

牛支原体、多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌三重 qPCR 方法的建立与流行病学调查

马彦颖¹, 高磊¹, 宫枫举², 吴雨伦¹, 李旭雯¹, 张志², 孙学强²,
潘子豪^{1*}, 姚火春^{1*}

1 南京农业大学 动物医学院, 猪链球菌病 WOA 参考实验室, 江苏 南京

2 青岛立见生物科技有限公司, 山东 青岛

马彦颖, 高磊, 宫枫举, 吴雨伦, 李旭雯, 张志, 孙学强, 潘子豪, 姚火春. 牛支原体、多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌三重 qPCR 方法的建立与流行病学调查[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4198-4210.

MA Yanying, GAO Lei, GONG Fengju, WU Yulun, LI Xuwen, ZHANG Zhi, SUN Xueqiang, PAN Zihao, YAO Huochun. Establishment of a triplex qPCR detection method for *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and an epidemiological investigation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 4198-4210.

摘要:【目的】建立牛支原体(*Mycoplasma bovis*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, P.m)和溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, M.h)的三重 qPCR 检测方法, 并开展规模化奶牛养殖场牛呼吸道疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)的流行病学调查。【方法】以实验室分离鉴定后纯化的菌株制备敏感性质控样品; 选取国内主要流行株的保守基因, 分别以牛支原体的 *uvrC* 基因、多杀性巴氏杆菌的 *Kmt1* 基因和溶血性曼氏杆菌的 *lktD* 基因作为靶标, 建立多重探针和引物体系, 优化反应体系参数, 构建三重 qPCR 方法。验证该方法的敏感性、重复性和特异性, 并与细菌分离鉴定方法进行符合率验证。利用该方法对 1 252 份临床疑似 BRDC 的样本进行病原学检测, 分析病原的流行特征和时空分布特征。【结果】三重 qPCR 方法的标准曲线 R^2 值分别为 0.998 6、0.994 6 和 0.998 6; 牛支原体、多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌的最低检出量分别为 2.50×10^3 、 1.26×10^3 和 7.50×10^2 CFU/mL。批内和批间变异系数均小于 2%, 仅 3 种菌的敏感性质控样品出现特异性扩增曲线。符合率试验结果显示, 牛支原体、多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌与细菌分离鉴定方法的符合率分别为 100.00%、98.40% 和 97.60%。流行病学调查显示, BRDC 细菌性病原总阳性率为 75.9% [95% confidence interval (CI), 73.4%–78.3%], 其中混合感染占比 48.8%, 冬季为高发期, 北方地区阳性率显著高于南方 ($P < 0.001$)。【结论】本研究建立的三重 qPCR 方法具有良好的特异性、稳定性和重复性, 为我国 BRDC 主要病原的一步法检测提供了候

资助项目: 青岛立见诊断技术发展企业横向课题(HMSY21001)

This work was supported by the Qingdao Lijian Diagnostic Technology Development Center, Enterprise Horizontal Projects (HMSY21001).

*Corresponding authors. E-mail: PAN Zihao, panzihao@njau.edu.cn; YAO Huochun, yaohch@njau.edu.cn

Received: 2025-02-26; Accepted: 2025-03-30; Published online: 2025-06-18

选方案。本研究还分析了 BRDC 细菌病原的协同感染特征及地理-季节分布规律, 为精准防控策略的制定提供了参考。

关键词: 牛支原体; 多杀性巴氏杆菌; 溶血性曼氏杆菌; 流行病学调查; 多重 qPCR

Establishment of a triplex qPCR detection method for *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and an epidemiological investigation

MA Yanying¹, GAO Lei¹, GONG Fengju², WU Yulun¹, LI Xuwen¹, ZHANG Zhi², SUN Xueqiang², PAN Zihao^{1*}, YAO Huochun^{1*}

1 The WOA Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

2 Qingdao Lijian Bio-Tech Co., Ltd., Qingdao, Shandong, China

Abstract: [Objective] To establish a triple qPCR detection method for *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* (P. m) and *Mannheimia haemolytica* (M. h), and to conduct an epidemiological investigation of bovine respiratory disease complex (BRDC) in large-scale dairy farms with it. [Methods] Sensitive quality control samples were prepared using the purified strains isolated and identified in our laboratory. The conserved genes of the major prevalent strains in China were used as targets, including the *uvrC* of *M. bovis*, *Kmt1* of P. m, and *lktD* of M. h, to establish a multiplex qPCR containing multiple pairs of primers and probes. By optimizing the parameters of the reaction system, a triple qPCR method was established and its sensitivity, repeatability and specificity were verified. The coincidence rate with the bacterial isolation and identification method was verified. A total of 1 252 clinical samples suspected of BRDC were tested using the established method, and the prevalence and spatiotemporal distribution characteristics of three pathogens were analyzed based on the test results. [Results] The R^2 values of the standard curves for the triple qPCR for detecting *M. bovis*, P. m, and M. h were 0.998 6, 0.994 6 and 0.998 6 respectively; the minimum detectable quantities were 2.50×10^3 , 1.26×10^3 and 7.50×10^2 CFU/mL, respectively. The intra-batch and inter-batch coefficients of variation of the reaction system were both less than 2%, and only the specific amplification curves were observed for the three sensitive quality control samples established. The results of the test showed that the concordance rates of *M. bovis*, P. m, and M. h with bacterial isolation and identification methods were 100.00%, 98.40% and 97.60%, respectively. The epidemiological survey indicated that the total positive rate of bacterial pathogens in BRDC was 75.9% (95% confidence interval (CI), 73.4%–78.3%), among which the proportion of mixed infections was 48.8%. The incidence was higher in winter, and the positive rate in the northern region was significantly higher than that in the southern region ($P < 0.001$). [Conclusion] The multiple qPCR method established in this study demonstrated excellent specificity, stability and repeatability, which provided a candidate solution

for the detection of major pathogens of BRDC in China. The analysis of the co-infection characteristics and geographical-seasonal distribution patterns of BRDC bacterial pathogens offered meaningful references for the formulation of precise prevention and control strategies.

