

内蒙古自治区乌兰察布市羊种布鲁氏菌 HOOF 基因分型特征

刘志国 王妙 刘日宏 尚修建 崔步云

012000 内蒙古自治区乌兰察布市地方病防治中心检验科(刘志国、王妙、刘日宏);
830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心布鲁氏菌病防治科(尚修建);
102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布鲁氏菌病室 传染病
预防控制国家重点实验室布鲁氏菌病组(崔步云)

通信作者:崔步云, Email: cuibuyun@icdc.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.07.021

【摘要】 目的 调查 2012—2015 年内蒙古自治区乌兰察布市 83 株布鲁氏菌 HOOF 分型特征。方法 对临床分离的 83 株布鲁氏菌采用常规方法和 AMOS-PCR 进行鉴定;利用 8 个数目可变串联重复序列位点的 HOOF 分型方法对菌株进行基因分型,并用 Hunter-Gaston 分辨指数评估各 VNTR 位点的多态性和对菌株的综合辨别能力,采用 BioNumerics 5.0 软件聚类分析和构建聚类图。结果 83 株试验菌全部为羊种布鲁氏菌,全部 8 个分型位点具有极高的多态性,多态性指数为 0.998;其中 6 个位点(1、2、4~7)的多态性指数 ≥ 0.678 ,其分辨力主要来自多态性指数较高的位点。83 株羊种布鲁氏菌聚为 8 大类 76 个基因型。6 个共享基因型包括 13 株布鲁氏菌,提示感染患者具有流行病学相关性;另 70 株菌呈现独特的基因型,提示病原分离自无流行病学相关的散发患者。结论 乌兰察布市人布鲁氏菌病流行以散发和局部暴发共存,且散发为主,而交叉感染患者与传染源转移有关。

【关键词】 布鲁氏菌病;羊种布鲁氏菌;HOOF 基因分型

基金项目:内蒙古自治区卫生计生委医疗卫生科研计划(201301094)

HOOF genotyping characteristics of *Brucella melitensis* strains isolated in Ulanqab of Inner Mongolia Autonomous Region

Liu Zhiguo, Wang Miao, Liu Rihong, Shang Xiujian, Cui Buyun
Department of Laboratory, Ulanqab Center for Endemic Disease Prevention and Control, Ulanqab 012000, China (Liu ZG, Wang M, Liu RH); Department of Brucellosis, Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Diseases Control and Prevention, Urumqi 830001, China (Shang XJ); Department of Brucellosis, National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Prevention and Control, State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China (Cui BY)

Corresponding author: Cui Buyun, Email: cuibuyun@icdc.com

【Abstract】 Objective To investigate the HOOF genotyping characteristics of 83 *Brucella* (*B. melitensis*) strains isolated in Ulanqab of Inner Mongolia Autonomous Region from 2012 to 2015. **Methods** A total of 83 *B. melitensis* strains were detected by convention identification and AMOS-PCR, then HOOF protocol with eight VNTR locus were used for the genotyping of the strains, and the allelic diversity of each VNTR locus and the discriminatory power of VNTR typing of HOOF were assessed by Hunter-Gaston Discriminatory index. BioNumerics 5.0 was used for phylogenetic analysis and constructing dendrogram. **Results** All of the isolates were identified as *B. melitensis* strains by two identification methods. The complete eight VNTR locus had higher polymorphism and diversity index was 0.998; and diversity index of six locus (1, 2 and 4-7) were ≥ 0.678 , discriminatory power of HOOF was mainly from this six higher diversity index locus. The 83 *B. melitensis* strains were classified into eight clusters and 76 genotypes, 6 shared genotypes included 13 isolates, indicating that these brucellosis cases had epidemiological link, the other 70 strains had distinct genotypes, indicating that these cases had no epidemiological link. **Conclusions** The epidemic of human brucellosis in Ulanqab was characterized by local and sporadic outbreaks. Cross infection was related with the transfer of the sources of infection.

