

• 临床检验研究论著 •

9 株羊布鲁杆菌的基因突变研究*

李桂侠, 宋法云, 郁宝慧

(山东省郯城县第一人民医院 276100)

摘要:目的 对从血流感染的患者体内分离得到的 9 株致病菌进行菌属鉴定, 从 DNA 水平分析 9 株菌与标准菌株的染色体差异。方法 常规方法确定布鲁氏菌属, 用分子生物学技术克隆 9 株布鲁氏菌的致病基因 OMP25、OMP31、UGPB 及 BP26, 进行 DNA 测序后, 与羊标准菌株比对分析。结果 9 株致病菌株均为羊种布鲁氏菌, 与标准菌株相应基因序列比对发现, 9 株布鲁氏菌与标准菌株间存在相同或不同水平的碱基差异。碱基突变、缺失、插入等形式均有出现。结论 证实从患者血液中分离得到的菌株均为羊种布鲁氏菌, 并与标准菌株间存在分子差异。

关键词:布鲁氏菌病; 血流感染; 菌株分离; 鉴定; 羊布鲁氏菌; 碱基差异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0407-02

The study on gene mutation about 9 strains of *Brucella melitensis**

Li Guixia, Song Fayun, Yu Baohui

(People's Hospital of Tancheng in Shandong Province 276100, China)

Abstract: Objective To isolate 9 strains of pathogens from the blood of patients and identify the species of the strains, and to analyze the differences between the nine bacterias and the standard strains on DNA levels. **Methods** Conventional type test were carried out to identify that all of the 9 stains were the *Brucella*. Molecular biology techniques were used to clone the pathogenic genes OMP25, OMP31, UGPB and BP26 of the nine *Brucella*, DNA sequencing and comparative analysis. After sequencing, compared with the standard strain. **Results** All of the 9 strains of pathogens were *Brucella melitensis*, and compared with the corresponding gene sequences of standard strains. We found that there were the same or different differences between the nine strains and the standard strain on DNA levels. Base mutations, deletions, insertions, and other forms have appeared. **Conclusion** It could be confirmed that the 9 strains isolated from the blood of the patients were *Brucella melitensis*, and had the molecular differences between the 9 stains and the standard strain.

Key words: brucellosis; bloodstream infections; strains isolation; *Brucella melitensis*; identification; nucleotide differences

布鲁氏菌大多分布于地中海沿岸国家、西亚及拉丁美洲部分地区, 随着世界贸易市场的扩宽, 动物品种的广泛流通, 布鲁氏菌的人畜疫情在我国部分以畜牧业为主地区出现回升。但是近年来, 我国农业为主的平原地区也陆续出现布鲁氏菌病的案例。本实验通过从山东省郯城县 9 例疑似布鲁氏菌病患者血液内分离到布鲁氏菌, 并进行培养、鉴定及分子水平研究。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株 从山东省郯城县 9 例患者血液中分离获得布鲁氏菌。

1.2 仪器与试剂 BACTEC9050 血培养系统; CO₂ 培养箱; 柯氏染液; 氧化酶纸片; CFX connect Real-Time PCR System 试剂盒; BIO-RAD CFX Manager 软件; 2 × long taq mix 试剂盒。

1.3 实验引物 (1) BP26 forward: ATG AAC ACT CGT GCT AGC AAT T; BP26 reverse: CTT GAT TTC AAA AAC GAC ATT GAC C; 目标基因为 GenBank: AAO39775.1; PCR 产物大小为: 750 bp。(2) UGPB forward: ATG TTC ACG CAA TCA TAC ATC CG; UGPB reverse: TTA TTG AGC TGC GGC GAT TGC; 目标基因为 Gene ID: 5204123; PCR 产

物大小为: 1 335 bp。(3) OMP31 forward: ATG AAG TCC GTA ATT TTG GCG TC; OMP31 reverse: TTA GAA CTT GTA GTT CAG ACC GAC; 目标基因为 Gene ID: 5203320; PCR 产物大小为: 723 bp。(4) OMP25 forward: ATG CGC ACT CTT AAG TCT CTC G; OMP25 reverse: TTA GAA CTT GTA GCC GAT GCC G; 目标基因为 Gene ID: 5201563; PCR 产物大小为: 606 bp。

1.4 细菌分离与鉴定 所有操作均在生物安全柜中进行, 操作者严密安全防护。将血培养系统报阳性的血培养瓶转种血平板放 CO₂ 培养箱, 48 h 后可见微弱生长, 72 h 可见针尖状菌落, 9 株菌革兰染色均为革兰阴性球杆菌, 氧化酶、触酶试验均为阳性, 柯氏染色均呈红色, 用 API20NE 鉴定均为苯丙酮酸嗜冷菌(试剂盒可将布鲁氏菌错误地鉴别为苯丙酮酸嗜冷菌); 结合患者临床症状, 初步鉴定为疑似布鲁氏菌。

