

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53 (9) :976 - 983; 4 September 2013  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## TaqMan-MGB 探针检测文森巴尔通体博格霍夫亚种实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用

栗冬梅, 宋秀平, 王君, 刘起勇

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 世界卫生组织媒介生物监测与管理合作中心, 北京 102206

**摘要:** 【目的】应用 TaqMan-MGB 探针技术, 建立具有种水平特异性、高敏感性的荧光定量 PCR 方法, 用于快速检测文森巴尔通体博格霍夫亚种。【方法】在序列特异性扩增区标记 (Sequence characterized amplified region, SCAR) 技术基础上, 依据文森巴尔通体博格霍夫亚种一段特有的基因序列设计探针和引物, 分别优化扩增反应的退火温度、探针和引物的反应浓度; 分析此方法的特异性、敏感性及重复性; 绘制标准曲线, 评估 PCR 反应的扩增效率和稳定性。【结果】本研究设计的 TaqMan-MGB 探针具有种水平特异性; 最低检出限为每个 PCR 反应 11 个拷贝; 组内和组间的变异系数 CV 值分别为 0.12% - 0.70% 和 0.14% - 0.55%, 在允许范围内; 标准曲线线性关系良好 ( $R^2 = 1$ ), 扩增效率高 ( $E = 104.7\%$ )。【结论】本研究建立的基于 TaqMan-MGB 探针技术的荧光定量 PCR 方法能够在种水平特异性、高灵敏度检出文森巴尔通体博格霍夫亚种, 为这种巴尔通体所引起的一系列疾病的早期快速诊断、监测和流行病学调查等研究提供有效手段。

**关键词:** 巴尔通体, 荧光定量 PCR, TaqMan-MGB 探针, 犬, SCAR 标记

**中图分类号:** Q93-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2013)09-0976-08

文森巴尔通体博格霍夫亚种 (*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, Bvb) 是一种能够引起犬心内膜炎、紫癜性肝炎、心肌炎和肉芽肿性淋巴结炎等疾病的革兰阴性杆菌<sup>[1]</sup>, 也可以引起人心内膜炎<sup>[2]</sup>和神经系统疾病等<sup>[3]</sup>。1993 年, 此菌首先分离自一只患有心内膜炎的病犬<sup>[4]</sup>, 是巴尔通体属中新发现的人兽共患病原菌。Bvb 具有巴尔通体属菌的共同特征, 较难培养, 对培养条件要求较高、培养时间长。目前, 国内外对此菌的检测方法主要是分离培养、间接免疫荧光法 (IFA) 检出血清抗体和常规 PCR 检测

核酸分子。分离培养方法虽然能够获得直接的感染证据, 但是由于 Bvb 难于培养、生长缓慢, 又由于样品取材限制, 培养成功率较低, 不适用于快速诊断、筛查和流行病学调查。在血清学检测方法中, 国际上通常应用 IFA 法检测巴尔通体抗体, 有些种如汉赛巴尔通体 (*B. henselae*, Bh) 和五日热巴尔通体 (*B. quintana*, Bq) 有市售的检测试剂盒, 对于 Bvb 仅有国外个别实验室能够进行, 而且应用全菌作为检测抗原存在交叉反应, 另外 IFA 法判读有一定的主观性, 不易于推广使用和结果比较。常规 PCR 虽

**基金项目:** 十二五重大专项“重大传染病应急处置检测技术平台”课题 (2011ZX10004-001)

**作者简介:** 栗冬梅 (1974 -), 女, 北京人, 副研究员, 主要从事医学微生物方面研究。Tel: + 86-10-58900741; Fax: + 86-10-58900739; E-mail: lidongmei@icdc.cn

**收稿日期:** 2013-02-26; **修回日期:** 2013-04-20

然避免了上述两类方法的缺陷,但是方法的敏感性和可能存在污染是不得不考虑的问题。荧光定量 PCR 方法由于其灵敏度高、自动化程度高等优点,能够很好地解决上述问题,在传染病病原检测上日渐普及,因此有必要建立荧光定量 PCR 方法检测 Bvb。目前,国内外尚未见应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法检测 Bvb 的报道。本研究选取 Bvb 特有的一段核酸序列设计特异引物和探针,利用新型 MGB 探针技术建立检测此菌的荧光定量 PCR 方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和生物样本 DNA

