

• 短篇论著 •

布鲁氏菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步评价*

常秀琴¹, 郝梦¹, 雷振华¹, 杨丹², 海晓梅¹, 李静¹, 徐珂¹

1. 宁夏回族自治区第四人民医院检验科, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏赛斯聚信生物科技有限公司, 宁夏银川 750000

摘要:目的 建立快速、准确检测布鲁氏菌感染的 TaqMan 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法。方法 利用布鲁氏菌 IS711 基因序列设计特异性引物和探针, 并对该方法的特异性、灵敏度及重复性进行评价。结果 所建立的检测方法可对布鲁氏菌基因组进行特异性检测, 对其他细菌无特异性扩增曲线。该检测方法基因拷贝数的检出限为 3.8 copy/ μ L。批内变异系数在 0.20% ~ 2.01%, 批间变异系数在 0.71% ~ 2.57%, 具有较高的可重复性。采用 qPCR 检测临床标本, 其灵敏度明显高于血培养检测, 可对患者做出准确、及时的诊断。结论 该实验建立的 TaqMan qPCR 检测方法能有效、快速准确地检测布鲁氏菌感染。

关键词: 布鲁氏菌; TaqMan 探针; 实时荧光定量 PCR; IS711**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.11.024**中图法分类号:** R446.5**文章编号:** 1673-4130(2024)11-1399-05**文献标志码:** A

布鲁氏菌病简称布病, 是一种人畜共患的自然疫源性疾​​病, 由布鲁氏菌属细菌感染引起^[1]。布鲁氏菌感染人类、牲畜及野生动物等可引起临床异常表现和病理变化, 如发热、不孕不育、关节炎及神经损伤等^[2]。人类布鲁氏菌病临床分期为急性期、亚急性期和慢性期, 临床表现多变且非特异性, 常导致诊断延迟和误诊。尽管已研制出几种预防布鲁氏菌病的疫苗, 但其仍然是一个主要的全球健康问题, 全世界每年报告的人类布鲁氏菌病病例约 50 万例^[3], 每年因该病造成的经济损失约 30 亿美元^[4]。

布鲁氏菌快速、准确地鉴定对于有效控制和预防布鲁氏菌病至关重要。现行国家标准中诊断布鲁氏菌病的血清学检测方法主要有试管凝集试验、虎红平板凝集试验、酶联免疫吸附试验、抗人球蛋白试验、补体结合试验等。病原学检查即细菌分离培养, 依赖于细菌在实验室培养基上生长和繁殖并形成可见菌落的能力, 方法可靠、成本低廉, 是诊断布鲁氏菌的“金标准”^[5]。但该方法分离率低, 需要长达一周的时间来确认, 需要专门的设备和专业知识, 且存在较大的生物安全风险^[6]。在疾病高度流行的地区, 血清学检测敏感且易于执行, 但仍存在窗口期问题, 易与其他革兰阴性菌发生交叉反应, 特别是与小肠结肠炎耶尔森菌 O:9^[7], 受环境和主观因素的影响, 难以独立做出准确的判断。因此, 有必要提出一种更安全、快速、准确的布鲁氏菌鉴定方法克服以培养为基础的检测的局限性。

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。TaqMan 实时荧光定量 PCR (qPCR) 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 qPCR 方法是基于使用特定的引物和探针, 结合到目标 DNA 序列, 并在扩增过程中产生荧光信号^[8]。相比于荧光染料直接加入的 qPCR, 特异性更强, 且具有开发为高通量、多重基因检测的潜质, 目前大多数国家的临床实验室都可以使用这一强大工具。本研究旨在建立一种灵敏度高、特异性强的 TaqMan qPCR 检测方法, 用于布鲁氏菌感染的早期检测及筛查, 以期及时消除潜在的致病风险, 保障公共卫生安全。

1 资料与方法

1.1 临床标本采集 采集宁夏回族自治区第四人民医院感染科疑似布鲁氏菌感染的 100 例患者外周血标本 100 份。标本采集后及时送至检验科检测或 4℃ 保存, 标本均在 24 h 内检测完成。

