

MLVA 基因分型方法研究世界多地区布鲁氏菌的流行病学特征

田国忠 路殿英 朴东日 赵鸿雁 杨晓雯 姜海

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

通信作者: 姜海, Email: jianghai@icdc.cn

【摘要】 目的 通过多位点串联重复序列分析 (MLVA) 研究世界多国家和地区分离的布鲁氏菌分子流行病学特征。方法 选择 11 个可变数目串联重复序列位点, 使用 BioNumerics 软件, 采用非加权配对算术平均法, 对 1953—2013 年全球 48 个国家和地区分离的布鲁氏菌 VNTR 资料进行聚类分析, 绘制系统发育树和最小生成树, 分析菌株的流行分布特征。结果 布鲁氏菌系统发育树的进化关系与经典的生物分型方法基本上吻合, 但猪种生物 5 型菌株与其他猪种生物 1、2、3 和 4 型菌株关系较远; 鲸种布鲁氏菌也分为 2 个部分, 并且关系较远。2005—2008 年出现了全球布鲁氏菌病 (布病) 流行, 中国是布病多发区, 主要流行株为羊种布鲁氏菌, 其次是牛种布鲁氏菌, 猪种布鲁氏菌主要出现在中国南部省份, 犬种布鲁氏菌只在犬中出现, 人类没有发现病例。结论 布鲁氏菌具有种的系统发育树特征, 并且具有分离的时间、地域和宿主的特异性, 这些特征对于布病的防控具有重要意义。

【关键词】 布鲁氏菌; 可变数目串联重复序列

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1200403)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.06.014

Epidemiological characteristics of *Brucella* species isolated from different regions of the world using the MLVA genotyping

Tian Guozhong, Lu Dianying, Piao Dongri, Zhao Hongyan, Yang Xiaowen, Jiang Hai

National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China

Corresponding author: Jiang Hai, Email: jianghai@icdc.cn

【Abstract】 Objective To study the molecular-epidemiological characteristics of *Brucella* species isolated from different countries, using the multiple locus tandem-repeat (MLVA) analysis. **Methods** Eleven variable-number tandem-repeat (VNTR) loci were selected. VNTR strains of *Brucella* isolated from 48 different countries in 1953–2013, were analyzed by using the BioNumerics software. Unweighted Paired Arithmetic Average method was used to cluster and draw phylogenetic tree as well as the minimum spanning. **Results** The evolutionary relationship of *Brucella* phylogenetic tree was consistent with the classical biological typing method. However, the *Brucella suis* biovar 5 strains were different from the other *Brucella suis* biovars 1, 2, 3 and 4. *Brucella ceti* strains were divided into two parts and different from each other. Worldwide epidemics of brucellosis were emerged from 2005 to 2008 under the MLVA11 Orsay analysis. China has been a brucellosis-prone regions, with *Brucella melitensis* as the main epidemic *Brucella* species, followed by *Brucella abortus*. *Brucella suis* was mainly identified in the southern provinces, but *Brucella canis* was mainly found in dogs. No human cases were found. **Conclusion** Molecular-epidemiological characteristics of the *Brucella* strains were related to factors as time, region and hosts of isolation, which are important to setting up prevention and control programs on brucellosis.

【Key words】 *Brucella*; Variable-number tandem-repeat loci

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200403)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.06.014

布鲁氏菌病 (布病) 是世界上导致家畜流产和人体致残性感染的最广泛的人畜共患病之一。由于发

病率增加, 目前被看作一种再发性传染病^[1-10]。布病近年来在中国出现流行趋势^[11], 2013 年报告了 43 486 例

确诊病例,年发病率为3.3/10万,目前中国23个省份有布病病例报告^[7,11-14]。布鲁氏菌种型和生物型的分类主要根据其宿主特异性、生化特征进行鉴定^[15]。现已鉴定出10个布鲁氏菌菌种和23种生物型,包括牛种布鲁氏菌 *Brucella abortus* (生物1~7、9型,牛)、羊种布鲁氏菌 *Brucella melitensis* (生物1~3型,羊)、绵羊附睾种布鲁氏菌 *Brucella ovis* (绵羊)、犬种布鲁氏菌 *Brucella canis* (犬)、猪种布鲁氏菌 *Brucella suis* (生物1~5型,猪)、沙林鼠种布鲁氏菌 *Brucella neotomae* (沙林鼠)、田鼠种布鲁氏菌 *Brucella microti* (田鼠)、鲸种布鲁氏菌 *Brucella ceti* (鲸目动物类)、鳍种布鲁氏菌 *Brucella pinnipedialis* (海豹) 和 *Brucella inopinata* (人类)^[15-18]。为了了解全球多地布病流行病学规律,本研究通过已公布的布鲁氏菌菌株可变数目串联重复序列(variable-number tandem-repeat, VNTR)资料进行基因分型,分析世界多地来源布鲁氏菌菌株的遗传变异规律和分子流行病学特征。

