

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.201807029

猪猝死症4种重要病原多重连接探针扩增鉴别检测技术的建立与应用

周莹珊^{1†}, 陈琳^{1†}, 孙静¹, 姜胜¹, 邵春艳¹, 周彬¹, 宋泉江¹,
黄保续², 王晓杜^{1*}, 宋厚辉^{1*}

(1. 浙江农林大学 动物科技学院 / 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 / 动物健康互联网检测技术浙江省工程实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

摘要: 为了快速检测引起猪猝死的病原, 本研究针对临床引起猪猝死症的4种疾病病原(猪尼帕病毒、非洲猪瘟病毒、猪产气荚膜梭菌和猪胸膜肺炎放线杆菌)分别设计特异性探针, 建立了同时检测这4种病原的多重连接探针扩增技术(MLPA)。对扩增产物进行毛细管电泳分析, 结果显示该方法, 探针之间没有交叉反应, 特异性强。对不同病原核酸的最低检测限可以达到140拷贝 μL ~370拷贝 μL , 敏感性较高。应用该MLPA方法对129份临床样品进行检测, 并与国家相关标准进行比较。结果显示, 两种方法的符合率为100%, 且该方法检测猪产气荚膜梭菌和猪胸膜肺炎放线杆菌的特异性和敏感性均达到100%, $Kappa$ 值均为1。该方法的检测结果与国家或行业标准PCR的检测结果一致性较高, 且克服了后者无法同时进行多重检测的缺点, 最多可以同时检测45种病原, 对于复杂症候群的快速和高通量检测具有重要临床意义。该方法可推广到其它多重病原体的检测中, 显示出广阔的应用前景。

关键词: 多重连接探针扩增技术(MLPA); 猪猝死症; 多重检测

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2019)02-0161-07

Simultaneous identification of pathogens causing porcine sudden death syndrome by using multiplex ligation-dependent probe amplification assay

ZHOU Ying-shan^{1†}, CHEN Lin^{1†}, SUN Jing¹, JIANG Sheng¹, SHAO Chun-yan¹, ZHOU Bin¹,
SONG Quan-jiang¹, HUANG Bao-xu², WANG Xiao-du^{1*}, SONG Hou-hui^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: In order to rapidly differentiate the pathogens that cause porcine sudden death, we developed a novel multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the simultaneous detection of four clinically relevant pathogens of porcine sudden death syndrome, i.e., Nipah virus (NPV), African swine fever virus (ASFV), *Clostridium perfringens* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The amplified MLPA products were analyzed by capillary gel electrophoresis. The results

*Corresponding author; Equal contributors

收稿日期: 2018-07-18

基金项目: 科技部国家重点研发计划重大动物源性病原体传入风险评估和预警技术研究(2017YFC1200500); 浙江省科技重点研发计划项目(2018C02028, 2019C02043); 浙江省基础公益研究计划(LGN18C180001)

† 共同第一作者: 周莹珊(1989-), 女, 江西上饶人, 讲师、博士, 主要从事猪病毒病的研究;
陈琳(1989-), 女, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要从事猪病毒病的研究。

* 通信作者: E-mail: songhh@zafu.edu.cn; xdwang@zafu.edu.cn

showed that the detection limit for each pathogen vary from 140 copies to 370 copies per MLPA assay. There were no cross-reactions among any of the probes. A total of 129 clinical samples were detected by the RT-MLPA assay and the results were confirmed by national reference standards. The MLPA assay showed specificities, sensitivities and kappa value of 100 %, 100 % and 1, respectively, for *C.perfringens* and *A.pleuropneumoniae*. In conclusion, the MLPA assay shows highly agreement with reference PCR assay, and overcome the shortcoming of mono-PCR assay, it allows analyses of up to 45 targets in a single reaction. The novel assay will provide an efficient and high-throughput tool for differential diagnosis. The MLPA method could be used in other multiplex pathogens detection and shows broad application prospect.

