

翟可欣, 于江, 刘飞, 等. 布氏杆菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (8): 106–112.

ZHAI K X, YU J, LIU F, et al. Establishment of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for *Brucella* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (8): 106–112.

布氏杆菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

翟可欣^{1,2}, 于江^{1,2}, 刘飞¹, 丁罗刚¹, 李建达¹, 陈智¹, 孙文博¹,
兰邹然³, 张月³, 吴家强^{1,2*}, 张玉玉^{1,2*}

(1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所/农业农村部畜禽生物组学重点实验室, 山东 济南 250100;

2. 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014;

3. 山东省动物疾病预防与控制中心 (山东省人畜共患病流调监测中心), 山东 济南 250100)

摘要: 旨在建立布氏杆菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法。以布氏杆菌高度保守的单拷贝基因 *bcsp31* 作为靶基因, 设计特异性引物及 TaqMan 探针, 优化反应体系和反应条件, 建立标准曲线, 通过特异性试验、灵敏性试验、重复性试验及其与商品化试剂盒的检测效果比对验证本方法的优势, 并应用本方法对猪布病进行了检测。应用 TaqMan qPCR 反应的最优条件, 建立了本方法的标准曲线, $y = -3.364 \lg x + 48.740$, $R^2 = 1.000$ 。本方法对布氏杆菌表现出高度的特异性, 与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、沙门菌及副猪嗜血杆菌等常见病原体均无交叉反应, 可实现布氏杆菌的精准鉴别; 最低检测限为 1×10^1 拷贝/ μL , 是普通 PCR 的 100 倍; 批内及批间重复的变异系数均小于 2%。与商品化试剂盒的检测效果相比, 本方法在低浓度模板的检测中更有优势。应用本方法对猪临床样本 (683 份淋巴结和 341 份生殖拭子) 中布氏杆菌进行检测, 结果显示猪淋巴结样本的阳性检出率为 1.17%, 生殖拭子样本的阳性检出率为 1.47%, 均稍高于商品化荧光检测试剂盒的阳性检出率。综上所述, 本研究建立的布氏杆菌 TaqMan qPCR 方法灵敏、特异、稳定, 适用于动物布病的快速监测和早期诊断。

关键词: 布氏杆菌; 实时荧光定量 PCR; 猪布病检测; 应用

中图分类号: S855.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)08-0106-07

Establishment of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for *Brucella*

ZHAI Kexin^{1,2}, YU Jiang^{1,2}, LIU Fei¹, DING Luogang¹, LI Jianda¹, CHEN Zhi¹, SUN Wenbo¹,
LAN Zouran³, ZHANG Yue³, WU Jiaqiang^{1,2*}, ZHANG Yuyu^{1,2*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Livestock and Poultry Multiomics of MARA, Jinan 250100, China;

2. College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

3. Shandong Animal Disease Prevention and Control Center (Shandong Center for Epidemiological Investigation and Monitoring of Zoonoses), Jinan 250100, China)

Abstract: This study was aimed to establish a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method for *Brucella*. Specific primers and TaqMan probe were designed according to the highly conserved single-copy gene *bcsp31* of *Brucella*. The reaction system and conditions were optimized, and a standard curve of the method was established. The advantages of the method were validated through specificity, sensitivity and repeatability tests, as well as by comparing its detection performance with that of the commercial kits. The method was then employed to detect porcine brucellosis. Using the optimal reaction conditions for the TaqMan qPCR, the standard curve for this method was established as $y = -3.364 \lg x + 48.740$, with an R^2 value of 1.000. The method exhibited high specificity for *Brucella*, showing no cross-reactivity with common pathogens such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* and *Haemophilus parasuis*.

