

南京市羊种布鲁氏菌分离鉴定及 *rpob* 基因分析

张颖¹, 张之峰¹, 洪捷², 周伟忠², 鲍倡俊², 周明浩², 谈忠鸣^{2*}

(¹南京大学医学院附属鼓楼医院遗传室, 江苏 南京 210008; ²卫生部肠道重点实验室, 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 分离鉴定及分子快速诊断方法确诊布鲁氏菌病, 并对2011—2016年间南京地区分离到的布鲁氏菌 *rpob* 基因进行特征分析。方法: 对疑似布鲁氏菌病患者全血进行分离培养, 并通过生化鉴定、Real-time PCR对分离到的布鲁氏菌进行 *bcp31* 基因特异性分析及 IS-711 插入序列分型。利用 PCR 方法对 *rpob* 基因进行扩增, 产物测序并分析。结果: 2011—2016年共收集到7株布鲁氏菌, 经 Real-time PCR 方法检测, 全部为羊种布鲁氏菌。通过测序分析发现7株羊种布鲁氏菌 *rpob* 基因仅出现1个碱基差异。结论: 南京地区发现的布鲁氏菌病患者全部为羊种布鲁氏菌感染, 羊种布鲁氏菌 *rpob* 基因高度同源, 在种间水平上显示出良好的多态性。城市地区布鲁氏菌病的传播途径及危险因素更为复杂。

[关键词] 羊种布鲁氏菌; 分子检测; Real-time PCR; *rpob* 基因

[中图分类号] R181.2⁴

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-328-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20180309

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的世界范围的人兽共患病, 感染人的布鲁氏菌主要以羊种、牛种及猪种为主, 犬种偶有报道^[1]。布鲁氏菌在细胞内生长繁殖, 可引起患者长期发热、多汗、关节痛及肝脾肿大等, 该病原菌侵害生殖系统, 可造成男性睾丸肿大, 女性月经不调、流产、白带增多等, 晚期可能出现劳动力丧失、卧床不起、神经或精神方面等症状。江苏省为非流行区^[2], 自2005年报告首例病例以来, 2011年后病例数上升显著。2011年以后, 南京市持续出现布鲁氏菌病散发病例, 2015至2016年病例增多, 发病人群为高危人群以及城市非高危居民人群的混合感染模式。

布鲁氏菌病的诊断需要实验室确诊, 现有的实验室诊断方法主要是基于血清凝集等特异性和敏感性较一般的免疫学方法及分离培养和生化鉴定。分子诊断是一种根据核酸序列的差异进行检测和鉴别的方法, 灵敏度和特异性较高, 且快速、简单、省时、省样, 已应用在布鲁氏菌病的早期快速诊断中。布鲁氏菌染色体 I 上的 *rpob* 基因编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶 β 亚基, 该基因的突变与利福平耐

药相关^[3]。从2011—2016年, 本实验室共收到7例布鲁氏菌病患者标本, 现将实验室分离鉴定方法及 *rpob* 基因分析情况报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

以2011—2016年本实验室收到的7例布鲁氏菌病患者标本为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 标本收集与培养

采集患者全血标本注入血培养瓶, 放置在全自动血液培养系统(Becton, Dickinson and Company, 美国)中培养, 报警后取出划双份血平板, 1份放37℃环境中, 1份放含5% CO₂的37℃环境中培养。

1.2.2 生化鉴定及血清分型

血平板上挑取可疑菌落, 加入全自动细菌鉴定仪(VITEK 2 COMPAT, Bio Merieux, 法国)进行生化鉴定, 卡夹为 VITEK GN 生化反应鉴定卡。

1.2.3 核酸提取

将培养好的菌刮至含200 μ L生理盐水的1.5 mL EP管中。采用 QIAamp DNA mini kit (Qiagen 公司, 德国)提取 DNA, 操作步骤参照试剂盒使用说明书, 核酸-80℃保存待用。

1.2.4 Real-time PCR 检测

采用 Real-time PCR 方法检测布鲁氏菌特异性

[基金项目] 江苏省重大新发传染病综合防控科技示范项目(BE2015714); 江苏省“科教强卫”工程重点学科流行病学项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jstzm@jscdc.cn

基因bcsp31,分型采用IS-711插入序列,根据该基因插入序列在不同种布鲁氏菌基因组中插入位置的差异,可在分子水平上鉴定牛种和羊种布鲁氏菌^[4]。引物序列见表1。反应体系为:10 μL Master Mix (ABI Universal TaqMan Master Mix, Applied Biosys-

tems),300 nmol/L 上下游引物,250 nmol/L 探针,2 μL DNA 模板,H₂O 补足至20 μL。循环程序为:52 °C 2 min,95 °C 10 min;95 °C 15 s,57 °C 1 min,45个循环并收集信号。荧光定量PCR仪为ABI的7500 Real-time PCR System。

