

实验犬布氏杆菌的多重 PCR 检测与分型鉴定

冯育芳, 邢进, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立实验犬及相关生物制品布氏杆菌的多重 PCR 检测与分型鉴定方法。方法 选择布氏杆菌 Omp2 基因同源性较高的区域设计引物对布氏杆菌进行多重 PCR 扩增, 扩增结果一致的样本进行酶切以区分不同型, 同时进行序列测定, 以确定该方法的准确性; 然后验证该方法的特异性和敏感性。结果 成功扩增得到目的条带, 并通过酶切区分五种布氏杆菌; PCR 产物与布氏杆菌 DNA 序列同源性达到 99%, 并验证了该方法的检测结果。实验结果证明该方法特异性较好, 灵敏性为 $1.8 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 成功建立布氏杆菌多重 PCR 检测与分型鉴定方法, 所建立的方法特异性好, 灵敏度高。本研究对保证实验犬群的质量, 保护饲养人员、实验人员的身体健康具有重要意义。

【关键词】 实验犬; 布氏杆菌; 多重 PCR; 分型鉴定

【中图分类号】 R378.5 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0057-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.05.014

Detection of Brucellosis in Canine by Multiplex Polymerase Chain Reaction

FENG Yu-Fang, Xing Jin, Yue Bing-fei, He Zheng-ming

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish multiplex PCR assay for detects Brucellosis in laboratory canine and related biological products. **Method** These primers of multiplex PCR were designed according to the Omp2 gene of Brucellosis, and the PCR reaction was optimum, and then some samples were digested by three restriction enzyme for differentiate Brucellas. We also cloned PCR products and measured sequence after multiplex PCR to determine the accuracy of the assay. Then the specificity and sensitivity of the assay was tested. **Results** The target bands were successfully amplified, and these samples were successfully distinguished by digestion of the PCR product; It was 99% homology between the target segment by multiplex PCR and Brucellosis DNA sequence from GeneBank. The specificity of this method is better, $1.8 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{ml}$ samples can be detect. **Conclusion** The Brucella PCR detection and typing of multiple identification methods was established successful, the assay have good specificity and high sensitivity. The assay is important to ensure the quality of laboratory canine and protect the health of the animal keepers and laboratory personnels.

【Key words】 Canine; Brucellosis; Multiplex PCR; Type identification

布氏杆菌病 (Brucellosis) 是由布氏杆菌引起的一种人兽共患传染病^[1]。细菌主要通过生殖道分泌物、流产胎儿、胎盘、精液和尿液等途径传播; 犬感染后, 大多呈隐性感染, 少数可表现临床症状, 其

最主要的临床表现为繁殖障碍^[2]。细菌还能经消化道、呼吸道和皮肤三种途径感染人, 以生殖系统侵害为特征, 因此对饲养人员、实验人员具有很大的危险性^[1,3]。

[作者简介] 冯育芳 (1981 -), 女, 助理研究员, 研究方向: 实验动物细菌学。

[通讯作者] 贺争鸣 (1957 -), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 微生物学和免疫学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

1985 年世界卫生组织 (WHO) 布氏杆菌病专家委员会将布氏杆菌属分为 6 个型 (马尔他布氏杆菌、流产布氏杆菌、猪布氏杆菌、沙林鼠布氏杆菌、绵羊布氏杆菌和犬布氏杆菌)^[4]。其中,犬布氏杆菌、流产布氏杆菌、猪布氏杆菌和马尔他布氏杆菌均可感染犬,最常见的是犬布氏杆菌和流产布氏杆菌。加强对实验犬布氏杆菌的检测是及时发现感染、有效降低发病率、防止感染扩散的重要措施。本研究致力于建立一

