

徐恩红, 祁明普, 项志杰, 等. 牛呼吸疾病综合征七病原联合检测多重qPCR方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 38-47.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.006

牛呼吸疾病综合征七病原联合检测多重 qPCR方法的建立

徐恩红^{1,2,3}, 祁明普^{1,2,3}, 项志杰^{1,2,3}, 胡长敏²,
陈颖钰^{1,2,3}, 陈建国², 陈曦², 郭爱珍^{1,2,3,4}

1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;
2. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070; 3. 湖北洪山实验室, 武汉 430070;
4. 湖北省兽医流行病学国际科技合作基地/农业农村部兽用诊断制剂创制重点实验室/
农业农村部反刍动物生物制品重点实验室, 武汉 430070

摘要 为了提高牛呼吸疾病综合征多病原混合感染的临床诊断效率, 以牛支原体(*Mycoplasma bovis*, *M.b*) oppD/F 基因、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, *P.m*) ompH 基因、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, *M.h*) gcp 基因、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) gB 基因、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)以及牛副流感病毒(bovine parainfluenza virus type, BPIV) 3型a和c基因型(BPIV-3a, -3c)的N基因等为检测靶标, 分别设计特异性引物和Taqman探针, 通过优化反应条件, 采用3管7联的组合方式建立了7种病原体的多联实时荧光定量PCR检测方法。结果显示, 该方法仅对本试验的7种病原有特异性反应, 与其他常见病原无交叉反应。对*M.b*、*P.m*、*M.h*、IBRV、BRSV、BPIV-3a和BPIV-3c质粒标准品的最低检测限分别为 10^2 、 10^2 、 10^1 、 10^2 、 10^2 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μ L。组内变异系数小于2.5%, 组间变异系数小于5.5%。平行应用该方法和常规PCR方法对临床采集的115份有呼吸道症状牛的鼻拭子进行检测, *P.m*阳性率36.65%, *M.b*阳性率27.83%, *M.h*阳性率25.22%, IBRV阳性率11.30%, BPIV-3c阳性率8.57%, BRSV阳性率0.95%; 其中混合感染率为26.1%。共检测到11种混合感染模式, 主要由*M.b*与其他病原体的混合感染, 占72.7%(8/11); *M.b*/*P.m*混合感染的检出率最高, 占60%(18/30); *M.b*、*P.m*、*M.h*在混合感染中出现率排前三, 其占比分别为73.3%(22/30)、73.3%(22/30)和43.3%(13/30); 其次为IBRV, 占26.7%(8/30); BPIV-3c占13.3%(4/30)。以上结果表明, 该方法具有较高的分析敏感性和特异性, 可用于牛呼吸疾病综合征多病原感染的联合检测。

关键词 多联实时荧光定量PCR方法; 牛呼吸疾病综合征; 混合感染; 牛支原体; 多杀性巴氏杆菌; 牛溶血性曼氏杆菌; 多病原联合检测

中图分类号 S852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0038-10

牛呼吸疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC 或 BRD)是由牛支原体等多种病原体联合作用、环境应激因素诱导下所发生的、以牛支气管肺炎为主要症状的一种牛常见传染病的总称。BRD在世界各地广泛流行, 各品种和年龄阶段的牛均可发生, 随着现代牛业集约化和专门化模式的发展而呈上升趋势, 如长途运输、转群、气候变化、分娩

等环境应激因素是该病常见的诱发因素^[1]。BRD可四季发生, 典型症状主要为发热、精神沉郁、呼吸困难、咳嗽、眼分泌物增多、流涎等, 急性型病例甚至出现忽然倒地, 口鼻流出泡沫状液体并快速死亡^[2]。BRD发生后可能造成永久性肺损伤, 使患牛生长缓慢, 更容易受到随后的环境应激因素而复发, 从而降低养殖场的经济效益^[3]。

收稿日期: 2022-11-01

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEF02028); 国家现代农业产业技术体系(肉牛/牦牛)专项(CARS-37); 湖北省重点研发计划项目(2020BBA055)

徐恩红, E-mail: xeh0311@163.com

通信作者: 郭爱珍, E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

有数据显示,在美国的肉牛养殖场中,70%~80%的牛发病与BRD有关,同时BRD致死牛占总数的40%~50%,导致美国每年损失超过5亿美元^[4]。在日本,农林部2014年报告的统计数字表明,呼吸系统疾病占牛病的23%^[5]。BRD也给我国养牛业带来重大损失,主要发生在初生犊牛、断奶转群牛和经历长途运输的新引进牛,但具体损失无准确数据。因为病因复杂,诊断、治疗和预防该病的措施有限,该病尚未得到有效控制^[6]。鉴于早期、快速和准确的诊断是有效控制该病的前提,且目前已报道的检测方法存在检测病原数量少和操作复杂等问题^[7-10],本研究针对BRD最常见的7种病原体包括牛支原体(*Mycoplasma bovis*, *M. b*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, *P. m*)、牛溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, *M. h*)、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)、牛副流感病毒3型a基因型(bovine parainfluenza virus type 3a, BPIV-3a)和c基因型(BPIV-3c),建立一种能够同时检测以上7种病原的荧光定量PCR检测方法,以期为临床诊断BRD提供一种敏感、特异、多联、快速的病原学检测方法,为早期确诊BRD,实施精准治疗和防控方案、提高养殖效益,以及有效开展BRD病原学和流行病学监测研究等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原体、质粒及临床样品

1)病原体。牛支原体、多杀性巴氏杆菌(A型、B型、D型、F型)、牛溶血性曼氏杆菌(A1型和A6型)、

牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛副流感病毒3a基因型、牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、沙门氏菌、摩氏摩根菌、大肠杆菌、昏睡嗜组织杆菌(旧称为昏睡嗜血杆菌)、不动杆菌、肺炎克雷伯氏菌、无乳支原体、猪链球菌、副猪嗜血杆菌、乳房链球菌、停乳支原体、猪伪狂犬病毒等病原体均由笔者所在实验室分离保存,使用前均经PCR和测序鉴定正确。

