

# 病原菌分子生物学诊断技术及其 在奶牛子宫内膜炎诊断中的应用进展

邵丹<sup>1</sup>, 张世栋<sup>1</sup>, 武小虎<sup>1</sup>, 王东升<sup>1</sup>, 董书伟<sup>1</sup>, 桑梦琪<sup>1</sup>, 喻琴<sup>1,2</sup>, 严作廷<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/

甘肃省新兽药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 子宫内膜炎(Endometritis)是奶牛常见的生殖系统疾病, 影响奶牛的生产性能, 给奶牛养殖业带来了巨大的经济损失。奶牛子宫内膜炎多由病原菌混合感染, 若能及时、准确地检测出致病菌, 对该病的综合防控至关重要。目前, 奶牛子宫内膜炎病原菌诊断技术的相关报道甚少, 为进一步研究开发奶牛子宫内膜炎病原菌诊断技术, 论文对目前应用于其诊断的 PCR 技术、环介导等温扩增(LAMP)技术、基因芯片技术等研究进展进行了综述, 并对其应用情况和优缺点进行了分析与总结, 以期对奶牛子宫内膜炎病原菌诊断技术研究提供参考。

**关键词:** 奶牛; 子宫内膜炎; 病原菌; 分子诊断技术

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.02.021

中图分类号: S857.23; S854.43

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2019)02-0109-04

子宫内膜炎是奶牛分娩期间或产后由细菌感染子宫而引起的一种繁殖障碍性疾病, 是导致不孕症的主要原因<sup>[1-3]</sup>。奶牛子宫内膜炎不仅严重影响奶牛的生产性能, 导致产奶量下降, 还危害奶牛生殖健康, 造成诊疗费用增加, 给奶牛养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。大量研究表明, 细菌感染是引起奶牛子宫内膜炎发生的主要原因, 且多由病原菌混合感染, 还可引起并发症<sup>[5-6]</sup>。常见的致病菌主要是大肠埃希菌和化脓隐秘杆菌, 其他致病菌如链球菌、金黄色葡萄球菌、坏死杆菌、假单胞菌属及拟杆菌属等因地域性差异其分布也不尽相同<sup>[7-9]</sup>。目前, 奶牛子宫内膜炎病原菌的检测主要以传统细菌培养方法为基础, 这种方法需花费数天才能得到结果, 已不能满足临床上早诊断、早治疗的要求。因此, 临床上急需一些简单、快速、准确的诊断技术来及时检测致病菌。近年来, 随着科学技术的不断发展, 分子生物学技术检测病原菌得到了广泛应用。为进一步研究开发奶牛子宫内膜炎病原菌诊断技术, 作者对目前应用于其诊断的 PCR 技术、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、基因芯片技术等研究进展进行了综述。

## 1 聚合酶链反应

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction,

PCR) 自发明以来就被受到密切关注, 现已得到广泛应用。目前, PCR 已成为病原微生物检测的主要技术<sup>[10]</sup>, 该技术不但能够克服传统细菌鉴定方法耗时长、操作繁琐等缺点, 而且它还具有操作简便、敏感度高、特异性好、检测成本低等优点, 从而提高了检测结果的可靠性和时效性<sup>[11]</sup>。因此, 有些研究者试图应用 PCR 技术来检测子宫分泌物的病原菌<sup>[7,10,12]</sup>, 并逐步建立起了相对成熟的 PCR 子宫内膜炎分子诊断方法。

### 1.1 常规 PCR 诊断技术

应用常规 PCR 方法检测病原菌的关键是根据相关基因设计 1 对适宜的引物, 该引物所介导的 DNA 扩增序列应是该菌特异的保守序列<sup>[13]</sup>。刘明春等<sup>[14]</sup>利用 PCR 技术扩增化脓隐秘杆菌溶血素 plo 基因, 成功从子宫内膜炎患牛中分离出 32 株化脓隐秘杆菌。Yan Y 等<sup>[15]</sup>运用 PCR 技术扩增沙门菌相关基因, 检测灵敏度能达到 1 CFU/25 g, 灵敏性较好。张明富<sup>[16]</sup>针对化脓隐秘杆菌特异性 plo 基因设计引物, 建立了一种特异、灵敏的 PCR 方法, 重复性和准确性较高, 最低检出量可达  $9.2 \times 10^3$  CFU/mL。常规 PCR 价格低廉, 检测周期短, 特异性和灵敏度较好, 虽然与传统细菌鉴定方法相比占有一定的优势, 但病原检测单一, 只能通过 1 对引物

