002 , **31** ( 3 ) : 267 – 270.
- [ 17 ] 高 福 , 郭玉璞. 小鸭传染性浆膜炎疫苗的研究—— I 鸭疫巴氏杆菌的血清型鉴定. *中国兽医杂志* , 1987 , **13** ( 4 ) : 47 – 48.
- [ 18 ] 张大丙 , 曲丰发 , 郑献进. 鸭传染性浆膜炎的诊断与防治技术. *中国家禽* , 2005 , **27** ( 6 ) : 46 – 49.
- [ 19 ] 张大丙. 血清 10 型鸭疫里默氏菌 4 个亚型的分析. *畜牧兽医学报* , 2005 , **36** ( 2 ) : 181 – 186.
- [ 20 ] 张大丙 , 曲丰发 , 郑献进 , 等. 血清 10 型鸭疫里默氏菌第 5 个亚型的分析. *中国兽医杂志* , 2005 , **41** ( 4 ) : 3 – 6.
- [ 21 ] 张大丙 , 郭玉璞. 1 株难以定型的鸭疫里默氏菌分离株. *中国兽医学报* , 2005 , **25** ( 2 ) : 148 – 151.

## Rapid identification of *Riemerella anatipestifer* on the basis of specific PCR amplifying 16S rDNA

QU Feng-fa , CAI Chang , ZHENG Xian-jin , ZHANG Da-bing\*

( Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture , College of Veterinary Medicine , China Agricultural University , Beijing 100094 , China )

**Abstract :** *Riemerella anatipestifer* ( RA ) infection is the main disease causing severe losses in duck production. Because RA is characterized more by the absence than by the presence of specific phenotypic properties and different scholar had the different results of biochemical detection , it can't always be identified quickly and correctly only by the phenotypic properties or biochemical characteristics. The research object was to develop a species specific PCR method for RA detection. Because of the conserved structure of rRNA and appropriate size of 16S rRNA , a multiple alignment of 16S rDNA ( gene coding 16S rRNA ) was processed among RA , *Escherichia coli* , *Pasteurella multocida* , *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum* , which are the main bacteria causing duck diseases. A pair of species specific primers named 190f and 843r were selected from the variable regions of 16S rDNA depending on the result of multiple alignment. Using BLAST on NCBI website for a sequence similarity search , the results showed that this pair of primers had very high specificity , except for having a lower sequence similarity with some species of *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* . A PCR assay was performed and the template was extracted using the bacteria genomic DNA extraction kit and boiling method respectively. A chelate resin named Chelex 100 was used in the boiling method at the same time. Under the annealing temperature of 60°C , all the 26 RA strains , including 19 representative strains of serotypes 1 ~ 19 and 7 domestic isolated strains , showed the same 654bp fragment after PCR , while there was no amplification with isolates of other bacterial species. Also a series of sensitivity experiments were performed and proved that the detection limit of this method was 50pg genomic DNA ,  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL and 15 CFU/mL , when the template was prepared with genomic DNA extraction kit , only boiling method and boiling method with Chelex 100 respectively. 12 clinical cases which were probably infected with RA were chosen to identify the accuracy and sensitivity of this PCR method. Several other conventional detecting methods including bacteria isolating , differentiating culture , biochemical experiments and serotyping were used at the same time. The templates of PCR were extracted from brains or livers by boiling method with Chelex 100. Finally , 3 cases were identified as RA infection by the conventional methods and 4 by the PCR method , which proved the good accuracy and sensitivity of the PCR method. Thus , this PCR assay provides a rapid and accurate method for identification of *Riemerella anatipestifer* . It will help to make the final decision in clinical diagnose or species identification , especially when a new serotype or sub-serotype of RA comes up.

**Keywords :** *Riemerella anatipestifer* ; 16S rDNA ; Species specific PCR

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62733348 ; E-mail : zab@cau.edu.cn

Received : 30 May 2005 / Accepted : 3 August 2005 / Revised : 2 August 2005