Key words: multiplex ligation-dependent probe amplification; porcine sudden death syndrome; multiplex detection

猪“猝死症”也叫做“暴死症”、“急死症”，病因复杂，甚至在一些地区呈现区域性流行^[1]。该类疾病症候群主要特点是呈急性发病，无明显的临床症状，往往由于不能及时治疗而发生死亡^[2]。我国是生猪生产、饲养与消费大国，生猪饲养量占全球比例接近 70%，猪肉消费占国内肉类消费的 60%。猪猝死症每年给我国养猪业造成严重的经济损失。猪猝死症只是一种症状，不是单独的一种疾病，因而引起该病的病因也有很多种，根据猝死症临床症状、流行病学调查、病原分离鉴定等特征，引起猪猝死症的常见疾病有：猪尼帕病(Nipah disease)、非洲猪瘟(African swine fever, ASF)、猪梭菌性肠炎(Clostridial enteritis)及猪传染性胸膜肺炎(Porcine pleuropneumonia)等传染类疾病。虽然我国尚未发现猪尼帕病，但是我国周边国家和亚洲地区已有该疾病发生的报道^[3-4]，其流行病学风险不容忽视。

引起猪猝死症的病因有病原学和非病原学因素，在病原学方面，不同菌(毒)株毒力不同，常出现隐性感染或混合感染，使得通过临床症状和病理变化很难对致病原因进行确诊。目前我国动物疾病的检测标准多是针对单一病原，对于不明病原的临床样品，需要多次重复完成检测，耗时耗力。此外，由于猪猝死症病程急，快速检测并确定病原对于疾病早期预防和治疗至关重要。目前，国际上尚无一种方法可以一次性对引起猪猝死的多种病原进行鉴别。因此建立一种能够精准、快速、高效区分不同病原的检测方法，对于猪猝死症的预防和早期干预至关重要。

多重连接探针扩增技术(Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)是一种高通量、针

对待测核酸中靶序列进行定性和定量分析的新技术。该技术将核酸的杂交检测和 PCR 链式扩增相结合，实现了对靶分子的高效特异性分析，在同一反应管中可对多达 45 个不同的靶基因进行检测和定量分析。MLPA 的基本程序包括探针和靶序列 DNA 的杂交，再通过连接酶连接探针，然后进行连接探针的 PCR 扩增，产物经毛细管电泳，最后通过数据分析得出结论^[5]。

本研究建立了一种同时检测 4 种猪猝死症相关病原体的 MLPA 技术，该技术特异性强、灵敏度高，为病原体的鉴别诊断和应急检测提供了技术储备。

1 材料与方法

1.1 临床样品和菌(毒)株 129 份临床样品来自浙江农林大学动物健康检测中心，包括 30 份脐带血、34 份组织样品(14 份淋巴结、9 份肺组织和 11 份小肠组织)、21 份全血样本和 44 份鼻拭子样本。PRRSV JX-07 株、CSFV C 株、猪圆环病毒 2b 型(PCV 2b)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪日本脑炎病毒(JEV)、猪伪狂犬病毒(PRV)均由本实验室保存。猪产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) A 型(CVCC1126)、猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) CVCC3559 株、猪细小病毒(PPV, CVCC3559)购自中国兽药药品监察所。

1.2 主要试剂 MEGAscript T7 试剂盒购自 Ambion 公司；反转录试剂盒购自 TOYOBO (上海东洋纺)；One Step Ahead RT-PCR Kit 购自 QIAGEN 公司；DNA/RNA 共提取试剂盒购自 Tiangen 生物技术有限

公司; pGEM-5zf 载体购自 Promega 公司; SALSA MLPA EK1 Reagent Kit (MRC Holland) 购自厦门致善生物科技有限公司。

1.3 引物、探针的设计与合成 根据 GenBank 登录的相应病毒和细菌相对保守的基因序列设计引物和探针(表 1), 并利用 MUSCLE Alignment(Geneious 8.1.4)进行序列比对以确定每个基因中相对保守的区域, 用于特异性反转录和预扩增。这些引物扩增的片段包含 MLPA 探针结合的区域。探针设计参照 MRC-Holland 公司公开的流程 (Designing synthetic MLPA probes, Version 15)。探针分别结合 NPV 的 *N* 基因、ASFV 的 *p27* 基因、*C.perfringens* 的 *plc* 基因、*A.pleuropneumoniae* 的 *ApxIVA* 基因中相对保守的区域(表 2)。左侧探针(Left Probe, LP)由两段核苷酸组成, 一段是病原特异性序列(Left Hybridising Se-

quence, LHS), 一段是用于扩增的通用序列; 右侧探针(Right Probe, RP)由两段核苷酸组成, 一段是病原特异性序列(Right Hybridising Sequence, RHS), 一段是用于扩增的通用序列, 且右侧探针的 5' 端磷酸化处理。通过设计不同长度的探针区分不同病原。引物和探针均由金唯智(苏州)生物有限公司合成。

