

16S rDNA 序列分析在鉴定布鲁氏菌中的应用

汤旭^{1,2} 姜海² 赵鸿雁² 朴冬日² 田国忠² 张秋香³ 崔步云^{2*} 王桂琴^{1*}

(1. 山西医科大学 微生物与免疫教研室 山西 太原 030001)

(2. 传染病预防控制国家重点实验室 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
布鲁氏菌病室 北京 102206)

(3. 山西省疾病预防控制中心 山西 太原 030012)

摘要: 【目的】建立布鲁氏菌的 16S rDNA 序列分析方法, 评价该方法鉴定布鲁氏菌的特异性和实用性。【方法】用 PCR 扩增布鲁氏菌的 16S rDNA 片段, 将扩增的产物纯化后测序, 从 GenBank 下载与布鲁氏菌易发生血清学交叉反应的细菌的 16S rDNA 序列。使用 DNAMAN 软件进行 16S rDNA 序列相似性分析。【结果】在布鲁氏菌中 16S rDNA 核苷酸序列相似性达到了 99.74%, 而与其他有血清型交叉反应的菌株相比较, 16S rDNA 序列间有显著差异。【结论】16S rDNA 序列分析是一种快速、简便、特异的鉴定布鲁氏菌的方法之一。

关键词: 布鲁氏菌, 16S rDNA, 鉴定

Application of the 16S rDNA sequence analysis method in identification of *Brucella*

TANG Xu^{1,2} JIANG Hai² ZHAO Hong-Yan² PIAO Dong-Ri² TIAN Guo-Zhong²
ZHANG Qiu-Xiang³ CUI Bu-Yun^{2*} WANG Gui-Qin^{1*}

(1. Teaching and Research Group of Microorganism and Immunization, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

(2. Brucella Laboratory, Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

(3. Shanxi Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan, Shanxi 030012, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81271900); 国家科技重大专项项目(No. 2011ZX10004-001); 国家 973 计划项目(No. 2010CB530201)

*通讯作者: Tel: 86-10-82195780

✉: 王桂琴: guiqinwang321@163.com; 崔步云: cuibuyun@icdc.cn

收稿日期: 2012-09-24; 接受日期: 2013-01-04

Abstract: [Objective] To establish the 16S rDNA sequence analysis method to identify *Brucella* and evaluate the specificity and feasibility of this method. **[Methods]** 16S rDNA were amplified from *Brucella* by polymerase chain reaction (PCR) method and the purified product were directly sequenced for further analysis. The 16S rDNA sequence of the bacteria that are known to cross-react serologically with *Brucella* were downloaded from the GenBank. DNAMAN was used for comparison of 16S rDNA sequence. **[Results]** *Brucella* 16S rDNA sequence similarity reached 99.74%, *Brucella* 16S rDNA sequence to serologically related bacteria had more pronounced differences. **[Conclusion]** 16S rDNA sequence analyses is a rapid, simple diagnostic and specific method.

Keywords: *Brucella*, 16S rDNA, Identification

布鲁氏菌(布氏菌)是一种胞内寄生的革兰氏阴性微小球杆菌, 感染人或动物后可引起人兽共患的传染——变态反应性疾病即布鲁氏菌病(布病)。由于布病其较高的感染率, 它会给流行地区和国家造成巨大的经济损失并且严重危害人类健康^[1]。因此, 找到一种安全、可靠、快速的鉴定方法对布病的溯源工作、流行病学调查和预防控制都具有重要的意义。

经典的布鲁氏菌分类鉴定采取的主要方法是从菌株的形态学、生理生化反应特征以及免疫学特性加以鉴定。但这些经典的鉴定方法耗时、判读结果繁琐且存在实验室生物安全隐患^[2]。近年来, 聚合酶链反应(PCR)和 DNA 碱基序列测定技术得到迅速发展, 这两种技术的结合为细菌的分类和鉴定提供了一种快速、准确的方法。目前, 16S rDNA 序列同源性分析已成为细菌分类鉴定的重要方法^[3], 这是因为 16S rDNA 普遍存在于原核生物细胞内, 其序列具有保守性和特异性相结合的特点, 保守区为所有细菌所共有, 细菌间无差异; 可变区在不同细菌之间存在有不同程度的差异, 具有属或种的特异性^[4]。可以利用保守区设计通用引物扩增细菌的相应靶序列, 再利用可变区的差异鉴定细菌。本研究建立了鉴定布鲁氏菌的 16S rDNA 序列分析方法, 对常见的布鲁

