

3 种检测布鲁氏菌荧光定量 PCR 方法的比较

董浩^{1,2}, 原霖², 赵明海¹, 许中衍¹, 刘巍¹, 徐阳², 陈亚娜², 梁春南^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 102618)

摘要: 为了筛选适用于家畜布鲁氏菌病检测的荧光定量 PCR 方法, 合成目前报道最多的布鲁氏菌 *IS711* 插入序列、*per* 基因和 *bcp31* 基因的引物和探针, 并分别对这 3 种荧光定量 PCR 方法的敏感性、特异性、重复性以及 63 份临床样品检测效果进行比较。结果显示: 3 种荧光定量 PCR 方法均具有较好的敏感性且均不与其他常见细菌发生交叉反应; 3 种方法的批内变异系数和批间变异系数均小于 5%。在检测临床样品时, 3 种方法的敏感性均高于套式 PCR 方法, 其中 *IS711* 荧光定量 PCR 方法与套式 PCR 方法符合率为 95.24%, 其他 2 种方法与套式 PCR 方法的符合率为 98.41%。比较而言, *IS711* 荧光定量 PCR 敏感性最高, 更适合于布鲁氏菌核酸含量低的样品的检测。

关键词: 布鲁氏菌; 荧光定量 PCR; 方法比对; *IS711* 插入序列

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)06-0947-06

Comparison of three real time PCR assays for *Brucella*

DONG Hao^{1,2}, YUAN Lin², ZHAO Minghai¹, XU Zhongkan¹, LIU Wei¹, XU Yang², CHEN Yana², LIANG Chunnan¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629; 2. China Animal Disease Control Center, Beijing 102618)

Abstract: To select a real time PCR method for the detection of animal brucellosis, the primers and probes of three real time PCR methods (*IS711* insertion sequence, *per* gene and *bcp31* gene), which were most reported, were synthesized. The sensitivity, specificity and repeatability of the three methods were tested. In addition, 63 clinical samples were also tested using the three real time PCR methods. The results indicated that the three real time PCR methods had good sensitivity and did not cross-react with the DNA samples from other common bacteria. Both intra-batch coefficient of variation and inter-batch coefficient of variation of the three methods were less than 5%. When testing clinical samples, the sensitivity of the three methods were higher than the nested PCR method. The coincidence rate between the *IS711*-based real time PCR method and the nested PCR method was 95.24%, and which of the other two real time PCR methods and the nested PCR method were 98.41%. In comparison, the *IS711*-based real time PCR has the highest sensitivity, and it is more suitable for the detection of samples with low content of *Brucella* DNA.

Key words: *Brucella*; real time PCR; comparison of methods; *IS711* insertion sequence

布鲁氏菌病(简称布病)是由感染布鲁氏菌引起的一种危害严重的人兽共患病。布鲁氏菌主要侵害患病动物的生殖系统,以母畜发生流产和公畜睾丸炎为主要特征。人感染布病以发热、乏力、流产、睾丸炎等为主要症状,严重影响患者的生活质量,甚至丧失劳动能力和生育能力。布病感染人类时,需要及时进行治疗,若治疗不及时则容易转变成慢性感染。

目前,全球共有超过 170 个国家报道有人或家畜布病的发生。根据相关报道,全球每年人类新发布病病例数超过 50 万人,在布病高发的中东地区,每百万人的发病数字超过 200,但是世界卫生组织(WHO)的报告指出,真实的人间发病率应该为报告数字的 10~25 倍^[1-2]。

