

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.03

布鲁氏菌 MLVA-15 分型方法的建立

王 勋¹, 米吉提·莫合他汗², 孙明军³, 狄栋栋³, 许 芳¹,
贾舒安², 颜成旭², 李金平², 范伟兴³, 曾巧英^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 新疆动物卫生监督所, 乌鲁木齐 830000; 3. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

[收稿日期] 2018-04-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0012-07 [中图分类号] S855.1⁺2

[摘 要] 为提高对我国布鲁氏菌流行菌株的鉴别分型能力, 利用布鲁氏菌可变数目串联重复序列(VNTR)的多态性, 建立了新的布鲁氏菌分型方法——MLVA-15。与传统的布鲁氏菌 MLVA-16 和 BruMLSA21 分型方法相比, 新的 MLVA-15 分型方法对我国羊种布鲁氏菌流行菌株的区分能力有着显著的提高, 能够满足布病流行病学调查中对病原追溯的需求。尝试利用不同 VNTR 位点组合来提高对布鲁氏菌的鉴别能力, 为单一型布鲁氏菌流行区域的布病病原学调查提供了新思路。

[关键词] 布鲁氏菌; VNTR; MLVA; BruMLSA

Establishment of a New Genotyping Method of MLVA-15 on *Brucella*

WANG Xun¹, MI Ji-ti², SUN Ming-jun³, DI Dong-dong³, XU Fang¹, JIA Shu-an²,
YAN Cheng-xu², LI Jin-ping², FAN Wei-xing³, ZENG Qiao-ying^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Xinjiang Center of Animal Disease Control, Urumqi 830000, China; 3. Laboratory of Zoonoses, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Corresponding author: ZENG Qiao-ying, E-mail: zengqy@gsau.edu.cn

Abstract: In order to improve the ability of identifying and discriminating *Brucella* strains epidemic in China, variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism was valued and a new *Brucella* typing method of MLVA-15 was established. Compared to the traditional *Brucella* MLVA-16 and BruMLSA21 typing methods, the new MLVA-15 method has significantly improved the ability in differentiating *Brucella melitensis* strains currently circulating in China. It can also meet the requirement of infection source tracing back in the epidemiological investigation of brucellosis. Using different combinations of VNTR loci to improve the ability of identifying *Brucella* strains provides a means for the etiological investigation in regions where a single species of *Brucella* prevails.

Key words: *Brucella*; VNTR; MLVA; BruMLSA

基金项目: 甘肃农业大学伏羲杰出人才项目; 现代农业(奶牛)产业技术体系建设项目专项经费(CARS-36)

作者简介: 王 勋, 硕士研究生, 从事布鲁氏菌的流行病学调查和分子分型研究。

通讯作者: 曾巧英。E-mail: zengqy@gsau.edu.cn

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌引起的一种危害严重的人兽共患传染病。在目前已知的 6 个经典布鲁氏菌种中^[1],对我国畜牧业造成重大危害并能引起人致病的主要为羊种布鲁氏菌(*B. melitensis*)^[2],其次是牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)和猪种布鲁氏菌(*B. suis*)^[3]。而羊种布鲁氏菌三个生物型(1、2、3 型)中,最常见的是生物 3 型,占整个羊种分离菌株的 80% 以上。布鲁氏菌在遗传上高度保守,而我国流行菌株的种型相对单一,因而,建立一个分辨力高的布鲁氏菌鉴别方法对布病流行病学调查尤其是病原追溯是非常必要的。

