

PCR技术在布鲁氏菌检测与鉴别中的应用

秦立得, 南文龙, 陈义平

(中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: 布鲁氏菌是一种可感染多种哺乳动物的人兽共患病病原, 能给公共卫生和畜牧业带来严重危害。常用的布鲁氏菌病原检测方法包括布鲁氏菌分离培养和分子生物学方法。其中的PCR技术具有特异性强、灵敏度高、操作简便等优点, 在布鲁氏菌检测、菌种鉴别、疫苗株与野毒株区分等方面得到了广泛应用。本文综述了PCR技术在通用型布鲁氏菌、不同种型布鲁氏菌及布鲁氏菌疫苗菌株检测与鉴别中的应用研究, 以期为检验检疫、流行病学调查、人与动物布鲁氏菌病诊断等提供技术参考。

关键词: 布鲁氏菌; PCR; 检测; 鉴别

中图分类号: S851.34 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)10-0063-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.10.018

Application of PCR Method in Detection and Identification of *Brucella*

Qin Lide, Nan Wenlong, Chen Yiping

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qindao, Shandong 266032, China)

Abstract: *Brucella* is a kind of pathogen that can infect various mammals, and often causes great damage to public health and animal husbandry in China. The commonly used detection methods for *Brucella* included its isolation and culture and some molecular biological methods. Among them, PCR method possesses the characteristics of strong specificity, high sensitivity and convenient operation, etc, and has already been widely used in detection and identification of *Brucella* strains and in differentiating the vaccine and wild strains. Here, the current application studies of PCR method were summarized in detecting and identifying general-type, vaccine and different species of *Brucella* strains, hoping to provide some technical supports for inspection, quarantine, diagnosis and epidemiological investigation of human and animal brucellosis.

Key words: *Brucella*; PCR; detection; identification

布鲁氏菌病(Brucellosis, 以下简称布病)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人兽共患病。布鲁氏菌分为10个种型:6种经典型菌种,即羊种、牛种、猪种、绵羊附睾种、沙林鼠种和犬种;4种新发现种型,即*B.microti*、*B.ceti*、*B.inopinata*和*B.pinnipedialis*^[1-2]。它们可感染猪、牛、犬、羊、鼠、骆驼等多种哺乳动物,其中羊种、牛种和猪种可感染人。

常用的布鲁氏菌病原检测方法包括布鲁氏菌分离培养和分子生物学方法^[3]。布鲁氏菌分离培养是布鲁氏菌检测和种型区分的金标方法,但该方法耗时长,并需要在生物安全三级实验室中进行^[4]。

基金项目: 兽用生物制品及检测试剂质量评价标准研究项目(2017YFF0208602)

分子生物学病原检测技术具有安全可靠、灵敏度高、特异性强、操作简便等特点,已开始布鲁氏菌检测中推广应用^[5-6],其中研究最多的是聚合酶链式反应(PCR)方法。PCR方法已广泛应用于布病诊断、环境及动物产品的布鲁氏菌检测、布鲁氏菌分型等方面,能从全血、血清、组织、体液等多种样品,以及牛奶、奶酪、生肉等食品中检出布鲁氏菌,而且能从患病初期血清学阴性样品中检出病原,从而弥补了血清学检测方法的不足^[7]。

1 通用型布鲁氏菌 PCR 检测方法

通用型布鲁氏菌PCR检测方法包括普通PCR、巢式PCR和荧光定量PCR等。1990年,Fekete等^[8]首先开发出检测布鲁氏菌的PCR方法,证明PCR方法具有灵敏度高、特异性强的优

点。通用型布鲁氏菌 PCR 检测方法常检测的保守基因包括 16S-23S rRNA 基因^[9]、*omp2* 基因^[10]、*bcs31* 基因^[11]、*IS6501* (*IS711*) 重复序列^[12] 和 *per* 基因^[13] 等。大量的比对验证表明, 这些基因检测结果的敏感性存在差异。

2007 年, Manal 等^[14] 使用 *bcs31* 基因引物 (B4/B5)、*omp2* 基因引物 (JPF/JPR) 和 16S-23S rRNA 基因引物 (F4/R2), 检测 147 份阳性血清和 50 份阴性血清。结果显示, 这 3 对引物检测结果的特异性强, 但敏感性存在差异。其中: B4/B5 引物敏感性最高为 98% (144/147), 最低检出限为 700 CFU/mL; JPF/JPR 引物敏感性为 88.4% (130/147), 最低检出限为 7×10^5 CFU/mL; F4/R2 引物敏感性为 53.1% (78/147), 最低检出限为 7×10^7 CFU/mL。

