

副猪杆菌实验室检测方法研究进展

张文红*

(广东茂名农林科技职业学院, 茂名 525000)

摘要: 副猪杆菌是一种能够在猪上呼吸道定植的条件性致病菌, 如果感染的猪只不具备较强的免疫力或处在应激状态, 很可能出现副猪杆菌病, 导致猪只出现关节炎、脑膜炎等疾病, 严重损害养殖户经济效益, 该点对我国养猪业的健康发展非常不利。考虑到早期诊断对副猪杆菌的防控具有重要意义, 本文特此对副猪杆菌进行分析, 并以副猪杆菌的实验室检测方法为重点展开研究, 以期可以为副猪杆菌综合防控的实现奠定基础。

关键词: 副猪杆菌; 实验室; 检测方法

Study on laboratory detection methods of *Pseudomonas aeruginosa*

ZHANG Wen-Hong*

(Guangdong Maoming Vocational College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Maoming 525000, China)

ABSTRACT: *Pseudomonas aeruginosa* is a conditional pathogenic bacterium that can colonize the upper respiratory tract of pigs. If infected pigs do not have strong immunity or are in a stress state, it is likely to develop *Pseudomonas aeruginosa*, leading to diseases such as arthritis and meningitis in pigs, seriously damaging the economic benefits of pig farmers. This is very detrimental to the healthy development of China's pig industry. Considering the importance of early diagnosis for the prevention and control of *Pseudomonas aeruginosa*, this article analyzes *Pseudomonas aeruginosa* and focuses on the laboratory detection methods of *Pseudomonas aeruginosa*, in order to lay a foundation for the comprehensive prevention and control of *Pseudomonas aeruginosa*.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; laboratory; test method

0 引言

副猪杆菌是一种能够在猪上呼吸道定植的条件性致病菌, 在养猪业持续发展的背景下, 由于副猪杆菌对猪只健康具有严重影响, 可能损害养殖户经济利益, 故而如何实现副猪杆菌综合防控逐渐受到关注。在副猪杆菌的防控中, 早期诊断具有重要作用, 而采用合理的实验室检测方法是实现早期诊断的重要条件, 因此要加大对实验室检测方法的研究投入, 掌握不同检测方法的作用和优劣势, 以实现在副猪杆菌检测中对不同方法进行合理运用, 提升副猪杆菌检测精准性和防控效果。副猪杆菌病是猪的一种高度接触性、呼吸道传染病, 以高热、关节炎、腹膜炎、脑膜炎、败血症为主要特

征。副猪杆菌病对猪的危害非常严重, 一旦发病, 死亡率可高达90%以上。目前, 该病的诊断主要依赖于临床症状和病理变化, 没有任何特异性的实验室诊断方法, 因此本文就副猪杆菌实验室检测方法展开分析, 该点对推动我国养猪业长远发展具有现实意义。

1 副猪杆菌的危害性

副猪杆菌是一种仅能对猪只造成感染的病菌, 其在猪群中的发病率不小于10%, 死亡率可达到50%。因该病菌而形成的急性感染, 多是首先出现在膘情良好的猪只, 发病后病猪的体温将达到40.5~42.0°C内, 且病猪将出现食欲降低、

*通信作者: 张文红, 高级实验师, 研究方向: 畜牧兽医专业实验教学。E-mail: 1329648309@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Wen-Hong, Senior Experimentalist, Guangdong Maoming Vocational College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Maoming 525000, China. E-mail: 1329648309@qq.com

呼吸困难、精神沉郁、皮肤发红、行走缓慢、腕关节肿大等不良表现,在部分情况下可能无显著表现或忽然死亡。因该病菌而形成的慢性感染多是出现在保育猪只,发病后病猪的食欲将明显降低,表现出呼吸困难、咳嗽、四肢无力、生长不良等症状,直到衰竭而死亡。由此可见,副猪杆菌的危害性较强,因此对其进行防控具有必要性。

2 副猪杆菌实验室检测方法

2.1 血清学方法

在副猪杆菌的血清学检测中,常见的方法如下(如图1所示)。

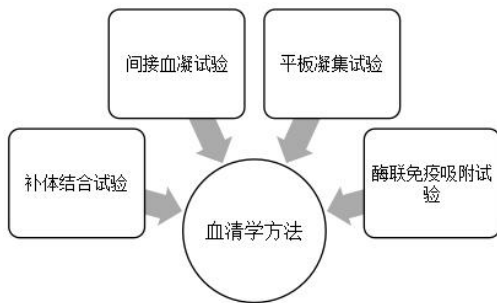


图1 副猪杆菌血清学检测方法

Fig.1 Serological detection method for *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1 补体结合试验