资料与方法

1. 菌株及资料来源:收集1953—2013年的2 747株布鲁氏菌,菌株的VNTR数据来自 <http://mlva.upsud.fr/> 数据库,包括菌株的分离国家和地区、分离的来源(宿主)、分离时间、基于生物学特征分类的布鲁氏菌菌株的种型和生物型等资料。

2. 多位点串联重复序列分析(MLVA):根据文献^[19-20],选择11个串联重复基因位点,包括 bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce18、bruce19、bruce21、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55,使用 BioNumerics version 6.6 (Applied Maths, Belgium) 软件,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)对所有数据进行聚类分析,绘制系统发育树和最小生成树,了解菌株的分子流行病学分布特征。

结 果

1. 基本资料分析:

(1)地区分布:共收集全球48个国家和地区分离的2 747株布鲁氏菌,见图1,其中主要的国家包括秘鲁、英国、巴西、西班牙、土耳其、意大利、葡萄牙和中国,分离的菌株占总数的73.57%(2 021/2 747),另有352株分离地区不详,见表1。

(2)时间分布:根据菌株分离时间和菌株数之间的关系,可归纳为7次高峰期,分别为:1957—1958、1962—1964、1973、1979、1987—1988、1995—1996、2002—2008年,见表2。

(3)来源分布:菌株的分离来源于人类和27种动物,其中人类和野猪、犬、家猪、绵羊、牛等来源菌株占75.39%(2 071/2 747),其余435株来源不详。见表3。

(4)布鲁氏菌种和生物型分布:2 747株布鲁氏菌包括812株(29.56%)牛种布鲁氏菌(生物1~6和9型),主要是生物1和3型;1 234株(44.92%)羊种布鲁氏菌(生物1~3型),主要是1和3型;378株(13.76%)猪种布鲁氏菌(生物1~5型),主要是1、2和3型;135株(4.9%)犬种布鲁氏菌(1个生物型);94株(3.42%)鲸种布鲁氏菌(1个生物型);46株(1.67%)鳍种布鲁氏菌(1个生物型);34株(1.24%)绵羊附睾种布鲁氏菌(1个生物型);12株(0.44%)田鼠种布鲁氏菌(1个生物型);1株(0.04%)沙林鼠种布鲁氏菌(1个生物型);1株(0.04%)*B. inopinata*(1个生物型)。

2. MLVA:11个串联重复基因位点包括 bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce18、bruce19、bruce21、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55,使用 BioNumerics version 6.6 (Applied Maths, Belgium) 软件,基于分类系数法和UPGMA对所有数据进行聚类分析,2 747株布鲁氏菌可分为365个MLVA11 Orsay 基因型。812株牛种布鲁氏菌分为83个基因型,1 234株羊种布鲁氏菌分为159个基因型,378株猪种布鲁氏菌分为81种基因型,135株犬种布鲁氏菌分为10个基因型,94个鲸种布鲁氏菌分为6个基因型,34株绵羊附睾布鲁氏菌分为6个基因型,46株鳍种布鲁氏菌分为11个基因型,12株田鼠种布鲁氏菌分为7个基因型,1株沙林鼠种布鲁氏菌和1株 *B. inopinata* 株分别代表1个基因型。

3. 布鲁氏菌系统发育树:为了简化布鲁氏菌系统发育树的描述,将布鲁氏菌种和生物型、MLVA11 Orsay 基因型以及同一基因型内菌株数重组为1个新的变量,建立了包括基因型在同一种内连续编号,如:“A1(A19, 11)”:A1代表牛种布鲁氏菌生物1型,A19代表在牛种布鲁氏菌中基因型为19,11代表该基因型的菌株为11株,其他如M为羊种,M2or3为羊种生物2或3型,S为猪种,O为绵羊附睾种,Ca为犬种,Ce为鲸种,Mi为田鼠种,P为鳍种,In为 *Brucella inopinata*, Ne为沙林鼠种。2 747株布鲁氏菌系统发育树,见图1。10个布鲁氏菌种和23个生物型具有独立的支系。

