

贵州省一起人间布鲁氏菌病疫情的菌株鉴定及遗传特征分析

李世军 王月 王定明 田克诚 刘英 马青 刘昭宾 龚晓俊 唐光鹏 陈贵春

【摘要】 目的 鉴定贵州省一起人间布鲁氏菌病(布病)疫情来源菌株(GZZA)并分析其遗传特征。方法 应用传统方法和聚合酶链反应(PCR)鉴定菌株,采用多位点可变数目串联重复序列(MLVA)-16分析其遗传特征。结果 菌株(GZZA)采用传统方法和PCR鉴定为羊种生物3型布鲁氏菌,MLVA-16分析显示该菌株与布鲁氏菌各型代表菌株中的羊种生物3型布鲁氏菌聚类最近,但在重复序列(VNTR)位点 bruce42、bruce04、bruce09 和 bruce16 与羊种生物3型布鲁氏菌存在重复数目差异。结论 该起疫情来源菌株(GZZA)鉴定为羊种生物3型布鲁氏菌,其遗传特征与羊种生物3型菌株最接近,但部分VNTR位点存在重复数目差异。

【关键词】 布鲁氏菌;聚合酶链反应;多位点可变数目串联重复序列

Identification and genetic characteristics on the bacteria isolate from a case of human Brucellosis in Guizhou province Li Shi-jun, WANG Yue, WANG Ding-ming, TIAN Ke-cheng, LIU Ying, MA Qing, LIU Zhao-bin, GONG Xiao-jun, TANG Guang-peng, CHEN Gui-chun. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China

Corresponding author: Li Shi-jun, Email: zjumedjun@163.com

This work was supported by a grant from the High-Level Talents Assistant Research Fund of Guizhou Province (No. TZJ-2010-100).

【Abstract】 Objective A suspected *Brucella* (*B.*) strain (GZZA), isolated from a case of anti-*Brucella* antibody positive patient was identified and its' genetic characteristics was analyzed, to provide etiologic basis for the confirmation of patient in Guizhou province. **Methods** Conventional methods and polymerase chain reaction (PCR) were used to identify the bacteria strain, with genetic characteristics analyzed by MLVA-16. **Results** The bacteria strain was identified as *B. melitensis* biovar 3 under the conventional and PCR methods. Results from the MLVA-16 analysis indicated that the bacteria strain was closely clustered with *B. melitensis* biovar 3, and differences of repeated numbers at VNTR loci bruce42, bruce04, bruce09 and bruce16 were also displayed. **Conclusion** Both traditional and molecular methods to identify one bacteria strain isolated from the human patient as *B. melitensis* biovar 3 and the genetic characteristics of the strain was closely related to that of *B. melitensis* biovar 3. Differences of repeated numbers at part of VNTR loci were also showed. The results of this study provided etiologic evidences for the confirmation of *Brucella* infection of the patient, also providing scientific basis for the control and prevention of Brucellosis in Guizhou province.

【Key words】 Brucellosis; Polymerase chain reaction; MLVA-16

布鲁氏菌病(布病)为布鲁氏菌属(*Brucella*)细菌感染的人兽共患病^[1]。贵州省已分别于2009和2011年首次从山羊和患者分离出羊种布鲁氏菌,证实布病在畜间和人间的存在^[2,3],随后疫情迅速扩散,病例数快速上升,防控形势非常严峻。本研究鉴

定贵州省1例布鲁氏菌抗体阳性患者来源菌株并分析其遗传特征,为病例确诊提供病原学证据及为贵州省布病疫情的预防和控制提供科学依据。

材料与与方法

1. 疫情资料:患者男性27岁,家住贵州省正安县碧峰乡。2012年5月6日出现高热(41℃)、寒战,就诊于私人诊所,给予对症治疗,无好转,5月8日就诊于遵义医学院附属医院。随后从患者血液分离到布鲁氏菌可疑细菌,诊断为布鲁氏菌感染病例,并报

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.07.013

基金项目:贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(TZJ-2010-100)

