

• 论 著 •

随州市羊种3型布鲁氏菌首发病例的病原学检测

郭芳¹, 何卫华¹, 金晓舟¹, 刘晓辉¹, 杨威¹, 聂丹文¹, 吕静^{2*}

摘要:目的 分离和鉴定布鲁氏菌,为病例的诊断、治疗及疫情的控制提供科学依据。方法 虎红平板凝集试验(RBPT)、试管凝集试验(SAT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测病人血清中特异性抗体,用血清凝集试验、噬菌体试验、PCR试验法对菌株进行分型鉴定。结果 虎红平板凝集试验出现絮状抗原抗体结合物100%凝集为阳性;试管凝集试验结果为阳性1:200(+++);发病期血清IgM抗体阳性、IgG阴性;M5布鲁氏菌疫苗株和病人菌株提取的基因组进行扩增和电泳,均在223和731bp附近出现阳性条带,而711、976和285bp处无条带,说明该病人分离出的菌株为布鲁氏菌属羊种布鲁氏菌;经CO₂、硫化氢、染料抑菌、菌株表面抗原凝集、噬菌体裂解试验,鉴定该菌株为羊种3型。结论 随州市布病首发病例病原体为羊种3型布鲁氏菌,应加强布病监测,采用RBPT、SAT、ELISA、PCR等方法可快速检测病原体,为临床诊断、疫情控制提供依据。

关键词:布鲁氏菌病;羊种布鲁氏菌;血清学检测;菌株鉴定

中图分类号:R516.7 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2013)1-19-03

Pathogenic detection of the first cases of *B.melitensis* type III in Suizhou city. GUO Fang, HE Wei-hua, JIN Xiao-zhou, et al.(1. Suizhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Suizhou, Hubei, 441300 2. Hubei province center for disease control and prevention, Wuhan 430079, Hubei, P. R. China; Corresponding author: LV Jing, E-mail: superjing22@yahoo.com.cn)

Abstract: Objectives To isolate and identify Brucella and provide scientific evidence for diagnosis, treatment and control of Brucellosis. **Methods** Rose-Bengal plate agglutination test (RBPT), standard tube agglutination test (SAT), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to test specific antibody in the sera. Serum agglutination test, Bacteriophage test and polymerase chain reaction (PCR) were used to identify the type of stains. **Results** Flocculent antigen-antibody combo 100% agglutination appeared in RBPT was positive; The result of SAT was positive (1:200, +++); The serum IgM antibody was positive and IgG was negative during the course of disease; Genomes were extracted from M5 Brucella vaccine strains and the patient strain. After amplification and electrophoresis, all appeared positive banding around 223 and 731 bp fragments and no banding at 711, 976 and 285 bp. It indicated that the strain isolated from the patient was *B.melitensis*; After stained with CO₂, H₂S, bacteriostasis, strain surface antigen agglutination and phage cracking test, the strain was identified as *B.melitensis* type III. **Conclusion** The pathogen of first case was *B.melitensis* type III in Suizhou. The monitoring work of brucellosis be strengthened. RBPT, SAT, ELISA and PCR allowed rapidly detection of Brucella and they can provide evidence for clinical diagnosis and control the prevalence of brucellosis.

Key words: Brucellosis; *B.melitensis*; Serological detection; Strains identification

由布鲁氏菌引起的人畜共患的急、慢性传染病,称布鲁氏菌病,又称马尔他热或波状热。牛、羊和猪是主要传染源,母畜感染后可引起流产,人因接触病畜或食用受染牛奶或奶制品而感染。潜伏期1~3周,临床特点是缓慢起病,长期发热、多汗、虚弱、全身痛和关节痛,急性期症状多在3~6月内消退。布鲁氏菌病可分为六型,以羊型为多见^[1]。20世纪50~60年代,我国布鲁氏菌病严重流行,70年代疫情逐渐下降,80年代和90年代初期疫情得到了基本控制,90年代中期起疫情持续快速上升,布鲁氏菌病成为报告发病率上升速度最快的传染病之一^[2]

