

# 7 种鼠传病原体多重 PCR 检测方法的建立与应用

康央<sup>1,2</sup>, 宋秀平<sup>1</sup>, 张燕君<sup>2</sup>, 刘起勇<sup>1</sup>, 栗冬梅<sup>1</sup>

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室, 传染病预防控制国家重点实验室, 感染性疾病诊治协同创新中心, 北京 102206; 2 山东大学生命科学学院, 山东 青岛 266237

**摘要:** 目的 应用 QIAxcel 毛细管电泳系统建立一种能够同时检测 7 种鼠传病原体的多重 PCR 检测方法。方法 应用微生物数据分析云平台 (<https://analysis.mypathogen.org/>) 中“special marker gene” workflow, 筛选恙虫病东方体、嗜吞噬细胞无形体、莫氏立克次体、土拉弗朗西斯菌、贝氏柯克斯体、问号钩端螺旋体和巴尔通体特异基因, 据此设计引物。根据温度转换 PCR 原理构建特异性嵌合引物, 建立多重 PCR 反应体系, 应用 QIAxcel 毛细管电泳系统对扩增产物进行检测, 评价该体系灵敏度、特异性和可重复性。通过对模拟样品和野外样品进行检测, 评价该方法对样品的检测能力。**结果** 特异性检测显示, 每种病原体扩增均只出现单一目的条带, 无交叉反应; 多引物单模板灵敏度检测限为 11~76 拷贝/ $\mu\text{l}$ , 多引物多模板灵敏度检测限为 20~200 拷贝/ $\mu\text{l}$ 。经样品检测显示, 多重 PCR 法检测能力与单重实时荧光定量 PCR 法相当, 优于普通单重 PCR 法。**结论** 运用 QIAxcel 毛细管电泳系统成功建立鼠传病原体多重 PCR 检测方法, 可同时高效、快速检出 7 种病原体, 为相关鼠传疾病的诊断、监测和流行病学调查提供有效手段。

**关键词:** 鼠传病原体; 多重 PCR; 毛细管电泳; 温度转换 PCR; 人兽共患病

中图分类号: R37 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)05-0487-07

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.05.002

## Establishment and application of a multiplex PCR detection method for seven rodent-borne pathogens

KANG Yang<sup>1,2</sup>, SONG Xiu-ping<sup>1</sup>, ZHANG Yan-jun<sup>2</sup>, LIU Qi-yong<sup>1</sup>, LI Dong-mei<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 School of Life Sciences Shandong University

Corresponding authors: LI Dong-mei, Email: lidongmei@icdc.cn; LIU Qi-yong, Email: liuqiyoung@icdc.cn

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2017ZX10303404)

**Abstract: Objective** To establish a multiplex PCR detection method for simultaneous detection of seven rodent-borne pathogens based on the QIAxcel capillary electrophoresis system. **Methods** The “special marker gene” workflow in Microbial Data Analysis Cloud Platform (<https://analysis.mypathogen.org/>) was used to screen out the specific genes of *Orientia tsutsugamushi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia typhi*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans*, and *Bartonella*, and specific primers were designed based on such results. Specific chimeric primers were constructed based on temperature-switch PCR, and a multiplex PCR method was established. The QIAxcel capillary electrophoresis system was used for the detection of amplification products, and the sensitivity, specificity, and repeatability of this method were evaluated. Simulated samples and field samples were tested to evaluate the detection capability of this method. **Results** Specificity tests showed that each pathogen had a single target band without cross reaction. The sensitivity detection limit of multi-primer single template was within the range of 11–76 copies/ $\mu\text{l}$ , and the sensitivity detection limit of multi-primer multiple templates was within the range of 20–200 copies/ $\mu\text{l}$ . Sample detection showed that the multiplex PCR detection method was comparable to the single quantitative real-time PCR method and was better than the simplex PCR method. **Conclusion** A multiplex PCR detection method is successfully established based on the QIAxcel capillary electrophoresis system, and this highly efficient and rapid method can detect seven rodent-borne pathogens simultaneously, which provides an effective mean for the diagnosis, monitoring, and epidemiological investigation of rodent-borne diseases.

