

· 论 著 ·

布鲁菌 PCR 快速检测方法的建立及应用*

徐明忠, 张如胜, 苏 良

(湖南省长沙市疾病预防控制中心 410006)

摘要:目的 建立布鲁菌聚合酶链反应(PCR)方法, 对其进行应用评价。方法 针对布鲁菌外膜蛋白编码基因(*omp-2*)设计 PCR 引物, 建立 PCR 方法, 利用 19 种常见细菌和布鲁菌株 DNA 分别对其进行特异性和敏感度评价, 对 3 株疑似布鲁菌株进行核酸检测, 并与分离培养法进行结果比对。结果 本研究建立的布鲁菌 PCR 检测方法仅能检出布鲁菌阳性菌株, 对照菌 DNA 未出现目的条带; 敏感度为 100 拷贝/反应; PCR 方法对 3 株疑似布鲁菌株检出 *omp-2* 基因条带, 鉴定结果为布鲁菌, 与分离培养法结果相同。结论 本研究建立了一种布鲁菌 PCR 检测方法, 与分离培养法相比, 布鲁菌 PCR 方法准确、快速, 适合布鲁菌疫病的快速检测。

关键词: 布鲁菌; 聚合酶链反应; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)13-1760-03

Establishment and application of a rapid PCR detection method of *Brucella* spp. *

XU Mingzhong, ZHANG Rusheng, SU Liang

(Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410006, China)

Abstract: Objective To establish a polymerase chain reaction(PCR) method for detecting *Brucella* spp. and to evaluate its application. Methods The PCR primer aiming at the outer membrane protein(*omp-2*) coding gene were designed and the PCR method for detecting *Brucella* spp. was established. By using DNA of 19 kinds of common bacteria and *Brucella* spp., the specificity and sensitivity were evaluated. Three strains of suspected *Brucella* spp. were performed the nucleic acid detection. Then, 3 suspected strains of *Brucella* spp. were amplified by the PCR method with *omp-2* gene, and the results were compare to the those by the culture method. Results The established *Brucella* spp. PCR detection method could only detect the *Brucella* spp. positive strain, the control bacterium DNA did not appear the target band; the sensitivity was 100 copies/response; the PCR method detected *omp-2* gene band in 3 strains of suspected *Brucella* spp., which was identified as *Brucella* spp. and was same to the results by the isolation culture method. Conclusion The established PCR method for detecting *Brucella* spp. is accurate and rapid compare with the isolation and culture method, which is suitable for the rapid detection of brucellosis epidemic situation.

Key words: *Brucella* spp.; polymerase chain reaction; gene

布鲁菌病(简称布病)是一种人畜共患传染病, 人感染布鲁菌后出现反复发热, 同时伴有乏力、关节痛等症状, 容易发展为慢性病。布鲁菌分为 6 个经典种和 19 个亚型, 不同种、型之间亲缘性很近^[1], 其中布病主要由羊、牛、猪、犬种布鲁菌感染引起。近年来, 布病疫情形势较为严峻, 数据显示, 2004 年 12 月至 2010 年 7 月, 中国共报告布病实验室诊断病例 141 604 例^[2]。2012 年, 长沙市宁乡县发生布病疫情, 为了对该疫情病原体进行准确、快速地检测, 本文在分离培养法检测的同时, 建立聚合酶链反应(PCR)方法对可疑布鲁菌菌株进行了核酸检测, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本及菌株来源 湖南省长沙市宁乡县疾病预防控制中心送检的布病疑似患者血液标本 3 例, 布鲁菌阳性菌株及 19 株常见细菌菌株由本中心实验室保存。

1.2 仪器与试剂 Mycycler™ thermal cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DYC-31E 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 通用型核酸快速提取试剂盒(华瑞安生物); Platinum® PCR Su-

perMix(美国 invitrogen 公司)。

1.3 PCR 引物 针对布鲁菌外膜蛋白编码基因(*omp-2*)设计 PCR 引物(*omp-2*-F: 5'-CCA GCC ATT GCG GTC GGT A-3'; *omp-2*-R: 5'-GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA-3', 预期目的片段 190 bp), 引物序列由上海 Life Technologies 公司合成。