2)牛溶血性曼氏杆菌重组质粒。参照文献[11]制作重组质粒,其步骤简述如下:以牛溶血性曼氏杆菌阳性核酸为模板,进行目的基因PCR扩增及产物纯化回收,回收产物与pMD19-T载体连接,转化至DH5α感受态细胞培养,通过蓝白斑筛选,挑取单克隆白色菌落进行PCR鉴定,检测阳性的菌落送北京擎科生物公司测序。通过序列比对,测序结果与克隆基因目的片段完全一致的阳性克隆接种至Amp*LB液体培养基,提取质粒。根据计算公式:质粒拷贝数=[$6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒质量浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}$]/(质粒碱基数 $\times 660$),进行质粒拷贝数浓度换算,-20℃保存备用,作为荧光定量PCR的标准品。

牛支原体、多杀性巴氏杆菌、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛副流感病毒3a和3c基因型的重组质粒均由北京擎科生物技术有限公司构建合成并完成鉴定(表1)。

3)临床样品。115份牛鼻拭子均采集自2021—2022年间,华中地区不同牛场发生牛呼吸道疾病的病牛。经常规PCR检测,58份样品为病原阳性。

表1 BRD 7种病原重组质粒信息
Table 1 Recombinant plasmids of seven BRD pathogens

病原 Pathogens	基因登录号 Accession number	靶基因 Target genes	载体 Vectors	插入片段大小(bp)及在靶基因中位置(nt) Insert fragment size and position
<i>M. b</i>	CP042939.1	OPPD\F	pMD18T	191(66~256)
<i>P. m</i>	CP033600.1	ompH	pMD18T	183(329~511)
<i>M. h</i>	CP017484.1	GCP	pMD18T	171(247~417)
IBRV	MG407785.1	gB	pMD18T	118(1 486~1 603)
BRSV	AF054664.1	N	pMD18T	149(585~733)
BPIV-3a	MH552577.1	N	pMD18T	153(1 322~1 474)
BPIV-3c	LC040886.1	N	pUC57	1548(1~1 548)

1.2 主要试剂

核酸染料 Gel-red、50 bp DNA Ladder、DL 2000 DNA Marker、2×Taq Master Mix、2×T5 Fast qPCR Mix(Probe)为北京擎科生物技术有限公司产品;PrimeSTAR Max DNA Polymerase 为宝日医生物技

术(北京)有限公司(TaKaRa 中国)产品;HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒、Virus DNA/RNA Extraction Kit 2.0(Prepackaged)核酸提取试剂盒为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品,质粒小提试剂盒为OMEGA公司产品,凝胶回收

试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品。琼脂粉、氨苄青霉素为Ameresco公司产品;NaCl为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 引物探针设计与合成

从GenBank中批量下载*M.b.*、*P.m.*、*M.h.*、IBRV、BRSV和BPIV-3的基因组序列,用MEGA7进行序列比对,挑选序列多样性低的区域,作为目的扩增区域。此外,根据核酸相似性,挑选能代表该病原多数基因的序列作为参考序列。经序列比对,发现BPIV-3不同基因型间的核酸相似性低,无法满足引物和探针的设计,因此挑选在中国流行较多的BPIV-3a和BPIV-3c的基因序列,分别进行序列比对及引物和探针的设计。最终,以*M.b.*(CP042939)、*P.m.*(CP033600)、*M.h.*(CP017484)、IBRV(MG407785)、BRSV(AF054664)、BPIV-3a(MH552577)和BPIV-3c(LC040886)作为参考序列,设计7种病原的特异性引物及相应的TaqMan探针(表2),用于扩增*M.b.*的oppD/F基因,*M.h.*的GCP基因,*P.m.*的ompH基因,IBRV的gB基因,BRSV、BPIV-3a和BPIV-3c的N基因。引物探针均由北京擎科生物技术有限公司合成。

1.4 反应条件的优化及标准曲线的建立

本研究所涉及的7种病原均以10⁶ copies/μL质粒DNA为模板,采用控制变量法,对引物浓度1~4.5 pmol/μL,探针浓度0.5~4.0 pmol/μL,退火温度57~64 ℃,各分为8个梯度进行优化,以Ct值大小、荧光信号高低和扩增曲线变化为依据,确定最佳的反应条件。

1.5 特异性试验

提取牛常见病原体包括昏睡嗜组织杆菌、摩氏摩根菌、停乳链球菌、无乳支原体、猪链球菌、副猪嗜血杆菌、伪狂犬病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛副流感病毒3a型、牛副流感病毒3c型、牛呼吸道合胞体病毒、牛传染性鼻气管炎病毒DNA或cDNA,并以此为模板,双蒸水为阴性对照,采用优化后的最佳反应体系条件,进行多联qPCR体系检测方法的特异性分析,本研究所涉及的7种特定病原的核酸用作阳性对照。

1.6 敏感性试验

将本研究所涉及的7种病原的质粒DNA进行10倍系列稀释,以不同浓度的质粒DNA为模板,分别将7种病原质粒DNA加入对应多重体系中,按照优化后的最佳反应体系条件,在相同条件下进行qPCR扩增,双蒸水为阴性对照进行质粒的敏感性分析。

表2 用于BRD 7种病原qPCR扩增的引物探针
Table 2 Primers and probes of each BRD pathogen for qPCR amplification

