DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002－2694.2015.04.003

利用多重聚合酶链反应和多色毛细管电泳分析布氏菌多位点可变数目串联重复序列

姜　海[1]，荣　蓉[2]，田国忠[1]，赵　娜[1]，赵鸿雁[1]，朴东日[1]，赵赤鸿[2]，崔步云[1]

摘　要：目的　传统的布鲁氏菌多点可变数目串联重复序列分析方法涉及16个位点（MLVA-16），包括单重聚合酶链反应和琼脂糖凝胶电泳，一直以来都作为标准的基因分型方法，用于布病的病原监测和流行病学调查。然而，目前这种传统方法工作量较大，实验室间结果不宜比较；尤其是对大规模菌株进行基因分型或面临突发疫情时，急需一种高通量且快速的方法。**方法**　用多重PCR和多色毛细管电泳方法建立一种可靠的，高通量的且自动化程度较高的MLVA-16改良分型系统，用82株菌进行测试。**结果**　这种改良的MLVA-16分型系统具有很高的准确性，且具有快速和高通量的特点。**结论**　改良的MLVA-16分型系统可用于基层布病实验室，为布病的病原监测提供高效的工具。

关键词：多重PCR；多色毛细管电泳；布鲁氏菌；基因分型

中图分类号：R378.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002－2694(2015)04－0303－08

MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis

JIANG Hai[1], RONG Rong[2], TIAN Guo-zhong[1], ZHAO Na[1], ZHAO Hong-yan[1], PIAO Dong-ri[1], ZHAO Chi-hong[2], CUI Bu-yun[1]

(1. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 102206, *China*; 2. *Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 102206, *China*)

Abstract: The Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis 16 loci panel (MLVA-16), involving singleplex PCRs and agarose gel electrophoresis, is the standard genotyping method for *Brucella* spp. used also for the *Brucella* international online database. To find a rapid and through-put genotyping method, modified MLVA-16 can be used. We described an alternative, reliable, high-throughput MLVA-16 protocol using multiplex PCRs and multicolor capillary electrophoresis. Furthermore, 82 *Brucella* strains were tested. Results showed that the modified MLVA-16 has proved to be accurate, rapid and throughput. It's indicated that the modified MLVA-16 is highly discriminatory and epidemiological concordance and is easy for brucellosis surveillance in province-level laboratory.

Keywords: multiplex PCR; multicolor capillary electrophoresis; *Brucella*; genotyping

Funded by the National Natural Science Foundation of China (No. 81271900); the Special Scientific Research Fund of Public Welfare Profession of China (No. 201302006); the Major Specil Fund(No. 2012ZX10004215)

Corresponding author: CUI Bu-yun, Email: cuibuyun@icdc.cn; ZHAO Chi-hong, Email: zhaoch@chinacdc.cn

国家自然科学基金（No.81271900）；国家卫生计生委公益性行业科研专项（No. 201302006）；重大专项（No. 2012ZX10004215）

通讯作者：崔步云，Email：cuibuyun@icdc.cn；
赵赤鸿，Email：zhaoch@chinacdc.cn
作者单位：1.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，感染性疾 病协同诊治协同创新中心，北京　102206；
2.中国疾病预防控制中心，北京　102206

布氏菌病（布病）是由布氏菌属细菌侵人机体后引起传染—变态反应性人兽共患的传染病[1-2]。人类及家畜、动物普遍易感，患者很容易转为难以治愈的慢性病人；动物造成流产和不孕。布病遍布在世界上160多个国家，随着全球化的影响，布病疫情发生了很多变化。一些国家布病再次出现，一些国家

疫情愈演愈烈,尤其在地中海、中东、西亚、非洲和南美洲。中国每个省(市)区的人畜中几乎都有不同程度布病的存在和流行[3]。布病是《中华人民共和国传染病防治法》37种传染病中的乙类传染病。自建国以来,中国经历了对布病疫情调查、流行病学规律的探索和分析、全面开展了预防和控制措施以及重点专项问题研究。在许多方面取得了显著成绩和进展。但是鉴于布病发病特点,近15年疫情呈持续增长态势,愈演愈烈。目前,布病在中国已经是严重的公共卫生问题之一,预防和控制人畜布病成为一项迫在眉睫的重要工作。