由于传统的布鲁氏菌种型鉴定方法过程繁琐、人员感染风险较高,因而以核酸分子为基础的基因型分析方法越来越受到重视。多位点可变数目串联重复序列分析(Multi-locus VNTR Assay, MLVA)和多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)是目前国际上主要的布鲁氏菌分子分型方法。基于 16 个可变数目串联重复序列(Variable-Number of Tandem-Repeats, VNTR)位点的 MLVA 分型方法(MLVA-16)具有较高的分辨力且最为常用^[3-4],可用于地域关系比较远的布鲁氏菌分离株的鉴别和遗传关系分析,但对于遗传关系较近的菌株区分能力较弱;包含 21 个看家基因的 MLSA 分型方法(BruMLSA21)对不同种的布鲁氏菌菌株具有很好的区分能力^[5-7],但对于同一种型的布鲁氏菌的区分能力还是很低。我国布鲁氏菌流行菌株的种型单一且遗传同源性较高,MLVA-16 和 BruMLSA21 的大部分位点在我国分离菌株中没有多态性或者仅呈现有限的多态性^[2,8],对菌株区分能力较弱,无法满足布病流调中对病原追溯的需求。因而,有必要建立一个分辨率高的、适合我国布鲁氏菌遗传特性的分型方法,为我国布病分子流行病学调查和分析菌株间遗传关系提供支持。

1 材料与方法

1.1 VNTR 位点选择和引物设计 根据已有文献^[3,9],对 95 个已知布鲁氏菌 VNTR 位点进行重新筛选和评价。VNTR 筛选依据包括:(1)所有位点在牛种、羊种和猪种布鲁氏菌参考菌株(*B. melitensis*

16M, *B. abortus* 2308 和 *B. suis* 1330)中都存在;(2)在同一 PCR 反应条件下,所有 VNTR 位点都能有效扩增;(3)VNTR 位点在布鲁氏菌基因组中均匀分布;(4)为了方便检测,扩增片短长度在 100~600 bp 之间,特异性高,无其他非特异性带。布鲁氏菌参考菌株的基因组由中国动物卫生与流行病学中心提供;PCR 有关试剂购自宝生物工程有限公司(Takara)。

1.2 与传统的 MLVA-16 分型方法的比较 利用我国分离的 51 株羊种布鲁氏菌分离菌株(中国动物卫生与流行病学中心人兽共患病监测室提供)对不同 MLVA 分型方法进行对比评价。这些菌株分别来自我国新疆、山东、甘肃、河南、河北五省的不同地市,分离时间为 2010-2016 年,具有一定的代表性,分离方法见文献^[6]。通过 PCR 和毛细管电泳方法来确定各菌株每个 VNTR 位点扩增产物的分子量,根据分子量大小计算 VNTR 位点的重复单元数。用 Hunter-Gaston Diversity(HGDI)指数对每个 VNTR 位点的多态性进行分析(<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>)。应用 BioNumerics 7.6 软件对菌株之间的亲缘关系进行聚类分析。细菌基因组提取试剂盒由宝生物工程有限公司(Takara)提供。

1.3 与 BruMLSA21 分型的比较 利用上述 51 株羊种布鲁氏菌分离菌株,参照 Sun M J 方法^[8]对 21 个基因位点进行 PCR 扩增和测序。测序结果与 *Brucella* MLST 数据库进行比对(<https://pubmlst.org/Brucella/>),对出现的新等位基因给定一个独特的数值,在 21 个基因位点上只要有一个新的等位基因则定义为一个新的序列型。21 个位点的序列组装连接后,利用 MEGA 5.1 软件绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 MLVA 分型方法的优化 通过对布鲁氏菌 VNTR 位点进行筛选和评价,其中 47 个 VNTR 位点符合要求,删除多态性位点相近的位点,最终选择了 15 个 VNTR 位点(I 号染色体 10 个,II 号染色体 5 个),作为一个新的 MLVA 分型方法-MLVA-15,各 VNTR 位点的引物、重复片段长度、PCR 产物大

小与重复片段拷贝数等信息见表 1。与传统的 MLVA-16 分型方法相比,MLVA-15 分型方法保留了其中 8 个 VNTR 位点 (Bruce04、Bruce09、Bruce16、Bruce30、Bruce42、Bruce43、Bruce45 和 Bruce55),另外又包括了 7 个未被使用的位点

