

# 多重 PCR 检测奶牛布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体

彭武丽<sup>1,2</sup>, 季新成<sup>2\*</sup>, 于学辉<sup>2</sup>, 史 茜<sup>2</sup>, 王科珂<sup>2</sup>, 李 娜<sup>2</sup>

(1. 石河子大学生命科学学院, 石河子 832000; 2. 新疆出入境检验检疫局, 乌鲁木齐 830063)

**摘 要:** 为了建立同步检测奶牛布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体感染的多重 PCR 方法, 根据 GenBank 上具有属间特异性的布鲁菌 *Bp26* 基因、鹦鹉热衣原体 23S rRNA 基因和贝纳氏柯克斯氏体 *IS1111a* 基因, 利用 Primer premier 5.0 软件各设计 1 对特异性引物。通过优化 PCR 反应体系和扩增条件, 建立了能够同时检测奶牛布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体的多重 PCR 方法。该方法具有较好的特异性和可重复性, 对 3 种基因单重 PCR 检测敏感性均达到  $3.1 \times 10^2$  拷贝 · 反应<sup>-1</sup>, 对 3 种病原基因同步检测的敏感性能达到  $3.1 \times 10^3$  拷贝 · 反应<sup>-1</sup>。利用该方法对采自不同流产产的抗凝全血、血清、流产胎儿及奶液等 172 份临床样品进行检测, 检测到布鲁菌感染阳性样品 53 份, 鹦鹉热衣原体感染阳性样品 2 份, 贝纳氏柯克斯氏体感染阳性样品 10 份, 且检测到布鲁菌和鹦鹉热衣原体混合感染阳性样品 2 份, 布鲁菌和贝纳氏柯克斯氏体混合感染阳性样品 2 份, 尚未检测到 3 种病原混合感染的阳性样品。结果表明, 建立的多重 PCR 方法可以用来对奶牛布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体进行同步、快速、灵敏的检测。

**关键词:** 布鲁菌; 鹦鹉热衣原体; 贝纳氏柯克斯氏体; 多重 PCR; 共扩增

**中图分类号:** S854.43; S852.614; S852.67; S852.69 **文献标志码:** A **文章编号:** 0366-6964(2014)01-0123-06

## A Multiplex PCR Method for Detecting *Brucella*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* of Dairy Cows

PENG Wu-li<sup>1,2</sup>, JI Xin-cheng<sup>2\*</sup>, YU Xue-hui<sup>2</sup>, SHI Qian<sup>2</sup>, WANG Ke-ke<sup>2</sup>, LI Na<sup>2</sup>

(1. College of Life Science of Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Xinjiang Exit-import Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063, China)

**Abstract:** *Brucella*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* are three important zoonotic pathogens known to infect dairy cows. The aim of this study was to develop a multiplex PCR method for the simultaneous detection of them. Three genus-specific genes sequences were selected according to the GenBank, including *Bp26* of *Brucella* spp., 23S rRNA of *Chlamydia psittaci* and *IS1111a* of *Coxiella burnetii* spp. And three specific primers pairs were designed respectively. After optimizing PCR reactions and amplification conditions, the multiplex method successfully discriminated *Brucella*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* of dairy cows. The method had better specificity and repeatability, the detection sensitivity of simplex method for the three genes both reached  $3.1 \times 10^2$  copies · reaction<sup>-1</sup>, the detection sensitivity of multiplex method for these reached  $3.1 \times 10^3$  copies · reaction<sup>-1</sup>. Using this multiplex method to detect 172 samples including bloods, serums, placentas and milk of different abortion cattle, 53 *Brucella* positive samples, 2 *Chlamydia psittaci* and 9 *Coxiella burnetii* positive samples were detected out, 2 co-infection of

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2011IK017); 国家科技支撑计划项目(2013BAD12B04)

作者简介: 彭武丽(1987-), 女, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: rui0518@126.com

\* 通信作者: 季新成, 男, 博士, 高级兽医师, E-mail: jixincheng@126.com

*Brucella* and *Chlamydia psittaci* and 2 co-infection of *Brucella* and *Coxiella burnetii* positive samples were detected out else, no co-infection positive samples of the three pathogens was detected out. The above results indicated this method can be used for simultaneously, rapidly and sensitively detecting *Brucella*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* of dairy cows.