表 1 反转录和预扩增引物名称和序列
Table 1 Sequences of the primers used in this study

病原 Pathogen	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
NPV	NPV-R	CCCATAGACCTGCAATAGTAGTAGC
ASFV	ASFV-F	ATGGATACCGAGGGAATAGC
	ASFV-R	CTTACCGATGAAAATGATAC
<i>C.perfringens</i>	<i>C.perfringens</i> -F	AGAGAACATGCATGAGCTTCA
	<i>C.perfringens</i> -R	TCCTCTTGGCATTATATCTAGC
<i>A.pleuropneumoniae</i>	<i>A.pleuropneumoniae</i> -F	GTGCGGGTAATGATACGGTT
	<i>A.pleuropneumoniae</i> -R	CGGCTAAACCAAAGTTCGGAT

表 2 MLPA 探针信息
Table 2 Target genes and sequences of MLPA left and right probes

病原 Pathogen	靶基因 Target gene	探针 Probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增长度(bp) Amplicon size (bp)
NPV	<i>N</i>	LP	gggttcctaagggttgaGGGTCCCTAAGGGTTGGAGCTTGATGCTACTCTA CAGAGAAATTGGCCCAA	116
		RP	GAGCCCCCTATATGGTGTCTTCTGAAGAATCAATTCAGACTTCTAGA TTGGATCTTGCTGGCACtctagattggatcttctgctggcac	
ASFV	<i>p27</i>	LP	gggttcctaagggttgaGGGTCCCTAAGGGTTGGATTAATCCAGAGCGCAA GAGGGGCTGATAGTATTTAGGGGTT	126
		RP	TGAGTCCATTACAGCTGTAATGAACATTACGTCTTATGCTCTCTAGA TTGGATCTTGCTGGCACtctagattggatcttctgctggcac	
<i>C.perfringens</i>	<i>plc</i>	LP	gggttcctaagggttgaGGGTCCCTAAGGGTTGGATTTCTGGGATCCTGATA CAGATAATAATTTCTCAAAGGATAATAGTT	135
		RP	GGTATTTAGCTTATTCTATACCTGACACAGGGGAATCACAAATAAGTC TAGATTGGATCTTGCTGGCACtctagattggatcttctgctggcac	
<i>A.pleuropneumoniae</i>	<i>ApxIVA</i>	LP	gggttcctaagggttgaGGGTCCCTAAGGGTTGGAGAACTTTGGTTTAGCCG AGAAAATAACGATTTGATTATTAATCATTATTAA	144
		RP	GTGAGGATAAAGTCACGGTTCAAATTTGGTATTCACACCAAGATCATA AATCTAGATTGGATCTTGCTGGCACtctagattggatcttctgctggcac	

注: 小写字母表示通用引物扩增的序列, 大写字母表示与病原特异性结合的序列。

Note: Universal primers binding sequences were in lower-case letters, the target-specific sequences were showed in upper-case letters.

1.4 重组质粒的构建和体外转录 RNA 的制备 分别以 *C.perfringens* 和 *A.pleuropneumoniae* 菌株提取的 DNA 为模板, 以 GTCGACAGAGAACATGCATGA/ACGCGTTCCTCTTTGCCATTCA 和 GTCGACGTGCGGGGTAATGATA/ACGCGTCGGCTAAACCAAAGT 为引物, PCR 扩增 *C.perfringens* 的 *plc* 基因和 *A.pleuropneumoniae* 的 *ApxIVA* 基因, 回收扩增产物酶切纯化后分别克隆至 pGEM-5zf 载体, 并转化 DH5 α 感受态细胞得到重组菌, PCR 鉴定阳性的菌液经测序正确后获得阳性重组质粒 pGEM-*plc* 和 pGEM-*ApxIVA*。通过数据库中的序列比对, 体外合成猪尼

