



禽大肠杆菌、肠炎、鼠伤寒、鸡白痢及鸡伤寒沙门菌多重 PCR 方法的建立及应用

梁华^{1,2} 王少辉² 吴晓君² 许漩² 田明星² 丁铲² 张焕容^{*1} 于圣青^{*2}

1 西南民族大学生命科学与技术学院 四川 成都 610041

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

摘要:【背景】大肠杆菌病和沙门菌病是最常见的家禽细菌性疾病,给养禽业造成严重经济损失。另外,禽大肠杆菌和沙门菌也是重要的人畜共患病原菌,可通过禽类及其产品传播给人类,对人类健康造成严重威胁。加强禽大肠杆菌和沙门菌的快速鉴别检测,对养禽业和公共卫生都具有重要意义。【目的】建立禽大肠杆菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的多重 PCR 检测方法。【方法】通过比较分析确定禽致病性大肠杆菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的特异靶标基因,设计 5 对特异性引物,通过条件优化建立多重 PCR 方法,分析该多重 PCR 方法的特异性、敏感性 & 可靠性。【结果】该方法能特异性地鉴定禽致病性大肠杆菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌,每个 PCR 反应的最低检出限分别为 10^3 CFU 细菌和 100 pg 基因组 DNA。临床分离菌株检测显示,多重 PCR 与传统血清学方法结果一致。【结论】建立的多重 PCR 方法能够快速鉴别禽致病性大肠杆菌和不同血清型沙门菌,对禽大肠杆菌病和沙门菌病的流行病学调查及临床检测具有重要意义。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 沙门菌, 多重 PCR, 检测

Multiplex PCR assay for detection of Avian pathogenic *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*

LIANG Hua^{1,2} WANG Shao-Hui² WU Xiao-Jun² XU Xuan² TIAN Ming-Xing²
DING Chan² ZHANG Huan-Rong^{*1} YU Sheng-Qing^{*2}

1 College of Life Science and Technology, University of Southwest Nationalities, Chengdu, Sichuan 610041, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Background] Colibacillosis and salmonellosis are the most common bacterial diseases in

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500800); Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201403054); National Natural Science Foundation of China (31572523)

***Corresponding authors:** ZHANG Huan-Rong: Tel: 86-28-85522727; E-mail: zhrong05@163.com

YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 04-04-2018; **Accepted:** 11-06-2018; **Published online:** 21-06-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800); 公益性行业(农业)科研专项(201403054); 国家自然科学基金(31572523)

***通信作者:** 张焕容: Tel: 028-85522727; E-mail: zhrong05@163.com

于圣青: Tel: 021-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-04; **接受日期:** 2018-06-11; **网络首发日期:** 2018-06-21

poultry, causing economically devastating to poultry industries. *Salmonella* and avian pathogenic *E. coli* (APEC) are important zoonotic pathogens, also with potential threat to human health. Thus, it is necessary to strengthen the rapid detection and differential diagnosis of these bacterial diseases. [Objective] We developed multiplex PCR to efficiently detect APEC, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*. [Methods] The special genes of APEC, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* were screened and selected for primers designing. A multiplex PCR method was developed by optimization of conditions. Then, the sensitivity and usage for detection of clinical isolates were determined. [Results] A multiplex PCR was established for accurately and effectively detection of APEC, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*. The sensitivity of the multiplex PCR was 10^3 bacterial colony forming units (CFUs) and 100 pg genomic DNA. The results of multiplex PCR for detection of clinical isolates agreed well with those of traditional serological assays. [Conclusion] Multiplex PCR developed in this study could efficiently detect APEC, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, Multiplex PCR, Detection

随着集约化养禽业的快速发展, 长期、不合理地使用抗生素引起广泛的耐药性, 由此导致疾病的发生和流行不断增多, 给养禽业造成重要经济损失。目前, 严重危害家禽的细菌性传染病主要是禽大肠杆菌病和沙门菌病, 表现为心包炎、肝周炎、脑膜炎、败血症、肠炎、白痢、伤寒等症状^[1-2], 其主要由禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *E. coli*, APEC)、肠炎沙门菌(*S. enteritidis*)、鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)、鸡白痢沙门菌(*S. pullorum*)和鸡伤寒沙门菌(*S. gallinarum*)引起。另外, APEC和沙门菌是人畜共患病原, 且家禽是 APEC 和沙门菌的储库, 可通过禽类及其产品传播给人类, 对人类健康及公共卫生造成潜在威胁^[3-5]。

