



# 布鲁菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

彭海涛, 高 阳, 刘雨欣, 顾德媛, 张 东, 张 如, 许会会, 陈 思\*, 杨艳玲\*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130000)

**摘 要:** 旨在建立一种经济高效的布鲁菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 鉴别检测方法, 用于布鲁菌感染的动物及动物产品的快速检测并区分牛种布鲁菌和其他种布鲁菌感染的动物, 为临床常的疫苗和研发的新型疫苗提供科学有效的鉴别诊断方法。本研究根据 GenBank 公布的 *galU* 和 *Omp31* 的序列设计检测引物和探针, 构建重组质粒, 对方法特异性、灵敏性及重复性评价, 检测实验室制备和临床动物布病血清及组织样品。结果表明, 成功建立了布鲁菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 该方法最低检测限为  $1.93 \times 10^0$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 与其他革兰阴性菌无交叉反应, 批内及批间变异系数均小于 2%。利用本研究建立的方法检测实验室制备样品和临床采集样品共 156 份, 与 BCSP31-PCR 相比, 两者阳性符合率为 69.75%; 与 PCR 和虎红凝集试验相比, 灵敏性更高, 双重 TaqMan 荧光定量 PCR 的敏感性为 100%, PCR 的敏感性为 69.75%, 虎红凝集试验的敏感性为 58.65%。本研究建立的布鲁菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 为布鲁菌临床鉴别检测、流行病学调查及净化提供技术支持。

**关键词:** 布鲁菌; 双重 TaqMan 荧光定量 PCR; 检测方法; 鉴别诊断

中图分类号: R378.5; S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0369-09

## Establishment and Preliminary Application of a Duplex TaqMan Real-time PCR Assay for *Brucella*

PENG Haitao, GAO Yang, LIU Yuxin, GU Deyuan, ZHANG Dong, ZHANG Ru, XU Huihui,  
CHEN Si\*, YANG Yanling\*

(Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences,  
Changchun 130000, China)

**Abstract:** This study aimed to establish a cost-effective duplex TaqMan real-time quantitative PCR (qPCR) assay for the rapid detection of *Brucella* infection in animals and animal products, and to differentiate *B. abortus* from other *Brucella* species. This method provides a scientifically valid diagnostic tool for distinguishing currently used vaccine strains and novel vaccines under development. Specific primers and TaqMan probes targeting the *galU* and *Omp31* genes were designed based on GenBank sequences. Recombinant plasmids were constructed. The assay's specificity, sensitivity, and repeatability were rigorously evaluated. Clinical serum and tissue samples from animals with brucellosis were tested. A duplex TaqMan qPCR assay for *Brucella* detection was successfully

收稿日期: 2025-01-22

基金项目: “十四五”国家重点研发计划(2023YFD1800703; 2023YFD1802501); 中国农业科学院重大科技任务项目(CAAS-ZDRW202410); 吉林省发展与改革委员会基本建设资金产业技术与开发专项(2024C015-3)

作者简介: 彭海涛, 硕士生, 主要从事布鲁菌病诊断试剂研制, E-mail: 735184279@qq.com

\* 通信作者: 杨艳玲, 主要从事布鲁菌致病机制研究及新型疫苗创制, E-mail: m1804321339@163.com; 陈 思, 主要从事布鲁菌致病机制研究及新型疫苗创制, E-mail: 374582512@qq.com

developed. The limit of detection (LOD) for recombinant plasmid standards was  $1.93 \times 10^0 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . The assay exhibited no cross-reactivity with other Gram-negative bacteria. Both intra-assay and inter-assay reproducibility were excellent, with coefficients of variation (CV) consistently below 2%. Testing of 156 samples (including laboratory-prepared and clinical specimens) revealed a positive agreement rate of 69.75% compared to BCSP31-PCR. Furthermore, the duplex TaqMan qPCR demonstrated significantly higher sensitivity (100%) than conventional PCR (69.75%) and the RBPT (58.65%). The established duplex TaqMan qPCR assay provides a robust technical foundation for the clinical differential diagnosis, epidemiological surveillance, and eradication programs of brucellosis.

**Keywords:** *Brucella*; duplex TaqMan real-time PCR; detection method; differential diagnosis

\* **Corresponding authors:** YANG Yanling, E-mail: m1804321339@163.com; CHEN Si, E-mail: 374582512@qq.com