收稿日期: 2025-07-14; 修回日期: 2026-06-04

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 课题 (2022CXGC020711-4); 山东省生猪产业技术体系项目 (SDAIT-08); 山东省农业科学院创新工程项目 (CXGC2025A04、CXGC2025C10); 济南市新高校 20 条 (202333065) 项目; 泰山学者工程项目

第一作者: 翟可欣, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 张玉玉, 博士, 研究员, 研究方向为动物病原学与免疫学, E-mail: zhyyy@126.com; 吴家强, 博士, 研究员, 研究方向为动物病原学与免疫学, E-mail: wujiaqiang2000@sina.com。

enabling precise identification of *Brucella*. The limit of detection was 1×10^1 copies/ μL , which is 100 times more sensitive than conventional PCR. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were both below 2%. Compared with the detection effect of the commercial kits, this method was more sensitive in detecting low-concentration templates. The application of this method to detecting *Brucella* in clinical samples (683 lymph nodes and 341 genital swabs) taken from pigs showed positive detection rates of 1.17% and 1.47%, respectively, which were both slightly higher than the positive detection rates of the commercial fluorescent detection kit. In summary, the *Brucella* TaqMan qPCR method established in this study was sensitive, specific and stable, and would be suitable for rapid monitoring and early diagnosis of brucellosis in animals.

Keywords: *Brucella*; real-time fluorescent quantitative PCR; porcine; brucellosis; application

布氏杆菌病 (brucellosis) 简称布病, 是世界普遍公认的危害严重的人畜共患病之一^[1]。家畜感染会侵害生殖系统, 母畜表现为流产和不育, 公畜表现为睾丸炎和附睾炎^[2]。人主要通过皮肤黏膜、消化道及呼吸道接触病原家畜及其产品而感染, 严重会造成骨头等关节损伤, 如果不及时发现则可能终生带菌^[3]。迄今为止, 布病已广泛流行于 170 多个国家和地区, 对人类与动物的健康、国家经济的发展和安全的均构成了较为严重的威胁^[4]。在我国, 布病的流行形势也较为严峻, 畜间和人群间布病的感染率持续处于较高水平。值得注意的是, 人群间布病的感染途径正从以往的职业接触为主, 逐渐转向以食源性感染为代表的非职业方式^[5-6]。因此, 加强动物布病的防控, 成为阻断人群间布病传播的关键环节。

快速灵敏的检测方法可以为布病的早期诊断和有效防控提供有力的技术支持。目前, 常用的检测方法主要为病原学检测及血清学检测。病原学分离被认为是诊断布病的金标准, 但布氏杆菌的分离培养耗时较长, 且受实验室生物安全风险等因素的制约, 难以在普通实验室广泛开展^[7]。血清学检测主要包括虎红平板凝集试验 (RBT)、试管凝集试验 (SAT) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等免疫学方法, 这些方法已在流行病学调查中被广泛使用, 但其主要检测对象为抗体, 无法有效区分野毒感染和疫苗免疫产生的抗体, 更无法对环境中的布氏杆菌进行监测, 因此血清学检测存在一定的局限性^[8]。相比之下, 基于 PCR 的分子生物学技术因其特异、高效、灵敏且安全等优势在病原学检测中展现出一定的优势。

布氏杆菌 *bcs31* 基因是单拷贝基因, 编码细胞表面 31 kDa 的蛋白质, 在布氏杆菌不同种型间其序列及拷贝数极为保守^[9], 已被用来作为 PCR 检测方法的靶基因^[10]。TaqMan 实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术是在普通 PCR 特异性引物的基础上增加一条荧光标记探针, 提高了序列的特异性, 可用于对样品中病原含量的检测和定量, 准确性高, 缩短了循环的反应时间, 从而为布病的检测提供更准确的依据^[11-12]。本研究以 *bcs31* 基因为靶基因设计特异性引物及 TaqMan 探针, 建立布氏杆菌 qPCR 检测方法, 并检

测了布病在山东省猪群中的流行情况, 不仅为实现布氏杆菌的快速诊断和定量分析提供科学的方法, 还为制定山东省内布病的防控与净化策略提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及临床样本

布氏杆菌病活疫苗 (S2 株) 购自齐鲁动物保健品有限公司; 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、沙门菌、副猪格拉菌均由山东省农业科学院畜牧兽医研究所分离、鉴定保存。

