

2015 年郴州市布鲁氏菌病的实验室诊断及病原学特征分析

谢群, 郑文, 朱韩武, 陈柏塘, 李征莉

郴州市疾病预防控制中心, 湖南 郴州 423000

摘要: **目的** 对 2015 年郴州市人感染布鲁氏菌疑似患者和病羊进行血清学和分子生物学检测, 以明确诊断。 **方法** 对患者进行流行病学调查, 采用血培养法对试管凝集试验检测为布鲁氏菌抗体阳性的患者和病羊血液进行荧光 PCR 及细菌分离培养, 应用分子生物学方法和基因测序对可疑菌落进行种类鉴定。 **结果** 68 份高危及疑似布病患者血清抗体筛查 13 份阳性; 1 679 份羊血血清抗体检测 57 份阳性, 6 株分离株经荧光 PCR 鉴定为羊种布鲁氏菌。 **结论** 2015 年引起郴州市布病的主要病原类型为羊种布鲁氏菌, 应采取综合措施防止布病在郴州流行。

关键词: 布鲁氏菌病; 实验室诊断; 病原学特征

中图分类号: R378.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)12-1465-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.12.015

Laboratory diagnosis and etiological characteristics of brucellosis in Chenzhou City, 2015

XIE Qun, ZHENG Wen, ZHU Han-wu, CHEN Bai-tang, LI Zheng-li

Chenzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Chenzhou, Hunan 423000, China

Abstract: **Objective** To clarify the diagnosis of *Brucella* infection in suspected patients and diseased goats in Chenzhou City in 2015 from serological and molecular biological aspects. **Methods** An epidemiological survey was conducted among the patients. Blood culture was used to isolate and culture *Brucella* strains from the blood of the patients and goats with positive anti-*Brucella* antibody detected by the standard agglutination test, and then real-time fluorescence quantitative RT-PCR was employed for identification. The molecular biological and gene sequencing techniques were used to identify the species of the suspicious bacteria strains. **Results** In the serum antigen screening of 68 high-risk and suspected patients with brucellosis, 13 were detected to be positive. 57 of 1,679 serum samples from sick goats were detected to be positive, and 6 isolated strains were identified as *Brucella melitensis* by real-time fluorescence quantitative RT-PCR. **Conclusions** The main pathogen species causing brucellosis in Chenzhou City in 2015 is *Brucella melitensis*. Comprehensive measures should be taken to control its epidemic.

Key words: Brucellosis; Laboratory diagnosis; Etiological characteristic

布鲁氏菌病 (brucellosis, 简称布病) 是由布鲁氏菌属的细菌引起的传染-变态反应性人兽共患传染病, 法定的乙类传染病, 临床症状以发热、乏力、关节痛、肝脾肿大特点, 严重威胁人、畜健康, 在世界 170 多个国家和地区存在人畜间布病流行, 每年造成的经济损失高达数十亿美元^[1]。郴州市 2015 年 6 月发现首例布鲁氏菌病例, 到 2015 年 12 月 31 日共报告 13 例病例, 本文对 2015 年郴州市布病的实验室诊断和病原学特征进行分析, 为郴州市布病防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 2015 年 6-12 月, 采集高危者及疑似布病

作者简介: 谢群 (1968-), 女, 主任技师, 主要从事微生物检验工作。

患者静脉血 68 份、病例密切接触者静脉血 37 份, 羊血 1 679 份。

1.2 仪器与试剂 7500 实时荧光定量 PCR (ABI 公司); VITEK2 Compact (梅里埃公司) 全自动微生物细菌鉴定仪; 虎红平板凝集抗原; 试管凝集试验抗原; A、M 和 R 布病分型血清由中国疾控中心传染病所布病实验室提供; 双相血培养瓶; 布鲁氏菌核酸测定试剂盒 (上海之江生物科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清学检测 对高危人群用虎红平板法和试管凝集法进行血清抗体筛查, 虎红平板凝集试验 (RB-PT) 是 pH (3.8±0.2) 高浓菌液, 经标准血清标化并用虎红染料染色菌体制成的玻片抗原, 是活化 IgG, 用于布病的初筛试验。试管凝集试验 (SAT) 是检测 IgM,