由于接触患病动物或被污染的动物产品是人感染布病的主要途径,畜间布病的流行情况与人间布

收稿日期: 2021-01-13

基金项目: 国家自然科学基金(31602055)资助。

作者简介: 董浩, 博士, 兽医师。E-mail: tunghao@163.com

* 通信作者: 梁春南, 副主任技师。E-mail: chunnan_liang@nifdc.org.cn

病的发生直接相关。根据现行的动物布鲁氏菌病诊断国家标准(GB/T18646—2018),家畜布病的检测方法中血清学方法应用最为广泛,包括虎红平板凝集试验、试管凝集试验、酶联免疫吸附试验、乳环试验和补体结合试验等。细菌分离试验是布病诊断的“金标准”,但是该方法分离率低、耗时费力且存在较大的生物安全风险。在现行国家标准中分子诊断方法,只推荐了 Bruce-Ladder PCR 方法,该方法属于多重 PCR,可以用于布鲁氏菌进行分型,但是该方法敏感性较低,只能对经过分离培养的布鲁氏菌核酸进行检测,不能用于临床样品的直接检测。随着荧光定量 PCR 技术的发展,该技术已经应用于越来越多种动物疫病的诊断。布鲁氏菌病的荧光定量 PCR 方法也有较多的报道,其中报道最多的是针对 *per* (DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase)、*IS711* (Transposase, IS4)和 *bcp31* (*Brucella* cell surface 31 kDa protein)这 3 个基因的荧光定量 PCR 方法^[3-4]。本研究对上述 3 种荧光定量 PCR 的敏感性、特异性、重复性以及临床样品检测效果进行了评价,以期筛选一种合适于实验室布鲁氏菌核酸检测的荧光定量 PCR 方法,为家畜布病的分子检测提供一种

有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 布鲁氏菌病 S2 疫苗株购自天康生物股份有限公司;大肠杆菌(CVCC4251)、鼠伤寒沙门氏菌(CVCC2220)、金黄色葡萄球菌(CVCC4098)、小肠结肠炎耶尔森菌(ATCC 23715)和乳酸杆菌(ATCC4356)均由本实验室保存。免疫羊的全血和阴道拭子样品采自河南省某羊场。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自西安天隆科技有限公司;GoTag Probe qPCR Master Mix,购自 Promega 公司;TE 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 Omega 公司;*Bam*H I、*Kpn* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶以及 T4 连接酶购自 NEB 公司。

1.1.3 引物和探针 套式 PCR 引物、荧光定量 PCR 所有引物探针和构建载体的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。本研究中所应用的引物和探针序列如表 1 所示。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Primers and probes

引物/探针名称	引物/探针序列 (5'-3')	用途
<i>IS711</i> -F	CGCTCGCGCGGTGGAT	
<i>IS711</i> -R	CTTGAAGCTTGCAGACAGTCACC	<i>IS711</i> 的荧光定量
<i>IS711</i> -P	FAM-ACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATG-BHQ1	
<i>Bcp31</i> -F	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC	
<i>Bcp31</i> -R	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG	<i>bcp31</i> 的荧光定量
<i>Bcp31</i> -P	FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-BHQ1	
<i>Per</i> -F	GTTTAGTTTCTTTGGGAACAAGACAA	
<i>Per</i> -R	GAGGATTGCGCGCTAGCA	<i>per</i> 的荧光定量
<i>Per</i> -P	FAM-TACGACCGGTGAAGGCGGGATG-MGB	
<i>Bcp31</i> - <i>Bam</i> H I	CGGGATCCCCACAAAGAAATAGCGTCCAG	pUC- <i>bcp31</i> 载体构建
<i>Bcp31</i> - <i>Kpn</i> I	GGGGTACCCCGTTTCGTCGAATGGCTC	
<i>Per</i> - <i>Bam</i> H I	CGGGATCCCCGATTGCTGCTTGAATAT	pUC- <i>per</i>
<i>Per</i> - <i>Kpn</i> I	GGGGTACCCACTAAGGCTGTAATGGTTGTT	载体构建
<i>IS711</i> - <i>Bam</i> H I	CGCGGATCCCGACCTTCGGCAAATGG	pUC- <i>IS711</i>
<i>IS711</i> - <i>Eco</i> R I	CCGGAATTCAATCTGATGGCGTTTCCTTG	载体构建

1.1.4 仪器 GeneRotex 全自动旋转式核酸提取仪购自西安天隆科技有限公司;ABI7500 荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取 在生物安全柜中将 S2 疫苗株按说明书使用生理盐水稀释后,取出

