

两株布鲁菌 MLST 新序列型(ST)的鉴定

吕燕宁^{1,2}, 郭潇潇², 陈丽娟¹, 吕冰¹, 常建华³, 华文浩⁴, 王慧珠⁴, 黎新宇¹, 王全意¹

摘要:目的 对北京地区分离自布病患者血液的2株布鲁菌进行多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)及其遗传学特征进行研究,为布病的预防和控制提供科学依据。**方法** 应用布鲁菌属特异性PCR(BCSP31-PCR)和种/型特异性PCR(AMOS-PCR)对分离的2株布鲁菌进行鉴定,采用MLST技术对2株布鲁菌分离株的19个管家基因、1个外膜蛋白基因及1个基因间区的序列进行测定,与MLST数据库中的等位基因序列进行比对,确定菌株的等位基因谱及9位点和21位点序列型(sequence type, ST)。采用聚类分析法研究2株菌ST型与各种布鲁菌已知ST型的遗传进化关系。**结果** 2株分离株经BCSP31-PCR鉴定为布鲁菌属细菌,AMOS-PCR鉴定为非羊种、非牛种1、2、4型、非猪种1型、非绵羊附睾种布鲁菌;MLST分析显示,2株菌的等位基因编号(gap/aroA/glk/dnaK/gyrB/trpE/cobQ/int-hyp/omp25/prpE/caiA/csdB/soxA/leuA/mviM/fumC/fbaA/ddlA/putA/mutL/acnA)分别为2、1、2、2、1、3、1、4、1、13、2、2、2、1、1、3、7、6、2、3和2、1、2、2、1、3、1、4、29、13、2、2、2、1、1、3、7、6、2、3,比对MLST数据库,结果显示这2株细菌的等位基因编号组合未见报道,为新ST型。聚类分析显示这2种新的ST型与牛种布鲁菌ST型处于同一分支。**结论** 北京地区分离的2株布鲁菌为新ST型牛种布鲁菌,已被MLST数据库确认,分别命名为ST74和ST75(9位点序列型)与ST108和ST109(21位点序列型)。与同属牛种布鲁菌的ST型遗传关系最近,该结果为北京地区布病的预防和控制提供了科学依据。

关键词:布鲁菌;多位点序列分型;序列型;基因分型

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2018)05-0434-07

Identification of two new sequence type of *Brucella* isolates by multilocus sequence typing

LYU Yan-ning^{1,2}, GUO Xiao-xiao², CHEN Li-juan¹, LYU Bing¹, CHANG Jian-hua³, HUA Wen-hao⁴, WANG Hui-zhu⁴, LI Xin-yu¹, WANG Quan-yi¹

(1. Beijing Center for Diseases Prevention and Control, Beijing Research Centre for Preventive Medicine, Beijing 100013, China;

2. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

3. Pinggu District Center for Diseases Prevention and Control, Beijing 101200, China;

4. Beijing Di Tan Hospital Affiliated of Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: We defined the sequence type (ST) of 2 *Brucella* strains isolated from patients' blood in Beijing by multilocus sequence typing (MLST) and investigate their genetic characteristics to provide scientific basis for the control and prevention of brucellosis. The 2 isolates were identified using *Brucella* genus specific BCSP31-PCR and species-specific AMOS-PCR. Nineteen house-keeping genes, one out membrane protein gene and one gene-inter-region sequence of the strains were further analyzed using MLST. The sequences were compared with the existing allele sequences on the MLST website to determine the allelic profile and sequence type and to determine the 9-loci ST and 21-loci ST. Clustering analysis was used to investigate the genetic relationship between the 2 new STs and other known STs of *Brucella*. The 2 isolates were identified as *Brucella* with BCSP31-PCR. AMOS-PCR results suggested that the isolates were not *B. melitensis*, not type 1, 2 and 4 *B. abortus*, not type 1 *B. suis*, and not *B. ovis*. MLST analysis revealed that 2 novel allele combinations (gap/aroA/glk/dnaK/gyrB/trpE/cobQ/int-hyp/omp25/prpE/caiA/csdB/soxA/leuA/mviM/fumC/fbaA/ddlA/putA/mutL/acnA) respectively.