(Bruce13、Bruce15、Bruce17、Bruce24、Bruce72、BruceVNTR1 和 BruceVNTR25)。PCR 反应条件如下:95 ℃ 5 min 预变性;然后进行 30 个循环的扩增 (95 ℃ 变性30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min),最后 72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。

表 1 MLVA-15 VNTR 位点信息表
Tab 1 Information of VNTRs in MLVA-15

VNTR 名称	上游引物序列	下游引物序列	染色体	重复片段、PCR 扩增产物、 重复片段拷贝数换算
Bruce04	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG	I	8bp-152bp-2u
Bruce09	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	I	8bp-156bp-7u
Bruce13	CGAACGATAGACCAGAACATGC	TTGAAAGAATCAGATAAGATAAAGCA	II	8bp-196bp-2u
Bruce15	GCGGTGTTGTGTCTGTGGATA	GCCGTCAGTATCCACGTCATAG	II	264bp-346bp-1u
Bruce16	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT	GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT	II	8bp-152bp-3u
Bruce17	TTTTCACAGGGCATGTTCTCAG	CGCGTTTCGATTGTGAAAATA	II	5bp-110bp-3u
Bruce24	AGGGGAGTATGTTTTTGTTGC	GCTACAAGATCGAAGTGCTCCA	I	8bp-146bp-8u
Bruce30	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG	I	8bp-151bp-6u
Bruce42	CATCGCCTCAACTATACCGTCA	ACCGCAAAATTTACGCATCG	I	125bp-539bp-4u
Bruce43	TCTCAAGCCCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCCTGCCATAAAC	I	12bp-182bp-2u
Bruce45	ATCCTTGCTCTCCCTACCAAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	I	18bp-151bp-3u
Bruce55	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTTCGAGTTGTCT	I	40bp-273bp-3u
Bruce72	GAAGACGGCTATCGACTGGTCT	GTTTCAATGAAGGCGAGGTGAG	II	8bp-230bp-8u
BruceVNTR1	GGCGGACAGAGCCGTCGGTGTTAC	CCCGCGCCGGAGATTGTTTTTGATTAATG	I	8bp-220bp-6u
BruceVNTR25	GATGCGGCTCGAGGGCCTTGAGAGTG	GACAATGGCCGCAAAAGCTTCCGAACC	I	15bp-495bp-2u

2.2 MLVA-15 与 MLVA-16 分型方法的比较 对 51 株我国羊种布鲁氏菌分离菌株 MLVA-15 VNTR 位点的多态性分析结果显示,除了 Bruce45 和 Bruce55 2 个 VNTR 位点,其他所有位点均呈现不同程度的多态性(HGDI=0.077~0.887)(表 2)。其中,Bruce04、Bruce24、Bruce30 和 BruceVNTR1 4 个位点的多态性最高(HGDI=0.718~0.887),其余 9 个位点具有中等或较低的多态性(HGDI=0.077~0.645)。MLVA-15 分型方法对菌株的区分能力明显提高,51 株布鲁氏菌分为 51 个基因型,对菌株的

鉴别效率达到 100%(图 1)。MLVA-16 分型方法仅鉴定出 28 个基因型,对菌株的区分效率为 55%,显著低于 MLVA-15(图 2)。对于菌株之间的遗传关系分析,MLVA-15 分型方法与 MLVA-16 分型方法获得的聚类结果基本一致,具有相同 MLVA-16 基因型的 5 个菌株 (Bruxj20、Bruxj35、Bruxj99、GS1683 和 GS1692)在 MLVA-15 聚类图上也聚为一簇(图 1、图 2),表明 MLVA-15 分型方法不会对以往 MLVA-16 分析遗传关系的结果产生较大的改变。