1.2 布鲁氏菌及其他菌株生化鉴定 布鲁氏菌标准株 (ATCC25840)、大肠杆菌标准株 (ATCC43888)、金黄色葡萄球菌标准株 (ATCC29213)、肺炎链球菌标准株 (ATCC49619)、乳酸乳球菌标准株 (CICC23609)、阴道加德纳菌标准株 (ATCC14018)、幽门螺杆菌标准株 (ATCC43504)、嗜酸乳杆菌标准株 (J120980)、鲍曼不动杆菌标准株 (ATCC19606) 购自信阳市中检计量生物科技有限公司, 经梅里埃全自动细菌鉴定仪 VITEK-2 (梅里埃生物诊断公司, 法国) 鉴定。

1.3 引物及探针设计 从 GenBank 查找布鲁氏菌

* 基金项目: 宁夏回族自治区重点研发项目 (2022BEG03161)。

的 16S 基因(NR_043003.1)和插入元件 IS711(NC_003317.1)的序列,使用 BeaconDesigner7(PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA)软件设计 16S 基因鉴定引物及 qPCR 检测用的引物和 TaqMan 探针,用 FAM 荧光发光基团标记探针的 5' 端,用 BHQ 淬灭基团标记 3' 端,引物和探针由上海生工生物科技有限公司合成。IS711-F: AAAGCGATTTCATGCGTCGTG; IS711-R: TTAT CGAAAAGGATGGCAAGCG; IS711-P: FAM-TCCGC-CGGGTCCAGCCAATCCA-BHQ1。

1.4 布鲁氏菌基因组 DNA 提取 布鲁氏菌标准菌株使用液体培养基扩大培养,后将其调整成吸光度值为 0.5 的菌液,95 °C 水浴箱灭活 15 min,使用全自动核酸提取仪 SSNP-2000B 及配套试剂(江苏硕世生物科技股份有限公司)提取布鲁氏菌 DNA,使用 Nano-Drop100 超微量分光光度计检测浓度及纯度(Thermo Scientific, USA)。

1.5 构建阳性质粒及绘制标准曲线 PCR 扩增获得布鲁氏菌插入元件 IS711 片段,用高保真酶扩增并进行 PCR 产物纯化,以 pUC19 为骨架载体,将 IS711 片段连接到骨架载体上,转入大肠杆菌 DH5 α 进行扩大培养及鉴定。采用超微量分光光度计定量测定提取重组的阳性质粒 DNA,重组阳性质粒拷贝数计算使用如下公式^[9]。得到布鲁氏菌质粒拷贝数为 3.8×10^9 copy/ μ L。将阳性质粒进行 10 倍梯度稀释,取 8 个稀释浓度依次为 3.81×10^7 、 3.81×10^6 、 3.81×10^5 、 3.81×10^4 、 3.81×10^3 、 3.81×10^2 、 3.81×10^1 、 3.81×10^0 copy/ μ L,每个稀释浓度均设置 3 次重复,根据循环阈值(Ct 值)绘制标准曲线,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳试验验证。

1.6 qPCR 检测条件 采用 ABI7500 荧光定量检测系统(赛默飞世尔科技,美国)进行 qPCR,定量试剂使用 Premix Ex Taq™(宝日医生物技术有限公司,日本)。反应体系为: Premix Ex Taq(2 \times) 10 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各取 0.5 μ L, 10 μ mol/L 的探针取 0.5 μ L,模板 2 μ L(阳性质粒),用 ddH₂O 补足体系至 20 μ L。运行程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸及荧光检测 30 s,共 40 个循环, Ct 值大于 35 视为阴性。

1.7 qPCR 灵敏度、特异性和重复性检测 灵敏度检测:将阳性质粒进行 10 倍梯度稀释,从 3.8×10^7 copy/ μ L 稀释至 3.8×10^{-1} copy/ μ L,各取 2.0 μ L 作为模板使用该 qPCR 系统进行检测。以 ddH₂O 为模板作为阴性对照,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证。

特异性检测:以阳性质粒及实验室保存的其他细菌 DNA(包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球

菌、乳酸乳球菌、阴道加德纳菌、幽门螺杆菌、嗜酸乳杆菌、鲍曼不动杆菌)作为扩增模板,以 ddH₂O 为模板作为阴性对照,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳试验验证。