确认布氏菌种(型)对于疫情判断及流行病学溯源分析极为重要。因此,开展布病爆发流行的追踪、溯源是布病预防控制技术支撑体系中亟须解决的问题。根据宿主偏好、致病力及流行病学特性,目前布氏菌属已扩展为10个种[4-5]。分别是羊种(共3个型)、牛种(共8个型)、猪种(共5个型)、绵羊附睾种、犬种、沙林鼠种、2种新的海洋哺乳动物种(鲸、鳍)、田鼠种和 *Brucella inopinata* 种。传统的生物型鉴定只能鉴定到种(型),无法对菌株进行溯源分析。一些低分辨率的分子分型方法,如PCR产物限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)[6]、肠杆菌基因间重复序列(ERIC-PCR)[7]、基因外重复回文序列(REP-PCR)[8] 随机扩增多态性 DNA(RAPD-PCR)[9]和扩增片段长度多态性分析(AFLP)[10]在分子流行病学中应用价值又十分局限。由于布氏菌属种间DNA同源性高达90%,亟须一种高分辨力的分型方法用来提供疾病传播模式和分子流行病学信息。多位点序列分析[11]和脉冲场凝胶电泳(PF-GE)[12]应运而生,然而这些方法都存在有限的菌株间区分能力,无法对某一疫区间进行菌株流行病学关联追踪调查。多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)[13]是一个基于PCR技术的分型方法。该方法通过区分基因组上多个具有多态性串联重复序列位点(VNTR)的重复数来区分菌株。串联重复数不同的核酸片段经位于串联重复的两端引物扩增,通过琼脂糖电泳、测序或毛细管电泳确定扩增产物大小,进而确定串联重复数。此方法分辨率高、重复性好、快速、简便,可用于流行病学溯源分析。

MLVA数据可以通过PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳很容易地产生,但实验室之间的比较仍然是个问题,因为琼脂糖凝胶电泳无法解决某些特定位点模棱两可的片段大小;而且这种方法工作量较大,尤其是对大规模菌株进行基因分型或面临突发疫情时,急需一种高通量且快速的方法。在这篇研究中,我们利用多重PCR和多色毛细管电泳方法建立一种可靠的,自动化程度高且高通量的MLVA-16改良分型方法。本研究对4株标准菌株、34株流行羊种菌、17株流行牛种菌、18株流行猪种菌和9株流行犬种菌株进行改良的MLVA分析,验证了该方法的可靠性和准确性,为布病的病原监测提供了强有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 布氏菌菌株 本实验选用的标准菌株(16M、544A、1330S和RM6/66)及地方菌株(23株羊种3型、5株牛种1型、12株牛种3型、12株猪种1型、7株猪种3型和9株犬种菌)均来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布鲁氏菌病室。

1.2 细菌培养与基因组DNA的提取 将冻干菌株在布鲁杆菌琼脂斜面上复苏后,参照标准菌株做硫堇、复红染料抑菌实验和噬菌体裂解实验。用热灭活的方式灭活细菌,然后用基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组DNA。基因组的提取按试剂盒说明书进行。提取的基因组DNA于−20℃保存备用。

1.3 16个位点多重PCR和多色毛细管分析方法 所用引物序列参照参考文献,多重PCR组合及多色毛细管分析信息见表2。引物由北京擎科新业生物公司合成,并分别在各上游引物5′端标记荧光报告基团。见表1。

1.3.1 目的VNTR位点扩增 采用多重聚合酶链反应技术(PCR)扩增各VNTR位点。1)反应体系:4套多重PCR均采用30 μL反应体系,包括2× EasyTaqPCR Super Mix:15 μL,4对混合引物(10 μm)2 μL,DNA模板(100 ng)2 μL,12 μL去离子水。2)扩增条件:预变性96 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s、60 ℃ 90 s、72 ℃30 s,35个循环,最后72 ℃延伸5 min。每次扩增均以16M作阳性对照。

1.3.2 扩增结果检测与分析 PCR产物送北京擎科新业生物技术有限公司,采用ABI 3730XL测序仪进行毛细管电泳;根据GeneScan 1200 LIZ DNA Marker确定扩增产物大小,采用Gene-Mapper 4.0软件进行分析并计算检测位点中各VNTR的重复次数。