500 μ L 菌液分装至 1.5 mL 离心管,在 80 $^{\circ}$ C 水浴锅中灭活 2 h,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书进行布鲁氏菌基因组 DNA 的提取。将大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森菌和乳酸杆菌培养至稳定期,采用热灭活的方式将细菌灭活后,取 1 mL 培养物,

10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min 后, 吸取上清即为制备的核酸样品。

在生物安全柜中打开装有免疫羊的抗凝血样品、阴道拭子样品的抗凝采血管或离心管, 分别取 250 μL 样品溶液加入装有 20 μL 蛋白酶 K 的无菌 EP 管中, 颠倒混匀。放入 56 °C 水浴锅中作用 30 min 后, 将全部溶液组分加入预分装的基因组 DNA 提取试剂中。使 GeneRotex 全自动旋转式核酸提取仪进行提取。

1.2.2 反应体系与反应条件 荧光定量 PCR 的反应体系为 20 μL, 包括 GoTag Probe qPCR Master Mix 10 μL, 10 μmol·L⁻¹ 的上游引物和 10 μmol·L⁻¹ 的下游引物各 0.6 μL, 10 μmol·L⁻¹ 的探针 0.6 μL, DNA 模板 2 μL, 加入 ddH₂O 20 μL。反应条件为 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。在每个循环第二步收集荧光信号。

1.2.3 对照质粒的构建 以疫苗株 S2 的核酸为模板, 分别使用 *IS711* 插入序列、*per* 基因和 *bcs31* 基因的载体构建引物进行目的片段的 PCR 扩增。回收大小正确的 PCR 扩增产物, 同时提取 pUC19 质粒。使用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 限制性内切酶对 *per* 基因和 *bcs31* 基因扩增产物以及 pUC19 质粒同时进行双酶切, 回收酶切产物后使用 T4 连接酶进行连接, 连接产物转化 *DH5α* 感受态细胞, 通过 Amp 抗性和 PCR 反应鉴定阳性克隆, 阳性克隆送公司使用 M13F 和 M13R 通用引物测序。构建成功的质粒分别命名为 pUC-*per* 和 pUC-*bcs31*。pUC-*IS711* 对照质粒的构建方法与上述过程类似, 区别是使用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶对 *IS711* 基因扩增产物以及 pUC19 质粒同时进行双酶切。

1.2.4 敏感性比较 将猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的基因组 DNA 使用 TE 溶液进行 10 倍系列稀释, 依次稀释 10¹~10⁷ 倍。分别使用 *per*、*IS711* 和 *bcs31* 等 3 种荧光定量 PCR 方法对上述系列稀释的基因组 DNA 样品进行扩增。

1.2.5 特异性比较 使用 *per*、*IS711* 和 *bcs31* 等 3 种荧光定量 PCR 方法对猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株基因组 DNA、热灭活的大肠杆菌、热灭活的鼠伤寒沙门氏菌、热灭活金黄色葡萄球菌、灭活的小肠结肠炎耶尔森菌和灭活的乳酸杆菌进行检测。

1.2.6 重复性比较 将猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的基因组 DNA 使用 TE 溶液进行 10 倍系列稀释, 制备成 10⁰、10¹、10²、10³ 和 10⁴ 倍稀释样品。分别使用 *per*、*IS711* 和 *bcs31* 等 3 种荧光定量 PCR 方法对上述系列稀释的基因组 DNA 样品进行扩增。批

内重复性比较, 每个样品同时进行 3 次重复。在不同时间对上述试验进行重复 3 次, 以观察 3 种方法的批间重复性。

1.2.7 临床样品检测比较 对临床收集的 63 份免疫羊的抗凝血和阴道拭子样品, 分别使用 3 种荧光定量 PCR 方法和《奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术》(NY/T 1467—2007) 中规定的套式 PCR 方法进行检测, 计算 3 种荧光定量 PCR 方法和现行行业标准中套式 PCR 方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pUC-*per*、pUC-*IS711* 和 pUC-*bcs31* 的构建

