

余波,杨莉,史开志,等.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 诊断方法的建立及耐药性调查[J].江苏农业科学,2017,45(22):165-167.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.045

# 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 诊断方法的建立及耐药性调查

余波,杨莉,史开志,任荣清,徐景峨,杨粤黔

(贵州省畜牧兽医研究所,贵州贵阳 550005)

**摘要:**为建立快速诊断猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(APP)的方法和耐药情况,根据 GenBank 中的 APP *apxIVA* 基因,设计合成 2 对引物,通过环介导等温扩增技术(LAMP)扩增条件的优化,建立了 APP LAMP 诊断方法,同时对分离到的 APP 进行耐药性分析。结果显示,建立的 LAMP 诊断方法最低核酸检测量为 2 pg/μL,对猪源大肠杆菌、猪源沙门氏菌、猪源支原体、副猪嗜血杆菌、猪源多杀性巴氏杆菌的扩增结果均为阴性,扩增反应 30 min 内完成,结果肉眼可见。分离得到的 31 株 APP,耐药性较强。结果表明,建立的方法可满足基层现场快速检测需要,对分离得到的 31 株 APP 耐药性分析表明,APP 耐药性较严重。

**关键词:**传染性胸膜肺炎放线杆菌;*apxIVA* 基因;环介导等温扩增;耐药性分析

**中图分类号:** S858.285.1<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0165-03

猪传染性胸膜肺炎是由猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)感染引起以纤维性肺炎为主要特征的猪呼吸道疾病<sup>[1]</sup>。急性发病时,猪死亡率较高,出现呼吸严重困难,体温升高,食欲减退,剖检可见肺部与胸膜粘连;慢性发病时,猪死亡率较低,但生长缓慢,饲料转化率。该病自 1987 年在我国被发现以来,贵州省各地报道较多,给养猪业造成严重的经济损失<sup>[2-4]</sup>。近年来,由于抗生素的滥用,APP 耐药性日益严重<sup>[5-7]</sup>。为对 APP 进行现场快速诊断以及了解其耐药情况,根据 GenBank 中的 APP *apxIVA* 基因,设计合成 2 对引物,通过环介导等温扩增技术(LAMP)的扩增条件的优化,建立了 APP LAMP 诊断方法。同时,对分离的 APP 进行耐药性分析,为防治 APP 提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 细菌 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型、猪源大

肠杆菌、猪源沙门氏菌、猪源支原体、副猪嗜血杆菌、猪源多杀性巴氏杆菌由贵州畜禽重大疫病防控重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 环介导等温扩增法 DNA 扩增试剂盒、环介导等温扩增法荧光检测试剂盒购自北京蓝谱生物科技有限公司;猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 PCR 试剂盒由贵州省畜禽重大疫病防控重点实验室研制;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中的 APP 1~15 型 *apxIVA* 基因序列,应用在线 PrimerExplorer 4.0 软件设计 4 条特异性引物,包括外引物和内引物(F3、B3、FIP、BIP)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。引物序号如下:

F3:5'-TGGAGCTCCTCGATCTCAAG-3'; B3:5'-GCCC CACAATGACGTGTAC-3';

FIP:5'-GCAACGGTCACCAGACTCCCGACAACGGAGTG ACCTGTC-3';

BIP:5'-AGAGCAGCACCTGTAACGTTTACGCTTCTGCA TTTTCCCG-3'。

1.2.2 细菌核酸的提取 (1)临床样品:取 1.0 g 病猪肺脏、淋巴结加入 2 mL 0.1 mol/L PBS 研磨后,反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行提取。(2)细菌样品:采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

收稿日期:2016-06-08

基金项目:贵州省科技成果推广项目(编号:黔科合成字[2013]50);

贵州省农业科技攻关项目(编号:黔科合 NY[2015]3009-2 号);

贵州省工程中心项目(编号:黔科合农 G 字[2015]4001 号)。

作者简介:余波(1981—),男,四川广安人,硕士,副研究员,研究方向为兽医微生物与中兽药。E-mail:yubonky@163.com。

[20]付忠,谢世清,徐文果,等.不同光照强度下谢君魔芋的光合作用及能量分配特征[J].应用生态学报,2016,27(4):1177-1188.

[21]Penuelas J, Filella I, Llusia J, et al. Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia* [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(319):229-238.

[22]薛伟,李向义,朱军涛,等.遮阴对疏叶骆驼刺叶形态和光合参数的影响[J].植物生态学报,2011,35(1):82-90.

[23]Xu C, Yin Y, Cai R, et al. Responses of photosynthetic characteristics and antioxidative metabolism in winter wheat to post-anthesis shading[J]. Photosynthetica, 2013, 51(1):139-150.

