

甘肃省永靖县奶牛布鲁氏菌病 监测与病原分离鉴定

吴志仓¹, 曹小安², 林学仕¹, 张俊文¹, 张丽蓉¹, 金淑霞¹, 王烈花¹

(1. 永靖县动物疫病预防控制中心, 甘肃永靖 731600;

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃兰州 730046)

摘要: 为查明甘肃省永靖县奶牛布鲁氏菌病流行情况、感染菌种和类型, 2013—2017年对永靖县8月龄以上奶牛进行了布鲁氏菌病监测, 对2016年检出的3份疑似感染布鲁氏菌奶牛的脾脏进行了病原分离与鉴定。结果显示: 2013—2014年检测奶牛444头, 未检出阳性; 2015—2016年检测奶牛706头, 检出阳性63头, 个体阳性率为8.92%; 3份脾脏样本均为布鲁氏菌PCR检测阳性, 细菌分离培养15d, 只有1份生长菌落; 将分离菌株用AMOS-PCR进行检测, 获得流产布鲁氏菌特征的扩增条带, 且分离菌株的omp25基因测序结果与流产布鲁氏菌高度吻合。本监测和细菌分离鉴定结果为该地布鲁氏菌病防控提供了技术支持。

关键词: 布鲁氏菌; 奶牛; 监测; 分离鉴定; 永靖县

中图分类号: S851.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)10-0083-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.10.022

Surveillance, Isolation and Identification of *Brucella* Surveillance in Cows in Yongjing County of Gansu Province

Wu Zhicang¹, Cao Xiaolan², Lin Xueshi¹, Zhang Junwen¹,
Zhang Lirong¹, Jin Shuxia¹, Wang Liehua¹

(1. Yongjing Animal Diseases Prevention and Control Center, Yongjing, Gansu 731600, China;

2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: In order to find out the prevalence status of cow brucellosis in Yongjing County of Gansu Province and to determine the types of infection strain, during 2013 to 2017, brucellosis surveillance was carried out towards cows over 8 months of age, and 3 spleen samples were detected *Brucella*-positive in 2016. Then isolation and identification of *Brucella* in suspected samples was carried out. Results showed that during 2013 to 2014, 444 cows were tested, no positive cow was found; during 2015 to 2016, 706 cows were tested, and 63 of them were detected brucellosis-positive, the individual positive rate was 8.92%. For the 3 suspected spleen samples, PCR tests all showed positive results. After 15 days of bacteria isolation and culture, bacteria colonies only grew in one culture plate. At last, one bacterial strain was isolated. Through AMOS-PCR detection, the amplified band revealed the characteristic of *Brucella abortus*, also, the sequencing results of omp25 gene of the isolate showed high consistency with that of *Brucella abortus*. In conclusion, the research results would provide technical supports for brucellosis prevention and control in Yongjing County.

Key words: *Brucella*; dairy cow; monitorsurveillance; isolation and identification; Yongjing County

布鲁氏菌病(以下简称布病)是我国的人乙类传染病、家畜二类传染病,也是世界卫生组织

基金项目:临夏州科技计划项目(2017-N-3-014)

通信作者:曹小安

(WHO)确认的致残率最高的动物源性人兽共患病。畜间布病以牛羊为主,染疫家畜及其产品是人间布病的主要传染源,牲畜养殖、畜产品加工、动物防疫和布病防治工作人员是高危人群。布病不仅危害

人体健康，还阻碍畜牧业持续健康发展，严重影响社会稳定和经济发展^[1]。

最近几年，布鲁氏菌广泛流行于我国大部分地区，特别是西北地区。布鲁氏菌有多种血清型，其中羊主要感染马耳他布鲁氏菌3型，牛主要感染流产布鲁氏菌1型和3型。猪布鲁氏菌多在我国南方一些地区流行，北方比较少见^[2-3]。研究发现，布病呈全国扩散趋势，且流行菌株的特征发生了一些变化，如羊原来以马耳他布鲁氏菌1型感染为主，现在转变为马耳他布鲁氏菌3型^[4-5]。因此，为查明永靖县奶牛布鲁氏菌病流行情况、感染菌种和类型，以便为布病防控提供技术支撑，2013—2017对永靖县奶牛进行了连续5年的布病监测，并对2016年检出的布病阳性牛，采集病料进行了病原分离与鉴定。

