

青海省2005—2019年人间布鲁氏菌病流行特征及分子特征分析

马丽¹ 杨旭欣¹ 薛红梅¹ 徐立青¹ 田国忠² 李积权¹ 杨晓雯² 赵志军¹
赵鸿雁² 杨建国¹ 朴东日² 姜海²

¹青海省地方病预防控制所, 西宁 811602; ²中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

通信作者: 姜海, Email: jianghai@icdc.cn

【摘要】 目的 分析青海省人间布鲁氏菌病(布病)流行规律与趋势,对2005—2019年布鲁氏菌分离株进行分子分型,为制定青海省布病预防控制策略提供依据。方法 收集中国疾病预防控制中心信息系统青海省2005—2019年布病报告数据,描述和分析其时间、地区和人群三间分布。采用BCSP31聚合酶链式反应(BCSP31-PCR)、AMOS聚合酶链式反应(AMOS-PCR)和多位点串联重复序列分析(MLVA-16)方法鉴定布鲁氏菌分离株,进行聚类分析。结果 2005—2019年青海省累计报告病例577例,平均发病率为0.07/10万,不同年份差异有统计学意义。一年四季均可发病,集中在每年的3—10月。577例病例分布在6个自治州(市)的31个县(市、区)中,病例数位居前5位的是门源回族自治县(22.88%, 132/577)、天峻县(10.57%, 61/577)、西宁市(10.57%, 61/577)、河南蒙古族自治县(10.51%, 58/577)和海晏县(9.53%, 55/577)。年龄范围8~82岁,男女性别比为1.8:1(374/203),职业分布以牧民为主(47.83%, 276/577)。从人全血中分离的10株菌株均为羊种Ⅲ型布鲁氏菌,分为5种基因型(2种基因型为单基因型,3种基因型为相同基因型),MLVA-16分型和聚类分析结果显示,同青海省已发表文献的26株羊种Ⅲ型布鲁氏菌的遗传关系较近。结论 青海省布病疫情呈回升趋势,应加强人群监测和疫情通报,MLVA-16分型呈基因多态性,提示MLVA-16可用于遗传多样性分析和分子流行病学溯源调查,以提高布病监测能力。

【关键词】 布鲁氏菌病; 流行特征; 多位点串联重复序列分析

基金项目: 青海省高端创新千人计划; 国家自然科学基金(81860588)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200309-00288

Epidemiological and molecular characteristics of human brucellosis in Qinghai province, 2005–2019

Ma Li¹, Yang Xuxin¹, Xue Hongmei¹, Xu Liqing¹, Tian Guozhong², Li Jiquan¹, Yang Xiaowen², Zhao Zhijun¹, Zhao Hongyan², Yang Jianguo¹, Piao Dongri², Jiang Hai²

¹Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 811602, China; ²National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Jiang Hai, Email: jianghai@icdc.cn

【Abstract】 Objective To analyze the epidemiological and molecular characteristics of human brucellosis in Qinghai province from 2005 to 2019 and provide basic data for brucellosis prevention and control. **Method** The data about human brucellosis in Qinghai from 2005 to 2019 were collected from the information system of China CDC to describe the spatial, population and time distributions of human brucellosis cases in Qinghai. The isolated strains were identified and typed with traditional methods, BCSP31-PCR, AMOS-PCR and multi-locus variablenumber tandem repeat (MLVA-16). **Results** A total of 577 human brucellosis cases were reported in Qinghai from 2005 to 2019, the average prevalence rate was 0.07 per 100 000 person, there were statistic differences among different years. The disease occurred all the year around, but mainly during March-October. The 577 cases were distributed in 31 counties (cities/districts) from 6 autonomous prefectures (cities). The prevalence rats of five counties were high, i.e. Menyuan Hui autonomous county (22.88%, 132/577), Tianjun county (10.57%, 61/577), Xining city (10.57%, 61/577), Henan Mongol Autonomous County (10.51%, 58/577) and Haiyan county (9.53%, 55/577). Age of the cases ranged from 8 years to 82 years, and the male to female ratio of the cases was 1.8 : 1 (374/203). The prevalence rate in herdsman (47.83%, 276/

577) was highest among different occupational populations. Ten isolates were all *Brucella melitensis* strains, belonging to biovar 3, and clustering analysis indicated that the 10 strains had 5 genotypes, in which 2 were distinct, the remaining 3 were same. MLVA-16 analysis indicated that the 10 strains had close relationship with 26 *B. melitensis* strains isolated in Qinghai previously. **Conclusions** The prevalence of brucellosis increased in Qinghai in recent years, we should strengthen the population based brucellosis surveillance and reporting. MLVA-16 indicated the gene diversity of the *Brucella* strains, suggesting that MLVA-16 can be used for genetic diversity analysis and molecular epidemiology survey to improve brucellosis surveillance.

