

宠物犬布氏杆菌的 PCR 检测及部分序列分析

孙明¹, 刘巧荣¹, 宋文静², 乔明明¹, 顾强², 张谦¹, 刘伯华¹, 杨雪松², 陈西钊^{1*}

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100094; 2. 北京关忠动物医院, 北京 100025)

摘要: 对北京关忠动物医院送检的 2 例疑似感染布氏杆菌宠物犬的 7 份分泌物进行了布氏杆菌普通 PCR、快速实时荧光 PCR 检测和 Multi-PCR 鉴定, 并对部分基因序列测序分析, 旨在对宠物犬感染犬布氏杆菌作出确诊, 为宠物犬感染布氏杆菌诊断与防控提供资料。结果显示, 布氏杆菌快速实时荧光检测试剂盒对两例犬的 7 份分泌物检测结果均为布氏杆菌阳性; Multi-PCR 检测结果显示, 感染犬布氏杆菌属于犬种布氏杆菌, 且为非典型犬布氏杆菌; 序列分析进一步验证了患犬感染样品扩增的序列均为布氏杆菌序列: BSCP31 表面蛋白序列与已经发布的序列相比相似性在 99%~100%; OMP25 序列与中国内蒙古分离的犬布氏杆菌 xue1 分离株和韩国 *Brucella canis* HSK A52141 分离株亲缘关系最为亲近, 核苷酸相似性均为 99.9%; 16S rRNA 序列显示, 进口斗牛犬和泰迪犬感染菌株均属于布氏杆菌序列。以上试验结果表明两例宠物犬均为犬布氏杆菌感染, 这些数据将为布氏杆菌病的筛查和防控提供一定的基础。

关键词: 布氏杆菌; 宠物犬; PCR 检测; 序列分析

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)12-2520-06

PCR Detection and Partial Sequencing Analysis of *Brucella canis* from Pet Dogs

SUN Ming¹, LIU Qiao-rong¹, SONG Wen-jing², QIAO Ming-ming¹, GU Qiang²,

ZHANG Qian¹, LIU Bo-hua¹, YANG Xue-song², CHEN Xi-zhao^{1*}

(1. Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd, Beijing 100094, China;

2. Beijing GuanZhong Animal Hospital, Beijing 100025, China)

Abstract: Two cases of pet dogs were confirmed to be infected with *Brucella canis* based on detection to their excretion by use of the BRU real time PCR and conventional PCR kits, and the partial genetic sequences of the *Brucella canis* infected were characterized. The results showed that the *Brucella* strains from the pet dogs belong to the *Brucella canis*, and atypical canine brucellosis. Phylogenetic analysis of BSCP31 gene sequences showed 99%-100% nucleotide identity with the published sequences in GenBank, and OMP25 gene showed 99.9% nucleotide identity between *Brucella canis* xue1 strain and *Brucella canis* HSK A52141 strain. Sequence analysis on 16S rRNA showed the strains from French Bulldog and Teddy Dog belong to *Brucella*. These data might provide a valuable information for future screening and prevention of canine brucellosis.

Key words: *Brucella*; pet dogs; PCR detection; sequence analysis

布氏杆菌病 (brucellosis, 简称布病) 是由布氏杆菌引起的一种以流产和发热为特征的人兽共患病。该病分布广泛, 有 170 多个国家存在此病。该病不仅影响畜牧业的发展, 还直接威胁人类健康和

公共卫生安全。

1966 年 L. E. Carmichael 等首次在患病犬的组织 and 阴道分泌物中发现了犬种布氏杆菌^[1]。犬种布氏杆菌属于粗糙型菌株, 主要引起犬类动物发病,

收稿日期: 2016-06-16

基金项目: “十三五”国家重点研发计划 (2016YFD0501006)

作者简介: 孙明 (1963-), 男, 河北秦皇岛人, 博士, 主要从事分子病毒诊断技术研究, E-mail: sunming@anheal.com

* 通信作者: 陈西钊, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病与预防兽医学研究, E-mail: chenxizhao@anheal.com