作者单位:550004 贵阳,贵州省疾病预防控制中心传染病防治研究所

通信作者:李世军, Email: zjumedjun@163.com

告遵义市疾病预防控制中心,可疑菌株及患者血清送至贵州省疾病预防控制中心鉴定。

2. 菌株和试剂:布鲁氏菌培养基采用进口布鲁氏菌肉汤(BD公司,产品号211088)和布鲁氏菌琼脂(BD公司,产品号211086)并按照说明书配制;冻干布鲁氏菌阳性血清、冻干布鲁氏菌单项特异性血清(A、M和R)、布鲁氏菌特异噬菌体均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供;PCR引物由大连宝生物科技有限公司合成。实验菌株为分离自布鲁氏菌抗体阳性患者血液的布鲁氏菌疑似菌株(GZZA),阳性对照菌株为实验室保存的布鲁氏菌菌株,PCR定种对照菌株疫苗株A19(牛种)、M5(羊种)和S2(猪种)均为兰州生物制品研究所提供。

3. 菌株鉴定:

(1)传统方法鉴定布鲁氏菌种/型:包括观察菌落生长时间、形态、菌体染色、CO₂需要、硫化氢(H₂S)产生、硫堇和碱性复红染料抑菌试验、单相特异性血清(A、M和R)凝集试验、布鲁氏菌噬菌体裂解试验(Tb、BK₂和Wb)^[4]。

(2)BCSP31-PCR鉴定布鲁氏菌属:采用布鲁氏菌属特异性基因BCSP31作为定属基因,按照参考文献[2,3]提供的B4和B5引物序列和参数进行扩增。

(3)AMOS-PCR法鉴定布鲁氏菌种/型:采用参考文献[3,5]提供的以布鲁氏菌属IS711插入序列为基础建立的AMOS-PCR鉴别布鲁氏菌种/型,其引物序列见表1,扩增过程按照相同文献的操作程序进行。

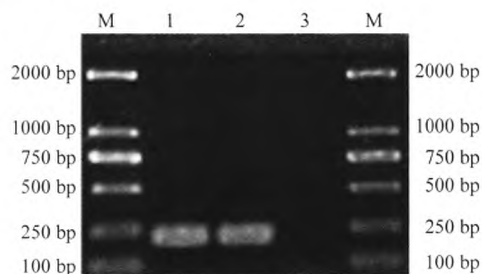
(4)MLVA-16分析:采用参考文献[5,6]提供的以布鲁氏菌16个重复序列位点引物及PCR扩展参数进行扩增,扩增产物委托大连宝生物公司进行纯化和双向序列测定,将所测序列采用DNAS_{tar}软件进行拼接,再根据参考文献[6,7]报道的布鲁氏菌MLVA-16各位点重复单元长度和重复数目换算表计算出重复序列的重复数目。从Brucella MLVA数据库(<http://mlva.u-psud.fr>)下载布鲁氏菌各种型菌株MLVA-16数据,采用NTsys 2.10e软件将所测菌株GZZA的MLVA-16各位点数据与数据库下载的各种型菌株的MLVA-16数据进行聚类分析。

结 果

1. 菌落及染色鉴定:将可疑菌株转种布鲁氏菌琼脂培养基培养48 h后,可见大小约0.5 mm、圆形、边缘整齐、无色半透明、呈露滴状、折光明亮、表面光滑湿润、稍隆起、均质样菌落。对转种菌株培养后的菌落进行革兰染色镜检,结果为阴性、短小杆菌,多为单个,有少数双或链状排列。

2. 传统方法鉴定布鲁氏菌种/型:采用布鲁氏菌单相特异性血清A、M和R与可疑菌落进行凝集试验,结果培养瓶的菌落均与A和M血清发生凝集。生化实验结果表明菌株对CO₂无依赖,不产生H₂S,硫堇和碱性复红染料培养基中均能生长,不被噬菌体Tb、Wb裂解,但能被噬菌体Bk₂裂解(表1)。

3. BCSP31-PCR鉴定:采用煮沸法提取疑似菌株核酸,经BCSP31-PCR扩增,阳性对照产物经1.5%琼脂糖电泳检测,同时采用羊种3型布鲁氏菌经相同方法处理作为阳性对照,采用无菌水作为阴性对照,结果表明分离菌株及阳性对照均出现分子量大小为223 bp的特异条带,而阴性对照无条带出现(图1)。