表 2 MLVA-15 各 VNTR 位点在 51 株布鲁氏菌中的多态性

Tab 2 Genetic diversity of MLVA-15 VNTRs in 51 *B. melitensis* isolates

VNTR 名称	等位基因数	HGDI	置信区间	Max(Pi)
Bruce04	6	0.718	0.638-0.779	0.451
Bruce09	3	0.078	0.000-0.178	0.961
Bruce13	2	0.113	0.000-0.227	0.941
Bruce16	6	0.645	0.543-0.748	0.529
Bruce15	2	0.477	0.409-0.545	0.627
Bruce17	4	0.581	0.475-0.688	0.588
Bruce24	9	0.886	0.862-0.911	0.196
Bruce30	7	0.812	0.762-0.862	0.314
Bruce42	2	0.077	0.000-0.175	0.961
Bruce43	3	0.416	0.272-0.559	0.745
Bruce45	1	0	0.000-0.130	1
Bruce55	1	0	0.000-0.130	1
Bruce72	5	0.779	0.729-0.829	0.353
BruceVNTR1	13	0.887	0.853-0.921	0.196
BruceVNTR25	2	0.147	0.023-0.272	0.922

2.3 MLVA-15 与 BruMLSA21 分型方法的比较

对 21 个基因的测序结果表明,51 株羊种布鲁氏菌菌株共发现 4 个序列型(Sequence type, ST),分别为 ST8、ST137、ST138 和 ST139。其中 37 株属于 ST8、ST139 菌株也比较常见(12 株),ST138 和 ST137 仅有 1 株。4 个序列型之间的差异很小,是由三个基因的单核苷酸突变引起的,表明我国羊种布鲁氏菌流行株在遗传上是十分保守的(表 3)。

表 3 51 株羊种布鲁氏菌流行株序列型分析

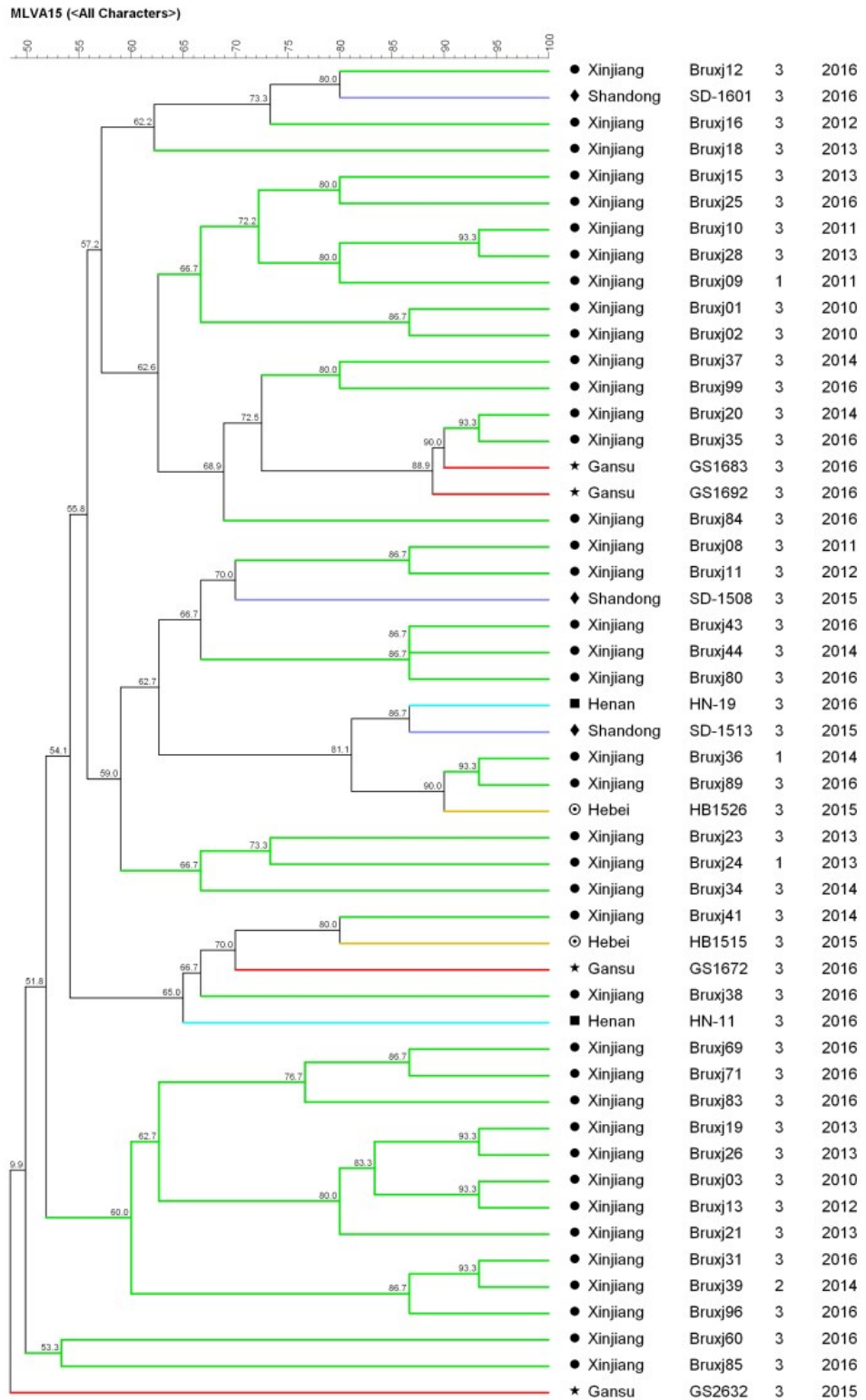
Tab 3 ST designation of 51 *B. melitensis* strains