种敏感度高、特异性强的针对布氏杆菌的检测方法,为实验犬的质量检测提供手段。

1 材料和方法

1.1 菌株及含布氏杆菌的生物制品

本研究中共应用了 5 种布氏杆菌或布氏杆菌抗原,其中包含了常感染实验犬的犬型、牛型和羊型,但没有猪型。这些抗原为全菌直接灭活产物。

表 1 研究中使用的布氏杆菌
Tab. 1 Brucella used in the study

编号 No.	名称 Name	种属 Species	来源 Source	备注 Remark
A	布氏杆菌 55010 株	流产布氏杆菌	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	(104M) 弱毒株生产人用活疫苗
B	试管抗原	具体分型有待验证	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	批号:2002
C	R. 试管抗原	具体分型有待验证	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	批号:2002
D	布鲁氏菌病虎红平板凝集试验抗原	具体分型有待验证	中国兽医药品监察所	批号:200809
E	布鲁氏菌病虎红平板试验凝集抗原	犬型	中国兽医药品监察所	批号:200901

1.2 引物设计

通过分析 Genbank 的布氏杆菌基因组序列 (accession NO. U26439.1), 参照文献报道^[5,6], 选择编码外膜蛋白 2 的 Omp2 基因区域进行引物设计。共设计种和型特异性的四条引物 (表 2), 由上海英潍捷基贸易有限公司合成。用上述四条引物扩增的不同型布氏杆菌的理论条带, 如图 1 所示。

表 2 布氏杆菌的多重 PCR 检测引物

Tab. 2 The primers of multiplex PCR about brucella

引物名称 Primer	引物序列 Sequense	扩增片段长度 Length
2ab	5'-actgacggatcgcgcetaggcggcgcgacgcaa-3'	
2ab200	5'-actgaectcgaaccagcattgcggtcggtac-3'	220bp
2ab600	5'-actgaagcttagcgcgctgatgtgtagt-3'	650bp
2ab900	5'-actgactcgaattgccttttcgggggcaatga-3'	910bp

1.3 细菌 DNA 的提取

取 0.5 mL 灭活后的细菌培养液, 用 TaKaRa 的 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (TaKaRa code: DV811A) 提取细菌基因组 DNA, 详细操作见产品说明书。

1.4 多重 PCR 方法

多重 PCR 反应体系为 50 μ L, 包括: 10 \times buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, ddH₂O 23.5 μ L, 引物 2ab 2.5 μ L, 引物 2ab200 2.5 μ L, 引物 2ab600 2.5 μ L, 引物 2ab900 2.5 μ L, DNA 5 μ L, Hs Taq 酶 2.5 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 68 $^{\circ}$ C 30s; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 重复 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物进行琼脂糖电泳测定。PCR 产物送 TaKaRa 公司进行序列测定。

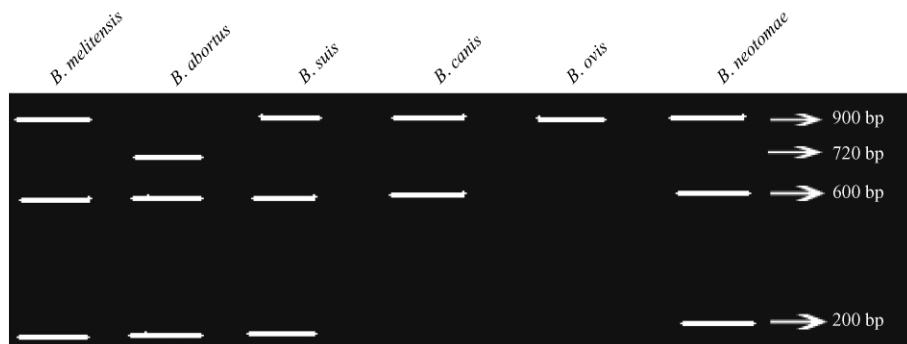


图 1 多重 PCR 扩增理论条带

Fig. 1 Theory bands of multiplex PCR

1.5 酶切鉴定

如果多重 PCR 扩增结果完全相同, 则用限制性内切酶对 910 bp 片段进行组合酶切, 以区分不同型。KpnI 只能切开沙林鼠型 (690) 和羊型 (712), 在猪型上没有酶切位点; EcoRI 在沙林鼠型上的酶切位点是 458, 大概在 PCR 产物正中间的位置, 而在另两型上分别有两个酶切位点, 分别是猪型 (450, 652), 羊型 (243, 455); PvuII 不能切开沙林鼠型, 可以切开另两型, 酶切位点分别是猪型 (285), 羊型 (614)。利用这样的组合酶可以区分沙林鼠型、猪型和羊型。