可作为布病的早期诊断。检测方法参考《布鲁氏菌病诊断标准》(WS269-2007)^[2]。

1.3.2 细菌培养 采集虎红平板法和试管凝集法血清抗体阳性的疑似患者抗凝血 4ml 进行血培养,接种双相血培养瓶置 5%CO₂,37℃ 培养 3~5 d 后观察,并转种血平板,进行菌株分离纯化,5%CO₂,37℃ 培养 2 d 后观察结果,为无色透明、圆形、凸起、针尖大小菌落,VITEK2 全自动微生物细菌鉴定仪进行鉴定。

1.3.3 荧光 PCR 试验 将取自病羊全血和患者的血培养物标本进行荧光 PCR 试验,取样品 3 ml,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,沉淀中加入 100 μl DNA 提取液,充分混匀,沸水浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取 4 μl 作 PCR 反应,PCR 参数设置:37℃ 2 min;94℃ 2 min;93℃ 15 s,60℃ 60 s,40 个循环;单点荧光检测温度为 60℃,反应体系为 40 μl。

1.3.4 基因测序 采用 Sanger 测序法,选择布鲁氏菌外膜蛋白 omp2a 和插入序列 IS7110 测序,按照文献报道^[3-4]引物对 PCR 产物进行基因测序,测序由赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)完成,测序结果用 mutation surveyor 生物软件进行分析。

2 结果

2.1 流行病学调查

2.1.1 病例发病情况 郴州市 2015 年 6 月 11 日-12 月 31 日,共报告 13 例布鲁氏菌患者,诊断时间主要是 7 月和 12 月,年龄最大 60 岁,最小 13 岁,职业分布以农牧民为主,农民占 61.54%(8/13),牧民占 15.38%(2/13),临武县同益乡 2 例病例是夫妻,桂阳县和平镇石碑村出现 2 例病例,见表 1。13 例病例都直接或间接有过羊接触史。

2.1.2 重点人群和环境调查 共采集 37 名与病例密切接触的相关人员血液和抗凝血各 1 份,检出隐性感染 4 名,其中宜章栗源镇 2 名隐性感染者为病例的儿子和儿媳妇。郴州市畜禽水产品质量检验检测中心对郴州市养殖的部分牛羊进行了布鲁氏菌检测,检测方

法为虎红平板抗原凝集试验和试管凝集试验。检测牛血 304 份,未检测到布鲁氏菌;检测羊血 1 679 份,检出阳性 57 份。来源于 6 群羊,分别是嘉禾塘村乡某村 20 份,桂阳县仁义镇某村 3 份,桂阳县和平镇某村 3 份,永兴县柏林镇某村 2 份,嘉禾县袁家镇某村 25 份,临武县同益乡某村 4 份。

2.2 实验室检测结果

2.2.1 血清学检测 68 份被检者血清中,虎红平板凝集试验阳性 24 份,试管凝集试验阳性 17 份。13 份阳性病例全血中分离到布鲁氏菌 6 株,6 株菌株用荧光 PCR 检测为羊种布鲁氏菌,3 份病羊全血培养物采用 PCR 检测阳性标本 2 份,也是羊种布鲁氏菌。

表 1 2015 年郴州市 13 例布病发病情况

编号	姓名	性别	年龄(岁)	地区	职业	诊断时间
1	彭某	男	37	北湖区芙蓉乡	农民	7月13日
2	欧某	男	32	北湖区保和镇	农民	7月28日
3	段某	男	24	北湖区燕泉路	商人	7月30日
4	李某	男	52	桂阳县正和乡	农民	6月11日
5	李某	女	57	桂阳县和平镇	农民	7月16日
6	李某	女	49	桂阳县和平镇	职工	7月30日
7	王某	男	32	桂阳县仁义镇	农民	8月11日
8	郭某	男	60	永兴县柏林镇	农民	9月15日
9	刘某	男	13	永兴县油麻乡	学生	12月29日
10	文某	男	41	临武县同益乡	牧民	12月11日
11	文某	女	40	临武县同益乡	牧民	12月11日
12	彭某	男	32	嘉禾县袁家镇	农民	9月14日
13	黄某	男	59	宜章县栗源镇	农民	12月24日