帕病毒(NPV) *N* 基因和非洲猪瘟病毒(ASFV) *p27* 基因中相对保守的序列, 分别克隆至 pGEM-5zf 载体, 构建重组质粒 pGEM-*N* 和 pGEM-*p27*。将重组质粒 pGEM-*N* 线性化之后, 采用 MEGAscript T7 试剂盒体外转录后 LiCl 沉淀, 70 % 乙醇洗涤后溶于无 RNase 的 ddH₂O 中, 核酸电泳检测 RNA 合成的完整性和正确性。测定上述质粒和 RNA 浓度, 换算成拷贝数后备用。

1.5 样品 DNA 或者 cDNA 及预扩增的制备 利用 DNA/RNA 共提取试剂盒同时提取 129 份临床样品、各菌株和各病毒株的 DNA 和 RNA, 按照 One Step

Ahead RT-PCR Kit 说明书进行一步法 RT-PCR 反应。25 μL 反应体系：10 μL One Step Ahead RT-PCR Master Mix, 1 μL One Step Ahead RT-Mix, 5 μL 样品 DNA 或 RNA, 5 μL 反转录和预扩增引物混合液(终浓度为每条引物 0.5 μM), 4 μL H_2O 补足。反应条件：50 $^\circ\text{C}$ 10 min, 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 15 s、55 $^\circ\text{C}$ 20 s、72 $^\circ\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 2 min。

1.6 检测 4 种病原的 MLPA 方法的建立 MLPA 反应程序按照 SALSA MLPA EK1 Reagent 试剂盒说明书进行。取 0.2 mL PCR 反应管, 每管加入上述 ASFV、NPV 的 cDNA 以及 *C.perfringens*、*A.pleuropneumoniae* 的 DNA 各 1 μL 再加入 1 μL TE, 使模板量达到 5 μL 后进行下列反应: 98 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 降至室温 25 $^\circ\text{C}$, 加入 3 μL 混匀的探针(每种病原探针终浓度为 1.33 nm)混合液, 95 $^\circ\text{C}$ 温育 1 min, 60 $^\circ\text{C}$ 杂交 4 h, 54 $^\circ\text{C}$ 温育, 加入 32 μL 连接酶混合物, 54 $^\circ\text{C}$ 温育 15 min, 98 $^\circ\text{C}$ 加热 5 min 灭活连接酶。室温下加入 10 μL PCR 混合物, 开始 PCR 反应, 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 降至 15 $^\circ\text{C}$ 。扩增产物经全自动核酸分析仪(Qsep100 DNA Analyzer, BIOptic)进行毛细管电泳分析。

1.7 特异性测试

1.7.1 单一探针特异性试验 采用每种病原探针分别对该 4 种病原的 DNA/cDNA 进行 MLPA 扩增, 对每种病原探针分别与不同病原探针对应的反应体系进行特异性试验, 以验证不同病原探针之间是否会发生交叉反应。

1.7.2 混合探针特异性测试 将 4 种病原探针混合分别对 NPV、ASFV、*C.perfringens*、*A.pleuropneumoniae*、PCV2、PEDV、JEV、PRV、PPV、PRRSV、CSFV 的 DNA/cDNA 和无病原对照(TE)为模板进行 MLPA 扩增。测试混合探针能否从各自的病原核酸中扩增出单一的特异性扩增峰, 验证探针混合之后是否会引起非特异性交叉反应。

1.8 灵敏度试验 将 pGEM-N 体外转录的 RNA, pGEM-p27、pGEM-plc 和 pGEM-ApxIVA 质粒 DNA 各 10 倍倍比稀释, 每个浓度取 5 μL 进行 MLPA 反应, 以确定各病原的检测限, 按以下公式计算拷贝数: (拷贝/ μL)=(6.02 $\times 10^{23}$ 拷贝/mol) \times (浓度 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)/(MW g/mol)。