布病弱阳性拭子 DNA 来自山东省动物疾病预防与控制中心 (山东省人畜共患病流调监测中心), 猪临床样本采自山东省无害化处理厂、屠宰场。

1.2 主要试剂及仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; $2 \times \text{ALL-Powerful}$ qPCR PreMix 试剂购自诺唯赞生物科技股份有限公司; Premix Taq 试剂、DL1000 DNA Marker 均购自 TaKaRa (北京) 公司。

CFX96 Real-Time system 荧光定量 PCR 仪购自 BioFlux 公司; 核酸电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 引物及探针的设计与合成

根据布氏杆菌 *bcs31* 基因 (GenBank 登录号: M20404.1) 序列, 用 Primer Premier 5.0 根据保守片段设计引物和探针, 引物序列为: *bcs31*-F: 5'-CCTACGGCCTCACGGAAGAC-3', *bcs31*-R: 5'-CCACAAAGAAATAGGCGTCCAG-3', 扩增片段为 102 bp; TaqMan 探针 5' 端标记荧光报告基团 FAM, 3' 端标记荧光淬灭基团 BHQ1, 探针序列为: *bcs31*-T: FAM-ACCATCTTTTCAGCCTCTCGCCTGC-BHQ1。所设计的引物和探针均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成、标记和纯化。

1.4 常规 PCR 扩增目的基因

布氏杆菌病活疫苗 (S2 株) 高压灭菌后加入生理盐水复融, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒按照说明书操作提取 S2 株基因组 DNA。用上述设计好的引物对作为 PCR 扩增的引物, 以 S2 株基因组 DNA

作为模板,扩增目的基因。PCR 反应体系为 25 μL , 包含 *bcs31*-F/*bcs31*-R 引物各 1 μL , 基因组 DNA 模板 2 μL 、双蒸水 8.5 μL 和 Premix Taq 12.5 μL 。PCR 扩增反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, 取 6 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 阳性质粒标准品的制备

将上述 PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒纯化提取目的片段。将目的片段连接 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 Trans 5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行鉴定并测序。序列正确的阳性质粒用来制备阳性标准品。阳性质粒初始浓度为 50 ng/ μL , 计算出拷贝数为 1.63×10^{10} 拷贝/ μL 。将初始阳性质粒稀释到 1.0×10^{10} 拷贝/ μL , 之后进行 10 倍比梯度稀释, 得到浓度为 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的质粒标准品, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 qPCR 反应条件的优化

采用棋盘法优化 qPCR 反应条件。qPCR 反应总体系为 20 μL , 包含 2 $\times$ ALL-Powerful Qpcr PreMix 混合物 10 μL , *bcs31*-F/*bcs31*-R 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的加入量分别为 0.3、0.4、0.5 和 0.6 μL , *bcs31*-T 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 分别加入 0.1、0.2、0.3 和 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , 补 ddH₂O 至 20 μL 。反应条件: 污染消化 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 58~62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环进行扩增。通过优化得到 qPCR 最佳反应所需的引物和探针浓度以及退火温度。

1.7 标准曲线的建立

分别以 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^5$ 拷贝/ μL 的质粒标准品为模板, 每个浓度均设置 3 次重复, 进行 qPCR 反应, 得到各自的阈值循环数 (*Ct*) 值, 以此建立标准曲线。

1.8 特异性试验

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、沙门菌、副猪格氏菌的基因组 DNA 为模板, 布氏杆菌 S2 株基因组 DNA 为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 在相同的条件下同时进行 qPCR 反应扩增, 通过观察有无 *Ct* 值和扩增曲线产生以确定该方法的特异性。

1.9 敏感性试验

分别以 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的质粒标准品为模板, 设置阴性对照, 进行 qPCR 反应扩增, 依据所能检测出最低浓度的标准品来确定该反应的敏感度。将 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的质粒作为普通 PCR 反应模板, 将 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测各个稀