布鲁菌病(简称布病)是由布鲁菌感染引起的一种流行广泛、危害较大的人兽共患病之一<sup>[1]</sup>。长期以来布病给畜牧业经济带来不可估量的损失,同时给畜产品安全和国家生物安全带来了严重隐患。最近研究发现布鲁菌已有12个种,34个生物型<sup>[2]</sup>,其中以羊种、牛种布鲁菌对人畜危害最为严重。动物感染后可引起流产、睾丸炎、关节炎等繁殖系统障碍为主的临床症状,人感染多由动物传播,主要以发热、不孕不育、关节炎、脊柱炎、心肌炎等为典型的临床症状<sup>[3]</sup>。全世界16%~25%的人口受该病威胁,据统计全球人类发病已超过210万例,每年因该病造成的经济损失达30亿~40亿美元<sup>[4-7]</sup>。实施动物布病净化是全球防控布病的重要路径,也是布病防控的终极目标,美国、加拿大、澳大利亚等国均采取有效的净化措施彻底消灭了动物布病。然而,布病的精准检测是我国动物布病净化急需解决的关键核心技术需求,在我国现有的布病诊断技术中,多基于血清学方法,如试管凝集试验(SAT)、虎红平板凝集试验(RBT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、补体结合试验(CFT)、胶体金快速检测试纸等。血清学检测是人畜布病检测常用的诊断方法,但血清学检测方法因特异性、灵敏性、应用范围等局限,目前还无法作出准确的判断,且无法鉴别诊断。病原学检测是布病诊断的关键方法,尤其是细菌分离是布病诊断的“金标准”<sup>[8]</sup>。但细菌分离需要BSL-3实验室条件,难以实现。因此,需要一种建立一种更灵敏、更方便的布鲁菌病原学检测方法克服以细菌培养和抗原抗体结合为基础的检测方法的局限性。同时病原学与血清学检测方法联合应用将极大提高动物布病检测的精准性,是动物

布病净化急需的检测方法。

与血清学检测比较,分子生物学诊断技术因其特异性强、灵敏度高等特点而被广泛应用于病原体感染检测中。随着分子生物学的发展,基于PCR的病原学检测技术也被广泛用于动物布病的诊断,如基于BCSP31基因的PCR检测方法,不但可以精确诊断人畜布病,同时还可检测动物产品及环境污染样品。实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)技术是在PCR定性技术基础上发展起来的核酸定量技术,是一种已广泛应用于核酸检测和定量的方法。TaqMan荧光定量PCR方法是基于使用特异的引物和探针,结合到目标DNA序列,并在扩增过程中将探针切断产生荧光信号。相较染料法荧光定量PCR,特异性更强。

在先前的研究中发现*galU*是布鲁菌高度保守的毒力基因,缺失该基因后可用于制备新型布病疫苗,为此,该基因不但是理想的布鲁菌病原检测核酸靶标,同时也是区分*galU*缺失疫苗株的鉴别诊断标识;外膜蛋白31基因(*Omp31*)部分序列在牛种布鲁菌基因永久缺失,可用于区分牛种布鲁菌和其他种布鲁菌<sup>[9-11]</sup>。

鉴于现有动物布病疫苗均为弱毒疫苗,尤其是由牛种布鲁菌制备的弱毒疫苗A19在奶牛、肉牛中广泛应用,疫苗引起的流产及感染人等不良反应在奶牛和肉牛中时有发生,尚无有效的方法进行区分,给产业带来了严重的影响。为此,本研究以*galU*和*Omp31*的核酸序列构建全长片段的重组质粒,建立灵敏度高、特异性强、经济实用的布鲁菌TaqMan荧光定量PCR检测方法,用于动物及动物产品布鲁菌检测及现有动物布病弱毒疫苗和未来

新型疫苗的鉴别诊断,结合现有的血清学检测方法为我国动物布病净化提供科学精准高效的检测技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 核酸

布鲁菌核酸在广州医科大学附属市八医院广州市高致病性传染病临床检测生物安全三级实验室提取并通过无菌检验后保存于本实验室,其它细菌核酸由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

TIANGEN®TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒提取试剂盒、TIANGEN®TIANgel Purification Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂,北京天根生化科技有限公司;Vazyme®ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 无缝克隆试剂盒、Vazyme®XL10 化学感受态细胞、Vazyme®2 x Phanta Max Master Mix 高保真酶预混液,诺唯赞生物医药科技有限公司;引物和探针,上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe

| 基因<br>Gene   | 引物和探针<br>Primer and<br>probe | 序列<br>Sequence                               | 产物大小/bp<br>Product size |
|--------------|------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|
| <i>galU</i>  | galU-F                       | 5'-GAACGGGGGAAAACCGAAGA-3'                   | 149                     |
|              | galU-R                       | 5'-AGTGCAAAAGGTTTCGTTGCC-3'                  |                         |
|              | galU-P                       | FAM-CAGCAGGTGCCGCTTGGCCTC-BHQ1               |                         |
|              | P-galU-F                     | AGTTCTAAATGAGTTCTATTTCGAAAAATCCGCAAGGCAG     |                         |
| <i>Omp31</i> | P-galU-R                     | GACGGCCAGTGAATTTTCAGGCTGGCTGGATCGTCTTCAACAG  | 917                     |
|              | Omp31-F                      | 5'-TTCCGCCCCCTACTGCTGCT-3'                   | 138                     |
|              | Omp31-R                      | 5'-CCGGAAACCTGTTTCGTTGTC-3'                  |                         |
|              | Omp31-P                      | HEX-ACGCCGGTTACGCAGGCGGCAAGTT-BHQ1           |                         |
|              | P-Omp31-F                    | TCGACTCTAGAGGATATGAAATCCGTAATTTTGCGTCCATCGCC | 755                     |
| pUC19        | P-Omp31-R                    | AACTCATTTAGAACTTGTAGTTCAGACCGACGCGAACAGT     | 2 698                   |
|              | pUC19-F                      | ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA                    |                         |
|              | pUC19-R                      | AATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGT                  |                         |