2.2.2 病原菌分离 血琼脂平板 5%CO₂ 37℃ 培养 3 d 后观察,肉眼可见灰白色、针尖大小、圆形稍隆起、表面光滑、不溶血的菌落。

2.2.3 生化鉴定 用 VITEK2 全自动微生物细菌鉴定仪,选择 GN 卡培养 8 h,进行鉴定结果为羊种布鲁氏菌(分辨率为 99%)。生化反应:氧化酶和过氧化氢酶、尿素酶、酪氨酸芳胺酶、氨基乙酸芳胺酶阳性;葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等其它 43 项阴性。

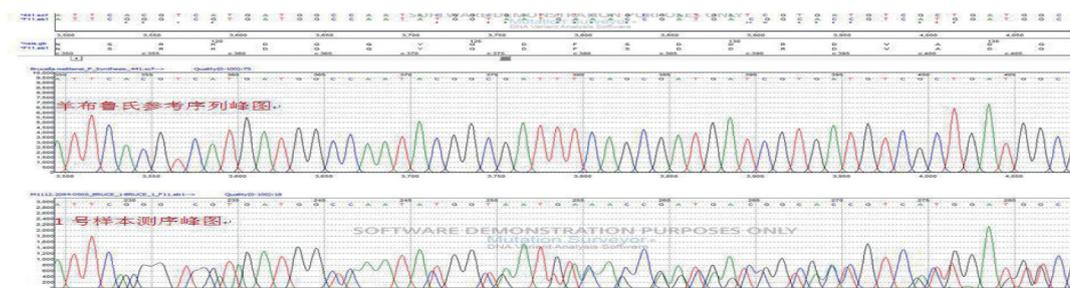


图 1 布鲁氏菌分离株基因测序结果

2.2.4 基因测序及结果分析 选择 2 菌株的 PCR 产物进行测序(Thermo Fisher Scientific)。测序结果用生物信息学软件 mutation surveyor 进行分析,将样本测序结果与猪牛羊犬等不同型别的布鲁氏菌进行比对分析,结果显示 2 株菌株均含有羊种布鲁氏菌,其中 1 号标本测序结果见图 1。由于样本中除了含有羊布鲁氏菌还有另外一种布鲁氏菌,所以测序峰图出现套峰。而羊布鲁氏菌之外的布鲁氏菌目前还没有找到序列可以匹配。

3 讨论

布病是一种布鲁氏菌引起的人兽共患慢性传染病,严重危害人们健康及畜牧业的发展,是全球最常见的人兽共患传染病之一。我国多见于内蒙古、东北、西北等牧区,近年流行区域南移,南方各省均有不同程度发现人、畜布病感染,全国布病疫情呈快速上升趋势^[6],南昌市、长沙市都有布病暴发流行的报道^[5-6]。

郴州市作为布病的非疫区,历史上无人畜布病报告,2015 年 6 月报告首例布鲁氏菌病例,之后陆续检出 13 例病例,隐性带菌者 4 例,聚集性病例 2 起,分别发生在桂阳县某村和临武县某村。6 个月内郴州市有 5 县 1 区出现病例,这一方面与当地医疗水平、诊断水平提高有关系^[7-8],另一方面也反映我国布病疫情正处于由北向南播散的趋势^[9]。此次分离的菌株经鉴定为羊种布鲁氏菌,是我国目前主要引起病情的优势病原菌^[10-11]。细菌培养方法是金标准,但耗时长,检出率低;RBPT 法较 SAT 法假阳性高些,RBPT 和 SAT 法适合基层医疗部门检测。SAT 大部分为阳性情况下,细菌分离和 PCR 只有 40%和 70%阳性相符,PCR 方法阳性检出率没有血清凝集试验高,但特异性和灵敏性