度是否扩增出条带, 与 qPCR 进行对比。

1.10 重复性试验

选取 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 拷贝/ μL 的质粒为模板, 进行批间与批内重复性试验, 每个浓度均重复 3~5 次。根据 *Ct* 值, 计算每个稀释度的变异系数 (*CV*), 进而确定该方法的重复性。

1.11 与商品化试剂盒的比较

将布氏杆菌 S2 株基因组 DNA 进行 10 倍比梯度稀释, 以 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 浓度为模板, 使用建立的 qPCR 检测方法 with 3 种商品化荧光 PCR 试剂盒进行对比, 比较 *Ct* 值, 以确定该检测方法的有效性。此外, 用同样的方法检测 5 份布氏杆菌弱阳性拭子 DNA。

1.12 临床样本检测

根据上述优化好的条件, 使用所建立的布氏杆菌 qPCR 检测方法, 对山东省内无害化处理厂、屠宰场采集的共 1 271 份猪临床样本 (猪淋巴结 683 份、全血 247 份、生殖拭子 341 份) 进行检测, 并与商品化试剂盒的检测结果进行比较。

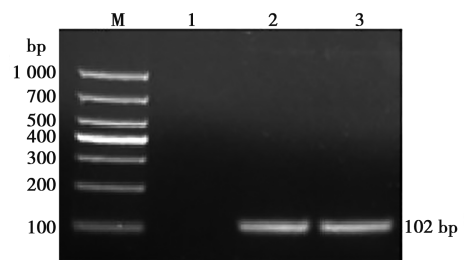
1.13 数据统计与分析

试验数据采用“平均数 $\pm$ 标准差”表示, 使用 SPSS 15.0 软件中的单因素方差分析进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因克隆和鉴定

布氏杆菌目的基因 PCR 产物大小为 102 bp, 将目的基因片段与 pMD19-T 载体连接获得重组质粒, 对重组质粒进行常规 PCR 扩增鉴定, 结果显示其扩增片段与目的基因片段大小一致 (图 1)。重组质粒测序结果显示其目的基因序列正确。



M. DL1000 DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 目的片段; 3. 重组质粒。

图 1 PCR 扩增目的片段

2.2 qPCR 反应条件的确定

通过棋盘法改变引物和探针的加入比例, 进行 qPCR 扩增, 试验结果如表 1 所示。由此得到反应的最佳体系: 在 20 μL 反应总体积中, 2 $\times$ ALL-Powerful Qpcr PreMix 混合物 10 μL , *bcs31*-F/*bcs31*-R 引物

各 0.4 μL , *bcs*p31-T 探针 0.1 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 7.1 μL 。优化的反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。

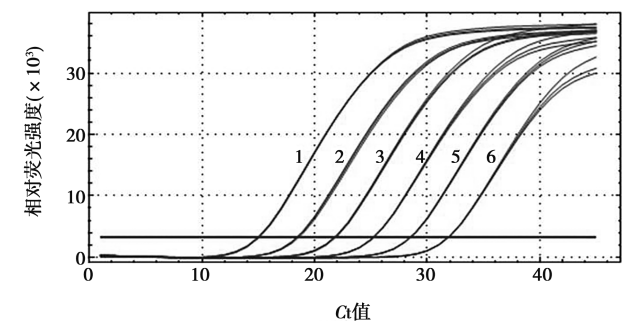
2.3 标准曲线的建立

在 $1\times 10^{10}\sim 1\times 10^5$ 拷贝/ μL 范围时, 标准品的拷

贝数与其相应的 Ct 值之间呈现良好的线性关系, 扩增曲线如图 2 所示。以阳性标准品拷贝数的对数值为横坐标, Ct 值为纵坐标建立标准曲线, 结果如图 3 所示, 标准曲线方程为: $y = -3.364\lg x + 48.740$, $R^2 = 1.000$ 。