2010年12月30日,华中科技大学附属同济医院报告了1例随州市布鲁氏菌病病例。此病人为近年

来湖北省首发病例。为控制疫情,防止此病蔓延,湖北省疾控中心协同随州市疾控中心迅速对病人进行了流行病学调查和病原学检测,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 基本情况 患者:男,30岁。在随州市随县某村从事山羊养殖,共饲养波尔山羊35只,当地地形以丘陵为主,灌木丛生,患者每日赶羊上山吃草,经常被蜱虫叮咬,山羊的繁殖、接生等工作由患者一人独立操作。本村无第二家从事羊养殖业,未发现其他患者。

1.1.2 发病情况 患者于10月16日出现发热,乏力,肌肉关节酸痛,在当地就诊不见好转,于11月3日到

作者单位:1.随州市疾病预防控制中心,湖北 随州 441300; 2.湖北省疾病预防控制中心,湖北 武汉 430079

作者简介:郭芳(1969~),女,汉,湖北随州,本科,主任技师,研究方向:传染病检验。

*通讯作者:E-mail:superjing22@yahoo.com.cn

市中心医院门诊就医后,自带药物头孢曲松回家输液治疗9d,疼痛症状消失,但体温未得到有效控制。12月12日因全身疼痛加剧,到同济医院住院治疗。

1.1.3 临床表现 持续发热两个月,最高体温39.5℃,平均体温38.2℃,全身乏力,肌肉关节酸痛,颈下淋巴结肿大。血液检查:白细胞计数降低($2.47 \times 10^9/L$)、中性粒细胞降低($1.03 \times 10^9/L$);血培养阳性,结果为G-小球杆菌。

1.1.4 试剂 TaKaRa LA Taq 酶、dNTPs 购自科瑞生物有限公司,PCR 扩增引物由上海英骏生物技术有限公司合成,布鲁氏菌虎红平板凝集试剂和试管凝集试剂购自中国疾病预防控制中心流行病研究所。酶联免疫试剂购自深圳市赛尔生物技术有限公司。

1.2 实验室检测

1.2.1 采集病人发病期和恢复期双份血清;菌株由同济医院检验科送检,实验操作在BSL-2实验室中进行。

1.2.2 特异性血清检查 虎红平板凝集试验(RBPT)试管凝集试验(SAT)检测人血清中特异性抗体,步骤操作方法依据中华人民共和国卫生行业标准WS 269-2007 布鲁氏菌病诊断标准附录C^[3],酶联免疫试验(ELISA)检测病人血清的IgM和IgG抗体。具体操作方法参照说明书进行。

1.2.3 菌株鉴定 CO₂需求、硫化氢产生、染料抑菌、噬菌体裂解、表面抗原凝集等试验依据《布鲁氏菌病防治手册》^[4]进行,结果按《OIE Terrestrial Manual 2009》进行判断。

1.3.3 核酸(PCR)检测 从平板上挑取疑似菌落,灭活后用Tiangen Blood DNA kit提取核酸制备DNA模板。PCR 20μL 反应体系:2×ExTaq Mix 10μL,上、下引物各0.2μL,双蒸水7.6μL,模板2μL。循环条件:94℃预变性3min,94℃ 30s、58℃ 30s、72℃ 30s(35个循环),72℃延伸5min,4℃保存。1%琼脂糖凝胶水平电泳进行PCR产物检测。B4、B5为OIE推荐鉴定布鲁氏菌的属引物,扩增片段理论大小为223bp;羊布鲁氏菌、IS711为鉴定羊种布鲁氏菌的引物,扩增片段理论大小为731bp;流产布鲁氏菌、IS711为鉴定牛种1、2、4型布鲁氏菌的引物,扩增片段理论大小为498bp;绵羊布鲁氏菌、IS711为鉴定绵羊附睾种布鲁氏菌的引物,扩增片段理论大小为976bp;猪布鲁氏菌、IS711为鉴定猪种1型布鲁氏菌的引物,扩增片段理论大小为285bp;M5为布鲁氏菌疫苗株,作对照。