[24]王金欢,耿庆伟,邢浩,等.遮阴对臭氧胁迫下“赤霞珠”葡萄叶片光合功能及活性氧代谢的影响[J].果树学报,2016,33(7):823-831.

[25]蔡艳飞,李世峰,解瑞佳,等.不同光照环境对“薇安”铁线莲光合特性的影响[J].园艺学报,2011,38(7):1377-1384.

**1.2.3 LAMP 扩增条件的优化** LAMP 扩增条件的优化主要包括扩增温度(分别为 60、65、70 ℃),扩增时间(分别为 15、30、45 min),F3、B3 引物浓度(分别为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ),FIP、BIP 引物浓度(分别为 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ),*Bst* DNA 聚合酶用量(分别为 0.5、1.0、2.0 U)。LAMP 反应在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中进行,引物 F3、B3 各 2  $\mu\text{L}$ ,引物 FIP、BIP 4  $\mu\text{L}$ ,*Bst* DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ (0.5、1.0、2.0 U),LAMP 反应缓冲液 12.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1.0  $\mu\text{L}$ ,加入环介导等温扩增法荧光检测试剂盒的荧光显色液 1.0  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25.0  $\mu\text{L}$ 。扩增产物于紫外光下进行观察。

**1.2.4 敏感性试验** 将提取的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 I 型核酸用核酸蛋白仪测定浓度后,经 10 倍系列稀释用于 LAMP、PCR 反应,以确定建立的 LAMP 诊断方法的敏感性。PCR 试剂盒敏感性试验参照文献[8]进行。

**1.2.5 特异性试验** 以猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型、猪源大肠杆菌、猪源沙门氏菌、猪源支原体、副猪嗜血杆菌、猪源多杀性巴氏杆菌 DNA 为模板分别进行 LAMP 反应,以确定建立的 LAMP 诊断方法的特异性。

**1.2.6 重复性试验** 应用建立的 LAMP 诊断方法,重复检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型 3 次以检验结果的可靠性。

**1.2.7 建立的 LAMP 对临床样品的检测** 2014 年 3 月至 2016 年 3 月,在贵州省贵阳市、安顺市、遵义市、凯里市、兴义市、铜仁市、瓮安县 15 个规模场和 48 家养殖户 236 份疑似病

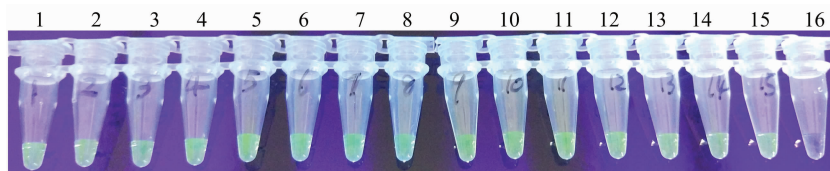
猪样品采用建立的 LAMP 诊断方法进行检测,同时应用研制的 PCR 诊断试剂盒进行检测。

**1.2.8 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌耐药性分析** 2014 年 3 月至 2016 年 3 月,对在贵州省贵阳市、安顺市、遵义市、凯里市、兴义市、铜仁市、瓮安县的 15 个规模场和 48 家养殖户分离得到的 APP 采用药敏纸片法检测分离菌对 18 种抗生素药物的敏感性,药敏纸片包括青霉素、氨苄西林、头孢噻吩、头孢拉定、头孢唑林、链霉素、庆大霉素、氟哌酸、恩诺沙星、氟苯尼考、强力霉素、红霉素、利福平、泰乐菌素、卡那霉素、土霉素、林可霉素、磺胺二甲嘧啶钠。将分离纯化的细菌涂布在含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的巧克力琼脂培养基上,置于 5% CO<sub>2</sub> 37 ℃ 培养箱,24 h 后观察并测量抑菌圈直径,判定标准参考杭州微生物试剂有限公司说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 诊断方法的建立

LAMP 诊断方法最优 25.0  $\mu\text{L}$  扩增体系为引物 F3、B3 浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ ,各 1.0  $\mu\text{L}$ ,引物 FIP、BIP 浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ ,各 2.0  $\mu\text{L}$ ,*Bst* DNA 聚合酶 1.0 U,1.0  $\mu\text{L}$ ,LAMP 扩增缓冲液 12.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1.0  $\mu\text{L}$ ,加入环介导等温扩增法荧光检测试剂盒的荧光显色液 1.0  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25.0  $\mu\text{L}$ 。最佳扩增条件:反应温度 65 ℃,反应 30 min,94 ℃ 灭活 2 min。扩增完后,在紫外灯光下观察,阳性反应管颜色为绿色,阴性反应管为无色(图 1)。

