

## 研究报告



## 犬种布鲁氏菌的遗传多样性分析

刘志国<sup>1,2</sup> 王衡<sup>4</sup> 王妙<sup>3</sup> 李丹<sup>1</sup> 赵鸿雁<sup>1</sup> 朴东日<sup>1</sup> 李明慧<sup>1</sup> 李振军<sup>\*1</sup>

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206

2 内蒙古自治区综合疾病预防控制中心 内蒙古 呼和浩特 010031

3 乌兰察布市地方病防治中心 内蒙古 乌兰察布 012000

4 杭州市疾病预防控制中心 浙江 杭州 310021

**摘要:**【背景】犬种布鲁氏菌是犬种布病的病原菌，主要导致犬流产和繁殖障碍。虽然犬种布鲁氏菌感染人群的病例极为少见，但是犬种布鲁氏菌对人的安全风险仍存在争议。目前，我国犬种布病的流行病学特征及犬种布鲁氏菌的遗传多样性的研究相对缺乏。开展犬种布病的流行特征及遗传多样性调查对加强犬种布病的监测防控具有重要意义。【目的】对犬种布病的流行病学特征和犬种布鲁氏菌的遗传多态性进行调查，为犬种布病的防控提供参考。【方法】采用常规鉴定方法和 BCSS-PCR 对 63 株试验菌株进行鉴定。采用 HGDI (Hunter and Gaston diversity index) 多态性指数调查犬种布鲁氏菌的遗传多态性，用 MLVA 方法基于 BioNumerics 5.0 软件对菌株进行聚类分析，揭示犬种布病的流行病学特点。此外，基于 MLVA-11 采用 goeBURST 软件构建犬种布鲁氏菌的最小生成树 (Minimum spanning tree, MST)，阐述我国犬种布鲁氏菌的地理起源特征。【结果】常规鉴定方法和 BCSS-PCR 扩增结果显示 63 株试验菌株全部为犬种布鲁氏菌。BCSS-PCR 与常规鉴定方法的符合率为 100%，BCSS-PCR 的分析敏感性为  $10^{-3}$  (即 50 pg/ $\mu$ L 犬种布鲁氏菌 DNA)。我国犬种布鲁氏菌具有较高的遗传多样性，基于 HGDI 分析表明 Panel 2B 的 5 个位点具有较高的变异度，等位基因型由高到底依次为 bruce09(11)> bruce07(8)> bruce16(7)> bruce04(6)> bruce30(5)。MLVA 聚类分析表明北京地区出现了 3 次较小规模的犬种布病暴发流行，其余地区均为零星散发。我国犬种布鲁氏菌可分为 5 个地理集群，以 MLVA-11 基因 26 型克隆群为主导种群，该种群与来自美国、希腊、加拿大、法国、罗马尼亚和韩国等国家的菌株具有共同的地理起源，其余 4 个种群为中国特有。【结论】我国犬种布鲁氏菌呈现高度的遗传多样性并有广泛的地理来源，表现为输入性和中国特有血统共存的起源进化特征。

**关键词:** 犬种布鲁氏菌，遗传多样性

**Foundation items:** Biosafety Key Special Projects (2017YFC1200303); Major Special Projects for Infectious Disease (2017ZX10303401, 2018ZX10734401, 2018ZX10734404); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomy Region (2018MS08004); Key Specialty Project of Science and Technology Bureau in Hangzhou (20160533B49)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-58900761; E-mail: lizhenjun@icdc.cn

**Received:** 26-02-2019; **Accepted:** 09-07-2019; **Published online:** 09-09-2019

**基金项目:** 生物安全重点专项(2017YFC1200303); 传染病重大专项(2017ZX10303401, 2018ZX10734401, 2018ZX10734404); 内蒙古自治区自然科学基金(2018MS08004); 杭州市科技局重点专病专科项目(20160533B49)

**\*通信作者:** Tel: 010-58900761; E-mail: lizhenjun@icdc.cn

**收稿日期:** 2019-02-26; **接受日期:** 2019-07-09; **网络首发日期:** 2019-09-09

## Genetic diversity of *Brucella canis*

LIU Zhi-Guo<sup>1,2</sup> WANG Heng<sup>4</sup> WANG Miao<sup>3</sup> LI Dan<sup>1</sup> ZHAO Hong-Yan<sup>1</sup>  
PIAO Dong-Ri<sup>1</sup> LI Ming-Hui<sup>1</sup> LI Zhen-Jun<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

2 Inner Mongolia Autonomous Region Central for Comprehensive Disease Control and Prevention, Huhhot, Inner Mongolia 010031, China

