

[16] Bruel A, Touhami-Carrier M, Thomaidis A, et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) and TSP-1-derived heparin-binding peptides induce promyelocytic leukemia cell differentiation and apoptosis[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(2A): 757-764.

[17] Saumet A, Slimane MB, Lanotte M, et al. Type 3 repeat/ C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/alphavbeta3 in promyelocytic leukemia NB4 cells[J]. *Blood*, 2005, 106(2): 658-667.

[18] Mateo V, Brown EJ, Biron G, et al. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: Link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization[J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2882-2890.

[19] Schnetzke U, Spies-Weissbart B, Yomade O, et al. Polymorphisms of toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia[J]. *Genes Immun*, 2015, 16(1): 83-88.

[20] Barcellini W, Imperiali FG, Zaninoni A, et al. Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(8): 1768-1773.

[21] Li Y, Qi X, Tong X, et al. Thrombospondin 1 activates the macrophage Toll-like receptor 4 pathway[J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(6): 506-512.

[22] Ueno H, Okita H, Akimoto S, et al. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62233.

[23] Fleitas T, Martinez-Sales V, Vila V, et al. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(11): 897-902.

[24] Shanafelt TD, Byrd JC, Laplant B, et al. Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(6): 660-664.

[25] 刘澎, 王一, 杨仁池, 等. 腺病毒介导的凝血酶敏感蛋白 1 抗血管新生衍生物基因转移抑制 K562 细胞裸鼠体内生长[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(6): 485-488.

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.044

(收稿日期: 2015-05-11 修回日期: 2015-07-10)

基于 PCR 的几种分子检测技术在布鲁氏菌鉴定中的应用

赵 波¹综述, 崔步云^{2△}审校

(1. 重庆市疾病预防控制中心微生物所 400042; 2. 中国疾病预防控制中心传染病所, 北京 102206)

[关键词] 聚合酶链反应; 分子检测; 布鲁氏菌
[中图分类号] R117 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2015)34-4868-02

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌属的细菌侵入机体引起的人兽共患传染病, 常造成牲畜流产和人类多器官的损害。布鲁氏菌属基于宿主特异性分为 6 个种 19 个型: 马耳他布鲁氏菌(羊型布鲁氏菌)3 个型、流产布鲁氏菌(牛型布鲁氏菌)8 个型、猪布鲁氏菌 5 个型和犬种布鲁氏菌、林鼠布鲁氏菌、绵羊布鲁氏菌各 1 个型^[1], 其中, 引起人类疾病的主要有羊、牛、猪和狗布鲁氏菌。布鲁氏病遍布全球, 是一个在世界范围内发生的流行性疾病, 严重危害流行地区的人们健康和带来巨大的经济损失。全世界 160 多个国家和地区每年向 WHO 报告发病例数 50 万例^[2]。中国从 2000 年起布鲁氏菌病疫情出现上升趋势, 并且由原来主要局限在几个重要的牧区, 近几年全国几乎所有省(自治区、直辖市)都有病例报道, 人间发病率达到 1.55/10 万^[3]。由于布鲁氏菌的病原学和致病特点, 大量的活菌操作都被要求在生物安全三级实验室中进行^[4], 而关于布鲁氏菌的常规的细菌学鉴定, 比如生化、生物学等鉴定都涉及大量活菌的操作, 但国内的实际是三级实验室只有极少数实验室装备。因此, 近年发展起来的基于聚合酶链反应(PCR)检测与鉴定布鲁氏菌的一些方法引起了大家的重视, 与常规的检测方法比较,

它需要的菌量少, 并且不要求活菌, 极大地降低了实验室感染概率, 在生物安全二级实验室就可以进行。本文就目前基于 PCR 检测和鉴定布鲁氏菌的方法的研究和应用综述如下。

1 普通 PCR 检测技术

普通 PCR 根据布鲁氏菌的一段特异性核酸序列来设计引物, PCR 检测布鲁氏菌最早是由 Bailly 报道的, 目前使用得较多的目标基因有 16SrRNA、BCSP31、omp2^[4-8]等。选择不同的目标基因对检测的结果敏感性和特异性都有影响^[9], 有研究以 16SrRNA、BCSP31、omp2 作为目标基因进行比较, 研究它们在血中做 PCR 检测布鲁氏菌的灵敏度和特异度差异, 得出 16SrRNA 检测相对灵敏度是最低的, 而 BCSP31 检测是最敏感的^[10]。

2 多重 PCR 检测技术

多重 PCR 在微生物检测中的应用一般是设计多种病原微生物的特异性引物, 在同一 PCR 反应管进行 PCR 扩增, 可用于同时检测多种病原体或鉴定出是哪一型病原体感染。Probert 等^[11]对多重 PCR 检测布鲁氏菌进行了研究, 但只能区分少数的几种布鲁氏菌。García-Yoldi 等^[12]根据布鲁氏菌不

