

布鲁杆菌分子诊断技术最新研究进展

阿祥仁 蔡小玲 李子安 彭海 高世兰 赵文君

青海省人民医院检验科, 西宁 810007

通信作者: 蔡小玲, Email: caixiaoling0509@163.com

【摘要】 布鲁杆菌是一种胞内寄生菌, 具有高度传染性, 常能引起乙类传染病——布鲁杆菌病(布病)。布病不仅可导致巨大的经济损失, 也是威胁人群健康的主要风险因素。人类感染后会造或多器官损伤, 严重者可致残, 丧失劳动能力。无论从流行地域的广泛性, 还是危害程度的严重性, 布病都堪称世界性的传染病。防治布病迫在眉睫, 要做到早预防、早发现、早治疗, 才能够控制该疾病的流行。近年来, 分子生物技术的不断完善对提高布鲁杆菌感染的早期诊断和快速筛查具有重要意义。本文对鉴定布鲁杆菌最新的分子诊断技术进行阐述, 为布病的实验室诊断提供一定的理论依据。

【关键词】 布鲁杆菌; 布鲁杆菌病; 分子诊断技术

基金项目: 青海省科技厅基础研究计划项目(2019-ZJ-7087)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.01.016

布鲁杆菌是一种革兰阴性无鞭毛的短小杆菌, 布鲁杆菌感染可引起布鲁杆菌病, 又称布病。现在布病仍被认为是最重要的有高度传染性的全球人畜共患病^[1]。由于全球卫生和社会经济的不同, 布病在世界范围内发生了巨大变化。目前, 布病分布于全球 160 多个国家和地区, 全球每年有超过 500 000 例新发病例, 给社会带来了严重的经济负担^[2]。尽管中国是少数几个接种预防人类布病疫苗的国家之一, 但是在 2009 年, 中国的不同地区共发现 35 816 例布病^[3], 2015 至 2016 年共报道了 104 125 例布病^[4]。同时也有研究报道^[5], 未被发现的患者数量会更多。所以, 布病的快速准确诊断仍然是研究人员面临的挑战, 诊断布鲁杆菌感染需要通过生化反应和分离培养到布鲁杆菌, 然而取决于疾病的严重程度, 培养标本的敏感性通常会很低。近年来, 随着分子生物技术的开发, 其为许多微生物的诊断提供了新的鉴定方法, 并且与其他血清学测试相比, 耗时更短、准确率更高^[6]。

1. 布鲁杆菌蛋白指纹图谱鉴定法: 布鲁杆菌是高度传染性的细菌病原体, 有研究指出全世界一半的人口被认为有风险感染布鲁杆菌^[7], 主要分布于贫穷的农村地区。但是鉴定布鲁杆菌分离株可能因缺乏快速和具有成本效益的方法而受到阻碍。随着科学技术的发展, 与常规微生物学和分子生物学方法相比, 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是鉴定细菌的一种更快、更准确的方法^[8]。质谱鉴定细菌早在 1975 年就拉开了序幕^[9], 当时的研究人员利用质谱仪结合高温裂解技术第一次完成了细菌的鉴定, 但是当时的技术只能提供有限的生物信息。随着基质辅助激光解吸电离(MALDI)技术的不断完善, MALDI-TOF MS 可以准确地在其的水平上鉴定布鲁杆菌分