被犬种布氏杆菌感染的犬可引起繁殖障碍(如流产、死胎、不孕等),也可表现非繁殖障碍症状(如视力缺陷、肌肉关节或皮肤受损等)。近几年,犬的饲养量大幅度增加,越来越多的人选择犬作为宠物,犬的品种繁杂、来源广泛,其疫病也较为复杂,导致犬布病的发病率逐年上升,而犬布病多呈隐性经过,不易察觉,当患病犬流产时才怀疑是布病,因此犬布病的准确检测对犬布病的防控和人类健康和公共卫生安全均有重要的意义。目前,布氏杆菌的检测方法主要有病原学诊断、血清学诊断和分子生物学诊断,前两种方法操作耗时、特异性和敏感性有待提高,且存在一定的风险;而以 PCR 为代表的分子生物学技术不仅用于布氏杆菌种及型的鉴定,还能反映基因间存在的差异,因此可在基因水平上进行分型和疫苗株的鉴定^[2],且 PCR 方法无风险,耗时短,对布氏杆菌病的监测和确诊具有很大的意义。

笔者对关忠动物医院送检的两例宠物犬的 7 份分泌物进行了 PCR 检测和种属鉴定,并对部分基因克隆测序,旨在对宠物犬感染布氏杆菌进行确诊,为犬布病的监测和防控提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 临床背景

病例 1:两只进口斗牛犬,一公一母,来自同一

窝,4 个月,白色。回国后发现 有 轻 微 感 冒,体 温 正 常,偶 尔 咳 嗽,鼻 涕 少,眼 屎 未 见 增 多。其 中 公 犬 辜 丸 发 育 迟 缓。采 样:母 犬 眼 鼻 分 泌 物(样 品 1)和 阴 道 分 泌 物(样 品 2),公 犬 眼 鼻 分 泌 物(样 品 3)和 阴 茎 分 泌 物(样 品 4)。

病例 2:母种犬,品种泰迪,2 岁,棕色。繁殖史:1 岁时怀孕生产,一切正常。第二次怀孕,怀孕不足 40 d,流产。采样:眼鼻分泌物(样品 5),阴道分泌物(样品 6),尿液(样品 7)。

1.2 菌体染色

将疑似分泌物进行革兰染色,显微镜下观察其形态特征。

1.3 载体和主要试剂

PMD19-T 克隆载体、EX-Taq DNA 聚合酶购自于大连 TaKaRa 公司;DH5 α 感受态细胞购自于北京全式金生物技术有限公司;总 DNA 提取试剂盒为北京世纪元亨动物防疫技术有限公司产品,胶回收试剂盒为 Omega 产品。布氏杆菌(BRU)快速实时荧光 PCR 检测试剂盒和布氏杆菌 PCR 检测试剂盒为北京世纪元亨动物防疫技术有限公司产品。

1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的布氏杆菌基因组和相应文献合成以下引物:由上海英骏生物技术有限公司合成,见表 1。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 The sequence of the primers for PCR amplification

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	产物大小/bp Expected size
16S rRNA	CATGGCTCAGAACGAACGCT	ACGACTTCACCCCAGTCGCT	1 420
OMP25	CATGGGCGGTTTACTC	CGGCCAGATCATAGTTC	650
BSCP	GGAACCGATCATTGAGGGATTA	CTATGCGGGAAGAGGACTGGTA	1 030

1.5 布氏杆菌 DNA 提取

按照北京世纪元亨动物防疫技术有限公司的 DNA 提取试剂盒操作说明提取布氏杆菌基因组 DNA,-20 ℃ 保存备用。

1.6 布氏杆菌检测

按照北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的布氏杆菌(BRU)实时荧光 PCR 检测试剂盒和布氏杆菌 PCR 检测试剂盒说明书进行鉴定。

1.7 Multi-PCR 鉴定

1.7.1 菌种鉴定 引物参照文献^[3]设计,见表 2。根据引物扩增目的片段大小不同判断种属。牛种布氏杆菌能扩增出 494 和 591 bp 片段,羊种布氏杆菌能扩增出 732 和 591 bp 片段,猪种布氏杆菌能扩增出 591 和 272 bp 片段,犬种布氏杆菌能扩增出 272 bp 片段。

表 2 牛羊猪犬种布氏杆菌 Multi-PCR 引物

Table 2 Multi-PCR primers of *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* and *B. canis*