4. 分子流行病学分布规律:为了简化布鲁氏菌分子流行病学分布的描述,在流行病学分布(*Brucella* Epidemiological Distribution)图中,对变量

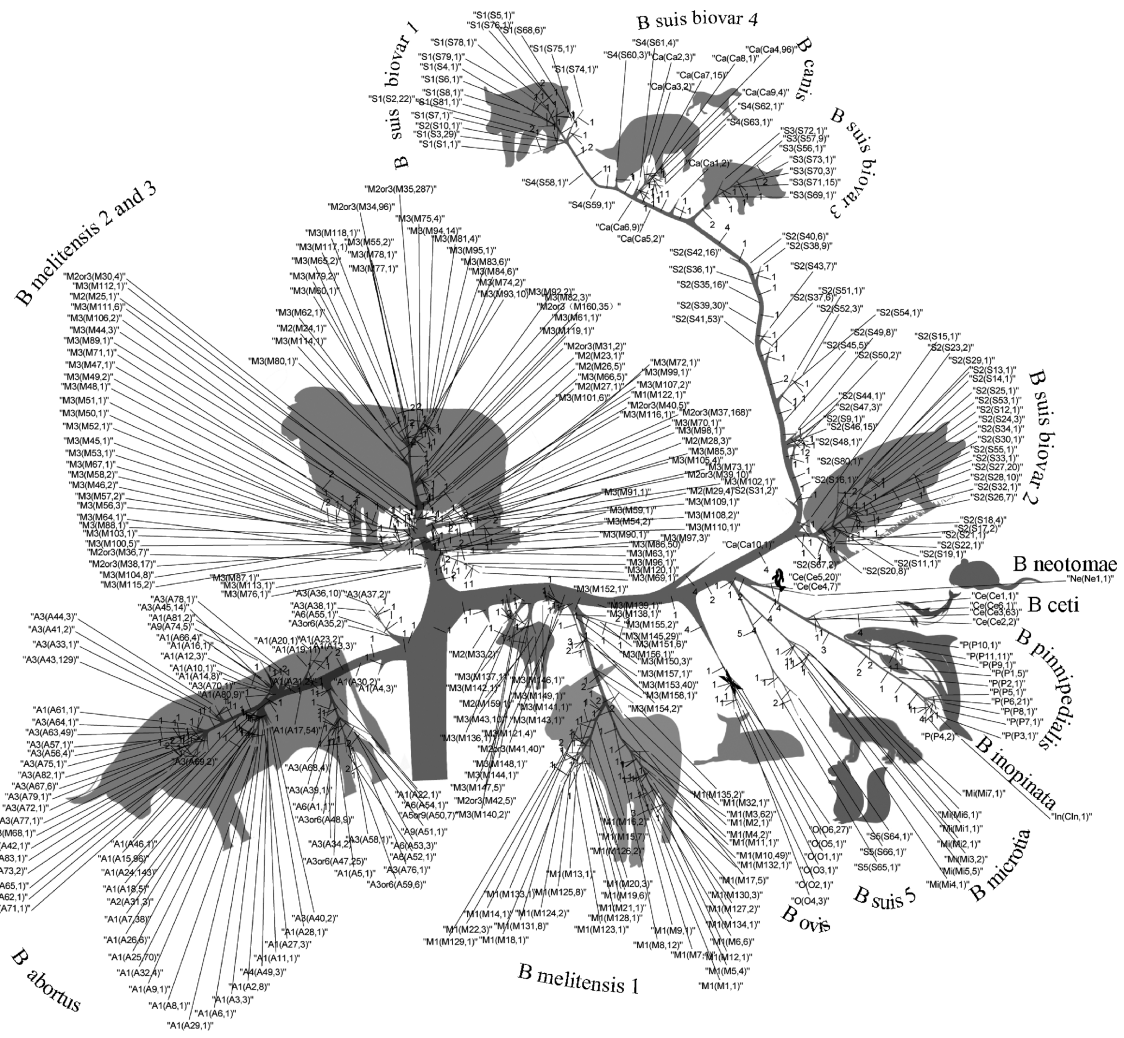


图1 布鲁氏菌系统发育树示意图

表1 2 747株布鲁氏菌地区分布

地区	菌株数	地区	菌株数	地区	菌株数
中国	601	挪威	11	南非	2
葡萄牙	383	阿根廷	9	乌干达	2
意大利	245	波兰	7	印度	2
土耳其	212	突尼斯	7	乍得	2
西班牙	179	前苏联	6	巴基斯坦	1
巴西	151	希腊	6	波尔图	1
英国	137	丹麦	5	波斯尼亚	1
秘鲁	114	加拿大	5	哈萨克斯坦	1
法国	79	以色列	5	波利尼西亚	1
德国	73	阿尔及利亚	4	马耳他	1
韩国	28	叙利亚	4	蒙古国	1
美国	25	捷克	3	纳瓦拉	1
比利时	21	阿联酋	2	苏丹	1
埃及	17	哥斯达黎加	2	索马里	1
克罗地亚	16	津巴布韦	2	伊拉克	1
肯尼亚	15	罗马尼亚	2	不详	352

表2 2 747株布鲁氏菌时间分布

年份	菌株数	年份	菌株数	年份	菌株数
1953	1	1979	24	1998	42
1955	2	1980	19	1999	48
1956	2	1981	6	2000	74
1957	9	1982	6	2001	57
1958	4	1983	2	2002	121
1959	1	1984	8	2003	146
1960	5	1985	17	2004	183
1961	3	1986	12	2005	196
1962	8	1987	22	2006	168
1963	8	1988	20	2007	239
1964	8	1989	12	2008	159
1965	6	1990	13	2009	55
1971	1	1991	11	2010	66
1972	8	1992	18	2011	261