序列型(ST)	菌株数量	csdB	ddlA	fbaA
137	1	427(C→A)		1(A→G)
138	1		476(G→C)	1(A→G)
139	12			1(A→G)
8	37			

3 讨论与小结

以 MLVA 和 MLSA 为主的分子分型方法在分析布鲁氏菌变异程度和遗传关系上起到重要作用。MLVA 利用布鲁氏菌基因组中的 VNTR 位点来研

究布鲁氏菌遗传多态性,因为不同拷贝数的重复序列经常出现在不同种或同一个种的不同株、型之间。其中,MLVA-16 分型方法最为常用^[10-11]。该法包括 16 个 VNTR 位点,分为 Panel 1 和 Panel 2 两组。Panel1 的 8 个位点的多态性较低,仅用于遗传关系较远的菌株的鉴别,尤其是布鲁氏菌在种水平上的鉴别。Panel2 的 8 个位点具有中等或较高的遗传多态性,适用于遗传关系较近的同种(或生物型)菌株的鉴别^[4,9]。这种 VNTR 位点组合可以分析流行菌株之间的差异和遗传关系,但对国内当前布鲁氏菌流行菌株的鉴别能力略显不足。对于国内羊种布鲁氏菌,16 个 VNTR 位点仅有 3 个位点(Bruce04、Bruce16、Bruce30)具有较高多态性,1 个位点(Bruce43)具有中等多态性,其余 12 个位点的多态性很低或没有任何多态性。研究建立的 MLVA-15 方法减少了 MLVA-16 中 8 个不具有多态性的位点,增加了 7 个多态性较高的位点,提高了对布鲁氏菌流行菌株的鉴别能力,可以满足布病流行病学调查中对传染源和传播途径精确追溯的需求。