巴尔通体基因组 DNA 包括 Bvb ATCC 51672、汉赛巴尔通体 ATCC 49882、五日热巴尔通体 ATCC VR-358、克氏巴尔通体 (*B. clarridgeiae*, Bc) ATCC 51734、克勒巴尔通体 (*B. koehlerae*, Bk) ATCC 700693、杆菌样巴尔通体 (*B. bacilliformis*, Bb) ATCC 35685、文森巴尔通体阿鲁潘亚种 (*B. vinsonii* subsp. *arupensis*, Bva) ATCC 700727、文森巴尔通体文森亚种 (*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, Bvv) ATCC VR-152、伊丽莎白巴尔通体 (*B. elizabethae*, Be) ATCC 49927、格拉汉姆巴尔通体 (*B. grahamii*, Bg) ATCC 700132、道志巴尔通体 (*B. doshaiae*, Bd) ATCC 700133、特利波契巴尔通体 (*B. tribocorum*, Bt) CIP 105476 及 Bvb 的实验室分离菌株 Q52SHD、Q80SHD、Q106SHD、Q109SHD、Q132SHD、Q151SHD; 根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*); 人、猫、犬、鼠、蜚及蚤基因组 DNA 均为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保存。

其它细菌基因组 DNA 包括布鲁菌 (*Brucella* species)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷白杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、伤寒杆菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、普氏立克次体 (*Rickettsia*

*proWazekii*)、马赛立克次体 (*R. massilliae*)、日本立克次体 (*R. japonica*)、嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*)、恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis* EV76)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、和伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*), 均为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所有关科室提供。

### 1.2 主要仪器设备与试剂

伯乐 (BioRad) CFX96 荧光定量 PCR 仪、台式高速离心机 Eppendorf centrifuge 5804R、核酸浓度测定仪 NanoDrop-1000。

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), pEASY-T1 Cloning Kit、TransStart Probe qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司; Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 购自宝生物工程(大连)有限公司; GoTaq® qPCR Master Mix 购自 Promega 公司; 质粒提取试剂盒购自北京擎科新业生物技术有限公司。

### 1.3 靶基因筛选、引物与 TaqMan-MGB 探针的设计与合成

应用随机引物 3S (S15: 5'-GGAGGGTGT-3', S18: 5'-CCACAGCAGT-3', S103: 5'-AGACGTC CAC-3') 对 Bvb 等 11 种巴尔通体进行 RAPD-PCR, 依据 RAPD 图谱中巴尔通体各个种之间的差异扩增带, 筛选 Bvb 的 SCAR 标记, 选择此标记为目标序列, 采用 ABI Primer Express 2.0 软件设计探针 BvbT (FAM-CACACACCAGCTTTG-MGB)、上游引物为 BvbF (5'-CACACAACCCCATATCTCATTCG-3') 和下游引物为 BvbR (5'-CATGCTGTATCGGCTATGG TTTT-3'), 由上海基康生物公司合成。

### 1.4 引物和探针的特异性、敏感性及实验重复性分析

确认引物和探针对 Bvb 的适用性和特异性, 将 Bvb、其它种巴尔通体、布鲁菌和根癌土壤杆菌等非巴尔通体菌及犬、猫、人、鼠、蜚和蚤基因组 DNA 的浓度调整至大约 1-10 ng/μL 左右, 取模板 1 μL 进行定量 PCR 检测。

将 Bvb 标准质粒 ( $1.08 \times 10^{10}$  拷贝/μL) 作 10 倍比稀释, 分别取 1 μL 稀释后的标准质粒 ( $1.08 \times 10^9 - 1.08 \times 10^0$  拷贝/μL) 为模板进行定量 PCR, 分

析能够检出的最小标准质粒拷贝数,即方法的敏感性。

在同一次定量 PCR 反应中,每个稀释度标准质粒做 3 个重复孔,以分析组内差异;以上述相同条件分别进行 3 次独立重复实验,分析组间差异,计算 Cq 值变异系数 CV 值以验证该方法的稳定性。