3 Ulanqab Center for Endemic Disease Control and Prevention, Ulanqab, Inner Mongolia 012000, China

4 Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

**Abstract:** [Background] *Brucella canis* is a pathogenic bacterium of canine brucellosis and mainly leads dogs to abortus and reproductive disorders. *B. canis* is a rare source of infection for human brucellosis, but safety risk of human posed by *B. canis* remains controversial. At present, the epidemiology characteristics and genetic diversity of *B. canis* research in China were lacking relatively. It is significant to investigate epidemiology characteristics and genetic diversity of canine brucellosis for strengthening surveillance and control of canine brucellosis. [Objective] Epidemiology characteristics and genetic diversity of *B. canis* strains were investigated in order to provide a reference for control and prevention of canine brucellosis. [Methods] Both conventional bio-typing methods and BCSS-PCR were applied for species identified of 63 *B. canis* strains. The genetic diversity of *B. canis* strains were investigated by the means of HGDI. MLVA method was used for cluster analysis of *B. canis* to reveal the epidemiological characteristics of canine with BioNumerics 5.0 software. goeBURST software was applied to construct minimum spanning tree of *B. canis* strains for elucidate characteristics of geographic origin of *B. canis* strains in China. [Results] Both conventional bio-typing methods and BCSS-PCR were used and 63 tested strains were all *B. canis*, and 100% identification coincidence rate was found between conventional bio-typing method and BCSS-PCR assay. The analytical sensitivity of BCSS-PCR at DNA sample was  $10^{-3}$  (50 pg/ $\mu$ L DNA of detecting *B. canis*). The higher genetic diversity was observed in *B. canis* strains in China. The results of genetic diversity investigated have showed that five loci in Panel 2B presented higher variability, the orders of allele genotypes from high to low were bruce09 (11), bruce07 (8), bruce16 (7), bruce04 (6), bruce30 (5). MLVA cluster analysis showed that there were three small-scale outbreaks of canine brucellosis in Beijing and sporadic in other areas. *B. canis* strains in this study were divided into five geographic groups (I–V), MLVA-11 genotype 26 clone group was predominated population. The strains of this clone group had common geographic origin with the strains from countries such as the United States, Greece, Canada, France, Romania and Korea. The others four geographic groups were unique lineages of *B. canis* in China. [Conclusion] There were higher genetic diversity and extensive of geographic origin of *B. canis* strains observed in China, and the results exhibited characteristics of origin and evolution of co-existing of imported and native specific lineage.

**Keywords:** *Brucella canis*, Genetic diversity

布病是由布鲁氏菌感染引起的动物源性人兽共患传染病<sup>[1]</sup>。布鲁氏菌为一类高度同源的胞内寄生致病菌。在当前确认的 12 个种型中绝大多数布鲁氏菌对人畜具有感染性<sup>[2]</sup>，但牛、羊、猪种布鲁氏菌是人畜间布病的主要致病菌，在全世界范围内引发了大量的布病病例，并造成了巨大的经济损失和严重的公共安全问题<sup>[3]</sup>。犬种布

鲁氏菌是一种脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)缺陷型布鲁氏菌，即粗糙型布鲁氏菌，其宿主范围相对较窄，以引起犬的布病最为常见，是犬养殖业面临的主要疫病防控难题<sup>[4]</sup>。受感染的犬通常无明显的临床表现，可呈现相对健康状态，偶有病犬表现为流产、附睾及睾丸萎缩和不孕等症<sup>[5]</sup>。犬种布病主要通过接触感染母犬的排泄物或阴

道分泌物而感染<sup>[6]</sup>。此外, 雄性疫犬的精液和尿液对动物具有高度的传染性<sup>[7]</sup>, 是健康犬的主要感染来源。

随着宠物犬的盛行, 犬种布鲁氏菌感染和公共卫生意义得到了公众的广泛关注。我国部分地区从犬养殖场及病犬血液分离获得了犬种布鲁氏菌, 并进行了相关的鉴定及遗传特征研究<sup>[8-9]</sup>, 但在全国层面的犬种布病流行特征及犬种布鲁氏菌的遗传多态性等相关研究鲜有报道。布鲁氏菌的基因组高度同源, 诸如限制性片段长度多态性聚合酶链反应(Restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP 分析)<sup>[10]</sup>、多态性 DNA 随机扩增(Random amplification of polymorphic DNA, RAPD)<sup>[11]</sup>、多位点序列分型分析(Multi-locus sequence typing, MLST)<sup>[12]</sup>等分子分型策略无法深度分辨菌株间的遗传相关性。多位点可变数目串联重复序列分析(Multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)是一种分辨力极好的布鲁氏菌鉴别方法, 结合菌株的流行病学背景信息可对布鲁氏菌进行深入的分子流行病学和遗传多态性分析<sup>[13]</sup>。对犬种布病进行全面的分子流行病学和遗传多态性分析, 对提升我国犬种布病的检测和防控具有重要的流行病学意义<sup>[14]</sup>。本文采用 MLVA 分型技术对我国 1983-2011 年间分离的 63 株犬种布鲁氏菌进行分析, 阐述我国犬种布鲁氏菌的遗传多样性和流行特征, 在全国层面更好地了解我国犬种布病的流行病学意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株信息

在 63 株犬种布鲁氏菌中, 1 株犬种布鲁氏菌来自患者血样, 其余 62 株来自病犬的临床样本。羊种布鲁氏菌生物 1 型参考菌株 16M、牛种布鲁氏菌生物 1 型参考菌株 544、猪种布鲁氏菌生物 1 型参考菌株 1330 及犬种布鲁氏菌参考菌株 RM66/6 用于实验对照, 4 种标准参考菌株由内蒙古自治区综合疾病预防控制中心布病科提供。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

布氏琼脂和肉汤培养基, 碧迪医疗器械(上海)有限公司(BD); 布鲁氏菌标准阳性血清, 标准 A、M、R 因子血清和 Tb、Wb 以及 Bk<sub>2</sub> 噬菌体, 青岛中创生物科技有限公司, 并在有效期内使用; 凯杰(QIAGEN)细菌基因组提取试剂盒, 内蒙古鸿之惠商贸有限公司; 2×Easy Taq PCR Super Mix (+dye), 北京全式金生物技术有限公司。生物安全柜、CO<sub>2</sub> 培养箱和微量分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

### 1.1.3 引物

BCSS (*B. canis* species specific, BCSS)-PCR 的扩增引物 BCSS-F (5'-CCAGATAGACCTCTCTGGA-3') 和 BCSS-R (5'-TGGCCTTTTCTGATCTGTTCTT-3')<sup>[15]</sup>, 扩增产物为 300 bp; MLVA-16 分型方法的引物信息见表 1<sup>[16]</sup>。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 犬种布鲁氏菌生物型鉴定

