

布鲁氏菌疫苗株与标准株的比较

王娜 肖培 田国忠 姜海 朴东日 赵鸿雁 孙岩 赵娜 呼和巴特尔 崔步云

【关键词】 布鲁氏菌; 标准株; 疫苗株

Comparison between the vaccine strains and the standard reference strains of *Brucella* Wang Na^{1, 2}, Xiao Pei², Tian Guozhong², Jiang Hai², Piao Dongri², Zhao Hongyan², Sun Yan^{1, 2}, Zhao Na², Huhebateer¹, Cui Buyun². 1 Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: Huhebateer, Email: hhbte@163.com; Cui Buyun, Email: cuibuyun@icdc.cn

This work was supported by grants from the Major State Basic Research Development Program of China (No. 2010CB530201), the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004215) and Qinghai Provincial Science and Technology Major Project (No. 2013-Z-749).

【Key words】 *Brucella*; Standard strains; Vaccine strains

布鲁氏菌鉴定需要标准株作为对照,标准株具有高致病性。本研究对牛、羊、猪种生物 I 型的标准株(544A、16M、1330S)与疫苗株(S19、M5、S2)进行比较,探索疫苗株作为对照菌株用于鉴定的可能性。

1. 材料与方法:

(1)菌株来源:布鲁氏菌牛、羊、猪种生物 I 型参考菌株 544A、16M、1330S 和疫苗株 S19、M5 和 S2,均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所保存。

(2)生化鉴定:于生物安全二级(BSL-2)实验室将冻存菌种在布鲁氏菌琼脂培养基上复苏,参照《布鲁氏菌防治手册》对 6 株菌进行硫化氢(H₂S)产生量、三胜黄凝集、阳性血清、染料抑菌、因子血清凝集和噬菌体裂解等试验。

(3)分子生物学检测:参照文献[1]的方法进行 PCR 鉴定;按照标准操作方法进行脉冲场凝胶电泳分析(PFGE),绘制聚类图;参照文献[2]设计引物进行多位点序列分型(MLST),了解菌株间的进化关系;参照文献[3]设计引物进行多位点可变数目串联序列分析(MLVA),计算基因组上多个具有多态性串联重复序列位点(VANT)的重复数,通过聚类来判断同源性。

2. 结果:

(1)生化鉴定:三胜黄凝集、阳性血清、生理盐水凝集、R 血清凝集、噬菌体裂解等实验中,疫苗株与标准株获得一致结果,见表 1。

(2)分子生物学:16S rDNA 同源序列分析实验显示,544A 与 S19、1330S 与 S2 核苷酸序列相似性达 100%,16M 与 M5 有 2 个差异基因(8 bp、9 bp);布鲁氏菌外膜蛋白(BCSP31)-PCR 分析 6 株菌均在 223 bp 左右出现清晰条带,条带单一,无差异;AMOS-PCR 中 544A 与 S19 扩增出 498 bp,16M 与 M5 扩增出 731 bp,1330S 与 S2 扩增出 285 bp 条带;多重 PCR 中 544A 与 S19 均扩增出 278 bp 和 299 bp 条带。1330S 和 S2 均扩增出 197 bp、425 bp 和 766 bp 3 个条带。16M 扩增 175 bp、278 bp、766 bp, M5 扩增出 218 bp、278 bp 和 766 bp 条带,两者存在差异;PFGE 中,1330S 与 S2 和 544A 与 S19 各聚为一类,相似性均为 100%,16M 与 M5 聚为一类,相似性达到 92.3%,见图 1;从 MLST 结果可知猪种布鲁氏菌强毒株 1330S 与疫苗株 S2 相同。544A 与 S19 可达到 80%以上, *trpE* 基因型不同。16M 与 M5 聚为一类,同源性达 60%~80%,有 *aroA*、*cobQ* 和 *omp25* 不同等位基因型;在 MLVA 聚类分析可知 544A 与 S19 聚为一类,且 bruce06、bruce18、bruce16 引物条带有差异,1330S 与 S2 聚为一类,差异等位基因重复数有 4

表 1 布鲁氏菌牛、羊、猪种生物 I 型参考菌株生化鉴定

名称	H ₂ S 产生	三胜黄凝集	阳性血清	生理盐水凝集	染料抑菌		因子血清凝集			噬菌体裂解			10 ⁴ 噬菌体裂解
					硫堇	复红	A 血清	M 血清	R 血清	Tb	Wb	Bk2	
16M	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	+	—
M5	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	+	—
544A	+	—	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+
S19	+	—	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+
1330S	++	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	+	+
S2	++	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	+	+

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.032

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2010CB530201); 国家科技重大专项(2012ZX10004215); 青海省科技重大专项(2013-Z-749)

作者单位:010018 呼和浩特,内蒙古农业大学(王娜、孙岩、呼和巴特尔); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(王娜、肖培、田国忠、姜海、朴东日、赵鸿雁、孙岩、赵娜、崔步云)

