

旋毛虫 5'-nucleotidase 基因特征与克隆表达

廖成水^{1,3},王晓利²,杜付玉¹,郁川¹,余祖华¹,张春杰¹,李银聚¹,吴庭才¹,刘明远³,程相朝¹

摘要:目的 研究旋毛虫 5'-nucleotidase 基因的序列结构特征及其蛋白克隆表达。方法 从旋毛虫获得 5'-nucleotidase 基因的序列,利用生物信息学方法进行系统性分析,并进行原核表达。结果 旋毛虫 5'-nucleotidase 基因大小为 1 653 bp,编码 550 个氨基酸,119 个氨基酸残基组成,理论相对分子质量(Mr)为 62 kD,分子式为 C₂₈₀₀H₄₃₅₈N₇₄₂O₈₀₃S₂₃,等电点为 6.13,属于稳定存在的亲水蛋白质。该蛋白含有 21 个氨基酸组成的信号肽,同时具有跨膜区域,此外还含有 3 个 N-糖基化位点、2 个 O-糖基化位点、20 个磷酸化位点、28 个 B 细胞线性结合位点和 13 个 T 细胞结合位点。二级结构中,α-螺旋占 43.27%(238 个),伸展链占 22.73%(125 个),β-折叠占 7.82%(43 个),无规则卷曲占 26.18%(144 个)。SDS-PAGE 显示,5'-nucleotidase 基因在原核表达系统中呈可溶性形式表达,重组蛋白大小约为 74 kD。结论 成功克隆了旋毛虫 5'-nucleotidase 基因,对其进行序列分析和原核表达,为进一步探究 5'-nucleotidase 蛋白在旋毛虫感染过程中的作用奠定基础。

关键词:旋毛虫;5'-nucleotidase;克隆;原核表达;生物信息学

中图分类号:S855.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)11-0971-05

Sequence characterization and expression of *Trichinella spiralis* 5'-nucleotidase gene

LIAO Cheng-shui^{1,3}, WANG Xiao-li², DU Fu-yu¹, YU Chuan¹, YU Zu-hua¹, ZHANG Chun-jie¹, LI Yin-ju¹, WU Ting-cai¹, LIU Ming-yuan³, CHENG Xiang-chao¹

(1. College of Animal Science and Technology /Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
2. Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
3. Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: We aimed to study the sequence structure and cloning and expression of 5'-nucleotidase gene from *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*). The sequence of 5'-nucleotidase gene was obtained from *T. spiralis*, analyzed systematically by bioinformatics method, and expressed in prokaryotic expression system and purified. Sequencing analysis showed that the size of 5'-nucleotidase gene was 1 653 bp. The gene encoded a protein of 550 amino acids. The protein was composed of 119 amino acid residues and the molecular formula was C₂₈₀₀H₄₃₅₈N₇₄₂O₈₀₃S₂₃. 5'-nucleotidase was a stable hydrophilic protein with a predicted molecular mass (Mr) of 62 kD and theoretical pI of 6.13. The protein has signal peptides and a transmembrane region. A total of 3 N-glycosylation sites, 2 O-glycosylation sites, 20 phosphorylation sites, 28 B cells linear binding sites, and 13 T cell binding sites were predicted in 5'-nucleotidase. In the secondary structure, α-helix accounted for 43.27% (238), extension chain accounted for 22.73% (125), β-sheet accounted for 7.82% accounted for 26.18% (144). SDS-PAGE analysis showed that the 5'-nucleotidase gene could be successfully expressed in prokaryotic expression system. The soluble expression products with about 74 kD were purified by Ni-NTA affinity chromatography. In this study, the 5'-nucleotidase gene from *T. spiralis* was successfully cloned and analyzed and highly expressed in *E. coli*. The results laid the foundation for the further study on the role of 5'-nucleotidase of development infection in *T. spiralis*.

