

网络出版日期:2017-08-18
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170818.0938.012.html

猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌多重 PCR 检测方法的建立及应用

何亚鹏,许信刚,付明哲,张 琪
(西北农林科技大学 动物医学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 为建立在临床样本能够同时检测猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌的多重 PCR 方法,根据 NCBI 已收录的布鲁菌全基因,设计并合成 4 对特异性引物,通过优化多重 PCR 的反应条件,建立能够同时检测 4 种布鲁菌的多重 PCR 诊断方法。特异性试验结果表明,可以从 4 种布鲁菌以及 4 种细菌混合物中扩增出大小分别为 276、494、733 和 976 bp 的特异性条带,对照组的检测结果为阴性;敏感性试验结果表明,对 4 种病原菌基因组 DNA 的检出量为猪种 32.2 pg、牛种 21.3 pg、羊种 27.5 pg、绵羊种 43.2 pg;人工模拟感染样本检测结果表明,能从混合感染的病料中特异地检测出 4 种病原菌。应用该方法对 200 份临床奶山羊乳样进行检测,结果检出 4 份阳性。建立的多重 PCR 方法具有特异性强、敏感度高、稳定性好的特点,可以有效地检测 4 种布鲁菌的感染。

关键词 猪种布鲁菌;牛种布鲁菌;羊种布鲁菌;绵羊种布鲁菌;多重 PCR
中图分类号 S855.1 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)08-1135-06

布鲁菌病是由布鲁菌(*Brucella*)引起的人畜共患传染病,严重危害经济发展和公共健康,世界动物卫生组织(OIE)将其列为 B 类重要传染病,中国将其列为二类传染病^[1]。现已确定的布鲁菌有 7 个种(牛种、羊种、绵羊附睾种、猪种、犬种、沙林鼠种、海洋种)和 20 个生物型^[2]。布鲁菌对牛、羊和猪的危害巨大,感染牛的有牛种、羊种和猪种布鲁菌;感染山羊的有羊种、牛种布鲁菌;感染绵羊的有绵羊种、牛种菌和羊种布鲁菌;感染猪的有猪种、牛种和羊种布鲁菌^[3]。

布鲁菌病临床症状极为相似,在临床上很难确定是那种病原感染所致,另外,临床上还有混合感染的病例。目前,布病的诊断主要采用病原学和血清学方法,但这些传统方法存在着检测时间长、操作步骤繁琐、假阳性和假阴性较高等问题,并对实验人员的健康安全构成一定的威胁^[4]。目前 PCR 方法对布鲁菌的试验鉴定多以种鉴定为主^[5],因此有必要建立能同时、快速、精确检测鉴

别 4 种布鲁菌感染的多重 PCR 检测方法。多重 PCR 技术是在同一 PCR 体系中加入多对引物对多种目的基因进行同时扩增的分子生物学检测方法,它具有快速、灵敏、特异等优点。*IS711* 基因为布鲁菌的转座基因,一般布鲁菌的基因组里都有多个 *IS711* 插入序列,不同种布鲁菌的 *IS711* 插入序列数量也不同。*IS711* 基因序列本身在种间的差别很小,但不同种布鲁菌的 *IS711* 基因插入位置有种间特异性,可用于鉴别诊断^[6]。本研究根据布鲁氏菌不同种型 *IS711* 序列拷贝数的差异设计引物检测特异性目的基因,建立能同时检测布鲁菌 4 种种型的多重 PCR 方法,该方法具有较好的特异性、敏感性及重复性,比传统的细菌学方法简便、经济,可以应用于兽医临床诊断以及食品安全的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 标准猪种布鲁菌 S2 (CVCC

收稿日期:2016-05-03 修回日期:2016-05-23
基金项目:陕西省农业科技创新与攻关(2016NY-092);陕西省重点产业创新链(2016KTZDNY02-06);西北农林科技大学试验示范站(基地)科技成果推广(TGZX2015-32)。
第一作者:何亚鹏,男,硕士研究生,从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:879533817@qq.com
通信作者:张 琪,女,博士,讲师,主要从事分子病原学研究。E-mail:273010466@qq.com
付明哲,男,高级兽医师,主要从事羊病研究。E-mail:286567031@qq.com