氏菌的 6 个种 19 个型和易与其发生血清学交叉反应的细菌的 16S rDNA 序列进行了特异性和相似性分析。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本实验选取了布鲁氏菌属的 19 株国际标准参考菌株及 63 株地方株(见表 1), 均由中国疾病预防控制中心传染病所布鲁氏菌病室保存和提供。同时, 从 GenBank 下载了与布鲁氏菌在血清学上易发生交叉反应的细菌的 16S rDNA 序列^[5], 登录号见表 2。

1.2 细菌 DNA 的制备

使用细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN 公司)制备细菌 DNA, 按试剂盒说明书操作。

1.3 16S rDNA 扩增

1.3.1 扩增引物: 引物序列参照文献[6], 由北京天一辉远生物科技公司合成, 正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 反向引物 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGAC TT-3'), 扩增长度约为 1 500 bp。

1.3.2 PCR反应体系: 总体积为 50 μ L 模板 DNA 1.0 μ L, 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 5.0 μ L, dNTPs (2.5 μ mol/L) 5.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, *Taq* 酶 1.0 μ L, 双蒸水 36.0 μ L。

表 1 实验用标准菌株和临床分离株
Table 1 *Brucella* standard strains and clinical isolates used in this study

种 Species	生物型 Biotype	标准株 Standard strains	临床分离株数量 The number of clinical isolates
羊种布鲁氏菌	1	16M	10
<i>B. melitensis</i>	2	6319	12
	3	Ether	15
牛种布鲁氏菌	1	544A	10
<i>B. abortus</i>	2	86/8/59	0
	3	Tulya	5
	4	292	4
	5	B3196	0
	6	870	1
	7	63/75	1
	9	V68	1
猪种布鲁氏菌	1	1330S	1
<i>B. suis</i>	2	Thomsen	0
	3	686	1
	4	40	0
	5	513	0
犬种布鲁氏菌		RM6/66	2
<i>B. canis</i>			
绵羊附睾种布鲁氏菌 <i>B. ovis</i>		63/290	0
沙林鼠种布鲁氏菌		5K33	0
<i>B. neotomae</i>			

表 2 用于 16S rDNA 分析比较的菌株及 GenBank 编号
Table 2 The strains and GenBank numbers of 16S rDNA used in this study

菌株名称 Strain name	GenBank 编号 GenBank numbers
苍白杆菌 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	JQ746623
发根农杆菌 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	JF900618
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	JQ307151
甲型副伤寒沙门菌 <i>Salmonella paratyphi</i> A	SPU88546
嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	JX081313
小肠结肠炎耶尔森菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	EU178101
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	AY513502
汉氏巴尔通体 <i>Bartonella henselae</i>	AY513504
尿道寡源杆菌 <i>Oligella urethralis</i>	AY513496
根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AY513489
肠道沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i>	JQ694661

1.3.3 PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 90 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.4 PCR 产物纯化及 DNA 测序

取 5 μ L 扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳约 1 h, 紫外灯下观察条带位置。若在 1.5 kb 处有相应条带, 证明已扩增成功。然后利用 DNA 回收试剂盒(OMEGA 公司)从凝胶上回收纯化目的片段, 送北京天一辉远生物科技公司测序。