Keywords: *Mycoplasma bovis*; *Pasteurella multocida*; *Mannheimia haemolytica*; epidemiological investigation; multiplex qPCR

牛呼吸道疾病综合征 (bovine respiratory disease complex, BRDC) 是全球肉牛和奶牛养殖业中最重要的健康问题之一^[1], 其发病机制复杂, 常由多种病毒和细菌协同作用引发^[2]。其中, 多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌和牛支原体是主要的细菌性病原^[2]。BRDC 在全球范围内具有较高的发病率和死亡率^[3], 目前国内养牛业中 65% 的疾病均与 BRDC 相关, 感染率为 100%, 死亡率不低于 35%^[4], 导致了严重的经济损失。研究表明牛支原体是 BRDC 的主要病原体^[5], 具有独特的生物学特性和广泛的致病性^[6-7], 且不同地区的菌株表现出显著的基因组多样性和耐药性^[8]。溶血性曼氏杆菌常定植于健康反刍动物的上呼吸道^[9], 在特定条件下可引发严重的呼吸道疾病^[10], 其生物被膜的形成增强了抗生素耐药性和耐药基因的传播^[11-13]。多杀性巴氏杆菌的致病常与运输、拥挤等应激因素相关^[14], 且能与其他病原体协同作用^[15]。

近年来, 多重 qPCR 因其高灵敏度和高通量的优势被广泛应用于病原检测^[16], 但现有的 BRDC 检测体系多针对单一病原, 或缺乏标准化验证^[17]。此外, 我国 BRDC 的流行病学数据较为零散, 病原体的协同作用机制及其时空分布规律尚未得到系统阐明^[18]。因此本研究选取牛支原体的 *uvrC* 基因、多杀性巴氏杆菌的 *KmtI* 基因和溶血性曼氏杆菌的 *lktD* 基因作为靶标, 建立三重 qPCR 检测方法, 并对全国 51 个牧场进行流行病学调查。

1 材料与方法

1.1 样品来源

110 份呼吸道拭子样本和 15 份内脏样本(通

过南京农业大学实验动物福利与伦理委员会审批, 编号: NJAULLSC2022085)作为符合率试验的临床样本, 均采集于安徽蚌埠某牧业。1 184 份呼吸道拭子样本和 68 份组织样本作为流行病学调查样本, 采集自全国各地的 51 个牧场。所有纳入流行病学调查的临床样本均来自呈现典型呼吸道症状的牛只, 包括咳嗽、气喘、呼吸困难; 同时伴随全身性临床症状, 如体温显著升高($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$)、食欲减退及精神沉郁, 部分病例还可见产奶量下降。每个牧场按呼吸道症状牛存栏量的 5% 抽取样本, 优先选择急性期症状明显的牛只, 所有采样牛均来自规模化牛场。

1.2 菌株、主要试剂和仪器

大肠埃希氏菌、肠道沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、肉芽肿曼氏杆菌、丝状支原体、牛鼻支原体、病毒性腹泻病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛疱疹病毒 1 型、昏睡嗜血杆菌、牛结核分枝杆菌、肺炎克雷伯氏菌、肺炎链球菌, 均由南京农业大学保存。

参考菌株: 多杀性巴氏杆菌 SX1804-1 (2018 年分离自陕西省某牧场患肺炎奶牛肺组织, 血清型为 A 型)、溶血性曼氏杆菌 HB2011-1 (2011 年分离自河北省某牧场牛拭子, 血清型为 A1) 由本实验室分离鉴定保存。牛支原体 HB08-1 (登录号为 NC_018077.1) 由华中农业大学郭爱珍老师惠赠。

1×Taq Master Mix, 青岛立见生物科技有限公司。

自动核酸提取仪及耗材, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 西安天隆科技有限公司。

1.3 敏感性质控样品制备

依据 Rossetti 等^[19]、许腾林等^[20]、Klima 等^[21]的研究, 选用针对多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌和牛支原体的荧光 PCR 引物和探针, 交由百力格生物科技(上海)股份有限公司合成。将 P.m 和 M.h 参考菌株接种于 THB 液体培养基, 37 °C 180 r/min 恒温摇床中培养 8–10 h, *M. bovis* 参考菌株接种于 PPLO 肉汤培养基, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。提取核酸后进行 10 倍梯度稀释, 利用荧光定量 PCR 验证, 选定 C_t 值在 25–30 的稀释度, 冻干保存, 制备成质控品 Mb/QC/DNA、Pm/QC/DNA、Mh/QC/DNA, 并于–20 °C 保存。

1.4 引物探针设计与制备

从 GenBank 数据库选取 11 株牛支原体的 *uvrC* 基因、7 株多杀性巴氏杆菌的 *KmtI* 基因和 11 株溶血性曼氏杆菌的 *lktD* 基因, 使用 DNASTar 11.1 软件进行序列比对, 筛选出靶基因的保守区域后, 针对各基因序列保守且同源性高的区域, 利用 Primer Express 3.0 软件评估引物二聚体(ΔG 值>–10 kcal/mol)和发夹结构, 设计引物和探针。采用独立荧光通道(FAM、VIC、Cy5)分离信号, 以减少交叉干扰。共筛选出 6 种三重引物探针组合, 并交由百力格生物科技(上海)股份有限公司合成。

将筛选的引物和探针以 100 μmol/L 的浓度

复溶后配制反应体系。将核酸阳性质控样品 Mb/QC/DNA、Pm/QC/DNA、Mh/QC/DNA 用 1×TE 缓冲液 10 倍稀释至 10^{–5} 作为模板, 每个稀释度设置 3 个重复。三重 qPCR 反应体系(25 μL): 1×Taq Master Mix 12 μL, *M. bovis*、P.m、M.h 的上、下游引物(100 μmol/L)各 0.06 μL, 探针(100 μmol/L)各 0.03 μL, DNA 模板 5 μL, ddH₂O 7.85 μL。三重 qPCR 反应条件: 37 °C 预孵育 2 min, 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。收集 FAM、VIC、Cy5 荧光信号。通过比较各引物探针组合的 C_t 值和扩增曲线, 选择 C_t 值最小且扩增曲线最典型的组合。

1.5 反应优化

对引物探针浓度、退火温度和延伸时间分别进行优化。通过配制不同引物探针浓度的反应液体系(表 1), 选择检测 C_t 值最小且扩增曲线最典型的浓度进行优化。以最优浓度为基础, 改变退火温度(55–65 °C, 以 2 °C 为梯度)进行反应, 选择最佳退火温度。在最佳浓度和退火温度条件下, 改变延伸时间(10–60 s, 以 10 s 为梯度), 通过对比检测 C_t 值和扩增曲线, 确定最佳延伸时间。

1.6 标准曲线建立

采用平板菌落计数法确定菌株浓度后, 用 TE 缓冲液进行 10 倍梯度稀释至 10^{–7} CFU/mL。

表1 优化引物探针浓度时配制的反应液体系

Table 1 The reaction mixture system for optimization of primer and probe concentrations