北京市疾病预防控制中心、北京市预防医学研究中心科研项目培育专项(No.2015-BJYJ-08)

通讯作者:王全意,Email:bjcdcxm@126.com

作者单位:1.北京市疾病预防控制中心,北京市预防医学研究中心,

北京 100013;

2.首都医科大学公共卫生学院,北京 100069;

3.平谷区疾病预防控制中心,北京 101200;

4.首都医科大学附属北京地坛医院,北京 100015

北京市疾病预防控制中心、北京市预防医学研究中心科研项目培育专项(No.2015-BJYJ-08)

通讯作者:王全意,Email:bjcdcxm@126.com

作者单位:1.北京市疾病预防控制中心,北京市预防医学研究中心,

北京 100013;

2.首都医科大学公共卫生学院,北京 100069;

3.平谷区疾病预防控制中心,北京 101200;

4.首都医科大学附属北京地坛医院,北京 100015

nA) 2, 1, 2, 2, 1, 3, 1, 4, 1, 13, 2, 2, 2, 1, 1, 3, 7, 6, 2, 3 and 2, 1, 2, 2, 1, 3, 1, 4, 29, 13, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 3, 7, 6, 2, 3 were found in the isolates but not reported before. Clustering analysis revealed that the 2 novel STs located at the same branches as the STs of *B. abortus*. The 2 isolates from Beijing were identified as 2 novel STs by this study which were confirmed by the MLST website, and were assigned as ST74 and ST75 (9-loci ST), ST108 and ST109 (21-loci ST). The 2 STs were most genetically closed to the STs belonging to *B. abortus*. The results provide scientific basis for the control and prevention of brucellosis in Beijing.

Keywords: *Brucella*; multilocus sequence typing; sequence type; genotyping

Supported by the Specialized Fund for Scientific Research Project Cultivation of Beijing Center for Diseases Prevention and Control, Beijing Research Centre for Preventive Medicine (No.2015-BJYJ-08).

Corresponding author: Wang Quan-yi, Email: bjcdcxm@126.com

布鲁菌病(以下简称布病)是由布鲁菌(*Brucella*)侵入机体引起的传染——变态反应性人兽共患传染病,在我国属于国家法定管理的乙类传染病,严重危害人类健康和畜牧业的发展。布鲁菌是一类兼性胞内寄生、革兰染色阴性的短小杆菌^[1],以牛、羊、猪、犬等家畜和野生动物为主要储存宿主,也存在于海洋动物中,可经呼吸道、消化道、生殖系统黏膜以及皮肤等多种途径引起感染。人感染布鲁菌可累及全身多个组织器官,临床表现为发热、多汗、乏力、关节肌肉疼痛等^[2-3],急性期可以治愈,但不易被确诊,常迁延为慢性感染,慢性期布病患者可有肝、脾及睾丸肿大,关节和脊柱强直,肌腱挛缩变硬等,很难治愈,如引起脑炎和心肌炎者可致命,严重影响人类健康^[4]。动物感染后主要引起流产,造成畜牧业减产,进而导致极大的经济损失。布鲁菌易借助气溶胶的方式传播,呈高度传染性(仅吸入 10—100 个细菌即可导致人类患病^[5]),因此布鲁菌被认为是一种潜在的生物战剂,已被列入《国际禁止生物武器公约》的核查清单,也是美国反生物恐怖袭击中的生物剂之一^[1,6]。

近年来全球布病发病率上升,被 WHO 称为“再度肆虐”的传染病。我国自 20 世纪 90 年代中期以来,布病再度流行,疫情逐年上升,防控形势严峻。2000 年以后,北京市布病疫情与全国一样,报告病例数呈逐年上升趋势,疫区人群感染率不断升高,并向普通人群扩散。此外,畜间疫情频发,并有局部暴发^[7],防控形势非常严峻。了解布病病原特点和遗传特征是布病防控的基础,本项研究采用基于布鲁菌属外膜蛋白 31 基因的 PCR(BCSP31-PCR)和基于插入序列 IS711 的牛、羊、绵羊附睾和猪种布鲁菌特异的 PCR(AMOS-PCR)技术对 2013 年和 2014 年北京地区分离自布病患者血液的 2 株布鲁菌进行属和种(型)鉴定,采用多位点序列分型(Multiple locus sequence typing, MLST)技术对 2