【Key words】 Brucellosis; *Brucella melitensis*; HOOF genotyping

Fund program: Medical and Hygiene Research Projects Pertaining to the Inner Mongolia Health and Family Planning Commission (201301094)

布鲁氏菌病(布病)是由布鲁氏菌属细菌引起的一种重要的人兽共患传染病^[1]。人因直接或间接接触染疫动物及其产品被感染^[2]。内蒙古自治区是布病历史疫区,人畜间布病时有发生^[3]。但该地区布鲁氏菌分子分型特征研究鲜见报道。HOOF-Prints分型方法不仅分辨高、重复性好且具有高通量、省时和成本低的特点,已用于布鲁氏菌分子流行病学调查。为此本研究应用该方法对临床分离的83株布鲁氏菌进行基因分型,以阐述菌株的分子分型特征。

材料与方 法

1. 菌株: 83株布鲁氏菌于2012—2015年分离自内蒙古自治区乌兰察布市10个旗(县、市、区)以及周边邻近地区。其中四子王旗1株,化德县3株,察哈尔右翼中旗3株,卓资县3株,兴和县4株,未知地点4株(乌兰察布),察哈尔右翼后旗5株,商都县6株,察哈尔右翼前旗(前旗)14株,丰镇县16株,凉城县20株以及锡林郭勒盟(锡盟)1株,河北省尚义县3株。按标准方法鉴定菌株的生物型。试验标准参考菌株羊种菌16M、牛种菌544、猪种菌1330(均由中国CDC传染病预防控制所布病室提供)为对照菌株。

2. 仪器与试剂: 仪器主要包括Class II A2型生物安全柜、CO₂培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、Gene Amp PCR仪(美国Applied Bio Systems Inc.)、DYY-6C-电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、Gel Doc XR自动凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。试剂包括布氏琼脂和肉汤培养基[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];布鲁氏菌阳性血清,A、M因子血清,Tb、Wb、BK₂噬菌体(均由中国CDC传染病预防控制所布病室提供);2×EasyTaq PCR Super mix、DNA Marker 2000 (TranS 2K)、6×Loading Buffer均由北京全氏金生物技术有限公司提供;细菌核酸提取试剂盒购自德国Qiagen公司。HOOF-PCR引物名称、序列见表1;羊种,牛种1、2、4型,猪种1型和绵羊附睾种布鲁氏菌鉴别方法(AMOS-PCR)引物参照文献[4]。引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

3. 试验方法:

(1)菌株基因组DNA提取:将传代培养布鲁氏菌

表1 HOOF分型引物及序列

位点	序列(5'~3')	引物
Locus-1 Fwd	GGT GAT TGC CGC GTG GTT CCG TTG AAT GAG	REV-3
Locus-2 Fwd	CCC GCA TGA TCC GCG AAC AGC TGG ATG	REV-1
Locus-3 Fwd	CAG GCG CTT GAG GAT GAG GCG GCA G	REV-3
Locus-4 Fwd	GCA GAA TTT TCG AGG CAT TCG GCG ATG	REV-3
Locus-5 Fwd	GTG CTC CAG GGC GCC GGG AGG TAT GTT TAG	REV-3
Locus-6 Fwd	GCC GCA GGA AAG CAG GCG ATC TGG AGA TTA TC	REV-3
Locus-7 Fwd	CAG AGC CGT CGG TGG TTA CTT GAG TAG GGC AG	REV-1
Locus-8 Fwd	GTG GGA AGC GTT ATC CTT TAA CGG GAG TAA GGG	REV-1
REV-1	GGG GAG TAT GTT TTG GTT GCG CAT GAC CGC	-
REV-3	GGG GGC ART ARG GCA GTA TGT TAA GGG AAT AGG G	-

灭活,并严格按照QIAamp DNA Mini Kit (250次)(细菌核酸提取试剂盒)操作步骤进行,提取完毕后用紫外分光光度计测定DNA浓度及纯度,-20℃保存备用。

(2) AMOS-PCR扩增:扩增条件、参数以及电泳结果检测同文献[5]。

(3) HOOF-PCR扩增及数据分析:扩增采用20 μl体系,包括2×EasyTaq PCR Super mix 18.2 μl、上下游引物各0.4 μl(10 μmol/L)、DNA 1.0 μl。扩增参数为预变性95℃ 3 min, 95℃ 30 s; 56℃ 30 s; 72℃ 50 s; 终末延伸72℃ 3 min。PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶检测。获得预期条带的扩增结果送北京擎科新业生物技术有限公司进行微卫星扫描(STR),并与GenBank公布的布鲁氏菌HOOF分型标准等位基因比对,将扩增片段转换为串联重复数(U)。

4. 数据处理:用Hunter-Gaston分辨指数(HGDI)评估各VNTR位点的多态性和数目可变串联重复序列(VNTR)基因分型方法对菌株的综合辨别能力(<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>)。用BioNumerics v5.0软件采用UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)进行聚类分析,获得布鲁氏菌的聚类图。