目前, 对细菌性疾病的诊断主要通过细菌分类鉴定、血清型鉴定、生化试验、分子生物学技术、免疫学技术等方法。传统方法主要通过血清凝集鉴定沙门菌, 但该方法费时费力, 且有些血清型难以区分。PCR 技术因其特异性强、敏感性高、操作简单、检测快速等优点而被广泛应用^[6]。多重 PCR 具有省时省力、高效经济、简便等优点, 可实现并常用于对多种不同病原或多个基因的同时检测。因此, 本研究通过序列比对分析确定了禽致病性大肠杆菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌

和鸡伤寒沙门菌的特异性检测靶基因, 然后设计引物并建立了一种能够准确快速检测禽大肠杆菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的快速检测 PCR 方法, 为禽大肠杆菌病和沙门菌病的鉴别诊断及流行病学调查提供了技术手段。

1 材料与方法

1.1 菌株

禽致病性大肠杆菌 DE719、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) ATCC14028、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) SL1344、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) CVCC3384、肠炎沙门菌 (*S. enteritidis*) CVCC3374、肠炎沙门菌 (*S. enteritidis*) CVCC1805、鸡白痢沙门菌 (*S. pullorum*) CVCC519、鸡伤寒沙门菌 (*S. gallinarum*) ATCC9184、禽波氏菌 ATCCIPDH591-77、铜绿假单胞菌 PA14、鸡毒支原体 CVCC1651、猪链球菌、血清 1 型鸭疫里默氏杆菌 CH3、血清 2 型鸭疫里默氏杆菌 Yb2、血清 10 型鸭疫里默氏杆菌 HXb2、单增李斯特菌 10403s、禽巴氏杆菌 CVCC493、金黄色葡萄球菌 CVCC543、禽致病性大肠杆菌临床分离株和沙门菌临床分离株由上海兽医研究所保存。

1.2 主要试剂和仪器

DNA marker、2×*Taq* PCR Master Mix, 北京康为世纪生物科技有限公司; GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, ABI 公司; 核酸电泳仪、全自动凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.3 引物设计

通过比较分析不同血清型沙门菌的全基因组序列及禽致病性大肠杆菌基因序列, 筛选特异性诊断靶标基因, 设计特异性检测引物(表 1), 引物由华津生物科技有限公司合成。

1.4 基因组 DNA 的提取

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。

1.5 多重 PCR 反应体系的建立及优化

首先以阳性菌株为模板进行单基因 PCR 扩增, 建立单基因 PCR 反应体系。然后, 采用方阵法优化引物浓度、退火温度, 确定最佳 PCR 反应体系及反应条件, 建立多重 PCR 方法。多重 PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, 模板 1 μL, 各引物对最佳浓度见表 1, 超纯水补至 20 μL。

PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 50 s, 57 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.6 PCR 产物的鉴定

取 10 μL PCR 扩增产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶, 120 V 恒压电泳 30 min, 在紫外灯下观察并记录结果。将阳性条带切胶, 采用 GeneJET Gel Extraction Kit 回收目的片段, 送上海华津生物科技有限公司测序。

1.7 多重 PCR 的特异性试验

分别以禽致病性大肠杆菌、沙门菌、禽波氏菌、鸡毒支原体、鸭疫里默氏杆菌、禽巴氏杆菌、铜绿假单胞菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌等细菌基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增, 以检测建立多重 PCR 方法的特异性。

1.8 多重 PCR 的敏感性试验

1.8.1 菌液敏感性试验

分别培养禽致病性大肠杆菌 DE719、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌、肠炎沙门菌标准株, 并依次稀释, 取 1 μL 作为模板进行多重 PCR 反应, 检测多重 PCR 方法的菌液敏感性。