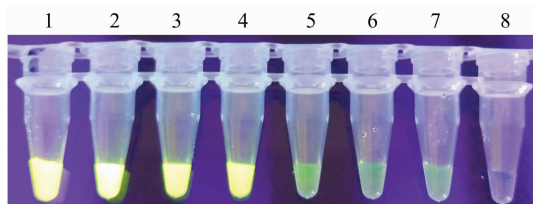


1~15—APP 1~15 型 LAMP 产物; 16—阴性对照

图1 LAMP 检测方法的建立

### 2.2 敏感性试验

经 10 倍系列稀释的 APP I 型 DNA 用于 LAMP、PCR 反应,图 2、图 3 结果显示,建立的 LAMP 诊断方法最低核酸检测量为 2  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ,而 PCR 诊断方法最低核酸检测量为 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

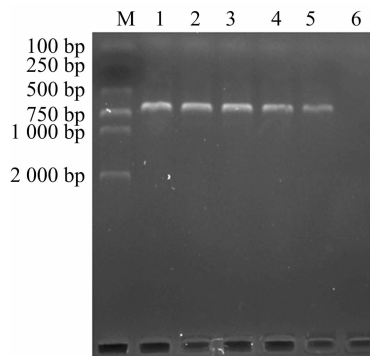


1~8— $2.0 \times 10^6 \sim 0.2 \text{ pg}/\mu\text{L}$  稀释的 APP DNA LAMP 结果

图2 APP LAMP 敏感试验

### 2.3 特异性试验

以猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型、猪源大肠杆菌、猪源沙门氏菌、猪源支原体、副猪嗜血杆菌、猪源多杀性巴氏杆菌 DNA 为模板,图 4 结果显示,紫外光下猪源大肠杆菌、猪源沙门氏菌、猪源支原体、副猪嗜血杆菌、猪源多杀性巴氏杆菌 DNA 均为阴性,而猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型 DNA 显示为阳性。



M—DL200; 1~6— $2.0 \times 10^6 \sim 20 \text{ pg}/\mu\text{L}$  稀释的 APP DNA PCR 结果

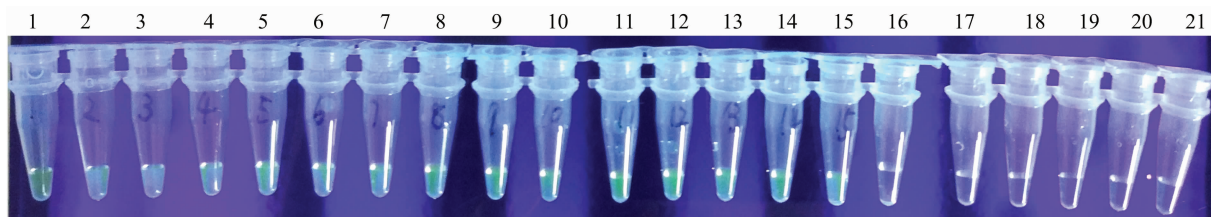
图3 APP PCR 敏感试验

### 2.4 重复性试验

应用建立的 LAMP 方法,重复检测 APP DNA 样品 3 次,结果均一致。

### 2.5 建立的 LAMP 对临床样品的检测

对 2014 年 3 月至 2016 年 3 月在贵州省贵阳市、安顺市、遵义市、凯里市、兴义市、铜仁市、瓮安县 15 个规模化猪场 236 份疑似病猪样品采用建立的 LAMP 诊断方法进行检测,



1~15—APP1~15型 LAMP 产物；16—猪源大肠杆菌 LAMP 产物；17—猪源沙门氏菌 LAMP 产物；18—猪源支原体 LAMP 产物；19—副猪嗜血杆菌 LAMP 产物；20—猪源多杀性巴氏杆菌 LAMP 产物；21—阴性对照

图4 APP LAMP 特异性试验

同时应用研制的 PCR 诊断试剂盒进行检测。236 份疑似病猪样品阳性率为 37.71% (89/236), 而 PCR 阳性率为 34.32% (81/236)。建立的 LAMP 诊断方法与 PCR 诊断方法符合率为 91.00%。