1973	22	1993	14	2012	25
1974	4	1994	22	2013	80
1975	1	1995	38	不详	402
1977	4	1996	41		
1978	6	1997	17		

表3 2 747株布鲁氏菌的分离宿主、种型及菌株数量关系

宿主	菌株生物型	菌株数
鹿	牛种1型	1
家鼠	牛种1型	1
假水蚤	羊种3型	1
沙漠鼠	沙林鼠种	1
麝牛	猪种4型	1
水獭	鳍种	1
红狐	猪种5型	2
马	猪种1型	2
田鼠	田鼠种	2
麋鹿	牛种1型	3
土壤	田鼠种	3
骆驼	牛种3型	4
牦牛	牛种和羊种	4
驯鹿	猪种3和4型	8
蟾蜍	牛种1和3型	15
鲸鱼	鲸种	28
野兔	猪种1和2型	30
山羊	牛种1型、猪种1和2型	39
海豚	鲸种和鳍种	42
海豹	鲸种和鳍种	53
野猪	猪种1和2型	133
犬	犬种、羊种1型和牛种3型	134
家猪	猪种和羊种3型	137
绵羊	羊种、牛种、猪种和绵羊附睾种	200
牛	牛种、羊种和猪种	593
人类	牛种、猪种、鲸种、犬种和 <i>B.inopinata</i>	874
不详		435

进行了重组简化,如“China [A3] (18), 1990—1995”:China为地名,[A3]为牛种生物3型,(18)为菌株数,1990—1995为分离时间。其他如A为牛种,M为羊种,M2or3为羊种生物2或3型,S为猪种,Ovis为绵羊附睾种,Canis为犬种,Ceti为鲸种,Micro为田鼠种,Pin为鳍种,Ino为*B. inopinata*,Neo为沙林鼠种。2 747株布鲁氏菌可归纳为2个大分支和8个群。第一分支包括5大群:群1:绵羊附睾种布鲁氏菌,群2:猪种布鲁氏菌(生物1、2、3和4型)和犬种布鲁氏菌,群3:鲸种布鲁氏菌,群4:鲸种、沙林鼠种、鳍种、田鼠种和*B. inopinata*种布鲁氏菌,群5:猪种布鲁氏菌生物5型;第二分支包括3大群:群6:牛种布鲁氏菌,群7:羊种布鲁氏菌(生物2和3型),群8:羊种布鲁氏菌(生物1型)。