犬种布鲁氏菌生物型鉴定及结果判定按照布鲁氏菌标准鉴定程序进行, 活菌操作在生物安全 3 级实验室完成<sup>[17]</sup>。

### 1.2.2 实验菌株 DNA 的制备及保存

实验菌株的 DNA 制备按照凯杰细菌基因组提取试剂盒的操作步骤进行, 犬种标准参考菌株的 DNA 用于测定 BCSS-PCR 的分析敏感性, 用分光光度计对其 DNA 含量进行了测定, DNA 含量为 50.03 ng/μL。制备好的 DNA 于 -20 °C 保存备用。

### 1.2.3 BCSS-PCR 扩增

PCR 反应体系(20 μL): 2×Super Mix 10.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.3 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.4 μL。PCR 反应条件: 96 °C 5 min; 96 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 5 μL PCR 产物加到 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 电泳 120 V, 25 min, 用凝胶成像系统检测、成像。

### 1.2.4 BCSS-PCR 分析敏感性检测

将犬种布鲁氏菌标准参考菌株的 DNA 样品 (DNA 含量为 50.03 ng/μL) 10 倍比稀释到 10<sup>-6</sup>

表 1 MLVA-16 引物信息

Table 1 Primers of MLVA-16 approach

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Sizes (bp)
bruce06	(F) ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG (R) GCGTGACAATCGACTTTTTGTGTC	274
bruce08	(F) ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC (R) ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	330
bruce11	(F) CTGTTGATCTGACCTTGCAACC (R) CCAGACAACAACCTACGTCCTG	698
bruce12	(F) CGGTAAATCAATTGTCCCATGA (R) GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	362
bruce42	(F) CATCGCCTCAACTATACCGTCA (R) ACCGCAAAAATTTACGCATCG	414
bruce43	(F) TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT (R) TATTTTCCGCTGCCATAAAC	170
bruce45	(F) ACCCTTGCCTTCCTTACCAG (R) CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	187
bruce55	(F) TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT (R) AATCTGGCGTTCCGAGTTGTTCT	233
bruce04	(F) CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG (R) CGATCTGGAGATTATCGGGAAG	200
bruce07	(F) GCTGACGGGAAGAACATCTAT (R) ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA	166
bruce09	(F) GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC (R) GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	156
bruce16	(F) ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT (R) GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT	146
bruce18	(F) TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT (R) GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	146
bruce19	(F) GACGACCCGGACCATGTCT (R) ACTTCACCCTAACGTCGTGGAT	175
bruce21	(F) CTCATGCGCAACCAAAAACA (R) GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT	172
bruce30	(F) TGACCGCAAAACCATATCCTTC (R) TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG	127

(0.5 fg/μL), 评价该方法的分析敏感性, 扩增及电泳检测步骤同 1.2.3。

### 1.2.5 MLVA-16 实验

#### (1) MLVA-16 分型方法

16 对引物分为 2 组<sup>[18]</sup>, Panel 1 (8 个位点: bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce42、bruce43、bruce45 和 bruce55)。Panel 2 分为 2A 和 2B, Panel 2A (3 个位点: bruce18、bruce19、bruce21), Panel 2B (5 个位点: bruce04、bruce07、bruce09、bruce16 和 bruce30)。Panel 1 又称 MLVA-8, Panel 1 与 Panel 2A 组合即 MLVA-11, Panel 1、Panel 2A 与 Panel 2B 组合即 MLVA-16。

#### (2) MLVA-16 PCR 扩增

PCR 反应体系(20 μL): 2×Super Mix 10.0 μL,

上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。PCR 反应条件: 96 °C 5 min; 96 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。5 μL PCR 产物经 2.0% (Panel 1 位点)或 3.0% (Panel 2 位点)的琼脂糖凝胶电泳进行初步检测, 预期扩增结果进行毛细管电泳检测。用 GeneMapper 4.0 软件分析产物的扩增片段, 并与羊种布鲁氏菌标准参考菌株 16M 的标准等位基因型进行比对, 将扩增片段长度转换为每个位点的串联重复数(U)。然后将菌株的种型、宿主和分离时间录入 Excel 2016, 保存为制表符分隔文件用于聚类分析。

### 1.2.6 数据分析

采用在线 HGDI (Hunter and Gaston diversity index) 多态性指数分析软件(<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>)分析菌株的遗传多态性特征, 用 BioNumerics 5.0 采用 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic means) 方法进行聚类分析, 构建菌株的聚类树图。采用 goeBURST algorithm 基于来自全球的 135 株[犬种布鲁氏菌(79 株)、海洋种(24 株)、绵羊附睾种(7 株)以及猪种布鲁氏菌(25 株)]布鲁氏菌的 MLVA-11 数据构建犬种布鲁氏菌的最小生成树(Minimum spanning tree, MST), 阐述我国犬种布鲁氏菌的地理起源特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 犬种布鲁氏菌的地区分布特点

63 株犬种布鲁氏菌分布于 16 个省(市/区), 时间跨度从 1983–2011 年, 除 1 株犬种布鲁氏菌分离至浙江嘉兴地区患者的血液样本, 其余 62 株均来自于犬的临床样本, 其中安徽、河北、湖北、湖南、山东和山西分别有 1 株犬种布鲁氏菌。河南、江西、辽宁、上海、新疆分别获得 2 株犬种布鲁氏菌。内蒙古 3 株, 浙江 4 株, 广西 6 株, 江苏 6 株, 北京 28 株。北京地区的菌株主要来自于 2011 年北京某犬养殖基地犬种布病暴发流行(另有 17 株分离时间未知)(表 2)。