**Key words:** Rodent-borne pathogen; Multiplex PCR; Capillary electrophoresis; Temperature-switch PCR; Zoonosis

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10303404)

作者简介: 康央, 女, 硕士, 从事鼠传病原体检测工作, Email: kangyangky@163.com

通信作者: 栗冬梅, Email: lidongmei@icdc.cn; 刘起勇, Email: liuqiyoung@icdc.cn

网络出版时间: 2019-08-07 10:51 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

鼠传疾病是由啮齿动物和其携带的寄生虫传播而引起的危害人畜健康的重要传染病。鼠形动物能引起多种传染病,病死率高,在世界范围内多次暴发流行,死亡人数高达千万计。近年来,随着全球化进程加快,人类活动增强,鼠传疾病流行区域不断扩大,出现多种新发鼠传疾病及复燃的老传染病<sup>[1-3]</sup>,由嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*, Ap)和巴尔通体(*Bartonella*, Bar)引起的传染病是我国新发传染病,由恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, Ot)、莫氏立克次体(*Rickettsia typhi*, Rt)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*, Ft)、贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*, Cb)和问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*, Lep)引起的传染病是我国再发传染病,新发、再发传染病均有着传播速度快,散播面积广,危害性大的特点,其中Lep引起的钩端螺旋体(钩体)病和Rt引起的地方性斑疹伤寒是我国法定传染病,多年来一直困扰我国居民的健康,由Cb引发的Q热疫区遍布全球各大洲,是分布最广的人兽共患病之一<sup>[4]</sup>。

及时准确地检测和监测宿主及传播媒介携带的病原体是预防控制鼠传疾病的前哨工作之一。传统的分离培养法、血清学检测法等存在检测周期长、操作通量小和灵敏度较低等问题,目前,以核酸分子扩增技术为基础的一系列PCR技术和核酸分子杂交技术等可以实现高通量检测,但多重PCR技术(multiplex PCR, mPCR)和多重探针实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)技术存在不同程度的分辨率低、检测种类数少等缺点。基因芯片法和高通量测序能够高通量、高灵敏度地检测病原体,但费用昂贵,数据处理专业性强,目前尚难以推广使用。本研究应用微生物数据分析云平台(<https://analysis.mypathogen.org/>)筛选特异核酸分子检测标识设计引物,建立多重PCR反应体系,利用QIAxcel毛细管电泳系统敏感、分辨率高的优势,观察扩增产物,建立一种高效、快速、简便的多重鼠传病原体检测方法。

## 1 材料与方法

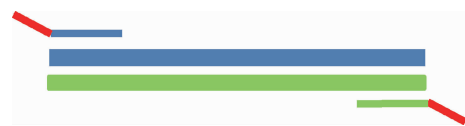
**1.1 核酸模板和质粒标准品** 各阳性菌株核酸包括Ot、Ap、Ft、Rt、Cb和Lep,巴尔通体属选取*B. clarridgeiae*(Bc)、*B. doshiae*(Bd)、*B. elizabethae*(Be)、*B. grahamii*(Bg)、*B. henselae*(Bh)、*B. koehlerae*(Bk)、*B. quintana*(Bq)和*B. tribocorum*(Bt)。非特异性核酸包括牛种布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、长角血蜱

(*Haemaphysalis longicornis*)、猫蚤(*Meerkat*)和人核酸,上述材料均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所保存。以特异性引物扩增序列为目的序列,将其与克隆载体连接制备成质粒标准品。

**1.2 主要仪器与试剂** QIAxcel毛细管电泳仪(德国QIAGEN),梯度PCR仪(德国Sensoquest),实时荧光定量PCR仪CFX96(美国Bio Rad)。

Platinum multiplex PCR master mix(美国Applied Biosystems), Size Marker 25~500 bp、Alignment Marker 15~600 bp和毛细管电泳卡夹QIAxcel DNA high resolution kit(德国QIAGEN)。本实验所用引物、探针由北京擎科生物有限公司合成。**1.3 特异基因筛选和引物设计** 在微生物数据分析云平台上传目标菌基因组序列、对比菌(与目标菌分类学相近的菌)基因组序列和目标菌的基因编码序列(coding sequences, CDS),选择“special marker gene”工作流运行,即可得到目标菌特异基因。根据特异基因序列在Primer premiers 5软件上设计目标菌特异性引物。

从拟南芥基因组中选取一段非同源性序列设计通用引物,正向引物GF为5'-TTCTTCCGCCTGATT-3',反向引物GR为5'-TGTTGGCATTCTCGT-3',分别加在目标菌特异性引物正反向5'端构成特异性嵌合引物(specific chimeric primers, SCPs)(图1)。



