

布鲁氏菌分型研究进展

周树武, 梁江明

摘要 布鲁氏菌是严重危害人畜健康的病原菌之一,其分型技术主要有生物分型、脂肪酸分型和基因分型等。前者是传统的分型法,得到广泛应用,后者是近年来研究的重点。其中,基因分型法作为布鲁氏菌溯源的主要方法,目前以多位点可变量数串联重复序列分型(MLVA)受到国内外的普遍关注,其他基因分型技术如Rep-PCR分型、扩增片段长度多态性分型(AFLP)、随机扩增多态性分型、染色体DNA的酶切脉冲场凝胶电泳法(PFGE)、核酸探针及多位点序列分型(MLST)也得到应用,本文综述了布鲁氏菌分型的研究进展。

关键词 布鲁氏菌;脂肪酸;基因分型

中图分类号:R516.8 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)9-1147-04

Advances in research on *Brucella* genotyping. ZHOU shu-wu, LIANG Jiang-ming (Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, Guangxi, P.R.China)

Abstract: Brucellosis is isdetrimental to the health of human and animal and the typing of this pathogen mainly includes biotyping, fatty acid phenotyping and genotyping. The former is the traditional classification method, obtained the widespread application, the two latter are developed in recent years. Genotyping is the main method for trace-back of brucellosis and the method is directed for multiple-locus variable number tandem repeat (MLVA). Other methods such as repetitive element sequence-based PCR, amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplification polymorphism, chromosome DNA digested pulse-field gel electrophoresis (PFGE), nucleic acid probe and multi locus sequence typing (MLST) have also been used for brucella genotyping.

Key words: Brucella; Fatty acids; Genotyping

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌属(*Brucella*)细菌侵入机体所引发的传染 变态反应性人畜共患传染病。人患此病可发生多器官受损,病程长,严重者可致残。动物患此病主要引起流产、不孕、不育、死胎等症体征,严重影响畜牧业发展。当前,世界上有许多国家和地区受到布病的危害,建立快速、可靠的布鲁氏菌分型技术对于布病的追根溯源,判断其毒力、免疫力和流行病学特征,反映其在进化中的系统发育地位,以及遏制和打击生物恐怖主义等具有重要作用。目前,布鲁氏菌分型方法主要有表现型和基因型,现综述如下。

1 生物分型

生物分型主要根据布鲁氏菌的生化特性,并结合主要宿主的不同,将布鲁氏菌属分为6个种19个生物型,即:羊种(*B.melitensis*)3个生物型,牛种(*B.abortus*)8个生物型,猪种(*B.suis*)5个生物型,犬种(*B.canis*)、沙林鼠种(*B.neotomae*)、绵羊附睾种(*B.ovis*)。这种传统的生物分型法于1986年得到联合国粮农组织和世界卫生组织布病专家委员会的确认,应用至今被证明是一种较好的分型方法,并在布病的防治工作中发挥了积极而重要的作用。但近十年来,由于畜牧业地区的人、畜间大面积地进行布鲁氏菌弱毒活疫苗的免疫,大量消毒剂的应用及临床上超剂量使用抗生素等的

影响,国内外分离到的非典型布鲁氏菌株以及变异菌株越来越多,它们大约占分离菌株的10%~30%^[1]。这些菌株应用该生物分型方法不能在分类表上找到合适的位置,不仅表明该分型方法尚存在一定的缺陷,更重要的是严重影响对布病疫区分类的判定,从而不能对此采取合理有效的预防控制措施。另外,生物分型方法作为一种传统的分型技术,虽然可以很好地说明布鲁氏菌的生化等表型特征以及与宿主的关系,但不能从根本上揭示各菌株之间的亲缘关系和差别,并且用于分型的表型特征都依赖于特定基因在体外表达的稳定性,因此,对于一个物种的追根溯源,生物分型方法有一定的局限性,需要进一步完善或者寻找新的分型方法以解决布鲁氏菌分型中遇到的问题。

2 脂肪酸分型

细菌的细胞结构中普遍含有的脂肪酸(CFAs)成分与细菌的DNA具有高度的同源性,不同种属的细菌,其脂肪酸的组成和含量表现出不同程度的差异,并且这种差异是比较稳定的,是理想的菌株分型方法。Dees等^[2]曾用气-液相色谱测定了犬种和猪种布鲁氏菌脂肪酸的组成,结果能把犬种和猪种布鲁氏菌区别开来。赵振祥等^[3]选择90株布鲁氏菌经化学方法提取菌体脂肪酸后,用气相色谱分析,获得布鲁氏菌脂肪酸成分的数据资料。并利用SPSS11.5统计软件对获