表 1 不同比例引物、探针组合下的扩增 Ct 值

引物体积/ μL	探针体积/ μL			
	0.1	0.2	0.3	0.4
0.3	30.73±0.62	30.66±0.27	30.89±0.23	31.25±0.54
0.4	30.41±0.12	30.51±0.61	30.73±0.36	31.20±0.46
0.5	31.31±0.63	31.64±0.27	31.82±0.30	31.87±0.34
0.6	31.79±0.34	32.01±0.37	31.91±0.36	32.52±0.40



1~6. $1\times 10^{10}\sim 1\times 10^5$ 拷贝/ μL 。

图 2 标准品的 qPCR 扩增曲线

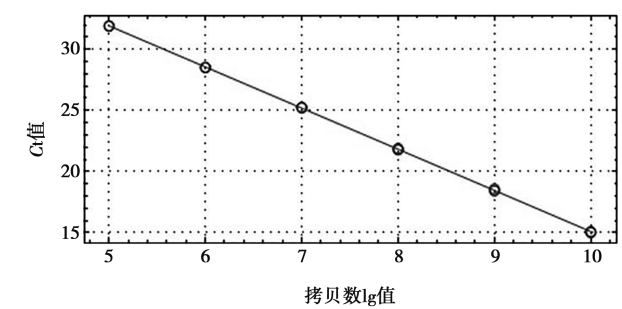
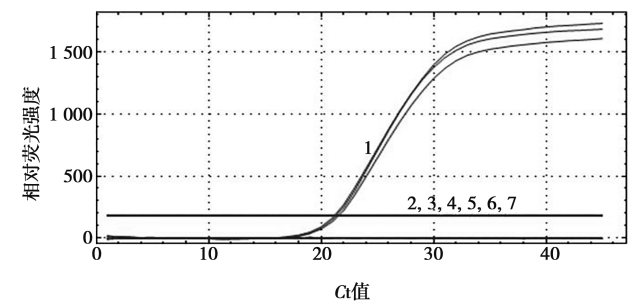


图 3 标准品的 qPCR 标准曲线

2.4 特异性试验

用建立的 qPCR 方法检测布氏杆菌疫苗 S2 株、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、沙门菌、副猪格拉菌, 确定该方法的特异性。除布氏杆菌疫苗 S2 株检测有典型的扩增曲线外, 其他菌株均未出现典型的扩增曲线, 表明该方法具有良好的特异性 (图 4)。

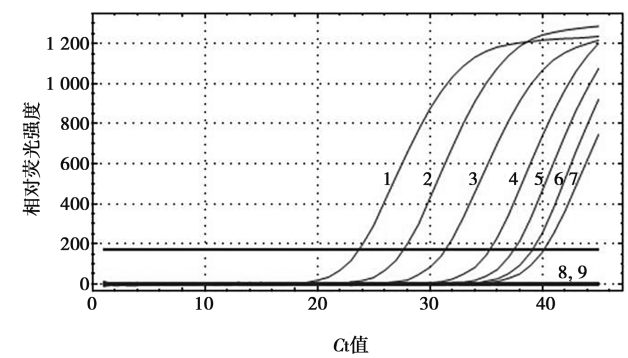


1. 布氏杆菌疫苗 S2 株; 2. 大肠杆菌; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 猪链球菌; 5. 沙门菌; 6. 副猪格拉菌; 7. 阴性对照。

图 4 qPCR 特异性试验

2.5 敏感性试验

使用连续 10 倍稀释的重组质粒 ($1\times 10^7\sim 1\times 10^0$ 拷贝/ μL) 为模板, qPCR 扩增结果见图 5, 普通 PCR 反应结果见图 6。qPCR 可检测出模板最低浓度为 1×10^1 拷贝/ μL , 而普通 PCR 可以检测出模板的最低浓度为 1×10^3 拷贝/ μL , 表明 qPCR 的敏感性比普通 PCR 高 100 倍。