1 材料与方法

1.1 监测动物和样品采集

对永靖县刘家峡镇、太极镇、盐锅峡镇、岷源镇、三墩镇和西河镇6个川塬区乡镇26个行政村农户中饲养的8月龄以上奶牛（怀孕后期奶牛为避免应急反应引起流产暂不检测）进行采样监测。血清样品采集，按常规无菌采血方法，空腹颈静脉采血置于试管中，然后将试管摆成斜面，置于4℃冰箱，5h后取出，放在室温下待血清自然析出后收集血清；收集3份疑似感染布鲁氏菌奶牛脾脏样品，-20℃冷冻保存备检。

1.2 试剂

Rnase A酶、Proteinase K和PCR反应酶等：购自于大连宝生物公司；BBL™布鲁氏菌肉汤培养基和布鲁氏菌基础培养基选择添加剂：购自于BD公司；SDS、酚-氯仿-异戊醇和引物等：来自于上海生工。无水乙醇等均为国产分析纯试剂。

1.3 培养基制备

取BBL™布鲁氏菌肉汤28g、琼脂15g，加入蒸馏水或去离子水900mL，调制到pH7.2，然后定容至1L，搅拌加热至完全溶解，121℃高压灭菌15min，待培养基温度降至60℃左右时，加入50mL无菌马血清和新配制的布鲁氏菌基础培

养基选择添加剂，混合均匀后制作布鲁氏菌固体培养基平皿，备用。

1.4 血清学检测

采集血清用虎红平板凝集试验（RBPT）初筛，对初筛检测出的阳性奶牛血样进行试管凝集试验（SAT）。操作及结果判定标准，按照《动物布鲁氏菌病诊断技术》（GB/T 18646-2002）进行。

1.5 病原检测

1.5.1 病料中基因组提取 取米粒大小脾脏放入离心管中，参照文献^[6]提取总基因组DNA：在离心管中加入400μL NET buffer、100μL 20%的SDS（终浓度3.4%），混匀，95℃孵育10min后，迅速放置于冰上冷却；在样品中加入Rnase A酶至终浓度为75μg/μL，50℃作用2h后，加入proteinase K至终浓度为325μg/μL，50℃作用2h；在消化液中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇（25:24:1），颠倒摇匀2~3次，4℃7000r/min离心10min；转移上清液于另一离心管中，重复用酚-氯仿-异戊醇抽提2次后，加入2.5倍体积的预冷无水乙醇，-20℃沉淀30min，12000r/min离心10min，弃取所有液相；用1mL 70%乙醇漂洗2~3次，12000r/min离心2min；真空或室温干燥后，将DNA沉淀物用50μL无菌双蒸水溶解，-20℃保存备用。

1.5.2 PCR检测 参照文献[6]，用布鲁氏菌Nested-PCR检测病料中的细菌。一扩反应体系：ExTaq mix 25μL，BP1和BP2引物各1μL，模板4μL、无菌双蒸水19μL；二扩：ExTaq mix 25μL，BP3和BP4引物各1μL，一扩产物2μL、无菌双蒸水21μL。一扩反应条件：95℃充分变性5min，35个循环，分别为94℃变性1min，49℃退火1min，72℃延伸1min，72℃延伸10min；二扩：20个循环，分别为94℃变性30s，51℃退火1min，72℃延伸1min，72℃延伸6min。

1.6 细菌分离

取采集的病料100mg左右放于1.5mL离心管，加入500μL无菌生理盐水，用组织破碎仪破碎，5000r/min离心10min，无菌条件下将沉淀均匀涂

布在选择性培养基平皿。将涂布好的平板置 37 °C 5%~10% CO₂ 温箱培养, 每天观察细菌生长情况, 记录生长菌落数量、颜色、大小、光滑度等。培养 15 d 后无细菌生长者为阴性。以接种针挑取选择性培养平板单菌落, 划线接种于固体培养基和液体培养基, 置 37 °C CO₂ 温箱培养, 观察纯培养细菌在固体和液体培养基的生长特性。