### 1.5 标准品的制备

以 BvbF 和 BvbR 为引物, Bvb 标准菌株 ATCC51672TM 的 DNA 为模板,扩增目的基因 119 bp;PCR 产物切胶回收纯化后连接到 pEASY-T 载体上;将连接后载体导入 DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选阳性克隆子,用 PCR、测序方法验证后提取质粒,测定浓度,作为绘制定量 PCR 标准曲线的标准品。质粒和含有重组子的阳性菌分别保存于 -20 $^{\circ}$ C 和 -70 $^{\circ}$ C。

### 1.6 质粒拷贝数浓度换算

测定质粒浓度为 47.7 ng/ $\mu$ L, pEASY-T 载体的碱基数为 3928 bp,每个碱基的平均分子量为 660 dalton/bp,质粒分子量即为 (3928 + 119)  $\times$  660 = 2.67  $\times$  10<sup>6</sup>,根据公式拷贝数浓度(拷贝/ $\mu$ L) = (质量/分子量)  $\times$  6.02  $\times$  10<sup>23</sup> 计算得出拷贝数浓度为 1.08  $\times$  10<sup>10</sup> 拷贝/ $\mu$ L。

### 1.7 标准曲线的制备

将质粒原液按 10  $\times$  倍比稀释,使浓度达到 1.08  $\times$  10<sup>9</sup> - 1.08  $\times$  10<sup>3</sup> 拷贝/ $\mu$ L 进行定量 PCR,同时做 3 个平行样品。

### 1.8 反应条件优化

**1.8.1 退火温度:**以阳性对照 DNA 为模板,51 - 62 $^{\circ}$ C 进行梯度定量 PCR,筛选最优退火温度。

**1.8.2 探针及引物浓度:**分别固定引物和探针浓度,探针和引物反应浓度分别为 40、100、200、300、400、500 nmol/L 和 200、300、400、500 nmol/L,根据扩增反应的循环阈值(Cq)和扩增曲线的荧光信号强度选择最优探针和引物浓度,设 3 孔平行样进行检测。

### 1.9 反应体系及反应参数

2  $\times$  TransStart<sup>TM</sup> Probe qPCR SuperMix 为 12.5  $\mu$ L,上游引物 BvbF (10  $\mu$ mol/L) 为 1.25  $\mu$ L,下游引物 BvbR (10  $\mu$ mol/L) 为 1.25  $\mu$ L, TaqMan-MGB 探针 BvbT 为 (10  $\mu$ mol/L) 1.25  $\mu$ L, DNA 模板 1.0  $\mu$ L, 去离子水 7.5  $\mu$ L, 反应体系为 25  $\mu$ L; Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Probe qPCR) Mix 和 GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix 为 10  $\mu$ L,上游引物 BvbF (10  $\mu$ mol/L) 为

1  $\mu$ L,下游引物 BvbR (10  $\mu$ mol/L) 为 1  $\mu$ L, TaqMan-MGB 探针 BvbT 为 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 去离子水 6  $\mu$ L, 反应体系为 20  $\mu$ L。扩增程序:第一步,95 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环;第二步,95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。

### 1.10 犬血样品 qPCR 检测

提取 47 份采集于北京市东城区(DC)和西城区(XC)的犬血全基因组 DNA,应用本研究中引物和探针进行荧光定量 PCR,抽取阳性样品扩增产物测序(北京擎科新业生物技术有限公司)以验证是否为目标序列。

## 2 结果

### 2.1 SCAR 标记筛选及探针、引物设计

3S 引物扩增发现 Bvb 的 F 带在其它巴尔通体对应位置上无扩增带(图 1),测序后在 NCBI 上比对发现与其相似性最大的是 Bq 的 *argF* (78%),其它还有 Bg 和 Bt (67%)。F 带核酸序列 GenBank 接受号为 KC665722,以此作为 SCAR 标记,设计用于特异性扩增 Bvb 的探针及引物。