Primers and probes (100 μmol/L)	Combinations of primer probes at different concentrations (μL)								
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	Group 9
<i>M. bovis</i> -F	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	6.0	6.0	6.0
<i>M. bovis</i> -R	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	6.0	6.0	6.0
<i>M. bovis</i> -P	1.0	1.3	1.6	1.0	1.3	1.6	1.0	1.3	1.6
P.m-F	2.0	2.0	2.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0
P.m-R	2.0	2.0	2.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0
P.m-P	1.0	1.3	1.6	1.0	1.3	1.6	1.0	1.4	1.8
M.h-F	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	6.0	6.0	6.0
M.h-R	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	6.0	6.0	6.0
M.h-P	1.0	1.3	1.6	1.0	1.3	1.6	1.0	1.8	1.0

以每个稀释度的核酸为模板，进行 5 次重复反应。在已优化的程序下，使用最佳浓度的三重荧光 PCR 反应液进行反应。以 C_t 值为纵坐标，lg CFU/mL 为横坐标，利用 GraphPad Prism 10.0 绘制标准曲线，并计算 R^2 值和扩增效率。

1.7 敏感性验证

将核酸敏感性质控样品进行 10 倍梯度稀释至 10^{-6} CFU/mL，选取出现 C_t 值的最低浓度及其邻近浓度，分别重复测定 20 次，以 95% 置信区间内至少 19 次阳性为判定标准。

1.8 重复性验证

预先配制三批三重荧光反应液，随机选取一批，以 3 种敏感性质控样品为模板进行 3 种梯度稀释(10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})，每种稀释度重复 8 次反应，其余两批按相同方法操作，记录 C_t 值，并统计分析变异率。

1.9 特异性验证

选取牛呼吸道及环境中常见的病原菌，包括大肠埃希氏菌、肠道沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、肉芽肿曼氏杆菌、丝状支原体、牛鼻支原体、病毒性腹泻病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛疱疹病毒 1 型、昏睡嗜血杆菌、牛结核分枝杆菌、肺炎克雷伯氏菌、肺炎链球菌，使用优化后的方法进行检测，观察其是否出现扩增曲线和 C_t 值。

1.10 流行病学调查

本研究于 2023–2024 年从全国 51 个牧场采集了 1 252 份临床样本(2023 年 825 份，2024 年 427 份)，所有样本均来自具有呼吸道临床症状的牛只。应用本研究建立的三重 qPCR 方法检测牛支原体、多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌。数据采用卡方检验(χ^2)比较区域间差异，置信区间计算基于二项分布。

2 结果与分析

2.1 敏感性质控品制备

通过平板菌落计数，牛支原体、多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌在梯度稀释前的浓度分别为 5.0×10^5 、 4.1×10^7 和 3.0×10^7 CFU/mL。当 C_t 值约为 25 时，这些细菌的敏感性质控品 Mb/QC/DNA、Pm/QC/DNA 和 Mh/QC/DNA 对应的 CFU 分别为 5.0×10^5 、 4.1×10^5 和 3.0×10^5 CFU/mL (表 2)。将此时的核酸浓度稀释后进行冻干处理，即可得到白色粉末状的冻干质控品。

2.2 引物、探针筛选结果

通过软件共设计了 9 套引物探针(表 3)，其中牛支原体的探针为 FAM，多杀性巴氏杆菌的探针为 VIC，溶血性曼氏杆菌的探针为 Cy5。利用 DNASTar 11.1 软件分析引物二聚体和发夹结构的 ΔG 值(> -10 kcal/mol)，最终选出 6 组可匹配的三重引物探针组合(表 4)。通过比较这 6 组的检测 C_t 值和扩增曲线，选择了组合 6 作为最

表2 不同稀释度下多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌和牛支原体的平均 C_t 值

Table 2 The average C_t values for qPCR detection of P.m, M.h and *Mycoplasma bovis* at different dilutions

Dilution	P.m average C_t value	M.h average C_t value	<i>M. bovis</i> average C_t value
Bacteria liquid	19.67	20.60	26.65
10^{-1}	23.06	23.91	29.04
10^{-2}	26.50	26.35	32.76
10^{-3}	29.91	30.83	34.51
10^{-4}	33.69	34.42	N/A
10^{-5}	36.88	38.29	N/A
10^{-6}	39.51	N/A	N/A
Blank control	N/A	N/A	N/A

N/A: Not available.

表3 引物探针序列

Table 3 Sequences of primers and probes

Number	Primers name	Primer sequences (5'→3')
1	MB/F1	CAGTGCTGATGTTGAATA
	MB/R1	GCTTCATTAACCTGTTGTA
	MB/P1	FAM-ACCGCCATCAGCTATACTAAGTCAT-BHQ1
2	MB/F2	GAATTTACGCAAGAGAATGCTTCA
	MB/R2	GCAATGCCTCTTTATTTGTTTTACAG
	MB/P2	FAM-TGACGGCGCTATTAA-MGB
3	MB/F4	AAACCAAAGCCTTAATTGACCT
	MB/R4	TCCATATTTGGACCTAGTCCTT
	MB/P4	FAM-ACCGGTTTGCAAAGTCGCACT-BHQ1
4	PM/5F	GGAGTTTGGTGTGTTGAG
	PM/5R	CAGACTGACAAGGAAATATAAAC
	PM/5P	VIC-AATCTGCTTCCTTGACAACGGC-BHQ1
5	PM/6F	CCTTGTCAGTCTGATTTATC
	PM/6R	GACCAAAATAGGTAACCAATA
	PM/6P	VIC-CCGCTCTGTCTTAATGGCTTC-BHQ1
6	PM/7F	GCTYGTGTGAGTGGGCTTGT
	PM/7R	GCCGTTGTCAAGGAAGCAGAT
	PM/7P	VIC-TTTGTTGGGCRGAGTTTGGTG-BHQ1
7	MH/8F	GATCGAATTATTGTGATG
	MH/8R	GGTGTAAGTAGGAATAAAGTC
	MH/8P	Cy5-CAAGGCAAGCACCACTACT-BHQ2
8	MH/9F	TATTAGCAACCATTTGGGCAACA
	MH/9R	CAATCACTTGCCCTGATAGCAT
	MH/9P	Cy5-ACCTTTGGCTAGGGGCACACT-BHQ2
9	MH/F1	TGTTAGAGGCCACCGCTCTG
	MH/R1	CGCATCCGGGCTAATATGTTT
	MH/P1	Cy5-CACCTCCTGCCCTGCTGCAACAA-BHQ2

表4 六组引物探针组合

Table 4 Six combinations of the primers and probes

Triple primer probe combination	Primer probe number		
Group 1	1	4	7
Group 2	1	5	7
Group 3	2	6	9
Group 4	2	4	8
Group 5	3	4	9
Group 6	2	4	9