1.6 特异性测定

取本室保存的肠道菌种 (沙门菌、假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌) 按上述方法进行 PCR 扩增, 检测不同细菌种间 PCR 扩增的特异性。

1.7 敏感性测定

将 D 株布氏杆菌 DNA 倍比稀释为 18 μg/mL、

1.8 μg/mL、1.8 × 10⁻¹ μg/mL、1.8 × 10⁻² μg/mL、1.8 × 10⁻³ μg/mL、1.8 × 10⁻⁴ μg/mL、1.8 × 10⁻⁵ μg/mL、1.8 × 10⁻⁶ μg/mL、1.8 × 10⁻⁷ μg/mL、1.8 × 10⁻⁸ μg/mL、1.8 × 10⁻⁹ μg/mL, 用上述 PCR 方法测定检测, 以确定其检测阈值。

2 结果

2.1 检测体系的建立

2.1.1 布氏杆菌种和型特异性 PCR 结果

五个菌株用三重 PCR 方法扩增出的条带如图 2 所示, 第 1 条为 A 株, 报道为牛型, 但扩增结果显示并不完全是牛型, 应该是牛型和别的什么的混合型; 第 2 条为 B 株, 与 A 株一样, 可能是两种的混合型; 第 3 条为 C 株, 为犬型抗原; 第 4 条为 D 株, 它有三条带, 分别在 600、400 和 200 的位置, 与理论图相比较, 其型别难以确定, 测序结果为田鼠型; 第 5 条为 E 株, 但 PCR 结果显示并非犬型, 需进一步酶切鉴定。

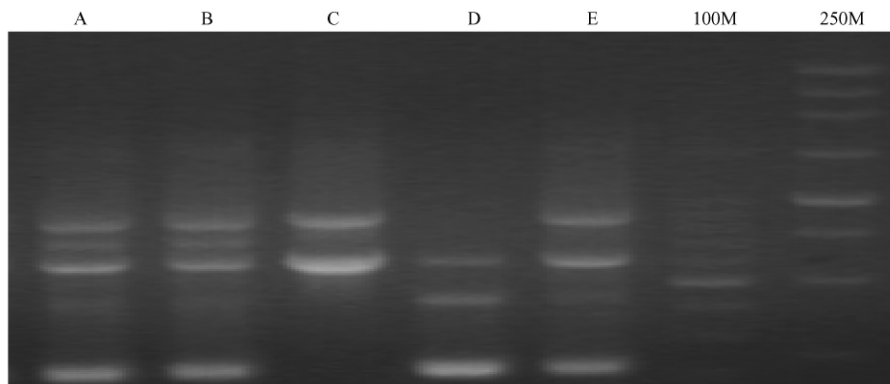


图 2 5 个不同来源的菌株用三重 PCR 方法扩增的结果

Fig. 2 The result of the different origin's stains which are amplified by multiplex PCR

2.1.2 限制内切酶酶切分析

三重 PCR 结果表明: A 株、B 株和 E 株扩增条带结果一致。用组合酶切的方式酶切上述三株细

菌 910 bp 的片段, 然后进行分析鉴定。结果见图 3, 由图可见, KpnI 可以切开三个菌株, 首先排除猪型; EcoRI 和 PvuII 结果显示, E 株实际为羊型; A 株和 B