1.4 PCR 扩增 将布鲁菌阳性菌株, 19 株常见细菌菌株及 3 株疑似布鲁菌菌株提取 DNA 后保存于 -20 °C 备用, 根据实验目的分别利用 *omp-2* 引物和 PCR 商品化试剂盒(invitrogen Platinum® PCR SuperMix)进行 *omp-2* 基因 PCR 扩增, 反应体积共 25 μL: Platinum® PCR SuperMix 23.0 μL; 20 μmol/L *omp-2*-F、*omp-2*-R 引物各 0.5 μL, 待检 DNA 1.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 再按 94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s 循环 30 次。PCR 扩增完成后取 5 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳(100 V 30 min), 观察有无预期目的片段(190 bp)。

1.5 分离培养鉴定 将 3 例疑似布病患者无菌静脉血(5 mL)分别注入 2 个含双相培养基的血培养瓶中, 轻轻混合倾

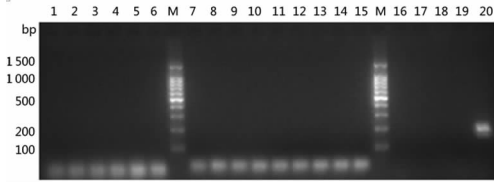
* 基金项目: 湖南省卫生和计划生育委员会科研课题项目(B2015-153)。

作者简介: 徐明忠, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验工作。

斜,使被检血液均匀分布在琼脂斜面上,置 37 °C 温箱培养,3 d 后观察结果。如未见布鲁菌生长,可按上述方法再倾斜,使血液均匀涂在琼脂斜面上,继续培养,每隔 1 d 观察 1 次,如有可疑布鲁菌菌落,可分纯至琼脂试管培养基,进一步作布鲁菌鉴定,血培养 30 d 仍不出菌,判定为阴性。

2 结 果

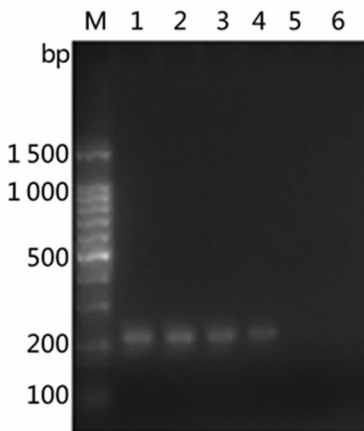
2.1 PCR 方法特异性分析结果 1 株布鲁菌(第 20 泳道)在 PCR 反应中出现目的条带(190 bp),结果为阳性,其他 19 种常见对照细菌均为阴性,表明 PCR 反应特异性强,见图 1。



注: M 为 100 bp DNA Marker; 1 为金黄色葡萄球菌; 2 为肠炎沙门菌; 3 为鼠伤寒沙门氏菌; 4 为伤寒沙门氏菌; 5 为单核细胞增多性李斯特氏菌; 6 为英诺克李斯特菌; 7 为变形杆菌属; 8 为奇异变形杆菌; 9 为肠致病型大肠杆菌; 10 为产志贺毒素大肠杆菌; 11 为肠出血型大肠杆菌; 12 为大肠杆菌; 13 为副溶血性弧菌; 14 为铜绿假单胞菌; 15 为肠侵袭型大肠杆菌; 16 为痢疾志贺菌; 17 为宋内氏志贺菌; 18 为鲍氏志贺菌; 19 为福氏志贺菌; 20 为布鲁菌。

图 1 布鲁菌 PCR 检测方法特异性扩增电泳图

2.2 PCR 反应敏感度结果 将 PCR 特异性分析中扩增出的布鲁菌阳性 PCR 扩增产物进行 TA 克隆、测序验证后构建质粒(大连宝生物生物技术公司完成)。然后利用本研究建立的布鲁菌 PCR 方法同时检测 10 倍系列稀释的布鲁菌 DNA 质粒($1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^5$ copies/ μ L)来评价布鲁菌 PCR 方法敏感度。检测结果显示 1~4 泳道出现预期目的条带(190 bp), PCR 反应敏感度为 100 拷贝/反应,表明本研究建立的布鲁菌 PCR 方法敏感度高。见图 2。