这种方法又被称作CF试验(complement fixation test),在国外,有人使用这种方法对副猪杆菌血清2型和5型作为抗原二价疫苗免疫效果进行评价,在二次接种后对阳性抗体效价进行检测发现,该检测方法检测副猪杆菌的特异性与敏感性相对较高,然而却未对交叉反应进行评价。除此之外,该试验参与成分相对较多,多种因素都会对检测结果产生影响,其虽然能够对特异性抗体效价进行有效识别,然而血清型的不同交叉反应也较为广泛。由此不难看出,采用该试验方法要想有效区分待检副猪杆菌血清型存在较大难度^[1]。

2.1.2 间接血凝试验

该检测方法又被称作IHA方法(indirect blood coagulation test),我国有人员对血清4型和5型分型菌株进行了超声波破碎处理,并通过经过处理的产物构建了IHA方法。使用这种方法检测猪群的抗体水平时,发现14天后的抗体检出率可以达到89%左右,且发现该检测方法的敏感性较强,是琼脂扩散试验的16倍左右。另有学者选择将3种副猪杆菌血清型作为抗原,分别是血清4型、13型、5

型,以建立IHA方法,发现该方法虽然整体敏感性较强,但特异性较差,且各项操作环节的复杂程度较高,不具备优异的稳定性,因此其无法在副猪杆菌的临床检测中进行推广使用。

2.1.3 平板凝集试验

这种方法又名PAT方法(plate agglutination test),有人选取副猪杆菌陕西分离株加以运用,来生成平板凝集抗原。然后选用相应的免疫健康兔,以此制作血清抗体,进而构建这种检测方法。随后使用这个技术展开了对某地区猪只的副猪杆菌血清抗体检测,发现检测结果和临床诊断结果大致相同。在分析PAT方法后,可发现其优势较多,例如准确度高、便捷性强、产生的成本较少等,因此该方法通常被应用到副猪杆菌疫苗免疫抗体水平的评估中,但仅能够进行定性检测^[2]。此外,这种方法在使用时很可能在现场环境因素的影响下产生非特异性反应,所以仅可以满足集约化猪场、散养猪的现场检测或初步检查。

2.1.4 酶联免疫吸附试验

这种方法可以检测抗原,还能够分析抗体。这个技术的优势有很多,例如检测过程中耗费的时间很少,有很强的特异性,对提高敏感度很有帮助,可以在同一时间对大量的样品进行检测,能够在血清抗体和血清流行病学的检查工作中展现出优异的效果。一般情况下,学者对这种方法进行构建时,荚膜多糖、超声破碎抗原作为主要的包被抗原。有人把甲醛灭活全菌体当成了包被抗原,借此构建出能够在副猪杆菌抗体检测工作中发挥重要作用的检测方法,并成功取得优异的试验效果。通过分析全菌体抗原制备发现,其简便性较强,然而有着复杂的成分,抗原释放存在残缺。使用全菌体抗原的阴性本底处在了一个较高的水平,形成的检测结果没有一个很好的稳定性,这对假阴性问题的控制很不利。另有学者在研究中,在121℃高温和高压条件下处理副猪杆菌血清4型、5型耐热蛋白,并在混合后将其作为包被抗原,以此来开展检测副猪杆菌抗体的间接酶联免疫吸附试验法,有利于开展副猪杆菌病检疫、流行病学检查等方面工作。因全菌体抗原有着复杂的成分,极易对最终的检测结果造成影响,散毒危害相对较强,但将副猪杆菌菌体上清液抗原成分利用超声波破碎之后其成分就会简单很多,但也没有呈现出单一化的特点,所以为了控制好其他抗原对间接酶联免疫吸附试验法检测准确度的可能影响,也有学者将在选择包被抗原时尽量选择具有单一抗原成分和安全性较高的副猪杆菌蛋白。在此基础上,我国近年来已有将寡肽通透酶蛋白、外

膜蛋白等当作包被抗原, 并以此构建的酶联免疫吸附试验法^[3]。对于副猪杆菌, 外膜蛋白 Omp 是其主要毒力因子, 在副猪杆菌的检测中, 可以当成候选的抗原使用。有研究人员选择将副猪杆菌的重组 OmpP2 当成包被抗原进行使用, 构建了间接酶联免疫吸附试验法, 并成功将这种方法运用到副猪杆菌的临床检测中。还有学者选择将表达纯化的副猪杆菌 OmpP5 视作包被抗原, 以建立可以对副猪杆菌抗体进行检测的间接酶联免疫吸附试验法。