株布鲁菌菌株的 19 个管家基因、1 个外膜蛋白基因及 1 个基因间区的序列进行测定,将各个等位基因的序列与 MLST 数据库中的等位基因序列进行比对,确定菌株的等位基因谱及 9 位点序列型(sequence type, ST)和 21 位点序列型,分析其与布鲁菌不同 ST 型的遗传进化关系,为北京地区布病的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 菌株培养基采用哥伦比亚血平板,购于英国 OXOID 公司,货号 PB0123A。PCR 试剂 Platinum PCR SuperMix, 购于美国 Invitrogen 公司,货号 11306-016。核酸自动电泳用卡夹(QIAxcel DNA Screening Kit)与 QX Alignment Marker 15bp/3Kb 购自德国 QIAGEN 公司,货号分别为 929004 和 929522。DL2,000bp DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,货号为 D501A。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 实验菌株 实验菌株 BJ3 与 BJ91 为分离自北京地区 2013 年和 2014 年布病患者血液的分离株。

1.3 菌株 DNA 制备 将分离菌株接种于哥伦比亚血平板,置于 37 ℃ 生化培养箱,培养 72 h 后,刮取 1~2 接种环菌苔到 150 μL 去离子水中,振荡混匀制成菌悬液。再放入数控干浴器中,于 100 ℃ 下煮沸 10 min; 12 000 r/min 离心 10 min,最后取上清液于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 BCSP31-PCR 法鉴定布鲁菌属 采用布鲁菌属特异性基因 BCSP31 作为定属基因,按照参考文献[8-9]提供的 B4 和 B5 引物序列和参数进行布鲁菌属的鉴定。

1.5 AMOS-PCR 法鉴定布鲁菌种/型 采用参考文献[10-11]提供的以布鲁菌属 IS711 插入序列为基础建立的 AMOS-PCR 引物及参数进行布鲁菌种/型的鉴定。

1.6 MLST 分型 采用参考文献[12-13]提供的布鲁菌 19 个管家基因(*gap*、*aroA*、*glk*、*dnaK*、*gyrB*、*trpE*、*cobQ*、*int-hyp*、*omp25*、*prpE*、*caiA*、*csdB*、*soxA*、*leuA*、*mviM*、*fumC*、*fbaA*、*ddlA*、*putA*、*mutL* 和 *acnA*)、1 个外膜蛋白基因(*omp25*)和 1 个基因间区 *int-hyp* 作为 MLST 的靶标基因,选取的靶标基因、引物序列及扩增长度见表 1。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,63 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。*ddlA* 基因扩增的退火温度为 55 ℃,其他条件不变。PCR 产物采用核酸自动电泳仪电泳检测,以 DL 2 000 bp DNA Marker 作为分子量标准。观察电泳结果判断 PCR 扩增是否成功。若 PCR 成功,直接将电泳检测后的样品委托生工生物工程(上海)

股份有限公司进行纯化及测序。运用 MLST 在线工具(网址 https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_brucella_seqdef&page=sequenceQuery),分别将每株菌的 21 个特殊位点的测序结果与布鲁菌 MLST 标准菌株等位基因序列进行比对,明确序列是否与某个等位基因型的序列一致,如果一致,则定义为某个等位基因型,否则定义为一个新的等位基因型,从而获得每株菌的等位基因谱(*gap*/*aroA*/*glk*/*dnaK*/*gyrB*/*trpE*/*cobQ*/*int-hyp*/*omp25*/*prpE*/*caiA*/*csdB*/*soxA*/*leuA*/*mviM*/*fumC*/*fbaA*/*ddlA*/*putA*/*mutL*/*acnA*)。将得到的等位基因谱与布鲁菌 MLST 数据库标准菌株的等位基因谱进行比对,从而确定每株菌的 ST 型。