1.9 临床样品的检测 将 129 份临床样品按照前述

方法提取其总核酸后进行预扩增, 用本研究建立的多重 MLPA 检测方法进行检测。同时, 取 5 μL 样品 DNA/RNA 利用 TOYOBO 反转录试剂盒反转录后, 采用国家或行业标准^[6-9]对 NPV、ASFV、*C.perfringens*、*A.pleuropneumoniae* 进行 PCR 检测, 比较二者检测结果, 并计算两种方法的符合率。对结果不一致的样品再用行业标准进行两次 PCR 检测, 对检测结果进行统计以评估 MLPA 临床检测效果。

2 结果

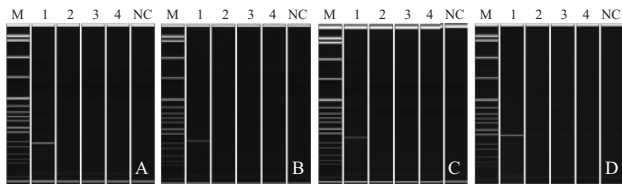
2.1 重组质粒的构建和体外转录 RNA 的鉴定 以 *C.perfringens* 和 *A.pleuropneumoniae* 菌株提取的 DNA 为模板, 利用设计的引物进行 PCR 扩增, 结果获得预期大小的片段, 回收纯化后克隆至 pGEM-5zf 载体, 经测序正确后表明正确构建了重组质粒 pGEM-plc 和 pGEM-ApxIVA。体外合成的重组质粒 pGEM-p27 和 pGEM-N 经测序正确后表明构建成功。将重组质粒 pGEM-N 线性化并体外转录, 通过核酸电泳检测显示体外转录的 RNA 片段大小正确, 且完整性良好(图略)。经计算各质粒及体外转录的 RNA 分别为 1.4 $\times 10^{10}$ 拷贝/ μL 、3.7 $\times 10^{10}$ 拷贝/ μL 、3.5 $\times 10^{10}$ 拷贝/ μL 、3.5 $\times 10^{10}$ 拷贝/ μL 。

2.2 探针特异性测试结果 分别以 NPV、ASFV、*C.perfringens* 与 *A.pleuropneumoniae* 的 DNA/cDNA 和无病原对照(TE)为模板, 利用相应的特异性探针进行 MLPA 扩增。结果显示, 单一探针只能从对应病原中扩增得到特异性条带, 大小分别为 116 bp、126 bp、135 bp 和 144 bp, 均与预期一致(图 1)。表明本研究设计的 4 种猪病病原 MLPA 探针及对应的反应体系特异性良好, 均仅能检测出对应的目的病原, 与其他病原无交叉反应。

分别以不同病原的 DNA/cDNA 和无病原(TE)对照为模板, 采用这 4 种病原体的混合探针进行 MLPA 扩增。结果显示, 仅 NPV、ASFV、*C.perfringens*、*A.pleuropneumoniae* 分别在约 118 bp、128 bp、137 bp、148 bp 处有单一特异性扩增峰, 均与预期相符, 其它病原体无任何扩增信号(图 2)。表明本研究设计的 4 种探针特异性较好, 混合后其特异性没有受到影响。

