

# 海南省布鲁氏菌病疫情特征研究

王旭明<sup>1</sup> 黄梅会<sup>1</sup> 崔步云<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>海南省人民医院检验科,海口 570311; <sup>2</sup>中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 感染性疾病诊治协同创新中心 传染病预防控制国家重点实验室,北京 102206; <sup>3</sup>内蒙古自治区布鲁氏菌病防治技术研究中心,通辽 028000

通信作者:崔步云, Email: cuibuyun@icdc.cn

**【摘要】** 目的 分析海南省布鲁氏菌病(布病)流行病学特征。方法 对2012—2017年海南省收集的16株布鲁氏菌采用Vitek 2 compact进行布鲁氏菌初步鉴定,再用传统生物学分型方法进行确证,结合饲养家畜血清学和病原学检测结果分析患者的流行病学特征。结果 Vitek 2 compact鉴定12株为羊种布鲁氏菌,4株为人苍白杆菌。传统生物学分型方法鉴定11株为羊种布鲁氏菌3型,5株为猪种布鲁氏菌3型。菌株对应的16例病例中2012年1例,2013年2例,2014年4例,2015年1例,2016年2例,2017年6例,分布在东方市、临高县、海口市、万宁市、乐东县、定安县等地。同时对疫区东方市745份羊血清进行布鲁氏菌血清抗体检测,阳性47例(6.3%),从东方市病羊采集的标本中分离到羊种布鲁氏菌3型。结论 Vitek 2 compact是一种简单、方便的布鲁氏菌鉴定方法,但不能替代传统生物学分型方法;海南地区布病主要流行的菌种为羊种3型及猪种3型,通过东方市2017年布病疫情,说明海南省有布病疫苗传染人的疫情,布病防控形势严峻。

**【关键词】** 布鲁氏菌; 种型鉴定; 流行病学

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.03.018

## Analysis on brucellosis epidemiological characteristics in Hainan province

Wang Xuming<sup>1</sup>, Huang Meihui<sup>1</sup>, Cui Buyun<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China;

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; <sup>3</sup>Engineering Technology Research Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China

Corresponding author: Cui Buyun, Email: cuibuyun@icdc.cn

**【Abstract】** **Objective** To understand the epidemiological characteristics of brucellosis in Hainan province. **Methods** Automatic microbial identification system of Vitek 2 compact was used for the preliminary identification of 16 brucellosis cases in Hainan province from 2012 to 2017, and further confirmation was performed with traditional biological typing methods. The epidemiological and clinical characteristics of the patients were analyzed in combination with the results of serological and etiological tests for raised livestock. **Results** Vitek 2 compact detection results showed that 12 strains were *Brucella (B.) melitensis* and 4 strains were *Ochrobactrum anthropi*. Traditional biological typing methods showed that 11 strains were *B. melitensis* biovar 3 and 5 strains were *B. suis* biovar 3. Sixteen cases were found in Dongfang, Lingao, Haikou, Wanning, Ledong and Ding'an with 1 case in 2012, 2 cases in 2013, 4 cases in 2014, 1 case in 2015, 2 cases in 2016 and 6 cases in 2017 respectively. At the same time, 745 sheep serum samples from the epidemic area (Dongfang) were collected for *Brucella* serum antibody detection, in which 47 were positive (6.3%). And *B. melitensis* biovar 3 was isolated from samples collected from sick sheep in Dongfang. **Conclusions** Vitek 2 compact is a simple and convenient method for *Brucella* identification, but it cannot replace traditional biological typing methods yet. The major epidemic strains of *Brucella* in Hainan were *B. melitensis* biovar 3 and *B. suis* biovar 3. The epidemic of brucellosis in Dongfang in 2017 indicated that brucellosis had spread from animal to human in Hainan, and it is very important to strengthen the prevention and control of brucellosis in Hainan.