注:红色表示通用引物,蓝、绿色细线为目标菌特异性引物,红和蓝(红和绿)整体为特异性嵌合引物

图1 特异性嵌合引物

Figure 1 Specific chimeric primers

本研究建立的mPCR方法根据温度转换PCR(temperature switch PCR, TSP)原理<sup>[4]</sup>,在特异性引物5'端加一段通用引物,构成特异性嵌合引物SCPs。在mPCR反应体系中,含有1对通用引物及7对SCPs,根据退火温度不同反应分为3个反应阶段,第1阶段退火温度为55.0~59.0℃,使靶基因特异性引物与模板结合引发扩增,第2阶段退火温度为66.5~71.5℃,使SCPs与模板结合引发扩增,第3阶段退火温度为43.5~48.5℃,使通用引物与模板结合引发扩增。通过设置反应体系中通用引物浓度为特异性嵌合引物的10倍,使整个PCR反应以通用引物为主导完成,避免了各病原体特异性引物间的扩增偏好性。

**1.4 mPCR体系的建立与优化** 单重PCR反应体系:特异性嵌合引物SCF、SCR各1 μl(1 μmol/L),通

用引物 GF、GR 各 1 μl (10 μmol/L), 2 × master mix 12.5 μl, DNA 模板 3 μl, ddH<sub>2</sub>O 5.5 μl。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 69 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 45 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min。设置温度梯度 PCR 优化各阶段引物退火温度, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。在单重 PCR 反应基础上, 依次增加引物, 提高 PCR 反应重数, 并优化引物浓度、延伸时间和循环数, 得到最优的 mPCR 体系。

1.5 mPCR 体系特异性检测 根据 1.4 部分优化结果配制反应体系, 以阳性菌株核酸和非特异性核酸为模板进行检测, 其中 Bar 选取 8 种常见的巴尔通体进行检测, QIAxcel 毛细管电泳检测扩增产物。

1.6 mPCR 体系灵敏度和重复性检测 根据拷贝数浓度换算公式: 拷贝数浓度 (copies/μl) = [DNA 浓度 (ng/μl) / (碱基数 × 660)] × 6.02 × 10<sup>23</sup>, 将质粒标准品按 10 倍比稀释至 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>5</sup> 拷贝/μl。多引物单模板灵敏度检测: 根据 1.4 部分优化结果配制反应体系, 以不同稀释度标准品为模板, 每个稀释度做 3 个重复,

琼脂糖凝胶电泳和 QIAxcel 毛细管电泳检测扩增产物, 并且非同日进行 3 次重复实验, 分析该体系的重复性。多引物多模板灵敏度检测: 根据最小公倍数计算法, 将各病原体的质粒标准品取一定量配制混合模板, 使各标准品在混合模板中拷贝数一致, 将混合模板按 10 倍系列稀释为 2 × 10<sup>0</sup> ~ 2 × 10<sup>5</sup> 拷贝/μl。检测方法与多引物单模板一致。

1.7 野外样品检测与分析 用 mPCR 法、已发表的单重常规 PCR 法 (简称常规 PCR 法)<sup>[5-9]</sup> 和单重 qPCR 法<sup>[10-16]</sup> 对 86 份野外鼠脾样品检测 7 种鼠传病原体, 常规 PCR 法和单重 qPCR 法的检测方法与文献 [5-16] 中记载一致。

1.8 统计学分析 对 mPCR 法和单重 qPCR 法进行方法一致性分析, 采用 Kappa 值检验。Kappa 值 = 1 为两结果完全一致, Kappa 值 ≥ 0.75 为一致性极好, 在 0.40 ~ 0.75 间为高度一致 (不包含 0.40 和 0.75), Kappa 值 ≤ 0.40 为一致性差。

## 2 结果

2.1 引物设计 根据微生物数据分析云平台筛选得到特异基因序列, 设计多重 PCR 反应体系引物组, 见表 1。

表 1 7 种鼠传病原体的引物序列

Table 1 Primer sequences of seven rodent-borne pathogens in this study

病原体	基因序号	特异性嵌合引物序列 (5' ~ 3')	产物大小 (bp)
Ot	AM494475.1	<u>TTCTTCCGCCTGATTGAGGTTGAAATGGTGCGAGAT</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTCACAAGGTTTATGCAATGGAC</u>	430
Rt	AE017197.1	<u>TTCTTCCGCCTGATTGGTGACAGGGCAAGGTTATG</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTCGATAAATGGCTCGGATTGTTT</u>	300
Ap	CP000235.1	<u>TTCTTCCGCCTGATTGGACGAATGTGCTGCTGG</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTACACCGTGCTCCCGATAACC</u>	328
Ft	AJ749949.2	<u>TTCTTCCGCCTGATTGCTTGGGACTGTGGTACTGGT</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTCATTAGGTTTAAGTATGCGTAGGC</u>	289
Cb	AE016828.3	<u>TTCTTCCGCCTGATTGGATTGGTTCATCCCT</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTGCCTTTGATTCTTGGTGCTT</u>	251
Lep	AE010300.2	<u>TTCTTCCGCCTGATTGTGGCGGAGCAATATGTAAT</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTCTTTCAATCTTCAGTGTCTGGAC</u>	185
Bar	BX897699.1	<u>TTCTTCCGCCTGATTGCAATGTATCTTCGCTCTACGG</u> <u>TGTTGGCATTCTCGTCGCATCATCAAACCTCACACC</u>	156