1.5 PCR 检测 (1) 细菌 DNA 提取; (2) PCR 的反应体系: 2 × long taq mix 12.5 μL, Forward primer 10 μmol/L 1 μL, Reverse primer 10 μmol/L 1 μL, Autoclaved distilled water 8.5 μL, cDNA 1 μL。(3) PCR 的反应条件: 94.0 °C 3 min, 94.0 °C 30 s, 59.0 °C 20 s, 72.0 °C 30 s, 40 个循环, Melt Curve 65~

* 基金项目: 临沂市科技发展计划项目(项目编号: 201113076)。

作者简介: 李桂侠, 女, 主管检验技师, 主要从事医学检验研究。

95 ℃(每 10 s 上升 0.5 ℃),读板,72 ℃ 15 min;16 ℃ 10 min。

2 结 果

2.1 PCR 结果 将 9 株菌株的 OMP25、OMP31、UGPB 及 BP26 基因通过 PCR 反应后,经荧光定量 PCR 分析软件 BIO-RAD CFX Manager 检测,均为特异性产物。

2.2 DNA 测序结果 将特异性产物直接送测序,峰值单一,结果可信。将结果与 NCBI 上目的片段比对后分析发现:与标准菌株对比,虽具有较高的同源性,但也存在一定基因的改变。

(1)BP26 基因中变异菌株 8 在 BP26 的 66 位点处出现 G-T 的突变,67 处插入一个碱基 T,菌株 1~9 在标准菌株 498 位点均出现 T-C 突变,如图 1(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。尽管存在这一系列的碱基突变,但并没有影响编码氨基酸的改变,是无意义突变。(2)OMP25 基因中变异菌株 1~9 在标准菌株 276 位点处出现 T-C 的突变,286 处出现 A-G 的突变,这一突变使得编码的氨基酸由 N 变为 D,369 处出现 T-C 的突变,405 处出现 T-C 的突变,577 处出现 A-T 的突变,597 处出现 C-A 的突变。但是,由于密码子的简并性这一系列的突变并没有引起氨基酸的改变。此外,在 553 处插入了大小为 36 个碱基的染色体片段,对应的,插入的氨基酸 NKNYD-LAGTTVR。如图 2(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。(3)UGPB 基因中变异菌株 1~9 在标准菌株 458 位点、484、840、925 处分别出现 T-C、C-T、A-G、T-C 的突变。这一系列的突变引起编码的氨基酸改变分别为:L-P、H-Y、I-M、Y-H。变异菌株 6 在标准菌株 1 098 位点处出现 G-A 的突变,此外,变异菌株 1~9 在标准菌株 1134 位点处插入碱基 G。这两处的突变并没有影响编码氨基酸的改变。如图 3(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。(4)OMP31 基因中变异菌株 1~9 在标准菌株 202、203、210、224、326、361、514、515 位点处分别出现 G-A、G-A、C-T、T-C、A-C、C-A、C-G 的碱基突变。这一系列的突变引起氨基酸编码的改变分别为:G-A、H-Q、P-G、L-S、S-G、N-K 及 P-S。375 位点处,除变异菌株 3 外,其他 8 株菌均出现 C-A 的突变。而在菌株 3 处发生了 C-G 的突变,虽然发生了不同碱基的突变,但所引起的氨基酸的变化是相同的,均发生了 N-K。变异菌株 3 在标准菌株 325、375、538、592 位点处出现 T-G、C-G、A-G、A-G 的突变,相应的引起氨基酸的改变分别为:L-A、N-K、K-E、N-D。而在 366 处发生的 C-G 突变并没有影响编码氨基酸的改变。如图 4(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

3 讨 论

布鲁氏菌病是人畜共患传染性疾病,主要通过呼吸道、消化道等途径传播,其病原菌为布鲁氏菌。根据细菌学特征和感染宿主的偏爱性,将布鲁氏菌属分为 6 个种,分别为羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌和沙林鼠种布鲁氏菌^[1]。其中羊种布鲁氏菌最为广泛流行,是引发布鲁氏菌病最为典型的菌株,也是危害人、畜健康重要的病原菌。

布鲁氏菌通过其表面的外膜蛋白特异性识别宿主表面受体,选择性进行黏附并寄居在宿主细胞上,黏附后在细胞膜上释放毒素,来建立自身适宜的生存环境免遭宿主清除。因此我们可以认为布鲁氏菌通过外膜蛋白和毒力因子来发挥致病作用^[2]。在此我们主要研究 OMP25、UGPB、OMP31、BP26。早在上世纪 80 年代就已发现布鲁氏菌的外膜蛋白,并认为是潜