70502)、牛种布鲁菌 A19(CVCC 70202)、羊种布鲁菌 M5 疫苗株为新疆天康畜牧生物技术股份有限公司产品;绵羊种布鲁菌由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室分离,经测序鉴定后保存;金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、沙门菌、大肠埃希菌、多杀性巴氏杆菌由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室保存。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL 2000 DNA marker 等均购自康为世纪生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试验动物 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自第四军医大学实验动物研究中心。

1.1.4 样品来源 200 份乳样采自陕西省某奶山羊养殖场。

1.2 方法

1.2.1 模板的制备 将布鲁菌及试验用各菌株分别接种于各自适宜的液体培养基,放入摇床,37 ℃、220 r/min 培养 24 h。取 1 mL 细菌培养液,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作,提取的各细菌 DNA 保存于一20 ℃冰箱,备用。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 中已发布的猪种(*B. suis*)、牛种(*B. abortus*)、羊种(*B. melitensis*)、绵羊种(*B. ovis*)布鲁菌的 *IS711* 基因序列,并参照国内外相关文献[7-10],利用 Primer 5.0 分析软件,设计用于扩增布鲁菌种特异性基因的 4 对特异性引物。引物序列及其位置、扩增产物的大小见表 1,引物由 Invitrogen 上海贸易有限公司合成。

表 1 PCR 引物信息
Table 1 Information of primer for PCR

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物长度/bp Product length	位置 Location	登录号 Genbank No.
PF-B. suis	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	276	1 645 193~1 645 171	CP009094.1
PR-B. suis	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		1 644 918~1 644 941	
PF-B. abortus	GACGAACGGAATTTTTTCCAATCCC	494	851 636 ~851 661	CP009626.1
PR-B. abortus	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		852 129~852 106	
PF-B. melitensis	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	733	248 914~248 936	CP007763.1
PR-B. melitensis	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		248 228~248 204	
PF-B. ovis	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	976	1 176 195~1 176 215	CP000708.1
PR-B. ovis	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		1 177 170~1 177 157	

1.2.3 单项 PCR 检测方法的建立 为确定单项 PCR 扩增的最佳条件及检测单基因 PCR 扩增的特异性,分别以 4 个细菌的 DNA 为模板,用相应的引物进行单项 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL):模板 DNA 2 μL,上、下游引物各 0.5 μL(20 pmol/μL),2 μL dNTP(2.5 mmol/L),2 μL MgCl₂(25 mmol/L),*Taq* 酶 0.2 μL(5 U/μL),10×PCR buffer 2.5 μL,其余用灭菌 ddH₂O 补足。PCR 反应程序:95 ℃变性 5 min;94 ℃变性 45 s,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 45 s,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。为摸索不同退火温度的影响,将退火温度设定为 51、53、55、57 ℃ 4 个梯度进行 PCR 反应,以确定单项 PCR 最佳退火温度。

1.2.4 多重 PCR 反应条件的优化 影响多重 PCR 反应的主要因素是退火温度和引物浓度,因

此对这 2 个反应条件进行优化。将猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌的 DNA 均稀释为 100 μg/mL,等量混匀作为模板。根据引物初始退火温度,按照 2 ℃梯度设定 51、53、55、57、59 ℃的多重 PCR 退火温度试验;按照 0.2 μmol/L 浓度梯度设定各引物对浓度组合(0.2、0.2、0.2、0.2 μmol/L;0.4、0.4、0.4、0.4 μmol/L;0.6、0.6、0.6、0.6 μmol/L;0.8、0.8、0.8、0.8 μmol/L;1.0、1.0、1.0、1.0 μmol/L)的引物优化试验,筛选多重 PCR 扩增的最佳反应体系和程序。