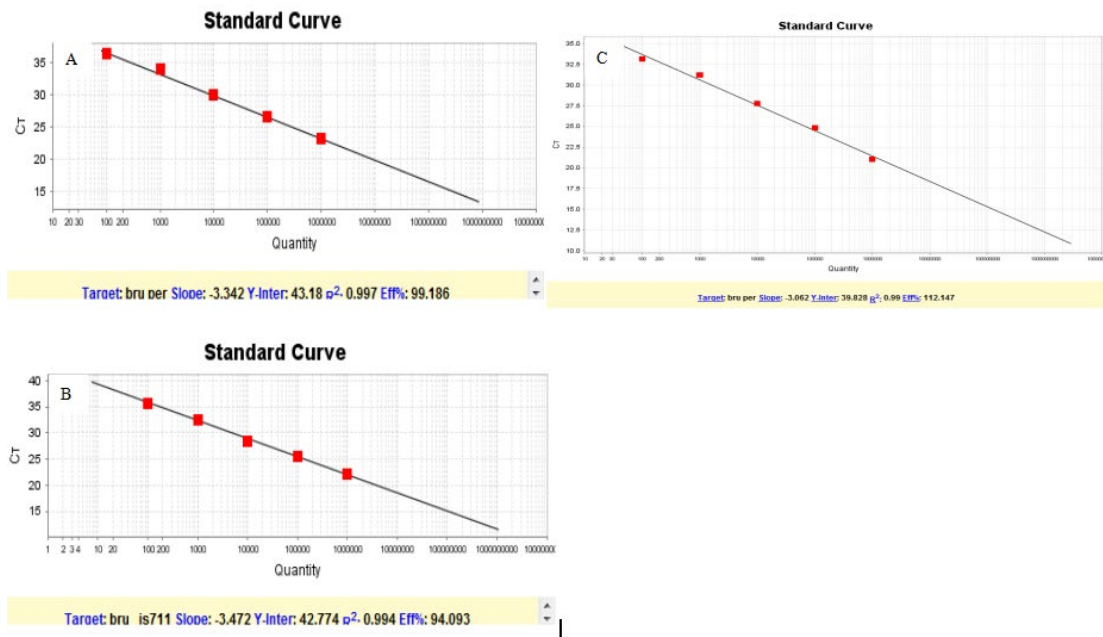
以猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的基因组 DNA 为模板, 分别设计针对 *per*、*IS711* 和 *bcs31* 基因的扩增引物, 引物序列如表 1 所示。使用 PCR 扩增上述 3 个片段, 经过双酶切后插入 pUC19 载体中, 获得重组质粒 pUC-*per*、pUC-*IS711* 和 pUC-*bcs31*。重组质粒构建完成后使用 M13F 和 M13R 通用引物测序。结果显示, pUC-*per*、pUC-*IS711* 和 pUC-*bcs31* 阳性质粒的 PCR 产物的长度分别为 360、493 和 408 bp。将测序结果与 NCBI 数据库中收录的布鲁氏菌菌株序列进行比对, 一致性均为 100%。

2.2 标准曲线的绘制

分别提取 pUC-*per*、pUC-*IS711* 和 pUC-*bcs31* 阳性质粒, 使用 TE 缓冲液进行 10 倍系列稀释, 每种阳性质粒稀释 5 个梯度。分别使用 3 种荧光定量 PCR 方法对相应的系列稀释的质粒溶液进行扩增, 从而绘制各个方法的标准曲线。结果显示, *per*、*IS711* 和 *bcs31* 3 种荧光定量 PCR 方法的 R² 值依次为 0.997、0.994 和 0.990, 3 种方法的扩增效率依次为 99.19%、94.09% 和 112.15% (图 1)。结果表明这 3 种荧光定量 PCR 的扩增效率均比较高, 线性良好。

2.3 敏感性比较

使用 TE 缓冲液将猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的基因组 DNA 进行 10 倍系列稀释, 分别使用 *per*、*IS711* 和 *bcs31* 等 3 种荧光定量 PCR 方法对系列稀释的基因组 DNA 样品进行扩增。3 种方法对不同稀释度样品的荧光定量检测结果如表 2 所示。使用 *IS711* 的荧光定量 PCR 方法可以检测到 10⁵ 倍稀释的猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的核酸, 而 *per* 和 *bcs31* 荧光定量 PCR 方法只能检测到 10⁴ 倍稀释的猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株的核酸。以上结果说明 *IS711* 荧光定量 PCR 方法的敏感性高于其他两种方法。