国家自然科学基金面上项目(No.31572489),河南科技大学博士启动基金项目(No.13480071),河南省高等学校重点科研项目计划(No.17A230009),河南省科技攻关项目(No.182102110061)资助

通讯作者:程相朝,Email:chengxch@126.com

作者单位:1. 河南科技大学动物科技学院,洛阳市活载体生物材料

与动物疫病防控重点实验室,洛阳 471023;

2. 河南科技大学医学院,洛阳 471023;

3. 吉林大学人兽共患病研究所,人兽共患病研究教育部重点实验室,长春 130062

Keywords: *Trichinella spiralis*; 5'-nucleotidase; clone; prokaryotic expression; bioinformatics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31572489), the PhD Start-up Fund of Henan University of Science and Technology (No.13480071), the Key Project of Henan Province for Scientific Research Higher Education of China Colleges and Universities (No.17A230009), and the Henan Science and Technology Key Project (No.182102110061)
Corresponding author: Cheng Xiang-chao, Email: chengxch@126.com

旋毛虫是一种重要的人兽共患胞内寄生虫,寄生于宿主骨骼肌细胞,目前旋毛虫具有9个种和3个基因型12个物种^[1]。一旦摄入含有旋毛虫幼虫的动物肉后,肌肉幼虫通过消化酶从包囊释放到胃中,进入肠道后发育为感染性幼虫^[2]。1835年Page和Owen在实验中首次分离旋毛虫^[3],随后大量研究发现旋毛虫幼虫入侵机体不是简单的机械性渗透的结果^[4-5],并且认为排泄/分泌产物在旋毛虫发育、侵袭和寄生过程中起着重要作用^[6]。

核酸酶广泛存在于微生物,主要参与营养代谢、遗传物质的复制、重组和修复机制以及与微生物感染、免疫有关^[7]。旋毛虫基因组中拥有125种庞大的DNase II家族蛋白,并且一半以上属于编码排泄/分泌产物^[8],但DNase II家族蛋白在旋毛虫的识别和侵入过程中起的关键作用仍未得到很好阐述。Wang等研究发现旋毛虫体外感染肠上皮细胞时可产生5'-nucleotidase蛋白^[9]。5'-nucleotidase是一个核苷酸代谢酶,催化核苷5'-二磷酸酯的水解中生成5'-单磷酸核苷^[10]。许多寄生虫可分泌5'-nucleotidase,但目前有关旋毛虫5'-nucleotidase基因及蛋白的研究报道较少。为此,本研究对旋毛虫5'-nucleotidase基因进行克隆,并进行了原核表达,为进一步5'-nucleotidase在旋毛虫感染过程中的作用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物、质粒、菌株和虫种 Wistar大鼠(200.0±20.0 g)购自吉林大学白求恩医学院动物实验中心;中国河南猪旋毛虫分离株 *Trichinella spiralis* (genotype T1),国际标准虫种编号为ISS534,由本室大鼠传代保种;pUC18和pET-32a购自宝生物工程(大连)有限公司,由本实验常规保存;大肠杆菌DH5 α 和大肠杆菌Rosetta购自德国Novagen公司,由本实验常规冻存。

1.2 主要试剂 胰蛋白胨和酵母浸出物购自英国OXOID公司;Taq PCR Master Mix(2x, blue dye) DNA Marker、Bam HI、Hind III、RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、T4连接酶和His标签镍柱亲和层析蛋白纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒小量提取试剂盒购于北京康为世纪生物科

技有限公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自Sigma公司。AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成 根据GenBank旋毛虫5'-nucleotidase基因序列(登录号AY127571.1),设计PCR引物:F: 5'-GGATCCTTACAGTTAACAC-TAATTCAAC-3'(下划线处为Bam H I酶切位点); R: 5'-AAGCTTCAAACGAAGGTGAT-GCGAT-3'(下划线处为Hind III酶切位点)^[11]。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 旋毛虫5'-nucleotidase基因的克隆与鉴定 常规方法收集旋毛虫肌幼虫虫体,根据Trizol试剂盒的方法得到旋毛虫总RNA。根据RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0试剂盒的方法得到cDNA。以旋毛虫cDNA为模板,常规PCR扩增获得*plancitox-in-1*基因,反应程序如下:95℃4 min;95℃1 min,55℃45 s,72℃100 s,30个循环;72℃延伸10 min,目的基因连接至克隆载体pUC18,然后转化于感受态细胞DH5 α 中,PCR和酶切鉴定后进行序列测定。

1.5 同源性分析 收集20余种不同物种的5'-nucleotidase类似物氨基酸序列,搜集90余种不同血清型的5'-nucleotidase及其类似物氨基酸序列。MEGA7.0用于分析旋毛虫5'-nucleotidase蛋白与其他90多个不同血清型的5'-nucleotidase家族蛋白的相似性。