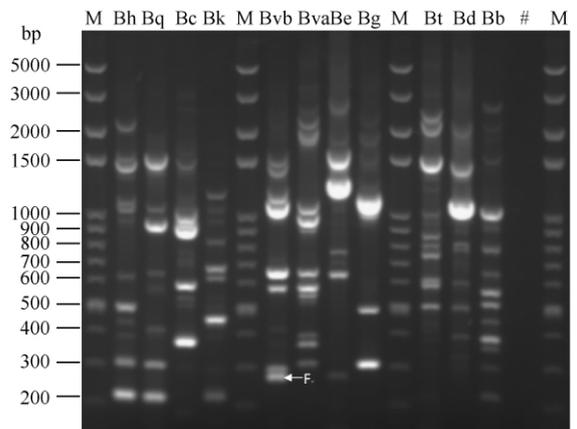


图 1. 应用 3S 引物 (S15, 10-mer; S18, 10-mer; S103, 10-mer) 扩增巴尔通体的 RAPD 图谱

Figure 1. RAPD profiles of the eleven type strains of *Bartonella* spp. Using the primer 3S (S15, 10-mer; S18, 10-mer; S103, 10-mer). Electrophoresis was performed at 100 V for 90 min. M, 100-bp ladder molecular weight marker; Lane Bh, Bq, Bc, Bk, Bvb, Bva, Be, Bg, Bt, Bd and Bb indicate *Bartonella* type strains for *B. henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. tribocorum*, *B. doshaiae* and *B. bacilliformis*. The # sign indicates the blank control.

## 2.2 最优反应条件

**2.2.1 最优退火温度:** 退火温度为 51.0、51.7、53.2、55.3、58.0、60.2℃ 时, C<sub>q</sub> 值分别为 19.39、19.36、19.34、19.32、19.35、19.43, 荧光信号在 51.7、53.2 和 55.3℃ 时较强。综合考虑选择 C<sub>q</sub> 值最小、荧光信号最强时的温度 55.3℃, 为方便操作退火温度定为 55℃。

**2.2.2 最优探针和引物反应浓度:** 当探针浓度为 500 nmol/L 时, C<sub>q</sub> 值最小、荧光信号强, 重复实验结果稳定, 故选择 500 nmol/L 为探针浓度 (图 2-A)。当引物反应浓度为 500 nmol/L 时, C<sub>q</sub> 值最小、荧光信号强, 重复实验结果稳定, 故选择 500 nmol/L 为引物反应浓度 (图 2-B)。

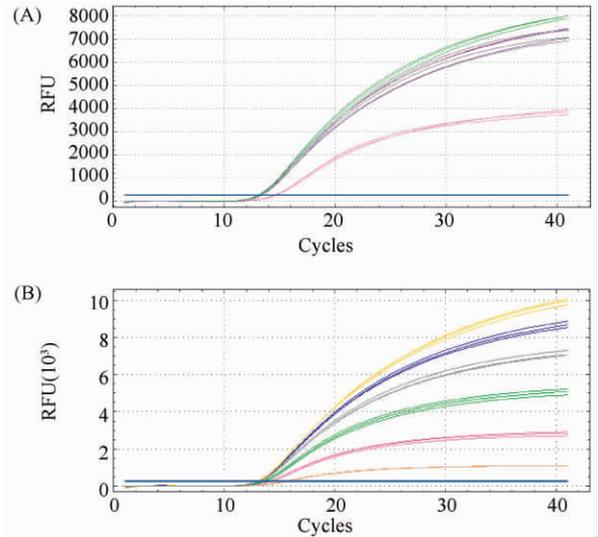


图 2. 不同引物和探针浓度的扩增曲线

Figure 2. Amplification curves under the different concentrations of the primers (A) and the Taqman-MGB probe (B).

