

# 水貂铜绿假单胞菌检测方法研究进展

庄金秋, 梅建国, 王玉茂, 杨丽梅, 沈志强

(山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600)

**摘要:** 水貂出血性肺炎是由铜绿假单胞菌引起的威胁养貂业的重要疾病之一。为了解该病相关检测方法的最新研究进展, 本文从病原学和分子生物学方面, 介绍了细菌分离培养、生化试验、特异性抗原及其抗体检测、PCR技术和LAMP技术等。通过比较各种方法的优缺点和实用性, 为临床兽医科技工作者快速、简便、准确、实用地诊断提供参考。

**关键词:** 水貂出血性肺炎; 铜绿假单胞菌; PCR技术; LAMP技术

中图分类号: S855.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X(2018)01-0070-03

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.01.020

## Research Progress on Detection Methods of Mink *Pseudomonas aeruginosa*

Zhuang Jinqiu, Mei Jianguo, Wang Yumao, Yang Limei, Shen Zhiqiang

(Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China)

**Abstract:** Mink hemorrhagic pneumonia is an important infectious disease, which is harm to mink industry. In order to recognize the development of laboratory detection methods, the isolation and culture of bacteria, biochemical tests, specific antigen and antibody detection, PCR technology and LAMP technology were introduced from aspects of etiology and molecular biology. The advantages and disadvantages of various methods and practicability were compared, which could provide a reference for the rapid, simple, accurate and practical diagnosis for the clinical veterinary scientists and technicians.

**Key words:** Mink hemorrhagic pneumonia; *Pseudomonas aeruginosa*; PCR; LAMP

水貂出血性肺炎(Mink hemorrhagic pneumonia)又称假单胞菌病或绿脓杆菌病,是由假单胞菌科假单胞菌属中的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA, 又称绿脓杆菌)引起的一种急性败血性传染病。本病以出血性肺炎和急性死亡为主要特征,死亡前出现呼吸困难和鼻孔出血等症状,死后剖检可见整个肺叶弥漫性出血和败血症变化。该病在世界各地均有发生,发病急,死亡快,常呈地方性暴发性流行,主要发生在每年夏季动物毛发脱落时期,其他季节亦时有发生,是严重威胁养貂业的疾病之一。1953年Knox<sup>[1]</sup>首次在丹麦报道了该病,1982年Gessord从貂体内首次

分离出病菌。我国于1977年在江苏省连云港市某貂场首次发现此病<sup>[2]</sup>。随着我国养貂规模的不断扩大,该病的发生呈明显上升趋势,已在多地相继暴发流行,给养貂业造成了巨大经济损失,严重威胁着我国养貂业的持续健康发展。及时、准确、快速检测是成功防治该病的关键。本文对水貂出血性肺炎的实验室诊断方法进行综述,为有效防治该病提供参考。

### 1 病料直接涂片镜检

在无菌条件下,取新鲜病死水貂肝脏、脾脏和心血等,分别进行直接涂片、革兰染色和镜检,可见有数量不等的革兰阴性,单个、成双或呈短链状的中等大小杆菌,无荚膜和芽孢。吴娟等<sup>[3]</sup>用电镜观察、鉴定了一株水貂PA,为PA鞭毛蛋

基金项目:山东省现代农业产业技术体系特种经济动物创新团队项目(SDAIT-21-15)

白的提取奠定了基础。

## 2 细菌分离培养鉴定

PA可在普通琼脂培养基上生长,形成圆形、光滑、湿润、扁平、中央隆起的和大小中等的菌落,菌落周围培养基呈蓝绿色,开盖后有特殊的香味。PA能产生两种水溶性色素:一种是绿脓菌素(Pyocynin),为蓝绿色的吩嗪类化合物;另一种为荧光素(Pyoverdin),呈黄绿色。后者仅溶于水,不溶于氯仿<sup>[4]</sup>。纯培养物在血液琼脂培养基上的菌落呈灰褐色,周围有 $\beta$ 型溶血环;在肉汤培养基表面可见菌膜,且培养基呈淡绿色,随培养时间延长,则绿色加深;在假单胞菌琼脂B培养基上呈绿色。细菌涂片可见革兰氏阴性菌。岳志刚等<sup>[5]</sup>通过细菌分离培养分离到一株水貂PA,经动物试验鉴定证明为该菌。