**Key words:** *Brucella*; *Chlamydia psittaci*; *Coxiella burnetii*; multiplex PCR; co-amplification

牛布鲁病(brucellosis)是由布鲁菌(*Brucella*)引起的以胎盘炎和流产等生殖障碍为特征的急性或慢性传染病<sup>[1]</sup>。牛衣原体病(Chlamydiosis)是由鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)感染牛引起的一种多症状性传染病,主要表现为妊娠母牛流产、死产和产弱犊,新生牛多发肺炎、肠炎、多发性关节炎、脑炎和结膜炎等<sup>[2]</sup>。牛 Q 热(Q fever)是由贝纳氏柯克斯氏体(*Coxiella burnetii*)引起的以流产、死胎为特征的自然疫源性传染病<sup>[3]</sup>。以上 3 种病均为严重威胁人畜健康的人畜共患病,在世界很多国家和地区都有不同程度的发生与流行。血清学调查结果表明,奶牛中存在上述病原的交叉感染<sup>[1-4]</sup>,且因临床症状上的相似性,以及血清学上的交叉反应,往往造成对诊断结果的误判。Q 热与布鲁菌病有大致相同的传染源和传播途径,因缺乏典型的临床表现,常常被误诊为流行性感、肺炎、沙门菌感染、布鲁菌感染和传染性肝炎等,有时误诊率达 100%<sup>[5-6]</sup>。

高效、快速、灵敏的检测技术是对这些疫病进行有效防控的重要手段之一,目前,对这些病已报道的检测方法中,大多都是基于血清学诊断,或是对单一病原的 PCR 检测<sup>[7-9]</sup>。笔者经对布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体特异性基因的分析,通过特异性引物设计和 PCR 扩增,拟建立同时检测这 3 种病原的多重 PCR 方法,实现对这 3 种疫病的同步、快速诊断。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 阳性核酸和样品 布鲁菌、鹦鹉热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体阳性核酸以及大肠杆菌、沙门菌、李氏杆菌、结核杆菌阳性核酸样品由新疆出入境检验检疫局技术中心实验室保存;牛抗凝全血、血清、流产胎儿及奶液等 172 份临床疑似布鲁菌感染(临床诊断表现流产、胎衣滞留、阴道炎、睾丸炎、副睾丸炎、阴囊肿大等症状)的样品分别采自新疆不同地区的 5 个牛场的不同奶牛。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶(2.5

U· $\mu\text{L}^{-1}$ )、DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒、血液基因组 DNA 提取系统和 DNA Zol,购自天根生物技术(北京)有限公司;DL2000 DNA Marker 购自鼎国昌盛生物技术(北京)有限责任公司;dNTP、限制性内切酶 *EcoR* I、pMD18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司;引物由上海生工生物有限公司合成。

### 1.2 引物的设计与合成

根据布鲁菌 *Bp26* 基因(GenBank 登录号:AB126349.1)、鹦鹉热衣原体 23S rRNA 基因(GenBank 登录号:U68448.1)和贝纳氏柯克斯氏体 IS1111a 基因(GenBank 登录号:M80806.1),利用 Primer premier 5.0 软件各设计 1 对特异性引物。引物相关信息见表 1。

### 1.3 模板 DNA 的制备

抗凝全血、血清按血液基因组 DNA 提取试剂说明书操作提取核酸,流产胎儿经研磨后用 DNA Zol 提取核酸,奶液中细菌基因组 DNA 的提取按参考文献[7]进行。将以上所提核酸加 50  $\mu\text{L}$  TE 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.4 单重 PCR 反应条件的优化与阳性重组质粒的构建

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系:dNTP 浓度分别为 2.0、1.5、1.0 和 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,引物浓度分别为 1、0.75、0.50、0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别为 2.0、1.5、1.0 和 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,Taq DNA 聚合酶浓度分别为 1.75、1.5、1.25、1.0、0.75 和 0.5 U,退火温度分别为 53、54、55、56、57 和 58  $^{\circ}\text{C}$ ,循环参数分别为 30、35 和 40。

用上述优化后的 PCR 反应条件分别对上述 3 个基因进行扩增,回收目的片段,克隆至 pMD18-T 载体,通过鉴定阳性重组子,提取质粒,经酶切、PCR 及测序鉴定正确,分别命名为 pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a。并进行浓度测定,将 3 种质粒均稀释成  $3.1\times 10^{10}$  拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$  用于后续试验。