注: 下划线部分为通用引物, 非下划线部分为特异性引物; Ot. 恙虫病东方体; Rt. 莫氏立克次体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Ft. 土拉弗朗西斯菌; Cb. 贝氏柯克斯体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

2.2 mPCR 体系的建立 通过对反应条件与体系优化, 确定最优多重 PCR 反应体系: 混合引物 MF、MR 各 1 μl (1 μmol/L), GF 和 GR 各 1 μl (10 μmol/L), 2 × Master Mix 12.5 μl, 模板 3 μl, ddH<sub>2</sub>O 5.5 μl。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s, 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 69.5 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s, 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 45.5 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s, 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min (图 2)。其中混合引物

MF、MR 为 7 种目标菌的 SCPs 按比例混合配制, 使各引物在体系中的最适终浓度 Ap 和 Ft 为 30 nmol/L, Rt 为 40 nmol/L, Ot、Lep 和 Cb 均为 50 nmol/L, Bar 为 60 nmol/L。

2.3 mPCR 体系特异性与灵敏度检测 以阳性菌株核酸为模板进行 mPCR, QIAxcel 毛细管电泳检测产物显示每个反应均只出现单一特异性条带, 无交叉反应 (图 3)。其中巴尔通体属可检出 8 种常见巴尔通体 (图 4)。经毛细管电泳多次检测, 目的条带大

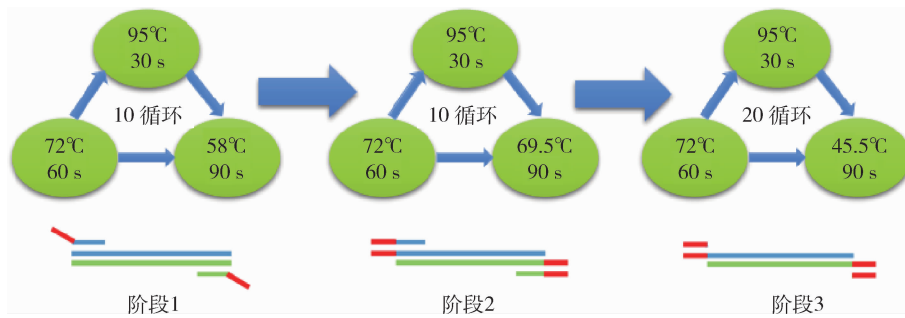
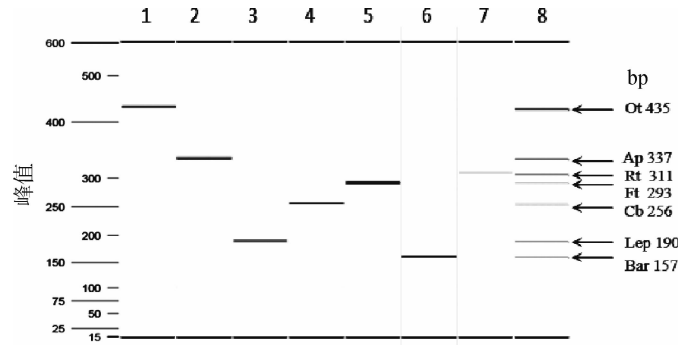


图 2 温度转换 PCR 扩增流程

Figure 2 Amplification process of temperature-switch PCR



注: 1~7. 分别为 Ot、Ap、Lep、Cb、Ft、Bar 和 Rt 病原体核酸; 8. 混合质粒标准品阳性对照; Ot. 恙虫病东方体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Rt. 莫氏立克次体; Ft. 土拉弗朗西斯菌; Cb. 贝氏柯克斯体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

图 3 引物特异性检测的毛细管电泳结果

Figure 3 Capillary electropherogram of primer specificity test



注: 1~8. 分别为 Be、Bd、Be、Bg、Bh、Bk、Bq 和 Bt; 9. 混合质粒标准品阳性对照; Ot. 恙虫病东方体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Rt. 莫氏立克次体; Ft. 土拉弗朗西斯菌; Cb. 贝氏柯克斯体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