【Key words】 Brucellosis; Epidemiological characteristics; Multi-locus variable number tandem repeat analysis

Fund programs: High-level Innovation Plan of Qinghai Province; National Natural Scientific Foundation of China (81860588)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200309-00288

人间布鲁氏菌病(布病)的危害影响广泛,在 170 多个国家均有病例报告,每年有超过 50 万新发病例,是目前最常见的人兽共患病之一,主要传播途径为摄入含有布鲁氏菌的奶类/奶制品,引起结膜/皮肤及呼吸道感染,可引起发热、多汗、乏力、关节肌肉疼痛等^[1-6]。近年来,全国布病疫情持续、快速上升^[7],布病引起的突发公共卫生事件频发^[8]。本研究利用多位点串联重复序列分析(MLVA-16)方法对人血液中分离的布鲁氏菌进行生物型的分析,为追溯传染源,确定当地布病流行趋势制定相应的防控措施。

对象与方法

1. 数据来源:中国疾病预防控制中心传染病报告信息管理系统 2005—2019 年青海省布病网络直报数据。历年人口数据来自青海省统计年鉴。

2. 菌株来源:10 株布鲁氏菌分离自 2005—2019 年布病病例血液标本,布鲁氏菌标准参考菌株为羊种(M5)、猪种(S2)和牛种(104M)。

3. 病原学鉴定方法:布鲁氏菌的种型鉴定方法根据菌落染色、形态、初代分离培养时二氧化碳(CO₂)的需求、硫化氢(H₂S)量、单相特异性血清 A、M 凝集试验、染料抑菌性试验、噬菌体的裂解性试验,操作步骤见参考文献[9-10]。

4. 菌株 DNA 制备:细菌 DNA 的提取,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行(TIANGEN 公司)。

5. 分子生物学方法:采用 BCSP31-PCR 和 AMOS-PCR 方法,引物序列、扩增体系及反应条件见参考文献[11-12]。

6. MLVA-16 PCR 方法和统计学分析:16 个基因位点,对 PCR 扩增产物测序,聚类分析采用 Bionumerics 7.6 软件,以确定菌株 MLVA 基因型,引物序列及 PCR 扩增条件见参考文献[13]。采用 Excel

2010 软件录入数据,采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。

结 果

1. 时间分布:2005—2019 年青海省累计报告 577 例,平均发病率 0.07/10 万,2005—2010 年发病率保持在较低水平 0.02/10 万~0.05/10 万,2011—2019 年发病率为 0.02/10 万~0.27/10 万,2019 年发病率最高为 0.27/10 万,不同年份差异有统计学意义。

2. 地区分布:577 例病例分布在 6 个自治州(市)的 31 个县(市、区)中,病例数位居前 5 位的是门源回族自治县(22.88%, 132/577)、天峻县(10.57%, 61/577)、西宁市(10.57%, 61/577)、河南蒙古族自治县(10.51%, 58/577)和海晏县(9.53%, 55/577)。

3. 人群分布:①年龄、性别分布:年龄范围 8~82 岁,发病年龄集中在 20~49 岁。男女性别比为 1.8:1(374/203)。②职业分布:以牧民为主(47.83%, 276/577),职业类型还包括农民(122 例)、兽医(59 例)、工人(21 例)、医务人员(5 例)及其他职业(94 例)。