引物名称 Primer names	序列 5'→3' Sequences 5'→3'	产物大小/bp Product size
<i>M.b.</i> -F	TCGCATAACATTAGTGTGTCG	145
<i>M.b.</i> -R	TCTGGTGGGGTTCCTTGA	
<i>M.b.</i> -P	FAM-CTCATCATCATTTTCAGG-TATAGCCGAGAT-BHQ1	
<i>P.m.</i> -F	GCGAGCAAGAAGCGATCA	183
<i>P.m.</i> -R	CGACTGCACCTTCATTCACTAG	
<i>P.m.</i> -P	Texas Red-TACCGCGTTTGAAT-GCTATCCACT-BHQ2	
<i>M.h.</i> -F	TTGCTCTAACGCTCGCTTG	171
<i>M.h.</i> -R	GGACTGGATTTCACTTTCTCC	
<i>M.h.</i> -P	HEX-CCAACAAGCCGTGGTT-GATACTATTTT-BHQ1	
IBRV-F	AGCACCTTTGTGGACCTAA	118
IBRV-R	GCTGTATCTCGCTGTAGTCG	
IBRV-P	CY5-CCGCGAGTTCTTGCCGC-TAGAAGTGT-BHQ2	
BRSV-F	ACGATACAAAGGACTTATCCCA	149
BRSV-R	CTGCAAAGATTCCTTCTACCC	
BRSV-P	CY5.5-ATTTTGGCATTGCT-CAATCCTCAAC-BHQ2	
BPIV-3a-F	CATCCATAGTTTCTTATGCATG	153
BPIV-3a-R	TTGGGTCGCTCTGTTTCC	
BPIV-3a-P	Texas Red-CGTTGAGTCTTTT-GTTCAGCCTGTCTCT-BHQ2	
BPIV-3c-F	ACAGTATGTAACAGGACGGTCC	126
BPIV-3c-R	GCCTCTTGTGTAATCCCCAA	
BPIV-3c-P	HEX-TGCCACTGCTT-GACCTAGTTGGAAC-BHQ1	

1.7 重复性试验

将7种病原的靶基因质粒DNA进行10倍系列稀释,以不同浓度的质粒DNA为模板,进行3次批内和批间试验,用所得Ct值计算出平均Ct值、标准差和变异系数,分析多联qPCR方法的重复性。

1.8 临床样品检测

将实验室保存的临床病牛的鼻拭子反复冻融3次,随后结合EasyPure Viral DNA/RNA病毒核酸提取试剂盒和VAMNE Magnetic Pathogen DNA Kit(Prepackaged)细菌核酸提取试剂盒说明书步骤,把样本放置于核酸自动提取仪中提取。提取的病毒基因组核酸按照HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒对病毒RNA反转录。采用所建立的多联荧光定量PCR方法及常规PCR方法对样

表 3 用于 BRD 7 种病原体常规 PCR 扩增的引物
Table 3 Primers for conventional PCR amplification
of 7 pathogens causing BRD

引物名称 Primer names	序列 5'→3' Sequences 5'→3'	产物大小/bp Product size	参考文献 References
<i>M.b</i> -F	TAATTTAGAAGCTT- TAAATGAGCGC	238	[12]
<i>M.b</i> -R	CATATCTAGGT- CAAGGCTTTG		
<i>P.m</i> -F	ATCCGCTATTTA CCCAGTGG	460	[13]
<i>P.m</i> -R	GCTGTA AAC- GAACTCGCCAC		
<i>M.h</i> -F	TGTTGGTTCTGG- TACGACGG	760	[14]
<i>M.h</i> -R	GATCCGCTCGC- CATTTTGAC		
IBRV-F	ACGGGCT- GGGAAAGACAA- CAACGG	868	[15]
IBRV-R	GCGGACACGTCCAG- CACGAACA		
BPIV-3-F	CGGCGGTCGAGCG- GCAAGAG	398	[16]
BPIV-3-R	AGGCGGGAACA- CAGCTGGGACAAT		
BRSV-F	CAAATAAAT- GACACTTTCAACAAG	566	[17]
BRSV-R	CATTTCATTCCT- TAGTACATTGTTG		

品进行平行检测,比较二者符合率。常规 PCR 引物由北京擎科生物技术有限公司合成(表 3)。采用 25 μL 的反应体系:2×Taq Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,模板为 1 μL,ddH₂O 补足 25 μL。扩增程序为:94 ℃预变性,35 次循环(94 ℃变性,55 ℃退火,72 ℃延伸)以及 72 ℃延伸,每种病原体的扩增参数略有不同(表 4)。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

2 结果与分析

2.1 *M.h* 重组质粒的构建

提取 *M.h* 菌液总 DNA,应用特异性引物进行 PCR 扩增,获得 *M.h* 的 GCP 基因部分片段,与目的片段大小(171 bp)一致。经回收、连接、转化,阳性克隆提取质粒,进行 PCR 鉴定和测序鉴定,结果显示与预

表 4 用于 BRD 7 种病原体常规 PCR 扩增的反应条件
Table 4 Amplification condition of conventional PCR for
7 pathogens causing BRD

反应步骤 Reaction steps	反应时间 Reaction time	病原 Pathogens
预变性 Predenaturation	5 min 10 min	<i>M.h</i> , IBRV <i>M.b</i> , <i>P.m</i> , BPIV-3, BRSV
变性 Denaturation	30 s 1 min	<i>M.h</i> , BPIV-3, BRSV <i>M.b</i> , <i>P.m</i> , IBRV
退火 Annealing	30 s 1 min	<i>M.h</i> , IBRV, BPIV-3, BRSV <i>M.b</i> , <i>P.m</i>
延伸 Extension	30 s 45 s 1 min	<i>M.b</i> <i>M.h</i> <i>P.m</i> , IBRV, BPIV-3, BRSV
最后延伸 Final extension	5 min 8 min 10 min	<i>M.h</i> <i>M.b</i> <i>P.m</i> , IBRV, BPIV-3, BRSV