1.2.5 多重 PCR 特异性试验 分别以猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌及 4 种细菌随机组合混合物的基因组作为模板,以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、多杀性巴氏杆菌、沙门菌、无乳链球菌等细菌 DNA 和双蒸水作为阴性对照,使用 4 对引物的混合物,采用优化的多重 PCR 扩增条件进行扩

增,测试多重 PCR 反应的特异性。

1.2.6 多重 PCR 灵敏性试验 分别提取 4 种细菌 DNA,经核酸蛋白定量仪测得猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌 DNA 的质量浓度分别为 322.42、213.34、275.14、432.13 ng/ μ L,多重 PCR 从初始质量浓度开始,按 $10^1\sim 10^6$ 梯度进行倍比稀释,采用优化的多重 PCR 条件进行扩增,以检测其敏感性。

1.2.7 重复性试验 用建立的多重 PCR 方法,分别对猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌及 4 者混合的阳性样品、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、多杀性巴氏杆菌、沙门菌、无乳链球菌等细菌对照样品各 2 份重复检测 3 次,以验证多重 PCR 方法的稳定性。

1.2.8 人工模拟试验 将 4 种细菌进行不同种类的排列与组合,按照下列设计对 16 只小鼠进行腹腔感染细菌:猪种(0.2 mL);牛种(0.2 mL);羊种(0.2 mL);绵羊种(0.2 mL);猪种+牛种(每种菌 0.1 mL);猪种+羊种(每种菌 0.1 mL);猪种+绵羊种(每种菌 0.1 mL);牛种+羊种(每种菌 0.1 mL);牛种+绵羊种(每种菌 0.1 mL);羊种+绵羊种(每种菌 0.1 mL);猪种+牛种+羊种(每种菌 0.07 mL);猪种+羊种+绵羊种(每种菌 0.07 mL);牛种+羊种+绵羊种(每种菌 0.07

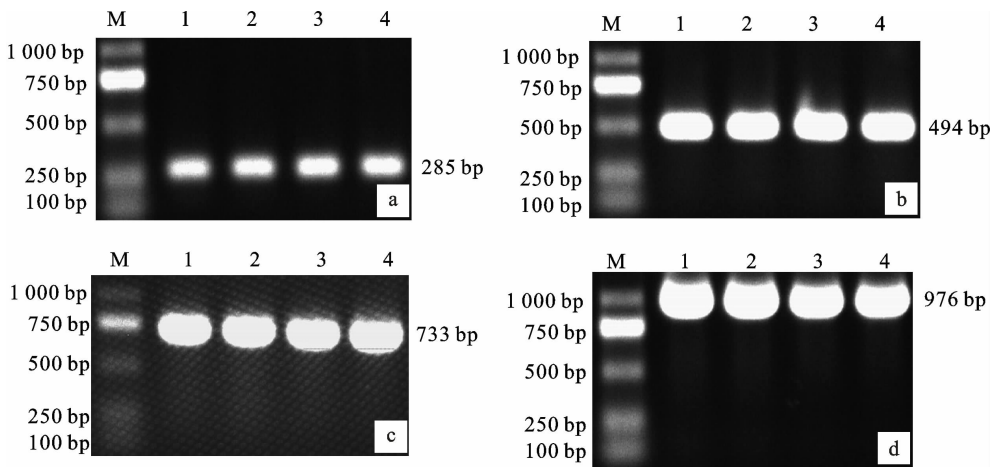
mL);猪种+牛种+绵羊种(每种菌 0.07 mL);猪种+牛种+羊种+绵羊种(每种菌 0.05 mL);生理盐水(0.2 mL 对照组)。24 h 后将小鼠断颈处死,无菌采取肝、脾、淋巴结等病料,混合样品约 100 mg,加液氮充分研磨后转入组织匀浆器中,加入 10 mmol/L PBS(pH 7.2)充分匀浆。按照细菌 DNA 提取试剂盒方法提取细菌 DNA,利用已建立的多重 PCR 方法进行检测。