1.6 在线网站分析5'-nucleotidase蛋白理化性质 <http://web.expasy.org/protparam/>分析蛋白分子量大小、理论等电点和氨基酸组成。<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/calcor.html>和<http://biotech.ou.edu/>分别用于分析稀有密码子和重组蛋白的可溶性。<http://web.expasy.org/protscale/>分析蛋白的亲水性与疏水性。

1.7 在线网站预测5'-nucleotidase蛋白结构 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>预测保守区域。在线软件TMHMM program、NetNGlyc、SignalP、NetOGlyc和NetPho分别预测跨膜区、N-糖基化位点、信号肽、O-糖基化位点和磷酸化位点。<https://www.predictprotein.org>

org/# 分析二硫键数量。<http://tools.immuneepitope.org/bcell/> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/> 预测线性 B 细胞抗原表位和 T 细胞结合位点。https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html 和 <https://swissmodel.expasy.org/> 分析预测二级结构和三级结构。

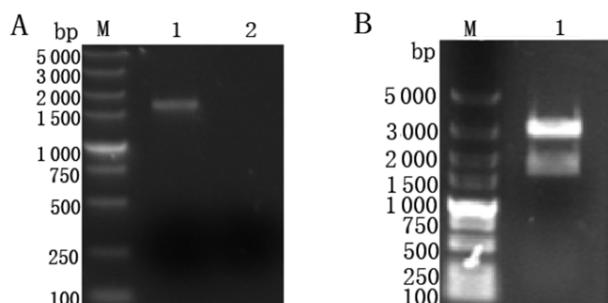
1.8 原核表达载体的构建与鉴定 将正确的重组质粒 pUC18-5'-nucleotidase 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后连接至表达载体 pET-32a 构建原核表达载体 pET-32a-5'-nucleotidase, 然后转化至大肠杆菌 Rosetta。

1.9 重组菌的蛋白表达与纯化 终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 对大肠杆菌 Rosetta(pET-32a-5'-nucleotidase) 进行诱导表达, 采用镍柱亲和层析蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 旋毛虫 5'-nucleotidase 基因的克隆与鉴定

PCR 结果显示扩增到了约 1 653 bp 的条带(图 1A), 与预期的 5'-nucleotidase 大小一致。限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 对重组质粒(pUC18-5'-nucleotidase) 双酶切鉴定, 结果显示出现约 2 686 bp 的载体条带和约 1 653 bp 的目的条带(图 1B)。测序结果与 GenBank 中 AY127571.1 的 5'-nucleotidase 基因的同源性为 100%。



A: PCR amplification of 5'-nucleotidase gene. M: DL5000 DNA Marker; 1: PCR products of 5'-nucleotidase; 2: Negative control; B: Identification of double enzyme for pUC18-5'-nucleotidase. M: DL5000 DNA Marker; 1: Products of pUC18-5'-nucleotidase digested with BamH I + Hind III

图 1 旋毛虫 5'-nucleotidase 基因的克隆与鉴定

Fig.1 Amplification and identification of 5'-nucleotidase gene from *T. spiralis*

2.2 5'-nucleotidase 蛋白的同源性分析 5'-nucleotidase 的氨基酸序列与其他物种的 5'-nucleotidase

蛋白及其类似物的同源性比较低, 与已报道的斑马拟丽鱼、根瘤菌、刺尾蝎属、柱头虫、赤拟谷盗等 5'-nucleotidase 蛋白类似物的同源性集中于 29.76%~34.44%, 与纯绿蜱属具有 39.36% 的同源性, 遗传进化关系上被分在一个进化支(图 2)。整体上看, 旋毛虫 5'-nucleotidase 与纯绿蜱属亲缘关系较近。但是 5'-nucleotidase 基因与 GenBank 中已报道的斑马拟丽鱼、水螅、刺尾蝎属、柱头虫、赤拟谷盗等的核苷酸同源性集中在 65%~72%, 与果蝇属的核苷酸同源性为 79%。