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Expected size	目的菌种 <i>Brucella</i> species
PIS711f	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	494	<i>B. abortus</i>
P494r	GACGAACGGAATTTTCCAATCCC		
PIS711f	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	732	<i>B. melitensis</i>
P732r	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA		
P591f	CTGGTGGGTATCGCATTACTCGG	591	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 、 <i>B. suis</i>
P591r	TTCAGGAAAGCCTGGCGGTACTG		
P272f	GGAACACTACGCCACCTTGT	272	<i>B. suis</i> 、 <i>B. canis</i>
P272r	GATGGAGCAAACGCTGAAG		

1.7.2 典型和非典型鉴定 引物参考文献[4]设计,能扩增出 836、436 和 217 bp 片段的为典型布氏杆菌,扩增出 436 和 217 bp 片段的为非典型犬布氏

杆菌,扩增出 436、217 和大于 836 bp 的片段不是犬布氏杆菌。

表 3 鉴定犬典型和非典型布氏杆菌 Multi-PCR 引物

Table 3 Multi-PCR primers of Typical and Atypical *B. canis*

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Expected size
B. ab-f	GTCTTCCTGATTGCGGCTGG	436
B. ab-r	ACCACCAGCGACAGGAACATC	
B. can-f	GGCTTCCTCACGACATACCAG	836 或大于 836
B. can-r	CTGAACAGGATGCAATGACGC	
B. sul-f	CCACGAACGAGCGAACAGC	217
B. sul-r	CGGTAAAGCGTTGATTTCCATG	

1.8 基因扩增

用合成的 16S rRNA 引物、OMP25 引物和 BSCP 引物对样品 1 和 5 进行各基因扩增。扩增使用 20 μL 体系,依次加入 $10 \times \text{ExBuffer}$ 2 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL 、*ExTaq* 0.2 μL 、上下游引物各 1 μL (10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、灭菌纯水 11.8 μL 、布氏杆菌 DNA 2 μL 。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,35 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后用 OMEGA 公司胶回收试剂盒回收纯化扩增的目的基因片段。

1.9 扩增产物的亚克隆及测序

分别将 PCR 扩增得到的相应片段连接到

pMD19-T 中,然后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。用 PCR 方法筛选阳性克隆,将初步鉴定的阳性克隆送上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

1.10 序列同源性分析

应用 DNAMAN 和 DNASTAR 生物软件对基因序列与 GenBank 上登录的国内外有代表性的布氏杆菌相应序列进行同源性分析、比对,分析其序列特征。

2 结果

2.1 菌体染色

布氏杆菌革兰染色为阴性(红色),呈球杆状细

菌, 单个或多个存在, 见图 1。

2.2 布氏杆菌试剂盒检测

使用北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的布氏杆菌快速实时荧光 PCR 试剂盒(图 2)和布氏杆菌 PCR 试剂盒(图 3)对 7 份样品进行检测, 结果显示, 快速荧光试剂盒检测 7 份样品均为阳性, 普通 PCR 试剂盒检测 7 份样品中 5 份阳性, 2 份阴性。结果见表 4、图 2 和图 3。表 4 为快速荧光试剂盒检测 C_t 值, 可知眼分泌物病菌含量高于阴道分泌物和尿液中的病菌含量。