(1)绵羊附睾种布鲁氏菌:群1内包括34株绵羊附睾种布鲁氏菌,分离自1974—1978年的巴西、法国和阿根廷,菌株之间的遗传关系较近。

(2)猪种布鲁氏菌:群2和群5包括了378株猪种布鲁氏菌,其中群2可分为4个亚群:亚群2.1是猪种生物2型179株,分离自2000—2005年的葡萄牙和西班牙,以及2000—2003年的克罗地亚、德国和

法国;亚群2.2是猪种生物1型29株菌株,分离自1987—1988年的法国、比利时、德国和丹麦;亚群2.3是猪种生物1型菌株,分离自1973—1979年的中国(28株),以及1980—1987和1992—1998年的波兰、美国和克罗地亚31株菌株;亚群2.4内173株菌株,包括加拿大和美国的猪种生物4型9株菌株,和1964—1973年的中国和印度的猪种生物3型29株菌株;亚群2.4内还包括来自中国和韩国的135株犬种布鲁氏菌。群5是生物5型3株菌株,分离自前苏联。

(3)犬种布鲁氏菌:群4包括135株犬种布鲁氏菌,分离自1986—1987、2003—2007和2011年的中国和韩国。

(4)鲸种、鳍种、田鼠种、沙林鼠种和*B.inopinata*种布鲁氏菌:鲸种、鳍种、田鼠种、沙林鼠种和*B. inopinata*种布鲁氏菌具有同源性。94株鲸种布鲁氏菌分布在群3和群4内,群3内27株分离自1999—2002和2005—2007年的苏格兰;群4内67株分离自2002—2005年的苏格兰。12株田鼠种布鲁氏菌分离自奥地利和乍得共和国,46株鳍种布鲁氏菌分离自1993—1994和2002年的德国和苏格兰。沙林鼠种和*B. inopinata*各1株菌株,为群4内的一组。

(5)牛种布鲁氏菌:所有的牛种布鲁氏菌均在群6内,群6又可细分为4个亚群。亚群6.1主要是牛种生物3、6和9型58株菌株,来自巴西的50株菌株与比利时、英国和中国的8株有差别;亚群6.2是牛种生物1型583株,是牛种主要流行株,占有牛种菌株的71.80%,其中,中国和巴西有79株菌具有同源性,韩国、英国、意大利和葡萄牙有322株菌株具有同源性,巴西和葡萄牙除了有本地特征菌株外,还有和其他欧洲地区的国家具有同源性的菌株,2006—2008年分离自巴西的13株牛种生物1型菌株具有同源性;亚群6.3包括牛种生物3型211株,中国76株生物3型菌株与其他国家有差异,其中1980—1985、1990—1995和1953—1973、1979—1985年的菌株有差异;意大利、葡萄牙、法国和德国分离的135株菌株具有同源性;亚群6.4分离自肯尼亚和乌干达的牛种生物3或6型16株菌,独成一亚群。

(6)羊种布鲁氏菌:羊种布鲁氏菌所有菌株分布在群7和群8内。羊种生物1型菌株与羊种生物2和3型菌株有明显差别。群7可以细分为5个亚群。亚群7.1和亚群7.2内27株羊种生物3型菌株分离2013年的中国;亚群7.2和亚群7.3内68株菌株,包括2013年中国菌株的6株和2003—2008年分离自西班牙的62株菌株,具有同源性;亚群7.4内共有

768 株菌株, 占有菌株的 62.24%, 包括了本研究菌株来源的所有国家和地区, 是羊种布鲁氏菌的流行株; 亚群 7.5 内 168 株菌株, 主要来自法国、德国、意大利和瑞士等, 2005—2011 年来自意大利和瑞士的 56 株菌株具有同源性, 2005—2011 年来自意大利、法国、瑞士、突尼斯和德国的 106 株菌株具有同源性。群 8 又可细分为 2 个亚群, 包括了羊种生物 1 型所有菌株, 亚群 8.1 内 140 株来自 2000—2009 年的秘鲁; 亚群 8.2 内的 59 株分别来自葡萄牙 (22 株) 和西班牙 (37 株) 具有同源性, 但是国家间有差异。

5. 中国分离的布鲁氏菌: 中国布鲁氏菌流行株主要是羊种, 其次为牛种, 主要来自于北部畜牧业为主的地区。猪种布鲁氏菌主要是猪种 1 和 3 型, 分布于中国南部地区, 而欧洲地区主要是猪种 2 型。犬主要分离自犬类, 无人类感染, 我国的犬种布鲁氏菌与邻国韩国具有相同的基因型。