表 1 用于扩增和测序分析的 21 对引物序列

Tab.1 21 Primer sets for amplification and sequencing

位点	推定功能	引物序列 5'-3'	长度/bp	位置
<i>gap</i>	3-磷酸甘油醛脱氢酶 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	YGCACCAAGCGCGTCATCGT GCGGGYTGGAGAAAGCCCA	589	AE017223 1685083-1685671
<i>aroA</i>	3-磷基酰亚胺 1-羧乙烯转移酶 3-phosphoshikimate-carboxyvinyltransferase	GACCATCGACGTGCCGG YCATAKGCCCATGAATT	565	AE017223 29974-30538
<i>glk</i>	葡萄糖激酶 glucokinase	TATGGAAMAGATCGGCGG GGGCCTTGTCCTCGAAGG	475 [#]	AE017224 988660-989134
<i>dnaK</i>	伴侣蛋白质 chaperone protein	CGTCTGGTCGAATATCTGG GCGTTCAATGCCGAGCGA	470	AE017223 2066742-2067211
<i>gyrB</i>	DNA 回旋酶 B 亚基 DNA gyrase B subunit	ATGATTTCATCCGATCAGGT CTGTGCCGTTGCATTGTC	469	AE017223 142378-141910
<i>trpE</i>	葸酸合成酶 anthranilate synthase	GCGCGCMTGGTATGGCG CKCSCGCCATAGGCTTC	486	AE017223 1538194-1537709
<i>omp25</i>	25 kD 外膜蛋白 25 kDa outer-membrane protein	ATGCGCACTCTTAAGTCTC GCCSAGGATGTTGTCCG	490 [#]	AE017223 710041-710530
<i>cobQ</i>	钴啉胺酸合成酶 cobyrinic acid synthase	GCGGGTTCAAATGCTTGG GGCGTCAATCATGCCAGC	422 [#]	AE017223 1289341-1288920
<i>int-hyp</i>	假定蛋白的上游 5' 端 upstream and extreme 5' of hypothetical protein	CAACTACTCTGTGACCCGA GCAGCATCATAGCGACGGA	430 [#]	AE017223 1372708-1372279
<i>prpE</i>	丙酸-辅酶 A 连接酶 propionate-CoA ligase	GGTGCTGTTCACGCTGGAA AGGTTTCGCAGGCGCGAA	468	AE017223 1687838-1688305
<i>caiA</i>	脂肪酰-辅酶 A 脱氢酶 acyl-CoA dehydrogenase	TGTGTTCGCAAGCCTTTG GGTCAAAAGACGTGCCACA	449	AE017224 633492-633940
<i>csdB</i>	半胱氨酸脱硫基酶 cysteine desulfhydrase	CGTCACCTCCTGGATCATTTC GCCACCGACGCTTATGAGAA	487	AE017223 930109-929623
<i>soxA</i>	肌氨酸氧化酶 α 亚基 sarcosine oxidase alpha subunit	CCTCGTAAAGCGCCTTCC TGTTCGATGCCTCACATTGG	486	AE017223 245488-245003
<i>leuA</i>	2-异丙基苹果酸合酶 2-isopropylmalate synthase	TCAACCGGATGAAGGAAGTC CCCTCGATAGTCTGGTGACA	482	AE017223 1534688-1534207

表 1(续)

位点	推定功能	引物序列 5'-3'	长度/bp	位置
<i>mviM</i>	葡萄糖-果糖氧化还原酶前体 glucose-fructose oxidoreductase precursor	ATCGCCCGTTCGGTGAC TGTTGCCGTCTTGTCC	447 [#]	AE017223 1990600-1990154
<i>fumC</i>	延胡索酸水合酶 C fumarate hydratase C	CGACCATGTCAATATGAGCC GATATCGTTGGCGATCTGAA	452	AE017224 180504-180055
<i>fbaA</i>	果糖-二磷酸醛缩酶 fructose-bisphosphate aldolase	CGTGAATAACCTGATCTCAC CATGCCGGTTCAAGCGAAC	458	AE017224 360206-360663
<i>ddlA</i>	D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶 A D-alanine-D-alanine ligase A	TTTCAGTGCCTCGAACAG GTTCTTCAATGATGAGATTAAA	553	AE017223 1251848-1251296
<i>putA</i>	脯氨酸脱氢酶 proline dehydrogenase	GTGGCGTGAGCCTTCG CCTGTGTGAGTACGAGCGG	527	AE017224 512957-513483
<i>mutL</i>	DNA 错配修复蛋白 DNA mismatch repair protein	ACATCCAAGCTGACCGAC TCCCGTGCGATCACATCCGA	549	AE017224 208009-207461
<i>acnA</i>	鸟头酸水合酶 aconitate hydratase	GAAGGCCGCATCCACTG GCAGCGAGGCAAGGTAAT	490	AE017223 99997-99508

注: # 不同等位基因型有不同的片段长度

1.7 聚类分析 应用 eBURST 软件将 2 株布鲁菌的 ST 型与数据库中的所有 ST 型进行聚类分析,探讨这两个 ST 型与已知 ST 型的进化关系。应用 MegAlign 软件对各 ST 型的核酸序列进行聚类分析,探讨各菌株间的进化关系。