注:M:分子量标准;1:GZZA;2:阳性对照;3:阴性对照

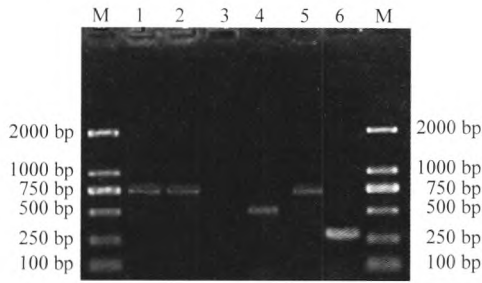
图1 分离株GZZA的BCSP31-PCR结果

4. AMSO-PCR检测:采用AMOS-PCR对疑似菌株和阳性株菌核酸进行扩增,产物经1.0%琼脂糖电泳检测,结果显示本次分离菌株及阳性对照均出现分子量大小为731 bp的特异条带,而阴性对照无条带出现(图2)。

5. MLVA-16分析:采用MLVA-16的16个重复序列位点引物序列对GZZA核酸进行PCR扩增,经2.0%琼脂糖凝胶电泳均出现清晰条带(图3),扩增产物经测序拼接并根据重复单元长度计算出

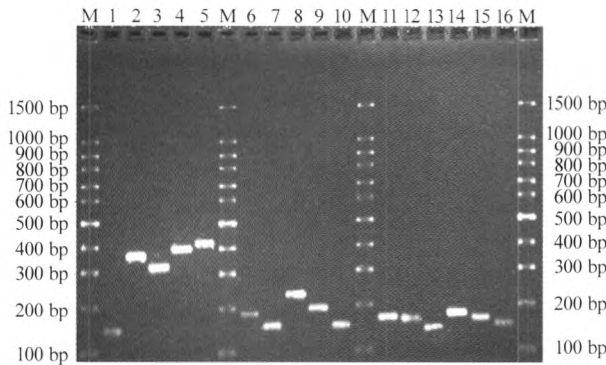
表1 贵州省一起布病疫情中分离菌株的传统方法鉴定结果

菌株	分离年份	CO ₂ 需要	H ₂ S需要	染料抑菌		血清凝集			RTD噬菌体			鉴定结果
				碱性复红	硫堇	A	M	R	Tb	Wb	Bk ₂	
GZZA	2012	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	羊种3型
羊种3型(对照)	2010	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	羊种3型



注: M: 分子量标准; 1: GZZA; 2: 羊种 3 型菌株; 3: 阴性对照;
4: 牛种 1 型菌株; 5: 羊种 1 型菌株; 6: 猪种 1 型菌株

图 2 分离株 GZZA 的 AMOS-PCR 结果



注: M: 分子量标准; 1: Bruce06; 2: Bruce08; 3: Bruce11;
4: Bruce12; 5: Bruce42; 6: Bruce43; 7: Bruce45; 8: Bruce55;
9: Bruce04; 10: Bruce07; 11: Bruce09; 12: Bruce16; 13: Bruce18;
14: Bruce19; 15: Bruce21; 16: Bruce30

图 3 分离株 GZZA 的 MLVA-16 各重复位点 PCR 检测结果

Bruce06、Bruce08、Bruce11、Bruce12、Bruce42、Bruce43、Bruce45、Bruce55、Bruce04、Bruce07、Bruce09、Bruce16、Bruce18、Bruce19、Bruce21 和

Bruce30 位点的重复数目依次为 1、5、3、13、2、2、2、2、4、20、8、4、4、6、4 和 4, 将各位点重复序列重复数与 MLVA 数据库 (<http://mlva.u-psud.fr>) 收录的布鲁氏菌各种型菌株 MLVA-16 数据采用 NTsys 2.10e 软件进行聚类分析, 显示 GZZA 与羊种生物 3 型布鲁氏菌聚类最近, 但在位点 bruce42、bruce04、bruce09、bruce16 和 bruce19 位点存在重复数目差异 (图 4)。

讨 论

近年来我国布病疫情快速上升, 尤其是 2000 年后成为报告发病数上升速度最快的传染病, 其主要流行区仍在华北、东北和西北地区, 如内蒙古自治区 2011 年报告布病病例 20 845 例, 发病率为 84.4/10 万, 占全国报告病例数的 49%, 发病率是 1992 年的 2000 多倍^[2,3]。但既往鲜有病例的南方地区疫情也日趋严重, 不仅有与北方相同的羊种菌引起的病例, 还有因牛种菌、猪种菌引起不同体征的感染者, 使布病疫情复杂化^[6,8]。在贵州省分别于 2010 年和 2011 年首次从患病动物 (羊) 和患者分离出羊种布鲁氏菌^[2,3], 之后散发和暴发疫情时有发生, 疫情迅速扩散, 已涉及贵阳、黔南、黔东南、铜仁、遵义、黔西南 6 个州 (市), 相继从疫情的动物 (羊) 和患者血液分离到羊种布鲁氏菌。