离物。在一项最新研究报告中^[10], 使用全自动快速微生物质谱检测系统(VITEK MS)构建了 MALDI-TOF MS 鉴定布鲁杆菌的参考数据库, 从 84 种不同的菌株(包括稀有或非典型菌株)中产生 590 个光谱来覆盖布鲁杆菌属。然后应用一种新的生物数学方法来区分不同的物种。这就能保证在属水平上准确鉴定布鲁杆菌分离物, 且没有错误鉴定。主要的畜共患物种(*B. melitensis*、*B. abortus* 和 *B. suis*)也可以在物种水平上鉴定, 准确度分别为 100%、92.9% 和 100%。该 MALDI-TOF 参考数据库将成为第一个经过验证的布鲁杆菌鉴定数据库, 这可以通过快速鉴定标本来改善布病的诊断和控制水平。另外, 布鲁杆菌属的微生物鉴定和分型程序较昂贵和耗时, 以及为了最大限度地降低操作人员风险, 必须在控制生物危害的设施中进行, MALDI-TOF-MS 测定的开发减少了处理时间, 同时也能保持性能标准。经过研究证明^[11], MALDI-TOF-MS 数据库在种属和物种水平上正确鉴定布鲁杆菌的准确率分别为 99.5% 和 97%, 且测定的性能和不同条件培养分离微生物无关^[11], 所以更加说明了在蛋白质水平鉴定比常规诊断方法更可靠。

2. 布鲁杆菌基因环介导等温扩增技术(LAMP)鉴定法: 聚合酶链反应(PCR)是诊断布病的重要工具^[12], 然而 PCR 基于转录间隔区(ITS)引物与 DNA 产生了交叉反应, 将人体感染的解糖假苍白杆菌误认为是布鲁杆菌^[13]。因此有必要设计一种快速、灵敏的即时检测方法, 以确保布鲁杆菌的早期诊断。有研究使用 LAMP 开发了布鲁杆菌的检测方法, 其中以 *bcs31* 和 *omp25* 基因用作靶基因, 该方法具有高度特异性和敏感性^[13]。在最新研究报告中^[14], 以 *omp25* 基因为靶向的 LAMP 试验检测布鲁杆菌的检出限为 17 pg, 反应可在 63 个循环、60 min 内完成, 这与检出限为 1.7ng 的常规

PCR 相比, LAMP 检测布鲁杆菌更敏感, 且没有观察到与肠埃希菌、肠沙门菌亚种、铜绿假单胞菌和巴斯德梭菌 4 种细菌之间的交叉反应。之后使用了 263 份样本用来评估反应, 得到 LAMP 和 PCR 之间的相符率为 91%, 相对特异度达到 87%, 相对敏感度达到 100%, 表明 LAMP 可以是一种诊断布鲁杆菌的更优越、更简单快速的方法^[15]。

3. 布鲁杆菌全基因组测序鉴定法: 用于医学微生物学中常规细菌鉴定的方法包括生化试验、质谱或分子生物学技术的组合方法。近年来, 全基因组测序(WGS)被认为是在临床微生物学中一种具有革命潜力的技术^[16]。由于积累了大量公开可用的病原菌 DNA 序列数据库, 这为使用细菌基因组测序进行鉴定提供了机会。20 年前, 第一个细菌流感嗜血杆菌基因组序列的完成震动了细菌学世界^[17]。全基因组鸟枪测序、高通量测序和单分子长读序列三次测序革新将成为细菌学中尚未尝试应用的首选方法^[18]。尽管目前细菌基因组测序仍然是一种相对昂贵的鉴定和分型方法, 但是却越来越受欢迎, 因为细菌基因组测序能降低复杂性, 提高物种鉴定的有效性, 所以全基因组测序法是鉴定布鲁杆菌感染的又一选择方法。

4. 其他分子鉴定方法: 现代的细菌分类中, DNA-DNA 分子杂交一直是细菌分类的黄金法则, 杂交百分数越高, 说明细菌线性序列的相似性就越高, 根据进化发育树说明他们的亲缘性就越近。另外, 16sDNA 序列分析只能在属的水平上区分细菌, 继续向下一步鉴定还需借助其他辅助分子手段。细菌的管家基因 *rpoB* 也可以帮助鉴定细菌, 但是在布鲁杆菌中的检验还需进一步验证。

