

贵州省2010—2012年6株羊种布鲁氏菌分子流行病学特征研究

李世军 刘英 王月 马青 黄艳 周敬祝 余春
田克诚 邹志霆 唐光鹏 王定明

【摘要】 目的 了解贵州省近年羊种布鲁氏菌分离株的分子流行病学特征。方法 应用布鲁氏菌属外膜蛋白31基因PCR(BCSP31-PCR)和基于插入序列IS711的牛、羊、绵羊附睾和猪种布鲁氏菌特异的PCR(AMOS-PCR)对贵州省2010—2012年间分离的6株布鲁氏菌进行鉴定,采用16个可变量串联重复序列(VNTR)的多位点可变数目重复序列分析(MLVA-16)方法对上述菌株进行分型,并做聚类分析。结果 6株菌经BCSP31-PCR鉴定为布鲁氏菌属细菌、AMOS-PCR鉴定为羊种布鲁氏菌。MLVA-16分析显示,6株菌在部分VNTR位点上存在重复数目差异,菌株ZY和ZA为MT63型,菌株LL3、LL4和LL11为MT67型,菌株SQ为MT72型。聚类分析显示,6株菌株中的ZY、ZA、LL3、LL4和LL9株与来自云南、福建和广东省羊3型布鲁氏菌聚类最近,菌株SQ与其他菌株聚类相对较远。结论 2010—2012年贵州省布鲁氏菌分离株均为羊种生物3型,菌株间存在重复序列多态性,与来自云南、福建和广东省羊3型布鲁氏菌聚类最近。

【关键词】 布鲁氏菌,羊种;分子流行病学

Study on the epidemiologic characteristic of *Brucella melitensis* isolated in Guizhou province in 2010–2012 Li Shijun, Liu Ying, Wang Yue, Ma Qing, Huang Yan, Zhou Jingzhu, Yu Chun, Tian Kecheng, Zou Zhiting, Tang Guangpeng, Wang Dingming. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China

Corresponding author: Li Shijun, Email: zjumedjun@163.com

This work was supported by grants from the Science and Technology Projects for Social Development in Guizhou Province (No. SY[2013]3049), Special Assistant Funding Projects for High-level Personnel in Guizhou Province (No. TZJF-2010-100) and Program of Natural Science Foundation of Guizhou Provincial Government (No. [2013]2166).

【Abstract】 Objective To understand the genetic and epidemiologic characteristic of *Brucella* (*B.*) *melitensis* strains isolated in Guizhou province in 2010–2012. **Methods** *B. genus* specific BCSP31-PCR and species-specific AMOS-PCR were used to identify the bacteria strain, while the identified strains were analyzed under MLVA-16 and cluster analysis of *B. melitensis* strains. The strains were isolated from Guizhou and other provinces. **Results** Six *B. melitensis* strains were identified as *B. melitensis* using the BCSP31-PCR and AMOS-PCR. Data from the MLVA-16 analysis revealed the differences of repeated numbers at parts of the VNTR locus in the six strains isolated in Guizhou province. The six strains from Guizhou province and 105 *B. melitensis* strains from other province could be divided into 72 MLVA types (MT). Strain ZY and ZA from Guizhou province were typed as MT63, and LL3, LL4 and LL11 were typed as MT67, while strain SQ was typed as MT72. Data from the clustering analysis showed that ZY, ZA, LL3, LL4 and LL9 were most closely clustered with *B. melitensis* isolates from Yunnan, Fujian and Guangdong provinces, but strain SQ was genetically remote from other strains. **Conclusion** PCR methods, combined with MLVA-16, identified the six *B. melitensis* strains isolated in Guizhou province in 2010–2012 as *B. melitensis* biovar 3, with the genetic diversity of the strains showed. Six strains were closely related to the *B. melitensis* strains from Yunnan, Fujian and Guangdong provinces. The results of this study provided scientific basis for the control and prevention of Brucellosis in Guizhou province.

【Key words】 *Brucella melitensis*; Molecular epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.014

基金项目:贵州省科技公关计划社会发展项目(黔科合SY[2013]3049);贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(TZJF-2010-100号);贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2166号)

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

布鲁氏菌病(Brucellosis)(布病)是由布鲁氏菌属(*Brucella*)侵入机体引起世界性、多宿主感染的人兽共患病^[1]。贵州省分别于2010和2011年首次从患病动物(山羊)和患者分离出羊种布鲁氏菌,从病原学角度证实贵州省人和动物中存在布病感染^[2,3]。本研究以贵州省布鲁氏菌分离株为研究对象,采用布鲁氏菌属外膜蛋白31基因PCR(BCSP31-PCR)和基于插入序列IS711的牛、羊、绵羊附睾和猪种布鲁氏菌特异的PCR(AMOS-PCR)技术鉴定其属和种(型),应用基于16个可变数量串联重复序列(VNTR)的多位点可变数目重复序列分析(MLVA-16)技术分析贵州省人和动物来源布鲁氏菌的分子流行特征。