1~8. $1\times 10^7\sim 1\times 10^0$ 拷贝/ μL ; 9. 阴性对照。

图 5 qPCR 敏感性试验

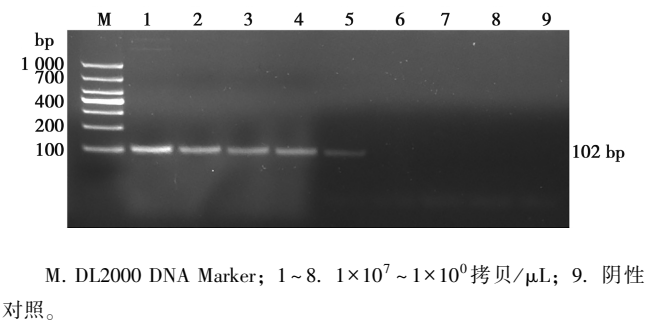


图 6 普通 PCR 敏感性试验

2.6 重复性试验

选取 4 个浓度的质粒标准品为模板进行 qPCR 反应，每组重复 3~5 次，计算批内和批间 CV（表 2 和表 3）。CV 均小于 2%，表明该方法具有良好的稳定性和重复性。

2.7 与商品化试剂盒的比较

本试验建立的 qPCR 方法与商品化试剂盒对低浓度 S2 株基因组 DNA 和弱阳性样本 DNA 的检测结果显示，建立的 qPCR 方法与商品化试剂

盒的检测效果相当，且在低浓度模板的检测中更有优势，表明了该方法的有效性。

表 2 TaqMan qPCR 批内重复试验结果

浓度/ (拷贝 · μL^{-1})	重复 次数	平均值	标准差	方差	CV/%
1×10^7	5	21.58	0.1738	0.0302	0.81
1×10^6	5	25.63	0.2080	0.0433	0.81
1×10^5	5	29.07	0.2732	0.0747	0.94
1×10^4	5	33.20	0.3723	0.1386	1.12

表 3 TaqMan qPCR 批间重复试验结果

浓度/ (拷贝 · μL^{-1})	重复 次数	平均值	标准差	方差	CV/%
1×10^7	3	23.32	0.2267	0.0514	0.97
1×10^6	3	27.80	0.3499	0.1224	1.26
1×10^5	3	30.39	0.3132	0.0981	1.03
1×10^4	3	34.42	0.3910	0.1529	1.14

表 4 布氏杆菌不同荧光 PCR 检测试剂盒 Ct 值比较

样本	qPCR	试剂盒 1	试剂盒 2	试剂盒 3
S2 (10^{-4})	27.42±0.07	26.56±0.03	29.44±0.04	28.93±0.09
S2 (10^{-5})	30.62±0.23	29.90±0.16	32.68±0.17	32.22±0.13
S2 (10^{-6})	33.68±0.26	33.29±0.14	35.17±0.42	35.76±0.66
S2 (10^{-7})	36.24±0.26	37.02±0.45	36.98±0.25	38.33±0.51
弱阳性样本 1	36.99±0.12	37.68±0.03	/	/
弱阳性样本 2	34.46±0.40	34.39±0.13	/	/
弱阳性样本 3	36.24±0.06	36.35±0.33	/	/
弱阳性样本 4	36.78±0.12	36.89±0.45	/	/
弱阳性样本 5	36.09±0.19	36.37±0.42	/	/
阳性对照	24.99±0.10	23.07±0.79	28.76±0.48	24.47±0.65

注：“/”表示未检测。

2.8 临床样本检测

使用建立的 qPCR 方法检测 1 271 份采集的猪临床样本，结果显示，在检测的 683 份猪淋巴结样本中，检出 8 份阳性，检出率为 1.17%，与商品化试剂

盒 1 的符合率达到 99.56%；247 份猪全血样本中均未检出阳性；在采集的 341 份生殖拭子中检出 5 份阳性，检出率为 1.47%，与商品化试剂盒 1 的符合率达到 99.41%。

表 5 临床样本检测结果

临床样本	样本总数	qPCR		试剂盒 1		符合率/%
		阳性数	阳性率/%	阳性数	阳性率/%	
淋巴结	683	8	1.17	5	0.73	99.56
全血	247	0	0	0	0	100
生殖拭子	341	5	1.47	3	0.88	99.41