重复性检测:将阳性质粒进行 10 倍梯度稀释,从 3.8×10^7 copy/ μ L 稀释至 3.8×10^0 copy/ μ L 用于计算批间及批内变异系数(CV)。将同批次配制的反应体系重复检测 3 次并计算批内 CV;其次进行 3 个不同批次配制的反应体系并计算批间 CV。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳试验验证。

1.8 临床标本检测 将 100 份临床标本分别进行虎红平板凝集试验、试管凝集试验、血分离培养及 qPCR,具体实验方法如下。

虎红平板凝集试验:在洁净载玻片上加 0.03 mL 被检标本,再加入虎红平板抗原 0.03 mL,摇匀 5 min。结果判定:出现肉眼可见凝集片或颗粒物判为阳性(+);无肉眼可见凝集片或颗粒物判定为阴性(-)。

试管凝集试验:用 0.5% 的苯酚生理盐水对被检标本进行稀释,稀释浓度分别为 1:12.5、1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800,用 0.5% 的苯酚生理盐水对抗原进行 1:10 稀释,然后对稀释的被检标本分别加入等量的稀释抗原,被检血清稀释浓度分别为 1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600。阴性对照和阳性对照制作方法同上。比浊管使用抗原稀释液和 0.5% 的苯酚生理盐水按比例进行配制,抗原稀释液用抗原原液加等量 0.5% 的苯酚生理盐水稀释配置。结果判定:将全部试验管、对照管和比浊管充分震荡后于 37 °C 保温 20~22 h,取出后室温放置 2 h,用比浊管为标准目测判定结果。++++:完全凝集,上层液体 100% 清亮,底部倒伞状沉淀明显;+++ :几乎完全凝集,上层液体 75% 清亮,底部有倒伞状沉淀;++ :显著凝集,上层液体 50% 清亮,底部倒伞状沉淀较薄;+ :微量凝集,上层液体 25% 清亮,底部倒伞状沉淀不明显;- :无凝集,液体不清亮,无倒伞状沉淀。样本滴度出现 1:100 稀释度及以上判为阳性。

血培养:血培养瓶中(需氧瓶和厌氧瓶各 1 个)接种标本 8~10 mL,放入自动血培养仪中培养,当出现阳性报警后接种血琼脂平板,如有细小沙滩样生长的菌落,应用梅里埃全自动细菌鉴定仪 VITEK-2 鉴定。

qPCR:外周血标本 95 °C, 15 min 灭活后,离心取上清液,使用全自动核酸提取仪 SSNP-2000B 及配套试剂直接提取细菌 DNA,通过本研究开发的 qPCR 体系进行检测。

2 结 果

2.1 阳性质粒标准曲线制作 结果表明,基于 IS711

基因序列设计特异性引物和探针的布鲁氏菌的 qPCR 检测方法成功建立(图 1),标准曲线具有良好的线性关系及放大效果,相关系数 $R^2=0.999$,标准曲线方程 $Y=-3.6945X+35.997$,其中 Y 为 C_t , X 为 \log (拷贝数)。这说明该引物和 qPCR 系统能够有效、可靠地检测布鲁氏菌。

2.2 特异性试验结果 以其他 8 种主要细菌标准株

的 DNA 为模板,用该系统进行扩增。布鲁氏菌阳性质粒为阳性对照,无核酸酶的水为阴性对照。结果表明,布鲁氏菌阳性质粒成功检测到荧光信号,其他细菌标准株均无扩增信号且核酸凝胶检测结果为阴性(图 2),表明基于 TaqMan 探针的 qPCR 系统具有高度特异性,与其他临床细菌不发生交叉反应。