图 4 巴尔通体引物特异性检测的毛细管电泳结果

Figure 4 Capillary electropherogram for the specificity test of the Bar primers

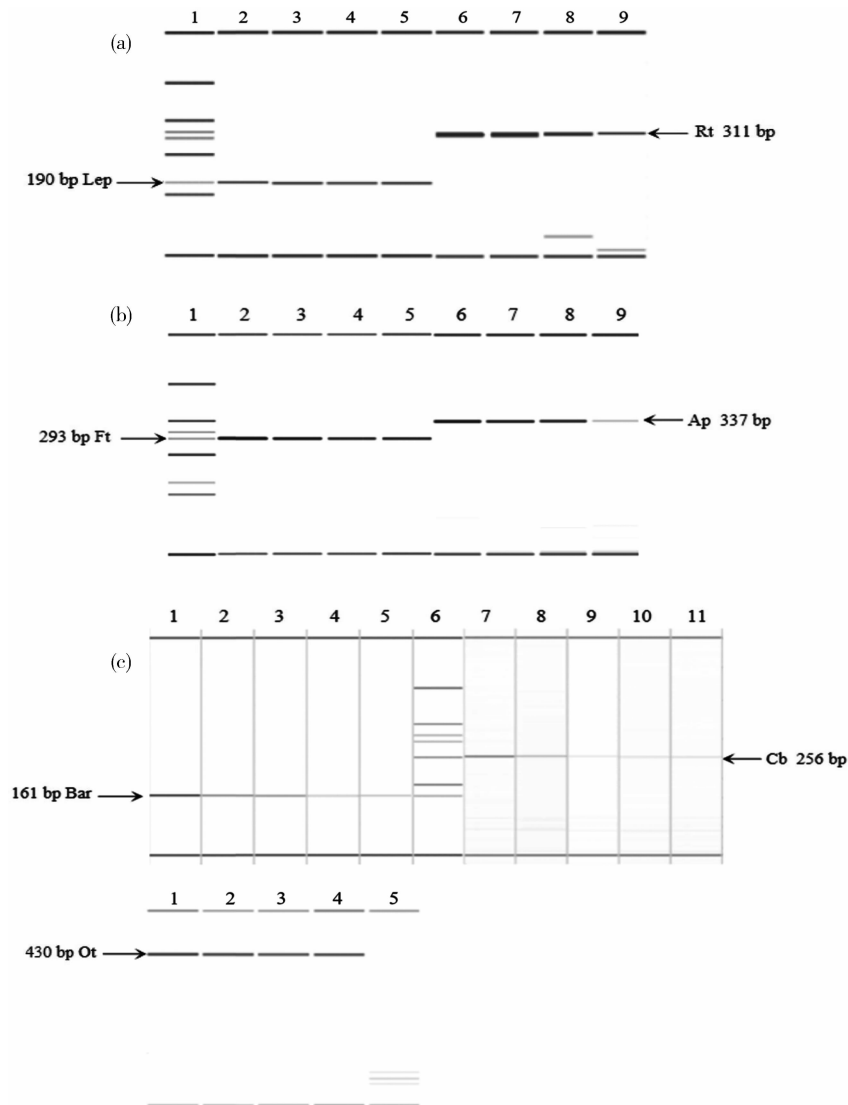
小: Bar 为 155~161 bp, Lep 为 185~191 bp, Cb 为 251~257 bp, Ft 为 287~293 bp, Rt 为 305~311 bp, Ap 为 331~337 bp, Ot 为 429~435 bp. 非特异性核酸均未扩增出目的条带。

多引物单模板灵敏度检测限显示, 琼脂糖凝胶电泳显示检测限分别为  $1.1 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Cb)、 $1.5 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Rt)、 $7.6 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Ap)、 $1.7 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Ot)、 $1.8 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Ft)、 $1.7 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Lep) 和  $1.6 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  (Bar), 检测限均在 76~180 拷贝/ $\mu\text{l}$  范围内; QIAxcel 毛细管电泳检测限分别为 Ap

检测限不变, 其余病原体检测限的质粒拷贝数浓度均降低 10 倍, 均在 11~76 拷贝/ $\mu\text{l}$  范围内 (图 5)。

多引物多模板灵敏度检测限显示, 琼脂糖凝胶电泳检测限为  $2 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$ , 可检测 6 种病原体 (由于 Rt 和 Ft 目的条带大小相近, 无法区分); QIAxcel 毛细管电泳检测限在  $2 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{l}$  可检测到 5 种病原体 (Rt、Ft、Cb、Lep 和 Bar), 在  $2 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  可检测到 7 种病原体 (图 6)。经多次重复检测, 实验结果保持一致。