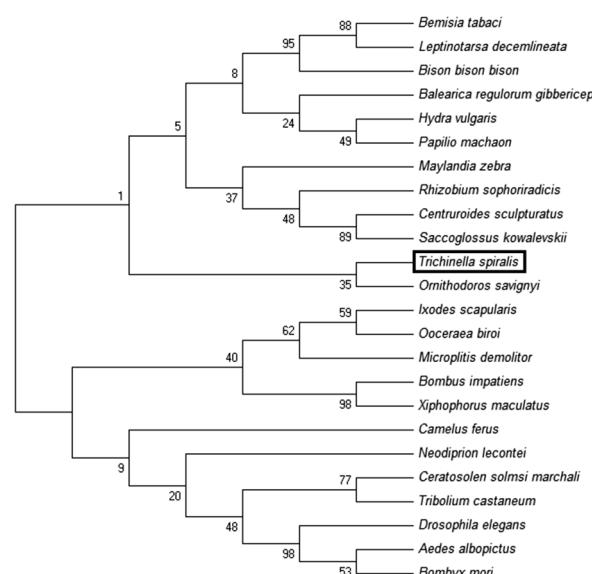


图 2 旋毛虫 5'-nucleotidase 与其他物种 5'-nucleotidase 蛋白的遗传进化树分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of 5'-nucleotidase from *T. spiralis* and other previously reported

旋毛虫 5'-nucleotidase 的氨基酸序列与旋毛虫的其他血清型 XP-003380309.1 和 AAM97494.1 的同源性分别达到 100% 和 96%。旋毛虫 5'-nucleotidase 基因的核苷酸序列与旋毛虫的其他血清型 XP-003380309.1 和 AAM97494.1 的核苷酸序列的同源性也分别达到 100% 和 95%。5'-nucleotidase 与 KRY37020.1、XP-003380308.1、KRY26807.1、KRY26803.1 等分在一个进化树大分支上。

2.3 5'-nucleotidase 蛋白理化性质的分析 在线软件分析显示 5'-nucleotidase 的氨基酸数为 550, 分子式为 $C_{2800} H_{4358} N_{742} O_{803} S_{23}$, 理论分子质量和等电点(pI)为 62 kD 和 6.13, 119 个氨基酸残基, 带负电荷残基总数(Asp+Glu)为 63 个; 正电荷残基总数(Arg+Lys)为 56 个。非极性氨基酸占 44.4%, 极性不带电荷氨基酸占 31.3%, 极性带负电荷氨基酸

占 11.4%，极性带正电荷氨基酸占 12.9%。其消光系数($M^{-1} \text{cm}^{-1} = 280 \text{ nm}$)为 77 280，不稳定指数(II)为 33.45(<40)，属于稳定类蛋白质，在体外哺乳动物网织红细胞的半衰期是 30 h。疏水指数为 93.80。该序列含有 56 个稀有密码子，其中有 5 处连续出现稀有密码子，在大肠杆菌中呈可溶性表达。该蛋白在 11 位氨基酸分值最高(2.467)，有最强的疏水性；在 72 位氨基酸分值最低(-2.833)，有最强的亲水性。

2.4 5'-nucleotidase 蛋白结构的分析 保守结构域分析显示，5'-nucleotidase 蛋白的保守结构域在 24-304 和 332-512 位氨基酸之间。5'-nucleotidase 在 N404VT、N461LS 和 N522FT 共有 3 个 N-糖基化

位点。在 G47 和 G535 共有 2 个 O-糖基化位点。 $5'$ -nucleotidase 共存在 20 个磷酸化位点，分别为 9 个 Ser、6 个 Thr 和 5 个 Tyr，潜力值均大于 0.5。另外，该蛋白前 21 个氨基酸为信号肽，有跨膜区域，是跨膜蛋白。而且该蛋白含有 28 个 B 细胞线性结合位点和 13 个 T 细胞结合位点。二级结构预测结果显示，该蛋白的二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成，其中 α -螺旋占 43.27%(238 个)，伸展链占 22.73%(125 个)， β -折叠占 7.82%(43 个)，无规则卷曲占 26.18%(144 个)。 $5'$ -nucleotidase 没有二硫键(图 3)。三级结构预测发现，5'-nucleotidase 蛋白序列与 PDB 数据库中 5eqv.1.A 模板序列相似性为 31.19%(图 4)。