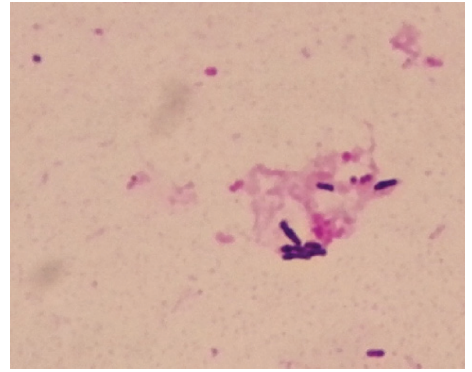
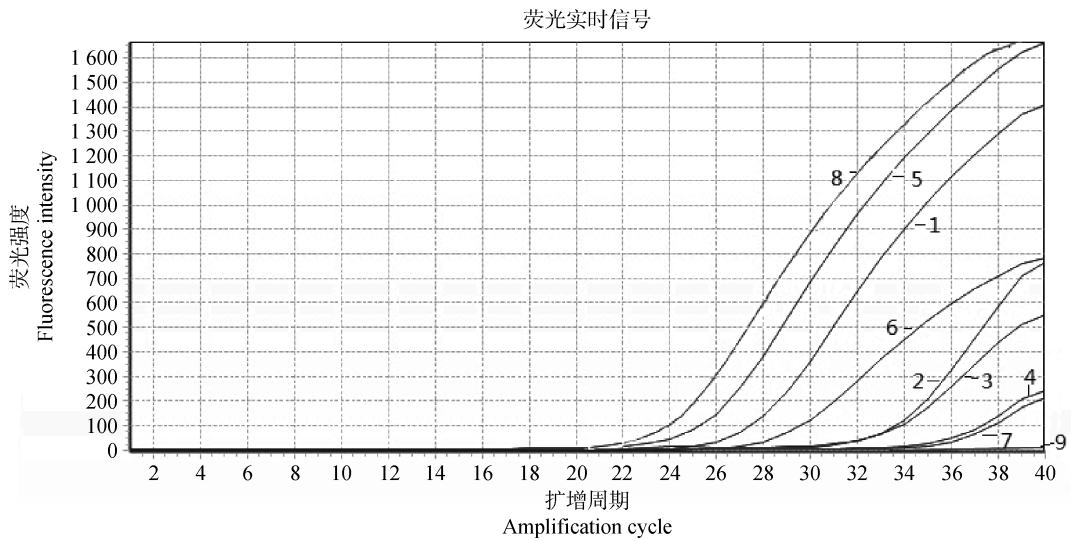


图 1 布氏杆菌感染犬分泌物染色(915×)

Fig. 1 Staining of secretion from *Brucella* infected pet dogs (915×)



1~7. 样品编号; 8. 阳性对照; 9. 阴性对照

1-7. Sample number; 8. Positive control; 9. Negative control

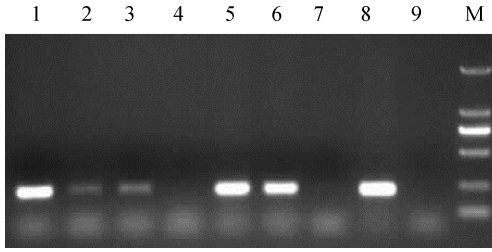
图 2 布氏杆菌快速荧光试剂盒结果

Fig. 2 Detection results of *Brucella* rapid fluorescent reagent kit

表 4 布氏杆菌快速荧光试剂盒检测 C_t 值

Table 4 Result of C_t values by *Brucella* rapid fluorescent reagent kit

犬品种 Dog species	样品编号 Sample number	样品来源 Sample source	C_t 值 C_t number	结果 Results
斗牛犬(母)	1	眼鼻分泌物	27.43	阳性
	2	阴道分泌物	33.61	阳性
斗牛犬(公)	3	眼鼻分泌物	33.83	阳性
	4	阴茎分泌物	37.29	阳性
	5	眼鼻分泌物	25.28	阳性
泰迪(母)	6	阴道分泌物	29.57	阳性
	7	尿液	37.75	阳性



1~7. 样品编号;8. 阳性对照;9. 阴性对照;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

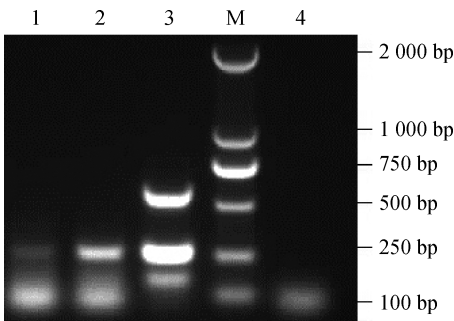
1-7. Sample number; 8. Positive control; 9. Negative control; M. DL2000 DNA marker

图3 布氏杆菌 PCR 试剂盒检测结果

Fig.3 Results of *Brucella* PCR kit

2.3 Multi-PCR 鉴定

用两种 Multi-PCR 对样品 1 和样品 5 进行扩增,牛羊猪犬 Multi-PCR 结果显示两个样品均能扩增出 272 bp 的片段,为犬种布氏杆菌,结果见图 4。典型非典型 Multi-PCR 结果显示能扩增出 436 和 217 bp 的片段,为非典型犬布氏杆菌,结果见图 5。