材料与方法

1. 试剂:布鲁氏菌培养基采用进口布鲁氏菌肉汤(批号为211088)和琼脂(批号为211086)成品培养基(均购自美国BD公司),按照说明书配制。布鲁氏菌阳性血清、单项特异性血清(A、M和R)、特异噬菌体(Tb、BK-2、Wb、Fi)均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布病室提供。PCR引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR相关试剂购于宝生物工程(大连)有限公司。

2. 菌株:实验菌株为分离自贵州省2010—2012年患者与动物(山羊)血液,并经传统方法鉴定为羊种生物3型布鲁氏菌菌株(命名为ZY、ZA、SQ、LL3、LL4和LL11),其中菌株ZY来源于铜仁市德江县患者,菌株ZY和ZA来源于遵义市和正安县患者,SQ来源于石阡县患者。LL3、LL4和LL11为黔南市龙里县动物(山羊)疫情来源菌株。阳性对照菌株为布鲁氏菌疫苗株A19(牛种)、M5(羊种)和S2(猪种)(购自兰州生物制品研究所有限责任公司)。

3. DNA提取:挑取布鲁氏菌可疑菌落接种于布鲁氏菌琼脂平板,培养48 h后采用水煮法提取细菌核酸。

4. BCSP31-PCR法鉴定布鲁氏菌属:采用布鲁氏菌属特异性基因BCSP31作为定属基因,按照文献[2,3]提供的B4和B5引物序列和参数进行布鲁氏菌属的鉴定。

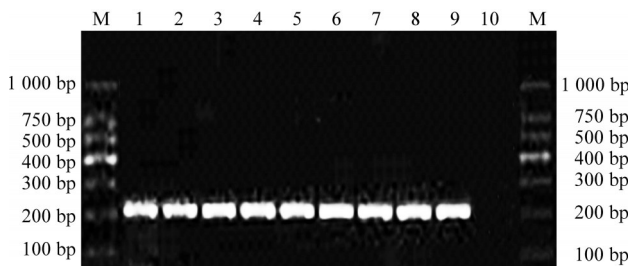
5. AMOS-PCR法鉴定布鲁氏菌种/型:采用参考文献[3,4]提供的以布鲁氏菌属IS711插入序列为基础建立的AMOS-PCR引物及参数进行布鲁氏菌种/型的鉴定。

6. MLVA-16分析:采用参考文献[5,6]提供的

方法进行,采用Bio-Numerics 4.0软件将本次所测菌株的MLVA-16各位点数据与文献报道^[5]的我国其他省份的105株羊种布鲁氏菌菌株的MLVA-16数据进行聚类分析。

结果

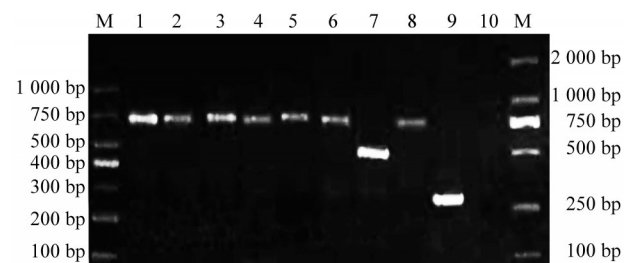
1. BCSP31-PCR鉴定:BCSP31-PCR方法对分离株和对照菌株核酸进行扩增,产物采用1.5%琼脂糖电泳进行检测,结果显示,分离株及阳性对照菌株核酸均扩增出布鲁氏菌属特异的223 bp的条带,而阴性对照无条带出现(图1)。



注: M: 相对分子质量标准; 1: ZY株; 2: ZA株; 3: SQ株; 4: LL3株; 5: LL4株; 6: LL11株; 7: 疫苗株A19; 8: 疫苗株M5; 9: 疫苗株S2; 10: 阴性对照

图1 贵州省羊种布鲁氏菌分离株BCSP31-PCR检测结果

2. AMOS-PCR检测:AMOS-PCR方法对分离株和对照菌株核酸进行扩增,产物采用1.5%琼脂糖电泳检测。结果显示,分离株及阳性对照菌株核酸均扩增出羊种布鲁氏菌特异的731 bp条带,而阴性对照无条带出现(图2)。



注: 同图1

图2 贵州省羊种布鲁氏菌分离株AMOS-PCR检测结果

3. MLVA-16分析:采用MLVA-16的16个VNTR位点引物序列对菌株核酸进行PCR扩增,然后采用2.0%琼脂糖凝胶电泳均出现清晰条带,扩增产物测序拼接后在测序序列上标记出引物序列的位置并去除多余序列后获得各位点的序列长度,根据重复单元长度计算出Bruce06、08、11、12、42、43、45、55、04、07、09、16、18、19、21和30位点的重复数目(图3)。16个位点的重复数目显示,6株贵州省布鲁