布鲁氏菌多种生物型可能与病原菌为适应不同宿主而发生遗传变异有关, 因此了解病原体的遗传特征对布病的有效控制至关重要。本研究采用

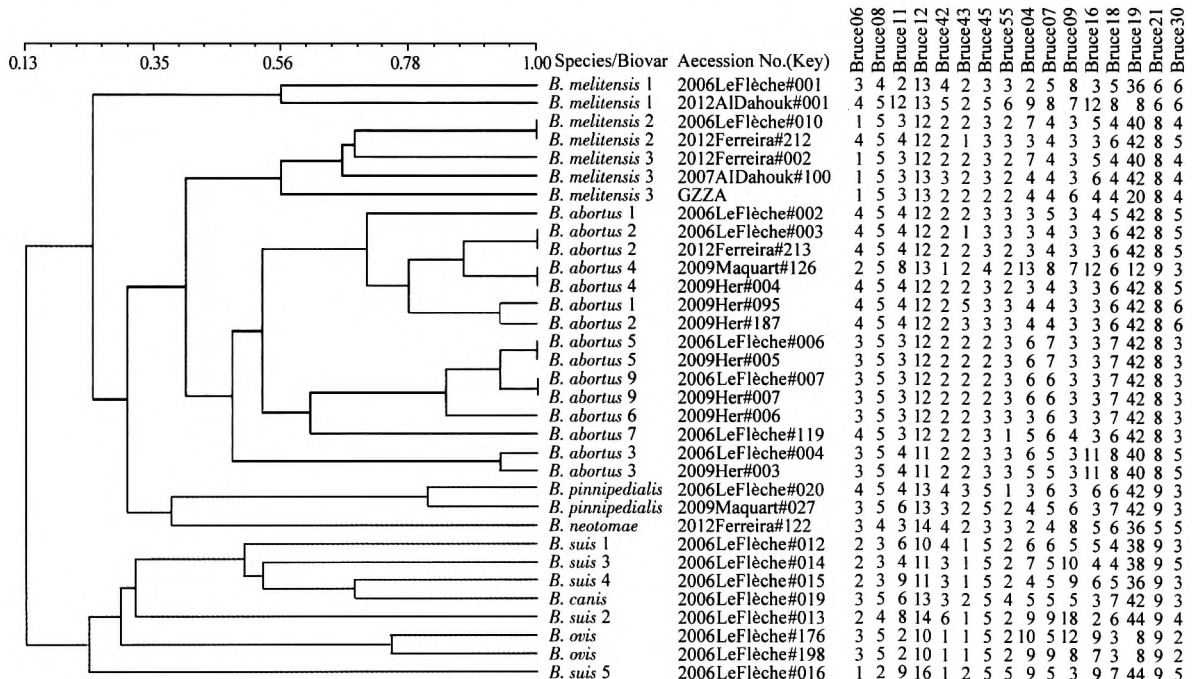


图 4 分离株 GZZA 与布鲁氏菌各种型菌株 MLVA-16 聚类分析

MVA-16 分析显示,本次分离的布鲁氏菌菌株与 *Brucella* MLVA 数据库 (<http://mlva.u-psud.fr>) 收录的羊种生物 3 型布鲁氏菌聚类最近。由于我国近年流行的布鲁氏菌菌型主要为羊种生物 3 型^[8],提示本次分离菌株的遗传特征与我国近年主要流行的羊种生物 3 型布鲁氏菌最接近,流行病学调查资料也显示,本次疫情患者为养羊户,因此其病原来源可能因从外地引进羊种而输入至当地。此外本次分离菌株与羊种生物 3 型菌株在位点 bruce42、bruce04、bruce09、bruce16 和 bruce19 存在重复数目差异,提示其遗传特征与数据库收录的羊种生物 3 型菌株具有一定差异,而其变异和多态性与菌株致病力的关系还需进一步研究。

BCSP31-PCR 是以布鲁氏菌属特异基因 *BCSP31* 为靶基因的检测方法,基于该基因的 B4、B5 引物具有良好的特异性和敏感性,该方法得到广泛应用^[9,10]。本研究选用 BCSP31-PCR 作为布鲁氏菌定属方法,结果分离菌株 *BCSP31* 基因检测结果呈阳性。AMOS-PCR 是根据电泳条带鉴别布鲁氏菌牛种 1、2、4 型(498 bp)、羊种布鲁氏菌(731 bp)、猪种 1 型(285 bp)、绵羊附睾种(961 bp),已有广泛应用^[11-13],其鉴定结果与传统方法符合率非常高^[6]。