比血清凝集试验高^[12]。

布鲁氏菌属于胞内寄生菌,可以在机体内长期存在,急性期患者如不能得到及时有效治疗,一旦转为慢性感染,机体很难将其彻底清除。而且病例与病羊形成了传播链以后,如不能及时发现,极易造成本地布病播散,引起暴发。畜牧部门要加强畜性检疫与流通监管,做好畜间免疫工作,有效控制传染源;疾控部门要加大健康教育力度,提高民众对布病的认识,在春夏季对布病高发地区进行重点监测;医疗部门要及时发现新病例,及时治疗,各部门密切配合才能有效控制布病的流行。

志谢:郴州市畜禽水产品质量检验检测中心陈男颖、陈文承。

参考文献

- [1] 马茜. 布鲁氏菌病研究进展[J]. 疾病监测与控制杂志, 2014, 8(9):553-555.
- [2] 中华人民共和国卫生部. WS 269-2007 布鲁氏菌病诊断标准[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2007.
- [3] Ficht A, Hussein HS, Derr J, et al. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains [J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(1):329-331.
- [4] Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, et al. Evaluation of multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strain [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(10):3484-3487.
- [5] 李辉,陶卉英,孔令岩,等. 南昌市一起布鲁氏菌病暴发疫情的调查[J]. 现代预防医学, 2014, 41(1): 169-171.
- [6] 申晓君,廖瑜,肖芳. 长沙市一起布鲁氏菌病暴发疫情的调查与防控策略探讨[J]. 医学动物防制, 2016, 32(2): 211-213.
- [7] 张小芬,陈焯,庄敏芳,等. 桃源县首起布鲁氏菌疫情的现场调查与实验室检测[J]. 实用预防医学, 2015, 22(12): 1487-1489.
- [8] 宗雪梅,张海红,李卫红,等. 平山县 2011-2014 年布鲁氏菌病血清学监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1038-1040.
- [9] 李晔,余晓花,王大力. 2006-2012 年全国布鲁氏菌病引起突发公共卫生事件特征分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(9): 723-725.
- [10] 周晓艳,陈燕芬,崔步云. 我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(5): 371-375.
- [11] 刘英,王月,马青. 贵州省 2013 年人间布鲁氏菌病病原体种/型鉴定与分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(1): 45-48.
- [12] 李坚,李铁锋,王艾琳. 用 PCR 法对布鲁氏菌进行筛查及分型鉴定的研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2009, 24(4): 300-302.

收稿日期:2016-03-21

(接 1418 页)

- [2] 罗昊,袁晟,桂卓嘉,等. 湘潭市恶性肿瘤死因监测及口腔癌死亡特征分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(7): 804-808.
- [3] 傅志勇,莫苗芳,陈灿. 长沙市城区 2007-2010 年居民死因监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9): 1331-1333.
- [4] 全国肿瘤登记中心. 中国肿瘤登记工作指导手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2004:48-50.
- [5] Forman D, Bray F, Brewster DH, et al. Cancer incidence in five continents, Vol. X[M]. Lyon:IARC Scientific Publications, 2014.
- [6] Felay J, Burkhard C, Whelan S, et al. Check and Conversion Programs for Cancer Registries. IARC Technical Report No. 42[M]. Lyon:IARC, 2005.
- [7] Bray F, Parkin DM. Evaluation of data quality in the cancer registry: Principles and methods. Part I: Comparability, validity and timeliness [J]. Eur J Cancer, 2009, 45:747-755.
- [8] 邓伟,黄天壬,陈万青,等. 中国 2003-2007 年鼻咽癌发病与死亡分

析[J]. 中国肿瘤, 2012, 32(3): 189-193.

- [9] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(1): 1-8.
- [10] Chen WQ, Zheng RH, Peter D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. Ca Cancer J Clin, 2016, 15: 101-103.
- [11] 周小军,田道法. 鼻咽癌家系成员体质调查研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(11): 860-863.
- [12] 周小军,田道法. 鼻咽癌高危人群体质调查研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 51-54.
- [13] 周小军,张丽娟. 鼻咽癌及其不同进展阶段中医体质变化与意义[J]. 中国中医药杂志, 2015, 30(8): 2738-2740.
- [14] 李桂源,刘华英. 鼻咽癌癌变的分子机理[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10): 922-931.
- [15] 艾斌,唐锦森. 鼻咽癌家族致病基因的定位[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2014, 21(12): 1433-1436.

收稿日期:2016-06-15