作者单位 广西壮族自治区疾病预防控制中心 广西南宁 530028

作者简介 周树武(1972~),男,研究生,副主任医师,研究方向:人兽共患病、自然疫源性疾病防治。

得的数据资料进行聚类分析,结果将90株布鲁氏菌分为5种。陈经雕等^[4]对广东不同地区分离到的29株布鲁氏菌进行了菌体脂肪酸成分聚类分析,可以在种的水平上区分布鲁氏菌的3个种。然而,脂肪酸分型与生物分型一样,耗时长,培养所需条件要求严格且需要大量活菌操作,很容易引起实验室感染。因此,该分型方法的应用受到一定的限制。

3 基因分型

3.1 AMOS-PCR 分型 AMOS-PCR分型法是根据布鲁氏菌体中的IS711种特异性定位引起的多态现象进行种型分类。Bricker等^[5]人用此方法区分出布鲁氏菌牛种(1、2、4型)、羊种(1、2、3型)、猪种(1型)和绵羊附睾种,后来他们改进了AMOS-PCR,建立了Bass-PCR,能从非典型布鲁氏菌株和变异菌株中区别牛种布鲁氏菌流行株(1、2、4型),认为是牛种布鲁氏菌筛选的一种可信赖方法。Ocampo等^[6]用此方法鉴别出牛3b型、牛5、牛6和牛9型布鲁氏菌。在国内,钟旗^[7]用AMOS-PCR鉴定出新疆的牛种菌,刘国栋^[8]用此种鉴定方法对146株地方株检测,羊种和猪种布鲁氏菌鉴定结果与传统方法符合率较高,牛种和犬种符合率低。可见,AMOS-PCR鉴定方法能够鉴定布鲁氏菌六个种,可以涵盖近年国内的流行菌株,有很强的应用价值,但鉴定到型存在一定困难。

3.2 Rep-PCR 分型 Rep-PCR是一种依据细菌基因组中广泛分布的短重复序列间片段的差异而建立起的基因组指纹分析方法^[9]。崔步云等^[1]用Rep-PCR技术将107株国内外布鲁氏菌的参考菌株和地方流行菌株分为8个基因型,Mercier等^[10]用此方法对34株布鲁氏菌标准菌株进行了检测,得到19种基因型。可见,此种分子生物学分型法比传统的表现型分类法具有更高的灵敏性,可作为生物分型的补充。

3.3 扩增片段长度多态性分型(AFLP) AFLP是将细菌基因组酶切后进行标记和扩增,从而获得DNA指纹图并进行分析。Whatmore等^[11]用该法可区分出牛种、羊种、犬种、沙林鼠种、绵羊附睾种和海洋种布鲁氏菌,但不能区分犬种和猪种布鲁氏菌。骆利敏等^[12]首次成功构建出我国布鲁氏菌株基因组扩增片段长度多态性DNA指纹图谱,从聚类分析树状图可以将18株布鲁氏菌分成8类,显示AFLP技术可在种的水平上区分布鲁氏菌各株,甚至在种内细分为各亚型。但是,对犬种和羊种菌的分型有一定程度的重叠。因此,AFLP能用于布鲁氏菌种间的分型,但对种内生物型间的分型则无法实现。

3.4 随机扩增多态性分型(RAPD) 随机引物扩增多态性DNA的PCR技术(RAPD)是利用不同的随机排

列碱基顺序的短寡聚核苷酸单链为引物,对所研究的靶DNA进行PCR扩增,将扩增产物进行多态性分析。2000年,Tcherneval等^[13]采用P5和OPLO4作为引物对46株布鲁氏菌进行RAPD分析,可在种的水平上区分除犬种和猪种生物1型外的所有布鲁氏菌。王文敬等^[14]采用引物P5、OPLO4和引物组合P4/5可以得到布鲁氏菌的高分辨率的分型带谱,并建立相应的优化反应体系,但是,RAPD仍无法区分犬种和猪种布鲁氏菌,由此可以看出该方法的局限性。