收稿日期: 2018-03-01

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2017YFD0502201); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-03)

作者简介: 邵丹(1993-), 女, 山东鄄城人, 硕士研究生, 主要从事奶牛疾病诊断技术研究。\* 通讯作者

扩增出一条特定基因。然而,引起奶牛子宫内膜炎的病原菌种类繁多,且多由混合感染所致,常规 PCR 技术已不能满足临床上同时检测多种致病菌的要求。

### 1.2 多重 PCR 检测技术

多重 PCR(multiplex PCR)克服了普通 PCR 引物单一的缺陷,是为了提高检测效率,降低检测成本而发展起来的一种 PCR 技术。它是在一个反应体系中同时加入 2 对以上的引物,同时扩增多个目的基因,可以完成多种致病菌的同时鉴定。目前,关于奶牛子宫内膜炎的多重 PCR 技术已有相关报道。Aghamiri S M 等<sup>[17]</sup>分别在产后 25 d~35 d 和产后 39 d~49 d 利用多重 PCR 技术检查 128 头母牛子宫内膜炎的主要致病菌,结果在 8 个样品中检测到大肠埃希菌,在 13 个样品中检测到化脓性链球菌,在 11 个样品中检测到坏死梭菌,第一次检查发现子宫内膜炎的患病率高于第二次。Tramuta C 等<sup>[18]</sup>利用多重 PCR 技术分别对造成奶牛流产的主要细菌、支原体、病毒、寄生虫等进行检测,结果表明,使用每个多重 PCR 获得的结果与通过在同样本上使用针对单个基因的各个 PCR 测定所获得的结果是一致的,此外,临床样品的所有多重 PCR 检测与参考方法进行比较,在所有样品中获得完美的一致性,并证实了该组多重 PCR 检测的有效性。Gillespie B E 等<sup>[19]</sup>建立了检测奶牛乳房炎奶样中病原菌金黄色葡萄球菌、乳房链球菌和无乳链球菌的实时多重 PCR 诊断方法,直接检测奶样敏感性为 95.5%,特异性为 100%。多重 PCR 技术可一次完成多个病原菌的检测,具有简便、快速、成本低的优点,但灵敏度相对于普通 PCR 有所下降,因此需对整个 PCR 反应体系(包括引物浓度、*Taq* 酶浓度、退火温度及延伸时间等)进行全面的优化<sup>[20]</sup>。而且,很少有人提出多重靶基因的方案来鉴定奶牛子宫内膜炎子宫分泌物的感染因子<sup>[21]</sup>,对引物的设计提出了更高的要求;此外,多重 PCR 与常规 PCR 一样,只能对病原菌进行定性,而不能达到定量的检测。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,该技术是对传统 PCR 技术的补充和发展。其原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行实时而快速定量分析的方法,近年来该技术在病原性微生物的检测上已经取得了较多进展<sup>[22]</sup>。Guion C E 等<sup>[23]</sup>利用熔解曲线分析及多重