综上所述,本研究通过传统和分子生物学方法对布病疑似患者鉴定为羊种生物 3 型布鲁氏菌感染,MLVA-16 分析显示该菌株的遗传特征与羊种生物 3 型布鲁氏菌最接近,但部分 VNTR 位点发生重复数目改变,为病例确证提供了病原学证据,也为贵州省布病疫情的预防和控制提供科学依据。

(感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布病室崔步云研究员和李兰玉等指导和帮助)

参 考 文 献

- [1] Shang DQ. Brucellosis raging again and the reasons. *Chin J Contr Endem Dis*, 2001, 16(1):29-34. (in Chinese)
尚德秋. 布鲁氏菌病再度肆虐及其原因. *中国地方病防治杂志*, 2001, 16(1):29-34.
- [2] Li SJ, Wang Y, Chen H, et al. Isolation and identification of *Brucella melitensis* firstly isolated from goat in Guizhou province. *Chin J Zoonoses*, 2011, 27(6):515-518. (in Chinese)
李世军, 王月, 陈红, 等. 贵州省首次从山羊分离到布鲁氏菌及其种型鉴定. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(6):515-518.
- [3] Li SJ, Wang Y, Wang DM, et al. Etiologic diagnosis and analysis of the first case of human brucellosis in Guizhou province. *Chin J*

Endem Dis, 2012, 31(5):69-71. (in Chinese)

李世军, 王月, 王定明, 等. 贵州省首例人间布鲁氏菌病例的病原学诊断与分析. *中国地方病学杂志*, 2012, 31(5):69-71.

- [4] Lin DH, Wang LL, Chen L, et al. Identification of *Brucella* strains firstly isolated from patients in Fujian province. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(1):1071-1073. (in Chinese)
林代华, 王灵岚, 陈亮, 等. 福建省首次从人体分离到的布鲁氏菌的初步研究. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(1):1071-1073.
- [5] Jiang H, Cui BY, Zhao HY, et al. Use of AMOS-PCR assay for the species identification of *Brucella*. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(2):107-109. (in Chinese)
姜海, 崔步云, 赵鸿雁, 等. AMOS-PCR 对布鲁氏菌种型鉴定的应用. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(2):107-109.
- [6] Jiang H, Fan MG, Chen JD, et al. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. *BMC Microbiol*, 2011, 11:256.
- [7] Deng YQ, Wang JX, Lin DH, et al. Molecular identification of the *Brucella* strains isolated in Fujian province. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(7):636-639. (in Chinese)
邓艳琴, 王加熊, 林代华, 等. 福建省布鲁氏菌分离株的分子生物学鉴定. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(7):636-639.
- [8] Cui BY. *Brucella* epidemic situation and vaccine research in China. *Chin J Endem Dis*, 2012, 31(4):355-356. (in Chinese)
崔步云. 关注中国布鲁杆菌病疫情发展和疫苗研究. *中国地方病学杂志*, 2012, 31(4):355-356.
- [9] Chen JD, Deng XL, Ke BX, et al. Etiological analysis of brucellosis in Guangdong province. *Dis Surveil*, 2008, 23(5):227-229. (in Chinese)
陈经雕, 邓小玲, 柯碧霞, 等. 广东省布鲁氏菌病原学特征分析. *疾病监测*, 2008, 23(5):227-229.
- [10] Wang L, Ma GZ. The research for diagnosing brucellosis patient with PCR technology. *Chin J Contrl Endem Dis*, 2004, 19(2):65-67. (in Chinese)
王丽, 马国柱. PCR 技术用于布鲁氏菌病的诊断研究. *中国地方病防治杂志*, 2004, 19(2):65-67.
- [11] Peng XB, Cheng JS, Xia YC, et al. A multi-PCR assay for differentiating the strains of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*. *Chin J Veterinary*, 2010, 44(2):12-14. (in Chinese)
彭小兵, 程君生, 夏业才, 等. 多重 PCR 方法鉴别牛、羊、猪种布鲁氏菌株. *中国兽药杂志*, 2010, 44(2):12-14.
- [12] Di Giannatale E, De Massis F, Ancora M, et al. Typing of *Brucella* field strains isolated from livestock populations in Italy between 2001 and 2006. *Vet Ital*, 2008, 44(2):383-388.
- [13] Matope G, Bhebhe E, Muma JB, et al. Characterization of some *Brucella* species from Zimbabwe by biochemical profiling and AMOS-PCR. *BMC Res Notes*, 2009, 22(2):261.

(收稿日期:2013-01-28)

(本文编辑:张林东)