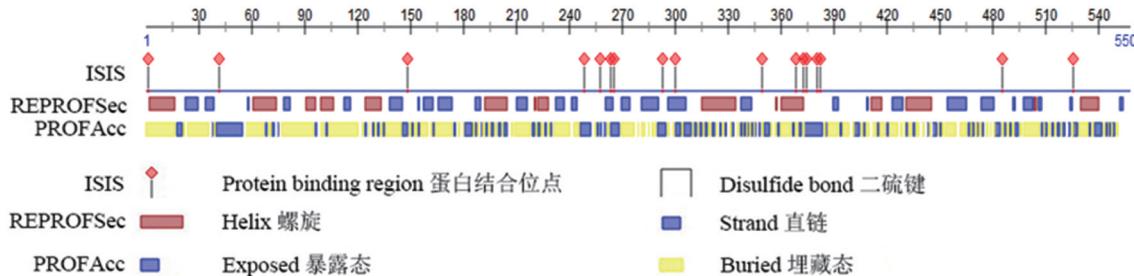


图 3 5'-nucleotidase 蛋白二级结构分析

Fig.3 Predicted secondary structure of 5'-nucleotidase protein

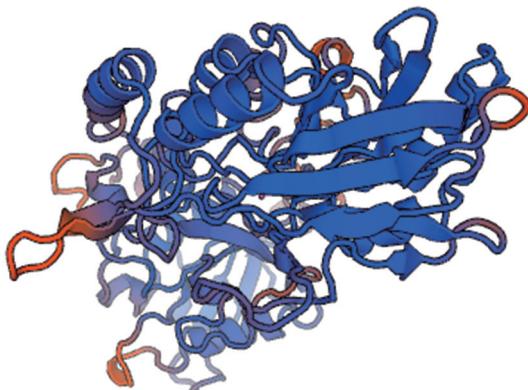
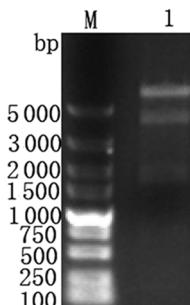


图 4 5'-nucleotidase 三维结构同源模型

Fig.4 Three-dimensinal model of 5'-nucleotidase

2.5 pET-32a-5'-nucleotidase 重组质粒的构建与鉴定 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 对重组质粒 pET-32a-5'-nucleotidase 进行双酶切鉴定，结果显示出现约 6 000 bp 的载体条带和约 1 653 bp 的目的条带，与预期结果相符，说明原核表达载体构建成功(图 5)。

2.6 pET-32a-5'-nucleotidase 的诱导表达分析 SDS-PAGE 分析结果显示，在约 74 kD 处出现目的条带，而且发现该蛋白主要存在于菌体超声后的上



M: DL5000 DNA Marker; 1: Products from pET-32a-5'-nucleotidase digested with *Bam*H I + *Hind* III

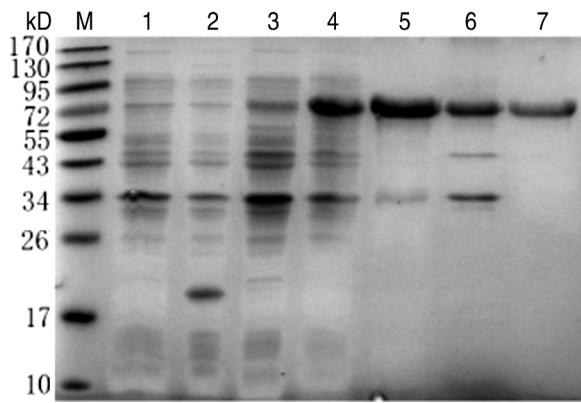
图 5 pET-32a-5'-nucleotidase 的酶切鉴定

Fig.5 Identification of double enzyme for pET-32a-5'-nucleotidase

清中，说明该蛋白是可溶性蛋白，将超声后的蛋白经镍柱亲和层析纯化后获得纯化的蛋白，经 SDS-PAGE 结果显示可见较纯的目的条带(图 6)。

3 讨 论

旋毛虫病临床诊断方面最大的困扰是其临床表现无特异性，患者患病期间发热、腹泻等症状时有发生，重症患者可引发心肌炎、肺炎及脑炎等^[12]。目



M: Protein Marker; 1: Rosetta (pET-32a) without IPTG induction; 2: Rosetta (pET-32a) with IPTG induction; 3: Rosetta (pET-32a-5'-nucleotidase) without IPTG induction; 4: Rosetta (pET-32a-5'-nucleotidase) with IPTG induction; 5: Rosetta (pET-32a-5'-nucleotidase) precipitate of bacteria with IPTG induction; 6: Rosetta (pET-32a-5'-nucleotidase) supernatant of bacteria with IPTG induction; 7: Purified protein