氏菌在VNTR位点Bruce06、08、11、12、43、45、55、18和21上的重复数目完全相同, VNTR位点Bruce42、04、07、09、16、19和30上存在重复数目差异(图3)。6株分离株中菌株ZY与ZA, 菌株LL3、LL4和LL11各位点的重复数目分别完全相同。6株菌与来自我国其他省份的105株羊种布鲁氏菌被分为72个MT型, 其中菌株ZY和ZA为MT63型, 菌株LL3、LL4和LL11为MT67型, 菌株SQ为MT72型(图3)。将各位点重复数目与来自我国其他省份105株羊种布鲁氏菌的MLVA-16数据进行聚类分析, 结果显示, 2010年分离自山羊的菌株LL3、LL4和LL11, ZY与ZA分别聚类最近, 相似性分别为100%。菌株SQ与贵州省其余5株菌相对较远, 相似性在60%左右。贵州省分离菌株LL3、LL4和LL11, ZY与ZA与云南、广东和福建省的羊种生物3型布鲁氏菌聚类较近, 菌株SQ与其他菌株聚类关系相对较远(图3)。

讨 论

贵州省分别于2010和2011年首次从患病动物(羊)和患者分离出羊种布鲁氏菌^[2,7], 此后, 布病疫情在贵州省迅速扩散, 散发和暴发疫情时有发生, 因此, 布病属贵州省新发传染病。本研究将来源于贵州省患者和动物的6株菌株采用属特异性BCSP31-PCR和AMOS-PCR进行鉴定, 结果显示本次分离的可疑细菌为羊种布鲁氏菌。本研究中患者均为农村地区的养羊户, 均与羊有直接接触史, 提示羊为贵州省人间布病的主要传染源。

布鲁氏菌MLVA-16技术是基于16个VNTR位点的分子分型方法, 该技术已被应用于布鲁氏菌分型并了解其遗传与分子流行病学特征^[4,5]。本研究中MLVA-16技术分析显示, 来自贵州省的6株布鲁氏菌分离株在部分VNTR位点(Bruce42、04、07、09、16、19和30)存在重复数目差异, 来自不同疫情患者的3株菌中, 遵义的ZY株和ZA株16个位点完全相同, 同属一个MLVA型(MT63), 而SQ株在VNTR位点Bruce04、09、19和30与ZY和ZA株具有重复数目差别, 被单独分为1个MLVA型(MT72), 而3株来自同一起动物疫情菌株LL3、LL4和LL11的16个位点重复数目完全相同, 同属一个MLVA型(MT67), 提示贵州省6株羊种生物3型布鲁氏菌基因组具有重复序列多态性。MLVA-16所揭示的菌株间部分位点存在重复数目差异可能为不同地域来源菌株之间存在的遗传变异所致, 其差异是否与布鲁氏菌的致病力有关尚需要进一步研究。

聚类分析结果显示, 本次分离菌株与我国羊种生物3型布鲁氏菌聚类最近, 提示6株布鲁氏菌为羊种生物3型, 这与全国布鲁氏菌病原体型别分布一致^[8]。其中2010年分离自山羊的菌株LL3、LL4和LL11, ZY与ZA分别聚类最近, 相似性均为100%。而菌株SQ与贵州省其余5株菌相对较远, 相似性在60%左右。此外, 聚类图显示贵州省分离菌株LL3、LL4、LL11、ZY和ZA与云南、广东和福建省的羊种生物3型布鲁氏菌聚类较近, 而菌株SQ与其他菌株聚类关系相对较远, 上述结果提示, 贵州省布鲁氏菌病原体间的相似性和多样性及与我国其他省羊种布鲁氏菌之间的遗传关系。经流行病学调查, 本研究中的患者均为养羊户, 所饲养的羊多数为贵州省因畜牧业发展需求而从外地引进羊或是来历不明的山羊, 提示贵州省动物间布鲁氏菌感染为输入性传播, 其云南、广东和福建可能为贵州省布病来源地, 抑或贵州省羊种布鲁氏菌流行株与云南、广东和福建流行株属同一来源菌株。

参 考 文 献

- [1] Shang DQ. Brucellosis raging again and the reasons[J]. 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[J]. 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 [J]. 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[J]. 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 [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(6):643-645. (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[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(6):643-645.
- [4] Jiang H, Cui BY, Zhao HY. Use of AMOS-PCR assay for the species identification of *Brucella* [J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(2):107-109. (in Chinese)
姜海, 崔步云, 赵鸿雁. AMOS-PCR对布鲁氏菌种型鉴定的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(2):107-109.
- [5] Jiang H, Fan MG, Chen JD, et al. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates [J]. BMC Microbiol, 2011, 11:256.
- [6] Deng YQ, Wang JX, Lin DH, et al. Molecular identification of the *Brucella* strains isolated in Fujian province [J]. 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[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(7):636-639.
- [7] Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, et al. *Brucella* as a biological weapon [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(19/20):2229-2236.
- [8] Cui BY. *Brucella* epidemic Situation and vaccine research in China [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(4):355-356. (in Chinese)
崔步云. 关注中国布鲁氏杆菌病疫情发展和疫苗研究[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(4):355-356.

(收稿日期:2014-06-04)

(本文编辑:万玉立)