结 果

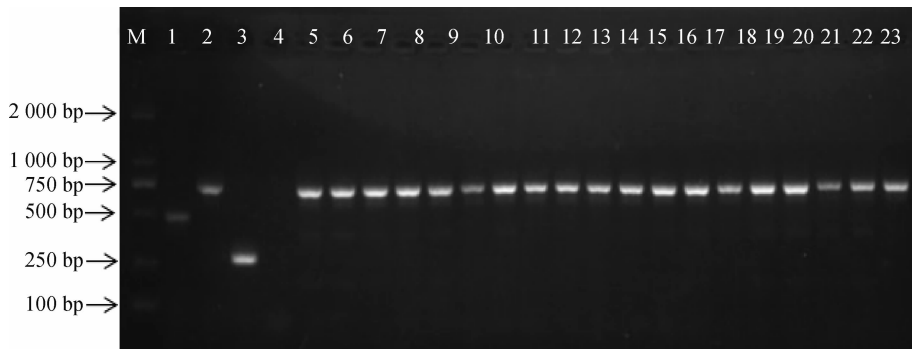
1. 菌株鉴定:83株布鲁氏菌(待测菌株)CO₂需要和H₂S产生试验结果均阴性;血清凝集试验均阳性,其中67株A、M因子血清凝集均阳性,其余16株仅M因子血清凝集阳性;染料抑菌试验均为阳性;试验菌株均可被噬菌体BK₂裂解(表2)。

2. AMOS-PCR扩增:阳性对照牛、羊、猪标准参考菌株均获得了预期结果,扩增条带分别为牛种498 bp、羊种731 bp和猪种285 bp;阴性对照未见扩增。待测菌株的产物均为731 bp(图1)。

表2 83株布鲁氏菌常规鉴定结果

菌株	菌株数	CO ₂ 需要	H ₂ S产生	血清学凝集试验			染料抑菌试验		噬菌体裂解试验			鉴定结果
				阳性血清	A因子血清	M因子血清	硫堇	复红	BK ₂	10 ⁴ Tb	WB	
16M	1	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	羊1
544	1	±	-	+	+	-	-	+	+	+	-	牛1
1330	1	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	猪1
待测菌株	16	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	羊1
	67	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	羊3

注: 16M、544、1330为试验标准参考菌株



注: M: Marker; 1~3分别为牛、羊、猪标准参考菌株对照; 4为阴性对照; 5~23为羊种布鲁氏菌

图1 布鲁氏菌的AMOS-PCR扩增结果

3. 分型位点的多态性: 8个位点的多态性指数为0.998(95%CI: 0.995~1.000), 其分辨力由高到低依次为 Locus-1(0.882)、Locus-4(0.869)、Locus-5(0.868)、Locus-6(0.850)、Locus-7(0.841)、Locus-2(0.678)、Locus-8(0.024)、Locus-3(0.000), 其中6个位点(Locus-1、2、4~7)的多态性指数均≥0.678, Locus-8的多态性指数为0.024, 仅Locus-3的多态性指数为0.000(无多态性); 6个高分辨力位点的等位基因型依次分别为13、13、15、8、11和6(表3)。

表3 83株羊种布鲁氏菌的等位基因型和多态性指数

位点	多态性指数(95%CI)	串联重复个数	次数
全部位点	0.998(0.995~1.000)	76	0.036
Locus-1	0.882(0.858~0.905)	13	0.205
Locus-4	0.869(0.837~0.901)	13	0.229
Locus-5	0.868(0.817~0.918)	15	0.313
Locus-6	0.850(0.821~0.878)	8	0.253
Locus-7	0.841(0.792~0.890)	11	0.325
Locus-2	0.678(0.622~0.734)	6	0.458
Locus-8	0.024(0.000~0.070)	2	0.988
Locus-3	0.000(0.000~0.083)	1	1.000

注: 多态性指数(基于数目可变串联重复序列数据)表示每个位点的重复串联数目的变化, 范围从0.0(无多态性)~1.0(极具多态性), 95%CI表示多态性指数的精确度; 串联重复个数表示在此样本集中存在于该位点的不同串联重复数; 次数表示在该位点中最多串联重复数出现的次数(0.0~1.0)