2009 年, Bounaadja 等^[15] 根据 *IS711*、*bcs31* 和 *per* 基因, 建立了 3 种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法, 并与检测相同基因和普通 PCR 和巢式 PCR 方法进行了比对试验。结果显示, 上述荧光定量 PCR 方法较普通 PCR 和巢式 PCR 方法灵敏度提高了 50~500 倍, *IS711*、*bcs31* 和 *per* 基因荧光定量 PCR 方法最低检出限分别为 0.2、2 和 2 fg 布鲁氏菌基因组, 但这 3 种方法在检测不同种型布鲁氏菌时存在敏感性差异。

2 不同种型布鲁氏菌 PCR 检测鉴别方法

2.1 多重 PCR

多重 PCR 是布鲁氏菌种型检测与鉴定的常用方法。1994 年, Bricker 等^[16] 根据高度保守的 *IS711* 重复序列在不同种型布鲁氏菌基因组中的数量和分布特点, 设计了通用型 *IS711* 引物 and 不同种型布鲁氏菌引物, 建立了能同时检测 1 型、2 型和 4 型牛种布鲁氏菌, 羊种布鲁氏菌, 绵羊附睾种布鲁氏菌和 1 型猪种布鲁氏菌的多重 PCR (AMOS PCR)。随后 Bricker 等^[17] 又在上述方法中增加了两对引物, 使该方法能够区分牛种布鲁氏菌疫苗株 S19 株和 RB51 株。2000 年, Ewalt 等^[18] 使用 AMOS PCR 方法检测经分离培养确定为牛种布鲁氏菌的 231 份样品, 发现检测结果与布鲁氏菌分离

培养鉴别结果一致。目前, AMOS PCR 已得到广泛认可, 并在布鲁氏菌检测、种型鉴别和流行病学调查中得到广泛应用。

近年来多重 PCR 方法在 AMOS PCR 的基础上又有了进一步发展。2006 年, García-Yoldi 等^[19] 开发出能区分经典型布鲁氏菌种型和亚种, 牛种布鲁氏菌疫苗株 S19 和 RB51, 以及羊种布鲁氏菌疫苗株 Rev1 的多重 PCR。2009 年, Huber 等^[20] 开发出不仅能实现之前此类多重 PCR 检测的效能, 并能区分牛种布鲁氏菌 1、2、4 型与 3、5、6、9 型, 猪种布鲁氏菌 1、3、4 型与 2、5 型的多重 PCR。2010 年, Mayer-Scholl 等^[21] 进一步完善了该方法, 设计了能检测区分包括 *B.microti*、*B.inopinata*、*B.ceti* 和 *B.pinnipedialis* 在内的目前已知的所有种型布鲁氏菌多重 PCR 方法。

2.2 不同种型荧光定量 PCR

最初建立的布鲁氏菌不同种型检测与鉴别荧光定量 PCR 方法的目的基因, 往往选择经多重 PCR 方法确认的相应序列, 由此开发出了牛种、猪种和羊种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法。2007 年, Ai Dahouk 等^[22] 对比了 2 种羊种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法、3 种牛种布鲁氏菌和 1 种猪种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法, 检测了 248 份已知样品 (包括各型布鲁氏菌菌株、临床分离布鲁氏菌菌株和 68 株其他菌株)。检测结果表明: 这些方法特异性强, 与检测同种布鲁氏菌的荧光定量 PCR 方法灵敏度相同, 其中羊种布鲁氏菌基因组最低检出限为 16 fg, 猪种为 100 fg, 牛种为 18 fg; 检测敏感性存在差异, 羊种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法可检测所有种型羊种布鲁氏菌样。Redkar 等^[23] 开发的牛种和猪种布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法只能单独检测 1 型、2 型、4 型和部分 6 型牛种布鲁氏菌和 1 型猪种布鲁氏菌。

随着对布鲁氏菌全基因序列的深入研究, 布鲁氏菌的不同种型和生物型的特异性核酸多态性位点或特异性序列相继被发现, 并依此开发了相应的荧光定量 PCR 检测鉴别方法。