5. 目前临床常用的检测方法: 目前临床上鉴定布鲁杆菌的检测方法有常规血培养、血清学凝集试验、PCR、质谱鉴定等。虽然血培养分离布鲁杆菌是诊断的金标准, 但缺点是培养分离率低及抗生物等的影响, 不能快速及时得到准确诊断; 血清学凝集试验的检测方法较多, 能快速检出阳性标本, 但是有敏感度和特异度差异大的缺点; PCR 是美国疾病预防控制中心(CDC)推荐的布病筛选方法之一, 是大部分实验室检测布鲁杆菌的常用检测方法, 主要有细菌基因组重复序列 PCR(REP-PCR)方法和限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)。REP-PCR 是操作最简单、分辨力最强的一种方法, PCR-RFLP 可用于种属的鉴定, 常用的引物有 3 对^[19]。PCR 扩增方法中提取高质量的 DNA 是该方法的关键, 对实验室的要求也比较高。另外, 越来越多的医院微生物室或疾控中心都有了 MALDI-TOF 质谱仪, 用于常规对培养物的鉴定, 但要特别注意实验室生物安全。

6. 目前国内外已有的商品化试剂: 目前国内外布鲁杆菌的前处理都采用甲酸提取法。检测方法中常用的商品试剂盒有 plate agglutination test (PAT) 和 standard agglutination test (SAT), 由于商业诊断方法的局限性, 更多的文献报道了自己的优化方案^[20]。

7. 展望: 分子生物学鉴定是近年来逐渐发展起来的技术, 结合最新技术的应用, 布鲁杆菌在基因和蛋白检测的

基础上, 通过对分子方法不断地完善改进, 布鲁杆菌的鉴定分型手段呈多元化的趋势。展望未来, 通过构建布鲁杆菌患者血清蛋白的数据库, 不再以分离培养细菌为依据, 质谱技术将成为我国布病预防控制的支撑技术, 能快速筛查出布鲁杆菌感染的血清蛋白丰度的变化, 同时为提高和扩展布病防控能力提供新模式、新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Abd El-Wahab EW, Hegazy Y, El-Tras WF, et al. A multiple risk model for brucellosis at the human-animal interface in Egypt[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(6):2383-2401. DOI: 10.1111/tbed.13295.
- [2] Dean AS, Crump L, Greter H, et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency[J]. *PLoS Negl Trop*, 2012, 6(5): 1-9. DOI: 10.1371 / journal.pntd.0001865.
- [3] Ran X, Chen X, Wang M, et al. Brucellosis seroprevalence in ovine and caprine flocks in China during 2000-2018: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1):393. DOI: 10.1186/s12917-018-1715-6.
- [4] Wang L, Liang C, Wu W, et al. Epidemic situation of brucellosis in Jinzhou city of China and prediction using the ARIMA model[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2019, 13(21): 1429462. DOI: 10.1155/2019/1429462.
- [5] Dahouk AS, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans [J]. *Rev Sci Tech*, 2013, 32(2): 177-188. DOI: 10.20506 / rst.32.1.2204.
- [6] Rahman SU, Zhu L, Cao L, et al. Prevalence of Caprine brucellosis in Anhui province, China[J]. *Vet World*, 2019, 12(8): 558-564. DOI: 10.14202/vetworld.2019.558-564.
- [7] Cleaveland S, Sharp J, Abela-Ridder B, et al. One health contributions towards more effective and equitable approaches to health in low-and middle-income countries[J]. *Halliday Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017, 372(1725): 20160168. DOI: 10.1098/rstb.2016.0168.
- [8] Yamashita T. Rapid decision of ESBL from blood culture positive bottles (using MALDI-TOF MS and Sysmex UF-5000) [J]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*, 2018, 28(1):9-13.
- [9] Rocco VG, Intra J, Sarto C, et al. Rapid identification of carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae strains by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight using Vitek® mass spectrometry system [J]. *Eurasian J Med*, 2019, 51(3):209-213. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2019.18405.
- [10] Mesureur J, Arend S, Cellière B, et al. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of Brucella[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 18(12): e0006874. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006874.
- [11] Sali M, De Maio F, Tarantino M, et al. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of brucella strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0197864. DOI: 10.1371 / journal.pone.0197864.
- [12] Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction[J]. *Sci Am*, 1990, 262: 56-61. DOI: 10.1038 / scientificamerican0490-56.