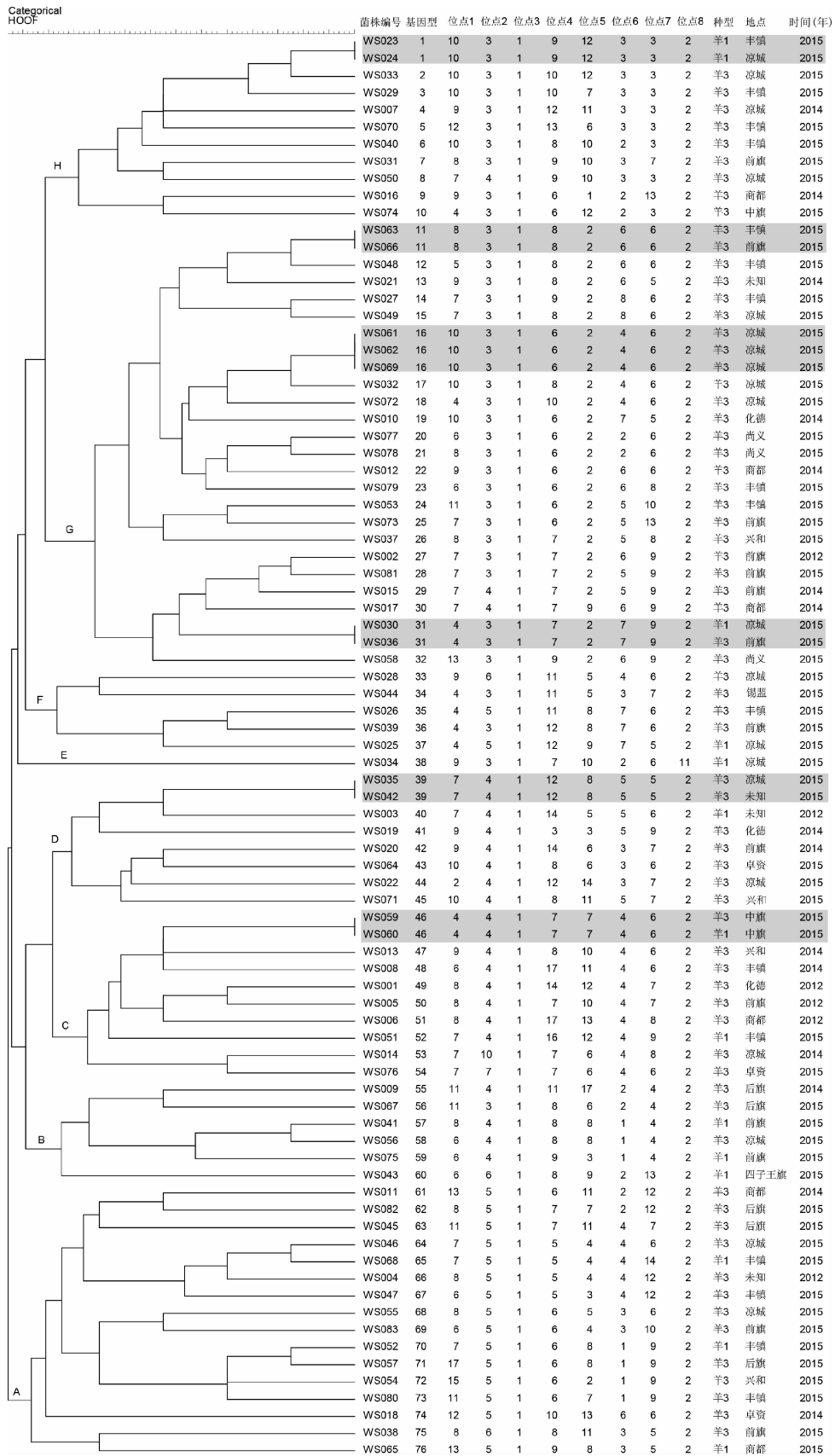
4. 聚类分析: 83株布鲁氏菌聚为8类(依次命名为A~H)76个基因型; 其中6个为共享基因型, 70个

为独特基因型。在6个共享基因型中, 有2个基因型(16和46)分别包含3和2株分离时间地点相同的菌株; 其余4个基因型分别包括2株来自不同地区的菌株(图2)。

讨论

本研究分离的83株布鲁氏菌中16株为羊种1型菌, 67株为羊种3型菌。常规鉴定和AMOS-PCR鉴定结果相同, 均为羊种布鲁氏菌, 其种型与我国西北地区其他省份的种型一致^[6-8]。90%以上患者与羊有直接或间接的接触史, 证实了疫羊是该地区人间布病的主要传染源。与疫羊直接或间接接触也被其他研究证实是人感染布病最重要的方式^[9-10]。因此, 强化疫羊的管控是控制人间布病最有效的措施。

布鲁氏菌的核心基因组序列有极高的同源性(核苷酸相似性>99%), 但本实验所用8个位点的多态性指数为0.998, 表明该方法对试验菌株有极高的分辨力, 是一种适用的布鲁氏菌分型技术。在8个多态性位点中有6个多态性位点呈现出极好的分辨力, 而Locus-3的多态性指数为0.000, 无分辨能力。对该地区菌株的分辨力主要来自6个多态性指数较高的位点。多态性指数的相似性或差异性可用于评估临床分离株的遗传相关性。分离自乌兰察布市周边的锡盟及河北省尚义县菌株, 虽未见与乌兰