1.7 分离菌株 AMOS-PCR 检测

AMOS-PCR 体系: ExTaq mix 25 μL、AMOS-(A1) 1 μL、AMOS-(M) 1.5 μL、AMOS-(O) 1.5 μL、AMOS-(S) 1 μL、AMOS-(A2) 1 μL、AMOS-(IS711) 2 μL、DNA 模板 3 μL、ddH₂O 14 μL。反应条件: 95 °C 5 min, 40 循环: 94 °C 1 min, 60 °C 1.5 min, 72 °C 1 min; 最后 72 °C 作用 10 min。引物见表 1。

表 1 分离菌株 AMOS-PCR 检测

引物	引物序列 (5'-3')
AMOS-(A1)	5'-gac gaa cgg aat ttt tcc aat ccc-3'
AMOS-(M)	5'-aaa tcg cgt cct tgc tgg tct ga-3'
AMOS-(O)	5'-cgg gtt ctg gca cca tcg tcg-3'
AMOS-(S)	5'-gcg cgg ttt tct gaa ggt tca gg-3'
AMOS-(A2)	5'-gcg cag cgt tgc ggc aat tg-3'
AMOS-(IS711)	5'-tgc cga tca ctt aag ggc ctt cat-3'

1.6 分离菌株的 *omp25* 基因测序

为进一步鉴定分离菌株, 选用该细菌保守的 *omp25* 基因作序列分析。用已知的序列引物扩增分离菌落的 DNA, 获得 *omp25* 基因, 将其克隆到 pMD18-T 载体上, 送入测序公司测序。方法参照文献 [6]。将测序结果与已知公开的其它基因组序列用 Mega 软件进行系统发生树分析。

2 结果

2.1 血清学检测

2013—2017 年永靖县共检测奶牛 1 431 头, 检出布鲁氏菌病阳性奶牛 64 头, 平均个体阳性率为 4.47%; 共检测奶牛群 160 个, 检出布鲁氏菌病阳性牛群 12 个, 平均群体阳性率为 7.50%。其中: 2013—2014 年检测奶牛 444 头, 未检出阳性牛; 2015—2016 年检测奶牛 706 头, 检出阳性牛 63 头, 个体阳性率分别 8.92%; 2017 年检测 281 头, 检

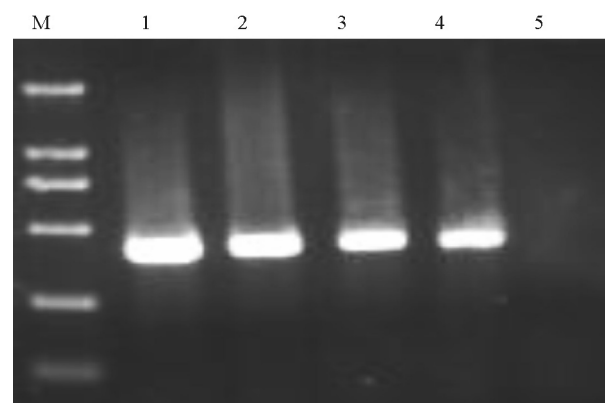
出阳性 1 头, 个体阳性率为 0.36% (表 2)。对检出的阳性牛全部进行了扑杀和无害化处理。

表 2 2013—2017 年永靖县奶牛布鲁氏菌病监测结果

检测时间	存栏数 / 只数	检测份数 / 份数	阳性率 / %	个体阳性数 / 个	牛群数 / 个	阳性群数 / 个	群体阳性率 / %
2013 年 9 月	528	295	0	0	30	0	0
2014 年 9—10 月	512	149	0	0	28	0	0
2015 年 10 月	527	221	24	10.9	27	4	14.80
2016 年 3—4 月	619	485	39	8.04	40	7	17.50
2017 年 7 月	430	281	1	0.36	35	1	2.86
合计	2 676	1 431	64	4.47	160	12	7.50