2 结 果

2.1 BCSP31-PCR 鉴定 BCSP31-PCR 方法对分离株和对照菌株核酸进行扩增,产物采用核酸自动电泳仪电泳进行检测,结果显示两株分离菌株及阳性对照菌株核酸均扩增出布鲁菌属特异的 223 bp 的条带,而阴性对照无条带出现。

2.2 AMOS-PCR 检测结果 AMOS-PCR 方法对分离株和对照菌株核酸进行扩增,产物采用核酸自动电泳仪电泳进行检测,结果显示阳性羊种对照菌株核酸可扩增出 178 bp 的条带和羊种布鲁菌特异的 731 bp 的条带,2 株分离菌株只有 178 bp 条带,

此外无其他条带,而阴性对照无条带出现。

2.3 MLST 分型结果 2 株菌的 19 个管家基因、1 个外膜蛋白基因(*omp25*)和 1 个基因间区 *int-hyp* 的扩增片段测序结果与与布鲁菌 MLST 数据库等位基因信息比对,得到这 2 株分离株的 21 个位点(*gap/aroA/glk/dnaK/gyrB/trpE/cobQ/int-hyp/omp25/prpE/caiA/csdB/soxA/leuA/mviM/fumC/fbaA/ddlA/putA/mutL/acnA*)的等位基因序列号分别为 2、1、2、2、1、3、1、4、1、13、2、2、2、1、1、3、7、6、2、3 和 2、1、2、2、1、3、1、4、29、13、2、2、2、1、1、3、7、6、2、3(表 2,表 3)。比对结果显示,这 2 株布鲁菌的 9 位点等位基因编号和 21 位点基因编号均为新组合,即新 ST。

我们将这 2 株布鲁菌的资料及其各等位基因序列编号通过互联网录入布鲁菌 MLST 数据库,已被接收并确认为新 ST,命名为 ST74 和 ST75(9 位点 ST)与 ST108 和 ST109(21 位点 ST)。

表 2 2 株分离株的等位基因谱(9 位点 ST)

Tab.2 Allele profile of 2 isolates (9 loci ST)

分离株	ST	<i>gap</i>	<i>aroA</i>	<i>glk</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>trpE</i>	<i>cobQ</i>	<i>Int-hyp</i>	<i>omp25</i>
BJ3	ST74	2	1	2	2	1	3	1	4	1
BJ91	ST75	2	1	2	2	1	3	1	4	29

表 3 2 株分离株的等位基因谱(21 位点 ST 的其他 12 位点)

Tab.3 Allele profile of 2 isolates (addtional 12 loci of 21 loci ST)

分离株	ST	<i>prpE</i>	<i>caiA</i>	<i>csdB</i>	<i>soxA</i>	<i>leuA</i>	<i>mviM</i>	<i>fumC</i>	<i>fbaA</i>	<i>ddlA</i>	<i>putA</i>	<i>mutL</i>	<i>acnA</i>
BJ3	ST108	13	2	2	2	2	1	1	3	7	6	2	3
BJ91	ST109	13	2	2	2	2	1	1	3	7	6	2	3

2.4 聚类分析结果 聚类分析显示,迄今已发现的73个9位点MLST分型的ST型所包含的布鲁菌10个种呈现出相同种ST型菌株聚集较紧密,不同种之间遗传距离及亲缘关系较远的现象,这2株菌的9位点ST与其它几个均属于牛种布鲁菌的ST型聚在一起,与ST2高度同源,遗传关系较近,ST74与ST2只有1个等位基因`int-hyp`的差异,ST75与ST2有2个等位基因`int-hyp`、`omp25`的差异,提示ST74、ST75与ST2的亲缘关系较近,ST2可暂定为1个可行度较高的始祖ST型(图1)。运用MegAlign软件(By ClustalW Method)对各ST型9个位点的核酸序列进行聚类分析,结果显示ST74、ST75型与属于牛种布鲁菌的其他18个ST型聚在一起(图2),对各ST型21个位点的核酸序列进行聚类分析,结果显示ST108、ST109型与属于牛种布