在的免疫性和保护性抗原。OMP25 蛋白是 OMPA 家族中重要的一个外膜蛋白,它在维持细菌外膜结构稳定性中发挥着重要的作用。此外,有研究表明,OMP25 还与布鲁氏菌的毒力有关^[3]。OMP31 是布鲁氏菌的另一个保护性抗原,不仅对维持布鲁氏菌外膜的完整性起重要作用,还是一种潜在的血红素利用蛋白,与布鲁氏菌对铁的摄取有关^[4-10]。UGPB 蛋白具有黏附和定居宿主细胞的能力,能够特异性识别红细胞、上皮细胞、巨噬细胞表面受体,在布鲁氏菌和宿主细胞相互作用中起重要作用。BP26 是一个周质蛋白,根据其所在的胞内定位,可能起着重要作用,目前已有报道,BP26 对布鲁氏菌的毒力,特别是胞内生存方面发挥重要作用,但是具体发挥了什么作用,还有待进一步研究。

我们此次研究发现,9 株布鲁氏菌与羊标准菌株间存在相同或不同水平的碱基差异。根据统计学知识及相关分析证实从人体分离得到的 9 个菌株均为羊种布鲁氏菌,并与标准菌株间存在分子差异。同时发现,在 9 株布鲁氏菌的这 4 个基因中均出现碱基突变、插入、缺失等碱基变化,而这一系列 DNA 水平的变化也不同程度影响到编码氨基酸的改变,但是否引起蛋白水平的变化,进而影响布鲁氏菌致病性以及侵袭力的改变还有待进一步研究。这 9 株变异株是否是布鲁氏菌变异株或为新的菌型尚不明确,有待进一步深入研究。

本次鉴定的 9 株菌均为羊种布鲁氏菌,患者均系接触外来病羊(或吃涮羊肉)而感染,证实了均系外源性传染源输入我县,且受到波及。

我省近几年畜牧业发展较快,从外省引进家畜较多,也为布鲁氏菌的输入埋下了隐患。这一系列案例的发现不仅为了解我县布鲁氏菌的流行情况提供帮助,还提示我们:该病应成为引起我们高度重视的公共卫生问题之一;应增强疫情观念,加强布鲁氏菌病防治队伍建设,提高防治水平,加强牲畜入境检疫。

参考文献

- [1] Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1920: 377-378.
- [2] 王远志. 绵羊种布鲁氏菌致病的分子机制研究[D]. 新疆石河子: 石河子大学, 2008.
- [3] Boigegrain RA, Salhi I, Alvarez-Martinez MT, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25[J]. Infect Immun, 2004, 72: 5693-5703.
- [4] Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, et al. *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein[J]. Microbes Infect, 2006, 8(10): 1203-1208.
- [5] Di Giannatale E, De Massis F, Ancora M, et al. Typing of *Brucella* field strains isolated from livestock populations in Italy between 2001 and 2006[J]. Vet Ital, 2008, 44(2): 383-388.
- [6] Martín-Martín AI, Caro-Hernández P. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells[J]. Microbes Infect, 2008, 10(6): 706-710.
- [7] Grilló MJ, Marin CM, Barberán M, et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams[J]. Vaccine, 2009, 27(2): 187-191.
- [8] Wang Y, Chen Z, Qiao F, et al. The type IV secretion(下转第 411 页)

2.3 FibroScan、APRI 及 FIB-4 联合诊断轻中度肝纤维化的性能分析见表 3。与 3 种方法单独诊断相比, FibroScan 联合 APRI 或 FIB-4 诊断轻、中度肝纤维化的特异度无明显改变, 敏感度显著提高。FibroScan 联合 APRI 及 FibroScan 联合 FIB-4 诊断轻度肝纤维化患者的敏感度由单纯 FibroScan 诊断的 54.33% 上升至 63.94% 和 65.78%, 诊断中度肝纤维化患者的敏感性由单纯 FibroScan 诊断的 60.74% 上升至 64.56%, 66.58%。

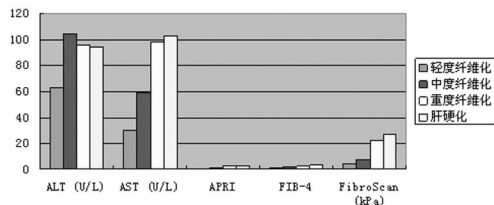


图 1 入选患者临床资料的差异

3 讨论

我国是乙肝病毒感染人数最多的国家, 每年近 30 万人死于肝脏相关疾病, 如肝硬化、肝癌等, 而肝纤维化是肝炎发展至肝硬化、肝癌的必经道路。有学者发现, 在肝纤维化早期给与积极干预能够在一定程度上逆转其纤维化程度^[10-11]。因此, 尽早发现肝纤维化并准确判定纤维化程度对预防肝硬化和肝癌, 降低死亡率有着至关重要的作用。