**【Key words】** *Brucella*; Species identification; Epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.03.018

布鲁氏菌病(Brucellosis,布病)是由布鲁氏菌引起的一种严重危害人类和动物健康的人畜共患病。近年来,布病疫情在国内外均出现了回升的势头,有些布病罕见的地区报道的病例逐渐增多。海南省历史上少有病例报道,并非布病的流行区,只有1985年海南省防疫站在儋州市发现1例确诊病例<sup>[1]</sup>,2009年底陵水县报告了全省近20年来首例布病确诊病例后,此后省内几乎每年均有病例报道<sup>[1-2]</sup>,而2017年病例数明显增多,并多集中在东方市,布病防控形势严峻。本研究对2012—2017年分离的布鲁氏菌菌株进行鉴定,调查研究了海南地区布病流行规律和病原学特点,结合对东方市部分羊群进行检测,对相应疑似患者的流行病学特征进行分析,以期为本地区布病防控提供参考。

### 资料与方法

1. 流行病学资料:收集2012—2017年在海南省人民医院诊断的16例布病患者的相关资料和病历,对患者基本情况、流行病学资料、实验诊断结果及患者的临床特征进行汇总分析。同时对疫区东方市布病患者饲养羊群采样检测布病抗体,了解同期采集羊血标本的布鲁氏菌分离结果。

2. 主要仪器与试剂:BacT/Alert® 3D全自动血培养仪(法国生物梅里埃公司),全自动细菌鉴定系统 Vitek 2 compact VT2.R7.01 细菌分析仪及配套细菌鉴定板 GN 卡(法国生物梅里埃公司),CO<sub>2</sub>培养箱(中国上海 HEAL FORCE 公司),菌种保存管(中国北京友康恒业公司)。A、M 单因子血清凝集试验、噬菌体裂解试验试剂由中国 CDC 馈赠。

### 3. 布鲁氏菌的实验室鉴定:

(1)患者来源布鲁氏菌鉴定:16株布鲁氏菌分离自海南省人民医院就诊的患者血液样本,采集全血5~8 ml直接注入血培养瓶,置血培养仪中培养。依照我国 WS 269—2007《布鲁氏菌病诊断标准》、血培养仪和 Vitek 2 compact 鉴定操作手册进行布鲁氏菌鉴定<sup>[3]</sup>。布鲁氏菌初步鉴定:将血培养瓶中的样本转种血平皿,置35℃培养,初步判定参照陈东科等<sup>[4]</sup>的方法。生化鉴定利用 Vitek 2 compact 鉴定功能,取生长48 h待检布鲁氏菌溶解于3 ml灭菌生理盐水中,并稀释为麦氏浊度0.50~0.63,用封口膜封口,将GN鉴定卡导管插入菌悬液中上机鉴定,鉴定完毕后及时将废弃物高压灭菌处理,并做好废物仓消毒灭菌。鉴定结果分析参照梅里埃(GN鉴定卡)布鲁氏菌属和种的生化阳性鉴定标准和参考菌株结

果。传统生物学鉴定方法:包括标准阳性血清凝集试验,染料抑菌试验及噬菌体裂解试验,具体操作步骤遵照《布鲁氏菌病防治手册》<sup>[5]</sup>。

(2)东方市羊血标本检测:对羊血清标本进行布鲁氏菌血清凝集(虎红和试管凝集)试验,由海南省 CDC 负责检测。羊血标本细菌的分离鉴定由中国动物卫生与流行病学中心进行检测。

### 结 果

#### 1. 布病患者的相关资料及流行病学特征:

(1)性别、民族和职业分布:在16例患者中,12例为男性,4例为女性;均为汉族,职业以农民(养殖户)最多(8名),其次是工人(3名),其余为儿童、退休人员、无职业者。

(2)年龄分布:患者主要集中在31~62岁,15例成年人平均年龄为50岁,另1例为儿童(3岁7个月)。

(3)接触史和发病时间:11例羊种3型患者中,6例有明确的与羊接触史。5例猪种3型中,1例有明确与猪接触史,1例有与“布病”患者密切接触史。其余患者接触史不详。从发病后就诊时间来看,全年均可发病,多集中在3—8月(14例),与国内其他地区发病集中时间相似。发病后1个月内前来就诊人数最多(14名),2个月内就诊2名。

(4)临床表现及治疗史:16例患者均有不同程度的发热,均无典型波状热,多为不规则热型,部分患者表现为畏寒、多汗、头晕、头痛、乏力、纳差、肌肉酸痛等症状。3例患者血常规白细胞计数低,中性粒细胞比例有所下降,1例患者白细胞计数及中性粒细胞比例稍升高,其余患者血常规正常。16例患者中13例C-反应蛋白升高,其中1例达到100 mg/L以上,9例血沉升高。将患者感染布鲁氏菌的种型与临床症状及感染指标进行比较分析,发现两者之间无明显关系。2例患者入院前已确诊为布病,2例入院时考虑存在布病可能,另外12例在血培养结果报告前均未考虑布病可能。