2008 年, Hinić 等^[24] 根据不同种型布鲁氏

菌特异性序列,建立了通用型布鲁氏菌荧光定量PCR检测方法,羊种、猪种、牛种、绵羊附睾种、沙林鼠种和犬种6种布鲁氏菌荧光定量PCR检测方法,通过样品检测发现,只有猪种、沙林鼠种和绵羊附睾种布鲁氏菌荧光定量PCR检测方法特异性强。

2010年,Winchell等^[25]分析总结出7种布鲁氏菌的特异性单核氨酸多态性位点,建立了能检测区分羊种、猪种、绵羊附睾种、沙林鼠种、犬种和感染海洋生物的布鲁氏菌(*B.ceti*和*B.pinnipedialis*)的荧光定量PCR方法,证明以上方法的最低检测限分别为100、1、100、10、100和10 fg布鲁氏菌基因组;使用以上方法检测153份样品,证明这些方法具有良好的特异性和敏感性。

2015年,Vahhab等^[26]根据牛种和羊种布鲁氏菌的种特异性核酸位点,建立了能检测区分牛种和羊种布鲁氏菌的荧光定量PCR方法,发现该方法对牛种和羊种布鲁氏菌基因组最低检出限均为1.5 pg;使用该方法检测160份临床样品和17株非布鲁氏菌菌株,证明其具有良好的特异性和敏感性。

2016年,Kim等^[27]发现牛种布鲁氏菌基因组种特异性突变位点,建立了能检测并区分牛种布鲁氏菌的荧光定量PCR方法,发现该方法最低检出限为20 fg或4 CFU牛种布鲁氏菌基因组;使用该方法检测296株已知布鲁氏菌菌株和8株非布鲁氏菌菌株,结果检测出了所有牛种布鲁氏菌菌株。

2017年,Kaden等^[28]发现羊种布鲁氏菌基因中存在种特异性核酸缺失,以此建立了能检测区分羊种布鲁氏菌的荧光定量PCR方法,发现该方法最低检测限约为6.25个布鲁氏菌基因组;使用该方法检测120份人类临床分离羊种布鲁氏菌、37株布鲁氏菌代表型菌株和45株非布鲁氏菌菌株,证明其具有良好的特异性和敏感性。

2.3 不同生物型荧光定量PCR

2015年,Hänsel等^[29]发现猪种布鲁氏菌1~4型有特异性重复序列,而后建立了能检测猪种布鲁氏菌1~4型荧光定量PCR方法,发现该方法最低检测限为12.5 fg布鲁氏菌基因组DNA;使用该方法检测25

份各种型布鲁氏菌基因组样品、75份已知猪种布鲁氏菌分离株样品和30株非布鲁氏菌样品,发现该方法特异性强,对布鲁氏菌1~4生物型检出率为95%。

2.4 其他PCR方法

1996年,Ouahrani-Bettache等^[30]根据IS711序列在不同种型布鲁氏菌基因组中分布的多态性,建立了能区分多种布鲁氏菌和疫苗株B19的锚定PCR方法。2012年,Mirnejad等^[31]设计能同时检测区分牛种和羊种布鲁氏菌的PCR方法(RFLP-PCR),通过对PCR产物进行限制性内切酶酶切,可进一步分析结果。此外,将限制性片段长度多态性分析、多位点可变数目串联重复序列分析、随机扩增多态性DNA技术、芯片技术等与PCR技术相融合并应用于布鲁氏菌种型或菌株的检测与鉴别,都取得了理想的效果。

3 布鲁氏菌疫苗菌株PCR检测鉴别方法

接种弱毒疫苗是控制布病的有效方法。常见的疫苗包括牛种布鲁氏菌19(S19)、45/20(45/20)疫苗,羊种布鲁氏菌Rev.1疫苗,猪种布鲁氏菌S2疫苗,粗糙型牛种布鲁氏菌株51(RB51)疫苗等。目前,多种布鲁氏菌弱毒疫苗在我国布病防控中发挥了积极作用,但也出现了干扰诊断等问题,而PCR方法可区分弱毒疫苗株与野生型菌株。