### 2.2 犬种布鲁氏菌常规鉴定结果

牛种、羊种和猪种布鲁氏菌标准参考菌株获得

表 2 犬种布鲁氏菌的地理分布、数量、分离时间  
Table 2 Geographic distribute, numbers, isolate time of *B. canis* used in this study

Regions	Number	Years
Anhui	1	1987
Hebei	1	1989
Hubei	1	1988
Hunan	1	1987
Shandong	1	1987
Shanxi	1	1992
Henan	2	1987
Jiangxi	2	1987, 1988
Liaoning	2	1988
Shanghai	2	1983
Xinjiang	2	1986
Inner Mongolia	3	1988, 2010
Zhejiang	4	1986, 2011
Guangxi	6	1986, 1987
Jiangsu	6	1986-1988, 2006
Beijing	28	2011

了预期的实验结果。63 株待测菌株的 CO<sub>2</sub> 需要和 H<sub>2</sub>S 产生试验结果为阴性, R 血清凝集试验全部阳性, A 因子和 M 因子血清凝集全部阴性, 硫堇抑菌试验全部阳性, 复红抑菌试验全部阴性, 所有试

表 3 63 株犬种布鲁氏菌的常规鉴定结果  
Table 3 Conventional identification of 63 *B. canis* strains

Strains	CO <sub>2</sub> requested	H <sub>2</sub> S	Serological agglutination tests			Dye tests		Phage lysis tests			Number	Interpretation
			A serum	M serum	R serum	Thionine	Fuchsin	Bk <sub>2</sub>	Tb10 <sup>4</sup>	Wb		
16M	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	1	<i>B. melitensis</i> bv.1
544	±	+	+	-	-	-	+	+	+	+	1	<i>B. abortus</i> bv.1
1330	-	++	+	-	-	+	-	+	-	+	1	<i>B. suis</i> bv.1
Tested strains	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	63	<i>B. canis</i>

注: +: 阳性; -: 阴性; ±: 部分菌株阳性。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; ±: Positive of partly strains.

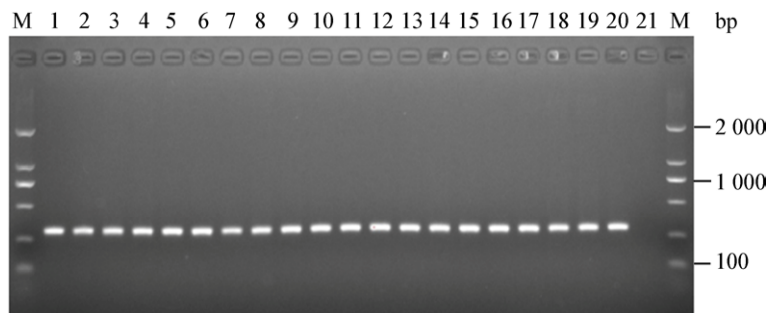


图 1 部分试验菌株的 BCSS-PCR 扩增结果

Figure 1 BCSS-PCR amplification of partly test strains in this study

注: M: 2 000 bp DNA 分子量标; 1: 阳性对照; 2-20: 试验菌株; 21: 阴性对照。

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1: Positive control; 2-20: Tested strains; 21: Negative control.

验菌株的噬菌体裂解实验为阴性(表 3)。

### 2.3 BCSS-PCR 扩增结果

BCSS-PCR 对试验菌株的扩增结果显示犬种阳性对照获得了预期扩增, 阴性对照未见扩增。待检菌株获得了与犬种参考菌株一致的特异性扩增条带, 扩增产物为 300 bp (图 1)。

### 2.4 BCSS-PCR 分析敏感性的检测结果

采用 BCSS-PCR 对 10 倍比稀释的犬种布鲁氏菌参考菌株 DNA 的扩增结果显示, 该方法的分析敏感性为 10<sup>-3</sup> 即 50 pg/μL 犬种布鲁氏菌 DNA (图 2)。

### 2.5 遗传多态性分析结果

MLVA 中的 16 个位点中每个位点至少有 2 个等位基因型。Panel 1 的 bruce11 有 4 个等位基因型, 在 Panel 2A 的 bruce19 有 5 个等位基因型。Panel 2B 的 5 个位点分别至少有 5 个等位基因型, 5 个位点的等位基因型数目由高到低分别为 bruce09(11)>bruce07(8)>bruce16(7)>bruce04(6)>bruce30(5) (图 3)。

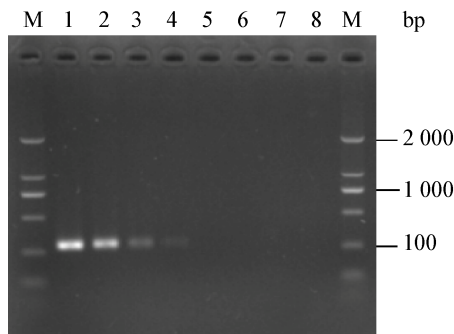


图2 BCSS-PCR 的分析敏感性

**Figure 2 Analytical sensitivity of BCSS-PCR**

注: M: 2 000 bp DNA 分子量标; 1-7: 犬种布鲁氏菌参考菌株 DNA  $1 \times 10^0 - 10^{-6}$ ; 8: 阴性对照.

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1-7: Stock solution ( $\times 10^0$ ) of DNA of *B. canis* standard strain  $-10^{-6}$ ; 8: Negative control.