16例患者中14例伴有其他类型的疾病,其中1例神经性布病患者为硬膜下血肿术后第3天出现发热,另有1例患者是因月经量增多入院后查出布鲁氏菌感染。15例患者入海南省人民医院前均有治疗史,其中1例患者曾给予多西环素、利福平及头孢哌酮舒巴坦抗感染治疗2 d,经治疗后不再发热,但患者血液仍可培养出布鲁氏菌。1例入海南省人民医院前未给予任何治疗。

(5)种型及地理分布:距2014年初临高县波莲

镇 2 名患者感染猪种布鲁氏菌 3 型后,2017 年相同的村再发生 1 例儿童猪种 3 型感染病例,提示该村可能存在猪种 3 型感染的家畜,亦或是猪种布鲁氏菌 3 型的疫源地。另外 2 例猪种 3 型分别位于万宁市北大镇及定安县龙河镇。11 例羊种 3 型布病病例,有 5 例位于东方市,4 例位于海口市秀英区,另外 2 例分别位于临高县及乐东县,提示海南省布病主要的致病菌及流行菌种是羊种 3 型和猪种 3 型。见表 1。

表 1 2012—2017 年海南省布鲁氏菌种、型及地区分布

发病时间	种	型	地区
2013-11-02	羊	3	临高县博厚镇
2014-06-30	羊	3	乐东县九所镇
2013-06-28	羊	3	海口市秀英区
2015-05-18	羊	3	海口市秀英区
2016-06-29	羊	3	海口市秀英区
2016-08-01	羊	3	海口市秀英区
2017-03-01	羊	3	东方市板桥镇
2017-03-14	羊	3	东方市板桥镇
2017-05-17	羊	3	东方市感城镇
2017-07-21	羊	3	东方市感城镇
2017-08-10	羊	3	东方市感城镇
2012-12-03	猪	3	万宁市北大镇
2014-05-26	猪	3	定安县龙河镇
2014-02-15	猪	3	临高县波莲镇
2014-03-26	猪	3	临高县波莲镇
2017-08-31	猪	3	临高县波莲镇

2. 患者来源布鲁氏菌的鉴定:

(1)细菌学和生化功能鉴定:布鲁氏菌血培养仪上的生长曲线表现为迟缓期曲线较平坦,生长期曲线短,稳定期曲线平坦;培养阳性报警时间 4~5 d。血及巧克力培养基上培养 48 h 可见针尖样菌落。菌落涂片镜下为革兰阴性短小球杆菌,呈“细沙状”,见图 1。培养 72 h,菌落较前稍大,凸起、表面光滑、边缘整齐、不溶血,无色素,尿素酶强阳性(15 min 快速阳性),氧化酶、触酶均为阳性,待检菌涂片经柯氏染色为阳性(红色),见图 2。16 株菌均考虑为布鲁氏菌。

(2)Vitek 2 compact 鉴定:12 株菌被鉴定为羊种布鲁氏菌,4 株被鉴定为人苍白杆菌。羊种布鲁氏菌的鉴定时间为 7~8 h,人苍白杆菌鉴定时间为 5~6 h。具体生化鉴定结果见表 2。

3. 生物分型方法鉴定:11 株为羊种布鲁氏菌

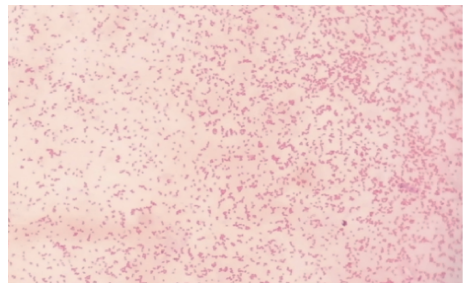


图 1 2015 年海南省布鲁氏菌革兰染色(1 000×)

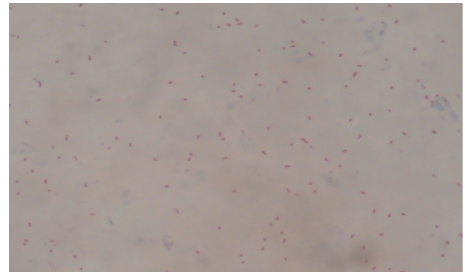


图 2 2015 年海南省布鲁氏菌柯氏染色(1 000×)