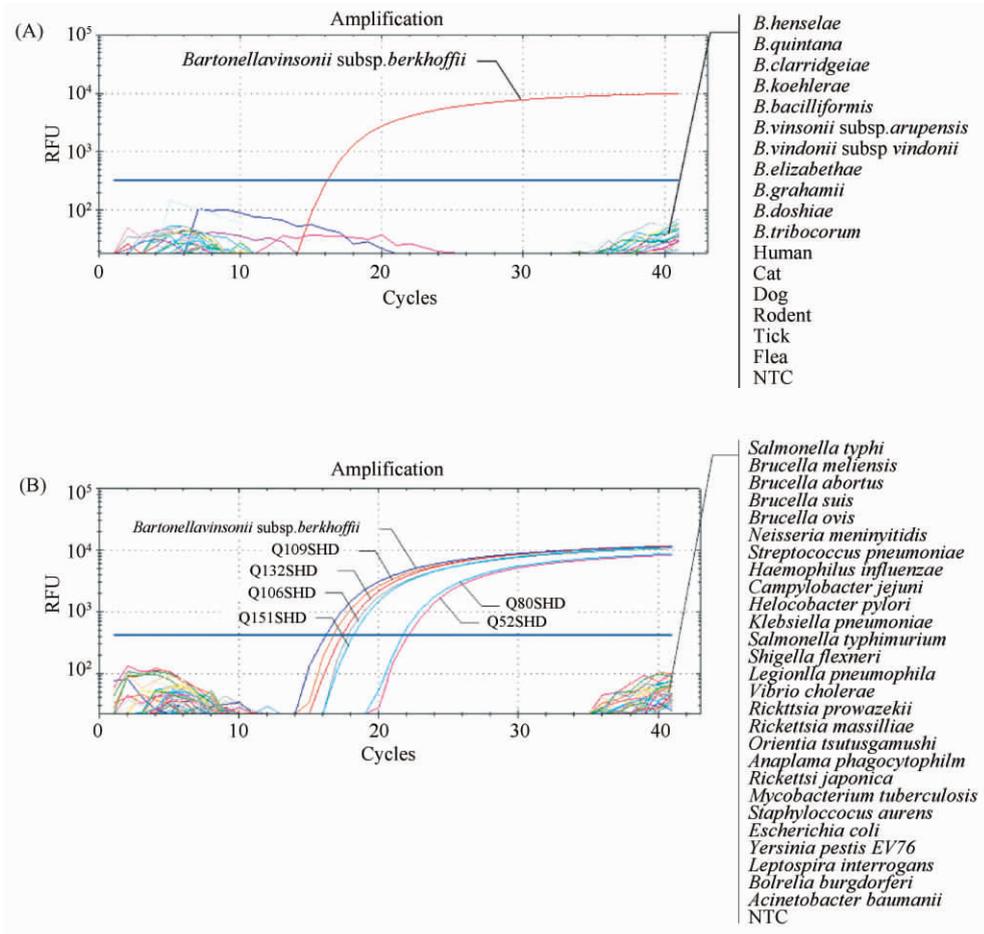


图 3. 文森巴尔通体博格霍夫亚种 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 特异性结果

Figure 3. The results of specificity of real-time PCR using TaqMan-MGB assay for the detection of *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. 3-A is the amplification curves of real-time PCR using DNA templates from other *Bartonella* species and animals and 3-B is for the wild strains and other bacteria.

### 2.3 引物及探针的特异性检测

Bvb 标准菌株及实验室分离的 Bvb 菌株扩增均为阳性, Bva、Bvv 及汉赛巴尔通体等其它种巴尔通体和布鲁菌、根癌土壤杆菌及大肠杆菌等非巴尔通体属细菌的核酸样品检测均未见荧光信号, 扩增结果均为阴性, 空白对照 NTC 为阴性 (图 3-A、3-B)。

### 2.4 引物及探针的敏感性检测

以  $10 \times$  倍比稀释的标准质粒 ( $1.08 \times 10^4 - 1.08 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 为模板应用不同公司的  $2 \times \text{Taq}$  酶预混液检测方法的敏感性。结果显示, 不同公司的  $\text{Taq}$  酶对于本研究应用的定量 PCR 方法敏感性不同, 最低检出浓度为  $1.08 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 即每个反应需 11 个拷贝, 检测线以上各浓度质粒均出现良好的扩增信号, 空白对照 (NTC) 没有扩增信号 (图 4)。

表 1. TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测文森巴尔通体伯格霍夫亚种重复性

Table 1. Repeatability and reproducibility of real-time PCR based on TaqMan-MGB probe assay for *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*