鲁菌的其他30个ST型聚在一起(图3),提示这2株菌为牛种布鲁菌,与AMOS-PCR结果吻合。

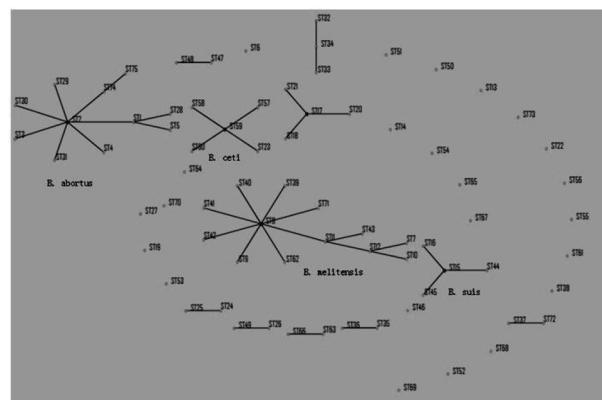


图1 2种新ST型与已知布鲁菌ST型的eBURST分析结果

Fig.1 eBURST analysis of 2 novel STs and the known STs

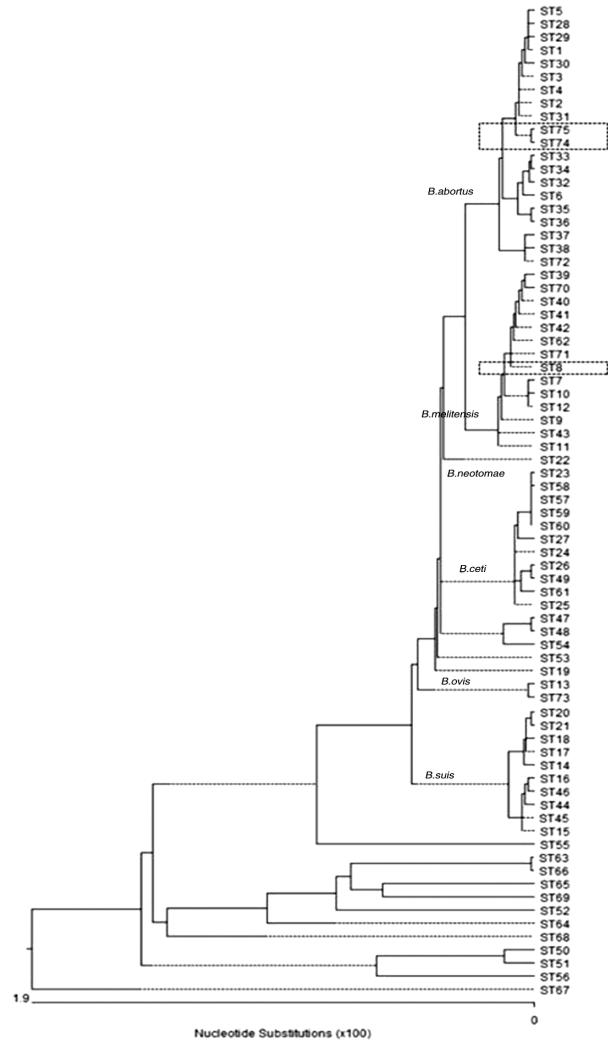


图2 2种新ST型与已知布鲁菌ST型间的进化关系(9位点ST)

Fig.2 Phylogenetic tree of 2 novel STs and the known STs (9 loci ST)



图3 2种新ST型与已知布鲁菌ST型间的进化关系(21位点ST)

Fig.3 Phylogenetic tree of 2 novel STs and the known STs (21 loci ST)

3 讨 论

1985年WHO根据在细菌培养过程中的生化以及噬菌体裂解和血清凝集特性,将布鲁菌分为羊种布鲁菌、牛种布鲁菌、猪种布鲁菌、绵羊附睾种布鲁菌、沙林鼠种布鲁菌和犬种布鲁菌共6个种19个生物型,此为布鲁菌的经典分型。之后又陆续发现了4种新型布鲁菌。目前认为,布鲁菌有10个种,它们分别为马耳他布鲁菌(羊种布鲁菌*B. melitensis*,3个生物型)、流产布鲁菌(牛种布鲁菌*B. abortus*,8个生物型)、猪种布鲁菌(*B. suis*,5个生物型)、绵羊附睾种布鲁菌(*B. ovis*,1个生物型)、沙林鼠种布鲁菌(*B. eotomae*,1个生物型)、犬种布鲁菌(*B. canis*,1个生物型),从海洋哺乳动物如海豹、鲸、海豚等中分离出的鲸型布鲁菌(*B. ceti*)^[14]和鳍型布鲁菌(*B. pinnipedialis*)^[15],从野鼠中分离出的田鼠型布鲁菌(*B. microti*)^[16],在人乳房植入体中发现的湖浪布鲁菌(*B. inopinata*)^[17]。其中4个种(羊种*B. melitensis*,牛种*B. abortus*,猪种*B. suis*和犬种*B. canis*)对人致病,致病作用大小顺序一般是羊种大于牛种、猪种,大于犬种。布鲁菌因其生物种、型和菌株的不同,致病力各异,对人致病力最强的为羊种菌,其次为猪种菌,牛种菌对人致病力弱,但亦时有病例发生。因此,了解布病病原学特征对布病的有效预防和控制至关重要。本研究将来源于患者的2株菌株采用属特异性BCSP31-PCR进行鉴定,结果显示这两株分离的可疑菌株均为布鲁菌。AMOS-PCR结果只有178 bp条带而无其他大小的目的条带出现,提示分离菌株为非羊种、非牛种1、2、4型、非猪种1型、非绵羊附睾种布鲁菌。