### 1.4 重组质粒构建与鉴定

以羊种布鲁菌核酸序列为模板,分别扩增 *galU*、*Omp31* 基因以及反向 PCR 扩增 pUC19 质粒序列。分别将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分离,并回收琼脂糖凝胶目标片段核酸,通过无缝克隆将 *galU* 及 *Omp31* 序列插入 pUC19 质粒,转化至 XL10

QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 系统, NanoDrop 微量分光光度计,干式加热器赛默飞世尔公司产品;FIRE READER XSD-56-20M 型凝胶成像系统,Uvitec 公司产品;恒温培养箱,上海三腾仪器有限公司;SCI1000-G 梯度 PCR 仪,赛洛捷克公司产品。

### 1.3 引物及探针设计和引物特异性初步验证

依据 GenBank 查找羊种布鲁菌 *galU*、*Omp31* 基因参考序列和 pUC19 质粒参考序列图谱,利用 NCBI primer-BLAST 软件,设计三对携同源臂引物及两对特异性引物和探针(表 1);将双重 TaqMan 荧光定量 PCR 引物 *galU*-F/R 和 *Omp31*-F/R 序列输入 NCBI primer-BLAST 软件;*galU*-F/R 引物检索条件为无物种限制核酸序列数据库(Nucleotide Sequence Database, nt),*Omp31*-F/R 引物检索条件为无物种限制核酸序列数据库和 *Brucella abortus* 核酸序列数据库,验证 *galU*-F/R 引物作为布鲁菌通用性检测以及 *Omp31*-F/R 引物作为牛种布鲁菌鉴别检测的可用性,并由上海生工生物技术有限公司合成。

感受态细胞,在氨苄青霉素 LB 固体培养基上过夜培养,挑取单菌落 PCR 鉴定后转至 LB 液体培养基扩大培养,菌液提取质粒后送上海生工生物技术有限公司测序。将测序后核酸序列正确的质粒,命名为 pUC19-*galU*&*Omp31*。使用超微量分光光度计测量质粒浓度,计算拷贝数,用去离子水将质粒进

行稀释,使其终浓度为 $1.93 \times 10^0 \sim 1.93 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , $-20^\circ\text{C}$ 保存备用。计算公式:质粒拷贝数( $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )= $6.02 \times 10^{23} \times 10^{-9} \times$ 质粒浓度( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )/质粒碱基长度 $\times 660$ 。

### 1.5 双重荧光定量PCR反应体系优化及标准曲线建立

采用方阵法优化引物与探针浓度,总体系为 $20 \mu\text{L}$ ,SuperReal荧光定量预混试剂 $10 \mu\text{L}$ 、引物终浓度为 $500$ 、 $250$ 、 $125 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及探针终浓度为 $250$ 、 $125$ 、 $62.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $1.93 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的重组质粒 $3 \mu\text{L}$ ,去离子水 $2.5 \mu\text{L}$ 。 $C_t$ 值以平均值( $\bar{x}$ ) $\pm$ 标准差( $s$ )表示。

使用浓度为 $1.93 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 重组质粒pUC19-galU&Omp31,进行连续10倍稀释,取浓度为 $1.93 \times 10^3 \sim 1.93 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为模板,每个浓度做3个重复,进行双重TaqMan荧光定量PCR扩增。以质粒浓度为横坐标,以循环阈值(cycle threshold,  $C_t$ )为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.6 特异性试验

使用羊种布鲁菌、牛种布鲁菌A19株、不动杆菌、产气荚膜梭菌、肠致病性大肠埃希氏菌、致脑膜炎性大肠埃希氏菌、巴氏杆菌DNA分别作为模板,去离子水作为阴性对照,按优化后的双重TaqMan荧光定量PCR反应体系进行扩增,检测该方法的特异性。

### 1.7 敏感性试验

将重组质粒pUC19-galU&Omp31进行连续10倍倍比稀释,即 $1.93 \times 10^0 \sim 1.93 \times 10^4 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 5个浓度的质粒作为模板,按优化后的双重TaqMan荧光定量PCR反应体系进行扩增,去离子水做阴性对照,检测该方法的灵敏性。

### 1.8 灵敏度试验

将羊种布鲁菌、牛种布鲁菌A19株、猪种布鲁菌S2株的核酸进行连续10倍倍比稀释,即 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \sim 0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 8个浓度,以此作为模板,按优化后的双重TaqMan荧光定量PCR反应体系进行扩增,去离子水作阴性对照,确定最低核酸检出浓度。

### 1.9 重复性试验

选取 $1.93 \times 10^4$ 、 $1.93 \times 10^5$ 、 $1.93 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 3个浓度重组质粒pUC19-galU&Omp31作为模板,每种浓度进行3次重复,通过双重TaqMan荧光定量PCR扩增后,计算得出组内变异系数。每个梯度

在3个不同批次分别做3个重复,计算得出组间的变异系数。根据公式:变异系数( $CV$ )= $\text{标准差}(s)/\text{平均值}(\bar{x}) \times 100\%$ ,计算出组内和组间变异系数。