real-time PCR 法对于大肠埃希菌的检测,特异性强,敏感性高。Wang J 等<sup>[24]</sup>采用 PCR、变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis PCR,PCR-DGGE)和实时荧光定量 PCR 技术来评估健康产后母牛与子宫内膜炎产后母牛的阴道微生物区系,通过实时荧光定量 PCR 在两组奶牛中检测到了大肠埃希菌、拟杆菌属和梭杆菌属等,结果表明,与健康奶牛相比,子宫内膜炎奶牛的阴道微生物区系更加多样化,缺乏优势菌群,说明正常阴道微生物菌群的破坏可能导致子宫内膜炎的发生。唐吉思等<sup>[25]</sup>为建立检测牛乳中金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)肠毒素 A 基因(SEA)定性定量的检测方法,针对 *S. aureus* SEA 基因片段设计 1 对引物,将构建的重组质粒作为阳性对照,建立了 *S. aureus* SEA DNA 的 SYBR Green I real-time PCR 检测方法,结果显示,特异性产物  $T_m$  值为 78.2 °C~78.5 °C,最低可检测到 49.5 fg/ $\mu$ L(16.5 拷贝)的阳性质粒,标准曲线的相关系数为 0.99,无交叉反应,具有较好的特异性和敏感性。实时荧光定量 PCR 是 PCR 技术从定性到定量的飞跃,常规 PCR 和多重 PCR 只能达到半定量,而荧光定量 PCR 做到了相对定量,且灵敏度和准确性也有极大的提高,但荧光定量 PCR 也存在仪器及试剂成本较高的问题,不便于现场的快速诊断。

## 2 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)技术是 2000 年日本学者 Notomi 等发明的一种新型恒温核酸扩增技术,其原理是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,在链置换 DNA 聚合酶(*Bst*DNA polymerase)的作用下,65 °C 恒温扩增,不到 1 h 即可实现  $10^9$  倍的核酸扩增,可通过反应是否产生扩增产物即焦磷酸镁白色沉淀来判断靶基因是否存在<sup>[26-27]</sup>。Cho A E 等<sup>[28]</sup>用 LAMP 法检测单增李氏杆菌,在李氏增菌液中增菌 12 h 和增菌 24 h 的检测限分别是 2.22 CFU/mL,在李氏增菌液-牛奶中增菌 12 h 和 24 h 后的检测限分别是 22.2 和 2.22 CFU/mL,比 PCR 方法的检测限低,并且牛奶成分不会干扰试验结果。Sheet O H 等<sup>[29]</sup>用 LAMP 技术检测奶牛乳房炎奶样中的金黄色葡萄球菌,检测限为  $9 \times 10^2$  CFU/mL,2 h 之内即可完成整个检测。李永刚等<sup>[30]</sup>根据金黄色葡萄球菌的 *femA* 基因设计了引物,建立了一种能够快速准确地检测金黄色葡萄球菌的 LAMP 技术,特异性好,灵敏度高,检测限为 8 CFU/mL~9 CFU/mL。LAMP 技术具有灵敏度高、特

异性强、检测时间短、不需要特殊设备等优点。但引物设计较困难,需对引物进行反复筛选;另外,反应产物一旦开盖即可造成气溶胶污染且易产生样品间交叉污染,因此应注意操作,严格控制污染。该方法操作简便,结果可视化,适合基层检测机构的推广使用。

### 3 基因芯片技术

基因芯片(genechip)又称为DNA微阵列(DNA microarray),可以平行化、高通量地对多种病原微生物进行快速鉴定,其原理是将大量的寡核苷酸片段或基因片段作为探针固定于玻片或硝酸纤维素膜等载体上,然后与待检的靶基因进行杂交,通过扫描仪分析杂交信号或可视化放大反应来判断靶基因是否存在。近年来,随着基因技术的发展,国内外越来越多的学者致力于基因芯片检测致病菌的研究。Miller S M等<sup>[31]</sup>利用病原体毒力及特异基因构建一种能同时检测11种病原细菌、2种真菌、5种病毒的芯片,是最早应用特异基因的芯片之一。饶宝等<sup>[32]</sup>通过16S rRNA基因序列设计特异性探针,制备的基因芯片能够在相同条件下同时检测并区分沙门菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌。Lee K H等<sup>[33]</sup>则用基因芯片技术实现了金黄色葡萄球菌、牛棒状杆菌、乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌、牛链球菌和牛支原体7种奶牛乳房炎病原菌的检测,该检测方法能在6 h内得到检测结果且具有较高的灵敏度。与其他检测方法相比,基因芯片技术可同时对多类样品进行准确、快速的检测,高通量是其最大的优点,节省了大量的时间,为奶牛子宫内膜炎病原菌的诊断提出了新思路。