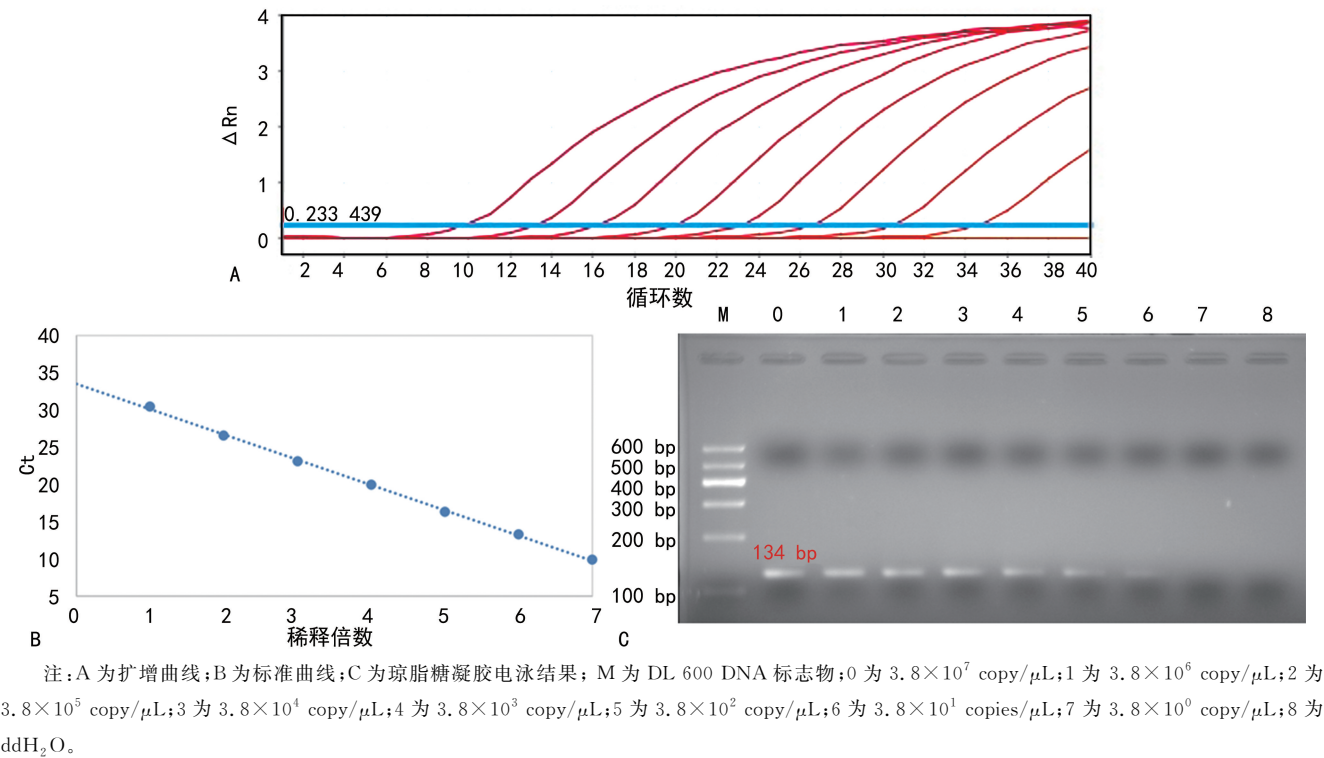


图 1 TaqMan qPCR 标准曲线

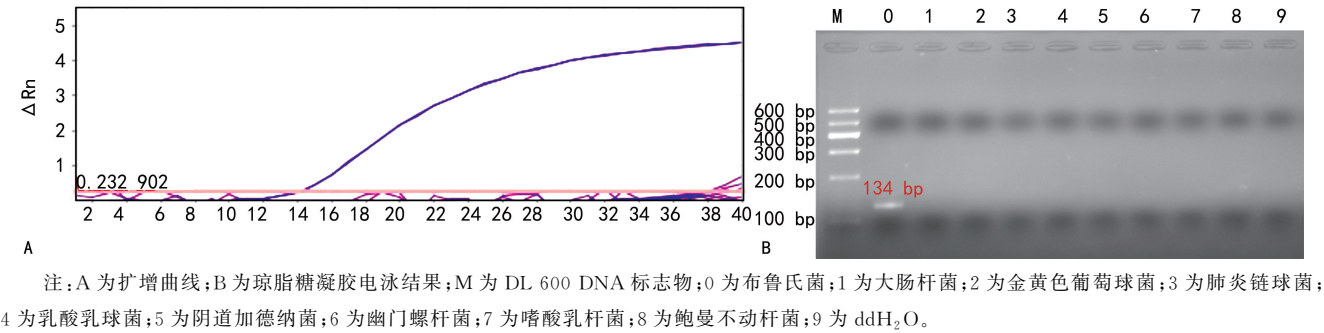


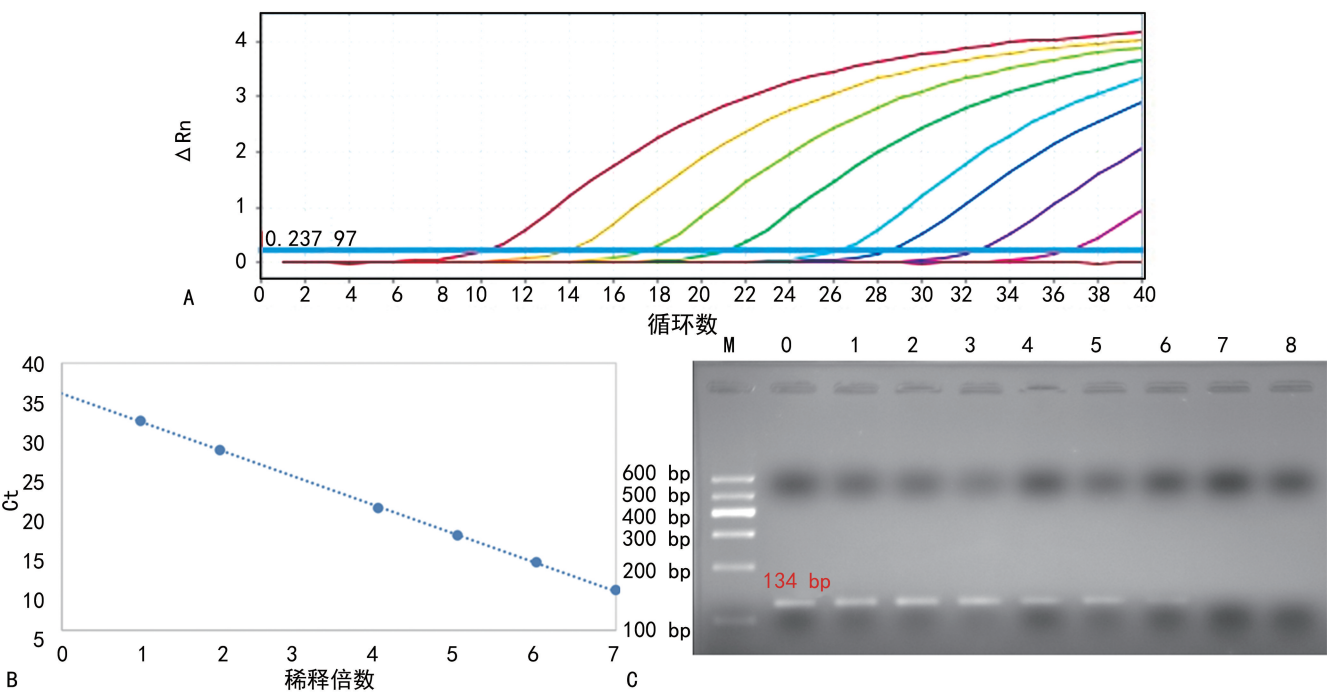
图 2 TaqMan qPCR 特异性扩增曲线

2.3 灵敏度试验结果 结果表明,当布鲁氏菌阳性质粒浓度为 3.8×10^0 copy/ μL , C_t 值为 34.65, 3.8×10^{-1} copy/ μL 阳性质粒未检测到荧光信号。结果表明,基于 TaqMan 探针的 qPCR 检测布鲁氏菌的最低检测值为 3.8 copy/ μL 。

2.4 重复性试验结果 批内 CV 在 0.20%~2.01%,批间 CV 在 0.71%~2.57%(图 3、表 1)。结果表明,本研究建立的基于 TaqMan 探针的 qPCR 检测方法具有可重复性和可靠性。

2.5 临床标本的检测 对 100 份疑似布鲁氏菌感染的患者全血标本进行虎红平板凝集试验、试管凝集试验、血培养及 qPCR 检测,发现符合临床诊断标准的 50 例虎红凝集阳性及试管凝集试验阳性患者全血标本中,血培养方法检测阳性患者 15 例,qPCR 检测阳性患者 26 例;50 例虎红凝集阴性及试管凝集试验阴性患者全血标本中,血培养方法检测结果均为阴性,qPCR 检测阳性患者 13 例。综合所有判定结果,血培养和 qPCR 的阳性例数及灵敏度分别为 15 例