表1 布鲁氏菌 Real-time PCR 引物及探针序列

名称	检测基因	引物及探针序列(5'→3')
布鲁氏菌特异基因	bcsp31	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-BHQ1
牛种布鲁氏菌	IS-711	GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC CATGCGCTATGATCTGGTTACG HEX-CGCTCATGCTCGCCAGACTTCAATG-BHQ1
羊种布鲁氏菌	IS-711	AACAAGCGGCACCCCTAAAA CATGCGCTATGATCTGGTTACG CY5-CAGGAGTGTTCGGCTCAGAATAATCCACA-BHQ2

1.2.5 rpoB 基因扩增

普通 PCR 方法扩增布鲁氏菌 rpoB 基因^[5],扩增片段大小为4 300 bp,上下游引物分别为:FP:5'-ATGGCTCAGACCCATTCTTTC-3',RP:5'-TTATTCTGCGCGTCCGGAA-3'。25.0 μL 反应体系为:2 × Premix Taq™(LA Taq Version 2.0 plus dye)12.5 μL,10 nmol/L 上下游引物各 1.0 μL,DNA 模板 2.0 μL,H₂O 补足。循环程序为:94 °C 4 min;94 °C 30 s,60 °C 40 s,72 °C 3 min,35个循环;总延长72 °C 7 min。PCR 扩增仪为ABI的9800 Fast Thermal Cycler。PCR 产物1.5%琼脂糖电泳分析结果。

1.2.6 序列分析

rpoB 基因扩增产物用 TaKaRa 试剂盒回收(TaKaRa Mini Best Agarose Gel DNA Extraction Kit,TaKaRa 公司,日本)并测序,测序仪为 Applied Biosystems/HITACHI 3500 xL (Hitachi High - technologies Corporation,Tokyo 公司,日本)。测序结果用 DNA Star 和 MEGA 4.1 软件进行分析。

2 结果

2.1 分离及生化鉴定

从患者全血中分离到的菌株,经生化鉴定全部为布鲁氏菌。

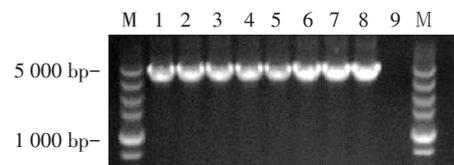
2.2 Real-time PCR 检测

对7例疑似布鲁氏菌病患者分离株进行 Real-time PCR 检测,检测靶基因bcsp31和IS-711插入序列基因。结果显示7株分离株核酸中均检测出bcsp31基因和羊种布鲁氏菌的荧光信号,C_t值均小于35。未

检测出牛种布鲁氏菌的荧光信号。

2.3 rpoB 基因分析

7株羊种布鲁氏菌分别进行 rpoB 基因扩增,电泳结果显示在5 000 bp 附近出现目的条带(图1)。测序结果拼接分析后发现7株羊种布鲁氏菌的同源性非常高,仅有1个碱基的差异。通过 MEGA 4.1 软件分析其序列与参考株间的进化关系(图2),所有菌株基因序列被聚类为两个组(Group A 和 Group B),本研究中收集到的羊种布鲁氏菌和羊种参考菌株均在 Group A 中,其他种布鲁氏菌被聚类在 Group B 中。



M:5 000 bp 梯度 Marker;1~7:分离株;8:阳性参照;9:阴性参照。

图1 南京市7株羊种布鲁氏菌株 rpoB 基因扩增电泳图

3 讨论

布鲁氏菌病临床表现复杂多样,波状热型曾被认为是典型临床特征^[6],但近十几年来,患者病情轻重差异很大,易误诊^[7]。临床医生较多考虑为流感、伤寒、结核、血液病或结缔组织病等,因此实验室诊断尤其重要。

为在最短时间内诊断病原,本实验室提取7例患者分离株的核酸并进行 Real-time PCR 快速检测。布鲁氏菌特异性检测的靶基因为bcsp31基因,该基因是一种高度保守、序列稳定、存在于毒力不