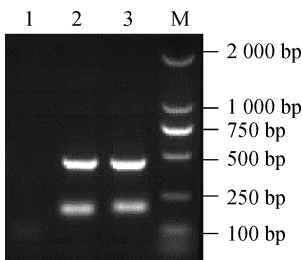


1. 样品 1;2. 样品 5;3. 疫苗株 S2 对照;4. 阴性对照;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1. Sample 1; 2. Sample 5; 3. Control of Vaccine S2 strain; 4. Negative control; M. DL2000 DNA marker

图4 牛、羊、猪、犬布氏杆菌 Multi-PCR 检测

Fig.4 The detection of Multiplex PCR for *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella canis*



1. 阴性对照;2. 样品 1;3. 样品 5;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

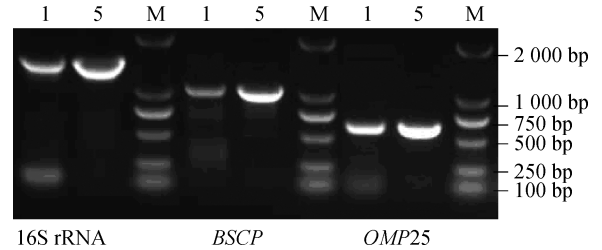
1. Negative control; 2. Sample 1; 3. Sample 5; M. DL2000 DNA marker

图5 典型和非典型布氏杆菌 Multi-PCR 结果

Fig.5 The results of Multi-PCR for Typical and Atypical *B. canis*

2.4 基因序列扩增

用 16S rRNA 引物、OMP25 引物和 BSCP 引物从样品 1 和样品 5 的 DNA 中扩增相应基因序列,结果显示,均获得大小合适的目的条带:16S rRNA 大小约为 1 400 bp, BSCP 大小约为 1 000 bp, OMP 25 约为 650 bp。结果详见图 6。



1. 样品 1;5. 样品 5;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1. Sample 1;5. Sample 5;M. DL2000 DNA marker

图6 基因序列扩增

Fig.6 Amplification results of genes

2.5 基因序列测序及分析

测序结果显示,样品 1(来自进口斗牛犬)和样品 5(来自泰迪犬)16S rRNA、OMP 25 和 BSCP 分别长 1 426、652 和 1 034 bp,核苷酸相似性均为 100%。将样品 5 的 16S rRNA、OMP25 和 BSCP 基因序列提交到 GenBank,登录号分别为 KX529832、KX529833 和 KX529834,将该菌株命名为 YH-C16。OMP 25 基因序列与我国内蒙古分离的 xue1 分离株和韩国 *Brucella canis* HSK A52141 分离株关系最为亲近,相似性为 99.9%,有两个核苷酸发生改变,但氨基酸没有改变。16S rRNA 基因序列分析显示,本次感染的菌株属于布氏杆菌。BSCP31 基因测序显示,两个菌株与 NCBI 上代表性的菌株相似性均在 99% 以上,其中与 *Brucella suis* SPC 株、*Brucella canis* RM6/66 株、SVA13 株以及 ATCC23365 等菌株核苷酸相似性为 100%。

3 讨论

2016 年 1 月,我单位收到关忠动物医院送检的两例疑似布病感染的 7 份样品,对其分别用布氏杆菌快速实时荧光 PCR 和布氏杆菌 PCR 试剂盒进行检测;快速实时荧光 PCR 检测试剂盒检测两例犬的 7 份分泌物均为布氏杆菌阳性,普通 PCR 检测试剂盒检测 7 份样品中 5 份阳性,2 份阴性,其中眼分泌物病菌含量最高,其次是阴道分泌物,尿液中病菌含

量最低。为对感染布氏杆菌进一步鉴定确诊,复采取 Multi-PCR 和序列测序的方法对样品 1 和样品 5 进行鉴定。Multi-PCR 表明两份样品均为犬种布氏杆菌感染,且为非典型布氏杆菌,这与患犬临床症状和测序结果相符(OMP25 基因序列与犬种分离株 xue1 相似性最高)。16S rRNA、OMP25 和 BSCP31 基因序列比对结果显示,布氏杆菌 16S rRNA、OMP25、BSCP31 等基因和 NCBI 基因库里的基因序列相似性均在 99% 以上,这说明布氏杆菌菌株之间、种属之间序列差异不大。