传统血清学方法鉴定只能将布鲁菌鉴定到种(型),无法对菌株进行溯源分析。随着分子生物学的发展,一些分子分型方法不断出现,如PCR产物限制性片段长度多态性(PCR-RFIP)、随机扩增多态性DNA(RAP-PCR)、扩增片断长度多态性分析(AFLP)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)、多位点可变数目串联重复序列分析(multi-locus variable-Humber tandem repeat analysis,MLVA-16)技术和多位点序列分型(multi-locus sequence typing,MLST)技术等,但是PCR-RFIP、RAP-PCR和AFLP分辨率较低,在分子流行病学中应用价值十分有限。由于布鲁菌属种间DNA同源性高达90%,需要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。PFGE、MLVA和MLST在布病的病原鉴定、传染源追踪与病原体的溯源等方面发挥了重要作用。但

PFGE实验过程中活菌操作繁多,实验室感染风险较大。相比MLVA-16,MLST在反映菌株遗传特征方面更加敏感^[18],分辨率高,重复性好,数据可实现网络共享,不同的实验室之间具有良好的可比性^[19]。2007年Whatmore等^[12]根据7个管家基因、1个外膜蛋白基因及1个基因间区设计引物,对160株布鲁菌进行MLST分析,试验将160株布氏菌分为27个序列型。为了提高分辨率,Whatmore^[13]等又新增了12个靶标基因,加上之前的9个特殊位点,形成了BruMLSA21分型方案。对收集自全球的500多株布鲁菌进行MLST分析,结果分了101个序列型。此后不断有新的ST型被发现,数据库不断丰富,目前9位点序列型有73个ST型,21位点序列型有107个ST型。因此,本研究中我们采用布鲁菌MLST分子分型方法对2013年和2014年分离自北京地区布病患者的2株菌株进行分子分型分析并与已发现的ST型进行比对,结果发现2株菌株的等位基因谱与目前已有的ST型的等位基因谱不完全一致,为新的ST型。

MLST数据库(<https://pubmlst.org/brucella/>)是国际上公认的登载布鲁菌序列分型信息的重要数据库,注册登录后将发现的2种新ST型菌株的等位基因谱信息提交,被接受并予以命名,现该库关于*Brucella*的9位点ST更新为75种,21位点ST更新为109种。本研究中2株菌的ST分别被命名为ST74、ST75(9位点MLST)和ST108、ST109(21位点MLST)。ST74与ST2只有1个等位基因int-hyp的差异,ST75与ST2有2个等位基因int-hyp、omp25的差异,见表2。为了进一步分析新发现的ST型,利用eBURST工具分析目前布鲁菌数据库中所有的73个ST型和新发现的ST型,并绘制出各ST型之间的关系图。eBURST(Based Upon Related Sequence Type)是一种基于相关序列型的聚类分析方法。根据细菌的所有序列型的等位基因谱将细菌分为不同的组(group),计算每个序列型的单位点变异型SLV(Single Locus Variants)个数、双位点变异型DLV(Double Locus Variants)个数,鉴定可能的祖先序列型等。当2个ST型之间只有1个等位基因数字不同时,这2个ST型互为单位点变异型SLV;如果有2个等位基因数字不同,这2个ST型则互为双位点变异型DLV^[20]。互为单位点变异型的序列型构成一组,若该组有足够的ST型且其中的1个ST拥有最多数量的SLV,该ST型则可以暂定为1个可行度较高的始祖ST型。eBURST分析显示(图1):迄今