- [13] Saini S, Gupta VK, Gururaj K, et al. Comparative diagnostic evaluation of OMP31 gene based TaqMan® real-time PCR assay with visual LAMP assay and indirect ELISA for caprine brucellosis[J]. Trop Anim Health Prod, 2017, 49(6):1253-1264. DOI: 10.1007/s11250-017-1323-7.
- [14] Liu Q, Wei J, Sun Q, et al. Detection of brucellosis in sika deer (*cervus nippon*) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. J Wildl Dis, 2017, 53(3): 612-615. DOI: 10.7589/2016-05-105.
- [15] Trangoni MD, Gioffré AK, Cerón Cucchi ME, et al. LAMP technology: rapid identification of brucella and mycobacterium avium subsp. paratuberculosis[J]. Braz J Microbiol, 2015, 46(2): 619-626. DOI: 10.1590 / S1517-838246220131206.
- [16] Muller BH, Mollon P, Santiago-Allexant E, et al. In-depth comparison of library pooling strategies for multiplexing bacterial species in NGS[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2019, 95(1):28-33. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.014.
- [17] Loman NJ, Pallen MJ. Twenty years of bacterial genome sequencing[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(12):787-794. DOI: 10.1038/nrmicro3565.
- [18] Talamantes-Becerra B, Carling J, Kennedy K, et al. Identification of bacterial isolates from a public hospital in Australia using complexity-reduced genotyping[J]. J Microbiol Methods, 2019, 160:11-19. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.03.016.
- [19] Bahmani N, Mirnejad R, Arabestani MR, et al. Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of Brucella isolates from human and livestock specimens[J]. Saudi J Biol Sci, 2019, 26(2): 256-262. DOI: 10.1016 / j. sjbs.2017.08.017.
- [20] Qin L, Nan W, Wang Y, et al. A novel approach for detection of brucella using a real-time recombinase polymerase amplification assay[J]. Mol Cell Probes, 2019, 48: 101451. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.101451.

继续教育学分, 答题二维码和方法见活插页)

- 布鲁杆菌病的主要传染源是()
 - 患病的羊、牛等疫苗
 - 羊、牛等牲畜粪便
 - 布鲁杆菌病患者的血液
 - 布鲁杆菌病患者的粪便
- 布鲁杆菌病主要的传播途径是()
 - 输血
 - 破损的皮肤黏膜、消化道和呼吸道等
 - 食用动物内脏
 - 食用牛、羊肉
- 下列选项中不属于布鲁杆菌病临床表现的是()
 - 发热、乏力、多汗
 - 关节疼痛
 - 肝、脾、淋巴结肿大
 - 抽搐
- 布鲁杆菌病的潜伏期是()
 - 一般为 2~3 周, 平均 2 周
 - 一般为 1~3 周, 平均 2 周
 - 一般为 2~4 周, 平均 3 周
 - 一般为 1~2 周, 平均 1 周
- 布鲁杆菌病实验室诊断的检查方法是()
 - 血象、红细胞沉降率等一般实验室检查
 - 免疫学检查
 - 病原学检查
 - 以上都是

(收稿日期:2019-07-26)

(本文编辑:张媛)

测试题(均为单选题,已注册参加本栏目学习者可获得 II 类

·读者·作者·编者·

本刊有关文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时,应采用负数幂的形式表示,如 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式; 组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在首次出现不常用的法定计

量单位处用括号加注与旧制单位的换算系数,下文再出现时只列法定计量单位。人体及动物体内的压力单位使用 mmHg 或 cmH_2O , 但文中首次出现时用括号加注 ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。正文中时间的表达,凡前面带有具体数据者应采用 d 、 h 、 min 、 s , 而不用天、小时、分钟、秒。量的符号一律用斜体字母。