



兽医临床科学

## 羊败血性链球菌多重 PCR 检测方法的建立

魏梦君, 郑思思, 游潇倩, 孙生祯, 辛莉, 阚威\*

(青海省动物疫病预防控制中心, 青海西宁 810000)

**摘要:** 建立多重 PCR 诊断方法。以复活羊败血性链球菌病活疫苗作为研究对象, 根据细菌 16S rRNA 基因通用引物和羊败血性链球菌种属特异性 sodA 基因, 参考文献设计合成引物并进行 PCR 扩增。结果显示: (1) 疫苗株接种 BHI 增菌培养, 细菌生长缓慢, 24 h 后 BHI 培养基变浑浊; 在血平板上形成有光泽、透明湿润、黏稠, 表面光滑、边缘整齐, 露滴状细小、灰白色的菌落, 菌落周围有明显的  $\beta$  溶血。(2) 羊败血性链球菌病疫苗株细菌镜检结果显示, 镜检可见呈革兰氏染色阳性, 常成对或 3~5 个短链排列的球形或椭圆形球菌, 有荚膜。(3) 羊败血性链球菌病疫苗株核酸提取结果显示, 提取核酸稳定性良好, 可用于后续实验研究。(4) PCR 扩增结果显示, 该方法特异性和敏感性好, 可为羊败血性链球菌病的实验室诊断检测和分子流行病学调查提供技术支持。研究认为, 多重 PCR 检测方法简便、快捷, 敏感性和特异性良好, 技术易掌握, 普遍适合基层单位使用, 可快速获得诊断结果, 确定病原, 为临床合理用药提供科学依据。

**关键词:** 羊; 链球菌; 多重聚合酶链反应; 诊断

[中图分类号] S852.61 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2024)-05-0080-03

### Establishment of a Multiplex PCR Method for Detection of Streptococcus Septicus in Sheep

WEI Mengjun, ZHENG Sisi, YOU Xiaoqian, SUN Shengzhen, XIN Li, KAN Wei\*

(Qinghai Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Xining, Qinghai 810000, China)

**Abstract:** A multiplex PCR diagnostic method was established. The live vaccine of resurrected ovine Streptococcus septicus disease was used as the research object. According to the universal primers of bacterial 16S rRNA gene and the species-specific sodA gene of ovine streptococcus septicus, the primers were designed and synthesized and amplified by PCR. The results showed as follows: (1) The vaccine were inoculated with BHI medium, the growth of bacteria was slow, and the BHI medium became cloudy after 24 h; On the blood plate, shiny, transparent, moist, viscous, smooth surface, neat edges, small dew drops, gray and white colonies were

formed, and there was obvious beta hemolysis around the colonies. (2) The microscopic examination results of the bacteria of the ovine septicemia streptococci vaccine strain showed that the microscopic examination showed gram staining positive, often in pairs or 3 to 5 short chain arranged spherical or oval coccus, with capsules. (3) The results of nucleic acid extraction showed that the extracted nucleic acid was stable and could be used for subsequent experimental studies. (4) PCR amplification results showed that the method had good specificity and sensitivity, and could provide technical support for laboratory diagnostic detection and molecular epidemiological investigation of sheep septicemia streptococcus disease. The study concluded that the multiplex PCR detection method is simple, rapid, sensitive and specific, easy to master, and generally suitable for grass-roots units to use, can quickly obtain diagnostic results, identify the pathogen, and pro-

[收稿日期] 2023-10-07

[基金项目] 青海省高端创新人才千人计划项目

[第一作者] 魏梦君(1994-), 女, 助理兽医师, 主要从事动物疫病诊断与检测工作。E-mail: 408724164@qq.com

\* [通信作者] 阚威, E-mail: kanweind@163.com

vide scientific basis for clinical rational drug use.