期一致。表明 *M.h* 重组质粒构建成功,经检测浓度,换算成拷贝数为 3.07×10¹⁰ 拷贝/μL,可作为质粒标准品。

2.2 多联荧光定量 PCR 体系反应条件的确定

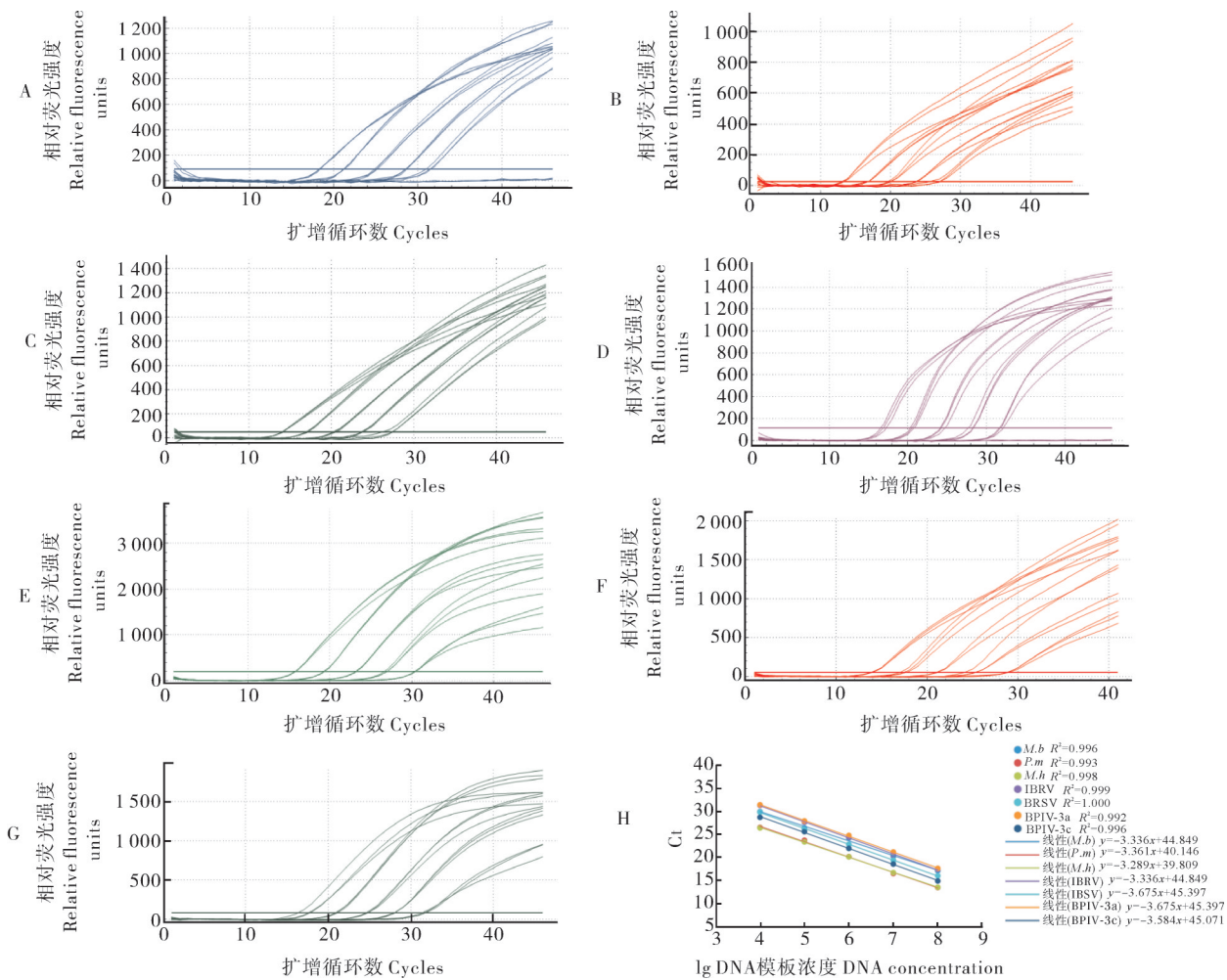
经过优化,将 7 种病原分为 3 管进行扩增,其中管 1 包括 *P.m* 和 *M.h*,管 2 包括 BRSV、BPIV-3a 和 BPIV-3c,管 3 包括 *M.b* 和 IBRV。每种病原扩增的引物浓度和探针浓度有所不用,最终形成 20 μL 的反应体系,并在同一反应条件下进行扩增。多联荧光定量 PCR 的最佳反应体系及条件如表 5 所示。

2.3 多联荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将 *M.b*、*P.m*、*M.h*、IBRV、BRSV、BPIV-3a 和 BPIV-3c 的质粒标准品 10 倍系列稀释成 10⁸~10⁴ 拷贝/μL,等比例混合后作为模板进行扩增,以扩增循环数为横坐标,相对荧光强度即 RFU 值(relative fluorescence units)为纵坐标,获得多联荧光定量 PCR 的扩增曲线(图 1A~G),以质粒 DNA 模板浓度的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标,建立多联 qPCR 体系标准曲线(图 1H)。结果显示,7 种病原标准曲线的相关系数 R² 均在 0.99 以上,表明各种标准品的起始模板数和 Ct 值之间均呈现良好的线性关系。

表 5 多联荧光定量PCR扩增体系及条件
Table 5 Amplification system and condition of multiple qPCR

分管 Tubes	病原体 Pathogens	引物浓度/(nmol/L) Primer concentrations	探针浓度/(nmol/L) Probe concentrations	2×qPCR mix/ μ L	双蒸水 ddH ₂ O	反应条件 Reaction conditions
管 1 Tube 1	<i>P.m</i> <i>M.h</i>	250 350	350 350	10	补足至 20 μ L Refill to 20 μ L	95 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环 95 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 10 s and 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 cycles
管 2 Tube 2	BRSV BPIV-3a BPIV-3c	250 400 350	350 250 300	10	补足至 20 μ L Refill to 20 μ L	
管 3 Tube 3	<i>M.b</i> IBRV	250 350	350 250	10	补足至 20 μ L Refill to 20 μ L	



A: *M.b*; B: *P.m*; C: *M.h*; D: IBRV; E: BRSV; F: BPIV-3a; G: BPIV-3c; H: 标准曲线 Standard curves.

图 1 多联荧光定量PCR对牛呼吸疾病综合征 7 种病原体的扩增曲线(A~G)和标准曲线(H)

Fig.1 Amplification curves(A-G) and standard curves(H) of multiple qPCR used to amplify the 7 pathogens associated with bovine respiratory diseases complex

2.4 特异性分析

用建立的多联 qPCR 方法对牛呼吸疾病综合征 7 种病原体或其常见血清型和基因型的培养物进行

检测,模板为各病原体的基因组 DNA 或 cDNA,结果如图 2 所示,只有 *M.b*、*P.m*-A、*P.m*-B、*P.m*-D、*P.m*-F、*M. h*-A1、*M. h*-A6、IBRV、BRSV、BPIV-3a 和

BPIV-3c 的基因组 DNA/cDNA 出现扩增曲线, 而其他常见病原体和相关病原体如昏睡嗜组织杆菌、摩氏摩根菌、猪链球菌、停乳链球菌、无乳支原体、牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛病毒性腹泻病毒、副猪嗜血杆菌、伪狂犬病毒的 DNA/cDNA 及阴性对照均无扩增, 表明所建立的多联 qPCR 方法特异性好。