1.5 16S rDNA 序列分析

将测定所得的 16S rDNA 序列输入 GenBank, 用 BLAST 程序与数据库中的序列进行比较分析, 寻找相似性最高的 16S rDNA 序列。

1.6 布鲁氏菌与相关菌株的 16S rDNA 相似性比较

运用 DNAMAN 软件对布鲁氏菌和与其易发生血清学交叉反应的细菌的 16S rDNA 序列进行比对分析。

2 结果

2.1 布鲁氏菌 16S rDNA 片段 PCR 电泳检测结果

82 株布鲁氏菌株均扩增到一条约 1.5 kb 的 16S rDNA 片段(图 1), 与预期片段大小相符。

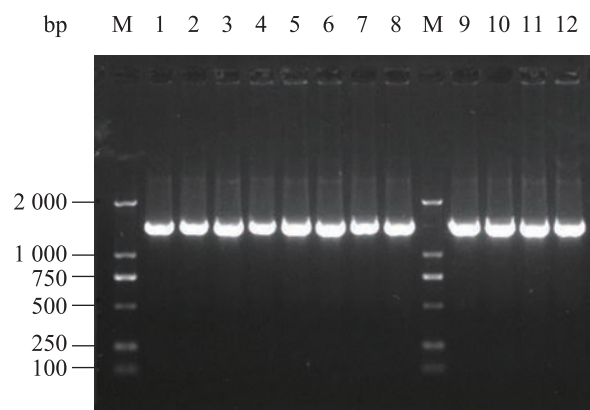


图 1 部分布鲁氏菌的 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 16S rDNA PCR results of partial *Brucella* strains

注: M: DNA marker; 1-8: 临床分离株; 9-12: 标准株。

Note: M: DNA marker; 1-8: Clinical isolates; 9-12: Standard strains.

2.2 布鲁氏菌 16S rDNA 序列分析

所测定的 82 株布鲁氏菌株的 16S rDNA 序列经 BLAST 分析, 结果显示均与布鲁氏菌的同源性最高, 达到了 99% 以上。同时对 82 株布鲁氏菌的 16S rDNA 序列用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 核苷酸序列相似性达到了 99.74%, 说明 16S rDNA 在布鲁氏菌中是非常保守的, 6 个种间以及 19 个型间差距很小, 种、型间基本没有差异。

2.3 布鲁氏菌与有血清型交叉反应的菌株间 16S rDNA 相似性比较

用 DNAMAN 软件对布鲁氏菌和与其易发生血清学交叉反应的细菌的 16S rDNA 做序列比对, 结果显示 *O. anthropi* (苍白杆菌) 与布鲁氏菌的 16S rDNA 相似性最高, 达到了 98.96% (表 3), 这与先前有关种系发生关系的研究结果是一致的^[7]。而其他相关菌株与布鲁氏菌的 16S rDNA 序列间有显著差异(图 2), 差异区有 4 个, 以 *Agrobacterium rhizogenes* (JF900618) 的全长 16S rDNA 序列作为参照序列, 差异区分别在 110-190 bp、830-900 bp、1 020-1 080 bp 和 1 280-1 370 bp 之间。

3 讨论

目前, 对布鲁氏菌的鉴定主要是基于传统的微生物学检测, 操作繁琐, 周期较长, 约有 10%-30% 成为无法鉴定的非典型菌株^[8]。同时在进行血清学检测时, 由于与布鲁氏菌密切相关的菌株间易发生交叉反应, 使其检测的特异性降低^[9]。因此需要一种更加快速、可靠的鉴定方法。16S rDNA 序列分析最大的优点就是可以对未知菌株直接进行鉴定。本研究也证实: 使用细菌 16S rDNA 通用引物进行扩增, 很容易得到布鲁氏菌的 16S rDNA 片段, 只需通过软件进行简单的序列比对, 即可确定该菌株为布鲁氏菌属。而且 PCR 和测序可以在 1-2 d 内完成, 可以大大节约时间, 使患者得到及时正确的治疗。

表3 布鲁氏菌 16S rDNA 序列与相关菌株的 16S rDNA 序列的相似性比较

Table 3 Similarities of *Brucella* 16S rDNA sequences to 16S rDNA sequences of strains related to *Brucella* spp.

菌株 Strains	与布鲁氏菌 16S rDNA 序列的相似性 Similarity of 16S rDNA sequence to <i>Brucella</i> (%)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (JQ746623)	98.96
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (JF900618)	98.61
<i>Vibrio cholerae</i> (JQ307151)	92.99
<i>Salmonella paratyphi</i> A (SPU88546)	92.95
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JX081313)	92.78
<i>Yersinia enterocolitica</i> (EU178101)	88.38
<i>Escherichia coli</i> (JH768572)	86.54
<i>Bartonella henselae</i> (AY513504)	97.92
<i>Oligella urethralis</i> (AY513496)	91.45
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AY513489)	97.69
<i>Salmonella enterica</i> (JQ694661)	91.61