3.5 染色体DNA的酶切脉冲场凝胶电泳法(PFGE) 脉冲场电泳是使用细菌稀有位点的限制性核酸内切酶对染色体DNA进行消化,对得到的大片段进行分型。骆利敏^[15]对分离自我国的76株布鲁氏菌株进行PFGE,结果显示有39种PFGE图谱,聚类分析表明,大体上是羊种菌聚为一类,牛种菌聚为一类,猪种菌聚为一类,犬种菌聚为一类,而每一类又都有例外,并不是互相排斥的关系。陈经雕^[16]对广东的8株布鲁氏菌和3株布鲁氏菌标准株进行PFGE分型,11株布鲁氏菌被聚为3大类,其中猪种菌及其标准株聚为一类,羊种菌及其标准株聚为一类,牛种菌标准株为一类,在相似值为84.9%水平上,可以区分羊种3型和1型;在相似值为92.9%水平上,可以区分猪种3型和1型。PFGE分型法能用于布鲁氏菌种间的分型,并可根据不同的聚类分析相似值区分出不同型别的布鲁氏菌。

3.6 核酸探针 基因探针是近年来才发展起来的一种技术。Fernandez等^[17]以流产布鲁氏菌16Sr-RNA序列制备荧光核酸探针进行全菌杂交试验。选用3种荧光探针对所有布鲁氏菌属和变种以及9株不同的临床分离的布鲁氏菌进行杂交检测,结果用B9探针可将猪种布鲁氏菌2、3、4、5型和几乎全部布鲁氏菌菌属区别开。骆利敏^[18]选择国内不同时期、不同地区的99株布鲁氏菌分离株,采用相对保守的核糖体基因探针进行杂交图谱多态性研究。发现我国布鲁氏菌分属17个核糖核酸型(RT型)。但是,RT3型全部为羊种布鲁氏菌,而RT10和RT12型则全部为犬种布鲁氏菌。表明,该方法与传统分型方法相互重叠又相互区别,可以成为传统分型方法的有益补充。

3.7 多位点序列分型(MLST) 多位点序列分型(MLST)是一种通过对多个管家基因的测序,用核苷酸序列变异来发现细菌型别差异的分型方法^[19]。Adrian^[20]等分析了160株分离自30个国家的布鲁氏菌,共发现了27个序列型(ST)。种系发生树显示,各ST形成的类群与传统分类基本一致,46株海洋哺乳动物分离株分成5个ST,并可形成一个独立种。周晓艳等^[21]对

分离自我国的47株羊种3型布鲁氏菌进行MLST分析,结果显示,19株omp25基因与目前已有的等位基因型不同,被定义为1个新的等位基因型,即ST28。其余28株与已知的ST8型的各等位基因型一致。可见,随着基因测序技术的发展,新的等位基因型被不断发现,MLST将逐步得到完善,可成为布鲁氏菌分型的有力工具。

3.8 多位点可变数量串联重复序列分型(MLVA)
多位点可变数量串联重复序列分型(MLVA)是利用细菌在进化过程中由于错配和重组而不断产生的可变数目串联重复序列(VNTR)改变,当对多个VNTR位点的改变进行分析时,其指纹图具有高度鉴别性,使高度同源性的细菌分型成为可能。Ewalt等^[22]利用布鲁氏菌基因序列中的8个位点(MLVA-8)对美国的105株布鲁氏菌(包括标准株和分离株)进行分型,能较好地地区分各生物型,其分型的重复性很好。Le Fleche等^[23]利用MLVA-16对527株布鲁氏菌(包括标准株和分离株)进行分型,获得了384个基因型,由此建立了布鲁氏菌2007数据库供各不同实验室进行比对,可作为传统生物学分型法的替代方法。随着所利用基因序列位点的不断增多,获得的基因型也随之增加,可在流行病学追踪调查及确定分离株的亲缘关系上发挥重要作用。

4 结语

布鲁氏菌分型的目的是反映细菌在进化过程中较为重要的有意义的突变,寻找细菌衍化的内在规律,为疾病的预防与控制提供依据。从目前的情况来看,还没有一种分型方法能完全反映布鲁氏菌的进化关系和分类地位,同时在临床和流行病学上又具有现实意义。布鲁氏菌是一个较为特殊的细菌,它没有质粒,不编码外毒素,但有2条染色体,它的基因组较为保守,这为基因分型奠定了基础。目前,已完成了13株布鲁氏菌全基因组测序工作,为利用比较蛋白组学和比较基因组学研究布鲁氏菌宿主特异性及毒力上的差异提供了依据,并为布鲁氏菌的分型服务。基于omp2a,omp2b和omp31,omp25等编码外膜蛋白多样性基因的研究,发现了一种限制性片段长度多态性多聚酶链式反应^[24],能够鉴定布鲁氏菌和区分布鲁氏菌各个典型菌株以及其亚型。钟志军等^[25]利用羊种和牛种的基因构建了全基因组芯片,对19株不同亚型布鲁氏菌和4株疫苗株进行分析,成功鉴定了25个差异区域。杨毅等^[26]对10株布鲁氏菌的基因组序列进行了系统的比较分析,结果显示不同种型布鲁氏菌在基因水平上存在较大差异,差异基因主要位于II号染色体上,根据差异基因,鉴定了42个差异区段,这些差异