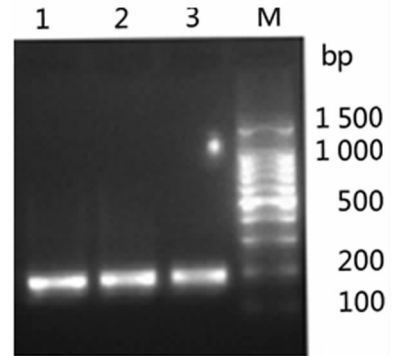
注: M 为 100 bp DNA Marker; 1~6 分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^0 拷贝/反应。

图 2 布鲁菌 PCR 方法敏感度分析

2.3 分离培养法鉴定结果 3 例疑似布病患者血液标本经 1 周左右培养,均生长出无色透明、圆形、针尖大小的疑似布鲁菌菌落(编号分别为 NX201201、NX201202、NX201203),进一步菌落转种和血清凝集试验鉴定为布鲁菌。

2.4 疑似布鲁菌 PCR 扩增结果 利用布鲁菌特异性基因引物

(*omp-2-F*、*omp-2-R*) 对 NX201201、NX201202、NX201203 株 DNA 进行 PCR 扩增,均出现 190 bp 的预期 *omp-2* 基因片段,扩增结果表明上述 3 株菌均为布鲁菌。见图 3。



注: M 为 100 bp DNA Marker; 1、2、3 分别为 NX201201、NX201202、NX201203 菌株 *omp-2* 基因 PCR 扩增产物。

图 3 3 株疑似布鲁菌 PCR 电泳图

3 讨 论

目前,针对布病的检测主要依赖分离培养法和免疫学方法^[3],分离培养方法是金标准,但分离培养鉴定耗时较长,且易受病期的长短、抗菌药物治疗等因素的影响而降低布鲁菌分离的阳性率;免疫学方法(虎红平板凝集试验、试管凝集试验)简便、快速,适合布病的大面积筛检,但也存在不能区分现症和既往感染、自然感染和布病疫苗免疫后出现的抗体等不足之处,需要和其他方法联合应用来确诊布病的感染。随着分子生物学技术的发展,国内外有较多采用 PCR 方法(荧光定量 PCR 方法、普通 PCR 方法)进行布鲁菌检测的报道^[4-5], Debeaumont 等^[6]利用荧光定量 PCR 方法对疑似布病患者的血液标本进行了检测,结果表明该方法适用于分离培养方法结果阴性或免疫学诊断存在抗体交叉反应的布病患者的诊断;文献^[7]利用荧光定量 PCR 方法对 1 例布鲁菌型脊髓炎患者进行了诊断,相比常规培养方法,该方法具有较高的特异性和敏感性;但同时荧光定量 PCR 由于需要昂贵的荧光定量 PCR 仪和较高的试剂成本而限制了其广泛的应用^[8]。文献^[9]利用 PCR 方法对布鲁菌进行了筛查和分型鉴定研究,该研究不但可以对布鲁菌属进行检测,还可以鉴定出牛、羊、猪种布鲁菌,同时还证实 PCR 方法的特异性和灵敏性均高于血清凝集试验。

本研究参考文献^[10],针对 *omp-2* 设计 PCR 引物,配合 invitrogen 公司的 Platinum[®] PCR SuperMix,建立布鲁菌属 PCR 检测方法,成功将 NX201201、NX201202、NX201203 菌株鉴定为布鲁菌,和分离培养方法结果相同;相比分离培养方法,本研究建立的布鲁菌属 PCR 方法具有快速,准确的优势;相比荧光定量 PCR 方法,本方法具有经济便宜(无需昂贵的荧光定量 PCR 仪和合成探针)和引物保存时间较长的优势,适合突发布病疫情的快速检测。同时普通 PCR 方法扩增后的产物可以直接进行核苷酸测序和基因分析,本研究中的 NX201201、NX201202、NX201203 菌株即通过 PCR 产物直接测序证实为羊种布鲁菌。本研究建立的 PCR 方法仅能确定是否为布鲁菌,尚不能进行分型鉴定是其不足之处,下一步将尝试分型鉴定和对血液标本提取核酸后直接进行 PCR 扩增,来减少布病职业暴露的风险。