1.2.9 临床样品检测 利用已建立的多重 PCR 方法检测陕西省某奶山羊养殖场送检的 200 份待检乳样。乳样 5 mL 10 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清后按照细菌 DNA 提取试剂盒方法提取细菌 DNA,利用已建立的多重 PCR 方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 单项 PCR 扩增

单基因 PCR 扩增后,可分别观察到 276 bp (猪种)、494 bp (牛种)、733 bp (羊种)和 976 bp (绵羊种)的条带(图 1),大小与预期相符,表明设计的引物特异。采用不同的退火温度进行 PCR 反应,结果表明,退火温度为 51、53、55、57 $^{\circ}$ C 时结果差异不大(图 1)。



a. 猪种布鲁菌 *B. suis*; b. 牛种布鲁菌 *B. abortus*; c. 羊种布鲁菌 *B. melitensis*; d. 绵羊种布鲁菌 *B. ovis*; M, DL 2000 DNA marker; 1~4. 退火温度分别为 51、53、55、57 $^{\circ}$ C Annealing temperature were 51 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 57 $^{\circ}$ C, respectively

图 1 单项 PCR 扩增及退火温度的优化

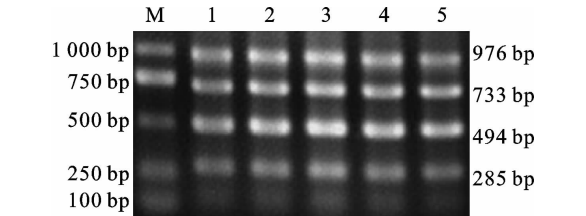
Fig. 1 Single PCR amplification and optimization of annealing temperature

2.2 多重 PCR 退火温度优化

采用不同的退火温度(51、53、55、57、59 $^{\circ}$ C)进行多重 PCR 反应,结果表明,四重 PCR 反应在

53、55、57 $^{\circ}$ C 时都有较好的扩增结果(图 2),以降低非特异性扩增的可能性及得到理想的扩增效果为原则,最终选择 55 $^{\circ}$ C 作为多重 PCR 反应的退

火温度。



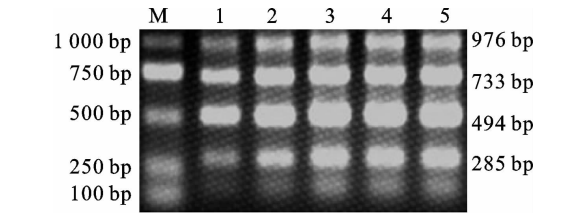
M, DL 2000 DNA marker;1~5. 退火温度分别为 51、53、55、57、59 °C Annealing temperatures were 51 °C, 53 °C, 55 °C, 57 °C and 59 °C, respectively

图 2 多重 PCR 退火温度的优化

Fig. 2 Optimal annealing temperature in multiplex PCR

2.3 引物比例优化

取不同浓度的引物组合进行多重 PCR 反应，以摸索引物的最佳浓度及各引物间的最佳比例。结果表明，4 种引物对的浓度均为 0.6 μmol/L 时多重 PCR 的扩增效果最理想(图 3)。



M, DL 2000 DNA marker;1~5. 猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌引物的浓度分别为: 0. 2、0. 2、0. 2、0. 2 μmol/L; 0. 4、0. 4、0. 4、0. 4 μmol/L; 0. 6、0. 6、0. 6、0. 6 μmol/L; 0. 8、0. 8、0. 8、0. 8 μmol/L; 1. 0、1. 0、1. 0、1. 0 μmol/L Primers concentration (μmol/L)for *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* were 0. 2, 0. 2, 0. 2, 0. 2 μmol/L; 0. 4, 0. 4, 0. 4, 0. 4 μmol/L; 0. 6, 0. 6, 0. 6, 0. 6 μmol/L; 0. 8, 0. 8, 0. 8 0. 8 μmol/L; 1. 0, 1. 0, 1. 0, 1. 0 μmol/L, respectively