表 1 多重 PCR 引物

Table 1 Primers for multiplex PCR

基因	引物名称	序列(5'→3')	位置(bp)	扩增片段长度/bp
Gene	Primer name	Sequence(5'→3')	Position	Fragment /bp
<i>Bp26</i>	Forward	GCTTGAAGCTTGC GGACA	1 151-1 168	219
	Reverse	GGCTGATACGCCGACTT	1 352-1 369	
23S rRNA	Forward	CTTCGGCGAGCTGGTATA	522-539	356
	Reverse	CTAGGTTTCACGTGTCTAG	859-877	
IS1111a	Forward	GGGGTAAAGTGATCTACAC	159-177	130
	Reverse	CCCATAAACGTCCGATAC	271-288	

### 1.5 多重 PCR 反应条件的优化

在单重 PCR 最佳反应条件前提下,用 3 基因的 3 对引物对  $3.1 \times 10^{10}$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 3 种质粒进行共扩增,同 1.4 进行反应条件的优化和观察结果。

### 1.6 多重 PCR 特异性试验

采用优化后的多重 PCR 方法分别对大肠杆菌、沙门菌、李氏杆菌、结核杆菌病原阳性核酸样品扩增,以检测该方法的特异性。

### 1.7 多重 PCR 敏感性试验

将  $3.1 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^1$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  按 10 的倍数系列稀释的 3 种阳性重组质粒等量混合后,用多重 PCR 方法进行共扩增,同时用 1.4 建立的单重 PCR 方法进行同步检测,以确定该方法的敏感性。

### 1.8 多重 PCR 重复性试验

以  $3.1 \times 10^7$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 3 种阳性重组质粒为模板,用优化好的多重 PCR 反应体系进行 3 次重复检测,验证其稳定性。

### 1.9 临床样品的检测

用所建立的多重 PCR 方法对分别采自新疆不同地区的 5 个牛场不同奶牛的抗凝全血、血清、流产胎儿及奶液等 172 份临床疑似布鲁菌感染(临床诊断表现流产、胎衣滞留、阴道炎、睾丸炎、附睾炎等症状)的样品进行检测,并对阳性样品 PCR 产物测序鉴定。

## 2 结果

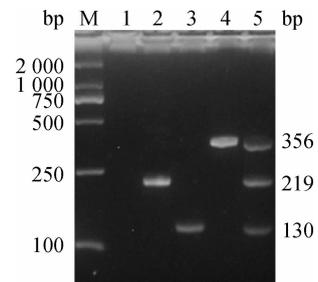
### 2.1 PCR 反应及优化结果

优化后的单重 PCR 反应条件:dNTP 浓度为  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Bp26*、23S rRNA 和 IS1111a 引物浓度均为  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶为  $1.0 \text{ U}$ ;扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$  45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,35 个循环;最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min。不同的反应管中分别扩增出大小为 219、356 和 130 bp 的电泳条带,与

理论相符。

优化后的多重 PCR 反应条件:dNTP 浓度为  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Bp26* 基因上下游引物浓度为  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 23S rRNA 基因上下游引物浓度为  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , IS1111a 基因上下游引物浓度为  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$   $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶  $1.25 \text{ U}$ ;扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$  45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,30 个循环;最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min。在同一反应管中分别扩增出大小为 219、356 和 130 bp 的电泳条带,与理论相符。

同一反应体系中,以 pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a 等浓度的阳性混合质粒为模板,用相应的引物分别进行常规单重 PCR 和多重 PCR 扩增,均得到各自的目的条带,且各引物对各自基因具有较好的特异性,见图 1。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. 阴性对照;2. *Bp26* 引物;3. IS1111a 引物;4. 23S rRNA 引物;5. 混合引物  
M. DL2000 DNA marker;1. Control;2. Primers for *Bp26*; 3. Primers for IS1111a; 4. Primers for 23S rRNA; 5. Primers mix

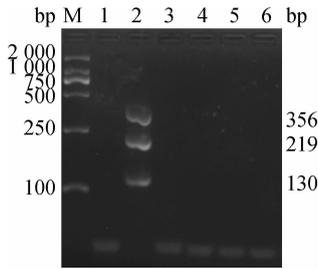
图 1 不同引物的特异性扩增结果

Fig. 1 Specific amplification of different primer pairs

### 2.2 多重 PCR 特异性试验

用本研究所建立的多重 PCR 方法对 pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a 3 种等浓度混合的阳性重组质粒进行共扩增,结果扩增出相应大小的目的片段,而对其它几种核酸品的扩增均未出现