佳方案, 其 C_t 值最小, 3 个通道均显示完整的扩增曲线, 且扩增曲线最为典型(图 1)。

2.3 反应条件优化结果

对引物、探针浓度、退火温度和延伸时间分别进行优化后, 确定的最佳浓度比例: 反应

体系 25 μL , 3 种病原体的上、下游引物均为 (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μL , 探针均为 0.08 μL ; 其余用酶反应液补足至 20 μL , 反应模板为 5 μL 。

最终确定的反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 共 40 个循环; 在 59 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM、VIC 和 Cy5 荧光信号。

2.4 建立的标准曲线

溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌和牛支原体的初始浓度分别为 8×10^7 、 4×10^7 、 4×10^7 CFU/mL, 提取核酸并进行梯度稀释后在最佳反应条件下进行反应。通过软件分析, 生成了三重 qPCR 标准曲线(图 2)。结果显示, 标准曲线线性关系良好, 引物扩增效率分别为 92%、93% 和 93%, 符合要求。

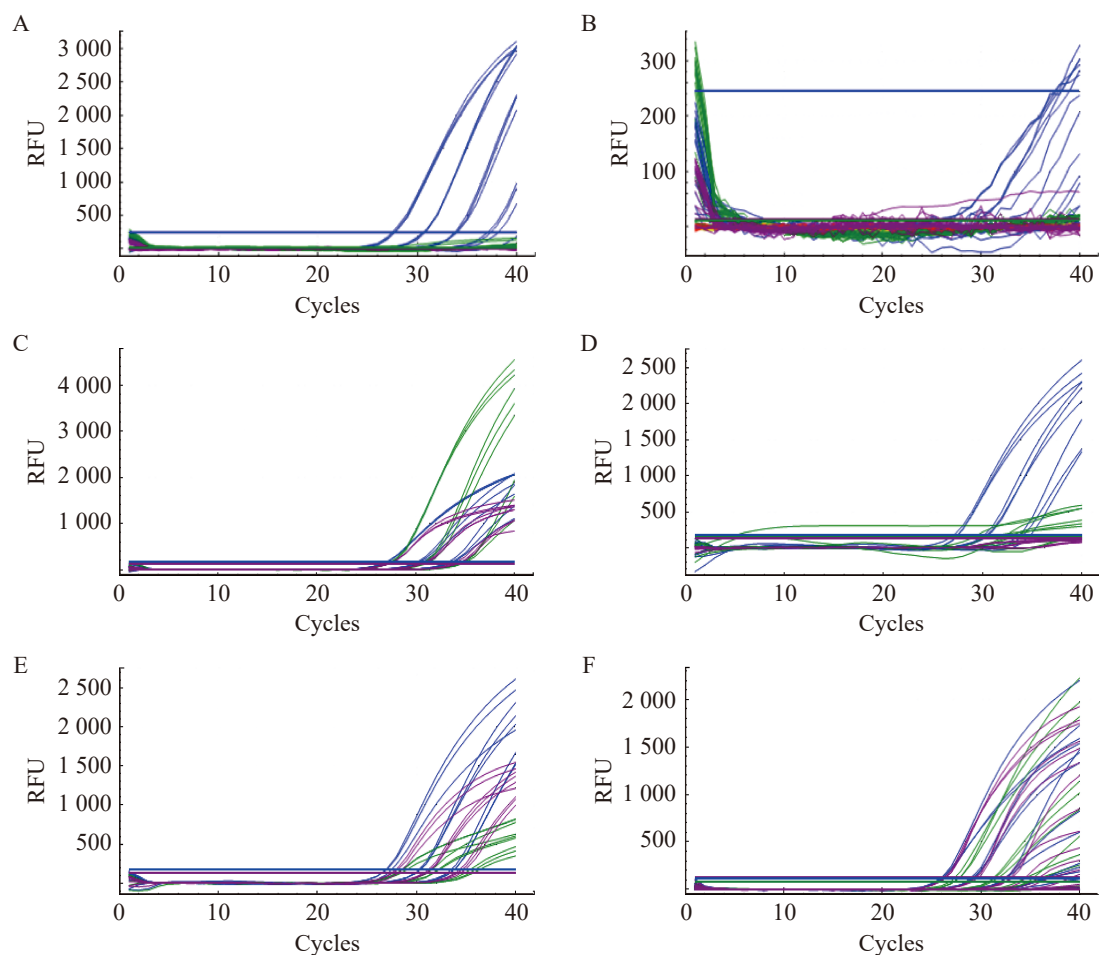


图1 六组引物探针组合的qPCR扩增曲线。A-F: 组合1-6的qPCR扩增曲线。

Figure 1 The qPCR curves of six combinations of primers and probes. A-F: The qPCR curves of group 1 to group 6.

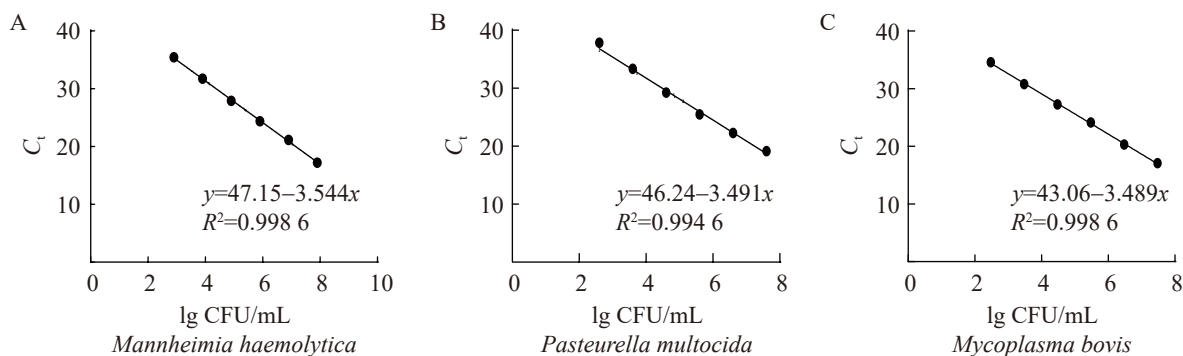


图2 三重qPCR标准曲线。A: 溶血性曼氏杆菌的标准曲线; B: 多杀性巴氏杆菌的标准曲线; C: 牛支原体的标准曲线。

Figure 2 The triple qPCR standard curve. A: *Mannheimia haemolytica* detection standard curve; B: *Pasteurella multocida* detection standard curve; C: *Mycoplasma bovis* detection standard curve.