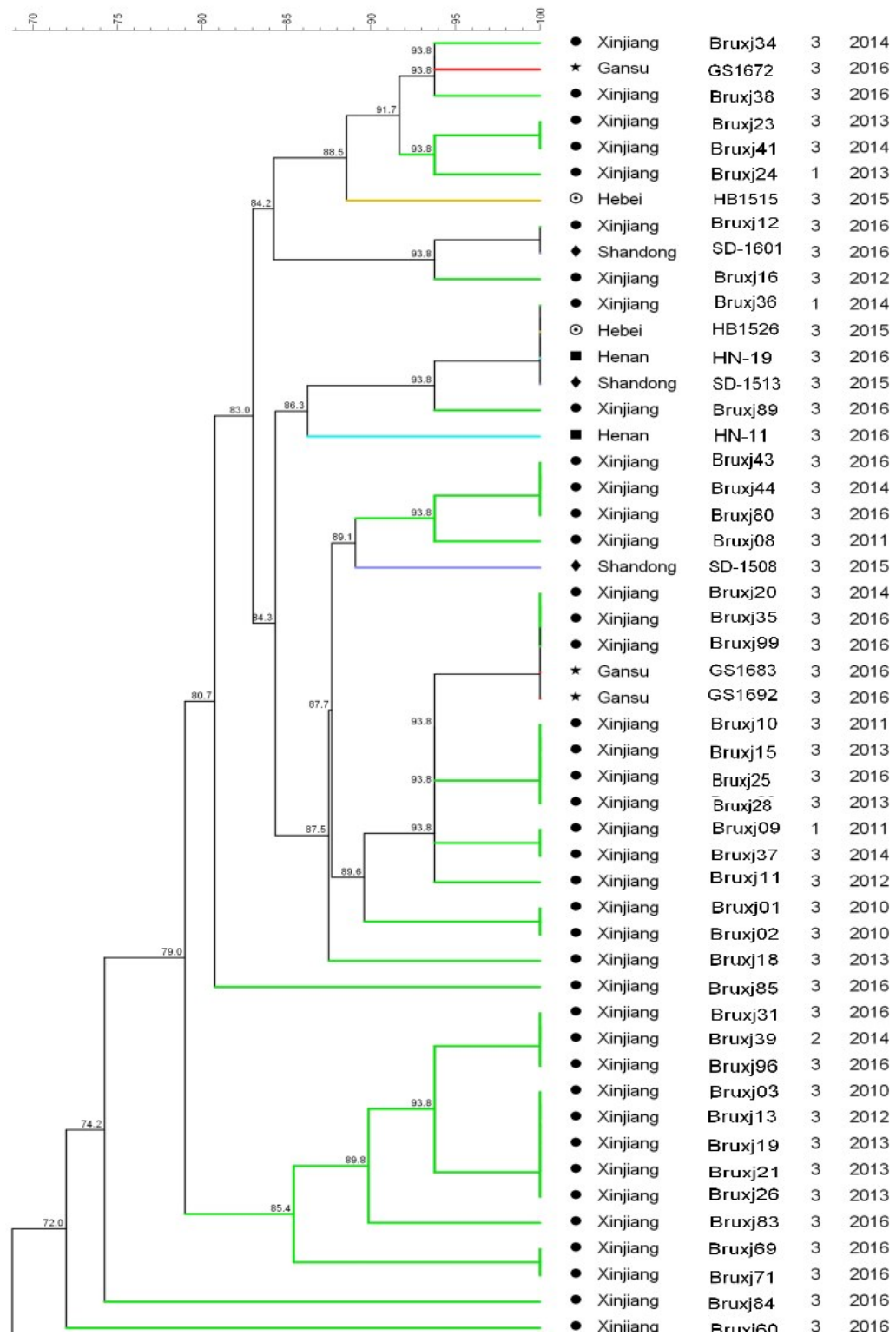


右侧数据依次为菌株分离地点、名称、生物型和分离时间

Right columns represents isolation location, names, biotype and isolation date

图 1 51 株我国羊种布鲁氏菌 MLVA-15 聚类分析结果

Fig 1 MLVA-15 cluster analysis on 51 *B.melitensis* isolates



右侧数据依次为菌株分离地点、名称、生物型和分离时间
Right columns represents isolation location, names, biotype and isolation date