3 讨论

布氏杆菌宿主广泛,感染途径多种多样,随着社会经济的发展和家畜流动性增大,发病率正在不断上升^[13]。布氏杆菌属包括 13 个种,其中牛、羊、猪的布氏杆菌对动物和人类的致病性最强^[14],且存在着跨物种传播^[1]。如果不能及时发现、诊断并治疗,布氏杆菌将在动物尤其是畜群中迅速传播,给布病的消除带来负担,并给畜牧业造成巨大的经济损失。因此,动物布氏杆菌的检测对布病的筛查和预防具有重要意义。

qPCR 是一种结合传统 PCR 与实时荧光检测的核酸扩增技术,根据所用荧光化学物质的不同可分为荧光染料法(SYBR Green I 法为代表)和荧光探针法(TaqMan 法为代表)。国内外众多学者已将该技术广泛应用于布氏杆菌的检测和定量。Newby 等^[15]使用相同的扩增引物扩增 *alkB* 基因和 *IS711* 插入元件的部分区域,评估了 SYBR Green I、TaqMan 和杂交探针等 3 种方法检测流产布氏杆菌的敏感性和特异性,结果显示杂交探针的特异性最高,SYBR Green I 灵敏性最低。Hinic 等^[16]使用普通 PCR 和 qPCR 对布氏杆菌参考株和野毒株进行鉴别,显示对于布氏杆菌含量较低的样本时,qPCR 方法更具优势。高正琴等^[17]针对 16S rRNA 序列设计了布氏杆菌特异引物及 TaqMan 探针,建立了 TaqMan MGB 探针 qPCR 方法,该方法能够准确地从布氏杆菌阳性样本中检测到布氏杆菌 DNA,最低能够检测到的布氏杆菌数量为 9.3 拷贝。Sohrabi 等^[18]优化的 TaqMan qPCR 方法,评价其对入血清布氏杆菌 DNA 定量检测的诊断效率,显示出高灵敏性。Abdel-Hamid 等^[19]建立了一种省时且快速的 TaqMan qPCR 方法,靶向检测牛血清中的 *IS711* 基因,诊断性能优于传统 PCR,可以区分布氏杆菌自然感染或疫苗免疫。常秀琴等^[11]利用布氏杆菌 *IS711* 基因序列设计特异性引物和探针,建立的 TaqMan qPCR 检测方法也能有效、快速、准确地检测布氏杆菌感染。这些研究表明,基于特异且相对保守的基因序列建立的 TaqMan qPCR 技术是检测病原菌感染的有效方法。

本研究选择布氏杆菌保守基因 *bcbp31* 作为 TaqMan qPCR 扩增的靶基因。*bcbp31* 基因是一种单拷贝基因,能更准确反映感染样本中布氏杆菌的 DNA 载量,是最常用的靶点^[20]。石丽瑞等^[21]也根据 *bcbp31* 基因序列设计引物和探针,成功建立了布氏杆菌 qPCR 检测体系,灵敏度可达 2.0×10^1 拷贝/ μL 。而本研究建立的 qPCR 方法灵敏度可达到 1.0×10^1 拷贝/ μL ,表明本研究设计的引物和探针扩增效果更

好。此外,特异性和重复性试验也表明本方法特异性强、重复性好。通过与市面上现有的商品化试剂盒进行对比,本方法与商品化试剂盒的检测效果相当,且在低浓度模板的检测中更有优势,具有较好的应用前景。为评价本研究建立的 TaqMan qPCR 方法对动物临床样本检测的实用性,对 683 份猪淋巴结、247 份全血和 341 份生殖拭子样本进行了检测,除全血未检出布氏杆菌阳性外,猪淋巴结样本的阳性检出率为 1.17%,生殖拭子样本的阳性检出率为 1.47%。本方法的布氏杆菌检出阳性率稍高于商品化试剂盒的阳性检出率,进一步说明本研究建立的 TaqMan qPCR 方法在检测灵敏度方面的优势。