相对较传统的肝穿刺活检而言, 无创的检测方法更易被大多数乙肝患者接受, 因此探寻一种无创而又能准确判断肝纤维化程度的方法显得尤其必要而迫切。FibroScan 技术以超声技术为基础, 通过检测肝脏硬度来判定其纤维化程度, 因其安全、无创、可重复性强的优点而被广泛用于肝纤维化程度的检测。但有研究发现, FibroScan 技术的准确性并不理想, 尤其是在 ALT 明显升高的患者中, FibroScan 评估肝纤维化程度的准确性显著降低^[12]。单一应用 FibroScan 技术对患者的肝纤维化程度进行测定容易造成误诊。因此, 我们需要探寻多项指标联合检测的方法, 对肝纤维化程度做出准确判断。

本研究发现, 在重度肝纤维化、肝硬化的患者中, FibroScan、APRI、FIB-4 3 种检测方法单独判断肝纤维化程度的准确性是值得肯定的(敏感性为 76.87%~94.62%), 但是在轻度及中度肝纤维化患者中, 其敏感性欠佳, 仅为 54.33%~63.31%。采用 FibroScan 结合 APRI 及 FibroScan 结合 FIB-4 的方法后, 对轻度肝纤维化诊断的敏感性由 54.33% 上升至 63.94% 及 65.78%, 而对中度肝纤维化诊断的敏感性由 60.74% 上升至 66.58% 及 64.56%, 此方法值得在临床上推荐使用。

总之, FibroScan 联合 APRI 或 FIB-4 测定乙肝患者肝纤维化程度的敏感性显著优于 FibroScan、APRI、FIB-4 单独测定

的敏感性, 而特异性无明显改变, 此方法是早期准确判断肝纤维化的可靠途径。鉴于早期症状不明显的乙肝患者并不愿意接受有创的肝脏活检, 从而导致不能准确判断其肝纤维化的程度, 也就不能给与早期干预和治疗。而本研究提出的联合多种无创检测的方法能够为其提供准确判断肝纤维化的有效手段之一。

参考文献

- [1] Scott DR, Levy MT. Liver transient elastography (Fibroscan): a place in the management algorithms of chronic viral hepatitis[J]. *Antivir Ther*, 2010, 15(1): 1-11.
- [2] Kim SU, Lee JH, Kim DY, et al. Prediction of liver-related events using fibroscan in chronic hepatitis B patients showing advanced liver fibrosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): 366-376.
- [3] Zhang YG, Wang BE, Wang TL, et al. Assessment of hepatic fibrosis by transient elastography in patients with chronic hepatitis B[J]. *Pathol Int*, 2010, 60(4): 284-290.
- [4] Castera L, Foucher J, Bernard PH, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13369 examinations [J]. *Hepatology*, 2010, 51(3): 828-835.
- [5] Kim SU, Kim DY, Park JY, et al. How can we enhance the performance of liver stiffness measurement using FibroScan in diagnosing liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B[J]. *Clin Gastroenterol*, 2010, 44(1): 66-71.
- [6] Coco B, Oliveri F, Maina AM, et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases [J]. *Viral Hepat*, 2007, 14(5): 360-369.
- [7] Courane S, Browne JE, Fagan AJ. The effects of fatty deposits on the accuracy of the Fibroscan? liver transient elastography ultrasound system[J]. *Phys Med Biol*, 2012, 57(12): 3901-3914.
- [8] 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(2): 162.
- [9] Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group [J]. *Hepatology*, 1996, 24(2): 289-293.
- [10] 李诺飞, 杜开春. 血浆同型半胱氨酸和肝纤维化标志物在肝硬化患者中的检测结果 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(2): 231-232.
- [11] 徐海红. 血清对氧酯酶 I 与慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化的关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(7): 789-790.
- [12] Chen XB, Zhu X, Chen LY, et al. Accuracy of FibroScan for the diagnosis of liver fibrosis influenced by serum alanine aminotransferase levels in patients with chronic hepatitis B [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2011, 19(4): 286-290.

(收稿日期: 2012-09-21)

(上接第 408 页)

system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 303(1): 92-100.

[9] Gupta VK, Rout PK, Vihan VS. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M [J]. *Res Vet Sci*, 2007, 82

(3): 305-313.

[10] Connolly JP, Comerchi D, Alefantis TG, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development [J]. *Proteomics*, 2006, 6(13): 3767-3780.

(收稿日期: 2012-12-09)