### 1.10 样品检测

对临床采集和实验室制备的牛种布鲁菌A19疫苗免疫后流产奶牛血清、临床鹿血清、布病阴性羊血清、羊种布鲁菌感染羊血清、羊免疫菌影疫苗血清、羊种布鲁菌感染豚鼠血清、豚鼠免疫galU缺失弱毒疫苗血清和羊种布鲁菌感染羊脾脏进行核酸提取,用本研究建立的双重TaqMan荧光定量PCR方法进行检测,分析galU和OMP31基因作为探针的双重TaqMan荧光定量PCR检测方法的敏感性、特异性及鉴别诊断能力,同时用BCSP31-PCR和虎红平板凝集试验进行符合试验,分析其实用性。

## 2 结果

### 2.1 双重TaqMan荧光定量PCR引物特异性初步验证

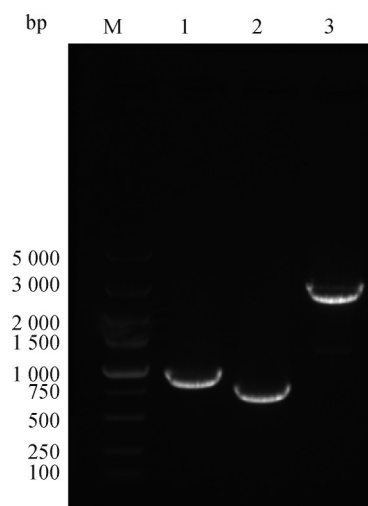
通过NCBI primer-BLAST软件检索。结果显示,galU-F/R(JOB ID: -\_EkqOHC7GrLVPZR-zHSY4Eqw1GsOdhMrQ)引物具有良好的特异性可作布鲁菌属通用检测引物,Omp31-F/R(JOB ID: cHqusxahGwk8Nx4yE1I6AG1JKzJEWjAvRQ 和 JOB ID: hoxZ1Z\_Bkmm1V4hShTKsYP8pvVLSOqZP0w)引物可以扩增其它种布鲁菌基因组片段但无法扩增牛种布鲁菌基因组片段。

### 2.2 重组质粒pUC19-galU&Omp31构建

以羊种布鲁菌的核酸序列为模板,使用P-galUF/R、P-Omp31-F/R、pUC19-F/R通过PCR扩增目的片段。结果(图1)所示,获得与预期大小一致的目的片段,分别为galU(917 bp)、Omp31(755 bp)及pUC19线性化片段(2 698 bp)。将带有同源臂扩增产物与线性化pUC19片段通过无缝克隆连接以构建重组质粒,送上海生工生物工程技术有限公司测序,并命名为pUC19-galU&Omp31。提取重组质粒,测得重组质粒的浓度为 $90.7 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。经计算,pUC19-galU&Omp31重组质粒的拷贝数为 $1.93 \times 10^{10} \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 双重TaqMan荧光定量PCR反应条件的优化及标准曲线的建立

使用 $1.93 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ pUC19-galU&Omp31重组质粒采用方阵法对引物和探针浓度优化



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. *galU*; 2. *Omp31*; 3. pUC19 线性化片段

M. DL5000 DNA marker; 1. *galU*; 2. *Omp31*; 3. pUC19 linearized vector

图 1 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification

(表 2), 确定双重 TaqMan 荧光定量 PCR 总体系为 20  $\mu\text{L}$ : SuperRealPreMix (Probe) 10  $\mu\text{L}$ , *galU*-F/R 和 *Omp31*-F/R 各 1  $\mu\text{L}$ , *galU*-P 和 *Omp31*-P 各 0.25  $\mu\text{L}$ , 重组质粒模板 3  $\mu\text{L}$ , 去离子水 2.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环。将重组质粒 pUC19-*galU*&*Omp31* 连续 10 倍稀释, 使用浓度  $1.93 \times 10^3 \sim 1.93 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  作为模板, 进行双重 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增绘制标准曲线。结果显示, 最佳引物浓度为 500  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 探针 125  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (表 2), *galU* 的标准曲线为  $y = -3.561x + 44.069$ ,  $R^2 = 0.999$ , *Omp31* 的标准曲线为  $y = -3.38x + 43.455$ ,  $R^2 = 0.998$  (图 2)。

## 2.4 特异性试验

利用本研究已建立的双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对羊种布鲁菌、牛种布鲁菌 A19 株、不动杆菌、产气荚膜梭菌、肠致病性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、巴氏杆菌、变形杆菌、铜绿假单

表 2 双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的引物探针浓度优化及结果 ( $C_t$  值,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Primer and probe concentration optimization of duplex TaqMan qPCR ( $C_t$  value,  $\bar{x} \pm s$ )