1.8.2 基因组 DNA 敏感性试验

分别提取禽致病性大肠杆菌 DE719、鼠伤寒沙

表 1 多重 PCR 检测引物

Table 1 Primers used for the multiplex PCR

Primers name	Primers sequences (5'→3')	Concentration of primers (μmol/L)	Size (bp)
<i>phoA</i> -F	GGCAATACACTCACTATGCGCTG	0.5	761
<i>phoA</i> -R	AGGATTCGCAGCATGATCCTG	0.5	
<i>glgC</i> -F	CGTCGCTATAAAGCGGAATATGT	0.2	83
<i>glgC</i> -R	CCTTTTCAAAACATACGCGAGTAG	0.2	
<i>SGP</i> -F	GTTGCCGTACCGGTCGTAACG	0.3	249
<i>SGP</i> -R	TTCCTGACGGGCATCGACGGC	0.3	
<i>sdjI</i> -F	GATGTGGTTGGTTCGTCCTG	0.4	409
<i>sdjI</i> -R	GCGAGACCTCAAACCTACTCAG	0.4	
<i>STM4495</i> -F	CAGCGGTATGATGCGGTAGT	0.5	569
<i>STM4495</i> -R	TCACCGGTGGACATGCCTGC	0.5	

门菌、肠炎沙门菌、鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌标准株的基因组 DNA, 并依次稀释, 取 1 μ L 作为模板进行多重 PCR, 检测多重 PCR 方法的 DNA 敏感性。

1.9 多重 PCR 的应用

应用建立的多重 PCR 方法对本实验室保存的 52 株 APEC 及沙门菌菌株进行检测, 比较与血清学和生化鉴定的结果, 验证多重 PCR 方法的可行性。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 方法的建立

分别以禽致病性大肠杆菌 DE719 和沙门菌标准菌株基因组 DNA 为模板, 用设计的引物建立单基因 PCR, 然后经过条件优化建立多重 PCR 检测体系。结果显示, 建立的 PCR 可特异性扩增出目的条带, 且与预期扩增基因片段大小一致(图 1)。禽致病性大肠杆菌可扩增出 761 bp 特异性条带; 鼠伤寒沙门菌可扩增出 569 bp 特异性条带; 肠炎

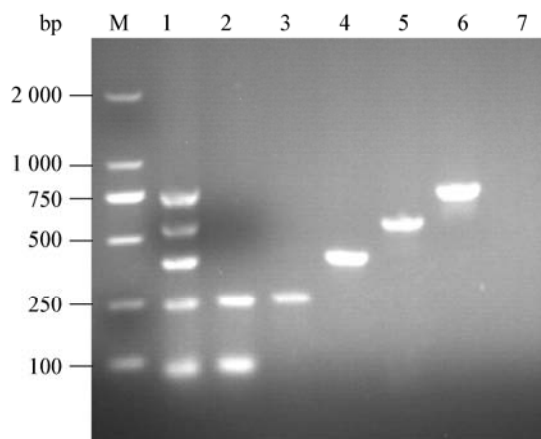


图 1 多重 PCR 方法的建立

Figure 1 Development of multiplex PCR

注: 1: 多重 PCR 产物; 2: 鸡伤寒沙门菌 ATCC9184; 3: 鸡白痢沙门菌 CVCC519; 4: 肠炎沙门菌 CVCC3374; 5: 鼠伤寒沙门菌 ATCC14028; 6: 禽致病性大肠杆菌 DE719; 7: 阴性对照; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: Products of multiplex PCR; 2: *S. gallinarum* ATCC9184; 3: *S. pullorum* CVCC519; 4: *S. enteritidis* CVCC3374; 5: *S. typhimurium* ATCC14028; 6: APEC DE719; 7: Negative control; M: DL2000 DNA marker.

沙门菌可扩增出 409 bp 特异性条带; 鸡白痢沙门菌可扩增出 249 bp 特异性条带; 鸡伤寒沙门菌可扩增出 249 bp 和 83 bp 特异性条带。将阳性特异性条带切胶回收后测序, 结果表明扩增条带序列与目的基因序列一致。经过试验条件优化最终确定各引物对的最佳浓度(表 1)及 PCR 反应程序, 具体反应参数见 1.5。

2.2 多重 PCR 的特异性检测

分别以禽致病性大肠杆菌 DE719、鼠伤寒沙门菌 ATCC14028、肠炎沙门菌 CVCC3374、肠炎沙门菌 CVCC1805、鸡白痢沙门菌 CVCC519、鸡伤寒沙门菌 ATCC9184、禽波氏菌 ATCCIPDH591-77、铜绿假单胞菌 PA14、鸡毒支原体 CVCC1651、猪链球菌、鸭疫里默氏杆菌、单增李斯特菌 10403s、禽巴氏杆菌 CVCC493、金黄色葡萄球菌 CVCC543 等细菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示阳性菌株均扩增出目的条带, 而阴性菌株均未扩增出目的片段(图 2), 表明多重 PCR 方法具有较好的特异性。