2.2 分子生物学方法

常见的副猪杆菌分子生物学检测方法如下(如图2所示)。

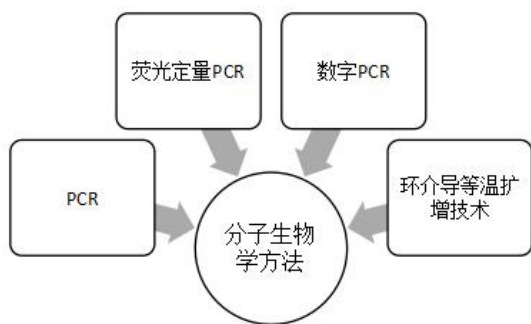


图2 副猪杆菌分子生物学检测方法

Fig.2 Molecular biology detection method for *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 PCR

在分析 PCR 技术后, 可发现其不但灵敏度较高, 有较强的特异性, 而且可以提升检测效率, 降低操作难度, 可以有效解决血清学检测易出现交叉反应的缺陷, 目前已被广泛运用到副猪杆菌病原体的检测中^[4]。有人在 2004 年左右构建出了一种 PCR 方法, 在初代分离培养物中, 这种方法不仅仅可以鉴定副猪杆菌, 完成感染确诊, 还可以达到病理检测目的。有研究选择以已成功建立的猪多杀性巴氏杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌等单项 PCR 法为基础, 以建立复合 PCR 方法, 该方法在临床检测具有重要意义。经过调查可以发现, 现阶段, 分子生物学检测法针对很多基因, 其中就包括 *infB*, 该基因具有较高的使用率, 16S rRNA 基因存在于细菌多种属内, 保守性非常高, 该特征有利于鉴定细菌种属。众多学者先后将副猪杆菌的 16S rRNA 基因作为模板并设计引物, 从而开展 PCR 检测, 其能够实现临床上快速检测副猪杆菌的目标。有研究人员将副猪杆菌 OmpP2 基因作为设计引物, 以建立 PCR 方法, 该方法的敏感度达到 1000 个

副猪杆菌。另有人员选择了副猪杆菌的 P2 蛋白基因和猪鼻支原体的 P37 蛋白基因, 分别设计出了 1 对引物, 由此构建了另一种 PCR 检测法, 将这个办法应用到临床时, 可以发现其有 100 copies 的灵敏度, 可以对猪鼻支原体和副猪杆菌进行同时诊断, 并保证诊断准确度, 实现对疾病后续治疗和疫情控制产生积极影响, 这对于副猪杆菌综合防控的实现具有重要意义。

2.2.2 荧光定量 PCR

相对 PCR, 荧光定量 PCR 的敏感性和特异性更高, 其能够实现准确定量和全封闭反应的目标, 现已在动物疫病检测中得到广泛应用。有学者结合 *infB* 基因序列, 以建立可以对副猪杆菌进行检测的 SYBR GreenI 荧光定量 PCR 检测方法, 相比于常规 PCR, 其敏感性有很大提高。有研究人员根据 *infB* 基因序列开展 TapMan 探针荧光定量 PCR 法, 获得的结果是该检测方法获得的效果接近于细菌分离法。也有研究人员根据 16S rRNA 基因序列开展实时荧光定量 PCR 法, 其能够对副猪杆菌进行快速定量检测。有研究通过结合副猪杆菌的 16S rRNA 基因开展 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测, 该检测方法具有较高的灵敏度, 有利于早期检测副猪杆菌感染, 且在调查流行病学和定量分析方面也起到重要作用^[5]。有学者结合副猪杆菌的 OmpP2 基因序列与 PM 的 PlpE 基因序列, 分别设计特异性引物和探针, 成功建立可以对猪多杀性巴氏杆菌和副猪杆菌进行同时检测的荧光定量 PCR 法。这种方法不但特异性优异, 重复性良好, 而且耗费的时间较短, 其在对病原进行排查时很快就能获得结果, 由此可见, 该检测方面应用和推广价值较高。

2.2.3 数字 PCR

近几年, 数字 PCR 技术得到很好发展, 在实际运用时无需使用校准物或者外标, 计数时可以落实到某个分子, 这对于绝对定量的实现很有作用^[6]。相对于实时荧光定量 PCR 法, 数字 PCR 法不仅有利于提升结果的准确度, 而且灵敏度很不错, 使用时不太会受到 PCR 抑制物的影响^[7]。有学者结合副猪杆菌的 OmpP2 基因以此来设计引物与探针, 并开展了能够精准定量的微滴数字 PCR 检测法^[8-9]。之后采用该检测方法与其他检测方法进行比较, 发现建立的数字 PCR 法特异性和敏感性均更为优异, 能检测到的阳性质粒最低位 2.647 copies/ μ L, 且可以应用到副猪杆菌低含量样品检测和定量检测中^[10]。但目前数字 PCR 技术仍存在一定缺陷, 例如使用过程中将耗费大量的检测时间, 是荧光定量 PCR 的 2 倍; 通过该方法对样本进行检测时, 需进行稀释处理; 各