2 结 果

2.1 4株标准株16个VNTR位点毛细管电泳观察值与测序预期值比较 毛细管电泳分析VNTR片段的大小具有可重复性,每个位点的等位基因长

度大小通过对其进行直接测序来验证(表 2)。通过毛细管电泳分析获得的 VNTR 片段的大小,与预期的片段大小具有较低的标准差,无需修改相应的等位基因串联重复数目。

表 1　多重 PCR 荧光标记引物序列及扩增产物大小

Tab. 1　MLVA primers used in each multiplex reaction

Multiplex reaction	Locus	Primer sequences (5′-3′)	Allele size range/bp
Multiplex 1	Bruce 30	F：FAM-TGACCGCAAAACCATATCCTTC R：TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG	119－199
	Bruce 08	F：HEX-ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC R：ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	312－384
	Bruce 11	F：ROX-CTGTTGATCTGACCTTGCAACC R：CCAGACAACAACCTACGTCCTG	257－698
	Bruce 45	F：TAMRA-ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG R：CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	133－187
Multiplex 2	Bruce 19	F：FAM -GACGACCCGGACCATGTCT R：ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	79－205
	Bruce 06	F：HEX -GATTGCGGAACGTCTGAACT R：TAACCGCCTTCCACATAATCG	312－714
	Bruce 42	F：ROX-CATCGCCTCAACTATACCGTCA R：ACCGCAAAATTTACGCATCG	289－539
	Bruce 12	F：TAMRA-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA R：GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	302－452
Multiplex 3	Bruce 18	F：FAM-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT R：GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	130－186
	Bruce 55	F：HEX-TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT R：AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT	193－273
	Bruce 21	F：ROX-CTCATGCGCAACCAAAACA R：GTGGATACGCTCATTCTCGTTG	431－463
	Bruce 04	F：TAMRA-CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG R：TGGTTTTCGCCAATATCAACAA	313－473
Multiplex 4	Bruce 07	F：FAM-GCTGACGGGGAAGAACATCTAT R：ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAAA	134－246
	Bruce 09	F：HEX-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC R：GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	124－292
	Bruce 43	F：ROX-TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT R：TATTTTCCGCCTGCCCATAAAC	170－194
	Bruce 16	F：TAMRA-ACGGGAGTTTTTGTTGCTCAAT R：GGCCATATCCTTCCGCAATA	227－353

2.2　部分菌株部分 VNTR 位点多重 PCR 扩增后毛细管电泳检测结果　菌株 2011030 多重 PCR3bruce18(蓝色)、bruce21(红色)、bruce55(绿色)、bruce04(黑色)产物大小分别为 136 bp、460 bp、229 bp 和 345 bp。菌株 2011032 多重 PCR1bruce18(蓝色)、bruce21(红色)、bruce55(绿色)、bruce04(黑色)产物大小分别为 124 bp、320 bp、363 bp 和 150 bp。菌株 2010028 多重 PCR4 bruce18(蓝色)、bruce21(红色)、bruce55(绿色)、bruce04(黑色)产物大小分别为 150 bp、246 bp、122 bp 和 185 bp。菌株 2010022 多重 PCR2 bruce18(蓝色)、bruce21(红色)、bruce55(绿色)、bruce04(黑色)产物大小分别为 177 bp、289 bp、310 bp 和 39 1bp。毛细管电泳检测峰图分别见图 1、图 2、图 3 和图 4。根据标准菌株结果,证实了待检菌株 VNTR 重复数的准确性。

表 2 4 株标准菌株 16 个位点观察值和预期值大小

Tab. 2 ***Brucella* reference strains typed in this study -- MLVA profiles, observed and expected allele sizes**