任何条带,说明该方法具有较好的特异性,见图 2。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 阴性对照; 2. pMD-Bp26 + pMD-23S rRNA + pMD-IS1111a; 3. 大肠杆菌; 4. 沙门菌; 5. 李氏杆菌; 6. 结核杆菌

M. DL2000 DNA marker; 1. Control; 2. pMD-Bp26 + pMD-23S rRNA + pMD-IS1111a; 3. *E. coli*; 4. *Salmonella*; 5. *Listeria*; 6. *Tubercle bacillus*

图 2 多重 PCR 的特异性试验结果

Fig. 2 Specificity of multiplex PCR

### 2.3 多重 PCR 敏感性试验

用优化后的 PCR 反应条件分别对浓度为  $3.1 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^1$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  10 倍梯度稀释的 pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a 阳性重组质粒混合物进行共扩增,多重 PCR 方法对 3 种基因的最低检测限为  $3.1 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{反应}^{-1}$ 。单重 PCR 对每种基因的最低检测限均为  $3.1 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{反应}^{-1}$ ,说明该方法具有较高的敏感性,见图 3 (其中单重 PCR 检测以 pMD-Bp26 阳性质粒检测结果为例)。

### 2.4 多重 PCR 重复性试验

用所建立的多重 PCR 方法,以  $3.1 \times 10^7$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a 阳性重组质粒为模板,用优化好的多

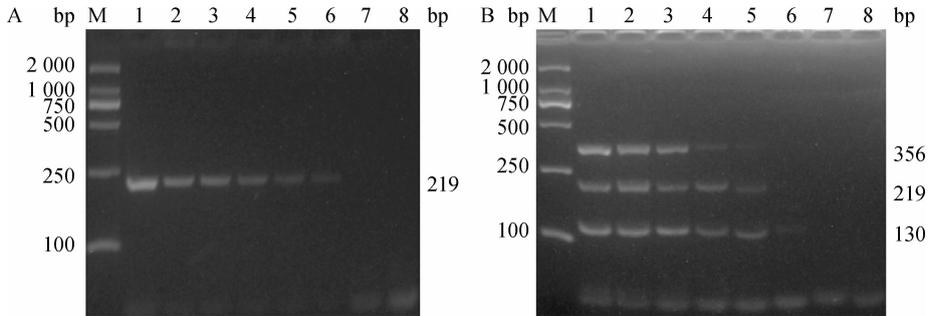


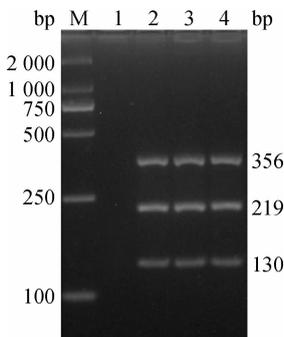
图 A. pMD-Bp26 阳性质粒;图 B. pMD-Bp26、pMD-23S rRNA 和 pMD-IS1111a 阳性混合质粒。M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~7.  $3.1 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^1$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  系列稀释的阳性质粒;8. 阴性对照

Fig. A. pMD-Bp26 positive plasmid; Fig. B. pMD-Bp26, pMD-23S rRNA and pMD-IS1111a positive mixed plasmids. M. DL2000 DNA marker; 1-7. Diluted from  $3.1 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^1$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  of three positive mixed plasmids; 8. Negative control

图 3 多重 PCR 的敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity of multiplex PCR

重 PCR 反应体系进行 3 次重复检测,均可扩增出特异片段(图 4),说明该方法具有较好的重复性和稳定性。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 阴性对照; 2~4. pMD-Bp26 + pMD-23S rRNA + pMD-IS1111a