个样本成本费用远远超过荧光定量 PCR, 在此基础上配套的仪器设备相对昂贵^[11]。

2.2.4 环介导等温扩增技术

该方法优势相对较多, 例如操作难度较低、速度较快、特异性强、有利于减少成本费用等, 在基层的临床检测和进出口岸通关检测中有较强的应用价值^[12]。有学者先后将副猪杆菌的 16S rRNA 基因作为依据, 以设计引物, 并成功建立 LAMP 方法, 发现该方法在检测中的灵敏度将达到常规 PCR 的 100 倍^[13]。还有学者选择对 OmpP2 基因进行结合, 以建立 LAMP 方法, 发现该方法的最低检测 DNA 量达到 0.2 pg/ μ L^[14]。还有研究人员依照副猪杆菌肽聚糖相关脂蛋白基因序列设计引物, 在反应后体系中添加 SYBR Green I, 成功建立 LAMP 检测法, 其特征是可视化, 该检测方法中所发生的反应无需特殊条件, 只需要在 55°C 的水内水浴 1 小时即可, 反应之后只需在反应液中添加荧光染料, 之后采用肉眼就能够对检测结果进行分辨^[15]。对 PCR 方法和 LAMP 技术进行全面比较分析后, 可发现后者不但产生的成本较低, 不需要使用价格昂贵的仪器设备, 而且在副猪杆菌检测中耗费的时间较少, 有利于提升检测效率^[16]。但这种方法由于具有较高的灵敏度, 因此在开盖之后极易出现气溶胶污染等情况, 最终出现假阳性的结果。除此之外, 该检测方法获得的检测结果用肉眼就能够分辨, 而在分辨过程中很可能受到检测人员主观意识的影响, 导致可疑样品的判断准确度下降。

3 结束语

综上所述, 副猪杆菌感染对猪只健康具有严重影响, 所以要重视该种病菌, 充分掌握副猪杆菌实验室检测方法, 了解不同方法的优劣势, 并结合实际对不同检测法进行科学利用。此外, 未来还要加大研究, 探究更高效的检测方法, 以实现副猪杆菌的早期诊断和综合防控。

参考文献

[1] 高梦霞, 靳曼玉, 高树基, 等. 猪链球菌副猪嗜血杆菌猪源支气管败血波氏杆菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(07): 843-850.

- [2] 广敏, 靳洪振, 彭康尧, 等. 联合环介导等温扩增和横向流动试纸条可视化检测副猪嗜血杆菌[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(01): 180-189.
- [3] 黄利, 袁东波, 曹省艳, 等. 副猪嗜血杆菌病检测技术[J]. 四川畜牧兽医, 2022, 49(12): 47-48.
- [4] 靳曼玉, 高树基, 李金朋, 等. 猪链球菌和副猪嗜血杆菌双重 Taq Man 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(10): 1052-1058.
- [5] 陈霞. 猪源大肠杆菌五种毒力因子单重及多重荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[D]. 华中农业大学, 2022.
- [6] 刘艺婷, 杨金钱, 丁略烜, 等. 副猪嗜血杆菌 7 型微量凝集试验抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(09): 1115-1121.
- [7] 刘艺婷. 副猪嗜血杆菌 7 型的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 河南科技大学, 2022.
- [8] 靳曼玉. 三种常见猪呼吸道病原菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 河南科技大学, 2022.
- [9] 陈娟, 李潇, 何菊等. 副猪嗜血杆菌研究概况[J]. 北方牧业, 2021, (16): 22-23.
- [10] 庄金秋, 梅建国, 王艳, 等. 副猪嗜血杆菌实验室检测方法研究进展[J]. 养猪, 2021, (04): 123-128.
- [11] 黎娜铭. 猪呼吸道病原菌多重 PCR 检测方法的建立和应用[D]. 贵州大学, 2021.
- [12] 张宇. 贵州省副猪嗜血杆菌病综合防控技术研究[D]. 贵州大学, 2021.
- [13] 胡仲皓. 微流控-LAMP 同时检测多种食源性致病菌方法的建立与应用[D]. 安徽农业大学, 2021.
- [14] 叶洋. 副猪嗜血杆菌重组 MnSOD 蛋白抗体阻断 ELISA 方法的建立[D]. 南京农业大学, 2021.
- [15] 冯逸雪. 三种猪呼吸道病原 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[D]. 西北农林科技大学, 2021.
- [16] 孙学飞, 谭业平, 王丹丹, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌及血清 1、3、5、7 型多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2020, 41(12): 17-22.

作者简介

张文红, 高级实验师, 研究方向: 畜牧兽医专业实验教学。