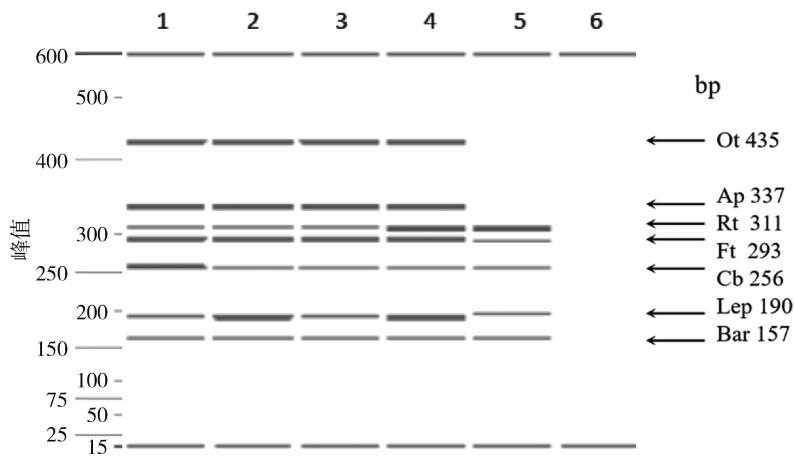
2.4 野外样品检测 采集北京市 86 只野外小型兽



注:(a)1. 混合质粒标准品阳性对照; 2~5. Lep模板浓度按10倍比稀释(下同)依次为 $1.7 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ; 6~9. Rt模板浓度依次为 $1.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ 。(b)1. 混合质粒标准品阳性对照; 2~5. Ft模板浓度依次为 $1.8 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ; 6~9. Ap模板浓度依次为 $7.6 \times 10^4 \sim 7.6 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ 。(c)1~5. Bar模板浓度依次为 $1.6 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ; 6. 混合质粒标准品阳性对照; 7~11. Cb模板浓度依次为 $1.1 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ 。(d)1~5. Ot模板浓度依次为 $1.7 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^0$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ; Ot. 恙虫病东方体; Rt. 莫氏立克次体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Ft. 土拉弗朗西斯菌; Cb. 贝氏柯克斯体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

图5 基于QIAxcel系统多引物单模板灵敏度检测结果

Figure 5 Sensitivity of multi-primer single template based on the QIAxcel system



注:1~5. 混合质粒模板浓度依次为 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^1$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ; 6. 空白对照; Ot. 恙虫病东方体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Rt. 莫氏立克次体; Ft. 土拉弗朗西斯菌; Cb. 贝氏柯克斯体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

图6 基于QIAxcel系统多引物多模板灵敏度检测结果

Figure 6 Sensitivity of multi-primer multiple templates based on the QIAxcel system

类,包括大林姬鼠 (*Apodemus peninsulae*) 3 只 (3.49%),褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 18 只 (20.93%),鼯鼠 (*Soricidae*) 1 只 (1.16%),北社鼠 (*Niviventer confucianus*) 35 只 (40.70%),小家鼠 (*Mus musculus*) 29 只 (33.72%)。用 mPCR 法、qPCR 法和常规 PCR 法对野外鼠脾样品检测,由表 2 可见,共 22 份阳性样品,均为单病原体感染。mPCR 法检出阳性 21 份 (24.42%),其中 18 份为 Bar 感染,2 份为 Lep 感染,1 份为 Ap 感染;qPCR 法检出阳性 21 份 (24.42%),其中 18 份为 Bar 感染,3 份为 Lep 感染;常规 PCR 法检出阳性 6 份 (6.98%),其中 5 份为 Bar 感染,1 份为 Lep 感染。

对 mPCR 法和 qPCR 法进行 Kappa 值一致性检验(表 3)。对于 Bar 检测,Kappa 值为 1.00,2 种方法检测结果完全一致;对于 Lep 检测,Kappa 值为 0.79,2 种方法检测结果一致性极好;对于 Ap 检测,mPCR 法检测到 1 份阳性样品,qPCR 法和常规 PCR 法未检测到阳性样品。

### 3 讨论

鼠形动物是许多病原体的自然宿主和传播媒介,可引起多种人兽共患病暴发流行,成为公共卫生安全巨大挑战和隐患。早在 20 世纪 50 年代,我国就建立了鼠传疾病的单病原体监测系统,对相关鼠传疾病进行系统的监测和早期预警。随着病原体变种日趋增加,监测任务日益加重,单病原体检测不仅费时费力,更不利于监测数据进行综合有效的分析。因此,急需多重病原体检测方法为鼠传疾病综合监