Repeatability/ Reproducibility	Plasmid (copies)	Cq value					
		1 (well/group)	2 (well/group)	3 (well/group)	Mean	SD	CV (%)
Intra-	$10^9$	13.20	13.20	13.12	13.17	0.044	0.33
	$10^8$	16.50	16.29	16.31	16.37	0.114	0.70
	$10^7$	19.26	19.50	19.42	19.40	0.125	0.64
	$10^6$	22.76	22.71	22.71	22.73	0.028	0.12
	$10^5$	25.99	26.01	26.07	26.02	0.043	0.17
	$10^4$	29.12	28.88	29.10	29.03	0.132	0.45
	$10^3$	32.07	32.31	32.52	32.30	0.225	0.70
Inter-	$10^9$	13.17	13.04	13.12	13.11	0.066	0.50
	$10^8$	16.37	16.25	16.27	16.30	0.064	0.39
	$10^7$	19.40	19.44	19.45	19.43	0.026	0.14
	$10^6$	22.73	22.55	22.77	22.68	0.117	0.52
	$10^5$	26.02	25.91	25.90	25.94	0.067	0.26
	$10^4$	29.03	28.81	28.72	28.85	0.159	0.55
	$10^3$	32.30	32.21	32.53	32.35	0.165	0.51

### 2.6 标准曲线

根据  $C_q$  值与标准质粒的浓度对数值绘制标准曲线, 其相关系数  $R^2$  为 1.000 ( $y = -3.214x + 41.95$ ), 扩增效率  $E$  为 104.7%,  $C_q$  值和浓度之间呈现良好的线性关系 (图 5-A、5-B)。

### 2.7 犬血样品 qPCR 检测

对 47 份犬血全基因组 DNA 进行 qPCR 检测, 4 份血基因组 DNA 产生荧光信号 (表 2)。选取阳性样品中编号为 Q22DC 和 Q5XC 的扩增产物进行测序, 序列与 Bvb 标准菌株一致, 证实检测的阳性目的条带为 Bvb, 北京 2 城区犬 Bvb 总感染率为 8.5%。

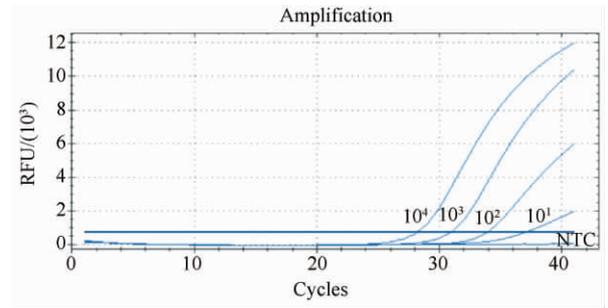


图 4. 不同稀释度标准质粒扩增曲线

Figure 4. Amplification curve of real-time PCR for the different dilution of the reference plasmid.

### 2.5 重复性分析

组内各孔间 CV 值在 0.12% - 0.70% 之间, 组间重复测定 CV 值在 0.14% - 0.55% 之间, 小于 1% (表 1)。

表 2. 犬血文森巴尔通体伯格霍夫亚种 TaqMan-MGB 探针 qPCR 检测结果

Table 2. The result of dogs DNA for *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* using real-time PCR based on TaqMan-MGB probe assay

Origin	Specimen sizes	Positive sizes	Infection rate /%
东城区 (Dongcheng District, Beijing)	22	1	4.5
西城区 (Xicheng District, Beijing)	25	3	12.0
Total	47	4	8.5

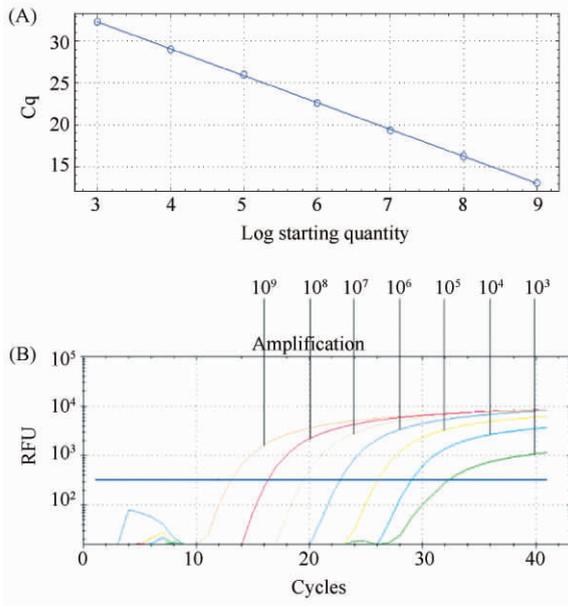


图 5. 质粒标准品荧光定量 PCR 标准曲线 (A) 和扩增曲线图 (B)

Figure 5. Standard curve for real-time PCR based on natural logarithm of plasmid concentration & Cq values (A) and amplification curve of real-time PCR for the reference plasmid (B).