该技术虽然使那些不能培养或很难培养的病原微生物得到快速诊断,但不能完全解决细菌分类及细菌进化等问题,仍需要结合其他方法来进一步解决微生物的分类及鉴定。此外,因其成本较高、标记操作复杂、分析范围较狭窄等问题,限制了该技术大规模地应用于临床检测中。

### 4 小结

近年来,各地奶牛养殖业迅速发展,子宫内膜炎发病率随之不断升高,给奶牛业造成了巨大的经济损失。奶牛子宫内膜炎主要是由多种病原菌微生物引起,现有的检测方法尚不能满足快速高效检测多种致病菌的需要。分子生物学技术在奶牛子宫内膜炎中的应用前景非常广阔,它从基因的水平鉴定细菌,检测时间大大缩短。多重PCR和基因芯片技术可以同时多种病原菌进行检测,特异性和灵敏性高;荧光定量PCR技术使得病原菌的检测达到了从

定性到定量的飞跃;LAMP技术能够在1 h内得出肉眼可见的结果,极大地缩短了检测的时间。虽然分子生物学技术具有以上优势,但也存在一定的缺陷,比如成本高昂,需专业技术人员操作完成等,限制了其在基层牛场或兽医站的推广应用。目前,关于奶牛子宫内膜炎病原菌诊断技术的研究甚少,因此,临床上急需快速、简便、灵敏的检测方法来提高子宫内膜炎的诊断效率。应用分子生物学技术进行早期、快速、准确地诊断将成为控制奶牛子宫内膜炎的趋势,这对于奶牛子宫内膜炎的诊疗十分关键,应用前景非常广阔。

### 参考文献:

- [1] Sheldon I M, Lewis S, Leblancee S, et al. Defining postpartum uterine disease in cattle[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(8): 1516-1530.
- [2] Dohmen M J W, Joop K, Sturk A, et al. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta[J]. *Theriogenology*, 2000, 54(7): 1019-1032.
- [3] Azawi O I. Postpartum uterine infection in cattle[J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(3/4): 187-208.
- [4] Leblanc S. Economics of improving reproductive performance in dairy herds[J]. *Adv Dairy Technol*, 2007, 19: 201-214.
- [5] 龚团莲. 奶牛子宫内膜炎致病菌的分离鉴定、药敏试验及致病力研究[J]. 2017, 38(6): 104-106.
- [6] Aghamiri S M, Haghkhal M, Ahmadi M R, et al. Development of a multiplex PCR for the identification of major pathogenic bacteria of post-partum endometritis in dairy cows[J]. *Reprod Dom Anim*, 2014, 49(2): 233-238.
- [7] Bicalho M L, Machado V S, Oikonomou G, et al. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157(1/2): 125-131.
- [8] 马建玲. 奶牛子宫内膜炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *安徽农业科学*, 2014(14): 4371-4373.
- [9] Santos T M, Gilbert R O, Bicalho R C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(1): 291-302.
- [10] Guo M Y, Wang G Q, Shao G, et al. Identification of intrauterine *Mycoplasma* in endometritis of dairy cow isolates by 16S rDNA nested PCR-DGGE[J]. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11(10): 1745-1752.
- [11] 管远志, 王艾琳, 李 座. 医学微生物实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 249-255.
- [12] Liu M C, Wu C M, Liu Y C, et al. Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(8): 3659-3666.
- [13] 王 爽. 奶牛子宫内膜炎主要病原菌分离鉴定及多重PCR诊断方法的建立[D]. 黑龙江大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.