同种的特异性 DNA 片段设计引物,一共设计了 8 对引物,多重 PCR 扩增后按照电泳片段多寡和片段大小不同可以对 6 种布鲁氏菌都进行区分。刘志国等^[13]将多重 PCR 与荧光 PCR 技术结合进行研究,建立的方法有灵敏度高、快速、易操作等优点,可用于布鲁氏菌快速鉴定,并同时确定是否为牛种或羊种布鲁氏菌。

3 AMOS-PCR 检测技术

布鲁氏菌的 AMOS-PCR 检测是基于细菌染色体上的重复插入序列 IS711 的发现建立的,IS711 对布鲁氏菌属是特异性的,而且在绝大多数布鲁氏菌种的染色体上至少有一个拷贝序列^[14]。有研究者^[15-16]根据布鲁氏菌不同种 IS711 位置的差异设计引物,一共设计了 5 条引物,建立了 AMOS-PCR 检测布鲁氏菌的方法:即将一个共用引物锚定在这段 IS711 序列上,其他 4 条不同的引物分别选在与 IS711 序列邻近的 DNA 的特异序列中,通过 4 个 PCR 反应的扩增产物的大小和有无来鉴别布鲁氏菌种。这种方法能检测牛布鲁氏菌的生物 1、2 和 4 型,羊布鲁氏菌的所有 3 种生物型,猪布鲁氏菌的生物 1 型和绵羊布鲁氏菌的所有生物型^[15]。后来为了区分布鲁氏菌疫苗株 S19 和 RB51,另外 3 条引物被增加到上述的 AMOS-PCR 方法中^[16-17]。AMOS-PCR 能检测大部分布鲁氏菌到种^[15]。

4 细菌基因组重复序列 PCR(Rep-PCR)检测技术

研究发现细菌基因组中存在一些特殊的重复序列,常见的包括基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindromic, REP)、肠杆菌基因间重复一致序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus,ERIC)和 BOX^[18-19],BOX 是 DNA 序列中一种特异的功能序列,它们在菌株、种、属水平上进化过程有相对保守性,但分布有差异。Rep-PCR 通过扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列,然后对电泳条带进行分析比较,来揭示基因组间的差异,在细菌演化和流行病学研究中是一种重要的手段^[20]。在 3 种重复序列中,根据 BOX 重复原件设计引物的 Rep-PCR 对细菌的区分能力是最高的^[21]。

5 多位点可变数目串联重复序列分析技术(MLVA)

基因组的研究发现细菌基因组中分布着一种可变量目串联重复序列(variable-number tandem-repeat, VNTR),VNTR 有一定的序列和重复的特点。MLVA 的原理即根据研究的需要选取多个 VNTR 位点设计引物,通过多个 PCR 扩增这些位点序列,依据电泳结果,必要时也可以通过测序得出 VNTR 大小、位点的不同以达到菌株分型的目的。Flèche 等^[22]用筛选了 15 个微卫星串联重复序列等位标记对已知的 236 株布鲁氏菌菌株进行了分析,分出来的簇和原本的生物型符合度高。并且他们将 15 个等位标记分成两组,一组由 8 个标记组成,能够将布鲁氏菌区分到种;另外一组由 7 个标记组成,有更高的分型能力,能够对种进行分型。由于 MLVA 可以数字分析的优势,有研究机构建立了在线的布鲁氏菌 MLVA 数据库,巴黎第 11 大学于 2007 年建立了基于 MLVA 分型方法的在线数据库(<http://mlva.u-psud.fr/brucella/>),访者可以免费浏览和查询该数据库^[23]。在线数据库的应用将极大地方便全球布鲁氏菌分析的交流和比较。

以上几种基于 PCR 建立的检测和鉴定布鲁氏菌的方法比较,普通 PCR 只能够将布鲁氏菌鉴定到属;多重 PCR 能够将布鲁氏菌鉴定到一些种,但多重 PCR 对 DNA 提取的纯度和 PCR 反应体系的条件要求较高,否则将出现假阴性现象^[12];AMOS-PCR 能够检测几种重要的布鲁氏菌种,已经能应付绝

大多数的疫情处理^[15];Rep-PCR 主要应用于布鲁氏菌的分型研究,但由于操作人员和实验室条件的变化对实验结果影响比较大,应用上受到一定的限制;MLVA 技术比较容易标准化,结果容易解释,对种和型都能够进行分析,而且易于各实验室的交流比较,显示了很好的发展前景^[24]。