讨 论

以噬菌体裂解试验、生长时 CO₂ 的需求、硫堇和复红抑菌试验为基础的布鲁氏菌种型和生物型的分类是布鲁氏菌分型的经典方法, 但是该方法不能显示菌株的布鲁氏菌遗传变异和流行病学分布规律^[21-22]。基因分型常用于分子流行病学调查, 并可用于观察种群之间的关系。VNTR 分析对近缘菌株的种类鉴定和疫情暴发同源性追踪方面具有较高的鉴别能力^[4-8, 19-20]。目前用于布鲁氏菌基因分型的主要有 16 个位点, 包括 bruce04、bruce07、bruce09、bruce16、bruce30、bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce18、bruce19、bruce21、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55。其中 bruce04、bruce07、bruce09、bruce16 和 bruce30 等位点, 由于其变异系数大, 适合疫情暴发的菌株溯源, 而 bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce18、bruce19、bruce21、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55 等位点 (MLVA11 Orsay) 的变异系数小, 适合研究布鲁氏菌的进化关系和流行病学特征^[5, 21, 23]。MLVA11 Orsay 基因分型与 MLVA71 Orsay 基因分型^[19]、布鲁氏菌特异性 IS711 分子分析^[25], 以及基于全基因组的系统发育研究具有相似性^[24]。因此, 本研究采用 MLVA11 Orsay 方法, 通过布鲁氏菌菌株大数据资料, 分析布鲁氏菌的进化特征和全球多地区的布鲁氏菌分子流行病学特征研究。

聚类分析表明, 以 11 个位点 bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce18、bruce19、bruce21、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55 的 MLVA11 Orsay 聚类

分析, 与布鲁氏菌菌株分离的时间、地域和宿主具有较好的一致性。2002—2008 年分离了 1 212 株菌株, 占有菌株的 44.12% (1 212/2 747), 而 1953—1999 年 47 年间只分离到 18.75% (515/2 747) 菌株, 提示 2002—2008 年是布病流行期。所有菌株中以牛种和羊种布鲁氏菌为主, 牛种中以生物 1 和 3 型为主, 羊种中以生物 2 和 3 型为主, 动物中以犬种、鲸种、鳍种和田鼠种布鲁氏菌为主。分离来源主要是人、牛、绵羊、山羊、犬、野猪、海豹、海豚、野兔和鲸鱼等。菌株分离地区主要有中国、葡萄牙、意大利、土耳其、西班牙、巴西、英国和秘鲁等。中国羊种布鲁氏菌与土耳其、黎巴嫩、以色列和德国同源性较近, 牛种生物 1 型与巴西和葡萄牙同源性较近, 牛种生物 3 型具有中国地理特异性, 中国猪种布鲁氏菌以生物 1 和 3 型为主, 并且具有地域特异性, 尽管波兰、美国 and 克罗地亚也有生物 1 型菌株, 但与中国菌株有基因型上的差异, 中国分离的生物 3 型与印度分离的菌株具有同源性。欧洲地区猪种菌主要是生物 2 型为主, 且葡萄牙和西班牙具有极高的同源性; 犬种菌主要是来自中国 and 韩国, 而且具有同源性。从海洋哺乳动物中分离的菌株具有密切的亲缘关系, 如鲸种和鳍种布鲁氏菌菌株。从聚类分析图可以看出, 分离自前苏联的猪种生物 5 型 3 株菌株, 与猪种其他生物型遗传关系较远, 可以从猪种中分离出来, 独成一个新种。犬种布鲁氏菌与猪种生物 4 型菌株相似, 可以归在一个种内。沙林鼠种与田鼠种布鲁氏菌关系较近, 而分离自人体内的 1 株 *B. inopinata* 和鳍种布鲁氏菌关系较近, 它们可以合并成一个种型。同样来自苏格兰的鲸种菌株, 1999—2002 和 2005—2007 年分离的 27 株菌株, 与 2002—2005 年分离的 67 株菌株遗传关系较远, 而且与其他海洋动物分离的鳍种关系较远, 这 27 株鲸种菌株似乎可以独成一个布鲁氏菌种型。羊种生物 2 和 3 型菌株应用该分型方法不能区分, 实际上应用其他分型方法也有相似的结果, 他们之间具有极高的相似性, 可以归在同一生物型。牛种生物 3 和 6 型, 生物 5 和 9 型基因型相似度较高。来自肯尼亚和乌干达分离的 16 株牛种生物 3 或 6 型菌株, 与其他牛种菌株基因关系较远, 可以独立成一个牛种新类型。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis [J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6 (2) :