4. 菌株种型鉴定:10 株布鲁氏菌分离株在普通大气下即可生长,形态及染色特征、培养特性均与布鲁氏菌完全相同;生长时不需要 CO₂,不产生 H₂S,在硫堇(1:25 000)和复红(1:50 000)环境中均能生长,噬菌体 BK₃裂解,Tb 不裂解,与血清 A、M 均凝集,确定为羊种 III 型布鲁氏菌。BCSP31-PCR 和 AMOS-PCR 方法对分离株核酸进行扩增,以羊种(M5)、牛种(104M)、猪种(S2)和大肠埃希菌作为阳性、阴性对照。BCSP31-PCR 鉴定,10 株分离菌株及阳性对照菌株核酸均扩增出布鲁菌属特异的 223 bp 的条带,阴性对照无条带出现。AMOS-PCR 鉴定,结果显示阳性对照扩增获得了预期片段,阴性对照未见扩增,10 株均扩增获得 731 bp 特异性条带,与羊种布鲁氏菌扩增结果一致,判定为羊种布鲁氏菌。

表1 2005—2019年青海省10株布鲁氏菌株采集情况

基因型	编号	年份	样本地区	传染源	传播途径
1型	QH007	2013	青海省达日县	自繁自育牛、羊	饲养
	QH008	2013	青海省囊谦县	自繁自育牛、羊	饲养
2型	QH009	2018	青海省门源回族自治县	羊育肥贩卖(甘肃省山丹县羊)	处理流产羊羔
	QH010	2018	青海省门源回族自治县	羊育肥贩卖(甘肃省山丹县羊)	处理流产羊羔
3型	QH003	2019	青海省西宁市湟中区	自繁自育羊	饲养
	QH004	2019	青海省民和回族土族自治县	羊育肥贩卖(甘肃省大河家羊)	饲养
	QH002	2019	青海省门源回族自治县	羊育肥贩卖(甘肃省天祝县羊)	饲养
	QH006	2019	青海省门源回族自治县	羊育肥贩卖(来源不详)	饲养
4型	QH001	2019	安徽省砀山县	羊育肥贩卖(来源不详)	饲养
5型	QH005	2019	青海省大通回族土族自治县	羊育肥贩卖(来源玉树、玛多、海晏)	徒手接生

讨 论

布病在以畜牧业为主的国家和地区较为常见，主要流行在沙特阿拉伯、中东和地中海等国家和地区^[14]。近几年，新疆维吾尔自治区、青海省、内蒙古自治区、西藏自治区的布病发病率呈直线上升趋势^[15]。青海省是布病流

行地区，20世纪80年代通过综合防治，疫情下降至“控制区”标准^[16]。本研究发现，2005—2010年青海省布病发病率保持在较低水平0.02/10万~0.05/10万，2011年开始发病率呈上升趋势，2019年发病率最高。10株菌株时间分布为2013年(分离2株)、2018年(分离2株)和2019年(分离6株)。布病病例分布在6个自治州(市)的31个县(市、区)，发病呈高度散发状态，并呈现一定地域性，病例数位居前5位的是门源回族自治县、天峻县、西宁市、河南蒙古族自治县和海晏县，年龄范围8~82岁，发病年龄集中在20~49岁青壮年，男女性别比为1.8:1，牧/农民的感染率比

5. MLVA-16分型:10株布鲁氏菌株包括5种基因型:①2种单基因型分离株(1株分离自青海省大通回族土族自治县,1株分离自安徽省砀山县);②3种相同基因型分离株(1型基因型有2株分离自青海省达日县和青海省囊谦县,2型基因型有2株分离自青海省门源回族自治县,3型基因型各有2株分离自青海省西宁市湟中区、民和回族土族自治县、门源回族自治县),其差异的串联重复序列位点为 Bruce04 和 Bruce16。见表1。10株布鲁氏菌株的MLVA-16分型和聚类分析结果显示,同青海省已发表文献的26株羊种Ⅲ型布鲁氏菌的遗传关系较近。见图1。