## 2.6 聚类分析结果

63 株犬种布鲁氏菌聚为 3 大类(A、B 和 C) 50 个基因型(GT1-GT50), 仅 7 个共享基因型, 其中 5 个共享基型(GT26、GT34、GT37、GT38 和 GT40)由来自北京地区的菌株构成, 分别包括 2-5 株犬种布鲁氏菌, 其余 43 个为独特基因型, 每个基因型代表单一的菌株。共享基因型 GT24 由 2 株 1986 年在浙江地区分离的犬种布鲁氏菌组成。GT42 由 2 株来自内蒙古和辽宁的犬种布鲁氏菌组成。2011 年从浙江地区患者血样分离的犬种布鲁

氏菌(GT36)呈现独特的基因型。63 株犬种布鲁氏菌形成 16 个 MLVA-11 基因型, 分别为 CN1-CN14、26 和 28 基因型, 特别是北京地区的菌株聚为 5 个 MLVA-11 基因型, 分别为 CN4、CN9、26、28 和 CN10 (图 4)。

## 2.7 犬种布鲁氏菌的 MST 分析结果

本研究中 24% (15/63) 的菌株属于 MLVA-11 基因 26 型, 并与美国、希腊、加拿大、法国、罗马尼亚和韩国等地的菌株共享相同的 MLVA-11 基因 26 型。CN1-CN14 基因型为我国特有的犬种布鲁氏菌基因型。我国犬种布鲁氏菌大致可分为有 5 个地理集群, 集群 I 包括 5 个基因型分别为 28、26、CN10、CN11 和 CN12, 集群 II 包括 8 个基因型分别为 CN1-CN8 基因型, 集群 III、IV 和 V 均有 1 个基因型, 分别为 CN9、CN13 和 CN14。CN9 由 4 株来自北京地区病犬中分离的犬种布鲁氏菌组成, CN13 和 CN14 分别由来自湖南和山西病犬分离的菌株构成。在集群 I 中其余 4 个基因型均来自基因 26 型的单位点突变。在集群 II 中其余 7 个基因型均来自基因 CN3 型的 1-3 位点的突变。III、IV 和 V 基因型的突变位点较多( $\geq 4$ ), 分别形成了独特的进化分支(图 5)。