- 91-99. DOI:10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
- [2] Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3/4): 392-398. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.06.021.
- [3] Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, et al. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health[J]. Euro Surveill, 2012, 17(30):20227.
- [4] Ferreira AC, Chambel L, Tenreiro T, et al. MLVA16 typing of Portuguese human and animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42514. DOI: 10.1371/journal.pone.0042514.
- [5] Garofolo G, di Giannatale E, de Massis F, et al. Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA-16 [J]. Infect Genet Evol, 2013, 19: 59-70. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.021.
- [6] Minharro S, Silva Mol JP, Dorneles EM, et al. Biotyping and genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 1977 to 2008 [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81152. DOI: 10.1371/journal.pone.0081152.
- [7] Jiang H, Wang H, Xu LQ, et al. MLVA genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from different animal species and humans and identification of *Brucella suis* vaccine strain S2 from cattle in China [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76332. DOI:10.1371/journal.pone.0076332.
- [8] Her M, Kang SI, Cho DH, et al. Application and evaluation of the MLVA typing assay for the *Brucella abortus* strains isolated in Korea [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 230. DOI: 10.1186/1471-2180-9-230.
- [9] Sanogo M, Abatih E, Thys E, et al. Importance of identification and typing of *Brucellae* from West African cattle: a review [J]. Vet Microbiol, 2013, 164(3/4): 202-211. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.009.
- [10] Muendo EN, Mbatha PM, Macharia J, et al. Infection of cattle in Kenya with *Brucella abortus* biovar 3 and *Brucella melitensis* biovar 1 genotypes [J]. Trop Anim Health Prod, 2012, 44(1): 17-20. DOI:10.1007/s11250-011-9899-9.
- [11] Shang DQ, Xiao DL, Yin JM. Epidemiology and control of brucellosis in China [J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1/4): 165-182. DOI:10.1016/S0378-1135(02)00252-3.
- [12] Zhang WY, Guo WD, Sun SH, et al. Human brucellosis, inner Mongolia, China [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(12): 2001-2003. DOI:10.3201/eid1612.091081.
- [13] Li ZJ, Cui BY, Chen H, et al. Molecular typing of *Brucella suis* collected from 1960s to 2010s in China by MLVA and PFGE [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(2): 504-508. DOI: 10.3967/0895-3988.
- [14] Di DD, Cui BY, Wang H, et al. Genetic polymorphism characteristics of *Brucella canis* isolated in China [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84862. DOI:10.1371/journal.pone.0084862.
- [15] Ulu-Kilic A, Metan G, Alp E. Clinical presentations and diagnosis of brucellosis [J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2013, 8(1): 34-41. DOI:10.2174/1574891X11308010007.
- [16] Foster G, Osterman BS, Godfroid J, et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(11):2688-2693. DOI:10.1099/ijs.0.65269-0.
- [17] Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(Pt 2): 375-382. DOI: 10.1099/ijs.0.65356-0.
- [18] Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(Pt 4): 801-808. DOI: 10.1099/ijs.0.011148-0.
- [19] Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay [J]. BMC Microbiol, 2006, 6:9. DOI:10.1186/1471-2180-6-9.
- [20] Maquart M, Le Flèche P, Foster G, et al. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis* [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 145. DOI:10.1186/1471-2180-9-145.
- [21] Al Dahouk S, Le Flèche P, Nöckler K, et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis [J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(1): 137-145. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.015.
- [22] Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens [J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(6): 1168-1184. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001.
- [23] Tian GZ, Cui BY, Piao DR, et al. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of Chinese *Brucella* strains isolated from 1953 to 2013 [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6: 89. DOI:10.1186/s40249-017-0296-0.
- [24] Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella* [J]. J Bacteriol, 2009, 191(8): 2864-2870. DOI: 10.1128/JB.01581-08.
- [25] Audic S, Lescot M, Claverie JM, et al. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella* [J]. BMC Evol Biol, 2011, 11: 200. DOI:10.1186/1471-2148-11-200.

(收稿日期:2018-11-30)

(本文编辑:万玉立)