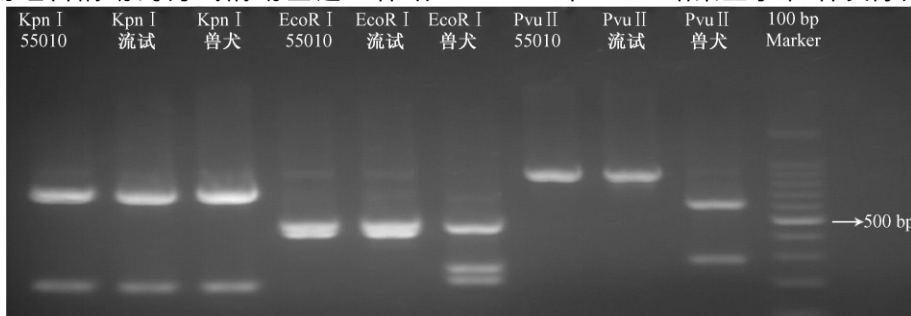


图 3 三个菌株组合酶切结果

Fig. 3 The results of combination enzyme digestion

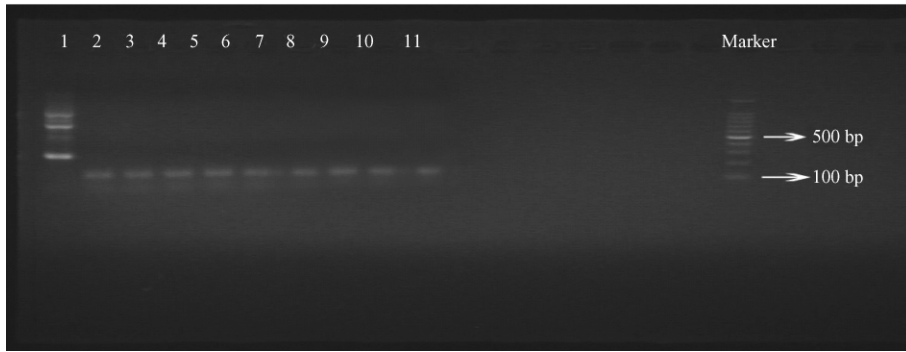


图 4 多重 PCR 方法特异性试验
 Fig. 4 The Specificity of multiplex PCR test

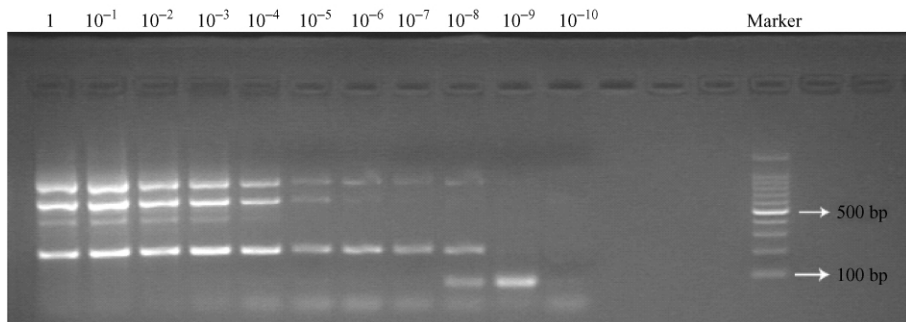


图 5 多重 PCR 方法敏感性试验
 Fig. 5 The sensitivity of multiplex PCR test

株 900 bp 酶切结果显示为沙林鼠株 ,具体情况有待于测序结果的印证。

2. 1. 3 测序结果

5 个菌株的 600 bp 片段和 4 个菌株的 910 bp 片段均送公司进行测序 ,测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对 ,结果显示 ,9 条片段均为布鲁氏杆菌片段 ,相似性很高 ,达到 99% -100%。而 A 株和 B 株 910 bp 和 600 bp 均为沙林鼠型的 ;C 株确为犬型的 ;D 株是田鼠型的 ;E 株实为羊型。与多重 PCR 结果一致。

2. 2 方法的特异性

用该方法同时扩增几种肠道菌 ,如图 4 ,从 1 - 11 分别为 D 株、金黄色葡萄球菌、沙门菌、耶尔森菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯、绿脓杆菌、嗜肺杆菌、变形杆菌、正常犬血对照、水对照 ,结果均未得到阳性条带 ,说明该方法的特异性很好。

2. 3 方法的灵敏性

用 D 株作 10 倍系列稀释 ,结果见图 5。由图可以看出 ,本实验最高可检测到 10^{-8} 的稀释度 ,即 $1.8 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