## 3 生化试验鉴定

张桂贤等<sup>[6]</sup>应用生化试验分离鉴定了PA。该菌能发酵葡萄糖、D核糖和D果糖等,不发酵麦芽糖、D木糖、L阿拉伯糖、棉籽糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、水杨苷和七叶树苷等。过氧化氢酶、氧化酶、触酶、运动力、硝酸盐、溶血素和脂酶试验,呈阳性。不产生吲哚,靛基质、MR、VP和H<sub>2</sub>S试验阴性。水解明胶而不水解淀粉。

## 4 血清学诊断

本病可用玻片凝集试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)等血清学方法进行诊断。血清玻片凝集试验只能用同场发病、经治疗后病愈的恢复期貂血清,来检测该场病貂肺中用普通琼脂分离得到的纯培养物,有一定局限性。ELISA法可用于特异性抗原及抗体水平的检测,特异性强,敏感性远强于凝集试验,但存在抗原制备过程较为复杂的缺点。Rivera等<sup>[7]</sup>用从水貂分离的PA A蛋白和G蛋白与过氧化物酶连接制成ELISA检测试剂,用以检测PA的血清抗体,发现A蛋白对抗体具有较高的亲和性。

## 5 分子生物学诊断

### 5.1 PCR技术

相对于其他病原菌来说,因PA可在普通琼脂平板和肉汤培养基中产生肉眼可见的水溶性绿色素,所以其鉴别比较容易,但并非所有菌株都能产生绿色素,有的菌株产褐色素,且同属菌株无法区分。为此,Saint等<sup>[8]</sup>和Kureishi等<sup>[9]</sup>分别报道应用PCR技术检测PA。随着分子生物学的迅速发展,细菌的分类鉴定从传统表型和生理生化分类进入到各种基因型分类水平。外毒素A(ETA)基因是PA中保守基因。Song等<sup>[10]</sup>曾根据其设计引物,用于PA的检测,检出率非常高。16SrDNA鉴定是指利用细菌16SrDNA序列测序的方法,对细菌进行种属鉴定,是一种快速获得细菌种属信息的方法<sup>[11]</sup>。高玉伟等<sup>[12]</sup>和孙见等<sup>[13]</sup>根据PA 16SrDNA基因保守序列设计引物,建立了快速检测PA的PCR方法。该法可准确地将PA与假单胞菌属的其他菌种区别开,可以迅速对水貂的出血性肺炎作出确诊,为及时控制该病提供帮助。

### 5.2 环介导等温扩增(LAMP)技术

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,是由日本学者Notomi<sup>[14]</sup>于2000年开发的一种恒温核酸扩增技术。与PCR技术相比,该技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上更精准,无需任何专门仪器设备即可实现现场高通量快速检测,检测成本远低于荧光定量PCR技术。Motoki等<sup>[15]</sup>针对PA oprL基因的保守区域设计了6条引物,研制了快速检测PA感染的LAMP方法,对快速确诊PA感染提供了强大的技术支持。姜莉莉等<sup>[16]</sup>和韩明明等<sup>[17]</sup>先后建立了检测水貂PA外毒素A基因的LAMP检测方法。LAMP检测方法适合于基层使用,具有广泛的临床应用前景。

## 6 讨论

PA是一种条件致病菌,广泛分布于土壤、水、空气及动物的肠道内和皮肤上,可引起多种动物发病,机体抵抗力降低时,可能引起感染<sup>[18]</sup>,是一种人兽共患性传染病原。近年来,由PA引起的动物疫病越来越多。该菌对毛皮动物,如水貂、狐狸

和貉等, 危害严重。水貂养殖密集的山东和辽宁等省份时有养殖场出现大规模水貂出血性肺炎的报道, 给水貂养殖户造成了严重经济损失。临床证明, 该菌对大多数防腐剂和抗菌药物表现为天然或获得性多重耐药, 可供选择的有效抗菌药物很少, 严重困扰着本病的有效治疗, 因此本病重在预防。PA 有 12 个血清型, 市售的疫苗主要以灭活疫苗为主, 只能用于预防疫苗中包含的血清型菌株, 尚未开发出能保护所有血清型的疫苗。