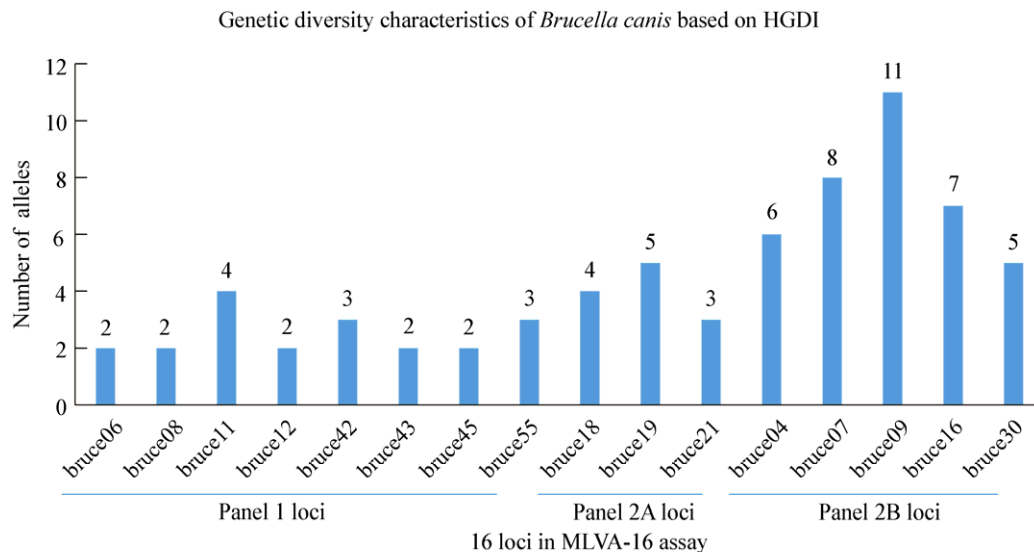


图3 犬种布鲁氏菌等位基因型分布特征

**Figure 3 Distribution feature of alleles types of *B. canis* based on HGDI**

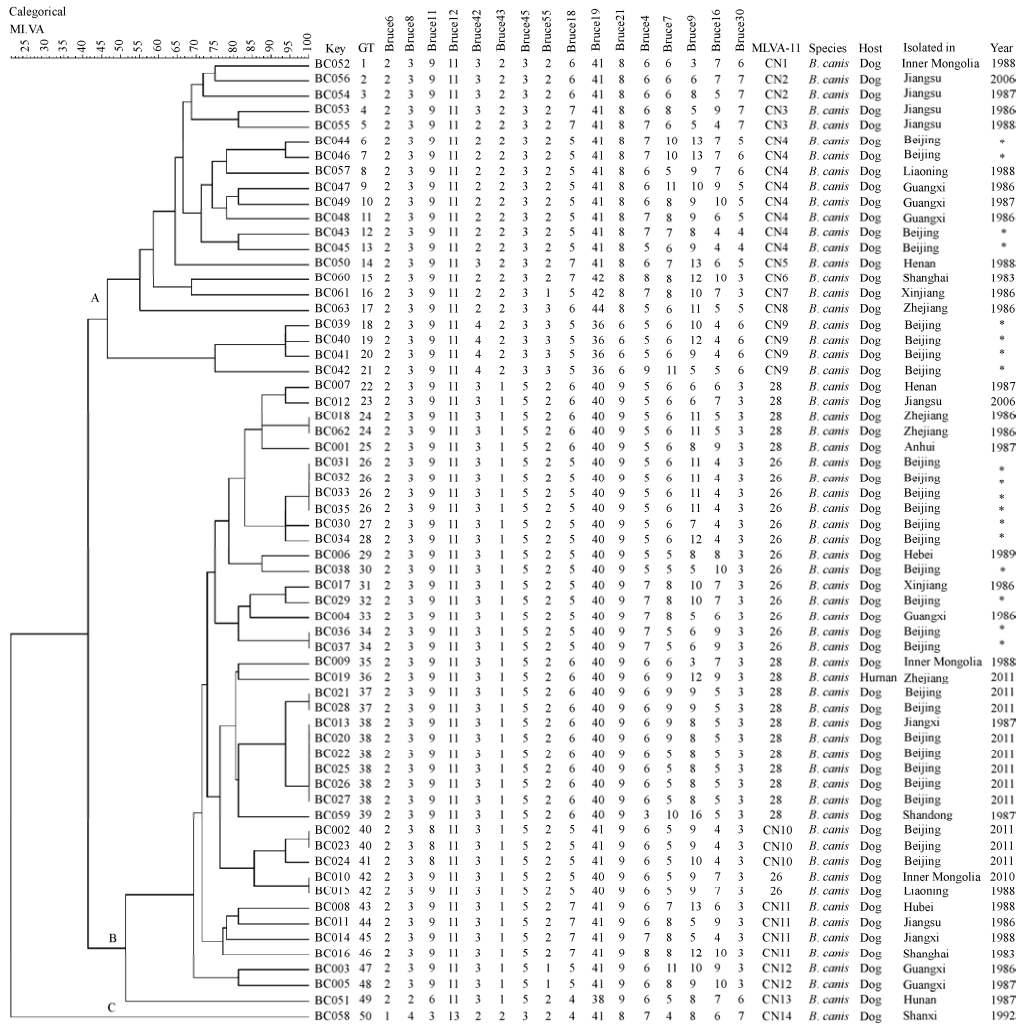


图 4 63 株犬种布鲁氏菌的 MLVA 亲缘关系树图

Figure 4 MLVA phylogenetic tree of 63 *B. canis* strains

Note: \*: Unknown.

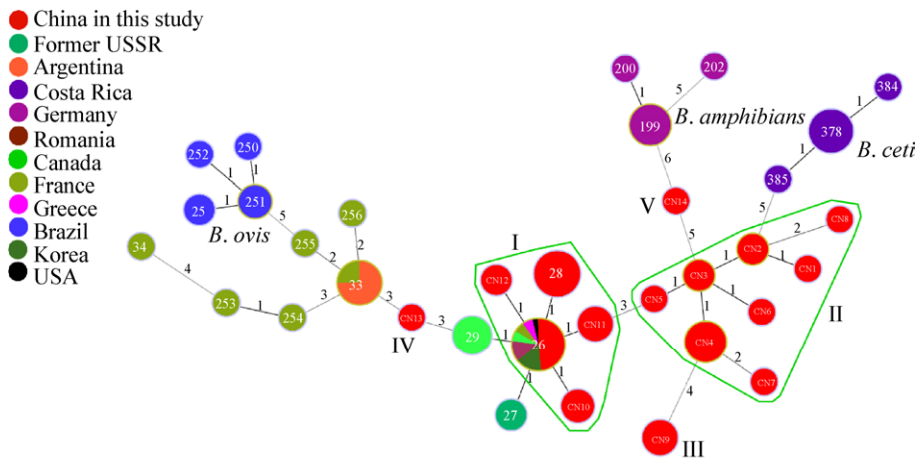


图 5 犬种布鲁氏菌的最小生成树

Figure 5 Minimum spanning tree (MST) of *B. canis* based on MLVA-11 data

### 3 讨论与结论

对犬种布鲁氏菌的流行病学和病原学特征进行全面的分析,不仅能揭示犬种布鲁氏菌的遗传多态性特征,而且对正确认识犬种布病的公共卫生意义具有积极的作用<sup>[19-20]</sup>。本研究对 1983-2011 年间分离自我 16 个省(市/区)的 63 株犬种布鲁氏菌进行了常规鉴定、PCR 扩增、流行病学特点、遗传多态性和地理来源分析。我国犬种布鲁氏菌的地域分布较广,北京、江苏、广西、浙江、内蒙古、上海、新疆、辽宁等 16 个省份(市/区)均分离获得了犬种布鲁氏菌,除北京、浙江、江苏和内蒙古的菌株均为 2006 年后分离,其余地区的菌株都来自 20 世纪 80 年代,所有菌株都来自犬的病料。究其原因这是由于 20 世纪 80 年代中期在全国范围内进行了大规模的犬种布病感染调查。此次调查从 20 个省(市/区)的病犬样本中分离获得了犬种布鲁氏菌,未见从患者的样本中分离获得犬种布鲁氏菌。在 2011 年从患者的血液样本中分离获得犬种布鲁氏菌<sup>[21]</sup>。流行病学调查发现患者为宠物犬的主人,起初因高烧、咳嗽和持续性上背部疼痛就诊,而且该患者的肺炎支原体抗体呈阳性(IgG+IgA+IgM 阳性,抗体滴度为 1:80),并在入院时采集患者血样进行了病原菌分离(在患者出院前分离获得了犬种布鲁氏菌)。随后,采用利福平和强力霉素(可用于布病和肺炎支原体的治疗)联合治疗的方案对该患者进行了治疗,治疗数天后患者出现了泌尿生殖道疱疹而主动出院,后续诊疗情况未知,但目前患者情况尚可。综合国内外犬种布病的发病流行情况及患者的病情经过,初步判定系由肺炎支原体感染导致患者免疫力低下而感染犬种布鲁氏菌。由此可以推断,犬种布鲁氏菌仅是犬的主要致病菌,其对人群的致病性不强或者感染后很快被机体的免疫系统识别并清除<sup>[22]</sup>,或仅在患者免疫力低下或感染其他疾病时并发感染<sup>[23-25]</sup>。