**Key words:** sheep; streptococcus; multiplex PCR; diagnosis

羊败血性链球菌病,简称羊链球菌病<sup>[1]</sup>,是 C 群马链球菌兽疫亚种引起,一种严重危害绵羊、山羊的急性、热性、败血性的传染病,多发于冬、春寒冷季节<sup>[2]</sup>。主要通过吸呼吸道传染,表现出来的主要特征包括浆液性肺炎与纤维索性胸膜肺炎和全身性出血性败血症、胆囊肿大及颌下淋巴结、咽背淋巴结和咽扁桃体发生肿胀,因而群众称之为“喉症”,该病死亡率较高,最短死亡时间不足 24 h,发生后如治疗不及时或误诊,则可致使养殖户经济损失严重,对放牧地区养羊业危害严重<sup>[3-4]</sup>。本文通过建立羊链球菌多重 PCR 诊断方法,为羊链球菌病的实验室诊断提供便捷准确的诊断检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 本实验采用羊败血性链球菌病活疫苗,购自青海生物药品厂,疫苗批号:YL202003;质控菌株:金黄色葡萄球菌(ATCC25923)。

1.1.2 主要试剂和设备 试剂:Trans2KDNA Marker、2×Taq PCR Master Mix、1×TAE、琼脂

糖、细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自于北京全式金公司;BHI 肉汤培养基、血琼脂培养基,购自青岛海博生物科技有限公司。

设备:显微镜(Olympus, BX41),LRH-250 型恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),SHA-B 型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂),PCR 扩增仪(Bio-RAD, Mexico),凝胶成像系统(Aanalytik Jena, AG),DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪与 DY-CP-31A 型电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.1.3 引物合成 参考已发表的文献<sup>[5-6]</sup>,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成细菌鉴定 16S rRNA 通用引物和羊败血性链球菌种属特异性 sodA 基因引物,引物序列及大小见下表 1。

### 1.2 方法

1.2.1 羊败血性链球菌病活疫苗株复活 取羊败血性链球菌病活疫苗 200 μL,接种于 BHI 增菌培养基,37 °C 培养 24~48 h;挑取增菌液划线接种血平板,37 °C 培养 24~48 h。

1.2.2 羊败血性链球菌病活疫苗株染色镜检 挑取血平板单个菌落触片,干燥,固定,革兰氏染色后镜检。

1.2.3 羊败血性链球菌病活疫苗株核酸提取 根据细菌基因组 DNA 提取盒说明书,提取疫苗株羊链球菌核酸。

表 1 16S rRNA 和 sodA 基因 PCR 扩增引物

Table 1 16S rRNA and sodA gene PCR amplification primers

基因	引物名称	序列(5'→3')	目的片段大小/bp
16S rRNA	16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500
	16S-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGA	
sodA	sodA-F	CAGCATTCTGCTGACATTCGTCAGG	235
	sodA-R	CTGACCAGCCTTATTCACAACCAGCC	

1.2.4 羊败血性链球菌多重 PCR 扩增 采用细菌 16SrRNA 基因和羊链球菌种属特异性基因 sodA 基因,进行双重 PCR 方法扩增鉴定。反应体系(50 μL):2×Taq PCR Master Mix 25 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,超纯水补至 50 μL;反应条件:94 °C 5 min;94 °C 60 s,56 °C 60 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,预期扩增片段大小为 1 500 bp 左右和 235 pb 左右的目的条带。

## 2 结果

### 2.1 羊败血性链球菌病疫苗株复活结果

疫苗株接种 BHI 增菌培养,细菌生长缓慢,24

h 后 BHI 培养基变浑浊;在血平板上形成有光泽、透明湿润、黏稠,表面光滑、边缘整齐,露滴状细小、灰白色的菌落,直径 0.5~1.0 mm,菌落周围有明显的 β 溶血。