2.5 敏感性试验结果

质控品在 10^{-2} 稀释度下均能检测出 C_t 值 (图 3), 进一步将质控品稀释至原始浓度的 0.500 0%、0.250 0%、0.125 0% 和 0.062 5%, 并进行 20 次重复实验。结果表明, 3 种质控品均在 0.250 0% 浓度时检出 C_t 值的次数 ≥ 19 次: Mb/QC/DNA 在 0.250 0% 浓度时平均 C_t 值为 38.39, 最低检出量为 2.50×10^3 CFU/mL; Pm/QC/DNA 在 0.250 0% 浓度时平均 C_t 值为 37.43, 最低检出量为 1.26×10^3 CFU/mL; Mh/QC/DNA 在 0.250 0% 浓度时平均 C_t 值为 37.68, 最低检出量为 7.50×10^2 CFU/mL。通过 GraphPad 10.0 软件绘制 ROC 曲线, 采用约登指数确定最佳 cut-off 值为 38.75, 该阈值对应灵敏度与特异性的最大平衡。

2.6 重复性试验结果

对不同浓度质控品进行检测后, 3 批预混酶反应液的 C_t 值变异率 (图 4) 显示, 批内和批间变异系数均小于 2%, 表明该多重荧光 PCR 检测方法具有较好的重复性。

2.7 特异性试验结果

对 1.9 节中提到的 17 种病原菌的核酸进行特异性检测。结果表明, 仅 Pm、Mh 和 Mb 的

敏感性质控品显示出扩增曲线 (图 5), 表明本研究建立的三重荧光 PCR 检测方法具有较高的特异性。

2.8 临床检测结果

对安徽某牧场样本的符合率分析显示 (表 5), 牛支原体的阳性和总体符合率均为 100.00%; 多杀性巴氏杆菌的阳性符合率为 88.00%, 总体符合率为 98.40%; 溶血性曼氏杆菌的阳性符合率为 92.86%, 总体符合率为 97.60%。

2.9 BRDC 细菌性病原体在我国的流行病学特征

2.9.1 病原体流行特征

应用本研究建立的牛支原体、多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌三重 qPCR 方法对 2023 年 1 月至 2024 年 12 月期间采集的 1 252 份 BRDC 临床样本进行检测。结果显示, 950 份样本 (75.9%, 95% CI 73.4%–78.3%) 至少检测到一种目标细菌性病原体阳性。其中, 多杀性巴氏杆菌的阳性率显著高于其他两种病原体 ($\chi^2=47.6$, $P<0.001$), 提示其在 BRDC 发病中可能占据主导地位 (表 6)。

在 950 份阳性样本中, 混合感染占比 48.8% (463/950), 双重感染为主导, 占比 36.0%

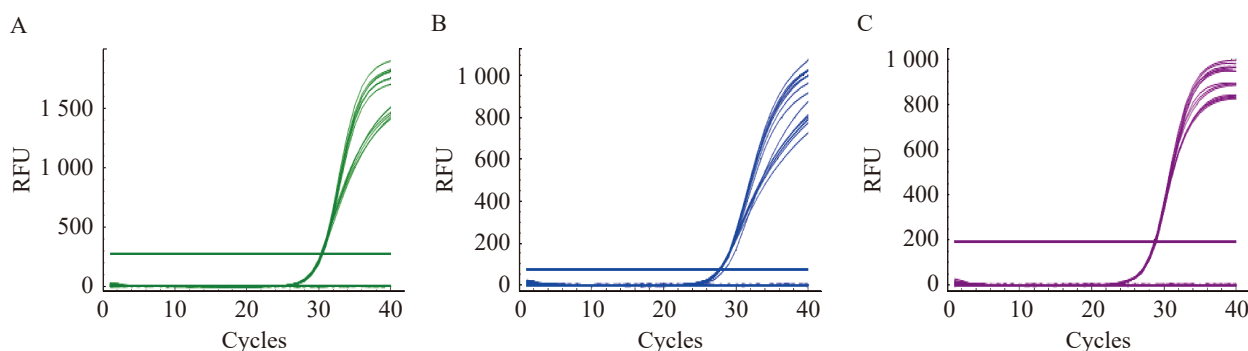


图3 多重荧光PCR敏感性试验。A: 不同浓度牛支原体的qPCR曲线; B: 不同浓度多杀性巴氏杆菌的qPCR曲线; C: 不同浓度溶血性曼氏杆菌的qPCR曲线。

Figure 3 The sensitivity of triplex qPCR. A: The qPCR curves for detection of *M. bovis* at different concentrations; B: The qPCR curves for detection of *P. m* at different concentrations; C: The qPCR curves for detection of *M. h* at different concentrations

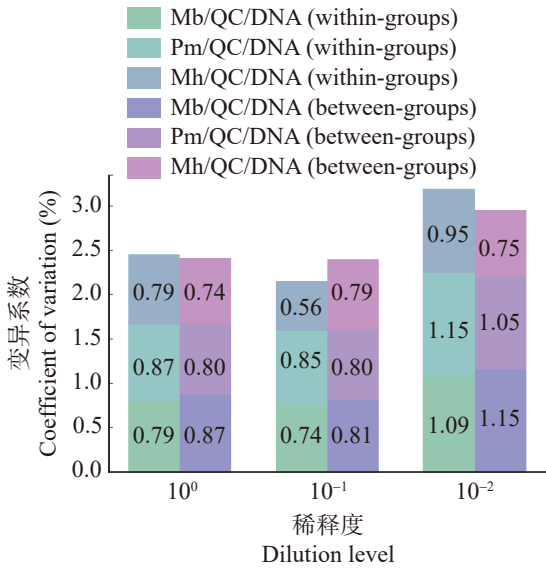


图4 不同质控DNA的批内和批间变异系数比较
Figure 4 CV Comparison between and within batches for different QC DNAs.