由于血清型十分复杂, 在对 PA 进行鉴定时, 不能仅仅满足于细菌形态和凝集试验等常规诊断结果, 特别是在提出新的血清型时, 更要慎之又慎, 需要综合考虑多种诊断手段的结果, 多进行比较。通过细菌培养特性、生化试验和凝集试验等进行细菌鉴定, 操作简单, 对试验技能和试验条件要求也不高, 可以快速地做出初步判断。PCR 和 LAMP 检测方法特异性很高, 且十分方便、快速。随着对 PA 的分子生物学和免疫原性等方面的深入研究, 希望建立更多快速、有效的检测方法, 以便为临床诊治和免疫预防提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] KNOX B. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of enzootic infections in mink in Danish[J]. *Nord veterinary medicine*, 1953 (5) : 731.
- [2] 初秀, 隋慧萍. 貂假单胞菌性肺炎的研究近况 [J]. *中兽医医药杂志*, 1999, 18 (3) : 36-37.
- [3] 吴娟, 秦晓冰, 单虎. 水貂绿脓杆菌 (PASD03 株) 鞭毛蛋白的提取与分析 [J]. *中国动物检疫*, 2012, 29 (8) : 36-38.
- [4] KING E O, WARD M K, RANEY D E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein[J]. *The journal of laboratory and clinical medicine*, 1954, 44 (2) : 301-307.
- [5] 岳志刚, 宁浩然, 刘学庆, 等. 水貂出血性肺炎的诊断与防治 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2012 (5) : 83.
- [6] 张贵贤, 项方, 王殿永, 等. 水貂出血性肺炎的诊断与防治 [J]. *Agricultural science & technology*, 2012 (12) : 2560-2561.
- [7] RIVERA E, JACKERT J M, MEJERLAND T, et al. Evaluation of protein A and protein G as indicator system in an ELISA for detecting antibodies in mink to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Veterinary microbiology*, 1994, 42 (4) : 265-271.
- [8] SAINT O, ROMÉYER F, LEBEL P, et al. Specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the *Pseudomonadaceae*[J]. *Journal of general microbiology*, 1992, 138 (4) : 733-741.
- [9] KUREISHI A, BRYAN L E. Pre-boiling high GC content mixed primers with 3' complementation allows the successful PCR amplification of *Pseudomonas aeruginosa* DNA[J]. *Nucleic acids research*, 1992, 20 (5) : 1155.
- [10] SONG K P, CHAN T K, JI Z L, et al. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers[J]. *Molecular & cellular probes*, 2000, 14 (4) : 199-204.
- [11] 蔡正求, 宋未, 东秀珠, 等. 细菌种属特异性的 16S rDNA 寡核苷酸探针数据库的初步构建 [J]. *首都师范大学学报*, 2004 (25) : 110-115.
- [12] 高玉伟, 夏咸柱, 胡桂学, 等. 细菌分离和基因扩增确诊水貂出血性肺炎 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006 (4) : 53-54.
- [13] 孙见. 貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定及其环介导等温扩增检测方法的建立 [D]. 北京: 中国农科院, 2012: 6-7.
- [14] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic acids research*, 2000, 28 (12) : e63.
- [15] MOTOKI G, KAYO S, AYAKO S, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of microbiological methods*, 2010 (81) : 247-252.
- [16] 姜莉莉, 樊兆斌, 高文玉. 水貂绿脓杆菌环介导等温扩增快速检测方法的建立 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28 (29) : 79-82.
- [17] 韩明明, 刘旭平, 母连志, 等. 检测水貂出血性肺炎绿脓杆菌的比色 LAMP 法的建立与应用 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 34 (4) : 583-587.
- [18] 韩青松, 简永利, 涂宜强, 等. 绿脓杆菌研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2012, 33 (1) : 122-124.

(责任编辑: 杜宪)