A. per 荧光定量 PCR 方法的标准曲线; B. IS711 荧光定量 PCR 方法的标准曲线; C. bcsp31 荧光定量 PCR 方法的标准曲线。

图 1 3 种荧光定量 PCR 方法的标准曲线

Figure 1 The standard curves using the three RT-PCR methods

表 2 3 种荧光定量 PCR 方法的敏感性比较结果 (Ct 值)

Table 2 Results of sensitivity comparison of the three RT-PCR methods (Ct value)

方法	稀释倍数						
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
per	26.52	30.00	33.92	36.34	Undetermined	Undetermined	Undetermined
IS711	25.61	28.47	32.44	35.58	37.96	Undetermined	Undetermined
bcsp31	26.94	29.85	33.28	36.24	Undetermined	Undetermined	Undetermined

表 3 3 种荧光定量 PCR 方法的批内重复性结果

Table 3 In batch repeatability of the three RT-PCR methods

稀释倍数	per PCR 方法		IS711 PCR 方法		bcsp31 PCR 方法	
	Ct 值平均值	变异系数/%	Ct 值平均值	变异系数/%	Ct 值平均值	变异系数/%
10 ⁰	23.31	1.12	22.01	1.73	23.27	2.13
10 ¹	26.47	2.34	25.49	2.79	26.87	1.37
10 ²	30.11	1.48	28.52	2.01	29.90	2.36
10 ³	33.89	2.59	32.49	2.17	33.13	2.33
10 ⁴	36.24	1.94	35.80	2.61	35.31	2.09

表 4 3 种荧光定量 PCR 方法的批间重复性结果

Table 4 Batch repeatability of the three RT-PCR methods

稀释倍数	per PCR 方法		IS711 PCR 方法		bcsp31 PCR 方法	
	Ct 值平均值	变异系数/%	Ct 值平均值	变异系数/%	Ct 值平均值	变异系数/%
10 ⁰	23.23	2.03	22.22	1.95	23.18	2.21
10 ¹	26.31	2.19	25.71	2.75	27.04	2.75
10 ²	29.91	3.33	28.39	2.45	29.77	2.78
10 ³	33.78	2.50	32.48	2.91	33.38	3.37
10 ⁴	36.30	3.11	35.57	3.28	35.71	2.82

表 5 3 种荧光定量 PCR 和套式 PCR 检测临床样品的结果
Table 5 Results of clinical samples using three RT-PCR methods and nested PCR

结果	per PCR 方法	bcp31 PCR 方法	IS711 PCR 方法	套式 PCR
阳性	10	10	12	9
阴性	53	53	51	54
合计	63	63	63	63

2.4 特异性比较

分别使用 per、IS711 和 bcp31 3 种荧光定量 PCR 方法对猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森菌、乳酸杆菌等基因组 DNA 进行检测, 结果表明 3 种荧光定量 PCR 方法均只能对猪种布鲁氏菌 S2 疫苗株核酸进行扩增, 说明 3 种荧光定量 PCR 方法均具有良好的特异性。

2.5 重复性比较

分别对 per、IS711 和 bcp31 3 种荧光定量 PCR 方法的批内和批间重复性进行比较。结果显示, per、IS711 和 bcp31 3 种荧光定量 PCR 方法的批内变异系数分别为: 1.12%~2.59%、1.73%~2.79%和 1.37%~2.36% (表 3)。per、IS711 和 bcp31 3 种荧光定量 PCR 方法的批间变异系数分别为: 2.03%~3.33%、1.95%~3.28%和 2.21%~3.37% (表 4)。上述 3 种荧光定量 PCR 方法的批内重复性和批间重复性的变异系数均小于 5.00%, 说明这 3 种方法的重复性良好。