2.5 敏感性分析

以 10 倍梯度稀释的 $10^4\sim10^0$ 拷贝/ μL 的 7 种病原质粒 DNA 为模板, 按照建立的多联 qPCR 方法对 5 个梯度模板进行扩增, 结果如图 3 所示, *M.h* 和 BPIV-3c 的质粒最低检测限为 10^1 拷贝/ μL , *M.b*、*P.m*、IBRV、BPIV-3a 与 BRSV 的质粒最低检测限均为

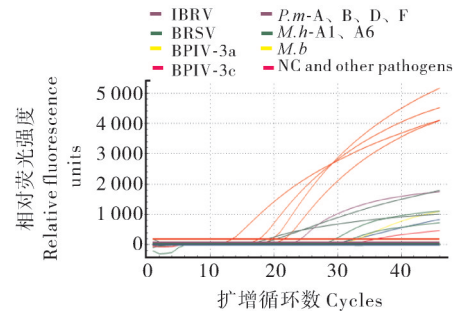
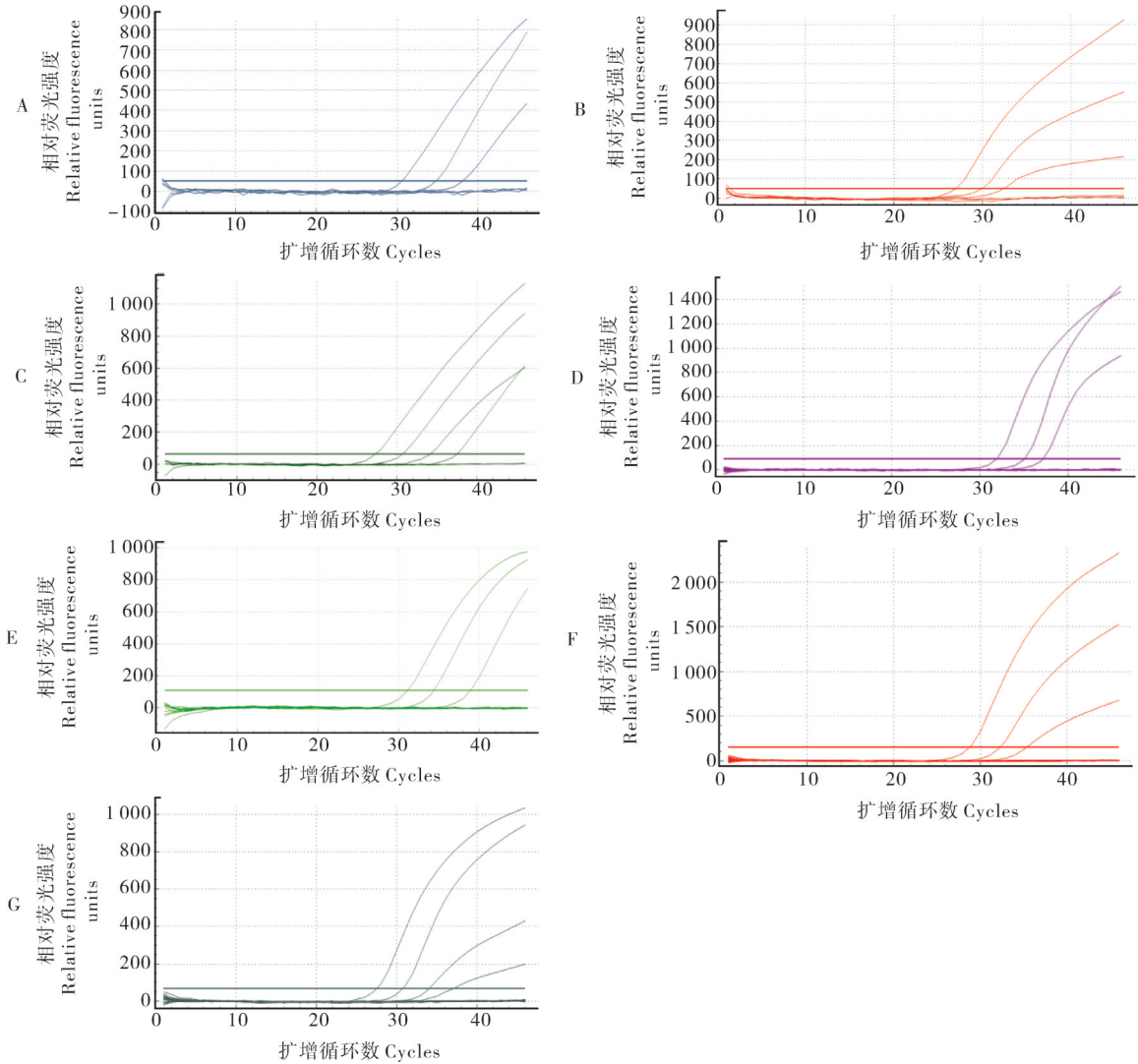


图2 牛呼吸疾病综合征七病原多联 qPCR 的特异性分析
Fig. 2 Specific test of the multiple qPCR for the seven pathogens causing bovine respiratory disease complex 10^2 拷贝/ μL 。

2.6 重复性分析

以 $10^6\sim10^4$ 拷贝/ μL 稀释的 3 个梯度质粒 DNA



A: *M.b*; B: *P.m*; C: *M.h*; D: IBRV; E: BRSV; F: BPIV-3a; G: BPIV-3c.
图3 牛呼吸疾病综合征 7 种病原多联 qPCR 分析灵敏度检测

Fig. 3 Analytic sensitivity test of multiple qPCR for seven pathogens of bovine respiratory disease complex

为模板,按照建立的多联 qPCR 检测方法分别进行 3 次批内试验和 3 次批间试验,结果如表 6 所示,批内试验变异系数小于 2.5%,批间试验变异系数小于 5.5%,表明该方法重复性较好。