Species biovar		06	08	11	12	42	43	45	55	18	19	21	04	07	09	16	30
B. mel 116M	Observed	582	346	260	395	542	180	150	274	147	163	441	323	156	165	236	153
	Expeted	580	348	257	392	539	182	151	273	146	163	439	321	158	164	235	151
	MLVA	3	4	2	13	4	2	3	3	5	18	6	2	5	8	3	6
B. abo 1544A	Observed	718	369	391	380	292	183	152	275	148	180	457	331	156	126	245	142
	Expected	714	366	383	377	289	182	151	273	146	181	455	329	158	124	243	143
	MLVA	4	5	4	12	2	2	3	3	5	21	8	3	5	3	4	5
B. suis	Observed	442	329	506	346	536	168	186	232	136	168	465	352	165	133	252	126
11330S	Expected	446	330	509	347	539	170	187	233	138	169	463	353	166	132	251	127
	MLVA	2	3	6	10	4	1	5	2	4	19	9	6	6	4	5	3
B. canis	Observed	443	334	793	365	412	172	185	230	143	172	466	167	165	154	253	126
RM6/66	Expected	446	330	798	362	414	170	187	233	146	175	463	169	166	156	251	127
	MLVA	2	3	9	11	3	1	5	2	5	20	9	8	6	7	5	3