2.2 Nested-PCR 检测

通过 Nested-PCR 对样本进行检测, 发现 3 份样本均为布鲁氏菌阳性 (图 1)。



M. 2000 bp DNA Marker, 1. 阳性对照, 2-4. 检测样本; 5. 阴性对照

图 1 Nested-PCR 检测结果

2.3 细菌分离鉴定

培养 15 d 内, 3 份样本中, 只有 1 份生长出透明、光滑菌落。

2.4 分离菌株 AMOS-PCR 检测

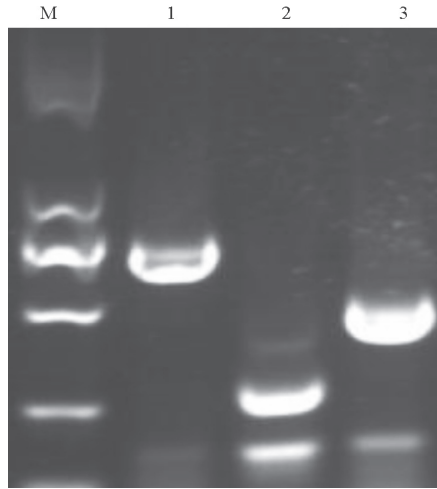
对分离获得的 1 株细菌进行 AMOS-PCR 鉴定, 结果扩增出流产布鲁氏菌特征性条带 (图 2)。

2.5 分离菌株 *omp25* 基因测序与分析

omp25 基因测序和系统发生树结果表明, 分离获得菌株的 *omp25* 基因序列与已经公布的基因序列高度一致, 为流产布鲁氏菌菌株特有序列 (图 3、图 4)。

3 讨论

永靖县从 1971 年开始采取检疫、扑杀病畜、免疫注射、治疗病人等综合防治措施防治布病,



M. 2000 bp NDA Marker; 1. 马耳他布鲁氏菌对照; 2. 猪布鲁氏菌对照; 3. 分离菌落流产布鲁氏菌扩增
图2 AMOS-PCR 鉴定结果

TCTCGTAATCGTCTCGGCTGCGCTGCTGCCGTTCTCTGCGACCCGCTTTTGTGCGCCG
ACGCCATCCAGGAACAGCCTCCGGTTCCGGTCCGGTTGAAGTAGCTCCCCAGTA
TAGCTGGGCTGGTGGCTATACCGTCTTTACCTTGGCTATGGCTGGAACAAGGCCA
AGACCAGCACCGTTGGCAGCATCAAGCCTGACGATTGGAAGGCTGGCGCCTTTGC
TGGCTGGAACCTCCAGCAGGACCAGATCGTATACGGTGTGAAGGTGATGCAGGT
TATTCTGGGCCAAGAAGTCCAAGGACGGCTGGAAGTCAAGCAGGGCTTTGAA
GGCTCGCTGCGTGCCCGCTCGGCTACGACCTGAACCCGGTTATGCGCTACCTCA
CGGCTGGTATTGCCGGTTCGACAGATCAAGCTTAACAACGGCTTGGACGACGAAAG
CAAGTTCGCGTGGGTTGGACGGCTGGTGCCTGCTCGAAGCCAAGCTG

图3 omp25 基因测序结果

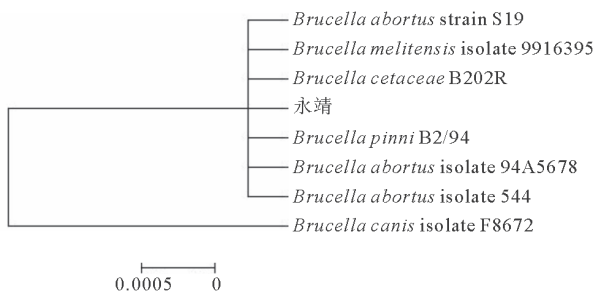


图4 布鲁氏菌 omp25 基因系统发生树

1983年达到了“控制区”标准，1995年达到了“稳定控制区”标准^[5]。查阅1996—2014年永靖县奶牛布病监测记录，发现该地连续18年未检出阳性牛。而本次监测在2015—2016年突然检出63头阳性牛，个体阳性率高达8.9%。调查发现，这些病例主要是输入性病例，检测出的11个阳性奶牛群中，只有3个是自养牛群，其他全部是从周边地区