图 6 蛋白原核表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression products

前,动物屠宰前旋毛虫的检测也被认为是阻断人类旋毛虫感染的有效方法之一,世界动物卫生组织(OIE)严格规定对进出口屠宰动物必须进行旋毛虫病检验^[13]。旋毛虫引发机体感染后,肠道区域嗜酸性粒细胞等大量增加,在病灶区聚集并表现出浸润现象,但肠黏膜并未出现炎性反应^[14]。5'-nucleotidase 是一种作用于腺苷(次黄苷)-5'-磷酸的核酸酶,首次在心脏和骨骼的肌肉中发现,它能催化核糖与脱氧核糖部分的核苷酸分子 5'-C 端的磷酸盐酯化水解^[15]。Cuttell 等对侵入机体的旋毛虫的分泌蛋白进行了 PCR 定量检测,发现 5'-nucleotidase 参与分解核苷酸^[16],但是目前对于旋毛虫 5'-nucleotidase 基因特征及功能的相关研究尚未见报道。

本研究利用多种生物信息学在线软件对旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白结构及其理化性质进行了预测和分析。旋毛虫 5'-nucleotidase 基因在同一物种属内差异较小,在不同物种之间的差异性比较大。该蛋白含有 28 个 B 细胞线性结合位点和 13 个 T 细胞结合位点。糖基化位点预测结果显示,旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白含有 3 个 N-糖基化位点和 2 个 O-糖基化位点,这些糖基化位点的存在对蛋白质的功能的调节起着重要的作用。信号肽预测结果显示,旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白含有信号肽,属于分泌性蛋白。二级结构分析结果显示,旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白的二级结构存在大量的 α -螺旋和无规则卷曲,这表明此蛋白质属于稳定类蛋白质。对

旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白质序列模序进行在线预测,发现旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白含 20 个潜在磷酸化修饰位点。旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白磷酸化位点的存在与细胞内信号传导和蛋白定位等过程关系密切,但旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白的磷酸化位点是否与细胞内信号传导及蛋白定位等过程有关目前尚未确切研究。

本研究成功克隆了旋毛虫 5'-nucleotidase 基因,并对其序列特征进行了分析,同时构建了旋毛虫 5'-nucleotidase 的原核表达质粒,在大肠杆菌 Rosetta 中呈可溶性表达。为深入探究旋毛虫 5'-nucleotidase 蛋白的功能及在旋毛虫感染宿主中的作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 张珊珊,张莉,李海龙,等.旋毛虫种属分布研究进展[J].动物医学进展,2016,37(4):82-86.DOI:10.3969/j.issn.1007-5038.2016.04.018
- [2] Kang SA,Min KC,Park MK,et al.Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection[J].Vet Parasitol,2012,186(3/4):319-327.DOI:10.1016/j.vetpar.2011.12.002
- [3] Bien J,Cabaj W,Moskwa B.Proteomic analysis of potential immunoreactive proteins from muscle larvae and adult worms of *Trichinella spiralis* in experimentally infected pigs [J].Folia Parasit,2015,62(1):22-22.DOI:10.14411/fp.2015.022
- [4] Liu RD,Wang ZQ,Wang L,et al.Analysis of differentially expressed genes of *Trichinella spiralis*,larvae activated by bile and cultured with intestinal epithelial cells using real-time PCR [J].Parasitol Res,2013,112 (12): 4113-4120.DOI: 10.1007/s00436-013-3602-1
- [5] Ren HJ,Cui J,Yang W,et al.Identification of differentially expressed genes of *Trichinella spiralis* larvae after exposure to host intestine milieu[J].Plos One,2013,8(6):e67570.DOI:10.1371/journal.pone.0067570
- [6] 王艳凤,王楠,丁静,等.旋毛虫肌幼虫排泄分泌物激活的巨噬细胞和成肌细胞共培养对成肌细胞分化的影响[J].中国人兽共患病学报,2014,30 (9): 893-897.DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.09.004
- [7] Liu J,Sun L,Liu W,et al.A nuclease from *Streptococcus mutans* facilitates biofilm dispersal and escape from killing by neutrophil extracellular traps[J].Front Cell Infect Mi,2017,7:97.DOI:10.3389/fcimb.2017.00097
- [8] Mitreva M,Jasmer DP,Zarlinga DS,et al.The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*[J].Nat Genet,2011,43(3):228-235.DOI:10.1038/ng.769
- [9] Wang L,Wang ZQ,Cui J.Proteomic analysis of the changed proteins of *Trichinella spiralis* infective larvae after co-culture in vitro with intestinal epithelial cells[J].Vet Parasitol,2013,194(2/4):160-163.DOI:10.1038/ng.769
- [10] Wang L,Wang ZQ,Cui J.Protein changes in *Trichinella spiralis*