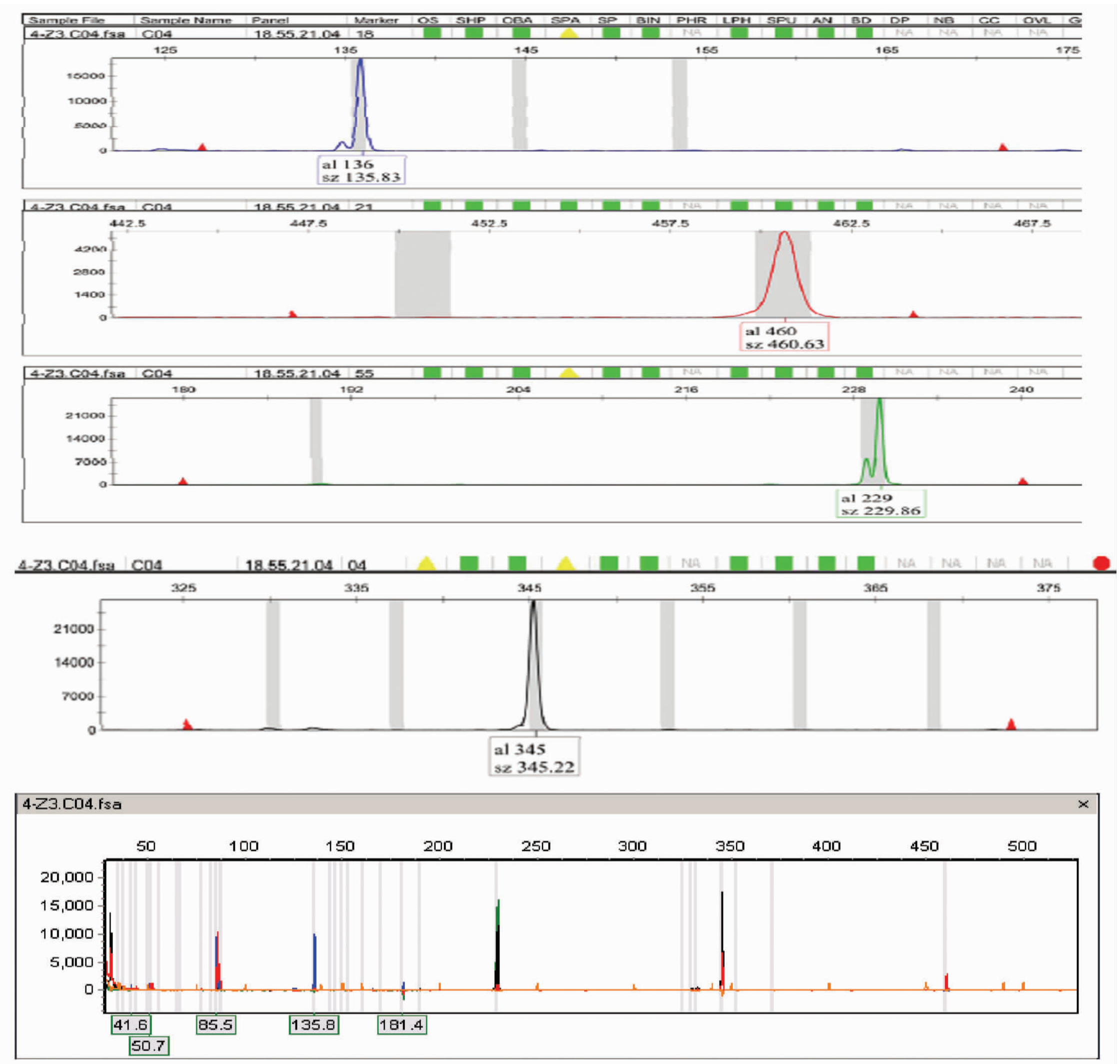

图 1 菌株 2011030 多重 PCR3 毛细管电泳结

Fig. 1 **Result of multicolor capillary electrophoresis of the strain 2011030**

图 2　菌株 2011032 多重 PCR1 毛细管电泳检测结果

Fig. 2　Result of multicolor capillary electrophoresis of the strain 2011032

图 3　菌株 2010022 多重 PCR4 毛细管电泳检测结果

Fig. 3　Result of multicolor capillary electrophoresis of the strain 2010022

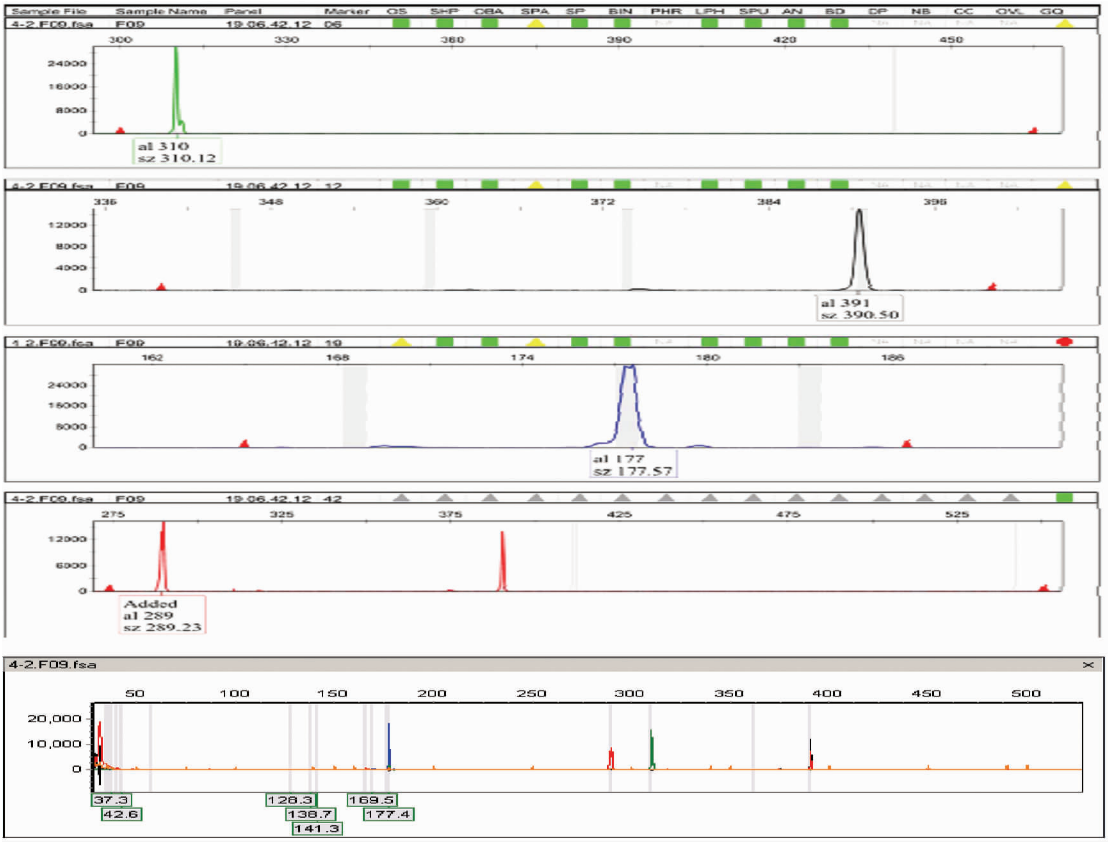

图 4　菌株 2010028　多重 PCR2 毛细管电泳检测结果

Fig. 4　Result of multicolor capillary electrophoresis of the strain 2010028

2.3　16 个位点不同等位基因扩增后毛细管电泳分析的测量误差　16 个位点不同等位基因扩增后毛细管电泳分析的测量误差见表 4，标准差范围在 0.03～0.23之间，证实了该方法的准确性。