### 3 讨论

Bvb 是近些年发现的重要犬传致病性巴尔通体,能够引起人和犬心内膜炎等严重疾病,其主要宿主多为犬科动物,如家犬或流浪犬<sup>[5-9]</sup>、北美郊狼<sup>[10]</sup>和灰狐狸<sup>[11]</sup>等,传播媒介疑为蜱等吸血节肢动物<sup>[12]</sup>。从目前文献报道看,此菌呈全球分布,欧美地区研究较多,宠物犬的抗体阳性率 (<5%) 明显低于自由放养的或流浪犬 (19% - 65%)<sup>[5]</sup>,野生犬科动物 (美国西部的郊狼) 带菌率为 32%<sup>[10]</sup>,可见在犬科动物中有较高的带菌率。中国虽有此菌的检出<sup>[13]</sup>,但研究报道尚少,概因受限于缺乏方便、快捷的检测方法。为了便于开展对犬中 Bvb 的检测和监测调查,本研究在 SCAR 标记基础上,开发建立了以新型 MGB 探针技术为基础的 Taqman 荧光定量 PCR 方法,用以方便、快捷、灵敏、特异地检出此菌。

本研究应用 RAPD-PCR 方法筛选出 Bvb 的 SCAR 标记,依据这段特异基因序列,设计引物与 TaqMan-MGB 探针。应用目标基因克隆质粒作为标

准品,检测敏感性、扩增效率等指标,应用多种巴尔通体和其它种属的细菌作为阴性对照进一步验证方法的特异性,建立了 Bvb 的荧光定量 PCR 检测方法。除目标菌外,包括文森巴尔通体另 2 个亚种在内的其它 11 种巴尔通体、20 余株其它种属细菌和犬、猫、人、鼠、蜱和蚤的基因组 DNA 均无扩增信号,表明该方法具有很好的特异性,能够满足一般临床样品要求,不会出现假阳性反应。应用不同公司的 Taq 酶,检测灵敏度不同,最低检测限可达到每个 PCR 反应检出 11 个拷贝的目的基因,因此所设计的探针具有极高的敏感性,但是需要高效能的 DNA 聚合酶,这也是定量 PCR 方法本身的影响因素决定的。倍比稀释的标准品 3 次平行重复实验的组内和组间变异值均较低,具有很好的重复性,表明该方法稳定、规范操作可实现数据的良好重复性,数据可靠<sup>[14]</sup>。标准曲线的绘制反应出 Cq 值与质粒浓度良好的线性关系和高扩增效率,说明 PCR 反应条件得到了最佳优化、实验操作准确,结果可信。犬血样品 Bvb 的检出及测序验证结果进一步表明此方法适用于临床检验。因而,本研究建立的荧光定量 PCR 方法可为 Bvb 引起的一系列犬传疾病的早期临床诊断、疾病监测和筛查以及流行病学调查提供一种高效的实验室检测手段。

**致谢** 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布病室、无形体室、诊断室、新病原室、呼吸道室、鼠疫室、钩体室、腹泻病室、莱姆病室等科室为本研究提供了相关菌株的基因组 DNA,在此表示衷心的感谢。

### 参考文献

- [1] Breitschwerdt EB, Atkins CE, Brown TT, Kordick DL, Snyder PS. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis or myocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(11): 3618-3626.
- [2] Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of a febrile blood culture-negative endocarditis in a human. *Journal of*