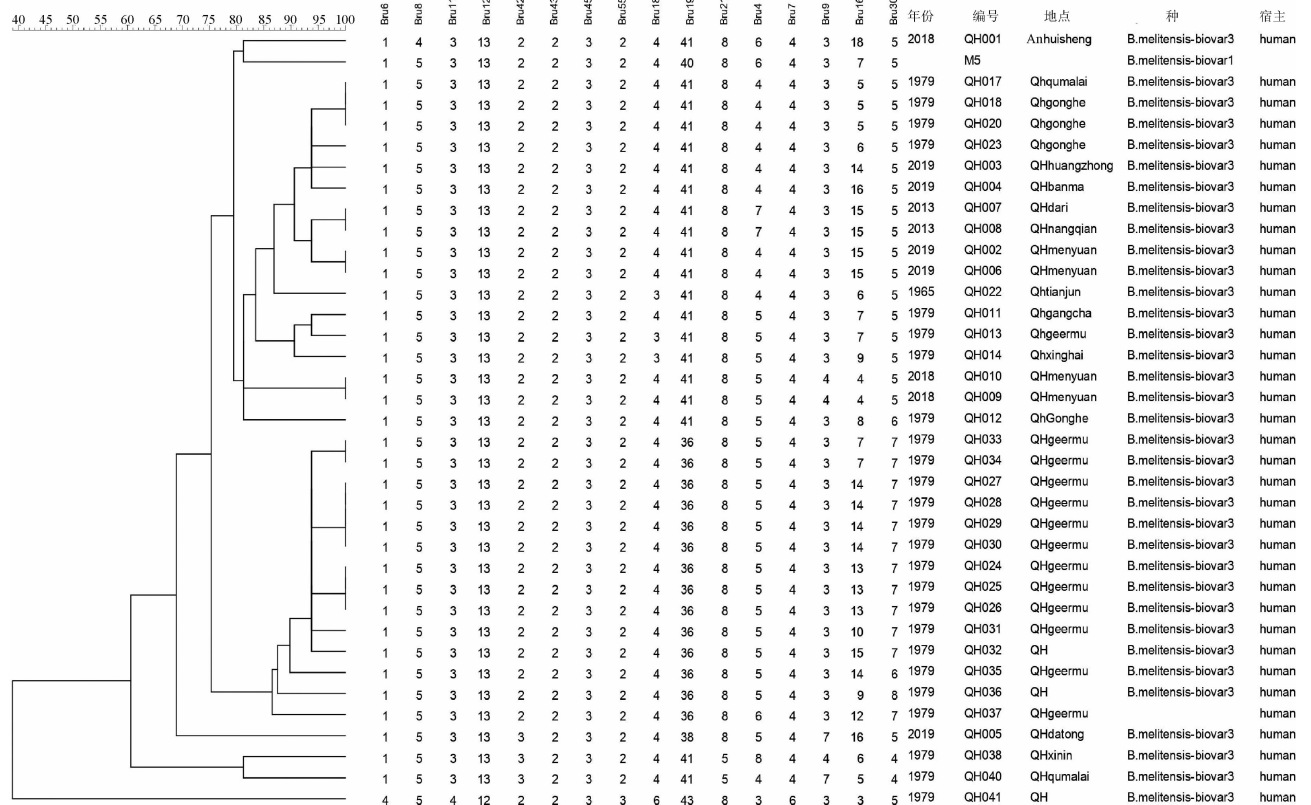


图1 青海省布鲁氏菌分离株多位点串联重复序列聚类分析

其他人群高,与病畜、染菌畜产品接触机会多,有明显的职业特征。人全血中分离的10株菌株中,3株菌株传染源为自繁自育的牛羊,7株菌株为育肥贩卖的羊。近年来的青海省农/牧区和城镇养殖业、育肥产业发展速度较快,加上检疫监管制度不健全,群众缺乏布病防治知识和防护措施,许多未经检疫和患病的牲畜及其制品流通市场,导致了布病的传播。

本研究应用 BCSP31-PCR、AMOS-PCR、MLVA-16等3种方法对10株布鲁氏菌分离株的鉴定结果,与传统的生物学鉴定方法相比,操作过程简单、快速,并降低实验室感染风险。姜海等^[17]通过 MLVA-16方法结合多重PCR法对24株犬种布鲁氏菌进行遗传关系研究,结果表明该方法可用于布鲁氏菌的生物型鉴定。10株布鲁氏菌包括5种基因型(2种基因型为单基因型,3种基因型为相同基因型),表明目前青海省流行的布鲁氏菌存在着丰富的基因多态性。聚类分析结果显示,青海省分离的部分菌株间存在共享基因型,部分菌株基因型分型一致,提示近几年门源回族自治县可能存在布病聚集性疫情,这与青海省报告的布病聚集性疫情相一致。MLVA-16方法结合流行病学资料,可用于布病疫情和暴发的预警,查找危险因素,示踪传播途径,进而追溯传染来源。