表 3　16 个位点不同等位基因扩增后毛细管电泳分析的测量误差

Tab. 3　Variability in VNTR fragment measurements

Locus	Allele number	Arithmetic mean	Standard deviation
Bruce 06	1	305.75	0.12
	2	439.81	0.11
	3	673.93	0.11
	4	717.85	0.13
Bruce 08	3	326.58	0.19
	5	362.64	0.23
Bruce 11	2	256.87	0.08
	3	320.25	0.05
	4	383.78	0.11
	6	509.98	0.03
	8	635.85	0.05
	9	698.98	0.07
Bruce 12	10	343.76	0.10
	11	358.68	0.06

表 3(续 1)

Locus	Allele number	Arithmetic mean	Standard deviation
	12	373.81	0.07
	13	388.98	0.05
Bruce 42	2	290.00	0.03
	3	415.68	0.06
	4	540.97	0.09
Bruce 43	1	172.46	0.10
	2	184.89	0.04
Bruce 45	3	150.76	0.04
	5	186.98	0.06
Bruce 55	1	189.50	0.13
	2	229.87	0.09
	3	270.13	0.08
Bruce 18	4	137.87	0.09
	5	145.76	0.08
	6	153.44	0.07
	7	161.68	0.08
	8	169.98	0.06
Bruce 19	19	171.26	0.06
	20	177.43	0.10
	21	183.18	0.13
Bruce 21	7	450.93	0.09

表 3(续 2)

Locus	Allele number	Arithmetic mean	Standard deviation
	8	458.36	0.07
	9	466.76	0.09
Bruce 04	3	330.10	0.06
	4	338.68	0.09
	5	344.87	0.08
	6	352.46	0.06
	7	360.56	0.07
Bruce 07	4	150.96	0.04
	5	158.78	0.06
	6	166.76	0.03
	7	174.87	0.05
	8	182.98	0.03
Bruce 09	3	124.98	0.04
	4	132.87	0.05
	5	140.65	0.06
	6	148.87	0.08
	7	156.07	0.08
	8	164.12	0.07
	9	172.54	0.09
	10	180.32	0.07
Bruce 16	3	233.65	0.04
	4	241.87	0.06
	5	249.86	0.10
	7	265.56	0.08
	8	273.39	0.07
	11	297.98	0.08
Bruce 30	3	123.81	0.13
	4	131.92	0.10
	5	139.98	0.09
	6	147.87	0.07
	7	155.37	0.08

3　讨　论

MLVA 方法是一种以 PCR 技术为基础的方法,其操作简单、分辨率高、结果分析容易、具有很高的重复性、并能够提供数字化的分型信息,适宜进行大量样本和网络化分析。更重要的是,根据基因型特征型别的簇,提出预警信息,进而结合流行病学调查发现暴发关联。尤其是发现散在分布于不同地理区域的暴发关联,查找危险因素,明确传播途径,追溯传染来源,为布病跨地区传播菌株溯源和疾病控制提供可靠技术支撑。MLVA 在揭示菌株间遗传关系及流行病溯源调查中的意义在我们发表的多篇文章中已有阐述[14-16],本研究已不再赘述,在此仅对方法学进行评述。

MLVA 分析已经成功地在许多细菌中广泛应用,包括所有涉及生物恐怖的致病菌如炭疽杆菌[17]和鼠疫耶尔森菌[18]。对于这些病原体,通过毛细管电泳估计 VNTR 片段大小是公认的金标准。对于布鲁氏菌,琼脂糖电泳估计 VNTR 片段大小是最广泛使用的 MLVA 分析方法。该传统方法便宜但相对耗时,不适于在疫情严重的省份进行大规模菌株基因分型。在这样的背景下,采用新的高通量 MLVA 分型系统迫在眉睫。此外,这将允许实验室继续使用传统的 MLVA-16 分型方案,并及时拓展了当前国际数据库的疫情数据。本研究中的数据也可以用于其他实验室菌株 MLVA 数据的参考,从而提高了分析的重现性。另外,预期值与观察值之间存在很小的差异,不同菌株相同位点相同等位基因存在很小的标准差(表 3)都证实了改良后该方法的准确性。当有新的疫情出现时,甚至涉及潜在的生物恐怖重大事件时,用改良的 MLVA 分型系统将成为应对这些事件的强有力工具。