本文对 BCSS-PCR 方法的检测敏感性和对现场分离犬种布鲁氏菌鉴定实用性进行了评价。实验

结果表明该方法的分析敏感性为  $10^{-3}$  (50 pg/ $\mu$ L),可满足不同核酸提取方法制备 DNA 的扩增。对 63 株现场分离犬种布鲁氏菌的鉴定结果表明,BCSS-PCR 与常规鉴定方法的符合率为 100% (63/63),并可在 90 min 内获得扩增结果。该方法是一种特异、敏感、准确、快速的犬种布鲁氏菌鉴别方法<sup>[15]</sup>,并具有耗时短、成本低、生物安全风险小等优势,可作为犬种布鲁氏菌鉴定的最佳辅助鉴定方法。

我国犬种布鲁氏菌具有极高的遗传多态性<sup>[26]</sup>。MLVA 方法的 16 个位点中的每个位点至少有 2 个以上的等位基因型,特别是 Panel 2B 位点的 bruce09 位点有 11 个不同的等位基因型,与我国猪种布鲁氏菌的基因多态性特征相似。我国猪种布鲁氏菌的 Panel 2B 中的 bruce09 也有 11 等位基因型,而羊种布鲁氏菌的基因型多态性主要来源于 Panel 2B 中的 bruce16 和 bruce30 位点<sup>[27]</sup>。此外,因当时实验室的菌株检测技术的分辨力有限,无法从遗传学层面深度辨析菌株间的相互关联,致使对菌株的分析调查尚不充分。当前,采用 MLVA 方法对 63 株犬种布鲁氏菌的分子流行病学调查显示,63 株犬种布鲁氏菌聚为 50 个基因型,其中 7 个为共享基因型,聚类率仅为 14% (7/50),提示我国犬种布病以零星散发为主。在 7 个共享基因型中,有 5 个共享基因型(GT26、GT34、GT37、GT38 和 GT40)由来自北京地区的菌株构成,证实了北京地区发生了犬种布病的暴发流行病。特别是 2011 年某实验用犬养殖基地发生了 3 起小规模犬种布病暴发流行,结合现场流行病学调查发现系由引入疫犬导致,但未见相关养殖人群发病。我国第一株犬种布鲁氏菌是在 1983 年上海第一医学院实验动物部进口的比格犬中分离所得<sup>[21]</sup>,提示引种可能是导致犬种布病暴发流行病的重要原因<sup>[28]</sup>。因此,在引种时应高度警惕,加强检疫检测。此外,2010 年内蒙古分离的菌株与辽宁 1998 年分离的菌株具有相同的 MLVA-16 基因型,其分子关联有待进一步研究证实。1986 年浙江地区有一起犬种布病(GT24)



的暴发流行。而 2011 年从浙江地区布病患者血样中分离的犬种布鲁氏菌(GT36)呈现独特的基因型,提示为零星散发病例,并与 1986 年浙江地区分离的 2 株犬种布鲁氏菌的遗传背景存在一定的差异,提示该地区的 2 起犬种布病疫情无直接的流行病学关联。但浙江地区分离的 3 株犬种布鲁氏菌有相同的 MLVA-11 基因 28 型,提示浙江地区的 3 株犬种布鲁氏菌具有共同的地理来源,表明 2 起疫情是由相同的犬种布鲁氏菌克隆群引起。此外,其他不同地区的病例间未见明显的分子流行病学关联,也未见犬种布鲁氏菌引起全国范围内的布病流行和暴发,仅在较为集中的犬养殖基地发生了暴发流行,表明犬种布鲁氏菌仅是犬的主要致病菌,其作为传染源可能对人群的流行病学意义有限。

63 株犬种布鲁氏菌聚为 16 个 MLVA-11 基因型,24% (15/63)的菌株与来自美国、希腊、加拿大、法国、罗马尼亚和韩国等地的菌株共享基因 GT26 型,提示这些菌株具有共同的地理来源,我国该基因型的菌株可能由美国等上述国家输入<sup>[29]</sup>。北京地区的 20 株犬种布鲁氏菌聚为 5 个 MLVA-11 基因型,分别为 CN4、CN9、26、28 和 CN10,表明北京地区犬种布鲁氏菌地理来源较广。北京地区有 2 起犬种布病的暴发流行由输入疫犬而导致。

基于 MST 分析表明我国犬种布鲁氏菌大致可分为有 5 个地理集群,表明我国的犬种布鲁氏菌具有广泛的地理起源。集群 I 包括 5 个基因型分别为 26、28、CN10、CN11 和 CN12,菌株分别来自北京、广西、河北、内蒙古、辽宁、新疆、安徽、江苏、江西、山东、浙江、湖北和上海。集群 II 包括 8 个基因型分别为 CN1–CN8 基因型,菌株分别来自内蒙古、江苏、北京、广西、辽宁、河南、上海、新疆和浙江。集群 III、IV 和 V 均有 1 个基因型,分别为 CN9、CN13 和 CN14,菌株分别来自北京、湖南和山西。集群 I 和 II 的菌株地理分布极为广泛,是我国犬种布鲁氏菌的主导流行种群。III、IV 和 V 3 个基因型仅在单一或限定地区分布,是我国