已发现的 73 个 ST 型所包含的布鲁菌 10 个种呈现出相同种菌株的 ST 型聚集较紧密, 而不同种之间遗传距离及亲缘关系较远的现象; 以 ST2、ST8、ST15、ST17、ST59 各自为中心聚集在一起的 ST 型的亲缘关系较近, 这样的菌株称为克隆群(或称克隆复合体 clonal complexes), 分别为牛种、羊种、猪种、猪种和鲸型。ST74、ST75、ST108、ST109 与其它几个均属于牛种布鲁菌的 ST 型聚在一起, 与 ST2 高度同源, 遗传关系较近, 从遗传学水平证实了这 2 株布鲁菌为两种新 ST 型牛种布鲁菌。ST2 可暂定为 1 个可行度较高的始祖 ST 型。运用 MegAlign 软件(By Clustal W Method)对各 ST 型 9 个位点的核酸序列进行聚类分析, 探讨不同 ST 型间的进化关系。结果显示(图 2): 羊种布鲁菌几乎所有的 ST 型(除 ST70 以外)均处于同一个进化分支上, 表现的高度集中, 说明羊种布鲁菌是一种高度保守的布鲁菌, 不同 ST 型间变异少, 而国内发现最多羊种 ST 型为 ST8^[21-22]。新发现的 ST74、ST75 型与 ST2 型遗传关系很近, 处于同一个进化层次。ST74、75 型与属于牛种布鲁菌的其他 18 个 ST 型聚在一起, 21 位点 ST 型的进化树分析显示 ST108、109 型与属于牛种布鲁菌的其他 30 个 ST 型聚在一起(图 3), 提示这 2 株分离株为牛种布鲁菌, 与 AMOS-PCR 结果吻合。

近年来我国布病再度流行, 防控形势依然严峻。2000 年以后, 北京市布病疫情与全国一样, 报告病例数呈逐年上升, 并由高危人群并向普通人群扩散。此外, 畜间疫情频发, 并有局部暴发^[7], 防控形势非常严峻。本研究结果显示 MLST 分型具有较好的分辨率, 能够与其它方法互为补充, 对布病的感染溯源具有重要作用, 研究结果不仅充实了布鲁菌 MLST 数据库, 也为北京地区布病的防控提供了科学依据, 在保护人群健康和保障畜牧业发展方面具有重要意义。

参 考 文 献:

- [1] Doganay GD, Doganay M. *Brucella* as a potential agent of bioterrorism[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2013, 8(1): 27-33. DOI: 10.2174/1574891X11308010006
- [2] Troy SB, Rickman LS, Davis CE. Brucellosis in San Diego: epidemiology and species-related differences in acute clinical presentations[J]. Medicine (Baltimore), 2005, 84(3): 174-187.
- [3] Hasanjani Roushan MR, Ebrahimpour S. Human brucellosis: An overview[J]. Caspian J Intern Med, 2015, 6(1): 46-47. DOI: 10.1097/01.md.0000165659.20988.25
- [4] Franco MP, Mulder M, Gilman RH, et al. Human brucellosis [J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(12): 775-786. DOI: 10.1016/j.lid.2007.09.012
- [5] Bellamy RJ, Freedman AR. Bioterrorism[J]. Qjm, 2001, 94(4): 227-234.
- [6] Santis RD, Ciammaruconi A, Pomponi A, et al. *Brucella*: Molecular diagnostic techniques in response to bioterrorism threat [J]. J Biotech Biodef, 2011, S2: 004. DOI: 10.4172/2157-2526.S2-004
- [7] 李锡太, 何战英, 陈艳伟, 等. 运用集中度与圆形分布法分析北京市布鲁氏菌病时间分布特征[J]. 公共卫生与预防医学, 2016, 27(1): 20-23.
- [8] Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification[J]. J Trop Med Hyg, 1992, 95(4): 271-275.
- [9] Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, et al. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of brucellosis from Zanjan, Iran[J]. Braz J Microbiol, 2014, 45(2): 533-538.
- [10] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(11): 2660-2666.
- [11] Kang YX, Li XM, Piao DR, et al. Typing discrepancy between phenotypic and molecular characterization revealing an emerging biovar 9 variant of smooth phage-resistant *B. abortus* strain 8416 in China[J]. Front Microbiol, 2015, 6(514): 1375. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01375
- [12] Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing [J]. BMC Microbiol, 2007, 7(1): 34. DOI: 10.1186/1471-2180-7-34
- [13] Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, et al. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049
- [14] Foster JT, Okinaka RT, Svensson R, et al. Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 296-301. DOI: 10.1128/JCM.01496-07
- [15] 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(Pt 11): 2688-2693. DOI: 10.1099/ijss.0.65269-0
- [16] 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(Pt 2): 375-382. DOI: 10.1099/ijss.0.65356-0
- [17] 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(Pt 4): 801-808. DOI: 10.1099/ijss.0.011148-0