图 2 51 株我国羊种布鲁氏菌 MLVA-16 聚类分析结果
Fig 2 MLVA-16 cluster analysis on 51 *B. melitensis* isolates

BruMLSA21 分型是利用布鲁氏菌 21 个看家基因的单核苷酸多态性来区分菌株的方法,核苷酸序列变异也可反映菌株之间的进化关系。BruMLSA21 分析表明,我国大部分羊种布鲁氏菌流行株属于 ST8,同时还存在一些不常见的序列型。BruMLSA21 与 BruMLSA9 相比(仅发现一个基因型 ST8)^[7],对菌株区别能力大有提高,但与传统的 MLVA-16 和新建立的 MLVA-15 分型方法相比,对菌株的分辨能力还是很低。尽管增加基因个数或长度可以增加其分辨力,但同时也增加了测序成本,不适合推广使用。因为有全球化的数据库(<https://pubmlst.org/>),便于各国分离菌株之间的比较,BruMLSA21 在分析各国布鲁氏菌菌株的遗传多态性以及进化分析方面仍具有参考意义^[8,12]。

除了 MLVA 和 BruMLSA21,基于全基因组测序的 SNP 分型方法(WGS-SNPs based typing)对布鲁氏菌菌株具有极高的辨别能力,也开始用于我国布鲁氏菌流行菌株的遗传多态性和进化关系分析^[13],但是由于检测成本较高,该方法目前使用较少。因而在未来的一段时期,基于不同 VNTR 位点组合的 MLVA 分型技术仍将在布鲁氏菌的分离鉴定及遗传关系分析方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, *et al.* Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella* - host interactions[J]. The Am J Pathol, 2015, 185(6): 1505-1517.
- [2] Jiang H, Fan M, Chen J, *et al.* MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates [J]. BMC Microbiol, 2011, 11(1):256.
- [3] France D, Patrick B, Sascha A D, *et al.* Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay [J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1):1-14.
- [4] Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis [J]. Methods Mol Biol, 2009, 551:141-158.
- [5] 周晓艳,陈燕芬,崔步云,等. 我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(5): 371-375.
Zhou X Y, Chen Y F, Cui B Y, *et al.* Study on Multiple-locus sequence typing of *Brucella melitensis* biovar 3 in China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(5): 371-375.
- [6] Whatmore A M, Perrett L L, MacMillan A P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing [J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 34.
- [7] Whatmore A M, Koylass M S, 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.
- [8] Sun M J, Di D D, Li Y, *et al.* Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains currently circulating in Xinjiang, China[J]. Infect Genet Evol, 2016, 44: 522-529.
- [9] Huynh L Y, Ert M N V, Hadfield T, *et al.* Multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) of *Brucella* spp[M]// Identifies species-specific Markers and insights into phylogenetic relationships. America: Humana Press, 2008:47-54.
- [10] Tian G Z, Cui B Y, Piao D R, *et al.* Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of Chinese *Brucella* strains isolated from 1953 to 2013 [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1):89.
- [11] Xiao P, Yang H, Di D, *et al.* Genotyping of human *Brucella melitensis* biovar 3 isolated from Shanxi province in China by MLVA16 and HOOF [J]. PloS one, 2015, 10(1), e0115932.
- [12] Shome R, Krithiga N, Shankaranarayana P B, *et al.* Genotyping of Indian antigenic, vaccine, and field *Brucella* spp. using multi-locus sequence typing [J]. Infect Dev Ctries, 2016, 10(3):237-244.
- [13] Sun M, Jing Z, Di D, *et al.* Multiple locus variable-number tandem-repeat and single-nucleotide polymorphism-based *Brucella* typing reveals multiple lineages in *Brucella melitensis* currently endemic in China [J]. Front Vet Sci, 2017, 4:215.

(编辑:李文平)