参考文献

- [1] Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, et al. Classification of brucella spp. isolated from Marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus [J]. Microbes Infect, 2001, 3(9): 729-738.
- [2] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis [J]. Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(2): 91-99.
- [3] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制 [J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 649-651.
- [4] Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis [J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1/4): 435-446.
- [5] Bricker BJ, Ewalt DR. HOOF prints: Brucella strain typing by PCR amplification of multilocus tandem-repeat polymorphisms [J]. Methods Mol Biol, 2006, 345: 141-173.
- [6] Mukherjee F, Jain J, Patel V, et al. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals [J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 10): 1309-1316.
- [7] Mukherjee F, Jain J, Grilló MJ, et al. Evaluation of brucella abortus S19 vaccine strains by bacteriological tests, molecular analysis of ery loci and virulence in BALB/c mice [J]. Biologicals, 2005, 33(3): 153-160.
- [8] O'leary S, Sheahan M, Sweeney T. Brucella abortus detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows [J]. Res Vet Sci, 2006, 81(2): 170-176.
- [9] Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay [J]. Vet Microbiol, 2001, 83(1): 37-44.
- [10] Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers [J]. Trends Microbiol, 2002, 10(10 Suppl): S15-21.
- [11] Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1290-1293.
- [12] García-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all Brucella species and the vaccine strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1 [J]. Clin Chem, 2006, 52(4): 779-781.
- [13] 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.
- [14] Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of Brucella spp. isolated from Marine mammals (下转第 4872 页)

尿外科开展的 2 μm 激光微创手术用于前列腺增生、膀胱癌等治疗,损伤小、出血少、恢复快;骨科开展了改良 Gibson 入路行全髋关节置换术、脊柱侧弯前路三维矫正术。这些技术的开展进一步促进和提升了学科的技术优势和专业特色,并通过重点学科的辐射与带动作用,提高了医院整体竞争力。与 2002 年相比,2014 年患者平均治愈率 91%,入出院诊断符合率 99%,分别增长了 19.83% 和 7.81%;门急诊人次由 27.0 万增长到 150.0 万,出院患者由 1.5 万增长到 7.1 万;博士生导师、硕士生导师由 1 人增长到了 140 人;博士学者由 2 人增长到了 135 人;省部级以上科研项目由 2 项增加到了 402 项。

参考文献

[1] 孙金海.新时期医院学科发展趋势与发展策略研究[J]. 中国医院,2012,16(7):51-53.
[2] 王羽.加强国家临床重点专科建设持续提高全国医疗服务能力[J]. 中国医院,2013,17(1):1-5.
[3] 邹小莉,王耀刚.医改新政下医学学科发展问题研究[J]. 中国卫生事业管理,2010,23(4):268-271.
[4] 黄国宁,陈凤娴.论重点学科建设的重要性[J]. 重庆医

学,2009,38(24):3049-3050.
[5] 王林平,刘海霞,赵兴海,等.山东省医药卫生重点学科科研状况及建议[J]. 中国卫生事业管理,2011,24(11):856-857,879.
[6] 李爱军,龚树生,吕燊,等.高等医学院校附属医院临床学科考核评价研究[J]. 中国医院管理,2012,32(8):38-39.
[7] 王懿,刘卫东,王振维.军医大学重点学科胜任力构成要素的探析[J]. 重庆医学,2012,41(6):620-621.
[8] Curtright JW, Stolp-Smith SC, Edell ES. Strategic performance management: development of a performance measurement system at the Mayo Clinic[J]. J Health Manag, 2000, 45(1):58-68.
[9] Shippmann JS, Ash RA, Battista M, et al. The practice of competency modeling[J]. Persl Psychol, 2000, 53(3):703-740.
[10] 沈杰,张琪峰,杨再峰,等.浙江省医学重点学科建设绩效分析[J]. 中华医学科研管理杂志,2013,26(1):55-57,33.

(收稿日期:2015-05-18 修回日期:2015-07-05)

(上接第 4869 页)

[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(5):835-839.
[15] Nagalingam M, Shome R, Balamurugan V, et al. Molecular typing of Brucella species isolates from livestock and human[J]. Trop Anim Health Prod, 2012, 44(1):5-9.
[16] Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the abbreviated Brucella AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of Brucella abortus field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(8):3085-3086.
[17] López-Goñi I, García-Yoldi D, Marin CM, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(10):3484-3487.
[18] Henderson M, Purcell AH, Chen D, et al. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of Xylella fastidiosa[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2):895-903.
[19] Schloter M, Lebuhn M, Heulin T, et al. Ecology and evolution of bacterial microdiversity [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(5):647-660.

[20] Hiett KL, Seal BS. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens[J]. Methods Mol Biol, 2009, 551:49-58.
[21] Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, et al. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms [J]. Croat Med J, 2005, 46(4):522-529.
[22] Flèche PL, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay[J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1):9.
[23] Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, et al. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing[J]. Biochimie, 2008, 90(4):660-668.
[24] Van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, 49(1):22-27.

(收稿日期:2015-05-23 修回日期:2015-07-05)

2015 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-63604477。
来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。
感谢您对本刊工作的支持!