3.1 普通PCR

1994年,Sangari等^[32]发现牛种布鲁氏菌弱毒疫苗株B19存在702 bp的基因缺失,并依此设计了检测B19弱毒疫苗株的PCR方法。1999年,Vemulapalli等^[33]发现牛种布鲁氏菌弱毒疫苗株RB51存在特异性的IS711基因插入,因此建立了能检测弱毒疫苗株RB51的PCR方法。2002年,Cloeckaert等^[34]发现羊种布鲁氏菌弱毒疫苗株Rev.1存在特异性基因突变,设计了能检测Rev.1弱毒疫苗株的PCR方法。此外,还将上述布鲁氏菌疫苗菌株普通PCR检测方法有效整合于布鲁氏菌快速检测和分型的多重PCR方法中^[18-21]。

2014年,Nan等^[35]建立能检测区分猪种布鲁氏菌弱毒疫苗株S2的双重PCR方法,发现检测猪种布鲁氏菌1型时产生285 bp条带,检测S2时产

生 285 和 497 bp 两条带。该方法最低检出限为 27 fg 猪种布鲁氏菌 1 型菌株基因组和 60 pg S2 弱毒疫苗株基因组。

3.2 荧光定量 PCR

2016 年, Nan 等^[36]发现牛种布鲁氏菌弱毒疫苗株 A19 菌株存在特异性位点, 以此设计了能检测区分 A19 疫苗株的荧光定量 PCR 方法, 发现该方法最低检出限为 7.6 fg A19 疫苗株布鲁氏菌基因组; 使用该方法检测 79 株已知布鲁氏菌菌株、125 份阳性血清样品和 4 株非布鲁氏菌菌株, 证明其具有良好的特异性和敏感性; 2018 年, Nan 等^[37]还发现牛种布鲁氏菌弱毒疫苗株 104M 存在特异性的基因突变, 以此设计了能检测区分 104M 疫苗株的荧光定量 PCR 方法, 发现该方法最低检出限为 220 fg 104M 疫苗株基因组。

4 结语

布鲁氏菌 PCR 方法与传统的血清学和细菌学检测方法相比具有简便快捷、特异性强、灵敏度高、操作简便等优点, 其检测结果得到了广泛接受和认可。目前多重 PCR 和荧光定量 PCR 在布鲁氏菌检测、布鲁氏菌菌种鉴别、疫苗株与野毒株区分等方面得到了广泛应用, 满足了检验检疫、流行病学调查、人和动物布病诊断等多方面的需求。目前, PCR 技术又实现了与芯片技术、微流体技术等新技术的融合, 可进行大量样品中多种病原的快速同步检测和分析, 有效提高了检测效率, 将更有助于布鲁氏菌的快速检测和分型。

参考文献:

[1] MORENO E, CLOECKAERT A, MORIYÓN I. *Brucella* evolution and taxonomy [J]. *Veterinary microbiology*, 2002, 90 (1/2/3/4): 209-227.

[2] SCHOLZ H C, VERGNAUD G. Molecular characterisation of *Brucella* species [J]. *Rev sci tech*, 2013, 32 (1): 149-162.

[3] ALTON G C, JONES L M. *Laboratory techniques in brucellosis* [M]. Geneva: WHO, 1975.

[4] 江明静, 赵世刚. 布鲁氏菌病及其诊断和药物治疗研究进展 [J]. *医学动物防制*, 2016 (12): 1372-1375.

[5] BHAT I A, MASHOOQ M, KUMAR D, et al.

Development of probe based real time loop mediated isothermal amplification for detection of *Brucella* [J/OL]. (2018-07-16) [2018-05-31] DOI: 10.1111/jam.13938.

[6] REN H, YANG M, ZHANG G, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for detection of *Brucella* in blood samples [J]. *Molecular & cellular probes*, 2016, 30 (2): 122-124.

[7] BRICKER B J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis [J]. *Veterinary microbiology*, 2002, 90 (1): 435-446.

[8] FEKETE A, BANTLE J A, HALLING S M, et al. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction [J]. *Journal of applied bacteriology*, 1990, 69 (2): 216-227.

[9] ROMERO C, GAMAZO C, PARDO M, et al. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33 (3): 615.

[10] LEAL KLEVEZAS D S, MARTÍNEZ VÁZQUEZ I O, LÓPEZ MERINO A, et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33(12): 3087-3090.

[11] MORATA P, MANCHADO P, COLMENERO J D. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1997, 35 (11): 2927-2930.

[12] HINIĆ V, BRODARD I, THOMANN A, et al. IS 711 -based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology [J]. *Bmc veterinary research*, 2009, 5 (1): 1-8.