图 3 多重 PCR 引物浓度的优化

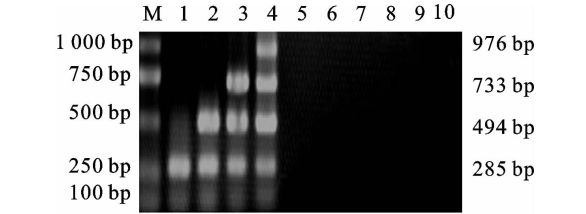
Fig. 3 Optimal primer concentration used in multiplex PCR

2.4 多重 PCR 反应特异性扩增

采用优化的扩增条件进行多重 PCR 反应。结果表明，猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌及 4 种细菌的混合样品均可扩增出特异的目的片段，而其他细菌和水均无扩增条带，结果与预期相符，说明方法特异性良好(图 4)。

2.5 多重 PCR 反应灵敏性试验

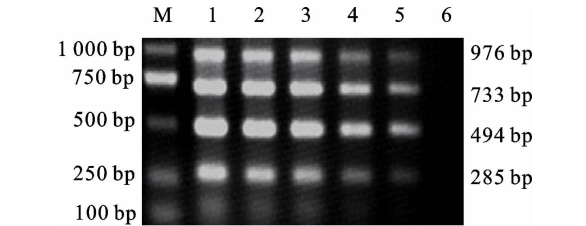
采用优化的多重 PCR 扩增条件扩增倍比稀释的 4 种细菌 DNA，分别测出多重 PCR 对猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌的最低检出量分别为 32. 2、21. 3、27. 5、43. 2 pg(图 5)。



M, DL 2000 DNA marker;1. 猪种布鲁菌 *B. suis*;2. 猪种+牛种布鲁菌 *B. suis* and *B. abortus*;3. 猪种+牛种+羊种布鲁菌 *suis*, *B. abortus* and *B. melitensis*;4. 猪种+牛种+羊种+绵羊种布鲁菌 *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*;5. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*;6. 大肠埃希菌 *Escherichia coli*;7. 多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida*;8. 沙门菌 *Salmonella*;9. 无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*;10. 双蒸水 ddH₂O

图 4 多重 PCR 特异性试验

Fig. 4 Specificity test of multiplex PCR



M, DL 2000 DNA marker;1~6. 10¹~10⁶ 倍比稀释的 4 种细菌 DNA 混合物的 PCR 扩增结果 PCR result for different dilutions of template from 10¹ to10⁶