测和预防提供技术支持。

**表 2** 北京市野外小型兽类脾样品检测情况  
**Table 2** Testing results of spleen samples from small mammals in Beijing

样品名称	常规 PCR 法	多重 PCR 法	qPCR 法
PG4	-	Bar	Bar
PG8	-	Lep	Lep
HR1	Lep	-	Lep
MTG1	-	Bar	Bar
MTG2	-	Bar	Bar
MTG4	-	Bar	Bar
MTG5	-	Bar	Bar
MTG6	-	Bar	Bar
MTG7	-	Bar	Bar
MTG8	-	Bar	Bar
MTG9	-	Bar	Bar
MTG13	-	Bar	Bar
MTG15	-	Bar	Bar
MTG20	Bar	Bar	Bar
MTG21	-	Bar	Bar
MTG23	Bar	Bar	Bar
MTG24	Bar	Bar	Bar
MTG25	Bar	Bar	Bar
MTG28	Bar	Bar	Bar
MTG29	-	Bar	Bar
CY38	-	Lep	Lep
CY41	-	Ap	-
其余 64 份样品	-	-	-
总数(份)	86	86	86
阳性数(份)	6	21	21
阴性数(份)	80	65	65
检出率(%)	6.98	24.42	24.42

注:-. 检测结果为阴性; Ap. 嗜吞噬细胞无形体; Lep. 问号钩端螺旋体; Bar. 巴尔通体

**表 3** mPCR 法和 qPCR 法一致性检验  
**Table 3** The consistency test of mPCR and qPCR

病原体	检测样品数(份) (mPCR 法/qPCR 法)				灵敏度 [真阳性率(%)]	特异度 [真阴性率(%)]	预测值(%)		Kappa 值
	+/+	+/-	-/+	-/-			阳性	阴性	
Bar	18	0	0	68	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00
Lep	2	0	1	83	66.67	100.00	100.00	98.81	0.79
Ap	0	1	0	85	N	98.84	N	100.00	N

注:N. 算式分子为 0, 无值; +. 检测结果为阳性; -. 检测结果为阴性; Bar. 巴尔通体; Lep. 问号钩端螺旋体; Ap. 嗜吞噬细胞无形体

本研究反应特异性良好,多引物单模板灵敏度检测限在 11~76 拷贝/ $\mu$ l 范围内,多引物多模板在 20~200 拷贝/ $\mu$ l 范围内,均比同等条件下琼脂糖凝胶电泳检测灵敏度提高 10 倍。相比单模板灵敏度检测,Ot 和 Ap 多模板灵敏度检测限下降,原因可能是多模板检测时多组引物间存在相互抑制与竞争。与同类研究结果相比,Tokarz 等<sup>[17]</sup>利用多重 qPCR 法同时检测 5 种鼠传病原体,检测灵敏度可达 10 拷贝/反应。Melničáková 等<sup>[18]</sup>将 DNA 微阵列与 PCR 技术结合同时检测贝氏柯克斯体、立克次体和土拉弗朗西斯菌 3 种鼠传病原体,检测极限可达 1 拷贝/ $\mu$ l。

王旺等<sup>[19]</sup>运用 xMAP 悬浮芯片在单管中同时检测 9 种鼠传病原体,检测灵敏度高达 0.03 pg/反应,所以 mPCR 法和多重 qPCR 法检测灵敏度相当,略低于芯片类高通量检测灵敏度。但由于多重 qPCR 法受检病原体数有限,基因芯片法费用昂贵,且操作专业性强,难以推广使用。

通过对野外鼠脾样品检测显示,mPCR 法和 qPCR 法检测能力相当,优于常规 PCR 法,与之前研究结果一致<sup>[20]</sup>。且 mPCR 法和 qPCR 法检测 Bar 的能力完全一致;检测 Lep 时 2 种方法检测能力一致性高,但多重 PCR 法漏检 1 份 Lep 阳性样品,差异无统

计学意义;在检测 Ap 时只有 mPCR 法检测到 1 份阳性,其他 2 种方法均未检测到,由于 mPCR 法检测灵敏度高,暂定认为该样品为真阳性。86 份待检样品共检出阳性 22 份,均为单病原体感染。其中,Bar 感染率较高,提示该地区存在潜在的 Bar 感染风险,要引起适当关注,同时也提示本次所采集的主要鼠种北社鼠和小家鼠可能为巴尔通体的重要宿主<sup>[21]</sup>。