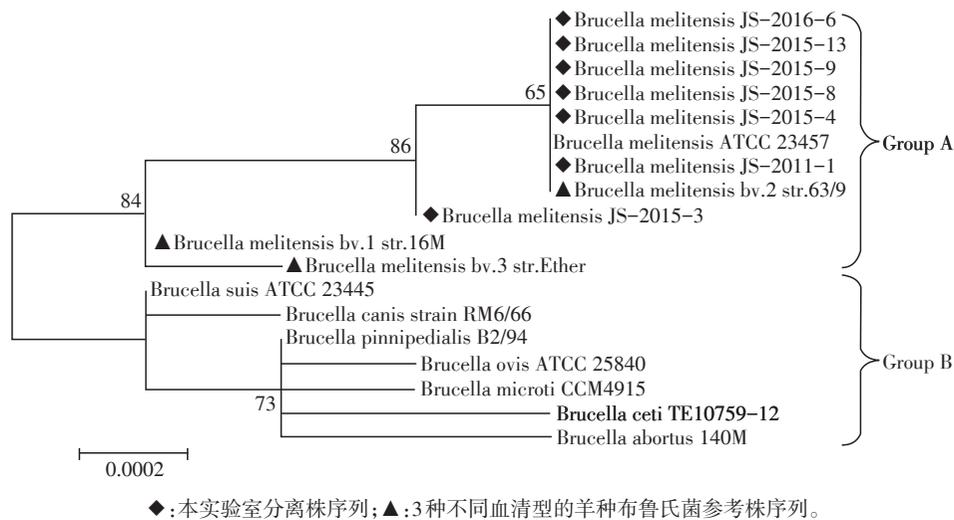


图2 南京市7株羊种布鲁氏菌与参考株 rpoB 基因进化树图

同的布鲁氏菌基因组中,具有免疫原性的可溶性细胞表面蛋白,可作为鉴定布鲁氏菌的标签序列。

目前最常见的对人致病的布鲁氏菌主要是羊种和牛种,羊种布鲁氏菌引起的临床症状较重,牛种布鲁氏菌相对较轻。一般医院使用 VITEK 2 生化鉴定仪无法区分牛种、羊种布鲁氏菌。传统分型方法如硫化氢产生量测定,染料抑菌试验,单相特异性血清 A、M 凝集试验,布鲁氏菌噬菌体裂解试验等,对实验操作人员的经验要求较高,实验周期长,敏感性和特异性一般。分别在牛、羊、猪 3 个种型的基因组中根据插入序列 IS-711 插入位置的差异设计两重荧光 PCR,可同时鉴别感染人的 2 种布氏菌,并在敏感性和特异性上均高于传统方法。可见运用 PCR 技术对布鲁氏菌进行鉴定,特别是在分子水平上对布鲁氏菌进行分型,能够为临床诊断治疗、疫情处理控制提供快速准确的依据。

布鲁氏菌 rpoB 基因全长 4 134 bp,位于染色体 I 上,当中间 1 543~1 632 bp 段发生变异,可导致利福平不能与 RNA 聚合酶 β 亚基结合,从而使细菌对利福平产生耐药^[8]。本研究中 7 株羊种布鲁氏菌 rpoB 基因高度保守,仅出现 1 个碱基的差异。通过与参考株序列分析后发现,所有羊种布鲁氏菌均聚类在 A 组中,6 株菌与参考菌株 ATCC 23457 及 str 63/9 完全相同。牛种、猪种、犬种等其他种布鲁氏菌被聚类在 B 组中,说明布鲁氏菌的 rpoB 基因同种属高度同源,种属间存在一定差异。该方法在布鲁氏菌种间水平上显示出良好多态性,与插入序列 IS-711 分型结果相一致。

通过流行病学调查发现 4 株分离自南京本地患者,2 株来自宿迁,1 株来自紧邻南京的安徽滁州市。

南京 4 例病例中仅 1 例为从事畜牧业的牧民,其他分别为退休、家庭主妇和设计师。宿迁和滁州病例为家里养羊的农民。调查结果显示在农村地区,从事畜牧养殖业或家里养羊易被感染;而城市地区,传播途径及危险因素更为复杂,需从源头上做好防控。

[参考文献]

- [1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview[J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3(2):213-221
- [2] Zhong Z, Yu S, Wang X, et al. Human brucellosis in the People's Republic of China during 2005-2010[J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(5):289-292
- [3] 塔拉,王建英,王晶妍. 布鲁菌利福霉素耐药与 rpoB 基因突变的相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(29):3198-3200
- [4] Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis* [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3):1290-1293
- [5] Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, et al. Molecular characterization of the rpoB gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping [J]. Microbes Infect, 2006, 8(3):860-865
- [6] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis [J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(2):91-99
- [7] Plumb GE, Olsen SC, Buttke D. Brucellosis: "one health" challenges and opportunities [J]. Rev Sci Tech, 2013, 32(1):271-278
- [8] Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase [J]. Cell, 2001, 104(6):901-912

[收稿日期] 2017-02-26