[13] BOGDANOVICH T, SKURNIK M, L BECK P S, et al. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella* [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 42 (5): 2261-2263.

[14] BADDOUR M M, ALKHALIFA D H. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood [J]. *Canadian journal of microbiology*, 2008, 54 (5): 352.

[15] BOUNAADJA L, ALBERT D, CH NAIS B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, *bcs*p31 and per target genes [J]. *Veterinary microbiology*, 2009, 137 (1): 156-164.

[16] BRICKER B J, HALLING S M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1994, 32 (11): 2660-2666.

[17] BRICKER B J, HALLING S M. Enhancement of the

- Brucella AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51 [J]. Journal of clinical microbiology, 1995, 33 (6) : 1640-1642.
- [18] EWALT D, BRICKER B. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51 [J]. Journal of clinical microbiology, 2000, 38 (8) : 3085-3086.
- [19] GARCÍA-YOLDI D, MARÍN C M, DE MIGUEL M J, et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1 [J]. Clinical chemistry, 2006, 52 (4) : 779-781.
- [20] HUBER B, SCHOLZ H C, LUCERO N, et al. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species [J]. International journal of medical microbiology, 2009, 299 (8) : 563-573.
- [21] MAYERSCHOLL A, DRAEGER A, G LLNER C, et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species [J]. Journal of microbiological methods, 2010, 80 (1) : 112.
- [22] AI DAHOUK S, NÖCKLER K, SCHOLZ H C, et al. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. [J]. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2007, 45 (11) : 1464-1470.
- [23] REDKAR R, ROSE S, BRICKER B, et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* [J]. Molecular & cellular probes, 2001, 15 (1) : 43-52.
- [24] HINĆ V, BRODARD I, THOMANN A, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems [J]. Journal of microbiological methods, 2008, 75 (2) : 375-378.
- [25] WINCHELL J M, WOLFF B J, TILLER R, et al. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis [J]. Journal of clinical microbiology, 2010, 48 (3) : 697-702.
- [26] VAHHAB P, MALIKE S, MOJTABA H, et al. Detection and discrimination of two *Brucella* species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP [J]. Iranian journal of basic medical sciences, 2015, 18 (9) : 909.
- [27] KIM J Y, KANG S I, JIN J L, et al. Differential diagnosis of *Brucella abortus* by real-time PCR based on a single-nucleotide polymorphisms [J]. Journal of veterinary medical science, 2016, 78 (4) : 557-562.
- [28] KADEN R, FERRARI S, ALM E, et al. A novel real-time PCR assay for specific detection of *Brucella melitensis* [J]. BMC infectious diseases, 2017, 17 (1) : 230.
- [29] HÄNSEL C, MERTENS K, ELSCHNER M C, et al. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis* [J]. Veterinary record open, 2015, 2 (1) : e000084.
- [30] OUAHRANI - BETTACHE S, SOUBRIER M. P, LIAUTARD J. P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains [J]. The journal of applied bacteriology, 1996, 81 (2) : 154-160.
- [31] MIRNEJAD R, DOUST R H, KACHUEI R, et al. Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR [J]. Asian pacific journal of tropical medicine, 2012, 5 (1) : 24-28.
- [32] SANGARI F J, GARCÍA-LOBO J M, AGÜERO J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes [J]. Fems microbiology letters, 1994, 121 (3) : 337-342.
- [33] VEMULAPALLI R, MCQUISTON J R, SCHURIG G G, et al. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains [J]. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 1999, 6 (5) : 760-764.
- [34] CLOECKAERT A, GRAYON M, GR PINET O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene [J]. Vaccine, 2002, 20 (19/20) : 2546-2550.
- [35] NAN W, TAN P, WANG Y, et al. Duplex PCR for differentiation of the vaccine strain *Brucella suis* S2 and *B. suis* biovar 1 from other strains of *Brucella* spp [J]. Veterinary journal, 2014, 201 (3) : 427-428.
- [36] NAN W, ZHANG Y, TAN P, et al. A rapid cycleave PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* A19 in China [J]. Journal of veterinary diagnostic investigation, 2016, 28 (3) : 214-218.
- [37] NAN W, QIN L, WANG Y, et al. A rapid minor groove binder PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* 104M [J]. BMC veterinary research, 2018, 14 (1) : 27.

(责任编辑: 侯文婷)