2.3 多重 PCR 的敏感性检测

分别以稀释的阳性菌株菌液为模板进行多重 PCR 扩增, 结果显示, 禽致病性大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的最低检出量均为 10^3 CFUs/反应(图 3A)。

以不同稀释度的阳性菌株基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增, 结果显示, 多重 PCR 反应体系检测禽致病性大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的最低检出 DNA 量均为 100 pg/反应(图 3B), 具有较高的灵敏度。

2.4 临床分离菌株的检测

采用本研究所建立的多重 PCR 方法对本实验室保存的 52 株临床分离菌株进行检测, 结果显示, 多重 PCR 检测结果(图 4)与单重 PCR 检测、玻板凝集试验及生化鉴定结果一致, 表明多重 PCR 方法可用于临床菌株检测。

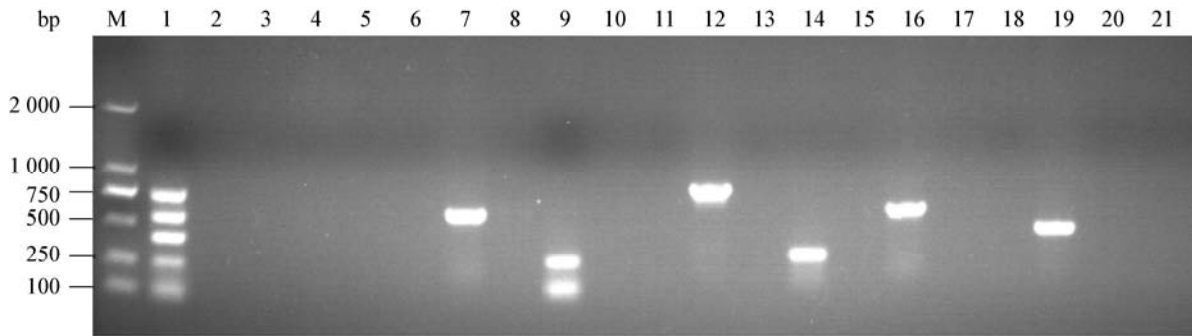


图2 多重PCR的特异性

Figure 2 The specificity of multiplex PCR

注: 1: 多重PCR产物; 2: 血清1型鸭疫里默氏杆菌CH3; 3: 金黄色葡萄球菌CVCC543; 4: 铜绿假单胞菌PA14; 5: 猪链球菌; 6: 血清2型鸭疫里默氏杆菌Yb2; 7: 鼠伤寒沙门菌分离株SAT52; 8: 血清10型鸭疫里默氏杆菌HXb2; 9: 鸡伤寒沙门菌ATCC9184; 10: 单增李斯特菌10403s; 11: 禽巴氏杆菌CVCC493; 12: 禽致病性大肠杆菌DE719; 13: 血清15型鸭疫里默氏杆菌wg4; 14: 鸡白痢沙门菌CVCC519; 15: 禽支原体CVCC274; 16: 鼠伤寒沙门菌SL1344; 17: 禽波氏菌IPDH591-77; 18: 金黄色葡萄球菌CVCC543; 19: 肠炎沙门菌CVCC1805; 20: 鸡毒支原体CVCC1651; 21: 阴性对照; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: Products of multiplex PCR; 2: *Riemerella anatipestifer* CH3; 3: *Staphylococcus aureus* CVCC543; 4: *Pseudomonas aeruginosa* PA14; 5: *Streptococcus suis*; 6: *Riemerella anatipestifer* Yb2; 7: *S. typhimurium* SAT52; 8: *Riemerella anatipestifer* HXb2; 9: *S. gallinarum*; 10: *Listeria monocytogenes* 10403s; 11: *Pasteurella* CVCC493; 12: APEC strain DE719; 13: *Riemerella anatipestifer* wg4; 14: *S. pullorum* CVCC519; 15: *Mycoplasma avium* CVCC274; 16: *S. typhimurium* SL1344; 17: *Bordetella* IPDH591-77; 18: *Staphylococcus aureus* CVCC543; 19: *S. enteritidis* CVCC1805; 20: *Mycoplasma gallisepticum* CVCC1651; 21: Negative control; M: DL2000 DNA marker.