表 6 多联荧光定量 PCR 重复性分析
Table 6 Repeatability analysis of the multiple qPCR

病原 Pathogens	模板浓度/ (copies/ μ L) Template concentration	批内重复 Repetition of intra-assay			批间重复 Repetition of inter-assay		
		平均Ct	标准差 SD	CV/%	平均Ct	标准差 SD	CV/%
<i>M.b</i>	10 ⁶	23.61	0.18	0.70	23.99	0.61	2.50
	10 ⁵	26.23	0.08	0.29	26.43	0.24	0.89
	10 ⁴	29.72	0.07	0.23	30.16	0.60	1.90
<i>P.m</i>	10 ⁶	19.80	0.26	1.29	20.13	0.29	1.42
	10 ⁵	23.57	0.49	0.20	23.70	0.13	0.50
	10 ⁴	26.67	0.22	0.80	26.92	0.21	0.79
<i>M.h</i>	10 ⁶	19.92	0.04	0.18	19.96	0.04	0.20
	10 ⁵	23.34	0.09	0.39	23.3	0.17	0.74
	10 ⁴	26.54	0.20	0.75	26.76	0.24	0.90
IBRV	10 ⁶	24.26	0.37	1.50	24.49	0.32	1.30
	10 ⁵	27.38	0.15	0.56	28.02	0.47	1.60
	10 ⁴	30.80	0.90	0.29	31.11	0.23	0.73
BRSV	10 ⁶	22.76	0.47	2.09	21.92	0.61	2.81
	10 ⁵	26.22	0.03	0.10	25.93	0.46	1.80
	10 ⁴	30.41	0.28	0.93	29.75	0.51	1.72
BPIV-3a	10 ⁶	20.92	0.68	0.03	20.50	1.06	5.19
	10 ⁵	25.21	0.62	2.46	25.24	0.67	2.66
	10 ⁴	29.27	0.05	0.17	29.30	0.12	0.42
BPIV-3c	10 ⁶	21.89	0.34	1.58	22.37	0.59	2.67
	10 ⁵	25.52	0.98	0.38	26.06	1.21	4.65
	10 ⁴	28.61	0.18	0.64	29.32	0.89	3.03

2.7 临床样品检测

将临床样品提取核酸后,利用本研究所建立的多联荧光定量 PCR 方法与常规 PCR 方法进行检测,结果见表 7。本方法共检测到 *M.b* 阳性样品 32 份(27.83%)、*P.m* 阳性样品 41 份(36.65%)、*M.h* 阳性样品 29 份(25.22%)、IBRV 阳性样品 11 份(11.30%)、BRSV 阳性样品 1 份(0.95%)、BPIV-3c 阳性样品 9 份(8.57%),阳性检出率均高于常规 PCR 法。另外,该多联荧光定量 PCR 方法还可用于多病原混合感染样品检测,结果见表 8,共检测到 11 种混合感染模式,由 *M.b* 与其他病原体的混合感染占 72.7%(8/11),*M.b/P.m* 混合感染的检出率最高,占 60%(18/30),*M.b/P.m/M.h* 在混合感染中出现率排前三,其占比分别为 73.3%(22/30)、73.3%(22/30)和 43.3%(13/30);其次为 IBRV,占 26.7%(8/30);BPIV-3c 占 13.3%(4/30)。

3 讨 论

由于 BRD 多病原混合感染增加了诊断的复杂性,临床上急需一种准确、快速且能同时检测多种病原的检测方法。本研究所建立的致 BRD 七种病原的多联荧光定量 PCR 检测方法,对 *M.h* 最低检测限为 10 copies/ μ L,与早期李富祥等^[18]建立的 *M.h* TaqMan qPCR 方法敏感性一致,对牛副流感病毒 3c 基因型的最低检测限为 10 copies/ μ L,其余 5 种病原的最低质粒检测限均为 10² copies/ μ L,其中 BRSV 的最低检测限与齐力格尔^[19]建立的 BRSV TaqMan qPCR 方法相比高 10 倍,*M.b* 的最低检测限与李建等^[20]建立的 *M.b* TaqMan qPCR 方法相比高 10 倍,IBRV 的最低检测限与任强林^[21]建立的 IBRV TaqMan qPCR 方法相比高 10 倍,*P.m* 的最低检测限与许腾林等^[22]建立的 *P.m* TaqMan qPCR 方法相比高 10 倍,虽然有些病原的最低检测限相较于单病原 TaqMan qPCR 检测方法有所降低,但在目前报道的多病原联

表 7 临床样品单病原检测结果

Table 7 Detection result of single pathogen in clinical samples

病原 Pathogens	样品数 Sample No.	多联荧光定量 PCR 检测 Detection of multiple qPCR		常规 PCR Detection of conventional PCR	
		阳性样品数 No. of positive sample	阳性率/% Positivity	阳性样品数 No. of positive samples	阳性率/% Positivity
<i>M.b</i>	115	32	27.82	10	8.69
<i>P.m</i>	115	41	35.65	33	28.69
<i>M.h</i>	115	29	25.22	9	7.83
IBRV	105	13	11.30	0	0
BRSV	105	1	0.95	0	0
BPIV-3a	105	0	0	0	0
BPIV-3c	105	9	8.57	6	5.71

表 8 临床样品多病原混合感染检测结果

Table 8 Detection results of multiple pathogen coinfection in clinical samples

病原 Pathogens	样品数 Sample No.	阳性样品数 No. of positive samples	阳性率/% Positivity
<i>M.b</i> + <i>P.m</i>	115	12	10.43
<i>M.b</i> + <i>M.h</i>	115	2	1.74
<i>P.m</i> + <i>M.h</i>	105	2	1.90
<i>P.m</i> +IBRV	105	2	1.90
<i>M.h</i> +IBRV	105	3	2.86
<i>M.h</i> +BPIV-3c	105	1	0.95
<i>M.b</i> + <i>P.m</i> + <i>M.h</i>	115	2	1.74
<i>M.b</i> + <i>P.m</i> +IBRV	105	2	1.90
<i>M.b</i> + <i>M.h</i> +BPIV-3c	105	1	0.95
<i>M.b</i> +BRSV+BPIV-3c	105	1	0.95
<i>M.b</i> + <i>P.m</i> + <i>M.h</i> +IBRV	105	1	0.95
<i>M.b</i> + <i>P.m</i> + <i>M.h</i> +IBRV+BPIV-3c	105	1	0.95