2.3 检测 4 种病原的 MLPA 方法的建立 将 NPV、ASFV、*C.perfringens* 与 *A.pleuropneumoniae* 的混合

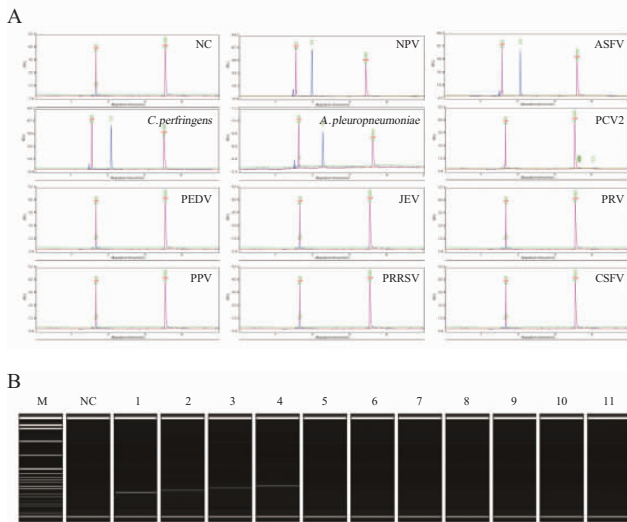
DNA/cDNA 按照 1.6 的方法进行 MLPA 扩增。结果显示, 以混合病原为模板, 一个 MLPA 反应同时扩增出了 116 bp、126 bp、135 bp、144 bp 的 4 条特异性条带, 分别对应于上述各病原的 *N.*、*p27*、*plc*、*ApxIVA* 基因片段, 与预期上述相符(图 3)。表明建立的 MLPA 方法可以同时检测到样品中的 NPV、ASFV、*C.perfringens*、*A.pleuropneumoniae* 4 种病原。



A: NPV probe. 1-4: NPV, ASFV, *C.perfringens*, *A.pleuropneumoniae* template; B: ASFV probe. 1-4: ASFV, NPV, *C.perfringens*, *A.pleuropneumoniae* template; C: *C.perfringens* probe. 1-4: *C.perfringens*, NPV, ASFV, *A.pleuropneumoniae* template; D: *A.pleuropneumoniae* probe. 1-4: *A.pleuropneumoniae*, NPV, ASFV, *C.perfringens* template; M: DNA Marker; NC: No template control

图 1 单一探针特异性 MLPA 扩增结果

Fig. 1 The specificity test of MLPA assay by using a single pair of probes



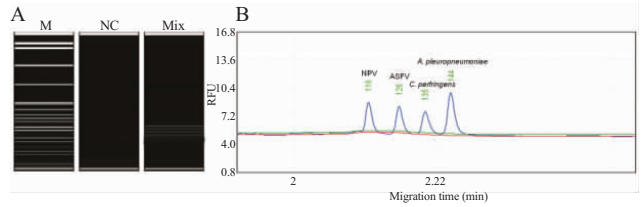
A: Signal chart; B: Gel view. M: DNA Marker; NC: no template control; 1-11: NPV cDNA, ASFV DNA, *C.perfringens* DNA, *A.pleuropneumoniae* DNA, PCV2 DNA, PEDV cDNA, JEV cDNA, PRV DNA, PPV DNA, PRRSV cDNA, CSFV cDNA.

图 2 混合探针特异性扩增结果

Fig. 2 The specificity test of the MLPA assay by using mixed probes

2.4 灵敏度测试结果 以不同稀释度的含 4 种病原的质粒作为模板进行 MLPA 扩增。结果显示, 该方法最低检测到的 NPV、ASFV、*C.perfringens* 和 *A.pleuropneumoniae* 4 种病原体的拷贝数分别为 3.5×10^2 拷贝/ μL 、 1.4×10^2 拷贝/ μL 、 3.7×10^2 拷贝/ μL 、 3.5×10^2 拷贝/反应。表明该方法对 4 种病原检测灵

敏度均较高。



A: Gel view; M: DNA Marker; Mix: Mixed template of pathogens; NC: No template control; B: Signal chart

图 3 4 种病原的 MLPA 扩增结果

Fig. 3 Amplification of four target pathogens by MLPA assay

2.5 临床样品检测结果 对 129 份临床样品进行反转录和预扩增后进行 MLPA 扩增, 结果显示, 建立的 MLPA 方法可检测出 5 份 *C.perfringens* 阳性样品和 5 份 *A.pleuropneumoniae* 阳性样品, 未检出 NPV 或 ASFV 阳性样本。采用国家或行业标准检测结果与 MLPA 方法检测结果一致(表 3), 二者的符合率为 100%。经计算, MLPA 方法的特异性、敏感性均为 100% (表 4)。 *C.perfringens* 和 *A.pleuropneumoniae* 的 Kappa 值均为 1 (表 4)。Kappa 值大于 0.75 说明 MLPA 方法与国家或行业标准所用的 PCR 方法检测结果的一致性较好。表明本研究建立的 MLPA 方法可用于临床检测。