综上所述,青海省布病疫情呈回升趋势,应加强人群监测和疫情通报,MLVA-16分型呈基因多态性,提示MLVA-16可用于遗传多样性分析和分子流行病学溯源调查,以提高布病监测能力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 崔步云. 中国布鲁氏菌病流行状况及防治对策[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(12): 1035-1038. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.12.003.
- [2] 崔步云. Epidemic situation and countermeasures of brucellosis in China [J]. Chin J Prev Med, 2014, 48(12): 1035-1038. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.12.003.
- [3] 刘志国, 崔步云, 刘日宏, 等. 布鲁菌分子分型方法应用研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(2): 163-168. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2015.02.015.
- [4] Liu ZG, Cui BY, Liu RH, et al. Application of molecular method for Brucella typing [J]. Chin J Zoon, 2015, 31(2): 163-168. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2015.02.015.
- [5] Haerry TE, Gehring WJ. Intron of the mouse *Hoxa-7* gene contains conserved homeodomain binding sites that can function as an enhancer element in *Drosophila* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 13884-13889. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13884.
- [6] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis [J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(2): 91-99. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
- [7] Oie AHS. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [J]. Bulletin Office International Des Epizooties, 2015: 1092-1106.
- [8] Troy SB, Rickman LS, Davis CE. Brucellosis in San Diego: epidemiology and Species-related differences in acute clinical presentations [J]. Medicine (Baltimore), 2005, 84(3): 174-187. DOI: 10.1097/01.md.0000165659.20988.25.
- [9] 李晔, 余晓花, 李铁峰, 等. 2006—2010年国家级布鲁杆菌病监测点监测结果分析[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(4): 405-408. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.04.015.
- [10] Li Y, Yu XH, Li TF, et al. Brucellosis from 2006 to 2010: an analysis of surveillance results at the national surveillance spots [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(4): 405-408. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.04.015.
- [11] 崔步云. 关注中国布鲁杆菌病疫情发展和疫苗研究[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(4): 355-356. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.04.001.
- [12] Cui BY. Pay attention to the development of brucellosis epidemic situation and vaccine research in China [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(4): 355-356. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.04.001.
- [13] Corbel MJ, Thomas EL. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures [J]. Res Vet Sci, 1985, 38(1): 35-40. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)31844-7.
- [14] 姜海. 布鲁氏菌病防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [15] Jiang SQ. Handbook of Brucellosis Prevention and Control [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [16] 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: 17-38.
- [17] Bureau of Disease Control and Prevention. Ministry of health Brucellosis prevention and control manual [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 17-38.
- [18] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2009.02.004.
- [19] Jiang H, Cui BY, Zhao HY, et al. Use of AMOS-PCR assay for the species identification of Brucella [J]. Chin J Zoon, 2009, 25(2): 107-109. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2009.02.004.
- [20] Li ZJ, Cui BY, Chen H, et al. Molecular typing of *Brucella suis* collected from 1960s to 2010s in China by MLVA and PFGE [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(6): 504-508. DOI: 10.3967/0895-3988.2013.06.013.
- [21] Goodwin ZI, Pascual DW. Brucellosis vaccines for livestock [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2016, 181: 51-58. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.03.011.
- [22] Nan WL, Zhang YY, Tan PF, et al. A rapid cycleave PCR method for distinguishing the vaccine strain Brucella abortus A19 in China [J]. J Vet Diagn Invest, 2016, 28(3): 214-218. DOI: 10.1177/1040638716640315.
- [23] 田广, 胡桂英, 李超, 等. 2006—2010年青海省人间布鲁杆菌病调查分析[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(1): 88-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.01.024.
- [24] Tian G, Hu GY, Li C, et al. Analysis of survey results of human brucellosis in Qinghai province from 2006 to 2010 [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(1): 88-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2012.01.024.
- [25] 姜海, 崔步云, 李兰玉, 等. 用MLVA技术和多重PCR对犬种布鲁氏菌基因分型[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(3): 336-338. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2009.03.010.
- [26] Jiang H, Cui BY, Li LY, et al. Typing *Brucella canis* strains gene with multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and multiplex PCR assay [J]. Lett Biotech, 2009, 20(3): 336-338. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2009.03.010.

(收稿日期: 2020-03-09)

(本文编辑: 斗智)