通信作者:呼和巴特尔,Email: hhbte@163.com; 崔步云,Email: cuibuyun@icdc.cn

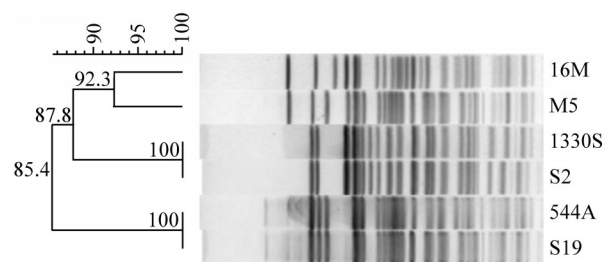


图1 PFGE图谱聚类分析

个,分别为 bruce04、bruce07、bruce09、bruce16;前两者同源性高于后两者,M5 与 16M 同源性较低。

3. 讨论:三胜黄凝集、阳性血清、生理盐水凝集、R 血清凝集、噬菌体裂解等实验中,疫苗株与标准株获得一致结果,可考虑使用疫苗株来替代标准株进行上述实验。多重 PCR 和 PFGE 中,544A 与 S19、1330S 与 S2 结果相同,利用这 2 种方法进行鉴定时可用 S19 代替 544A,S2 代替 1330S;MLST 结果表明,进行这个实验时只有 S2 可替代 1330S;MLVA 中 3 对菌株均存在差异。

M5 与 16M 在多重 PCR 和 PFGE 中均可直接看出条带不统一。MLVA 可以区分 M5 与 16M、S2 与 1330S 和 S19 与 544A,MLST 可区分 M5 与 16M 和 S19 与 544A^[4]。这些实验适用于鉴别疫苗菌株与标准菌株,并建议进一步开展与流行菌株的鉴别研究。

参 考 文 献

- [1] Tian GZ, Hou XX, Li ZJ, et al. Development and application of one-step polymerase chain reaction (PCR) for rapid identification of *Brucella* species and some biovars [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2013, 33(2): 133-137. (in Chinese)
田国忠,侯雪新,李振军,等.布鲁氏菌种及种内部分生物型快速 PCR 鉴定方法的建立及应用研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(2): 133-137.
- [2] Jiang H, Zhao HY, Cui BY, et al. Application of multiple locus variable number tandem repeats analysis in Brucellosis surveillance [C]. The third national Symposium on Zoonoses, 2011: 259-264. (in Chinese)
姜海,赵鸿雁,崔步云,等.多位点可变数目串联重复序列分析方法在布鲁氏菌病监测中的应用[C].第三届全国人畜共患病学术研讨会,2011:259-264.
- [3] Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay [J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1): 9.
- [4] Zhao ZX, Zhao HY, Cui BY, et al. Difference of the vaccine strain M5 and the virulent strain 16M of *Brucella* species [J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(10): 961-963. (in Chinese)
赵振祥,赵鸿雁,崔步云,等.布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 差异探索[J].中国人畜共患病学报,2009,25(10): 961-963.

(收稿日期:2013-12-18)

(本文编辑:万玉立)

滇西横断山区鼠类及蜚自然感染立克次体调查

亚红祥 张云智 王静林

【关键词】立克次体;巢式聚合酶链反应;序列分析

Investigation on rickettsiae infection among rodents and ticks in Hengduan Mountains, west of Yunnan province

Ya Hongxiang, Zhang Yunzhi, Wang Jinglin. Yunnan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China

Corresponding author: Ya Hongxiang, Email: yahongxiang@163.com

【Key words】Rickettsiae; Nested PCR; Sequence analysis

云南为我国立克次体病流行的主要省份之一,由于其地理环境较为复杂,生物多样性异常丰富,加之近年随着旅游业等人类活动的日益扩张,立克次体病例逐渐增多,尤其是滇西横断山区时有恙虫病和斑疹伤寒的流行^[1,2],为此对滇西横断山区开展立克次体调查,为人群有效防治提供参考依据。

1. 材料与方法:

(1) 标本采集:2011—2013 年在滇西横断山区盈江、云县、保山和祥云县居民区与山地采用鼠夹和鼠笼诱捕法捕鼠 11 种 272 只,现场无菌解剖取鼠肝和脾,以及牛舍捕获的蜚 2 种 42 只,置液氮保存。

(2) 检测方法:①DNA 提取:采用 75%乙醇消毒蜚再以生理盐水清洗,将同类蜚 2 只一组分成 21 组;利用生理盐水将蜚及鼠内脏分别在乳钵内研磨,取 60 μl 样本悬液,采用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega),按说明书操作。②巢式 PCR (nPCR) 检测:应用文献[3,4]中的引物(上海生工生物工程有限公司合成)及条件扩增立克次体 *groEL* 和斑点热群立克次体 (SFGR) *ompA*。PCR 反应总体积为 25 μl,应用 Promega 公司 GoTaqGreen Master Mix 试剂盒在 Biometra TProfessional PCR 仪中进行二次 PCR 扩增,以无菌水作为阴性对照,无阳性对照。第一次扩增取模板 6 μl,第二次扩增取第一次扩增产物 1 μl 为模板。取二次 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测。③DNA 序列测定及分析:PCR 阳性产物送上海生工生物工程有限公司测序。采用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对序列进行同源性比较和 SeqMan 软件

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.033

作者单位:671000 大理,云南省地方病防治所/云南省病毒立克次体研究中心/云南省自然疫源性疾病重点实验室

通信作者:亚红祥, Email: yahongxiang@163.com