表 3 129 份临床病料中 MLPA 检测方法 with PCR 检测方法的结果分析

Table 3 Comparison of the results obtained by the MLPA assay with PCR assays in 129 clinical specimens

Pathogen		No. of positive/negative by PCR assays		
		Positive	Negative	Total (%)
NPV	Positive	0	0	0
	Negative	0	129	129
ASFV	Positive	0	0	0
	Negative	0	129	129
<i>C.perfringens</i>	Positive	5	0	5
	Negative	0	124	124
<i>A.pleuropneumoniae</i>	Positive	5	0	5
	Negative	0	124	124

3 讨论

病原学检测是确诊动物传染病的主要手段, 但病原的分离鉴定相当耗时, 而且由于诸多因素的干扰, 其敏感性很低, 不适合疾病的快速诊断。PCR 技术具有敏感性高、特异性强等优点, 但其多是对单一病原进行的, 而动物疾病的流行却出现了多种病毒细菌混合感染, 现有诊断技术不能很好地满足快速、高通量检测的需求, 动物疾病多重检测新

表4 与行业标准相比 MLPA 检测方法敏感性与特异性结果分析
Table 4 Sensitivities and specificities of MLPA in relation to reference standards

病原体 Pathogen	结果统计				敏感性(%) Sensitivity (%)	特异性(%) Specificity (%)	Kappa 值 Kappa
	真阳性	假阳性	真阴性	假阴性			
	True positive	False positive	True negative	False negative			
<i>C.perfringens</i>	5	0	124	0	100	100	1
<i>A.pleuropneumoniae</i>	5	0	124	0	100	100	1

注: 敏感性 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性); 特异性 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性)。

Note: Sensitivity=True positive/(True positive+False negative); Specificity=True negative/(True negative+False positive)

技术的研究已经成为动物疫情监测、疫病控制领域关注的焦点。MLPA 最早于 2002 年由荷兰的 Schouten 报道^[10], 该技术已经在人类基因或基因片段的缺失或重复, 单核苷酸多态性(SNP)和点突变, 染色体重排, 基因甲基化定量以及传染病的高通量检测等多个领域中得到广泛应用^[11-12]。MLPA 具有高度的特异性, 能够检测单个碱基的突变和拷贝数的微量变化。该方法敏感度也很高, 只需要 50 ng DNA 或 3 000 个细胞即能检测。MLPA 在基因遗传性疾病研究及临床监测中发挥了重要作用, 如 MLPA 已用于遗传性非息肉性结直肠癌的鉴别以及卵巢癌和乳腺癌患者的预后检测等。近些年该方法逐渐应用于传染病高通量检测, 应用前景广阔。Reijns 等建立了可以同时检测 15 种呼吸道病毒的 MLPA 方法, 敏感性与单重荧光定量 PCR 相当, 但检测通量大幅度提升^[13]。Muvunyi 等建立了 MLPA 同步检测 7 种性传播疾病的方法, 结果用单重荧光定量 PCR 验证, 符合率达到 100 %^[14]。De Smet 等建立了可以同时检测 10 种蜜蜂病毒的逆转录 -MLPA (RT-MLPA)高通量检测技术, 并能同时区分 RNA 病毒的正负链^[15]。史喜菊等建立的猪流感病毒、伪狂犬病病毒、口蹄疫病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒共 5 种病毒的 MLPA 检测方法, 实现一次采样, 同时检测 5 种猪病原的目的^[16]。Kim 等利用 MLPA 技术建立了同时检测 13 种食源性致病菌的高通量技术^[17]。

MLPA 技术的关键是引物的设计。本研究针对病毒和细菌相对保守的基因设计了 4 对探针。并在 NCBI 数据库中进行 BLASTn 分析比对, 以确保探针的特异性。为了保证易于区分不同病原体, 每个病原体的大小区分至少在 5 bp 以上, 各扩增片段长度相差要满足此要求才能直接判断结果。本研究中每个病原体的探针大小均相差 9 bp~10 bp。为了使 MLPA 检测的灵敏度与荧光定量 PCR 相当, 本研究增加了反转录和预扩增环节。MLPA 扩增的目的片