犬种布鲁氏菌特有的基因型。由此推测我国犬种布鲁氏菌呈输入性和中国特有血统并存的地理起源特征。集群 I 中其余 4 个基因型均来自基因 26 型的单位点突变,提示菌株来自相同的犬种布鲁氏菌克隆群,并引起我国多个地区的犬种布病流行。在集群 II 中其余 7 个基因型均来自基因 CN3 型的 1–3 位点的突变,表明菌株来自相同的克隆群,可能在流行过程中少数高变位点发生了突变。III、IV 和 V 基因型的突变位点较多( $\geq 4$ ),形成了独立的进化分支,与另外 2 个种群的地理来源差异显著。对来自不同地理集群的菌株进行全基因测序分析,有助于深入了解犬种布鲁氏菌的起源进化。

本文揭示了我国犬种布病的流行特点及犬种布鲁氏菌的遗传多态性和地理起源特征。不仅为更好地理解我国犬种布鲁氏菌的流行病学和公共卫生意义提供了参考,而且对强化我国犬种布病的监测和防控具有重要的指导意义。

## REFERENCES

- [1] Shi YJ, Gao H, Pappas G, et al. Clinical features of 2041 human brucellosis cases in China[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0219110
- [2] Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1545
- [3] Kamal IH, Al Gashgari B, Moselhy SS, et al. Two-stage PCR assay for detection of human brucellosis in endemic areas[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 145
- [4] Tian GZ, Zheng M, Cui BY, et al. Analysis of pathogens and genetic characteristics of *Brucella canis*[J]. Chinese Journal of Endemiology, 2016, 35(10): 707-712 (in Chinese)  
田国忠, 郑敏, 崔步云, 等. 犬种布鲁氏菌病原学和遗传特征分析[J]. 中华地方病学杂志, 2016, 35(10): 707-712
- [5] Serikawa T, Takada H, Kondo Y, et al. Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis[J]. Developments in Biological Standardization, 1984, 56: 295-305
- [6] Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance[J]. Theriogenology, 2006, 66(3): 575-587
- [7] Serikawa T, Muraguchi T, Yamada J, et al. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs[J]. Experimental Animals, 1981, 30(1): 7-14
- [8] Zhou GL, Li XN, Wu Q, et al. Isolation and identification for a strain of *Brucella canis* from a Poodle[J]. Chinese Journal of

- Veterinary Drug, 2013, 47(2): 11-13 (in Chinese)  
周桂兰, 李旭妮, 吴启, 等. 一株犬种布鲁氏菌的分离与鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 11-13
- [9] Qian ZY, Liu XL, Sun YQ, et al. Identification and genetic characteristics of a *Brucella canis* strain isolated in Hebei Province[J]. Chinese Journal of Endemiology, 2016, 35(10): 717-720 (in Chinese)  
钱振宇, 刘晓丽, 孙印旗, 等. 河北省 1 株犬种布鲁氏菌分离株的鉴定及遗传特征分析[J]. 中华地方病学杂志, 2016, 35(10): 717-720
- [10] Al Dahouk S, Tomaso H, Prenger-Berninghoff E, et al. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2005, 31(4): 191-196
- [11] Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, et al. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1): 69-80
- [12] Chen YF, Ke YH, Wang YF, et al. Changes of predominant species/biovars and sequence types of *Brucella* isolates, Inner Mongolia, China[J]. BMC Infectious Disease, 2013, 13: 514
- [13] Liu ZG, Di DD, Wang M, et al. MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from ulanqab of Inner Mongolia, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 6
- [14] Gyuranecz M, Rannals BD, Allen CA, et al. Within-host evolution of *Brucella canis* during a canine brucellosis outbreak in a kennel[J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9: 76
- [15] Kang SI, Lee SE, Kim JY, et al. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2014, 37(4): 237-241
- [16] Al Dahouk S, Le Flèche P, Nöckler K, et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(1): 137-145
- [17] Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp.[J]. Clinical Laboratory, 2003, 49(9/10): 487-505
- [18] Liu ZG, Wang LJ, Piao DR, et al. Molecular investigation of the transmission pattern of *Brucella suis* 3 from Inner Mongolia, China[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2018, 5: 271
- [19] Yang Y, Wang Y, Poulsen E, et al. Genotyping *Brucella canis* isolates using a highly discriminatory multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) assay[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1067
- [20] Kang SI, Heo EJ, Cho D, et al. Genetic comparison of *Brucella canis* isolates by the MLVA assay in South Korea[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2011, 73(6): 779-786
- [21] Shang DQ, Xiao DL, Yin JM. Epidemiology and control of brucellosis in China[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/4): 165-182
- [22] Angel MO, Ristow P, Ko AI, et al. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2012, 6(9): 675-679
- [23] Moreno S, Ariza J, Espinosa FJ, et al. Brucellosis in patients infected with the human immunodeficiency virus[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1998, 17(5): 319-326
- [24] Tosi MF, Nelson TJ. *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam[J]. The Journal of Pediatrics, 1982, 101(5): 725-727
- [25] Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, et al. Recent trends in human *Brucella canis* infection[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2013, 36(1): 55-61
- [26] Di DD, Cui BY, Wang H, et al. Genetic polymorphism characteristics of *Brucella canis* isolated in China[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84862
- [27] Jiang H, Fan MG, Chen JD, et al. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 256
- [28] Keid LB, Chiebao DP, Batinga MCA, et al. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil[J]. Transboundary and Emerging Disease, 2017, 64(3): 691-697
- [29] Brower AL, Okwumabua O, Massengill C, et al. Investigation of the spread of *Brucella canis* via the U.S. interstate dog trade[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2007, 11(5): 454-458