2.6 临床样品检测结果的比较

使用 3 种荧光定量 PCR 方法和《奶牛布鲁氏菌 PCR 诊断技术》中规定的套式 PCR 方法分别对 63 份免疫羊的抗凝血和阴道拭子样品进行检测。结果 (表 5) 显示, 套式 PCR、per 和 bcp31 荧光定量 PCR 均检测到相同的 9 份阳性样品, 而 IS711 荧光定量 PCR 除了检测到上述 9 份阳性样品, 还多检测出 3 份免疫羊的抗凝血样品。通过计算符合率, per 和 bcp31 荧光定量 PCR 方法与套式 PCR 方法的符合率为 98.41%, IS711 荧光定量 PCR 方法与套式 PCR 方法的符合率为 95.24%。

3 讨论与结论

在家畜布病诊断方法中, 血清学方法应用最为广泛。但是大肠杆菌 O:157 和耶尔森菌 O:9 等细菌与布鲁氏菌存在血清学交叉反应, 而且目前血清学方法均无法区分布病自然感染产生的抗体和疫苗免疫产生的抗体^[5]。除此之外, 对于特定动物 (如乳用动物、种公畜等) 进行血液样品采集时, 可能还会影响生产性能, 或者存在一定的危险性。上述这些原因使得家畜布病血清学检测方法的使用存在一

定的局限性, 也亟需其他类型检测方法作为补充手段。

随着荧光定量 PCR 技术的发展, 以其高敏感性、高特异性和操作便捷的优点在病原诊断中得到了广泛的应用。相关报道表明, 感染布病的家畜尿液、粪便、阴道分泌物、流产物、乳汁及精液中均可能检测到布鲁氏菌的存在^[6]。其中, 阴道分泌物、流产胎儿和乳汁中含菌量较大, 可以直接进行细菌分离。相对于细菌分离培养的耗时费力、分离率低、生物安全风险大而言, 通过荧光定量 PCR 方法直接检测样品中的核酸, 能够快速、高效地检测布鲁氏菌, 并且生物安全风险显著降低。同时由于荧光定量 PCR 方法具有极高的敏感性, 可以通过定期对大罐奶混合样品、冻精样品等进行检测, 可作为一种有效的动物群体布病监测方法^[7-8]。

在本研究中, 为了筛选一种适用的荧光定量 PCR 检测方法, 对现在研究最多的 per、IS711 和 bcp31 3 种荧光定量 PCR 进行了敏感性、特异性、重复性和临床样品检测效果的比较。绘制标准曲线表明 3 种方法均具有良好的线性和扩增效率。敏感性方面, IS711 荧光定量 PCR 方法要高于其他 2 种荧光定量 PCR 方法, 这与 IS711 插入序列在布鲁氏菌基因组中具有多个拷贝密切相关。在特异性方面, 3 种方法均不与常见的几种细菌发生交叉反应。在重复性方面, 3 种方法的批内和批间重复性均比较好。在进行临床样品检测时, 和现行的奶牛布病检测行业标准中规定的套式 PCR 相比, IS711 荧光定量 PCR 方法多检测了 3 份样品, per 和 bcp31 荧光定量 PCR 均多检测了 1 份样品。这说明这 3 种荧光定量 PCR 方法均比现行布病诊断标准中套式 PCR 检测方法更加敏感。鉴于荧光定量 PCR 方法比套式 PCR 和“金标准”细菌分离更加敏感, 荧光定量方法比套式 PCR 方法多检测出的临床样品是否为真正的核酸阳性则需要更加敏感的定量方法进行确定, 例如数字 PCR 方法^[9]。

综上, 3 种荧光定量 PCR 方法均具有扩增效率高、线性好、敏感性高、特异性高和重复性好等特性, 均适用于家畜布病临床样品的检测。比较而言, IS711 荧光定量 PCR 方法敏感性更加优异。与常规

PCR 方法相比操作简单, 荧光定量 PCR 方法不需要通过电泳来判定结果, 不易造成气溶胶污染。因此, 荧光定量 PCR 方法可以作为一种家畜布病检测的重要技术手段。同时为将我国家畜布病诊断标准与世界动物卫生组织 (OIE) 接轨, 可考虑尽快将荧光定量 PCR 方法纳入家畜布病诊断的相关标准中, 提升实验室布病检测能力。