合检测同类研究中,已处于较高的技术水平。

应用该方法对临床 100 余份患有呼吸疾病的牛的鼻拭子进行检测,结果显示,该方法对 7 种病原阳性检出率均高于文献报道的常规 PCR 法。另外,采用国家标准的 IBRV qPCR 检测方法(GB/T 27981—2011)及有行业标准的 *M.b* PCR 方法(NY/T 3234—2018)对所有样品检测,本研究建立的方法与其检测符合率 IBRV 为 97.14%,而 *M.b* 符合率(80%)较低,可能是由于 qPCR 敏感性高于常规 PCR 所致。

本研究对临床样品检测结果显示,7 种病原的混合感染率达 26.08%,证实了 BRD 的混合感染特征。在混合感染中,*M.b*、*P.m*、*M.h* 是位于前 3 位的病原体,在 BRD 防控措施研发中,应给予高度重视。本研究中 7 种病原体出现频率由高到低的顺序分别为

P.m、*M.b*、*M.h*、IBRV、BPIV-3c 和 BRSV,与其他报道的各病原顺位存在差异,这表明不同国家和地区患病牛群 BRD 的优势病原所占具体比例存在一定差异性^[23]。本方法的另一优势是可同时对 BPIV-3 国内流行主要基因型(a 型和 c 型)进行分型鉴定。临床样本的检测结果显示,BPIV-3c 的流行率大于 BPIV-3a,这一结果与路荣^[24]结论相同。

综上,本研究建立的七病原多联荧光定量 PCR 检测方法,具有特异性强、灵敏度高、重复性好的特点,为 *M.b*、*P.m*、*M.h*、IBRV、BRSV、BPIV-3a 和 BPIV-3c 这 7 种病原的联合检测以及 BRD 快速检测和流行病学调查等提供了有效的技术手段,具有重要的应用价值。

参考文献 References

[1] 楚会萌,孙阳阳,张亮,等.牛呼吸系统疾病研究进展[J].现代农业科技,2019(17):219-220,222. CHU H M, SUN Y Y, ZHANG L, et al. Research progress of bovine respiratory diseases [J]. Modern agricultural science and technology, 2019(17):219-220,222 (in Chinese with English abstract).

[2] 钟舒红,吴翠兰,李军,等.一起牛呼吸道疾病综合征的病原分析与药敏试验[J].江苏农业科学,2020,48(19):168-171. ZHONG S H, WU C L, LI J, et al. Pathogen analysis and drug sensitivity test of a bovine respiratory disease syndrome [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2020, 48(19):168-171 (in Chinese with English abstract).

[3] FULTON R W. Bovine respiratory disease research (1983—2009) [J]. Animal health research reviews, 2009, 10(2):131-139.

[4] HILTON W M. BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? [J]. Animal health research reviews, 2014, 15(2):120-122.

[5] KISHIMOTO M, TSUCHIYAKA S, RAHPAYA S S, et al. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex [J]. Journal of veterinary medical science, 2017, 79(3):517-523.

- [6] WHITE B J, LARSON B L. Impact of bovine respiratory disease in U. S. beef cattle [J]. Animal health research reviews, 2020, 21(2): 132-134.
- [7] 刘晓乐, 张敏敏, 陈颖钰, 等. BPIV-3 和 BVDV 双重 RT-PCR 快速检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(11): 1-5. LIU X L, ZHANG M M, CHEN Y Y, et al. Establishment of duplex RT-PCR to detect bovine parainfluenza virus 3 and bovine viral diarrhoea virus [J]. Progress in veterinary medicine, 2011, 32(11): 1-5 (in Chinese with English abstract).
- [8] 肖淦文, 陈颖钰, 彭清洁, 等. 牛支原体、巴氏杆菌 A 型和化脓性梭状芽孢杆菌多重 PCR 快速检测方法的建立 [J]. 中国奶牛, 2012(21): 4-9. XIAO G W, CHEN Y Y, PENG Q J, et al. Establishment of multiple PCR to detect *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* type A, and *Arcanobacterium pyogenes* [J]. China dairy cattle, 2012(21): 4-9 (in Chinese with English abstract).
- [9] THONUR L, MALEY M, GILRAY J, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3 [J/OL]. BMC Vet Res, 2012; 8-37 [2022-11-01]. <https://bmcbvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-8-37>. DOI:10.1186/1746-6148-8-37.
- [10] 郭利, 王炜, 张淑琴, 等. 牛呼吸道疾病综合征相关病毒 BVDV、BPIV3、IBRV 和 BRSV 多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 特产研究, 2014, 36(1): 12-16. GUO L, WANG W, ZHANG S Q, et al. A multiplex PCR to detect the viruses of BVDV, BPIV3, IBRV and BRSV associated with the bovine respiratory disease complex in clinical [J]. Special wild economic animal and plant research, 2014, 36(1): 12-16 (in Chinese with English abstract).
- [11] 李一鸣, 李丽, 张凯悦, 等. 羊源产气荚膜梭菌多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(8): 1532-1538. LI Y M, LI L, ZHANG K Y, et al. Establishment and preliminary application of multiplex fluorescent quantitative PCR for detection of *Clostridium perfringens* from sheep and goats [J]. Chinese journal of veterinary science, 2021, 41(8): 1532-1538 (in Chinese with English abstract).
- [12] ASHRAF A, IMRAN M, YAQUB T, et al. Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis* in mastitic milk [J]. Folia microbiol, 2018, 63(3): 373-380.
- [13] 林立山, 黄秦, 才灵杰, 等. 牛源多杀性巴氏杆菌的分离与初步鉴定 [J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2240-2248. LIN L S, HUANG Q, CAI L J, et al. Isolation and diversity analysis of bovine *Pasteurella multocida* [J]. Acta microbiologica sinica, 2018, 58(12): 2240-2248 (in Chinese with English abstract).
- [14] 冉艾, 张斌, 岳华, 等. 肉牛溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(4): 301-305. RAN A, ZHANG B, YUE H, et al. Isolation, identification and antibiotics resistance analysis of *Mannheimia haemolytica* from beef cattle [J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 2018, 40(4): 301-305 (in Chinese with English abstract).
- [15] 郭爱珍, 张敏敏, 刘正飞, 等. 一种缺失 gG 和 TK 基因的重组牛传染性鼻气管炎病毒和应用. 中国, CN101818130B [P]. 2012-07-25. GUO A Z, ZHANG M M, LIU Z F, et al. A recombinant bovine infectious rhinotracheitis virus with gG and TK gene deletion and its application. China, CN101818130B [P]. 2012-07-25 (in Chinese).
- [16] 王嵩, 林红丽, 王宇鹏, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2014, 26(3): 26-29. WANG S, LIN H L, WANG Y P, et al. Establishment and application of single PCR method of IBRV infection diagnosis [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2014, 26(3): 26-29 (in Chinese with English abstract).
- [17] KLIMA C L, ZAHEER R, COOK S R, et al. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements [J]. Journal of clinical microbiology, 2014, 52(2): 438-448.
- [18] 李富祥, 李华春, 洪琼花, 等. 溶血性曼氏杆菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医科学, 2016, 46(10): 1213-1218. LI F X, LI H C, HONG Q H, et al. Development and application of TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Mannheimia haemolytica* [J]. Chinese veterinary science, 2016, 46(10): 1213-1218 (in Chinese with English abstract).
- [19] 齐力格尔. 牛呼吸道合胞体病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018. Qiligeer. Establishment and application of fluorescence quantitative RT-PCR for detection of bovine respiratory syncytial virus [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [20] 李建, 高航飞, 安维雪, 等. 牛支原体 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2017, 37(6): 1059-1064. LI J, GAO H F, AN W X, et al. The construction of the TaqMan real-time fluorescent quantitation PCR detection method for the *Mycoplasma bovis* [J]. Chinese journal of veterinary science, 2017, 37(6): 1059-1064 (in Chinese with English abstract).
- [21] 任强林. 牛传染性鼻气管炎病毒 TaqMan-gB 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021. REN Q L. Establishment and preliminary application of real-time PCR for detection of infectious bovine infectious rhinotracheitis virus [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [22] 许腾林, 邢桂玲, 刘家森, 等. 多杀性巴氏杆菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(8): 706-710. XU T L, XING G L, LIU J S, et al. Development and application of TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Pasteurella multocida* [J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 2018, 40(8): 706-710 (in Chinese with English abstract).
- [23] CONFER A W. Update on bacterial pathogenesis in BRD [J]. Animal health research reviews, 2009, 10(2): 145-148.
- [24] 路荣. 内蒙古地区牛副流感病毒 3 型的分离及鉴定 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. LU R. Isolation and identification of a strain bovine parainfluenza virus type 3 in Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).