M. DL2000 DNA marker; 1. Control; 2-4. pMD-Bp26 + pMD-23S rRNA + pMD-IS1111a

图 4 多重 PCR 重复性试验结果

Fig. 4 Repeatability of multiplex PCR

### 2.5 临床样品检测

用本研究所建立的多重 PCR 方法对 172 份临床样品进行检测,并同步进行常规 PCR 检测。结果显示,多重 PCR 方法检测到布鲁菌感染阳性样品 53 份,阳性检出率为 30.8%;鹦鹉热衣原体感染阳性样品 2 份,阳性检出率为 1.2%;贝纳氏柯克斯氏体感染阳性样品 10 份,阳性检出率为 5.8%;且检测到布鲁菌和鹦鹉热衣原体混合感染阳性样品 2 份,阳性检出率为 1.2%;布鲁菌和贝纳氏柯克斯氏体混合感染阳性样品 2 份,阳性检出率为 1.2%,尚未检测到 3 种病原混合感染的阳性样品。与常规 PCR 检测结果对比得知,本研究所建立的多重 PCR 方法对单一病原的阳性检出率与常规 PCR 检测结果一致,且阳性样品号码完全一致。临床样品检测结果见表 2。

表 2 不同牛场临床样品的检测结果

Table 2 Detection of clinical samples from different farms

方法 Method	项目 Items	样品名称(n) Samples(n)				
		全血(95) Bloods	血清(30) Serums	流产胎儿(19) Abortive fetuses	奶液(28) Milk	总计(172) Total
常规 PCR 检测 Conventional PCR tests	布鲁菌感染 <i>Brucella</i> infection	34	2	5	12	53
	鹦鹉热衣原体感染 <i>Chlamydia psittac</i> infection	2	0	0	0	2
	贝纳氏柯克斯氏体感染 <i>Coxiella burnetii</i> infection	5	1	4	0	10
多重 PCR 检测 Multiplex PCR tests	布鲁菌感染 <i>Brucella</i> infection	34	2	5	12	53
	鹦鹉热衣原体感染 <i>Chlamydia psittac</i> infection	2	0	0	0	2
	贝纳氏柯克斯氏体感染 <i>Coxiella burnetii</i> infection	5	1	4	0	10
	布鲁菌和鹦鹉热衣原体混合感染 <i>Brucella</i> and <i>Chlamydia psittac</i> co-infection	2	0	0	0	2
	布鲁菌和贝纳氏柯克斯氏体混合感染 <i>Brucella</i> and <i>Coxiella burnetii</i> co-infection	1	0	1	0	2
	3 种病原混合感染 Three pathogens co-infection	0	0	0	0	0

将部分阳性样品 PCR 产物送测序,并用 DNASTar 分子生物学软件分析,结果得知,所测得的序列分别与这 3 种病原阳性对照已知序列的相似性在 99.0% 以上,与表 2 PCR 检测结果相吻合。

### 3 讨论

布鲁菌病、衣原体病和 Q 热均属于人畜共患疾病,给畜牧业生产和人类健康造成很大的损失和潜在威胁,高效、快速、灵敏的检测方法,对于这些疫病的有效防控至关重要。本研究在单重 PCR 的基础上,通过特异性基因的选择和引物设计,经反应条件的优化,建立了针对这 3 种病原的多重 PCR 检测方法。目前,国内外尚未见同类报道。

目的基因的筛选对多重 PCR 检测尤其重要。*Bp26* 基因是布鲁菌属诊断抗原基因,在牛、绵羊、山羊和人类的布鲁菌感染中都可以检测到<sup>[10]</sup>。衣

原体 23S rRNA 基因序列具有很高的同源性,不同株间的 23S rRNA 基因差异 < 10%,鹦鹉热衣原体 23S rRNA 完整序列相似性  $\geq 95\%$ <sup>[11]</sup>。*IS1111a* 基因为贝纳氏柯克斯氏体的保守基因,其在不同分离株的基因组中拷贝数有所不同,最大可达每个基因组约 100 个拷贝<sup>[12]</sup>。本研究选择 *Bp26*、23S rRNA 和 *IS1111a* 3 基因作为研究对象,经 Blast 比对分析得知,3 基因高度特异,彼此不具有同源性,分别在其保守区设计特异性引物,能够保证本研究所建立的多重 PCR 方法的准确性和特异性。

多重 PCR 反应体系中,引物设计至关重要,合适的引物既能增加多重 PCR 的特异性又能增加其敏感性<sup>[13]</sup>。为提高引物的有效性和利用率,本研究在设计时,使每条引物的长度均保持在 18~20 bp,引物之间几乎不存在交叉反应,且具有相近的退火温度,扩增所得到的 3 种目的片段的长度相差均大