参考文献:

- [1] BUKHARI E E. Pediatric brucellosis[J]. Saudi Med J, 2018, 39(4): 336-341.
- [2] HASANJANI ROUSHAN M R, EBRAHIMPOUR S. Human brucellosis: an overview[J]. Caspian J Intern Med, 2015, 6(1): 46-47.
- [3] BOUNAADJA L, ALBERT D, CHÉNAIS B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes[J]. Vet Microbiol, 2009, 137(1/2): 156-164.
- [4] NEGLIA G, VENEZIANO V, DE CARLO E, et al. Detection of *Brucella abortus* DNA and RNA in different stages of development of the sucking louse *Haematopinus tuberculatus*[J]. BMC Vet Res, 2013, 9(1): 1-9.
- [5] 任燕斌. 布鲁氏菌竞争 ELISA 检测方法的建立及应用[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2016.
- [6] 梁世彦. 布病流行特点及综合防治措施[J]. 中国畜禽种业, 2016, 12(11): 46-47.
- [7] WARETH G, MELZER F, TOMASO H, et al. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR[J]. BMC Res Notes, 2015, 8: 212.
- [8] KAYNAK-ONURDAG F, OKTEN S, SEN B. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey[J]. J Dairy Sci, 2016, 99(5): 3351-3357.
- [9] 韩冰, 吴翠萍, 赵芯, 等. 数字 PCR 和荧光定量 PCR 诊断急性期布鲁菌病的灵敏度比较初步研究[J]. 传染病信息, 2019, 32(4): 312-316.

安徽农业大学在蜜蜂农药残留暴露与健康风险领域取得系列进展

蜜蜂是自然界最重要的授粉昆虫, 农业生产中化学农药的大量使用被认为是危害蜜蜂健康的重要风险因子。目前化学农药对蜜蜂风险评估方法主要是针对蜜蜂成蜂 (采集蜂) 在田间采花授粉过程中通过经口摄入和体表接触的暴露评估, 由于农药暴露途径多、采集蜂难以监控等因素会造成风险评估结果不确定性较大。如何科学评估农药残留对蜜蜂健康风险已成为当前世界科技前沿的难点问题。

蜜蜂幼虫健康对蜂群的发展壮大至关重要, 其对农药残留的暴露途径主要是膳食摄入。安徽农业大学农药学创新团队在系统地探明我国 5 个主要蜜源产区花粉、花蜜、蜂粮、蜂蜜等 1 700 余个实际样品中的农药残留时空分布规律的基础上, 创新运用农药残留膳食暴露风险评估方法定量评价了 40 种农药残留对蜜蜂幼虫的慢性累积风险水平, 明确了拟除虫菊酯类杀虫剂和新烟碱类杀虫剂为影响蜜蜂幼虫健康的主要风险因子。研究结果对于加强蜜源植物农残污染的风险管理、保障蜂群健康具有重要的理论指导意义与实际应用价值。研究论文“Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment”在 top 期刊 *Science of the Total Environment* (IF: 7.963) 上发表, 安徽农业大学植物保护学院青年教师肖金京为该论文第一作者, 国家蜂产业技术体系岗位专家余林生教授为共同作者, 操海群教授为通讯作者。

此外, 该团队围绕化学农药对蜜蜂幼虫毒性效应评价, 通过建立成熟可靠的蜜蜂幼虫体外培养技术, 重点研究拟除虫菊酯类、新烟碱类以及灭幼脲等农药对蜜蜂幼虫的无可观察效应浓度 (NOEC) 及生长发育影响机制, 为农药对蜜蜂幼虫健康风险评价提供慢性毒性毒理学数据。相关研究工作获得了国家自然科学基金面上项目、“十三五”和“十四五”国家蜂产业技术体系专项等资助, 在 *Pest Management Science* (<https://doi.org/10.1002/ps.6757>)、*Pesticide Biochemistry and Physiology* (<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.08.003>) 等期刊上发表相关研究论文 9 篇。