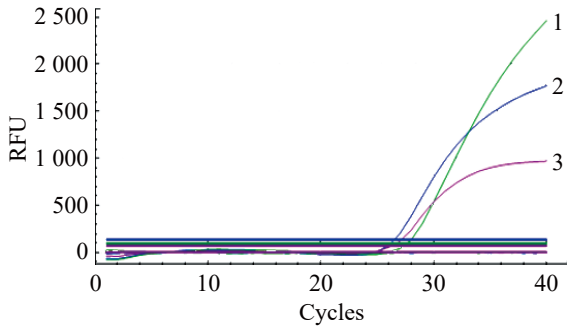


图5 多重荧光PCR特异性试验。1：牛支原体曲线；2：多杀性巴氏杆菌曲线；3：溶血性曼氏杆菌曲线。
Figure 5 The specificity of triplex qPCR. 1: The qPCR curve of *M. bovis*; 2: The qPCR curve of *P.m.*; 3: The qPCR curve of *M.h.*

(342/950), 其中“牛支原体+多杀性巴氏杆菌”组合占 58.2% (199/342), 三重感染占 12.8% (121/950) (图 6)。

2.9.2 地理分布规律

BRDC 主要细菌性病原体地理分布总体呈现北高南低的趋势(表 7), 华北、东北和西北地

表5 临床样本检测结果

Table 5 The results of clinical sample detection

Pathogen	Bacterial isolation result	Triple qPCR result		Kappa coefficient
		Negative	Positive	
<i>M. bovis</i>	Negative	116	0	1.000 0
	Positive	0	9	
<i>P.m.</i>	Negative	115	1	0.984 0
	Positive	1	8	
<i>M.h.</i>	Negative	109	2	0.976 0
	Positive	1	13	

表6 1 252份临床样本主要病原体阳性率分布

Table 6 Distribution of prevalence rates of major pathogens in 1 252 BRDC suspected samples

Pathogen	Number of positive samples	Positivity rate (%; 95% CI)
<i>P.m.</i>	412	32.9 (30.3–35.6)
<i>M. bovis</i>	328	26.2 (23.8–28.7)
<i>M.h.</i>	267	21.3 (19.1–23.7)

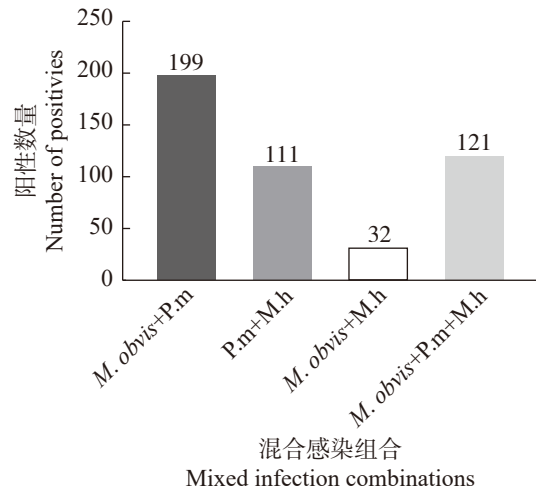


图6 混合感染各组合数量统计图

Figure 6 Statistical chart of the number of co-infections in detected samples.

区为高发区, 平均阳性率均超过 35.0%, 其中多杀性巴氏杆菌在东北地区的阳性率高达 48.5%, 显著高于其他区域($\chi^2=47.6$, $P<0.001$)。

表7 各区域病原体阳性率统计

Table 7 Statistics of pathogen positivity rates in various regions

Region	<i>M.bovis</i> positive rate (% , 95% CI)	P.m positive rate (% , 95% CI)	M.h positive rate (% , 95% CI)	Province/city/Autonomous region with high incidence
Northeast China	40.7 (33.1–48.8)	48.5 (40.8–56.3)	28.1 (21.7–35.6)	Hulunbuir, Tongliao, Chifeng
North China	41.1 (34.7–47.8)	46.8 (40.2–53.5)	23.4 (18.1–29.5)	Hohhot, Baotou, Ulanqab
Northwest	37.3 (29.6–45.7)	44.4 (36.3–52.7)	23.9 (17.5–31.7)	Bayannur, Ningxia Hui Autonomous Region, Xinjiang Uygur Autonomous Region
East China	15.7 (10.9–22.0)	20.2 (14.7–27.0)	11.8 (7.6–17.7)	Shandong, Anhui, Jiangsu
Central China	14.6 (8.4–23.6)	19.1 (11.9–28.8)	10.1 (5.1–18.3)	Henan, Hubei, Hunan
Southwest China	8.9 (2.9–21.3)	15.6 (6.9–29.8)	6.7 (1.8–18.5)	Yunnan

2.9.3 季节分布规律

冬季(12月至次年2月)为全年感染高峰, 多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌的阳性样本数最多, 混合感染占比最高, 以“牛支原体+巴氏杆菌”组合为主(58%)。夏季(6–8月)感染强度整体下降, 但牛支原体仍保持一定活跃度。值得注意的是, 虽然夏季溶血性曼氏杆菌阳性样本数较低, 但云南地区雨季(6–9月)溶血性曼氏杆菌感染风险较早季有所升高, 可能与高湿度(>80%)环境下细菌生物被膜形成能力增强密切相关。春季(3–5月)和秋季(9–11月)为过渡期, 多杀性巴氏杆菌感染规模逐步上升, 可能与动物运输和气候应激相关(图7)。

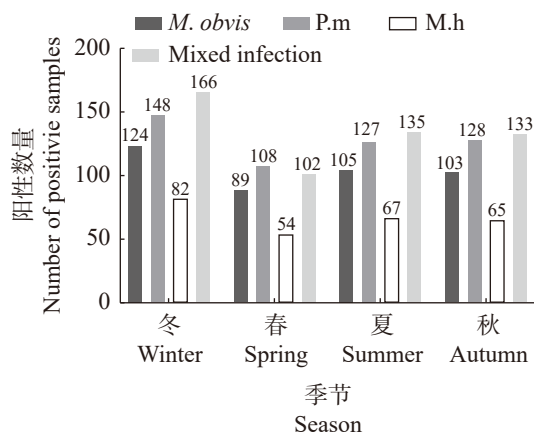


图7 各季节病原体阳性样本数

Figure 7 Number of positive samples for pathogens based on seasons.

3 讨论

3.1 方法学创新

相较于传统检测手段, 本研究建立的同步检测体系具有显著优势。在靶基因选择上, 本研究采用 *uvrC*、*Kmt1* 和 *lktD* 基因, 避免了传统 16S rRNA 靶标因保守性过高而导致的交叉反应问题^[22]。牛支原体的 *uvrC* 基因作为 DNA 修复基因^[23], 具有高保守性和高灵敏度, 能够检测低至 83 个基因拷贝的感染^[24], 且在奶样、组织样本等多种临床样本中表现出良好的稳定性^[25]。多杀性巴氏杆菌的 *Kmt1* 基因具有较高保守性, 针对该基因的实时定量 PCR 表现出高灵敏度和特异性^[26]。溶血性曼氏杆菌的 *lktD* 基因编码白细胞毒素, 具有高度特异性^[27], 能够有效区分曼氏杆菌与其他类似病原, 尤其在混合感染情况下显著降低了假阳性率^[28]。

与传统培养法需要 48–72 h 相比, 本方法能在 3 h 内完成检测, 且单次反应成本降低了约 40%^[29]。对于混合感染样本, 三重 qPCR 体系在灵敏度上优于单重 qPCR, 尤其在三重感染的精准识别上表现更为突出, 为处理复杂临床病例提供了新的解决方案^[24]。