3 型,5 株为猪种布鲁氏菌 3 型,结果由中国 CDC 传染病预防控制所布病室复核,见表 3。

4. 东方市羊血标本布鲁氏菌检测:海南省 CDC 对东方市 745 份羊血清进行血清凝集试验,其中阳性 47 份(6.3%)。中国动物卫生与流行病学中心从采集羊血标本中培养分离到羊种布鲁氏菌 3 型。

讨 论

布鲁氏菌感染患者临床表现多样,在鲜有病例的地方临床诊断困难,造成误诊。该菌是专性细胞内病原菌,一旦进入体内,能逃脱吞噬细胞的杀灭,普通抗生素无法杀灭该菌,确诊需细菌的分离培养或检出特异抗体。布鲁氏菌具有高度传染性,是引起实验室感染的主要病原菌之一<sup>[6]</sup>。海南省少有单位开展快速血清检测项目,对疑似感染患者多以作血培养为主,将血培养作为金标准,依靠细菌生长特点来进行初步鉴定,由于血培养的时效性差,影响了患者的及时诊断治疗。海南地区各相关的医疗机构应推广开展布鲁氏菌快速血清检测项目。

Vitek 2 compact 全自动微生物鉴定系统简单、方便、快速,从样本培养到布鲁氏菌鉴定约需 5~10 d

表 2 2012—2017 年海南省布鲁氏菌生化鉴定结果

菌种	菌种数	生化指标阳性菌株数										
		ProA	TyrA	URE	GlyA	ILATk	ELLM	APPA	ADO	SUCT	dGLU	AGLU
羊种布鲁氏菌	12	12	12	12	12	0	12	12	0	0	0	5
人苍白杆菌	4	4	4	4	4	3	4	4	0	0	4	4

注:ProA:L-脯氨酸芳胺酶;TyrA:酪氨酸芳胺酶;URE:尿素酶;GlyA:氨基乙酸芳胺酶;ILATk:L-乳酸盐产碱;ELLM:ELLMAN;APPA:丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶;ADO:侧金盏花醇;SUCT:琥珀酸盐产碱;dGLU:D-葡萄糖;AGLU:α-葡萄糖苷酶



表3 2012—2017年海南省布鲁氏菌传统生物学分型方法鉴定结果

菌株	染料抑菌试验		血清凝集试验		噬菌体裂解试验		
	硫堇	复红	A因子	M因子	Tb	Tb×10 <sup>4</sup>	Bk <sub>2</sub>
羊种布鲁氏菌16M	+	+	-	+	-	-	+
牛种布鲁氏菌544A	-	+	+	-	+	+	+
猪种布鲁氏菌1330S	+	-	+	-	-	+	+
羊种3型布鲁氏菌11株	+	+	+	+	-	-	+
猪种3型布鲁氏菌5株	+	+	+	-	-	+	+

注：+为阳性；-为阴性；A因子、M因子分别为表面抗原A、M的单相特异性血清；Tb、Tb×10<sup>4</sup>、Bk<sub>2</sub>分别为相应噬菌体裂解稀释度

可完成,既可用于大部分临床菌株的鉴定,还可以鉴定出绝大部分布鲁氏菌。可准确鉴定到属,但在种型方面的分辨率尚不理想,部分菌株可出现鉴定错误或无法鉴定的情况。本研究16株有4株被鉴定为人苍白杆菌。经典鉴定方法4株被鉴定为人苍白杆菌的菌株均为猪种布鲁氏菌3型,猪种布鲁氏菌其生化反应可能与人苍白杆菌非常相似,易发生误判。并且目前本实验室所用的细菌鉴定仪器数据库无猪种布鲁氏菌也是造成错误的重要原因<sup>[7]</sup>。本实验室的鉴定结果与肖春霞等<sup>[8]</sup>的鉴定结果(127株地方菌株中,121株被鉴定为羊种布鲁氏菌,4株被鉴定为人苍白杆菌)较为相似。

传统生物学分型方法是布鲁氏菌经典的菌种鉴定和生物型鉴定的依据,具有成本低廉、分辨率高、重复性好、分型能力强、结果易解释等特点,是布鲁氏菌生物种型鉴定的金标准。目前各种分子生物学分型方法快速发展,但是尚未取代传统的经典分型方法。