段长度差距比较小, 一般凝胶电泳无法区分, 检测结果需要毛细管电泳才能分离。通过设立阳性质粒对照, 可以通过读取扩增片段的碱基数直接进行结果的判定。

PCR 是一种快速灵敏的检测方法, 但是传统的 PCR 方法无法做到 4 重病原以上的检测, 难以用于高通量病原检测, 且检测成本较高。MLPA 方法能够检测多达 45 种靶标, 可以满足临床快速、高通量鉴别诊断的要求。由于所有反应在一管内进行, 可以减少繁琐的操作以及降低检测成本。通过比较 129 份临床样品的 MLPA 和 PCR 检测结果确定了 MLPA 方法的敏感性和特异性。临床样品检测表明, 细菌性疾病发病率较低。本实验未检出 ASFV 和 NPV, 但是今年 8 月以来, 非洲猪瘟首次传入我国, 辽宁沈阳、河南郑州、江苏连云港、浙江温州先后发生了 4 起非洲猪瘟疫情, 需要引起重视。NPV 是一种新出现的人畜共患病, 被列为生物安全 4 级病原, 虽然我国未有该病的报道, 但我国毗邻东南亚和南亚地区的疫情国家, 导致该病传入我国的风险始终存在。

本研究建立了一种快速鉴别检测 NPV、ASFV、*C.perfringens* 和 *A.pleuropneumoniae* 4 种病原体的高通量检测技术。该方法特异性强、敏感性高, 可在 20 h 内检测出 4 种病原。显著降低了检测多种病原体混合感染的人力、物力和财力。适用于临床病原体的鉴别检测和相关疫病的应急诊断。

参考文献:

- [1] 陈超, 钟尧禹, 刘兰平, 等. 猪猝死病因简析[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2017, (3): 54-54.
- [2] Foster D B, Liu Ting, Kammers K, et al. Integrated omic analysis of a guinea pig model of heart failure and sudden cardiac death [J]. J Proteome Res, 2016, 15(9): 3009-3028.
- [3] Angeletti S, Lo Presti A, Cella E, et al. Molecular epidemiology

- and phylogeny of Nipah virus infection: A mini review [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(7): 630-634.
- [4] Iglesias I, Munoz M J, Montes F, et al. Reproductive ratio for the local spread of African swine fever in wild boars in the Russian Federation [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(6): e237-e245.
- [5] Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the MECP2 gene of Swedish Rett syndrome patients [J]. *Genet Test*, 2003, 7(4): 329-332.
- [6] NY/T 1469-2007. 尼帕病毒病诊断技术[S].
- [7] SN/T 1559-2010. 非洲猪瘟检疫技术规范[S].
- [8] SN/T 2709-2010. 我国境口岸产气荚膜梭菌毒素检测方法[S].
- [9] SN/T 1447-2011. 猪传染性胸膜肺炎检疫技术规范[S].
- [10] Schouten J P, McElgunn C J, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 30: e57.
- [11] Wang Jung-ya, Ai Xiao-fei, Qin Tie-jun, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification assay identifies additional copy number changes compared with R-band karyotype and provide more accuracy prognostic information in myelodysplastic syndromes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1603-1612.
- [12] Shakeri H, Gharesouran J, Fakhrou A, et al. DNA methylation assessment as a prognostic factor in invasive breast cancer using methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification [J]. *Excli J*, 2016, 15: 11-20.
- [13] Reijans M, Dingemans G, Klaassen C H, et al. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4): 1232-1240.
- [14] Muvunyi C M, Dhont N, Verhelst R, et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(1): 29-37.
- [15] De smet L, Ravoet J, De miranda J R, et al. BeeDoctor, a versatile MLPA-based diagnostic tool for screening bee viruses [J]. *PloS One*, 2012, 7(10): e47953.
- [16] 史喜菊, 马贵平, 乔彩霞, 等. 多重连接探针扩增(MLPA)技术同时检测五种病毒的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(6): 745-752.
- [17] Kim S Y, Chung B, Chang J H, et al. Simultaneous identification of 13 foodborne pathogens by using capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism coupled with multiplex ligation-dependent probe amplification and its application in foods [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2016, 13(10): 566-574.

(本文编辑: 李 娜)