(15%)、39 例(39%)。



注:A为扩增曲线;B为标准曲线;C为琼脂糖凝胶电泳结果;M为DL 600 DNA标志物;0为 3.8×10^7 copy/ μ L;1为 3.8×10^6 copy/ μ L;2为 3.8×10^5 copy/ μ L;3为 3.8×10^4 copy/ μ L;4为 3.8×10^3 copy/ μ L;5为 3.8×10^2 copy/ μ L;6为 3.8×10^1 copy/ μ L;7为 3.8×10^0 copy/ μ L;8为ddH₂O。

图3 TaqMan qPCR 重复性扩增曲线

重组质粒数量 (copy/ μ L)	批内		批间	
	Ct 值($\bar{x}\pm s$)	CV (%)	Ct 值($\bar{x}\pm s$)	CV (%)
3.81×10^7	9.96 \pm 0.10	0.99	9.91 \pm 0.07	0.71
3.81×10^6	13.68 \pm 0.27	1.99	13.48 \pm 0.17	1.26
3.81×10^5	16.44 \pm 0.24	1.45	16.54 \pm 0.43	2.57
3.81×10^4	20.32 \pm 0.26	1.29	20.25 \pm 0.27	1.31
3.81×10^3	24.21 \pm 0.24	1.00	23.72 \pm 0.53	2.22
3.81×10^2	27.58 \pm 0.06	0.20	27.23 \pm 0.59	2.16
3.81×10^1	31.32 \pm 0.14	0.46	30.95 \pm 0.49	1.57
3.81×10^0	34.75 \pm 0.70	2.01	35.12 \pm 0.46	1.30

3 讨 论

进入 21 世纪,我国经济水平不断提升,人口流动性加大,使布鲁氏菌病发病率不断上升^[10]。如果不及时诊断和治疗,将造成宿主多系统损伤,可导致巨大的社会和经济负担^[11]。因此,布鲁氏菌的检测是布鲁氏菌病早期诊断的主要方法之一,对该疾病的筛查和预防也具有重要意义。目前,传统的检测方法有病原体分离鉴定、常规 PCR、血清学检测等。然而,这些方法往往在分离率、人工成本、检测速度、灵敏度、假阳性率等方面受到限制,不能在实验室广泛应用^[12]。因此,探索科学、准确、快速的检测方法,可以实现疾病

的防治效果。

近年来,基于 TaqMan 探针的 qPCR 技术已广泛应用于布鲁氏菌核酸的检测和定量,它可以特异性检测目标序列,防止非特异性产物的干扰,影响定量的准确性,也可用于多种反应。IS711 基因是一个转座基因,其序列本身在物种间差异很小,但 IS711 基因在不同布鲁氏菌物种中的插入位置具有不同的特异性,可用于鉴别诊断,已成为经典陆生哺乳动物布鲁氏菌物种和生物变种分子特征的有用靶点^[13]。Abdel-Hamid 等优化一种省时且快速的 TaqMan qPCR 方法,靶向检测牛血清中的 IS711 基因,诊断性能由于传统 PCR,可以区分布鲁氏菌自然感染或疫苗免疫^[14]。郭子奕等^[15]选用布鲁氏菌保守区 IS711 基因进行特异性引物及荧光探针的设计,对鹿茸和鹿血样品进行检测,检测方法不仅能有效地对布鲁氏菌进行检测,还可对布鲁氏菌的污染情况进行评价。SOHRABI 等^[16]优化的 TaqMan qPCR 方法,评价其对人血清布鲁氏菌 DNA 定量检测的诊断效率,显示高灵敏度。由 SAINI 等^[17]开发的 TaqMan qPCR 技术具有更快的扩增过程,灵敏度和特异度分别为 98%和 100%,能够定量细菌 DNA 载量,有助于布鲁氏菌感染的早期检测。综上所述,基于特异且相对保守的基因,结合快速省时的 TaqMan 探针的 qPCR 技术,是