布氏杆菌病 ,又称马尔他热或波状热 ,是由布氏杆菌引起的人兽共患的自然疫源性传染病 ,本病常常引起动物流产 ,不孕等症状 ,故又称为传染性流产病。本病流行广泛 ,几乎遍布世界各地。在 200 多个国家中已有 160 多个国家和地区有人兽布病存在和流行^[7]。犬是常用的实验动物之一 ,但实验犬经常被布氏杆菌感染导致流产和不孕 ,不仅影响实验动物的供应 ,也影响实验动物产业的发展 ;更重要的是对动物饲养人员、动物实验人员的健康造成威胁。因此 ,实验犬养殖场必须进行定期检疫 ,排除实验犬布氏杆菌的感染 ,以确保实验人员和实验犬的安全。

布氏杆菌最好的检测方法之一就是细菌培养^[2] ,但由于布氏杆菌的高度危险性 ,被 WHO 列为 III 类危险级病原体^[8] ,必须在严格的生物安全三级或更高安全等级的实验室进行 ,以减少职业暴露。由于实验条件所限 ,寻求一种更加简便的、同时对实验室要求并没有那么高的检测方法非常必要。

PCR 方法不需要培养活菌,大大减少了实验室感染的可能性^[9,10]。

本实验使用多重 PCR 检测 5 个不同来源的菌株,经扩增和酶切后分型,得到三个条带,与理论分析相符,能有效的区分犬型和其他型,其中有一个是一样,有三个条带,另一个与理论分析不符合,这些都需要通过进一步的酶切进行鉴定分型。通过 KpnI、EcoRI 和 PvuII 三酶切分析得到确切结果。该方法能较好的检测实验犬的布氏杆菌,并对菌株进行分型。其中一个 PCR 结果与理论不符合的,这是因为近年来又陆续发现了一些菌株,如海洋株、田鼠株等,这可能就是一个田鼠株,测序结果也证明了这一推论。

另外,部分实验菌株与原公布分型不符,55010 并非单纯的牛型,是混合菌株,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所的试管抗原也是混合菌株,均为沙林鼠型和牛型的混合菌株;而中国兽医药品监察所的布氏菌株与牛型的并不符,测序结果显示也并非牛型,而是田鼠型;中国兽医药品监察所的犬型是羊型布氏杆菌,我们认为,这些菌株是从相应动物分离出来的,但并非相应的型。出现这种情况是非常有可能的,因为布氏杆菌的感染途径可以通过食入别的动物的内脏等途径传播,并不局限与什么动物只能感染什么型,所以才会出现这种情况。

三重 PCR 方法经初步实验可有效扩增布氏杆菌 DNA,酶切也得到了比较理想的结果,但由于菌株不多,并没有涵盖所有的布氏杆菌型,所以还需要在以后的工作中继续深入研究,以期得到更加确切的结论。

参考文献:

- [1] Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC *et al.* Human infection with M - strain of *Brucella canis* [J]. *Emerg Infect Dis.* 2004, 10(1): 146 - 148.
- [2] Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma [J]. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1996, 11(3): 161 - 165.
- [3] Madkour MM. Brucellosis: overview [J]. *Brucellosis.* 2nd edition. Berlin: Springer Verlag. 2001: 165 - 178.
- [4] 吴清民. 兽医传染病学. In: 北京: 中国农业大学出版社; 2002.
- [5] Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A *et al.* Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals [J]. *J Clin Microbiol.* 1995, 33(12): 3087 - 3090.
- [6] Mukherjee F, Jain J, Patel V *et al.* Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals [J]. *J Med Microbiol.* 2007, 56(Pt 10): 1309 - 1316.
- [7] 金鑫, 苏敬良. 人兽共患病的现状与防制 (五)——布氏杆菌病 [J]. *动物保健.* 2005, (002): 14 - 15.
- [8] Laboratory biosafety manual. World Health Organization [J]. *Ann Ist Super Sanita.* 1995, 31(2 Suppl): 1 - 121.
- [9] Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K *et al.* Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp [J]. *Clin Lab.* 2003, 49(9 - 10): 487 - 505.
- [10] Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR [J]. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004, 4(1): 115 - 123.

(修回日期)2010-12-02