区段在19株不同生物型标准菌株中存在差异分布,从基因的获得与缺失的角度了解不同种型基因水平的差异。全基因组测序可以帮助我们了解布鲁氏菌种内或种间进化关系,随着基因组测序数量的增加,分析全基因组多态性会有更大的进步。

参考文献:

- [1] Cui BY, Yin JM, Li LY, et al. Tying of brucella isolates by repetitive element sequence-based polymerase chain reaction [J]. Disease surveillance, 2005, 20(8):397-400(In Chinese)
(崔步云,尹继明,李兰玉,等.布鲁氏菌的Rep-PCR分型研究[J].疾病监测, 2005, 20(8):397-400)
- [2] Dees SB, Hollis DG, Weaver RE, et al. Cellular fatty acids of *Brucella suis* and *Brucella canis*[J]. ClinMicro,1981,14(1):111.
- [3] Zhao ZX, Cui BY, Li LY, et al. Tying on the cellular fatty acids of *Brucella* species by gas-chromatography analysis [J]. Chinese journal of zoonoses, 2010,26(1):13-16(In Chinese)
(赵振祥,崔步云,李兰玉,等.布鲁氏菌的脂肪酸分型研究[J].中国人兽共患病学报,2010,26(1):13-16)
- [4] Chen JD, Deng XL, Ke CW, et al. Analysis of the fatty acid components of *Brucella* strains in Guangdong province [J]. Chinese journal of zoonoses, 2010,26(2):131-139(In Chinese)
(陈经雕,邓小玲,柯昌文,等.广东省布鲁氏菌菌株脂肪酸成分分析[J].中国人兽共患病学报,2010,26(2):131-139)
- [5] Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, et al. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle [J]. J Vet Diagn Invest, 2003, 15 (4):374-378.
- [6] Ocampo Sosa AA, Agüero Balbín J, García Lobo JM. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5,6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3[J]. Vet Microbiol,2005,110 (122):41-51.
- [7] Zhong QW, Fan WX, He QN, et al. AMOS-PCR for identification of *Brucella* species [J]. Chin J Zoonoses, 2007,23:683-686 (In Chinese)
(钟旗,范伟兴,何倩倪,等.用AMOS-PCR对布鲁氏菌种型鉴定的研究[J].中国人兽共患病学报, 2007,23:683-686)
- [8] Liu GD, Cui BY, Liu RZ, et al. Identification of *Brucella* by multiplex polymerase chain reaction [J]. Disease surveillance, 2008,23(5): 271-273(In Chinese)
(刘国栋,崔步云,刘荣臻,等.布鲁氏菌多重聚合酶链反应鉴定研究[J].疾病监测,2008,23(5):271-273)
- [9] Versalovic JT, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of Repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J].Nucleic Acids Res,1991,19(24):6823-6831.
- [10] Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, et al. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements[J]. J Clin Microbiol,1996, 34(5): 1299-1302.
- [11] Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, et al. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest[J]. J Clin Microbiol,2005, 43(2): 761-769.
- [12] Luo LM, Li M, Rui YY, et al. Construction of genomic DNA fingerprinting of *Brucella* by AFLP [L]. Chin J Zoonoses, 2006,22(1):15-17(In