	110	120	130	140	150	160	170	180	190
16M	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
544A	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
1330S	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
RM6-66	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
5K33	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>B. abortu</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>B. canis</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>B. melitensis</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>O. anthropi</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>A. rhizogenes</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>Bartonella</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>S. paratyphi</i> A	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>V. cholerae</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>Y. enterocolitica</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>S. maltophilia</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>E. coli</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>A. tumefaciens</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>Salmonella</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				
<i>Oligella</i>	ACGGGTGAGTAA	CGCGTGGGAACGTACCA	TTTGCTACGGAATA	ACTCAGGGAAACTTGTGCTAAT	ACCCTATGTGCCCTTCGGGGGAAA				

	830	840	850	860	870	880	890	900
16M	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
544A	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
1330S	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
RM6-66	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
5K33	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>B. abortu</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>B. canis</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>B. melitensis</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>O. anthropi</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>A. rhizogenes</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>Bartonella</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>S. paratyphi</i> A	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>V. cholerae</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>Y. enterocolitica</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>S. maltophilia</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>E. coli</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>A. tumefaciens</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>Salmonella</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				
<i>Oligella</i>	CACGCCGTAAACGATG	AATGTTAGCCGTCGGG	GTGTTTACACTT	CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCT				

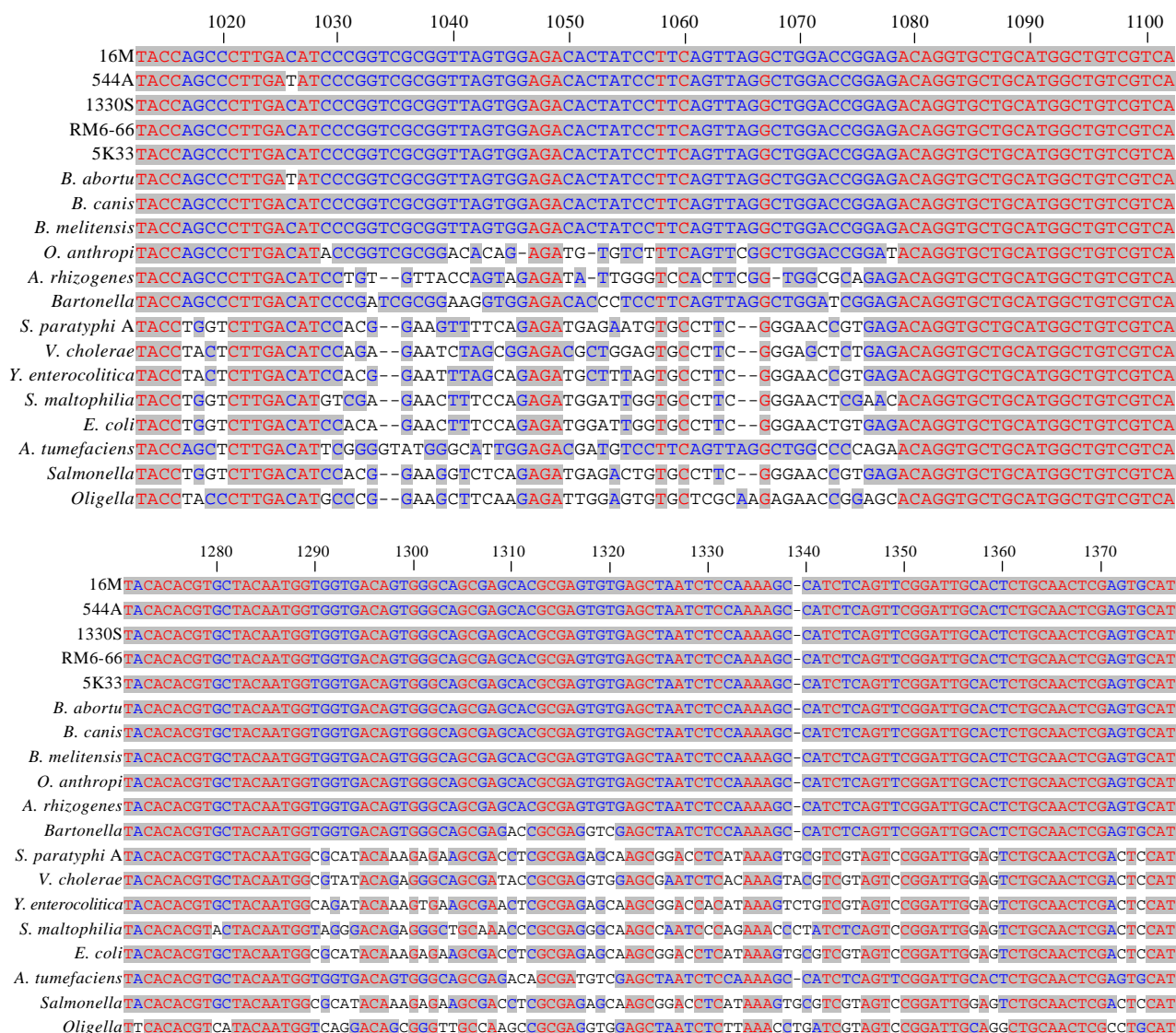


图2 布鲁氏菌与相关菌株间的 16S rDNA 序列的差异区域
Fig. 2 16S rDNA variable regions of *Brucella* spp. and related strains

本实验中将 19 株国际标准参考菌株及 63 株近年来临床分离的布鲁氏菌株的 16S rDNA 全片段进行扩增、纯化, 序列测定发现这 82 株菌的核苷酸序列相似性达到了 99.74%。说明 16S rDNA 在布鲁氏菌属中是非常保守的, 因此, 16S rDNA 序列分析不能将布鲁氏菌鉴定到种的水平。而与其血清学易发生交叉反应的细菌的 16S rDNA 序列比较, 相似性低于 98.96%, 因此, 可以直接通

过 16S rDNA 序列同源性分析区分布鲁氏菌属。16S rDNA 不宜对布鲁氏菌种和型鉴定, 可能是由于 16S rDNA 基因分子结构上的高度保守性和在基因组内的多拷贝性, 无法更精细区分其序列^[10]。

由于 16S rDNA 具有保守区和特异区并存的特点, 使其在临床病原菌的检测中具有筛选和鉴别的双重作用^[11]。通过对 16S rDNA 基因保守区

引物进行 PCR 扩增,可早期、快速判断布鲁氏菌存在与否,因此在临床布鲁氏菌感染的检验中有较高的应用价值。但是单纯的 16S rDNA 序列分析也有其缺点,特别是在种的鉴定上,对布鲁氏菌属做进一步种型鉴定时,可通过多重 PCR^[12]、AMOS-PCR^[13]对布鲁氏菌进行种型鉴定,这些鉴定方法不需要测序,可直接根据扩增目的片段大小对布鲁氏菌属不同的种型进行鉴定。综合应用可获得更准确的鉴定结果。

参 考 文 献

- [1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, 3(2): 213–221.
- [2] Gee JE, De BK, Levett PN, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3649–3659.
- [3] 刘朝军, 沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32(7): 774–776.
- [4] 何亮, 陈群, 曾忠铭, 等. 通过特异 PCR 扩增和 16S rDNA 序列分析检测动弯杆菌[J]. *微生物学报*, 2005, 45(1): 27–30.
- [5] Romero C, Gamazo C, Pardo M, et al. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(3): 615–617.
- [6] Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(3): 541–555.
- [7] Velasco J, Romero C, Lopez GI, et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 759–768.
- [8] 崔步云, 尹继明, 李兰玉, 等. 布鲁氏菌的 Rep-PCR 分型研究[J]. *疾病监测*, 2005, 20(8): 397–400.
- [9] Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 90(1/4): 447–459.
- [10] Boye K, Hansen DS. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 292(7/8): 495–503.
- [11] Chiang YC, Yang CY, Li C, et al. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(2): 131–137.
- [12] 刘国栋, 崔步云, 刘荣臻, 等. 布鲁氏菌多重聚合酶链反应鉴定研究[J]. *疾病监测*, 2008, 23(5): 271–273.
- [13] 姜海, 崔步云, 赵鸿雁, 等. AMOS-PCR 对布鲁氏菌种型鉴定的应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(2): 107–109.