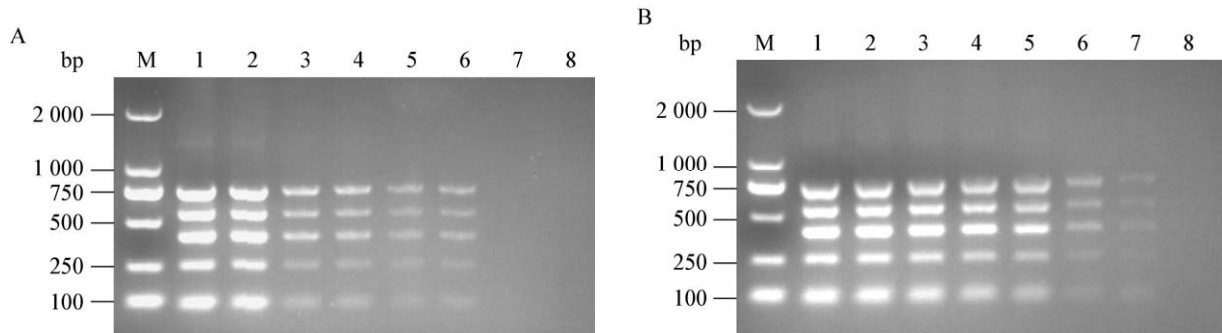


图3 多重PCR敏感性试验

Figure 3 Sensitivity test of multiplex PCR

注: A: 多重PCR菌液敏感性. 1: 10^8 CFUs; 2: 10^7 CFUs; 3: 10^6 CFUs; 4: 10^5 CFUs; 5: 10^4 CFUs; 6: 10^3 CFUs; 7: 10^2 CFUs; 8: 阴性对照. B: 多重PCR的DNA敏感性. 1: 200 ng; 2: 100 ng; 3: 50 ng; 4: 10 ng; 5: 1 ng; 6: 500 pg; 7: 100 pg; 8: 阴性对照. M: DL2000 DNA marker.

Note: A: Sensitivity test of multiplex PCR using bacteria. 1: 10^8 CFUs; 2: 10^7 CFUs; 3: 10^6 CFUs; 4: 10^5 CFUs; 5: 10^4 CFUs; 6: 10^3 CFUs; 7: 10^2 CFUs; 8: Negative control. B: Sensitivity test of multiplex PCR using DNA. 1: 200 ng; 2: 100 ng; 3: 50 ng; 4: 10 ng; 5: 1 ng; 6: 500 pg; 7: 100 pg; 8: Negative control. M: DL2000 DNA marker.

3 讨论与结论

目前对细菌性传染病的防治主要采用抗生素等药物进行防治,但由于抗生素的不合理使用,导致耐药性的出现及禽类产品的药物残留,不仅影响养禽业的健康发展,而且危害食品安全和人类生

存环境。禽大肠杆菌病和沙门菌病是危害养禽业的重要细菌病,给养禽业造成重大经济损失^[1-2],且具有重要的公共卫生学意义。因此,建立禽大肠杆菌病和沙门菌病的快速准确的检测及鉴别诊断方法,对养禽业及公共卫生具有重要作用。