2 结果

2.1 特异性血清学结果 虎红平板凝集试验出现絮状抗原抗体结合物100%凝集为阳性;试管凝集试验

结果为阳性1:200(+++);发病期血清IgM抗体阳性、IgG阴性,恢复期血清IgM抗体阴性、IgG阳性。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌落形态及生物特性 培养24h后平板上长出微小、无色、透明的光滑型菌落,无溶血现象;革兰氏染色为阴性小球杆菌;初次培养可不需要CO₂,能产生硫化氢。

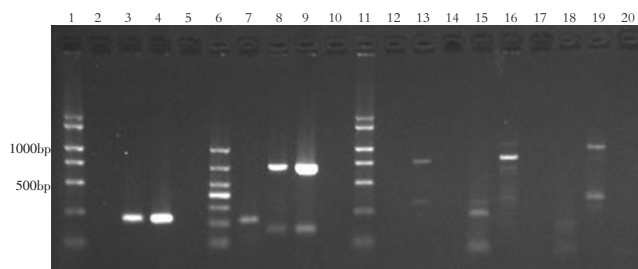
2.2.2 染料抑菌试验 硫堇、碱性复红试验阳性

2.2.3 噬菌体裂解试验 布鲁氏菌噬菌体TB、10TB均未见裂解斑。噬菌体BK2有不透明裂解斑。

2.2.4 菌株表面抗原凝集试验 布氏菌阳性血清凝集结果阳性1:800(++),粗糙(R)型布氏菌血清凝集结果阴性、A因子血清凝集结果阳性1:200(++),M因子血清凝集结果阳性1:200(++).

2.2.5 鉴定 查《OIE Terrestrial Manual 2009》CHAPTER 2.4.3 BOVINE BRUCELLOSIS 为羊种布鲁氏菌生物3型。

2.3.6 PCR 结果 M5布鲁氏菌疫苗株和病人菌株提取的基因组进行扩增和电泳,均在223和731bp附近出现阳性条带,而711、976和285bp处无条带。说明该病人分离出的菌株为布鲁氏菌属羊种布鲁氏菌,见图1。



1、11:DL 2000 6:DL 1000(TaKaRa) 5、10、14、17、20:H₂O(negative control);3、8:对照(Control) M5菌株(Strain) genomic DNA(positive control);2、7、12、15、18:另检样本(Another test sample) genomic DNA;4、9、13、16、19:(病人patients) genomic DNA;2-5:用B4、B5扩增(Amplified by B4 and B5) 7-10:用*B. melitensis*、IS711扩增(Amplified by *B. melitensis*、IS711);12-14:用*B. abortus*、IS711扩增(Amplified by *B. abortus*、IS711) 15-17:用*B. ovis*、IS711扩增(Amplified by *B. ovis*、IS711);18-20:用*B. suis*、IS711扩增(Amplified by *B. suis*、IS711)

图1 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR results of strain identification

3 讨论

随州市位于湖北省北部,地处长江流域与淮河流域的交汇地带,北纬31°19'~32°26',东经112°43'~113°46'。北与河南省南阳、信阳二市毗邻,南与湖北荆州相连,东承孝感,西接襄阳,地形复杂。丘陵、平原、河滩面积分别占总面积的61.3%、30%、11%,是全国的优质粮、棉、肉生产基地,全市畜牧小区已达到20多个,存在着多种人畜共患的可能。2008年出现

疑似无形体病疫情,2010年国家疾控中心在随州送检的标本中检出了新布尼亚病毒^[5]。但布鲁氏菌病病例在随州近五十多年未见报道。湖北省曾于上世纪90年代初对全省职业人群的布病疫情分布进行调查,血清学检测结果显示荆州、孝感、襄樊和神林架林区4个地区有布病感染者^[6],未发现病例。2007年湖北省枣阳市曾报道1例输入性布鲁氏菌病^[7]。上述均未得到病原学证实。

此次病例经流行病学和病原学检测确诊为羊种3型布鲁氏菌感染引起的布鲁氏病。2011年6月随州又发现2例病人,说明随州已有散在病例出现。提示我们应加强人畜共患病监测,做好布鲁氏菌病原学检测,防止布鲁氏病的流行。