## 2.6 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌耐药性分析

由表 1 可知, 在 15 个规模场和 48 家养殖户分离得到的 31 株猪传染性胸膜肺炎放线杆菌采用药敏纸片法检测分离菌对 18 种抗生素药物的敏感性不同。

表 1 31 株猪传染性胸膜肺炎放线杆菌对 18 种抗生素药敏试验结果

菌株 耐药性	抗生素																	
	青霉素	氨苄西林	头孢噻吩	头孢拉定	头孢唑林	链霉素	庆大霉素	氟哌酸	恩诺沙星	氟苯尼考	强力霉素	红霉素	利福平	泰乐菌素	卡那霉素	土霉素	林可霉素	磺胺二甲嘧啶
耐药株数量	31	31	7	5	13	31	31	17	20	7	31	31	31	17	31	31	20	31
中度敏感株数量	0	0	15	19	18	0	0	14	11	18	0	0	0	11	0	0	11	0
敏感株数量	0	0	9	7	0	0	0	0	0	6	0	0	0	3	0	0	0	0

## 3 讨论

近年来, 随着生猪养殖规模化不断发展, 生猪养殖病害不断增多<sup>[9]</sup>, 呼吸道疾病尤为严重<sup>[9]</sup>。APP 是近几年较为常见的呼吸道病原体。目前, APP 检测方法很多, 传统的病原分离鉴定, 耗时较长, 且 APP 病原分离对培养条件要求较高, 病原检测多使用 PCR 检测技术, 但 PCR 技术需要专业设备和专业人员操作。LAMP 扩增法可使用水浴锅或保温杯进行扩增, 结果肉眼可见, 操作相对简单, 特别适合基层现场检疫, 且敏感性较 PCR 高<sup>[11]</sup>。刘亚娟等建立的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 方法, 最低检测限为 0.307 ng/L<sup>[12]</sup>。本研究建立的 LAMP 诊断方法利用 APP 1~15 型共有 *apxIVA* 基因设计引物, 检测方法可检测 APP 1~15 型, 敏感性达到为 2 pg/ $\mu$ L, 是 PCR 法的 100 倍, 因此建立的 LAMP 诊断方法可在生猪养殖场进行现场快速检测。

对 236 份样品核酸检测显示, 阳性率为 37.71%, 而分离得到的 APP 只有 31 株, 这可能与 APP 的传统分离鉴定较难有关<sup>[13]</sup>。对分离得到的 31 株 APP 进行耐药性分析, 敏感药物只有头孢噻吩、头孢拉定、氟苯尼考、泰乐菌素, 表明该菌耐药性日渐严重, 这可能与养殖场在该病的防治中多数使用抗生素有关, 造成抗生素的滥用<sup>[14]</sup>。目前, APP 耐药性趋势日益严重, 建议生猪养殖场应对该场的 APP 血清型进行分离鉴定, 同时结合药敏试验, 合理使用抗生素和疫苗<sup>[15]</sup>。

## 参考文献:

[1] Bossej T, Janson H, Sheehan B J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection [J]. *Microbes and Infection*, 2002, 4(2): 225–235.

[2] 夏新萌, 连伟民, 李成蒙. 我国部分地区猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的血清型流行病学调查[J]. *中国猪业*, 2015(12): 50–53.

[3] 葛兆宏, 陆广富, 陶洁, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌变异株

的分离与鉴定[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2012, 33(4): 10–13.

[4] 张艳, 刘海隆, 林哲敏, 等. 海南省规模猪场猪传染性胸膜肺炎的血清学调查[J]. *动物医学进展*, 2016(1): 129–132.

[5] Vanni M, Merenda M, Barigazzi G, et al. Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(1/2): 172–177.

[6] Archambault M, Harel J, Gouré J, et al. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Microbial Drug Resistance – Mechanisms Epidemiology and Disease*, 2012, 18(2): 198–206.

[7] 刘英龙, 张洪波, 孙霞, 等. 山东地区猪传染性胸膜肺炎放线杆菌耐药性现状研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010(17): 125–126.

[8] 徐景峨, 蔡一鸣, 王璇, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 PCR 检测试剂盒的研制[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(4): 209–211.

[9] 覃军, 梁珠民, 李军成. 规模化猪场主要疫病抗体监测与免疫效果分析[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(10): 264–266.

[10] 郭广富, 曹军平, 朱爱萍, 等. 猪圆环病毒 2 型泰州株的分离鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(4): 294–295.

[11] Zhu H X, Zhang Q, Wu G H, et al. Advance of the research on testing of animal viruses by LAMP technology in abroad [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(7): 1029–1030, 1066.

[12] 刘亚娟, 聂福平, 杨俊, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2016(2): 200–205.

[13] 邹丽, 周雪, 徐登峰. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌鉴定与耐药性试验[J]. *中国兽医杂志*, 2014(2): 41–42.

[14] 田永祥, 檀永强, 刘泽文, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定, 致病性与药敏试验[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(21): 5204–5207.

[15] 李海利, 徐引弟, 宋毓民, 等. 猪接触传染性胸膜肺炎放线杆菌血清 3 型分子鉴定及药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2016(1): 280–284.