- Clinical Microbiology*, 2000, 38 (4) : 1698-1700.
- [3] Breitschwerdt EB, Maggi RG, Lantos PM, Woods CW, Hegarty BC, Bradley JM. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* bacteremia in a father and daughter with neurological disease. *Parasites & Vectors*, 2010, 3 (1) :29.
- [4] Breitschwerdt EB, Kordick DL, Malarkey DE, Keene B, Hadfield TL, Wilson K. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33 (1) :154-160.
- [5] Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research*, 2005, 36 (3) : 383-410.
- [6] Diniz PP, Billeter SA, Otranto D, De Caprariis D, Petanides T, Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB. Molecular documentation of *Bartonella* infection in dogs in Greece and Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47 (5) :1565-1567.
- [7] Cherry NA, Maggi RG, Rossmeisl JH, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. Ecological diversity of *Bartonella* species infection among dogs and their owner in Virginia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2011, 11 (11) :1425-1432.
- [8] Henn JB, Vanhorn BA, Kasten RW, Kachani M, Chomel BB. Antibodies to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* in Moroccan dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 74 (2) : 222-223.
- [9] Kernif T, Aissi M, Doumandji SE, Chomel BB, Raoult D, Bitam I. Molecular evidence of *Bartonella* infection in domestic dogs from Algeria, North Africa, by polymerase chain reaction (PCR). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, 83 (2) :298-300.
- [10] Chang CC, Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, Simpson DC, Smith CR, Kramer VL. Seroepidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in California coyotes, 1994-1998. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5 (5) : 711-715.
- [11] Schaefer JD, Kasten RW, Coonan TJ, Clifford DL, Chomel BB. Isolation or detection of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* and *Bartonella rochalimae* in the endangered island foxes (*Urocyon littoralis*). *Veterinary Microbiology*, 2011, 154 (1-2) :135-139.
- [12] Pappalardo BL, Correa MT, York CC, Peat CY, Breitschwerdt EB. Epidemiologic evaluation of the risk associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1997, 58 (5) : 467-471.
- [13] Li DM, Meng FX, Song XP, Qin ZJ, Yang XR, Wu HX, Ren DS, Liu QY. Study on *Bartonella vinsonii berkhoffii* isolated from blood of native dogs in China. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2006, 27 (4) :333-338. (in Chinese)  
栗冬梅, 孟凤霞, 宋秀平, 秦增军, 杨小冉, 吴海霞, 任东升, 刘起勇. 从山东省家犬血液中分离出致病性巴尔通体-文森巴尔通体伯格霍夫亚种. 中华流行病学杂志, 2006, 27 (4) : 333-338.
- [14] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2004, 18 (2) :212-214.

# Real-time PCR-based detection of *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii* by TaqMan minor groove binder probe

Dongmei Li<sup>\*</sup>, Xiuping Song, Jun Wang, Qiyong Liu

Department of Vector Biology and Control, State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, WHO Collaborating Centre for Vector Surveillance and Management, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**Abstract:** [Objective] *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* is a fastidious haemotropic Gram-negative bacterium that has been identified as an emerging causative agent for zoonotic diseases of human and dogs. This study aimed to develop a TaqMan-MGB probe based, highly sensitive and species-specific fluorescence quantitative PCR assay for rapid detection of *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. [Methods] The species-specific primers and probe set for *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* were designed. The annealing temperature, final concentration of the TaqMan-MGB probe and primers were optimized. Specificity, sensitivity and reproducibility of the PCR system were assessed. The standard curve was made using 10 × dilution series of the plasmid standard to analyze stability and PCR efficiency. [Results] The real-time PCR with TaqMan-MGB assay was highly specific and sensitive for the detection of *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. TaqMan-MGB probe-based fluorescence quantitative PCR did not show cross reactivity with the other *Bartonella* species, non-*Bartonella* bacteria and dogs and human. The detection limit of the TaqMan-MGB assay for the detection of *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* was 11 copies of the plasmid DNA per PCR reaction. The coefficient of variation CV% from the intra- and inter-group was in the range of 0.12% - 0.70% and 0.14% - 0.55% which were acceptable. The correlation coefficient and E-value of the standard curve were 1.0 and 104.7%, which reflected a very good linearity and high efficiency. [Conclusion] The TaqMan MGB-based probe fluorescence quantitative PCR assay was a reliable, species-specific, sensitive and useful tool for rapid detection of *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

**Keywords:** *Bartonella*, fluorescence quantitative PCR, TaqMan-MGB probe, SCAR markers

(本文责编: 张晓丽)