### 2.2 羊败血性链球菌病疫苗株细菌镜检结果

镜检可见呈革兰氏染色阳性见图 1 所示,常成对或 3~5 个短链排列的球形或椭圆形球菌,有荚膜,如采集腹水或心包液等病料,呈长链排列。

### 2.3 羊败血性链球菌病疫苗株核酸提取结果

按照细菌基因组 DNA 提取羊链球菌基因组,结果显示提取核酸稳定性良好,可用于后续实验研究,核酸提取结果见下图 2 所示。

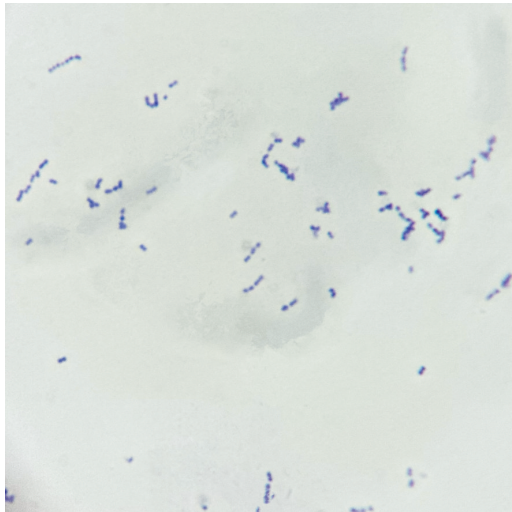
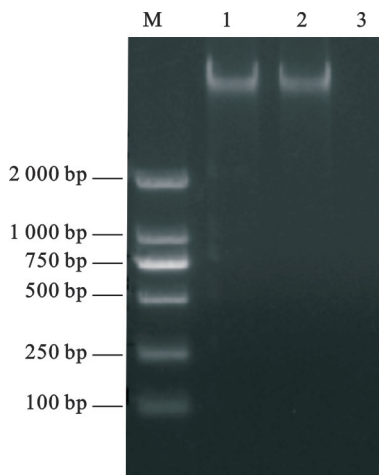


图 1 羊链球菌疫苗株细菌革兰氏镜检

Fig. 1 Gram microscopic examination of bacteria from streptococcus ovis vaccine strain



M. DNA 分子质量标准 Trans2000;1. 羊败血性链球菌病活疫苗株(马链球菌兽疫亚种);2. 质控菌株(金黄色葡萄球菌: ATCC25923);3. 阴性对照(生理盐水)。图 3 同

图 2 羊链球菌疫苗株核算提取结果

Fig. 2 Results of calculation and extraction of streptococcus ovis vaccine strains

#### 2.4 羊败血性链球菌多重 PCR 扩增结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小为 1 500 bp 左右和 235 bp 左右的目的条带, 与预期扩增片段大小相符, 结果显示该方法特异性和敏感性好, 可为羊败血性链球菌病的实验室诊断检测和分子流行病学调查提供技术支持, 扩增结果如下图 3 所示。

### 3 讨论

羊败血性链球菌病死亡率较高, 最短死亡时间不足 24 h, 发生后如治疗不及时或误诊, 则可致使养

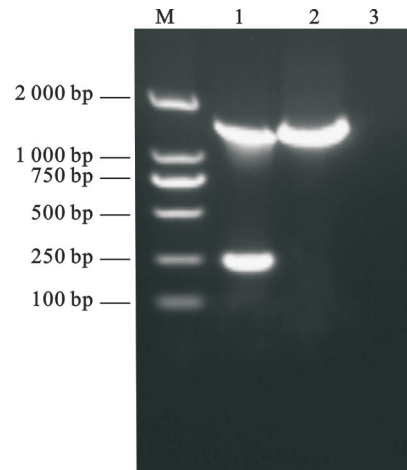


图 3 16SrRNA 和种属特异性基因 sodA 引物 PCR 扩增图

Fig. 3 sodA primer PCR amplification of 16SrRNA and generation-specific genes

殖户经济损失严重, 对放牧地区养羊业危害严重<sup>[7]</sup>。近年来, 随着 PCR 检测技术的发展, 其高度的灵敏性和特异性, 将被广泛应用于病原菌的检测和诊断, 本文结果表明, 该多重 PCR 检测方法简便、快捷, 敏感性和特异性良好, 技术易掌握, 普遍适合基层单位使用, 同时为羊链球菌病的实验室诊断提供了便捷准确的检测方法, 可快速获得诊断结果, 确定病原, 为临床合理用药提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 何高明. 羊的常见病防治[M]. 北京: 中国劳动社会保障出版社, 2011: 31.
- [2] 迟秀丽. 羊链球菌病的流行病学、实验室诊断及防治措施[J]. 现代畜牧科技, 2022(1): 101-102.
- [3] 马利青, 才学鹏, 张克山, 等. 肉羊疾病诊疗图鉴[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2018: 136-138.
- [4] 李 刚. 羊链球菌病的流行诊断及防控[J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(5): 131-132.
- [5] BAVERUD V, JOHANSSON S K, ASPAN A. Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3-4): 219-229.
- [6] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [7] 沈辰峰, 陈世军, 夏 俊, 等. 绵羊链球菌病病例的诊治 [J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(8): 45-47.