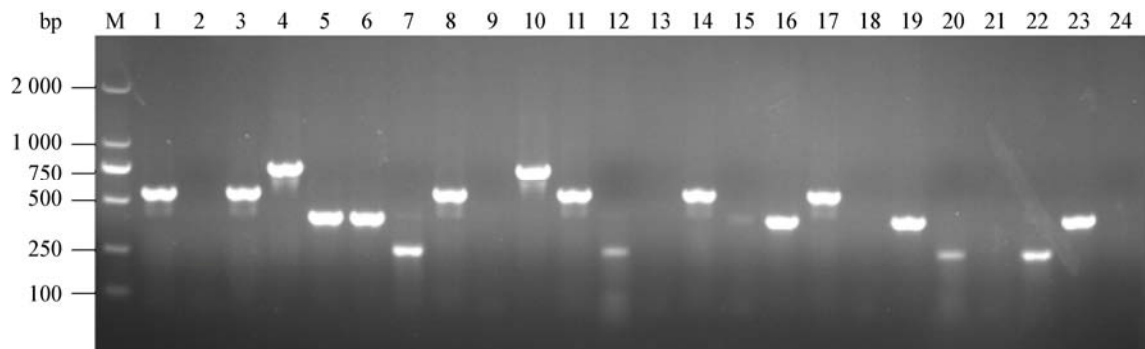


图 4 细菌临床分离株的检测

Figure 4 Detection of bacterial isolates

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 鼠伤寒沙门菌 SM5; 2: 猪霍乱沙门菌 SM1; 3: 鼠伤寒沙门菌 SM10; 4: 禽致病性大肠杆菌 APCE94; 5: 肠炎沙门菌 SM2; 6: 肠炎沙门菌 SM12; 7: 鸡白痢沙门菌 SP001; 8: 鼠伤寒沙门菌 SM11; 9: 都柏林沙门菌 SM3; 10: 禽致病性大肠杆菌 FJ1-B; 11: 鼠伤寒沙门菌 SM47; 12: 鸡白痢沙门菌 SP017; 13: 都柏林沙门菌 SM4; 14: 鼠伤寒沙门菌 SM50; 15: 肠炎沙门菌 SM8; 16: 肠炎沙门菌 SM13; 17: 鼠伤寒沙门菌 SM51; 18: 猪霍乱沙门菌 SM9; 19: 肠炎沙门菌 SM14; 20: 鸡白痢沙门菌 SP035; 21: 阿贡那沙门菌 SA1; 22: 鸡白痢沙门菌 CVCC519; 23: 鼠伤寒沙门菌 SM15; 24: 阴性对照。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: *S. typhimurium* SM5; 2: *S. choleraesuis* SM1; 3: *S. typhimurium* SM10; 4: APEC APCE94; 5: *S. enteritidis* SM2; 6: *S. enteritidis* SM12; 7: *S. pullorum* SP001; 8: *S. typhimurium* SM11; 9: *S. dublin* SM11; 10: APEC FJ1-B; 11: *S. typhimurium* SM47; 12: *S. pullorum* SP017; 13: *S. dublin* SM4; 14: *S. typhimurium* SM50; 15: *S. enteritidis* SM8; 16: *S. enteritidis* SM13; 17: *S. typhimurium* SM51; 18: *S. choleraesuis* SM9; 19: *S. enteritidis* SM14; 20: *S. pullorum* SP035; 21: *S. agona* SA1; 22: *S. pullorum* CVCC519; 23: *S. typhimurium* SM15; 24: Negative control.

传统的细菌性疾病诊断方法仍是通过细菌分离培养、生化鉴定及血清凝集反应, 但该方法费时费力, 且平板凝集易出现假阳性等, 不能满足临床快速诊断及疾病防控的需求。鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌和肠炎沙门菌的抗原结构相似, 需要通过生化鉴定才可鉴别血清型, 过程繁琐、耗时耗力^[7]。免疫学技术虽然比传统方法操作简单, 但灵敏度不如 PCR 方法。PCR 方法具有快速、灵敏、特异等优点, 因此广泛应用于病原菌检测。多重 PCR 是在单基因 PCR 基础上发展起来的检测方法, 可同时检测多种病原及不同基因, 因此具有高效快速、经济简便等优点, 已广泛应用于多种病原菌的检测。前期研究分别建立了常见家禽病原菌, 如禽大肠杆菌、沙门菌、禽多杀性巴氏杆菌、副鸡嗜血杆菌、鸭疫里默氏杆菌的多重 PCR 检测方法^[8-9]。然而这些方法仅特异性检测沙门菌属基因, 无法进一步区分不同血清型。另外, 也有研究针对沙门菌种属特异性基因建立了肠

炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌及不同血清组的 PCR 检测方法^[10-16]。因此, 本研究通过序列分析筛选并参考前期研究, 建立了可以同时检测禽大肠杆菌并区分常见禽源沙门菌血清型的多重 PCR 方法。