海南省畜牧业以生猪养殖为主,辅以牛、羊产业,农村居民多为生猪散养户。许多农村卫生环境较差,猪粪、羊粪随地排放,这可能是农民感染布病的主要途径。参考已有文献<sup>[1-2]</sup>,结合本研究中临床布病病例及东方市羊血标本分离到羊种布鲁氏菌3型,提示该地区传染途径可能为羊传染到人。海南省布病主要的致病菌及流行菌种是羊种3型和猪种3型,这与国内以羊种菌为主要流行菌种不同。一般来说羊种菌毒力最强,猪种和牛种次之,但是海南省近几年发现的布病患者两个种型其临床表现并无明显差异,这与已报道的文献是有差异的。提示海南省布病患者及布鲁氏菌具有自己的特点。

纵观16例布病患者的时间、地理及种型分布,本研究结果显示,2009—2017年海南省布鲁氏菌患者以散发性分布为主要特征,且均未从相关家畜得到传染源的证实。而2017年布病病例忽然增多,根据中国CDC疫情报告网络数据,全省全年报告30例新发布病病例,其中在东方市报告发病20例,发病

率为5.05/10万,从患者饲养的羊血标本检测到血清学阳性,从东方市羊血标本分离出布鲁氏菌,提示东方市已经发生由当地的传染源疫苗引起的人感染布病的疫情,海南省布病防控形势已经与全国一样严峻,应在海南省内特别是东方市加强布病防治知识的宣传。医护人员及微生物工作人员也应加强布病诊断知识的培训,不断提高业务水平和识别能力,避免患者的漏诊、误诊。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

致谢 感谢中国动物卫生与流行病学中心范伟兴主任、狄栋栋老师、中国CDC传染病预防控制所布病室及海南省CDC相关老师对论文的帮助

参 考 文 献

- [1] 翁勇,闫秀娟.四例布鲁氏菌病流行特征分析[J].海南医学,2013,24(17):2626-2627. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2013.17.1091.  
Weng Y, Yan XJ. Epidemiological characteristics of four cases brucellosis [J]. Hainan Med J, 2013, 24(17): 2626-2627. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2013.17.1091.
- [2] 陈海,李春辉,朱兰兰,等.感染性心内膜炎患者血液分离到羊种布鲁氏菌[J].中国人兽共患病学报,2010,26(3):289-291. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2010.03.025.  
Chen H, Li CH, Zhu LL, et al. Isolation of brucella melitensis from the blood of infective endocarditis infected patient [J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(3): 289-291. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2010.03.025.
- [3] 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:人民卫生出版社,2007.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. WS 269-2007 Diagnostic criteria for brucellosis [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [4] 陈东科,陈丽,许宏涛.柯氏染色法快速鉴别布鲁菌的方法学探讨[J].临床检验杂志,2015,33(11):805-807. DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2015.11.02.  
Chen DK, Chen L, Xu HT. Discussion the method of rapid identification for brucellosis by Kovac's staining [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2015, 33(11): 805-807. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2015.11.02.
- [5] 中华人民共和国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,2008:19-29.  
Disease Prevention and Control Bureau of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Brucellosis control manual [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 19-29.
- [6] 徐卫民,王衡,施世锋,等.浙江1例实验室感染布鲁氏菌病例及其警示[J].中国地方病防治杂志,2010,25(1):58.  
Xu WM, Wang H, Shi SF, et al. A case of brucellosis infected in a laboratory in Zhejiang province and its warning [J]. Chin J Ctr Endem Dis, 2010, 25(1): 58.
- [7] Panagopoulos MI, Saint Jean M, Brun D, et al. *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: report of four cases initially misidentified as *Acinetobacter lwoffii* [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3762-3764. DOI: 10.1128/JCM.00595-10.
- [8] 肖春霞,赵鸿雁,崔步云,等.全自动微生物分析系统对布鲁杆菌属和种鉴定效果的研究[J].中华地方病学杂志,2015,34(6):416-420. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4255.2015.06.007.  
Xiao CX, Zhao HY, Cui BY, et al. Identification effects of automatic microbial analysis system on Brucella genus and species [J]. Chin J Endemiol, 2015, 34(6): 416-420. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4255.2015.06.007.

(收稿日期:2018-09-09)

(本文编辑:万玉立)