通过样品检测体现了 mPCR 法的检测优势:①灵敏度高,与单重 qPCR 法相当,优于常规 PCR 法;②检测速度快,以单次检测 96 份样品为例,平均每份样品只需约 3 min;③操作简便,使用预制胶卡,自动上样;④通量高,可同时检测 7 种病原体。该方法可实现在单管中灵敏、特异、快速自动化地检测 7 种鼠传病原体,为我国鼠传疾病的实验室检测和多病原体综合监测提供了技术支持。除此外,本研究尚存在一些不足,如 3~5 bp 的高分辨率需要限制扩增片段长度在 500 bp 以内,这是该方法本身的技术限制;目前对该方法检测能力的评估只研究了 3 种病原体,还需要通过对大量样品的检测进一步评估和完善。

#### 参考文献

- [1] 余向华,张孝和,倪庆翔,等.鼠传疾病流行病学研究进展[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(6):634-636,IV. DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2015.06.026.
- [2] Bordes F, Blasdel K, Morand S. Transmission ecology of rodent-borne diseases: new frontiers [J]. Integr Zool, 2015, 10(5): 424-435. DOI: 10.1111/1749-4877.12149.
- [3] Liu QY, Xu WB, Lu S, et al. Landscape of emerging and re-emerging infectious diseases in China: impact of ecology, climate, and behavior [J]. Front Med, 2018, 12(1): 3-22. DOI: 10.1007/s11684-017-0605-9.
- [4] Tabone T, Mather DE, Hayden MJ. Temperature switch PCR (TSP): robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 580. DOI: 10.1186/1471-2164-10-580.
- [5] Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction [J]. Am J Trop Med Hyg, 1996, 54(4): 364-366. DOI: 10.4269/ajtmh.1996.54.364.
- [6] 史永林,王誓闻,胡万富,等.安徽地区家畜嗜吞噬细胞无形体 16S rRNA 基因检测和序列分析[J].安徽预防医学杂志,2013,19(5):329-330,338.
- [7] Brenner DJ, O' Connor SP, Winkler HH, et al. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43(4): 777-786. DOI: 10.1099/00207713-43-4-777.
- [8] 中国疾病预防控制中心.恙虫病预防控制技术指南[Z].北京:中疾控疾发[2009]1号,2009.
- [9] 徐建国,阚飙,张建中,等.现场细菌学[M].北京:科学出版社,2011:556-627.
- [10] Diaz MH, Bai Y, Malania L, et al. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(5): 1645-1649. DOI: 10.1128/JCM.06621-11.
- [11] 付秀萍,贺金荣,张景山,等. TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体方法的建立 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(2): 108-110.
- [12] 杨晓,陈梅玲,温博海,等.实时荧光定量 PCR 检测莫氏立克次体 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(10): 1054-1056. DOI: 10.3321/j.issn:0577-7402.2007.10.016.
- [13] 张晶波,温博海,陈梅玲,等.荧光定量 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4): 289-293. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2006.04.001.
- [14] 史清海,曲识,周冬生,等.应用 TaqMan 荧光定量 PCR 检测土拉弗朗西斯菌 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(6): 806-809.
- [15] 张翠彩,李秀文,聂一新,等.致病性钩端螺旋体 TaqMan Real-time PCR 检测技术的建立及其应用 [J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(10): 1018-1021. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.015.
- [16] 亚红祥,赫兢,张丽娟,等.贝氏柯克斯体实时荧光定量 PCR 方法的建立及对云南鼠标本检测 [J]. 传染病信息, 2009, 22(6): 345-347, 350. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2009.06.007.
- [17] Tokarz R, Tagliaferro T, Cucura DM, et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, and Powassan virus in ticks by a multiplex real-time reverse transcription-PCR assay [J]. mSphere, 2017, 2(2): e00151-17. DOI: 10.1128/mSphere.00151-17.
- [18] Melničáková J, Derdáková M, Barák I. A system to simultaneously detect tick-borne pathogens based on the variability of the 16S ribosomal genes [J]. Parasit Vectors, 2013, 6: 269. DOI: 10.1186/1756-3305-6-269.
- [19] 王旺,杨宇,王静,等.9种蜱媒病原体 xMAP 悬浮芯片高通量检测方法的建立 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(5): 397-401. DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2013.05.005.
- [20] 李瑾.基于两种毛细管电泳系统检测呼吸道病毒的多重 PCR 技术的建立及应用 [D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2012.
- [21] 李龙建,曹殿起,刘英,等.北京市门头沟区小型兽类群落构成及鼠疫监测 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(3): 267-269.

收稿日期:2019-06-20 (编辑:陈秀丽)