于 90 bp。通过固定反应体系中其它参数,对这 3 对引物的浓度进行不同比例的调整、组合,结果显示,当 *Bp26*、23S rRNA 和 *IS1111a* 3 基因的引物浓度之比为 1:1:2 时,具有较高的扩增效率。

PCR 体系中  $Mg^{2+}$ 、dNTP 和 *Taq* DNA 聚合酶等浓度对于其扩增效率的提高具有非常重要的作用<sup>[14]</sup>。为获得最优的多重 PCR 反应条件,本研究将 3 对引物看作一个整体,对 25  $\mu$ L 反应体系中的  $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶和循环数等作了系列优化,最终确定其浓度分别为 1.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、2.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、1.25 U,循环数为 30。本研究所建立的多重 PCR 检测方法对 3 种基因的最低检测限仅比常规 PCR 低 10 倍,且具有较好的特异性和可重复性,并进一步缩短了检测所需时间。利用该方法对临床样品进行检测,对于上述 3 种疫病,均检测到了阳性样品,且对部分样品经测序确认,也证明了该方法的准确性。

本研究所建立多重 PCR 方法的检测最低限低于常规 PCR,而临床样品的检测结果完全一致,分析原因:①在实际检测过程中,从临床样品中提取到的阳性核酸的浓度较高,高于最低检测限对应的模板浓度理论值;②临床样品中可能存在着大量复杂的未知成分,或是样品处理过程中,一些物质的残留影响了不同 PCR 方法尤其是多重 PCR 对样品检测的准确度。

## 4 结 论

以布鲁菌 *Bp26* 基因、鸚鵡热衣原体 23S rRNA 基因和贝纳氏柯克斯氏体 *IS1111a* 基因为研究对象,通过引物设计和反应条件优化,建立了能够同时检测奶牛布鲁菌、鸚鵡热衣原体和贝纳氏柯克斯氏体的多重 PCR 方法。该方法具有较好的灵敏度、特异性和可重复性,通过对 172 份临床样品进行应用检测,表明该方法可以用来对上述病原进行同步、快速、灵敏、准确检测,能够较好满足进出境检验检疫工作的需要。

## 参考文献:

[1] 姜东堡,高明春,曹涤非,等. 流产布鲁菌 BP26 蛋白 B 细胞线性表位的鉴定[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(9):1444-1448.

- [2] 李翠蓉. 奶牛衣原体和布鲁氏菌混合感染的诊断[J]. 山东畜牧兽医,2011,5(32):9-10.
- [3] 徐丽丽,贾广乐,张 映,等. Q 热血清学检测方法的研究进展[J]. 中国兽医学报,2012,39(8):83-86.
- [4] NAKOUNÉ E, DEBAERE O, KOUMANDA-KO-TOGNE F, et al. Serological surveillance of brucellosis and Q fever in cattle in the Central African Republic[J]. *Acta Trop*, 2004,92(2):147-151.
- [5] 俞树荣. 中国 Q 热研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2000,21(6):456-459.
- [6] WANG S M, LIU C C. Enterovirus71: epidemiology, pathogenesis and management[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009,7(6):735-742.
- [7] GUPTA V K, DEEPAK K V, ROUT P K, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Brucella melitensis* in goat milk [J]. *Small Ruminant Res*, 2006,65(1-2):79-84.
- [8] WILSON K, SAMMIN D, HARMEYER S, et al. Seroprevalence of chlamydial infection in cattle in Ireland[J]. *Vet J*, 2012,193(2):583-585.
- [9] NATALE A, BUCCI G, CAPELLO K, et al. Old and new diagnostic approaches for Q fever diagnosis: correlation among serological (CFT, ELISA) and molecular analyses [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012,35(4):375-379.
- [10] SECO-MEDIAVILLA P, VERGER J M, GRAYON M, et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003,10(4):647-651.
- [11] 邱昌庆. 衣原体分类研究进展[J]. 中国兽医科技, 2000,30(12):19-21.
- [12] TILBURG J J, MELCHERS W J, PETERSSON A M, et al. Interlaboratory evaluation of different extraction and Real-Time PCR methods for detection of *Coxiella burnetii* DNA in serum[J]. *J Clin Microbiol*, 2010,48(11):3923-3927.
- [13] 曹洪志,颜其贵,郭万柱,等. 多重 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫,2007,24(1):45-48.
- [14] MIRNEJAD R, DOUST R H, KACHUEI R, et al. Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012,5(1):24-28.