3.2 流行病学特征

本研究通过对全国 51 个牧场的 1 252 份临床样本进行检测, 揭示了我国 BRDC 细菌性病原体的流行特征具有时空特异性。结果显示,

多杀性巴氏杆菌的总体阳性率最高,牛支原体次之,两者混合感染占比达 58.2%。牛支原体全年检出稳定,推测其免疫逃逸与耐药性进化可能支持其长期定殖^[30];而多杀性巴氏杆菌冬季阳性率显著升高,可能与低温应激及黏膜屏障功能削弱有关^[31]。混合感染占比 48.8%,其中三重感染病例(12.8%)多伴随严重临床症状,提示病原体的协同作用可能通过基因水平转移加速耐药性扩散^[32-33]。

从地理分布来看,北方地区病原阳性率普遍高于南方,其中东北地区多杀性巴氏杆菌阳性率高达 48.5%,可能与寒冷气候延长病原气溶胶存活时间及规模化牧场密集有关^[34]。此外,云南雨季(6-9 月)溶血性曼氏杆菌感染率异常升高,可能与高湿度促进其生物被膜形成能力相关^[35]。

3.3 局限性及未来方向

尽管本研究取得了重要进展,但仍存在一些局限性。首先,本研究未涉及病毒病原体的检测。BRDC 通常由病毒与细菌共同感染引起,未来研究应加入病毒检测(如 BRSV、BPIV3),以更全面地分析病原体的协同作用^[36]。其次,本研究样本主要来源于规模化牧场,缺乏对散养牛群和不同品种感染差异的探讨。未来可扩大采样范围,进一步完善流行病学数据。此外,尽管本研究发现了较高比例的混合感染,但未深入分析病原体的耐药基因分布。抗生素滥用可能加剧 BRDC 治疗的难度,未来可结合基因组测序深入探讨病原耐药性的发展趋势^[37-38]。

4 结论

本研究成功建立了一种基于牛支原体 *uvrC* 基因、多杀性巴氏杆菌 *Kmt1* 基因及溶血性曼氏杆菌 *lktD* 基因的三重荧光定量 PCR 检测方法。该方法灵敏度高(最低检出限为 $7.5 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ CFU/mL)、特异性强(与其他呼吸道病原无交叉反应),且重复性优异(批内/批间变异系数

<2%)。临床样本检测显示,牛支原体、溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的总体符合率分别为 100.00%、97.60% 和 98.40%,显著优于传统培养法。流行病学调查表明,在 1 252 份临床样本中细菌性病原总体检出率为 75.9%,混合感染占比 48.8%,冬季为发病高峰。牛支原体为全年稳定存在的核心病原,多杀性巴氏杆菌冬季检出率显著升高。需要强调的是,BRDC 的典型发病机制中,病毒的初始感染可破坏呼吸道屏障并抑制宿主免疫,为条件致病菌的继发感染提供条件。本研究未将病毒性病原纳入研究范围,未来将进一步结合病毒检测数据以明确其动态机制。

作者贡献声明

马彦颖:方法验证,完成呈现,撰写文章;高磊:方法的初步建立;宫枫举:监督管理;吴雨伦:临床样本检测;李旭雯:分离菌株;张志:研究构思和设计;孙学强:提出概念;潘子豪:项目管理,提供资源;姚火春:实验指导,文稿审阅及修改建议。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] GOTO Y, FUKUNARI K, SUZUKI T. Multiplex RT-qPCR application in early detection of bovine respiratory disease in healthy calves[J]. *Viruses*, 2023, 15(3): 669.
- [2] GAUDINO M, NAGAMINE B, DUCATEZ MF, MEYER G. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: a comprehensive literature review of experimental evidence[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1): 70.
- [3] PANSRI P, KATHOLM J, KROGH KM, AAGAARD AK, SCHMIDT LB, KUDIRKIENE E, LARSEN LE, OLSEN JE. Evaluation of novel multiplex qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex[J]. *Veterinary Journal*, 2020, 256: 105425.
- [4] 刘志鹏,董秀梅,师东方,王宇.牛呼吸道疾病综合征的