特异性诊断靶标基因的筛选对 PCR 检测方法的建立及可靠性至关重要。由于鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的抗原表型及基因组结构非常相似, 难以鉴别。本研究通过比对分析沙门菌全基因组序列, 筛选出鸡伤寒沙门菌和鸡白痢沙门菌的特异性基因片段 SGP 作为靶标基因。另外, 与其他血清型沙门菌相比, 鸡伤寒沙门菌的 *glgC* 基因存在 11 bp 核苷酸的缺失, 常作为靶标基因鉴定鸡伤寒沙门菌^[17], 因此本研究选其作为鸡伤寒沙门菌的检测基因。参考前期研究, 本文分别选择了大肠杆菌看家基因 *phoA*、肠炎沙门菌特异性基因 *sdfI*、鼠伤寒沙门菌特异性基因 *stm4495* 作为靶标基因^[8,18]。引物序列直接决定了 PCR 的特异性及反应条件, 本

研究根据筛选的靶标基因分别设计了 5 对特异性引物, 保证其退火温度尽量接近且不产生发卡结构。通过条件优化, 建立了检测禽大肠杆菌和区分不同血清型沙门菌的多重 PCR 方法。特异性试验、敏感性试验检测结果表明建立的多重 PCR 方法能够特异、灵敏地检测禽大肠杆菌并区分不同血清型沙门菌。利用建立的多重 PCR 方法检测 52 株 APEC 和沙门菌临床分离株, 结果显示多重 PCR 和传统细菌分离鉴定、血清凝集结果一致, 结果可靠。因此, 本研究建立的多重 PCR 方法可检测禽大肠杆菌并区分常见的禽源沙门菌的血清型, 具有快速简便、特异性强、敏感性高等优点, 可用于禽源样品中 APEC 和沙门菌的特异性快速检测及分子流行病学调查。

REFERENCES

- [1] Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts[J]. Avian Pathology, 2008, 37(4): 355-366
- [2] Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, et al. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge[J]. Trends in Microbiology, 1995, 3(7): 253-255
- [3] Mora A, Viso S, López C, et al. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3/4): 506-512
- [4] Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(11): 916-932
- [5] Foley SL, Nayak R, Hanning IB, et al. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4273-4279
- [6] Martinez-Ballesteros I, Paglietti B, Rementeria A, et al. Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella*[J]. The Journal of Infection in Developing Countries, 2012, 6(5): 443-451
- [7] Shah DH, Park JH, Cho MR, et al. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 60(2): 169-177
- [8] Hu QH, Tu J, Han XG, et al. Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(1): 64-69
- [9] Zhang M, Han F, Shen WZ, et al. Establishment and application of multiplex PCR assay for detecting *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum* and *Escherichia coli*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(2): 163-168 (in Chinese)
张曼, 韩飞, 沈文正, 等. 禽多杀性巴氏杆菌、副鸡嗜血杆菌和大肠杆菌多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西北农业学报, 2018, 27(2): 163-168
- [10] Paião FG, Arisitides LGA, Murate LS, et al. Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Typhimurium* in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(1): 37-42
- [11] Pui CF, Wong WC, Chai LC, et al. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium*[J]. Tropical Medicine and Health, 2011, 39(1): 9-15
- [12] de Freitas CG, Santana ÂP, Da Silva PHC, et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Typhi* and *Typhimurium* and occurrence in poultry meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(1/2): 15-22
- [13] Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, et al. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Enteritidis* in meats[J]. Journal of Veterinary Science, 2009, 10(1): 43-51
- [14] Yang L, Lou YK, Su CH, et al. Development of a multiplex PCR for rapid identification of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pollorum* and *Salmonella gallinarum*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(2): 268-273 (in Chinese)
杨林, 娄亚坤, 宿春虎, 等. 多重 PCR 方法快速鉴别肠炎、鼠伤寒、鸡白痢及鸡伤寒沙门菌[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 268-273
- [15] Gong JS, Zhuang LL, Lu GW, et al. Development and application of a multiplex PCR for detection of avian *Salmonella*[J]. China Poultry, 2016, 38(4): 14-18 (in Chinese)
龚建森, 庄林林, 陆光武, 等. 禽源沙门菌多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国家禽, 2016, 38(4): 14-18
- [16] Geng SZ, Pan ZM, Jiang CH, et al. Development of allele-specific PCR assay for detecting *Salmonella pullorum*[J]. Veterinary Science in China, 2007, 37(2): 113-116 (in Chinese)
耿士忠, 潘志明, 蒋春红, 等. 鸡白痢沙门菌等位基因特异性 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(2): 113-116
- [17] Kang MS, Kwon YK, Jung BY, et al. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(1/2): 181-185
- [18] Boyd EF, Porwollik S, Blackmer F, et al. Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(8): 3823-3828