| 探针浓度/( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<br>Probe concentration | 引物<br>Primer        | 引物浓度/( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Primer concentration |                  |                  |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
|                                                                   |                     | 500                                                             | 250              | 125              |
| 250                                                               | $C_t(\text{galU})$  | 20.20 $\pm$ 0.13                                                | 20.50 $\pm$ 0.17 | 22.40 $\pm$ 0.18 |
|                                                                   | $C_t(\text{Omp31})$ | 22.20 $\pm$ 0.22                                                | 22.50 $\pm$ 0.17 | 22.90 $\pm$ 0.18 |
| 125                                                               | $C_t(\text{galU})$  | 19.80 $\pm$ 0.08                                                | 20.90 $\pm$ 0.11 | 22.50 $\pm$ 0.12 |
|                                                                   | $C_t(\text{Omp31})$ | 21.80 $\pm$ 0.15                                                | 21.90 $\pm$ 0.12 | 22.30 $\pm$ 0.16 |
| 62.5                                                              | $C_t(\text{galU})$  | 22.00 $\pm$ 0.13                                                | 21.80 $\pm$ 0.16 | 20.90 $\pm$ 0.10 |
|                                                                   | $C_t(\text{Omp31})$ | 21.80 $\pm$ 0.20                                                | 21.80 $\pm$ 0.21 | 22.20 $\pm$ 0.14 |

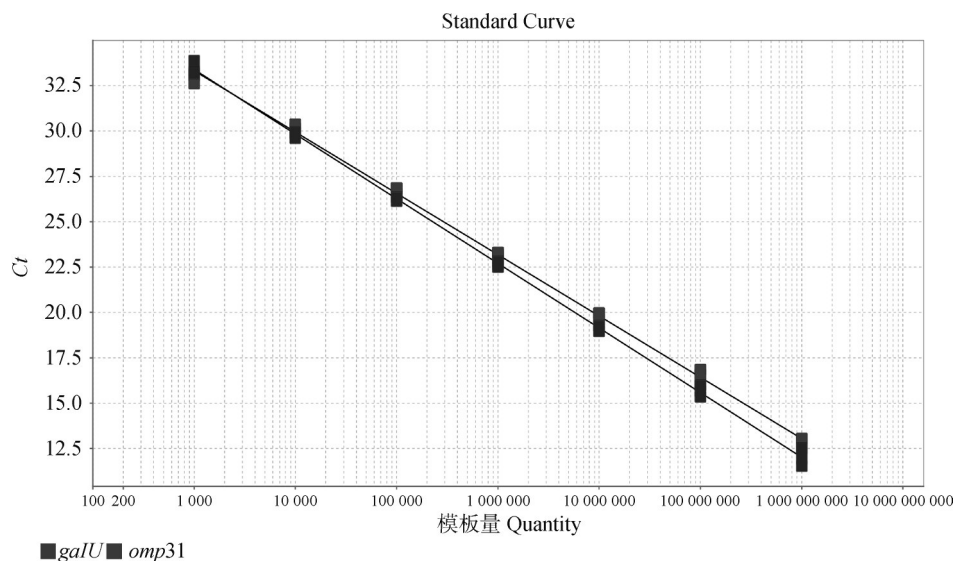


图 2 双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 *Omp31* 及 *galU* 基因片段扩增标准曲线

Fig. 2 Duplex TaqMan qPCR standard curves for *Omp31* and *galU* gene fragments

胞菌 DNA 进行扩增。结果显示,该方法特异性良好,羊种布鲁菌 DNA 扩增结果显示 *galU* 及 *Omp31* 阳性,牛种布鲁菌 A19 株 DNA 扩增结果显示 *galU* 阳性,*Omp31* 阴性,其他细菌核酸扩增结果均显示阴性。

## 2.5 敏感性试验

本研究将 pUC19-*galU*∕*Omp31* 重组质粒进行梯度稀释后,  $1.93 \times 10^0 \sim 1.93 \times 10^4$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$  5 个梯度浓度进行双重 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增。结果显示,该方法最低能检测到  $1.93 \times 10^0$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$ 。

## 2.6 灵敏度试验

本研究将牛种布鲁菌 A19 株、猪种布鲁菌 S2 株核酸,进行连续 10 倍稀释,  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \sim 0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  8 个梯度作为模板。双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法与 BCSP31-PCR 方法进行比较,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法核酸最低检出浓度为  $0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , PCR 方法核酸最低检出浓度为  $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

## 2.7 重复性试验

本研究将 pUC19-*galU*∕*Omp31* 重组质粒进行 10 倍梯度稀释,取  $1.93 \times 10^4 \sim 1.93 \times 10^6$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$  这 3 个梯度进行重复性试验,并计算变异系数。结果显示,该方法的组内平均变异系数在 0.02%~0.55% 之间;组间的变异系数在 0.6%~1.8% 之间。

## 2.8 样品检测

利用建立的布鲁菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 分别检测牛种布鲁菌 A19 疫苗免疫后流产奶牛血

清、临床采集的鹿血清、布病阴性羊血清、羊种布鲁菌感染羊血清、羊免疫菌影疫苗血清、羊种布鲁菌感染豚鼠血清、豚鼠免疫 *galU* 缺失弱毒疫苗血清以及布病感染羊脾脏。

### 2.8.1 临床动物血清及感染组织中的布鲁菌检测

2.8.1.1 临床采集的鹿血清检测:临床采集 52 份鹿血清,提取核酸,检测结果如表 3 所示,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 52 份鹿血清中,有 47 份血清均为布鲁菌核酸检测阳性,其中 1 份血清为牛种布鲁菌感染血清,其余 46 份血清为其它种布鲁菌感染血清;与 BCSP31-PCR 结果比较 52 份血清中有 46 份是布病阳性血清,仅有一份血清结果不同,符合率为 98%;虎红平板凝集试验结果为 52 份血清中 14 份是布鲁菌抗体阳性,检测结果与双重 TaqMan 荧光定量 PCR、BCSP31-PCR 方法符合率较低,阳性符合率为 29.8%,虎红平板凝集试验结果敏感性低于双重 TaqMan 荧光定量 PCR 和 BCSP31-PCR。