- 主要病原[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(12): 9-11.
- LIU ZP, DONG XM, SHI DF, WANG Y. The main pathogen of bovine respiratory disease syndrome[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012(12): 9-11 (in Chinese).
- [5] 闵聪聪, 候强强, 于凡淞, 项志杰, 陈颖钰, 胡长敏, 郭爱珍. 牛呼吸疾病综合征诊断方法的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 17-23.
- MIN CC, HOU QQ, YU FS, XIANG ZJ, CHEN YY, HU CM, GUO AZ. Research progress on diagnostic methods of bovine respiratory disease complex[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2023, 42(2): 17-23 (in Chinese).
- [6] TRIEBEL S, SACHSE K, WEBER M, HELLER M, DIEZEL C, HÖLZER M, SCHNEE C, MARZ M. *De novo* genome assembly resolving repetitive structures enables genomic analysis of 35 European *Mycoplasma mycoides* strains[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 548.
- [7] AMBROSET C, PETICCA A, TRICOT A, TARDY F. Genomic features of *Mycoplasma bovis* subtypes currently circulating in France[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 603.
- [8] YAIR Y, BOROVOK I, MIKULA I, FALK R, FOX LK, GOPHNA U, LYSNYANSKY I. Genomics-based epidemiology of bovine *Mycoplasma bovis* strains in Israel[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 70.
- [9] HET LAM J, DERKMAN THJ, van GARDEREN E, DIJKMAN R, van ENGELN E. Distinct *Mannheimia haemolytica* serotypes isolated from fatal infections in veal calves and dairy cows[J]. The Veterinary Journal, 2023, 292: 105940.
- [10] KAYAL A, NAHAR N, BARKER L, TRAN T, WILLIAMS M, BLACKALL PJ, TURNI C, OMALEKI L. Molecular identification and characterisation of *Mannheimia haemolytica*[J]. Veterinary Microbiology, 2024, 288: 109930.
- [11] CL, COOK SR, ZAHEER R, LAING C, GANNON VP, XU Y, RASMUSSEN J, POTTER A, HENDRICK S, ALEXANDER TW, McALLISTER TA. Comparative genomic analysis of *Mannheimia haemolytica* from bovine sources[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149520.
- [12] MA H, ALT DP, FALKENBERG SM, BRIGGS RE, TATUM FM, CLAWSON ML, CASAS E, DASSANAYAKE RP. Transcriptomic profiles of *Mannheimia haemolytica* planktonic and biofilm associated cells[J]. PLoS One, 2024, 19(2): e0297692.
- [13] JACKSON W, TUCKER J, FRITZ H, BROSS C, ADAMS J, SILVA M, LORENZ C, MARSHALL E. Antimicrobial susceptibility profiles among commensal *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from apparently healthy sheep processed in California: results from a cross-sectional pilot study[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2024, 233: 106360.
- [14] 彭忠, 梁婉, 吴斌. 多杀性巴氏杆菌分子分型方法简述[J]. 微生物学报, 2016, 56(10): 1521-1529.
- PENG Z, LIANG W, WU B. Molecular typing methods for *Pasteurella multocida*: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(10): 1521-1529 (in Chinese).
- [15] 林立山, 黄秦, 才灵杰, 马家乐, 姚火春, 潘子豪. 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 LS, HUANG Q, CAI LJ, MA A, YAO HC, PAN ZH. Isolation and diversity analysis of bovine *Pasteurella multocida*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2240-2248 (in Chinese).
- [16] HODZIC E, GLAVINIC A, WADEMAN C. A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR[J]. BiomolBiomed, 2023, 23(4): 640-648.
- [17] KAMEL MS, DAVIDSON JL, VERMA MS. Strategies for bovine respiratory disease (BRD) diagnosis and prognosis: a comprehensive overview[J]. Animals, 2024, 14(4): 627.
- [18] CHANG YM, YUE H, TANG C. Prevalence and molecular characteristics of bovine respiratory syncytial virus in beef cattle in China[J]. Animals, 2022, 12(24): 3511.
- [19] ROSSETTI BC, FREY J, PILO P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR[J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(5): 321-323.
- [20] 许腾林, 邢桂玲, 刘家森, 刘大飞, 李志杰, 姜骞, 康洪涛, 田进, 郭东春, 曲连东. 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 TL, XING GL, LIU JS, LIU DF, LI ZJ, JIANG Q, KANG HT, TIAN J, GUO DC, QU LD. 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).
- [21] KLIMA CL, ZAHEER R, BRIGGS RE, McALLISTER TA. A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139: 155-160.
- [22] VĚTROVSKÝ T, BALDRIAN P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57923.
- [23] EISSA S, HASHEM Y, ABO-SHAMA H, SHAKER M. Sequence analysis of three genes of *Mycoplasma bovis* isolates from Egyptian cattle and buffaloes[J]. British Microbiology Research Journal, 2016, 14(3): 1-10.
- [24] NAIKARE H, BRUNO D, MAHAPATRA D, REINISCH A, RALEIGH R, SPROWLS R. Development and

- evaluation of a novel Taqman real-time PCR assay for rapid detection of *Mycoplasma bovis*: comparison of assay performance with a conventional PCR assay and another Taqman real-time PCR assay[J]. *Veterinary Sciences*, 2015, 2(1): 32-42.
- [25] CHAUHAN K, ALY SS, LEHENBAUER TW, TONOOKA KH, GLENN K, ROSSITTO P, MARCO ML. Development of a multiplex qPCR assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* species, and *Acholeplasma laidlawii* in milk[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11881.
- [26] POUSSARD M, PANT SD, HUANG J, SCOTT P, GHORASHI SA. Comparative evaluation of PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detecting *Pasteurella multocida* in poultry[J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2025, 73(2): 134-142.
- [27] AVALOS-GÓMEZ C, REYES-LÓPEZ M, RAMÍREZ-RICO G, DÍAZ-APARICIO E, ZENTENO E, GONZÁLEZ-RUIZ C, deLa GARZA M. Effect of apolactoferrin on leukotoxin and outer membrane vesicles of *Mannheimia haemolytica* A2[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 36.
- [28] SINGH K, RITCHEY JW, CONFER AW. *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in Bovine Pneumonia[J]. *Veterinary Pathology*, 2010, 48(2): 338-348.
- [29] SCHOONBROODT S, ICHANTÉ JL, BOFFÉ S, DEVOS N, DEVASTER JM, TADDEI L, RONDINI S, ARORA AK, PASCAL T, MALVAUX L. Real-time PCR has advantages over culture-based methods in identifying major airway bacterial pathogens in chronic obstructive pulmonary disease: results from three clinical studies in Europe and North America[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13: 1098133.
- [30] MAUNSELL FP, CHASE C. *Mycoplasma bovis*: interactions with the immune system and failure to generate an effective immune response[J]. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 2019, 35(3): 471-483.
- [31] CALDERÓN BERNAL JM, FERNÁNDEZ A, ARNAL JL, SANZ TEJERO C, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL JF, VELA AI, CID D. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* associated with bovine respiratory disease outbreaks[J]. *Animals*, 2022, 13(1): 75.
- [32] ABED AH, EL-SEEDY FR, HASSAN HM, NABIH AM, KHALIFA E, SALEM SE, WARETH G, MENSRAWY AMS. Serotyping, genotyping and virulence genes characterization of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates recovered from pneumonic cattle calves in north upper Egypt[J]. *Veterinary Sciences*, 2020, 7(4): 174.
- [33] VALERIS-CHACIN R, POWLEDGE S, McATEE T, MORLEY PS, RICHESON J. *Mycoplasma bovis* is associated with *Mannheimia haemolytica* during acute bovine respiratory disease in feedlot cattle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 946792.
- [34] SU A, TONG J, FU YG, MÜLLER S, WELDEAREGAY YB, BECHER P, VALENTIN-WEIGAND P, MEENS J, HERRLER G. Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria-host interactions[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 140.
- [35] RUIZ-MAZÓN L, RAMÍREZ-RICO G, deLa GARZA M. Lactoferrin affects the viability of bacteria in a biofilm and the formation of a new biofilm cycle of *Mannheimia haemolytica* A2[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(16): 8718.
- [36] SETTYPALLI TBK, LAMIEN CE, SPERGSR J, LELENTA M, WADE A, GELAYE E, LOITSCH A, MINOUNGOU G, THIAUCOURT F, DIALLO A. One-step multiplex RT-qPCR assay for the detection of *Peste des petits ruminants virus*, *Capripoxvirus*, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma capricolum* subspecies (ssp.) *capripneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153688.
- [37] Van CAMP PJ, HASLAM DB, POROLLO A. Prediction of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria from whole-genome sequencing data[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1013.
- [38] WOODS RJ, BARBOSA C, KOEPPING L, RAYGOZA JA, MWANGI M, READ AF. The evolution of antibiotic resistance in an incurable and ultimately fatal infection: a retrospective case study[J]. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2023, 11(1): 163-173.