Establishment of multiple qPCR for simultaneous detection of 7 pathogens causing bovine respiratory diseases complex

XU Enhong^{1,2,3}, QI Mingpu^{1,2,3}, XIANG Zhijie^{1,2,3}, HU Changmin²,
CHEN Yingyu^{1,2,3}, CHEN Jianguo², CHEN Xi², GUO Aizhen^{1,2,3,4}

1.College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;

3.Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 4.Hubei International Scientific and Technological Cooperation Base of Veterinary Epidemiology/Key Laboratory of Development of Veterinary Diagnostic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Ruminant Biological Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China

Abstract In order to improve the clinical diagnosis efficiency of bovine respiratory disease complex (BRD) with multiple pathogen mixed infection, this study established a real-time quantitative PCR (qPCR) for multiple and rapid detection of seven common pathogens of BRD including *Mycoplasma bovis* (*M.b*), *Pasteurellae multocida* (*P.m*), *Mannheimia haemolytica* (*M.h*), bovine infectious rhinotracheitis virus (IBRV), bovine syncytial virus (BRSV), bovine parainfluenza virus type 3 genotype a (BPIV-3a) and c (BPIV-3c), the specific primers and TaqMan probes were designed and synthesized for the *oppD/F* gene of *M.b*, *gcp* gene of *M.h*, *ompH* gene of *P.m*, *gB* gene of IBRV, N genes of BRSV, BPIV-3a and BPIV-3c, respectively. After optimizing the reaction conditions, a multiple qPCR was established for simultaneous detection of the above seven pathogens in three tubes. This method specifically amplified these seven pathogens, rather than other major pathogens commonly found in cattle, indicating a high specificity. For *M.b*, *P.m*, *M.h*, IBRV, BRSV, BPIV-3a and BPIV-3c, the analytical sensitivity as limit of detection (LOD) was 10^2 copies/ μ L, 10^2 copies/ μ L, 10^1 copies/ μ L, 10^2 copies/ μ L, 10^2 copies/ μ L, 10^2 copies/ μ L, 10^2 copies/ μ L and 10^1 copies/ μ L, respectively, suggesting a high sensitivity. In addition, the coefficient of variation of the method was less than 2.5% within group and 5.5% between groups, indicating a good repeatability. Furthermore, 115 clinical nasal swabs were parallelly detected by this method and conventional PCR, and the positivity was 27.83% for *M.b*, 36.65% for *P.m*, 25.22% for *M.h*, 11.30% for IBRV, 0.95% for BRSV, 8.57% for BPIV-3C, with the proportion of coinfection was 26.1%. A total of 11 mixed infection patterns were detected, among them, the coinfection rate of *M.b* with other pathogens was the highest, accounting for 72.7% (8/11). Within the 30 coinfection cases, the detection rate of *M.b/P.m* coinfection was the highest (60%, 18/30); the top three pathogens present in the coinfection were *M.b*, *P.m*, and *M.h* with frequency of 73.3% (22/30), 73.3% (22/30) and 43.3% (13/30), respectively; followed by IBRV (26.7%, 8/30) and BPIV-3c (13.3%, 4/30). Overall, this method has high sensitivity and specificity, and potential application in the clinical detection of single pathogen and multiple pathogens causing BRD.

Keywords multiple fluorescence real time quantitative PCR (qPCR); bovine respiratory disease complex; coinfection; *Mycoplasma bovis*; *Pasteurella multocida*; *Mannheimia haemolytica*; combined detection of multiple pathogens

(责任编辑:边书京)