2.8.1.2 羊种布鲁菌感染的羊脾脏检测:采集羊种布鲁菌感染后 45 d 的羊脾脏 15 份,提取核酸,检测结果如表 3 所示,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 15 份脾脏为布鲁菌阳性组织,且均为非牛种布鲁菌感染,BCSP31-PCR 仅检测出 9 例阳性,阳性符合率为 60%,BCSP31-PCR 敏感性低于双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。

表 3 通用型样品检测结果

Table 3 Universality sample test results

| 样品类型<br>Sample type  | 双重 qPCR 检测结果<br>Duplex real-time PCR test results |              | PCR 检测结果<br>PCR test results | 虎红平板凝集试验<br>Rose Bengal plate test |
|----------------------|---------------------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------------|
|                      | <i>galU</i>                                       | <i>Omp31</i> |                              |                                    |
| 鹿血清<br>Cervine serum | 47/52                                             | 46/52        | 46/52                        | 14/52                              |
| 羊脾脏<br>Sheep spleen  | 15/15                                             | 15/15        | 9/15                         | —                                  |

### 2.8.2 现有疫苗及新型生物灭活疫苗的鉴别诊断

2.8.2.1 *galU* 基因缺失布鲁菌菌影疫苗的鉴别诊断:分别采集免疫菌影疫苗羊血清 16 份,免疫 *galU* 缺失弱毒疫苗豚鼠血清 9 份,羊种布鲁菌感染羊血清 21 份,布病阴性羊血清 8 份,羊种布鲁菌感染豚鼠血清 5 份,提取上述血清的核酸,检测结果如表 4 所示,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 16 份免疫菌影疫苗羊血清均未检测到 *galU* 基因和 *Omp31*

基因,9 份免疫 *galU* 缺失弱毒疫苗豚鼠血清,均检出 *Omp31* 基因且未检测出 *galU* 基因,21 份羊种布鲁菌感染羊血清,均检测出 *galU* 基因和 *Omp31* 基因。

2.8.2.2 *galU* 基因缺失弱毒疫苗的鉴别诊断:用免疫 *galU* 基因缺失弱毒疫苗豚鼠血清 9 份以及羊种布鲁菌感染豚鼠血清 5 份,提取核酸,检测结果如表 4 所示,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 9 份免疫 *galU* 基因缺失弱毒疫苗豚鼠血清中均检测到

*Omp31* 基因,未检测到 *galU* 基因;3 份羊布鲁菌攻毒豚鼠血清,均检测到 *galU* 基因和 *Omp31* 基因。

虎红平板凝集试验和 *BCSP31*-PCR 均检测出 7 份阳性,符合率为 78%。

表 4 *galU* 基因缺失布鲁菌弱毒疫苗免疫、菌影疫苗免疫和羊种布鲁菌感染动物血清的鉴别诊断结果

Table 4 Results of differential diagnosis for sera from animals immunized with *galU*-deficient *Brucella* attenuated vaccine, bacterial ghost vaccine, and infected with *Brucella melitensis*

| 样品类型<br>Sample type                                                                           | 双重 qPCR 检测结果<br>Duplex real-time PCR test results |              | PCR 检测结果<br>PCR test results | 虎红平板凝集试验<br>Rose Bengal plate test |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------------|
|                                                                                               | <i>galU</i>                                       | <i>Omp31</i> |                              |                                    |
| 免疫菌影疫苗羊血清<br>Serum of Sheep immunized with BG                                                 | 0/16                                              | 0/16         | 0/16                         | 0/16                               |
| 羊种布鲁菌感染羊血清<br>Serum from <i>Brucella melitensis</i> -infected sheep                           | 21/21                                             | 21/21        | 13/21                        | 21/21                              |
| 布病阴性羊血清<br>Sheep serum negative for <i>Brucella</i> antibody                                  | 0/8                                               | 0/8          | 0/8                          | 0/8                                |
| 免疫 <i>galU</i> 基因缺失弱毒疫苗豚鼠血清<br>Serum of guinea pig with <i>galU</i> deficient <i>Brucella</i> | 0/9                                               | 9/9          | 5/9                          | 5/9                                |
| 羊种布鲁菌感染豚鼠血清<br>Serum from <i>Brucella melitensis</i> -infected guinea pig                     | 5/5                                               | 5/5          | 5/5                          | 5/5                                |

2.8.2.3 牛种布鲁菌疫苗株的鉴别诊断:采集临床免疫牛种布鲁菌 A19 疫苗后出现流产的奶牛血清 30 份,提取核酸,检测结果如表 5 所示,双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 30 份血清中 22 份检测

到 *galU* 基因,其中 *Omp31* 基因检出率为 0,说明流产的 22 头牛均由牛种布鲁菌引起。本方法检出率 (73.33%) 高于虎红平板凝集试验 (53.33%) 和 *BCSP31*-PCR (46.67%)。