检测病原菌感染的有效方法。

本研究选择在布鲁氏菌各株菌株中高度保守的 IS711 为靶基因,通过对反应体系和反应程序的优化,建立的 TaqMan qPCR 检测方法的标准曲线具有良好的线性关系。TaqMan qPCR 检测具有较高的特异性和灵敏度,其他 8 种临床致病菌基因组 DNA 标本无交叉反应,最低检测线为 3.8 copy/ μ L。批内 CV 为 0.20%~2.01%,批间 CV 为 0.71%~2.57%,说明 TaqMan qPCR 系统具有良好的重复性和较高的稳定性。此外,对疑似为布鲁氏菌感染的 100 例患者的外周血标本进行检测,并与血培养检测方法进行初步对比分析。结果显示,血培养的灵敏度为 15%,而 qPCR 的灵敏度为 39%。结果表明,qPCR 可以在疾病早期做出正确及时的诊断,特别是对试管凝集试验阴性的患者。

综上所述,本研究中的 TaqMan qPCR 方法,具有灵敏度高、特异性强的特点,且操作简单,可作为一种可靠的布鲁氏菌临床检测方法。同时,对各种类型的人体标本的检测具有简单、快速的特点,适合在布鲁氏菌病的临床检测中推广应用。

参考文献

- [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] 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.
- [3] BENAMMAR S, GUENIFI W, MISSOUM S, et al. A case of acute renal failure revealing brucellian endocarditis and neurological complications in Batna (Algeria) [J]. Med Trop Sante Int, 2022, 2(1): mtsi, v2i1. 2022. 229.
- [4] SINGH B B, KHATKAR M S, AULAKH R S, et al. Estimation of the health and economic burden of human brucellosis in India[J]. Prev Vet Med, 2018, 154: 148-155.
- [5] 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 (Basel), 2023, 11(3):654.
- [6] CHANG J, HOU X, YANG X, et al. A rapid and sensitive triplex-recombinase polymerase amplification for simultaneous differentiation of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* in sera and foods[J]. FEMS Microbiol Lett, 2023, 370:fnad056.
- [7] BROWN V R, MILLER R S, BOWDEN C F, et al. Dis-

ease progression and serological assay performance in heritage breed pigs following *brucella suis* experimental challenge as a model for naturally infected feral swine[J]. Pathogens, 2023, 12(5):638.

- [8] SENOO M, MATSUBARA Y, FUJII K, et al. Adenovirus-mediated in utero gene transfer in mice and guinea pigs:tissue distribution of recombinant adenovirus determined by quantitative TaqMan-polymerase chain reaction assay[J]. Mol Genet Metab, 2000, 69(4):269-276.
- [9] HUANG Y L, PANG V F, PAN C H, et al. Development of a reverse transcription multiplex real-time PCR for the detection and genotyping of classical swine fever virus [J]. J Virol Methods, 2009, 160(1/2):111-118.
- [10] AN C H, SHEN L, SUN M H, 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.
- [11] SHEBLI H M, AL-SHAYYAB S M, HADADD A, et al. Rapidly progressive glomerulonephritis in human brucellosis[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2021, 32(4):1171-1175.
- [12] KHAN A U, MELZER F, EL-SOALLY S, et al. Serological and molecular identification of *brucella* spp. in pigs from cairo and giza governorates, Egypt[J]. Pathogens, 2019, 8(4):248.
- [13] MAQUART M, FARDINI Y, ZYGMUNT M S, et al. Identification of novel DNA fragments and partial sequence of a genomic island specific of *Brucella pinnipediaлис*[J]. Vet Microbiol, 2008, 132(1/2):181-189.
- [14] 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.
- [15] 郭子奕,任晓航,杜锐,等. 鹿茸及鹿血中布鲁氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(6):741-746.
- [16] SOHRABI M, MOHABATI-MOBAREZ A, KHORAM-ABADI 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.
- [17] SAINI S, GUPTA V K, GURURAJ K, et al. Comparative diagnostic evaluation of OMP31 gene based TaqMan(R) real-time PCR assay with visual LAMP assay and indirect ELISA for caprine brucellosis [J]. Trop Anim Health Prod, 2017, 49(6):1253-1264.