4 结论

本研究建立的布氏杆菌 TaqMan qPCR 方法灵敏、特异、稳定,对猪布病的阳性检出率稍高于商品化荧光检测试剂盒,适用于动物布病的快速监测和早期诊断。布病在山东省猪群中呈低水平存在,为该省制定布病的防控与净化策略提供参考依据。

参考文献:

- [1] OLSEN S C, PALMER M V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years [J]. Vet Pathol, 2014, 51 (6): 1076-1089.
- [2] KHURANA S K, SEHRAWAT A, TIWARI R, et al. Bovine brucellosis-a comprehensive review [J]. Vet Q, 2021, 41 (1): 61-88.
- [3] GONZÁLEZ-ESPINOZA G, ARCE-GORVEL V, MÉMET S, et al. *Brucella*: reservoirs and niches in animals and humans [J]. Pathogens, 2021, 10 (2): 186.
- [4] PERCIN D. Microbiology of *Brucella* [J]. Recent Pat Anti Infect Drug Discov, 2013, 8 (1): 13-17.
- [5] 崔步云,姜海. 2005—2016 年全国布鲁氏菌病监测数据分析 [J]. 疾病监测, 2018, 33 (3): 188-192.
- [6] 胡晓艳,冯陈琼璐,于晨静,等. 中国布鲁氏菌病时空分布特征及预测模型研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2025, 41 (1): 100-104.
- [7] 李林姣,彭小微,刘铭赫,等. 动物布鲁氏菌病实验室检测技术研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2023, 57 (4): 78-87.
- [8] 吴彤,王慧煜,吴绍亮,等. 动物布鲁氏菌病快速诊断方法研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32 (8): 746-750, 759.
- [9] 杨艳玲,郭利,王建科,等. 布鲁氏菌 SUMO-BCSP31 重组表达菌的构建及免疫原性分析 [J]. 中国畜牧兽医学会家畜传染病学分会全国会员代表大会暨学术研讨会, 2013, 1112-1117.
- [10] QUEIPO-ORTUÑO M I, MORATA P, OCÓN P, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35 (11): 2927-2930.
- [11] 常秀琴,郝梦,雷振华,等. 布鲁氏菌 TaqMan 实时荧光定量

- PCR 检测方法的建立与初步评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2024, 45 (11): 1399–1403.
- [12] CHRISTOPHER S, UMAPATHY B L, RAVIKUMAR K L. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis [J]. J Lab Physicians, 2010, 2 (2): 55–60.
- [13] AN C, SHEN L, SUN M, et al. Exploring risk transfer of human brucellosis in the context of livestock agriculture transition: a case study in Shaanxi, China [J]. Front Public Health, 2022, 10: 1009854.
- [14] ZHENG R, XIE S, LU X, et al. A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China [J]. BioMed Res Int, 2018, 2018 (1): 5712920.
- [15] NEWBY D T, HADFIELD T L, ROBERTO F F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (8): 4753–4759.
- [16] HINIĆ V, BRODARD I, THOMANN A, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. Ovis*, *B. Canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems [J]. J Microbiol Methods, 2008, 75 (2): 375–378.
- [17] 高正琴, 邢进, 冯育芳, 等. TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (11): 995–1000.
- [18] SOHRABI M, MOHABATI MOBAREZ A, KHORAMABADI N, et al. Efficient diagnosis and treatment follow-up of human brucellosis by a novel quantitative TaqMan real-time PCR assay: a human clinical survey [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52 (12): 4239–4243.
- [19] ABDEL-HAMID N H, BELETA E I M, KELANY M A, et al. Validation of real-time polymerase chain reaction versus conventional polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis in cattle sera [J]. Vet World, 2021, 14 (1): 144–154.
- [20] SANJUAN-JIMENEZ R, COLMENERO J D, BERMÚDEZ P, et al. Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella spp* and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e58353.
- [21] 石丽瑞, 李秀华, 韩惠瑛, 等. 布鲁氏菌实时定量荧光 PCR 检测体系的建立及应用 [J]. 中国动物检疫, 2014, 31 (1): 57–60.