- lis*, muscle larvae in vitro induced by bovine bile[J]. Vet Parasitol, 2013, 194(2/4): 164-167. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.01.046
- [11] Gounaris K, Selkirk ME, Sadeghi SJ. A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 136(2): 257-264. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2004.04.008
- [12] 翟铖铖, 陈家旭, 陈韶红, 等. 全球人体旋毛虫病的暴发情况分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(11): 1018-1023. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.11.013
- [13] 文慧, 胡晨曦, 王李昂, 等. 旋毛虫肌幼虫排泄分泌抗原诊断早期旋毛虫病的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(12): 1058-1063. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.012.004
- [14] Ding J, Bai X, Wang X, et al. Immune cell responses and cyto-
- kine profile in intestines of mice infected with *Trichinella spiralis* [J]. Front Microbiol. 2017, 8: 2069. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02069
- [15] Salazar-Gonzalez RM, Srinivasan A, Griffin A, et al. *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo[J]. J Immunol, 2007, 179(9): 6169-6175. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6169
- [16] Cuttell L, Corley SW, Gray CP, et al. Real-time PCR as a surveillance tool for the detection of *Trichinella* infection in muscle samples from wildlife[J]. Vet Parasitol, 2012, 188(3/4): 285-293. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.054

收稿日期:2018-02-06 编辑:王晓欢

(上接第 970 页)

参考文献:

- [1] 林德贵. 我国宠物业现状、机遇与挑战[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(11): 13-16. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.11.12.004
- [2] 颜卫, 赵莎莎, 刘静, 等. 江苏省泰州地区宠物重要人兽共患细菌病流行现状[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 198-200. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.064
- [3] 曹兴元. 兽药残留和动物源细菌耐药性现状及应对措施[J]. 兽医导刊, 2017, 12; 14-15.
- [4] 曲志娜. 养殖场动物源细菌耐药性监测与风险控制[J]. 兽医导刊, 2017, 7: 10-12.
- [5] 李德强, 李明月, 刘静, 等. 2004—2013 年全国布鲁氏菌病发病重心迁移轨迹研究[J]. 中国卫生统计, 2016, 33(6): 967-968.
- [6] 施玉静, 赖圣杰, 陈秋兰, 等. 我国南北方 2015—2016 年人间布鲁氏菌病流行特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(4): 435-440. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.04.005
- [7] 邵靓, 陈斌, 裴超信, 等. 2016 年四川省猪链球菌 2 型感染的血清流行病学调查[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(4): 103-105.
- [8] WHO. Weekly bulletins on outbreaks and other emergencies [EB/OL]. (2018-01-05) [2018-02-27]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259809/1/OEW1-2018.pdf>.
- [9] 刘凤岐, 王大力, 王季秋, 等. 全国布氏菌病干预试点县布氏菌病经济损失调查[J]. 中国地方病防治杂志, 2008, 23(6): 424-425.

DOI: 10.3969/j.issn.1001-1889.2008.06.008

- [10] 连凯, 谈卫军, 赵丹, 等. 2002—2012 年人和动物李斯特菌感染报告数据流行病学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(10): 1033-1038. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.10.010
- [11] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 882-889. DOI: 10.1086/650733
- [12] 杨晋川, 夏杨, 郭惠, 等. 一起由肠炎沙门菌所致食源性疾病暴发疫情的病原学研究[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(2): 160-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.02.014
- [13] 王丽丽, 马晓晨, 滕仁明, 等. 一起由肠炎沙门菌所致食源性疾病暴发疫情的病原学研究及溯源分析[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(1): 60-62. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2015.01.013
- [14] Liu LG, Zhou XY, Lan Z, et al. *Salmonella typhimurium* outbreak associated with a contaminated food container in a school in Sichuan Province, China[J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(2): 285-290. DOI: 10.1017/S0950268815001387
- [15] 李雨晴, 万李, 陈杏, 等. 中国西北四省(区)结核分枝杆菌分离株一线药物耐药状况及其影响因素分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(5): 398-402, 422. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.05.003

收稿日期:2018-03-24 编辑:王晓欢