随着我国人间和畜间布病疫情持续快速上升。建立适于省级疾病预防控制(地方病)中心标准化的分子分型技术进行布氏菌分子流行病学研究,阐明布氏菌疫区基因型特征并揭示其流行病学相关性已迫在眉睫。布氏菌分子分型监测是未来我国布病实验室常规监测的发展方向,是我国布病预防控制的关键支撑技术,也是我国公共卫生应急体系的重要组成部分,为提高和扩展布病防控能力提供新模式。布鲁氏菌也可以被恐怖分子用来发动生物恐怖袭击,因此生物反恐和防恐是保障我国安全的重要措施之一。为了快速、有效、经济地预防和控制布鲁氏菌的大面积暴发和流行,建立有效的病原微生物调查及溯源研究方法及深入了解布鲁氏菌致病相关机制具有重要的作用。鉴于 MLVA 技术基于 PulseNet 标准化方案,可以作为细菌分子分型、基因组进化、分子流行病学研究、实验室网络监测以及相关科研的有力工具,改良的 MLVA 分型系统可以作为布鲁氏菌流行病学调查中最重要的手段之一。

参考文献:

[1]Gvizdic S, Cengic D, Bratic M, et al. *Brucella melltemis*: review of the human infection case[J]. Bosh J Basic Med Sci, 2006, 6(1): 15-18.

[2]Cui BY. Epidemic surveilance and control of brucellosis in China [J]. Dis Surveill, 2007, 22(10): 649-651. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2007.10.001 (in Chinese)
崔步云.中国布鲁菌病疫情监测与控制[J].疾病监测,2007, 22

(10):649-651.
[3]Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58: 375-382. DOI: 10.1099/ijs.0.65356-0
[4]Scholz HC, Nockler K, Gollner C, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60: 801-808. DOI:10.1099/ijs.0.011148-0
[5]AI Dabouk S, Tomaso H, Prenger-Beminghoff E, et al. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PERRFLP) [J]. Crit Rev Microbiol, 2005, 31(4): 191-196.
[6]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.
[7]Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, et al. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains[J]. Vet Microbiol, 1996, 51(1-2): 169-178.
[8]Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, et al. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(1): 69-80.
[9]Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S,et al. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinaryinterest[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 761-769.
[10]Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing [J]. BMC Microbiol, 2007, 20(7): 34.
[11]Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, et al. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*[J]. J Bacteriol, 1988, 170(10): 4603-4607.
[12]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, 9(6): 9.
[13]Di D, Cui B, 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
[14]Jiang H, Wang H, Xu L, 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
[15]Jiang H, Fan M, Chen J, 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
[16]Jiang H, Mao LL, Zhao HY, et al. Reemergence and genetic comparison of *Brucella canis* in China, using a multiple-locus variable-number tandem-repeat assay[J]. Vet Microbiol, 2012, 154(3/4): 419-421. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.07.014
[17]Li S, An X, Huang Y, et al. Source tracking of an anthrax outbreak in northeastern China using complete genome analysis and MLVA genotyping[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. [Epub ahead of print]
[18]Zhang X, Hai R, Wei J, et al. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 205. DOI: 10.1186/1471-2180-9-205

收稿日期:2014-10-13;**修回日期**:2014-12-06

(上接第 297 页)

[4]Zhang CC, Li XW, Jiang XG, et al. Establishment and application of TaqMan real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* specie[J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(10): 1018-1021.
[5]Qu D, Zhou H, Han J, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork[J]. Vet Parasitol, 2013, 192(1-3): 98-103. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.10.010
[6]Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand[J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 84(4): 614-620. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0473
[7]Lin X, Chen Y, Lu Y, et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 63(3): 237-242. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.012
[8]Pinne M, Haake DA. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e51025. DOI: 10.1371/journal.pone.0051025
[9]Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, et al. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 2072-2074. DOI: 10.1128/jcm.00481-12
[10]Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis[J]. J Bacteriol, 2004, 186(7): 2164-2172.

收稿日期:2014-08-28;**修回日期**:2014-11-12