布鲁氏菌病的检测方法较多,本次布鲁氏菌的病人的确诊,我们采用了RBPT、SAT、ELISA试验和PCR技术等方法。RBPT和SAT因其方法简便快速,是国际贸易和许多发展中国家进行布鲁氏菌病检疫、监测的重要方法^[8]。ELISA方法具有敏感性高、特异性强等优点,可用于血清抗体效价的检测,野毒株的分型、自然感染与疫苗免疫的鉴别,并可用于大样本检测^[8]。PCR技术对布鲁氏菌可在基因水平上进行分型和疫苗株鉴定^[9],可以快速的鉴定到布鲁菌属和布鲁菌各种型,用血清学方法区别比较困难,尤其是对与布鲁氏菌有相同抗原、且具有强烈交叉反应的 *Y. enterocolitica* 09、*S. Typhi* 及 *E. coli* O157,用PCR方法可以很好将他们区别开来^[10]。因此,RBPT、SAT、ELISA和PCR技术能够为临床的诊断治疗、疫情的处理控制提供快速准确的依据。

参考文献:

- [1] Cui BY. A monitoring and control of Brucella in China [J]. Dis Monit, 2007, 22:49-651(In Chinese)
(崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测, 2007, 22: 649-651)
- [2] Xu N, Li N. Advances in epidemiology, diagnosis and treatment of Brucellosis [J]. China Pract Med, 2010, 5 (20): 246-247(In Chinese)
(徐楠 李娜 布鲁氏菌病流行病学及诊治研究进展[J]. 中国实用医药, 2010, 5 (20):246-247)
- [3] Ministry of Health of the People's Republic of China. Health industry standard of the People's Republic of WS269-2007 Brucella disease diagnosis standard [S]. People's Medical Publishing House, 2007, 6-10 (In Chinese)
(中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生行业标准 WS269-2007 布鲁氏菌病诊断标准[S]. 人民卫生出版社, 2007, 6-10)
- [4] The ministry of health bureau of disease prevention and control. Control manual of Brucellosis [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008, 17-29 (In Chinese)
(卫生部疾病预防控制局. 布鲁氏菌病防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社 2008, 17-29)
- [5] Xue-Jie Yu, Mi-Fang Liang, Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China[J], N Engl J Med 2011, April 21, 2011, 364:1523-1532.
- [6] Xiong PS, Man HF, Zhen CH, et al. The survey on brucellosis among occupational population in Hubei province[J]. Chin J Endemiol., 1993, 12 (4) : 224-226 (In Chinese)
(熊培生, 晏慧芳, 郑朝晖, 等. 湖北省职业人群布鲁氏菌病调查[J]. 中国地方病学志, 1993, 12(4): 224-226)
- [7] Gong XY, Shi TD. Report on an imported Brucellosis case[J]. Pub Hlth Prev Med., 2007, 18(3): 19 (In Chinese)
(龚雪英, 史天东 输入性布鲁氏菌病一例报告[J]. 公共卫生与预防医学 2007, 18(3): 19)
- [8] Gao MH, Zhang ZY, Li KY. Advances in laboratory diagnosis of Brucellosis[J]. Chin J Zoon. 2010, 26 (1) 81-83 (In Chinese)
(高明华, 张志琰, 李跃. 布鲁氏菌病实验室诊断研究进展 [J] 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (1) 81-83)
- [9] Tan ZM, Tang FY, Chen P, et al. Laboratory examination and molecular typing for one case of Brucellosis in Jiangsu Province[J]. Chin J Zoon, 2010, 26 (8): 787-788 (In Chinese)
(谈忠鸣, 汤奋扬, 陈萍等 江苏省1例布鲁氏菌病的实验室检测及分子分型[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (8) 787-788)
- [10] Jiang FH, Yu G.. The establishment of PCR rapid detection methods for Brucella[J]. Modern Animal Husband Veterin. 2008, 2:4-5 (In Chinese)
(姜凤华, 于刚. 布鲁氏菌PCR快速检测方法的建立[J]. 现代畜牧兽医, 2008, 2:4-5)

收稿日期: 2012-10-16 编辑: 崔宜庆