图 5 多重 PCR 灵敏性测定

Fig. 5 Sensitivity of multiplex PCR assay

2.6 重复性试验

用建立的多重 PCR 方法在不同时间进行 3 次重复试验，结果获得相同的检测结果，表明该方法重复性良好。

2.7 人工模拟试验

无菌采取 1~16 号小鼠病料并提取 DNA，按照优化的多重 PCR 方法进行扩增，结果见图 6。每份病料均扩增出所感染细菌相应的特异条带，



M, DL 2000 DNA marker;1~16. 1~16 号小鼠样品 Samples of 1-16 mice

图 6 人工模拟试验多重 PCR 检测

Fig. 6 Multiple PCR detection results of artificial simulation test

而生理盐水对照无扩增条带,证明建立的多重PCR方法可以应用于临床病料的检测。

2.8 临床样本检测

对200份奶样进行检测,结果检出4份阳性,均为羊种布鲁菌,检出率约为2%。部分样品的检测电泳结果见图7。4份阳性样品经回收后测序均为羊种布鲁菌的特异性序列。

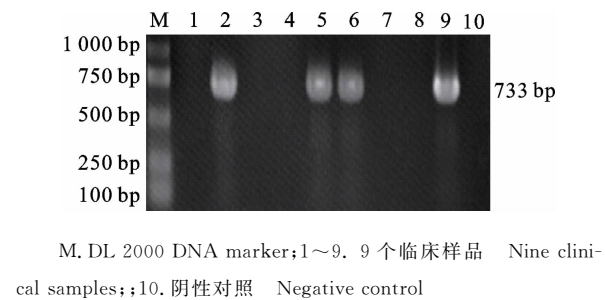


图7 部分临床样品的多重PCR检测
Fig. 7 Multiple PCR detection results of some clinic samples

3 讨论

布鲁菌可感染猪、牛、羊、绵羊、鼠、犬和人类,对养殖行业以及人类健康构成严重威胁^[11]。布鲁菌病在全世界许多国家都有分布,不论它在哪个国家暴发都会给该国带来巨大的经济损失,甚至造成人员的死亡,因此它在公共卫生上有很重要的意义。由于传统的检测方法有很多的缺点和局限性,不能在全世界范围内消灭布氏杆菌病。近年来,随着分子生物学的不断发展和各项技术的广泛应用,为细菌分类鉴定提供一些有效的新方法,可以在基因水平上对布氏杆菌病进行检测,提高检测的准确性和速度。

IS711是布鲁菌基因组中特有的插入序列,该序列在不同种布鲁菌基因组中非常保守,但却存在拷贝数差异^[6]。本研究参照Genbank提供的猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌的IS711基因序列和相关文献^[6-7,12],选取4对特异性引物,扩增片段大小分别为276 bp(猪种)、494 bp(牛种)、733 bp(羊种)和976 bp(绵羊种)。本研究首先经过摸索反应条件建立单项PCR反应,然后通过预试验确定多重PCR反应的循环体系及反应条件,重点对影响多重PCR反应的主要因素如退火温度和引物浓度进行适当的调整和优化,最终确定多重PCR的最佳退火温度为55℃,最佳引物浓度为0.6 μmol/L。本研究建立的多重PCR

反应对猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌DNA的最低检出量分别为32.2、21.3、27.5、43.2 pg,具有较高的灵敏性,这样的敏感性远高于传统的检测方法,并且已经可以满足临床检测和监测的需要。

本试验中目的片段均间隔200 bp以上,扩增结果显示,目的条带在琼脂糖凝胶电泳后易于区分且无非特异性扩增出现。用本试验建立的PCR方法对临床模拟样品和临床奶样品进行检测,结果模拟试验显示完全能够检测到四重、三重、两重、单一细菌的感染,临床奶样也检出布鲁菌的污染。本研究建立的多重PCR检测方法可以为快速检测猪种、牛种、羊种、绵羊种布鲁菌提供敏感和特异的技术手段,以期达到对导致动物疫病以及动物奶产品污染的布鲁菌的快速检测。

参考文献 Reference:

[1] 吐尔洪·努尔,谷文喜,何倩倪,等.布鲁菌病研究进展[J].动物医学进展,2007,28(7):82-87.
TUERHONG·NUER, GU W X, HE Q N, *et al.* Advance in brucellosis[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(7):82-87(in Chinese with English abstract).
[2] SOLMAZ H, CANTEKIN Z, ALTUG N, *et al.* A PCR method with internal control for detection of *Brucella* spp. from bovine abortion samples[J]. *Revue De Medecine Veterinaire*, 2014, 165(9-10):253-257.
[3] 陆承平.兽医微生物学(第4版)[M].北京:中国农业出版社,2007:151-154.
LU CH P. *Veterinary Microbiology*[M]. 4th Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2007:151-154(in Chinese).
[4] HASHEMI S H, ASADI F T, ALIKHANI M Y, *et al.* Comparison of serology, culture and polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of human brucellosis[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016 (45):476.
[5] 张彦婷,刘艳琴,赵林立,等.布鲁氏菌检测技术的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2008,29(6):43-46.
ZHANG Y T, LIU Y Q, ZHAO L L, *et al.* Research progress of detection technique of *Brucella*[J]. *Animal Husbandry & Feed Science*, 2008, 29(6):43-46(in Chinese with English abstract).
[6] 陈伟业,胡森,黄克和,等. IS711和OMP2作为布氏杆菌种属及菌株间分子鉴别诊断标记的研究[J].中国预防兽医学报,2006,28(6):676-680.
CHEN W Y, HU S, HUANG K H, *et al.* IS711 and OMP2 as molecular markers for identification of *Brucella* species and strains[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 28(6):676-680(in Chinese with English abstract).
[7] 丁家波,张存帅,彭小兵,等.布鲁菌种属鉴定多重PCR方法的建立及初步应用[J].中国兽医学报,2009,29(5):594-