表 5 牛种布鲁菌 A19 疫苗免疫奶牛血清的鉴别诊断结果

Table 5 Results of differential diagnosis for sera from cows immunized with *Brucella abortus* A19 vaccine

| 样品类型<br>Sample type | 双重 qPCR 检测结果<br>Duplex real-time PCR test results |              | PCR 检测结果<br>PCR test results | 虎红平板凝集试验<br>Rose Bengal plate test |
|---------------------|---------------------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------------|
|                     | <i>galU</i>                                       | <i>Omp31</i> |                              |                                    |
| 牛血清<br>Bovine serum | 22/30                                             | 0/30         | 14/30                        | 16/30                              |

### 3 讨 论

布鲁菌在人畜间的危害已经引起养殖企业、政府职能部门以及社会的高度关注,我们国家先后出台多个动物布病防控计规划,主要目的是建立科学有效精准的动物布病防控措施,然而因现有疫苗及诊断方法等问题导致动物布病防控措施仍无法取得较好的效果<sup>[12-16]</sup>。基于血清学检测技术操作的复杂性、敏感性、交叉反应及无法鉴别诊断等问题限制了其在动物布病防控中的应用<sup>[17-21]</sup>。为此,加快布鲁菌鉴别诊断技术的创新研究已成为了动物布病防控的重大技术需求,尤其是近年来频繁出现布病疫苗免疫后导致的动物流产及感染人等问题,严

重缺乏有效区分自然感染和疫苗免疫的实验室检测手段,为此建立可鉴别的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对动物血清进行检测已经成为当前研究的重要方向,尤其是根据产业不同场景需求建立多重探针法荧光定量检测技术可使布鲁菌病原检测方法更精准,更特异<sup>[22-25]</sup>。

为此,本研究中基于 *galU* 基因和 *Omp31* 基因建立了双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,该方法不但以 *galU* 基因为靶基因建立通用型布鲁菌病原检测,还以 *Omp31* 基因为靶基因区分牛种布鲁菌和其他种布鲁菌,目前还没有基于这两个基因建立双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测靶基因的研究。通过对临床样品检测,我们发现该方法比以

BCSP31为靶基因的PCR检测方法以及虎红平板凝集试验更精准、更灵敏,并可用于鉴别诊断牛种布鲁菌制备的弱毒疫苗及以*galU*基因缺失研制的新型弱毒疫苗和菌影疫苗免疫的动物,相比于其他方法应用价值更高,更经济。Sanni等<sup>[21]</sup>建立了基于布鲁菌*Omp31*基因TaqMan荧光定量PCR方法,用该方法检测山羊血清,结果显示其灵敏度和特异性均高于iELISA和试管凝集试验,与我们建立的方法结果一致,病原学诊断方法灵敏度和特异性高于血清学诊断方法。利用建立的以*galU*与*Omp31*为特异性探针的双重TaqMan荧光定量PCR方法,检测了52份鹿血清,其中有47份血清为阳性,与BCSP31-PCR(46份阳性)和虎红平板凝集试验(14份阳性)相比更敏感,更特异,同时47份鹿阳性血清中还鉴别出1份牛种布鲁菌感染的血清。同时检测的15份羊种布鲁菌感染的羊脾脏样本中均检测出布鲁菌*galU*基因和*Omp31*基因,证明羊脾脏感染菌不是牛种布鲁菌感染,与本试验使用的布鲁菌感染毒株为羊种布鲁菌相符,所以该方法能够有效区分牛种和羊种布鲁菌。同时该方法相比于BCSP31-PCR检测方法更灵敏。

此外,该方法对现有的牛种布鲁菌疫苗免疫的动物和以缺失*galU*基因研制的新型疫苗均具有鉴别诊断能力,通过检测*galU*基因缺失的布鲁菌弱毒疫苗免疫的豚鼠,菌影疫苗免疫的羊以及羊布鲁菌感染的豚鼠和羊的血清,结果显示该方法能够精准区分*galU*基因缺失弱毒疫苗和菌影疫苗免疫的豚鼠和羊。同时在本研究中,我们针对牛布鲁菌弱毒疫苗株导致的奶牛流产血清进行精准诊断,结果显示该方法还可精准区分牛布鲁菌菌株弱毒疫苗免疫的动物,为现有疫苗和未来新型疫苗建立精准的区分疫苗免疫和自然感染动物的鉴别诊断技术。

#### 4 结 论

本研究建立了一种特异性强、灵敏度高、重复性好的布鲁菌双重TaqMan荧光定量PCR检测方法,用于布鲁菌感染的人和动物及布鲁菌污染的动物产品进行检测以及牛种弱毒疫苗及未来新型疫苗的鉴别诊断,并可与血清学方法联合应用,用于动物布病的精准检测,为动物布病净化提供技术支持。