16S rRNA 为原核生物的一种核糖体 RNA。由于其基因序列的保守性和存在的普遍性,应用 16S rRNA 作为分子指标已逐渐成为微生物检测和分类鉴定的一种强有力工具^[3]。但也存在一些问题,比如水平基因转移、多拷贝的异质性、基因扩增效率的差异等^[5-6]。本研究对 16S rRNA 序列进行扩增,并扩增出了大小与目的片段大小相符的目的 DNA。OMP25 是 OmpA 家族成员之一,是布氏杆菌重要的外膜蛋白,在维持细菌外膜结构稳定中发挥重要作用^[7-8],此外,OMP25 还与布氏杆菌的毒力有关^[9]。BSCP31 是布氏杆菌表面蛋白,基因序列非常保守,目前其功能还不是很清楚,但基因缺失研究表明 BSCP31 并不影响细菌侵袭力和生长速度^[10]。本次扩增的 OMP25 和 BSCP31 序列,和犬布氏杆菌相应序列相比,相似性在 99% 以上,与狄栋栋^[2]和丁家波^[11]报道的一致。

目前 PCR 技术多用于人类布病的检测,对于动物布病这一方法尚未列入我国布病标准检测方法中。本研究从布氏杆菌试剂盒检测、Multi-PCR 种属鉴定和基因测序等方面对疑似感染布氏杆菌犬进行了鉴定,确诊了北京地区存在宠物犬感染布氏杆菌的病例,结果也进一步证实了布氏杆菌检测试剂盒的可靠性和准确性。本研究为以后布氏杆菌病的检测提供了很好的工具,也为布氏杆菌病的筛查以及防控提供了依据。

参考文献 (References):

- [1] CARMICHAEL L E, KENNEY R M. Canine abortion caused by *Brucella canis*[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1968, 152(6):605-616.
- [2] 狄栋栋. 犬布氏杆菌分离鉴定及 omp25 基因分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2011.
- DI D D. Isolation and identification of *Brucella canis*

and analysis of omp25 gene[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011(in Chinese).

- [3] 陈 思. 牛羊猪犬布鲁氏菌多重 PCR 方法的建立和试剂盒研制[D]. 北京:中国人民解放军军事科学院, 2014.
- CHEN S. The establishment of multiplex PCR method and detection kit for *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella canis*[D]. Beijing: PLA Academy of Military Science, 2014. (in Chinese).
- [4] HUBER B, SCHOLA H C, LUCERO N, et al. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species[J]. *Int J Med Microbiol*, 2009, 299(8):563-573.
- [5] BODILIS J, NSIGUE-MEILO S, BESAURY L, et al. Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in pseudomonas[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35647.
- [6] 刘 驰, 李家宝, 芮俊鹏. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2015, 35(9):2769-2788.
- LIU C, LI J B, RUI J P. The applications of the 16s rRNA gene in microbial ecology: current situation and problemes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(9):2769-2788. (in Chinese).
- [7] CLOECKAERT A, ZYGMUNT M S, BÉZARD G, et al. Purification and antigenic analysis of the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*[J]. *Res Microbiol*, 1996, 147(4):225-235.
- [8] EDMONDS M D, CLOECKAERT A, HAGIUS S D, et al. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant [J]. *Res Vet Sci*, 2002, 72(3):235-239.
- [9] EDMONDS M D, CLOECKAERT A, BOOTH N J, et al. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle [J]. *Am J Vet Res*, 2001, 62(9):1461-1466.
- [10] HALLING S M, DETILLEUX P G, TATUM F M, et al. Deletion of BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement[J]. *Infect Immun*, 1991, 59(11):3863-3868.
- [11] 丁家波, 毛开荣, 陈小云, 等. 8 株布氏杆菌 BCSP31 基因的序列分析[J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(3):13-16.
- DING J B, MAO K R, CHEN X Y, et al. Sequence analysis on BCSP31 genes of 8 different *Brucella* species[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2006, 40(3):13-16. (in Chinese)