- Chinese)
(骆利敏,李明,芮勇宇,等.AFLP法构建布鲁氏菌基因组DNA指纹图谱[J].中国人兽共患病学报, 2006,22(1):15-17)
- [13] Tcherneval E, Rijpensl N, Jersek B, et al. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(1): 69-80.
- [14] Wang WJ, Li Y, Luo LM, et al. Establishment of an optimal system of random amplified polymorphic DNA-PCR for the detection of *Brucella* species [J]. Chin J Zoonoses, 2005,21(6):482-485(In Chinese)
(王文敬,李妍,骆利敏,等.布鲁氏菌AP-PCR最优反应体系的建立[J].中国人兽共患病学报, 2005,21(6):482-485)
- [15] Luo LM, Cui BY, Rui YY, et al. *Brucella* pulsed-field gel electrophoresis profiles of type [J]. The Chin J Microbiol Immunol, 2005,25(12):1043(In Chinese)
(骆利敏,崔步云,芮勇宇,等.布鲁氏菌脉冲场凝胶电泳图谱分型研究[J].中华微生物和免疫学杂志, 2005,25(12):1043.)
- [16] Chen JD, Deng XL, Ke BX, et al. Etiological analysis of Brucellosis in Guangdong Province [J]. Dis Surveill, 2008,23(5): 277-279(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[J].疾病监测,2008,23(5):277-279)
- [17] Fernandez-lago L, Vallejo F J, Trujillano I. Fluorescent whole-cell hybridization with 16S rRNA targeted oligonucleotide probes to identify *Brucella* spp. by flow cytometry[J]. Clin Microbiol, 2000, 38(7): 2768-2771.
- [18] Luo LM, Li M, Wang WJ, et al. China *Brucella abortus* ribosomal gene polymorphism [J]. J Prev Med Chin PLA, 2006,24(5):324-327 (In Chinese)
(骆利敏,李明,王文敬,等.中国布鲁氏菌核糖体的基因多态性[J].解放军预防医学杂志, 2006,24(5):324-327)
- [19] Hanage WP, Feil EJ, Brueggemann AB, et al. Multilocus sequence typing: strain characterization, population biology, and patterns of evolutionary descent. In Persing, DH, et al. (eds), Molecular Microbiology: diagnostic principles and practice. American Society Press[M]. Washington DC, 235-243.
- [20] Adrian M What more, Lorraine L Perrett and Alastair P MacMillan: Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing [J]. BMC Microbiol, 2007,10 1186/1471.
- [21] Zhou XY, Chen YF, Cui BY, et al. Multiple sequence typing analysis of *Brucella melitensis* serotype 3 strains [J]. Chin J Zoonoses, 2011,27(5):371-375(In Chinese)
(周晓艳,陈燕芬,崔步云.我国羊种3型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J].中国人兽共患病学报, 2011,27(5):371-375)
- [22] Bricker BJ, Ewalt DR. Evaluation of the HOOB-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria[J]. BMC Microbiol, 2005, 5: 37-46.
- [23] Le Fleche, P, I. Jacques, M. Grayon, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay[J]. BMC Microbiol, 2006,6:9.
- [24] Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25kDa and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*[J]. Microbiol, 1995, 141 (9): 2111-2121.
- [25] Zhong ZY, Yu Z, Xu J, et al. Advances in comparative genomics of *Brucella* [J]. Chin J Zoonoses, 2011,27(4):346-350(In Chinese)
(钟志军,于爽,徐杰,等.布鲁氏菌比较基因组学研究进展[J].中国人兽共患病学报, 2011,27(4):346-350)
- [26] Yang Y, Yan YF, Chen YF, et al. Gene lost and found among different *Brucella* species and biotypes [J]. Letters in biotechnol, 2011,22(3): 358-361(In Chinese)
(杨毅,颜焱峰,陈燕芬,等.不同种型布鲁氏菌间的基因获得与缺失研究[J].生物技术通讯, 2011,22(3):358-361.)

收稿日期 2012-03-22 编辑 崔宜庆

(上接第1134页)

同年龄的乙肝疫苗查漏补种可以做为高年龄组防制乙肝的有效措施。

参考文献：

- [1] Kang LY, Dong PQ, Chen ZP, et al. Practical prevention and controlling of infectious disease[M]. Xueyuan publishing house, 2010.6(In Chinese)
(康来仪,董柏青,陈直平,等.实用传染病防治-3版[M].学苑出版社,2010.6)
- [2] Li LJ. Infectious diseases - medical colleges and universities - teaching materials[M]. Beijing: Higher Education Press (In Chinese)
(李兰娟. 传染病学-医学院校-教材[M]. 北京:高等教育出版社, 2004.1)
- [3] Li LM. Infectious diseases[M]. (6th vision) Beijing: People's medical

publishing house, 2007.11(In Chinese)

(李立明.流行病学[M].第6版.北京:人民卫生出版社,2007.11)

- [4] Liang XF, Chen YS, Wang XJ, et al. A Study on the sero-epidemiology of hepatitis B in Chinese population aged over 3 years old[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2005, 26(9):655(In Chinese)
(梁晓峰,陈园生,王晓军,等.中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J].中华流行病学杂志, 2005, 26(9):655)
- [5] Chen YS, Liang XF, Chen LJ, et al. Seroepidemiological Study on Hepatitis B in Chinese Children [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2006, 12(2):84-86 (In Chinese)
(陈园生,梁晓峰,陈丽娟,等.中国儿童乙型肝炎疫苗预防接种效果分析[J].中国计划免疫,2005, 26(9):655)

收稿日期 2011-12-14 编辑 谢永慧