#### 参考文献(References):

- [1] SADDIQUE A, ALI S, AKHTER S, et al. Acute febrile illness caused by *Brucella abortus* infection in humans in Pakistan [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(21):4071.
- [2] MORENO E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920) [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2021, 45(1):fuaa045.
- [3] CHA S B, LEE W J, SHIN M K, et al. Early transcriptional responses of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264. 7[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:426.
- [4] SHAALAN M A, MEMISH Z A, MAHMOUD S A, et al. Brucellosis in children: clinical observations in 115 cases[J]. *Int J Infect Dis*, 2002, 6(3):182-186.
- [5] 王金良, 沈志强. 布氏杆菌病研究进展[J]. 中国动物保健, 2008(6):58-60.  
WANG J L, SHEN Z Q. Advances in brucellosis research[J]. *China Animal Health*, 2008(6):58-60. (in Chinese)
- [6] BIKAS C, JELASTOPULU E, LEOTSINIDIS M, et al. Epidemiology of human brucellosis in a rural area of north-western Peloponnese in Greece [J]. *Eu J Epidemiol*, 2003, 18(3):267-274.
- [7] SINGH B B, KHATKAR M S, AULAKH R S, et al. Estimation of the health and economic burden of human brucellosis in India [J]. *Pre Vet Med*, 2018, 154:148-155.
- [8] ELBEHIRY A, ALDUBAIB M, MARZOUK E, et al. The development of diagnostic and vaccine strategies for early detection and control of human brucellosis, particularly in endemic areas[J]. *Vaccines*, 2023, 11(3):654.
- [9] ZHOU Y, BU Z, QIAN J, et al. *Brucella melitensis* UGPase inhibits the activation of NF- $\kappa$ B by modulating the ubiquitination of NEMO[J]. *BMC Vet Res*, 2021, 17(1):289.
- [10] ZHOU Y, BU Z, QIAN J, et al. The UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Brucella melitensis* inhibits the activation of NF- $\kappa$ B via regulating the bacterial type IV secretion system [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164:3098-3104.
- [11] VIZCAÍNO N, VERGER J M, GRAYON M, et al. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp. : evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers [J]. *Microbiology*,

- 1997,143(9):2913-2921.
- [12] 章文强, 栾荣生. “One Health”和我国布鲁氏菌病防控[J]. 现代预防医学, 2021, 48(1):166-169.  
ZHANG W Q, LUAN R S. Imperative “One Health” strategy for the prevention and control of brucellosis in China[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2021, 48(1): 166-169. (in Chinese)
- [13] 刘文兴, 步志高. 中国布鲁氏菌病的防控[J]. 中国科学: 生命科学, 2023, 53(12):1713-1721.  
LIU X W, BU Z G. Prevention and control of brucellosis in China[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2023, 53(12):1713-1721. (in Chinese)
- [14] 汪洁英, 宁 博, 景 伟, 等. 布鲁氏菌病及其在我国的防控现状与建议[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(12): 1578-1585.  
WANG J Y, NING B, JING W, et al. Research progress and suggestions regarding on the prevention and control of brucellosis in China: A review [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(12):1578-1585. (in Chinese)
- [15] 卢亮平, 万康林, 徐建国. 人兽共患细菌性疾病防控现状及特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(11):967-970, 976.  
LU L P, WAN K L, XU J G. Situation and characteristics of control and prevention for zoonotic bacterial disease [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(11):967-970, 976. (in Chinese)
- [16] 景 添, 王天星, 陈 曦, 等. 羊布鲁氏菌病及其国内外防控净化措施[J]. 动物医学进展, 2022, 43(2): 116-120.  
JING T, WANG T X, CHEN X, et al. Control and eradication of brucellosis in goats and sheep: Experiences learned from China and other countries[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(2): 116-120. (in Chinese)
- [17] YAGUPSKY P, MORATA P, COLMENERO J D. Laboratory diagnosis of human brucellosis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 33(1):e00073-19.
- [18] ANDRADE R S, OLIVEIRA M M D, BUENO FILHO J S D S, et al. Accuracy of serological tests for bovine brucellosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Pre Vet Med*, 2024, 222:106079.
- [19] DI BONAVENTURA G, ANGELETTI S, IANNI A, et al. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: An overview [J]. *Pathogens*, 2021, 10(12):1623.
- [20] DUCROTOY M J, CONDE-ÁLVAREZ R, BLASCO J M, et al. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2016, 171:81-102.
- [21] SAINI S, GUPTA V K, GURURAJ K, et al. Comparative diagnostic evaluation of *OMP31* gene based TaqMan® real-time PCR assay with visual LAMP assay and indirect ELISA for caprine brucellosis [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2017, 49(6): 1253-1264.
- [22] ARENAS-GAMBOA A M, FICHT T A, KAHL-MCDONAGH M M, et al. The *Brucella abortus* S19  $\Delta vjbR$  live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(2):877-884.
- [23] WALLACH J C, FERRERO M C, VICTORIA DELPINO M, et al. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(8):805-807.
- [24] OSMAN A E F, HASSAN A N, ALI A E, et al. *Brucella melitensis* Biovar 1 and *Brucella abortus* S19 vaccine strain infections in milkers working at cattle farms in the Khartoum Area, Sudan [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0123374.
- [25] LALSAMTHARA J, LEE J H. Development and trial of vaccines against *Brucella* [J]. *J Vet Sci*, 2017, 18(S1):281.

(编辑 白永平)