- [14] 刘明春,杨蕴力,吴聪明,等. 奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌的分离与 PCR 鉴定[J]. 畜牧与兽医,2008,40(11):76-77.
- [15] Yan Y, Wang X, Guo Y, et al. Study on detection of *Salmonella* in poultry samples by real-time PCR with Taqman probes [J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2014, 48(8):731-735.
- [16] 张明富. 牛源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及其 PCR 检测方法的建立[D]. 黑龙江哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [17] Aghamiri S M, Haghkhah M, Ahmadi M R, et al. Development of a multiplex PCR for the identification of major pathogenic bacteria of post-partum endometritis in dairy cows [J]. Rep Dom Anim, 2014, 49:233-238.
- [18] Tramuta C, Lacerenza D, Zoppi S, et al. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples [J]. J Vet Diag Invest, 2011, 23(4):657-664.
- [19] Gillespie B E, Oliver S P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(10):3510-3518.
- [20] 王丹,杨峰,李宏胜,等. 奶牛乳房炎病原菌诊断技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(6):1811-1817.
- [21] Sun D, Wu R, He X, et al. Development of a multiplex PCR for diagnosis of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* from cows with endometritis [J]. Agri Sci China, 2011, 10(10):1624-1629.
- [22] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔著 DW. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 等. 译. 北京:科学出版社,2003.
- [23] Guion C E, Ochoa T J, Walker C M, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(5):1752-1757.
- [24] Wang J, Sun C G, Liu C, et al. Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR [J]. Anaerobe, 2016, 38:1-6.
- [25] 唐吉思,布日额,吴金花,等. 荧光定量 PCR 检测牛乳中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报,2012,34(1):56-59.
- [26] Shao Y, Zhu S, Jin C, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 148(2):75-79.
- [27] Kokkinos P A, Ziros P G, Bellou M, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food [J]. Food Anal Meth, 2014, 7(2):512-526.
- [28] Cho A R, Dong H J, Seo K H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes* prfA in Milk [J]. Food Sci Biotechnol, 2014, 23(2):467-474.
- [29] Sheet O H, Grabowski N T, Abdulmawjood A, et al. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis milk samples [J]. Mol Cell Probes, 2016(30):320e325.
- [30] 李永刚,王德国,武建刚,等. 环介导恒温扩增法(LAMP)检测金黄色葡萄球菌 [J]. 食品工业科技,2010,31(1):388-390.
- [31] Miller S M, Tourlousse D M, Stedtfeld R D, et al. In situ synthesized virulence and marker gene biochip for detection of bacterial pathogens in water [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(7):2200-2209.
- [32] 饶宝,唐桂芬,刘玲玲,等. 沙门氏菌,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的基因芯片检测技术研究 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报,2012,32(3):3-5.
- [33] Lee K H, Lee J W, Wang S W, et al. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples [J]. J Vet Diagn Invest, 2008, 20(4):463-471.

## Molecular Biological Diagnosis of Pathogenic Bacteria and Its Application in Endometritis of Dairy Cows

SHAO Dan<sup>1</sup>, ZHANG Shi-dong<sup>1</sup>, WU Xiao-hu<sup>1</sup>, WANG Dong-sheng<sup>1</sup>, DONG Shu-wei<sup>1</sup>, SANG Meng-qi<sup>1</sup>, YU Qin<sup>1, 2</sup>, YAN Zuo-ting<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Discovery/Ministry of Agriculture Key Laboratory of New Animal Drug Project of Gansu Province/Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, 730050, China; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, 730070, China)

**Abstract:** Endometritis is a common reproductive disease in dairy cows, affecting the reproductive performance of dairy cows and causing great economic losses to the dairy farming industry. Cow endometritis is usually caused by infections of mixed pathogens. If it can detect the pathogenic bacteria in time and accurately, it is crucial for the comprehensive prevention and control of the disease. At present, there are few reports on the diagnosis of pathogenic bacteria in cow endometritis. The author summarized the current research progress on the polymerase chain reaction (PCR), genechip and loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and introduced the application and advantages or disadvantages of rapid detection technology, which aimed to provide some references for research on cow endometritis pathogens.

**Key words:** dairy cow; endometritis; pathogenic bacteria; molecular diagnostic technique