- 597.
- DING J B, ZHANG C SH, PENG X B, *et al.* Development and preliminary application of multi-PCR in differentiating *Brucella* spp[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 29(5): 594-597 (in Chinese with English abstract).
- [8] ALAMIAN S, AGHAIPOOR K, ZAHRAEI SALEHI T, *et al.* Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains using a single-stage PCR method[J]. *Archives of Razi*, 2015, 70(1): 51-55.
- [9] ALI S, ALI Q, MELZER F, *et al.* Isolation and identification of bovine *Brucella*, isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR[J]. *Tropical Animal Health & Production*, 2014, 46(1): 73-78.
- [10] NAN W, TAN P, WANG Y, *et al.* Duplex PCR for differentiation of the vaccine strain *Brucella suis* S2 and *B. suis* biovar 1 from other strains of *Brucella* spp[J]. *The Veterinary Journal*, 2014, 201(3): 427-428.
- [11] MARZETTI S, CARRANZA C, Roncallo M, *et al.* Recent trends in human *Brucella canis* infection[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2013, 36(1): 55-61.
- [12] CHOTHE S, SAXENA H M, CHACHRA D. Comparative evaluation of PCR and ELISA for diagnosing bovine brucellosis[J]. *Intas Polivet*, 2013, 14(1): 80-85.

Foundation and Initial Application of Multiplex PCR Method for Detecting *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* Infection

HE Yapeng, XU Xingang, FU Mingzhe and ZHANG Qi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In order to develop multiplex PCR assay for clinical detection of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* infection, four pairs of primers were designed and synthesized based on highly conserved regions of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* genome sequence in Genbank. The multiplex PCR reaction condition was optimized and multiplex PCR method for detecting *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* infection was established. The specificity test showed that fragments of 276 bp, 494 bp, 733 bp and 976 bp were amplified from genomic DNA of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*, respectively. No amplification was achieved from control groups of other bacteria. The sensitivity test showed that the multiplex PCR could detect genome DNA of 21.3 pg for *B. abortus*, 27.5 pg for *B. melitensis*, 43.2 pg for *B. ovis* and 32.2 pg for *B. suis*. The artificial simulation test showed that the multiplex PCR could detect four kinds of pathogens from co-infection disease material. The initial application test showed 200 clinical goat's milk samples were subjected to PCR. Among 4 clinical samples were *B. melitensis*-positive. The result indicated the multiplex PCR method had advantages of specificity, sensitivity, repetition, and it could effectively detect the infection of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* in clinical samples.

Key words *B. suis*; *B. abortus*; *B. melitensis*; *B. ovis*; Multiplex PCR

Received 2016-05-03 **Returned** 2016-05-23

Foundation item Scientific and Technological Projects of Shaanxi Province (No. 2016NY-092); Project of Major Industrial Innovation Chain of Shaanxi Province (No. 2016KTZDNY02-06); Project for Technology Achievement Extension of Demonstration Station (Base) of Northwest A&F University (No. TGZX2015-32).

First author HE Yapeng, male, master student. Research area: molecular etiology and immunology. E-mail: 879533817@qq.com

Corresponding author ZHANG Qi, female, Ph. D, lecturer. Research area: molecular etiology. E-mail: 273010466@qq.com

FU Mingzhe, male, senior veterinarian. Research area: sheep diseases. E-mail: 286567031@qq.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)