资料单独来源于神经外科而不包含非神经外科资料有关), 必须对碳青霉烯类药物使用加以规范; 上述所有药物均不宜经验性用于治疗本院鲍曼不动杆菌感染。米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦在本院使用时间不长, 耐药率相对较低, 分别为 28.6%、31.8%, 所以临床应考虑将米诺环素或头孢哌酮/舒巴坦作为本院治疗鲍曼不动杆菌感染的首选药物。但米诺环素和头孢哌酮/舒巴坦具有较高的中介率(分别为 29.0% 和 38.2%), 一方面临床可以在安全剂量范围内适当加大用药剂量以使中介鲍曼不动杆菌株变为敏感株, 另一方面也应防止乱用或滥用这些药物。

综上所述, 本院神经外科病房鲍曼不动杆菌的临床感染和耐药性已经非常严重, 而鲍曼不动杆菌基因组的相关研究发现其具有快速获得和传播耐药性的能力^[5], 所以防止鲍曼不动杆菌的交叉感染显得尤其重要, 这就需要临床医护人员加强各种综合性治疗措施: 要求神经外科病房加强环境和呼吸机等设备的管理; 严格执行无菌操作规程、各种消毒隔离制度和手卫生规范制度; 尽可能减少各种侵入性操作、尽量缩短各种置管的留置时间、尽快停机拔管或尽早使用鼻面罩机械通气治疗以缩短机械通气时间; 应加强感染标本送检率、及时进行细菌耐药性监测并根据实验室的药敏试验结果选择合适的抗菌药物。

参考文献

- [1] Zolldann D, Thiex R, Hifner H, et al. Periodic surveillance of nosocomial infections in a neurosurgery intensive care unit[J]. *Infection*, 2005, 33(3): 115-121.
- [2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(3): 538-582.
- [3] Fu Y, Zhou J, Zhou H, et al. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(4): 644-650.
- [4] Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection

[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(12): 1271-1281.

- [5] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊疗与防控专家共识[J]. *中国医药科学*, 2012, 2(8): 3-8.
- [6] 徐一鸣, 王蓓, 蒋晓飞. 2008 至 2012 年鲍曼不动杆菌临床感染分布及耐药特征分析[J]. *检验医学*, 2014, 29(3): 245-248.
- [7] Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8(12): 751-762.
- [8] 徐惠, 马智超, 罗明, 等. 某三甲综合性医院 20 年间出院患者年龄结构变迁[J]. *中国卫生统计*, 2013, 30(5): 758-759.
- [9] 张勇, 周华, 杨青, 等. 鲍曼不动杆菌临床分布、耐药性分析和肺部感染病例的预后研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(5): 530-533.
- [10] 何发明, 范晶, 余泽波, 等. ICU 中痰标本来源的鲍曼不动杆菌的临床意义分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(5): 357-361.
- [11] 周玉, 丛玉隆, 曲芬. 鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗策略研究进展[J]. *传染病信息*, 2014, 27(3): 184-188.
- [12] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(5): 321-329.
- [13] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(5): 321-330.
- [14] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2014, 14(5): 365-374.

(收稿日期: 2016-02-14 修回日期: 2016-04-26)

(上接第 1761 页)

参考文献

- [1] 钟志军, 于爽, 徐杰, 等. 布鲁氏菌比较基因组学研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(4): 346-350.
- [2] 刘志国, 罗成旺, 张利, 等. 多重荧光定量 PCR 方法鉴定布鲁氏菌属及牛羊种布鲁氏菌研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(9): 869-874.
- [3] Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-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.
- [4] 曾瑞霞, 苏玉虹. 布鲁氏杆菌各类检测方法的比较[J]. *现代畜牧兽医*, 2006(5): 65-70.
- [5] 高正琴, 邢进, 冯育芳, 等. TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(11): 995-1000.
- [6] Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. Real-time PCR

for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005, 24(12): 842-845.

- [7] Navarro-Martínez A, Navarro E, Casta MJ, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(1): 385-387.
- [8] Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, et al. Differentiation of *brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(1): 69-80.
- [9] 湛志飞, 张红, 黄一伟, 等. 一例输入性布鲁菌病的病原学诊断[J]. *实用预防医学*, 2009, 16(6): 1799-1800.
- [10] 李坚, 李铁锋, 王艾琳. 用 PCR 法对布鲁氏菌进行筛查及分型鉴定的研究[J]. *中国地方病防治杂志*, 2009, 24(4): 300-302.

(收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-05-04)