调入的，表明永靖县的奶牛“落地检疫”存在漏洞。

2017年永靖县检测奶牛281头，检出布鲁氏菌病阳性1头，个体阳性率下降到0.36%；检测牛群35个，检出阳性群1个，群体阳性率下降到2.86%，说明对检出的布病阳性牛全部扑杀并进行无害化处理的措施效果明显。今后，应当加大监测频次，每年至少开展2次奶牛布病检测、1次饲养人员布病检测。

最近几年布病在我国再次流行，特别是在西北地区，由马耳他布鲁氏菌引起的羊布病流行严重，局部地区出现疫情暴发^[7-8]。由于羊布病的广泛流行，在西部地区，马耳他布鲁氏菌也成为牛布病的主要病原^[9-11]。本研究经细菌分离与鉴定发现，感染该地奶牛的布鲁氏菌为流产布鲁氏菌，说明永靖县奶牛布病的感染源仍来自牛，无跨种传播迹象。

4 结论

本研究对2013—2017年永靖县8月龄以上奶牛进行了布病监测，发现该地奶牛布病个体阳性率呈现突然上升随后下降趋势，说明“检测-扑杀”的布病防控措施效果明显；对分离出的1株布鲁氏菌菌株，通过AMOS-PCR检测和omp25基因测序分析，鉴定为流产布鲁氏菌，说明该地奶牛布病感染主要来源于牛。调查发现，布病阳性病例主要是输入性病例，说明需要加强牛只跨区移动的检疫和监管。

参考文献:

- [1] ROUSHAN M R H, EBRAHIMPOUR S. Human brucellosis: An overview[J]. Caspian journal of internal medicine, 2015, 6 (1) : 46-47.
- [2] CAO X, LI Z, LIU Z, et al. Molecular epidemiological characterization of *Brucella* isolates from sheep and yaks in northwest China[J]. Transboundary emerging disease, 2018, 65: e425-433.
- [3] 刘志国, 王妙, 刘日宏, 等. 内蒙古布鲁氏菌临床分离株多位点序列分析研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32 (11) : 991-996.
- [4] TIAN G Z, CUI B Y, PIAO D R, et al. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of Chinese *Brucella* strains isolated from 1953 to 2013[J]. Infectious disease of poverty, 2017, 6 (1) : 89.

(下转第89页)

(上接第 86 页)

- [5] 吴志仓. 永靖县布鲁氏菌病防制结果 [J]. 中国地方病防治杂志, 2000, 15 (5) : 17-18.
- [6] 邱昌庆, 曹小安, 杨春华, 等. 乳牛布鲁氏菌病病原 DNA 快速检测技术的研究 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35 (2) : 85-89.
- [7] 刘双兰, 惠跃龙. 2006—2014 年甘肃省庆阳市布鲁氏菌病流行趋势分析 [J]. 疫病预防控制通报, 2015, 30(6): 37-39.
- [8] CAO X, LI S, LI Z, et al. Enzootic situation and molecular epidemiology of *Brucella* in livestock from 2011 to 2015 in Qingyang, China[J]. Emerging microbes & infections, 2018, 7 (1) : 58.
- [9] 卢旺银, 贺奋义, 李世恩. 庆阳市 2009—2013 年间布鲁氏菌病流行病学调查 [J]. 畜牧兽医杂志, 2014, 33(3): 73-76.
- [10] 鲁志平. S2 株、M5 株布鲁氏菌减毒活疫苗对山羊免疫效果的比较试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016 (8) : 160-162.
- [11] 王芸, 崔登峰, 罗静, 等. 甘肃省庆阳市人间布鲁氏菌病监测结果分析 [J]. 疫病预防控制通报, 2015, 30 (3) : 31-33.

(责任编辑: 朱迪国)