注:标注阴影为共享基因型

图2 83株羊种布鲁氏菌HOOF分型聚类结果

察布市分离株形成共享基因型,但仅在 1~3 个高变位点存在差异,提示这些菌株来自同一克隆群,具有较近的亲缘关系。HOOF 分型虽是一种分辨力较高的基因分型方法,但数据分析和结果解读均有难度,在一定程度上限制了其在基层的推广应用。

本文 83 株羊种布鲁氏菌聚为 8 类 76 个基因型,包括 6 个共享基因型和 70 个独特基因型。70 株布鲁氏菌呈现独特的基因型提示该地区布病具有零星和流行病学无关联的特点;6 个共享基因型包括 13 株菌表明菌株存在流行病学关联。从分子病原学角度证实该地区布病具有零星散发和暴发共存的发病特点,但以零星散发为主,偶有暴发。本研究结果与该地区疫情特点基本一致^[5]。先前的研究证实流行病学相关的菌株具有相同或相似的基因型^[11-12]。在 6 个共享基因型中,有 4 个基因型(1、11、31 和 39)每个包括 2 株分离时间相同而地点相邻的菌株;结合患者信息,凉城县与前旗、丰镇县接壤相邻地区多有患病家畜流动的交叉感染病例,这与流行病学调查结果相吻合。提示交叉感染病例是由该地区缺乏流通检疫和管控受染疫动物感染所致。另 2 个共享基因型(16、46)包括 5 株布鲁氏菌,分别来自相同的时间地点,证实了引起多点暴发。乌兰察布市及周边地区人畜间布病较为严重,患病家畜无序转运和跨区域流动极为频繁。本研究结果证实了当前该区域布病的流行特点,为人畜间布病防控提供了有意义的流行病学线索。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] van Straten M, Bardenstein S, Keningswald G, et al. *Brucella abortus* S19 vaccine protects dairy cattle against natural infection with *Brucella melitensis* [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (48) : 5837-5839. DOI:10.1016/j.vaccine.2016.10.011.
- [2] Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, et al. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16 [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 34: 173-180. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.07.008.
- [3] Chen YF, Ke YH, Wang YF, et al. Changes of predominant

species/biovars and sequence types of *Brucella* isolates, Inner Mongolia, China [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 514. DOI: 10.1186/1471-2334-13-514.

- [4] Shome R, Krithiga N, Shankaranarayana PB, et al. Genotyping of Indian antigenic, vaccine, and field *Brucella* spp. using multilocus sequence typing [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10(3) : 237-244. DOI:10.3855/jidc.6617.
- [5] 刘治国,王妙,刘日宏,等. 内蒙古乌兰察布布氏菌分离株种型鉴定及流行病学特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32 (7) : 618-622, 631. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.07.006. Liu ZG, Wang M, Liu RH, et al. Species identification and epidemiological characteristics analysis of *Brucella* in Ulanqab, Inner Mongolia, China [J]. *Chin J Zoonoses*, 2016, 32 (7) : 618-622, 631. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.07.006.
- [6] Xiao P, Yang HX, Di DD, et al. Genotyping of human *Brucella melitensis* biovar 3 isolated from Shanxi province in China by MLVA16 and HOOF [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (1) : e0115932. DOI: 10.1371/journal.pone.0115932.
- [7] Sun MJ, Di DD, Li Y, et al. Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains currently circulating in Xinjiang, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 44: 522-529. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.025.
- [8] 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. DOI: 10.1186/1471-2180-11-256.
- [9] Tan ZM, Huang Y, Liu GY, et al. A familial cluster of human brucellosis attributable to contact with imported infected goats in Shuyang, Jiangsu province, China, 2013 [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 93(4) : 757-760. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0149.
- [10] Roushan MRH, Ebrahimpour S. Human brucellosis: an overview [J]. *Caspian J Intern Med*, 2015, 6 (1) : 46-47. DOI: 10.1016/S1201-9712(03)90049-X.
- [11] Kılıç S, Ivanov IN, Durmaz R, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9) : 3276-3283. DOI: 10.1128/JCM.02538-10.
- [12] Allen A, Breadon E, Byrne A, et al. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* in Northern Ireland-1991 to 2012 [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9) : e0136721. DOI: 10.1371/journal.pone.0136721.

(收稿日期: 2016-11-29)

(本文编辑: 张林东)