

DOI:10.13350/j.cjpb.220712

• 调查研究 •

贵州省一起布鲁氏菌病聚集性疫情的病原学调查 与分子流行病学分析*

谭勤琴^{1,2}, 王月², 刘英², 陶忠发², 杨幸贵^{1,2}, 马青², 胡勇¹, 李世军^{1,2**}

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省疾病预防控制中心)

【摘要】 **目的** 对2021年贵州省一起疑似布鲁氏菌病聚集性疫情开展病原学调查和分子流行病学分析。 **方法** 采用血培养法从疑似感染布鲁氏菌病的患者和病羊的血液分离布鲁氏菌, 分别运用 BCSP31-PCR 和 AMOS-PCR 对疑似菌株进行布鲁氏菌属及种/型的鉴定, 应用多位点可变数目串联重复序列 (MLVA-16) 分析技术对其进行分子分型, 将 MLVA 分型结果与近年来贵州省及国内各地布鲁氏菌代表株进行聚类分析, 了解菌株间的聚类关系。 **结果** 从16份疑似患者全血标本分离出5株疑似布鲁氏菌, 从19份疑似病羊全血标本分离出1株疑似布鲁氏菌, BCSP31-PCR 将6株疑似菌均鉴定为布鲁氏菌属细菌, AMOS-PCR 其均鉴定为羊种布鲁氏菌。 MLVA-16 分析显示6株疫情菌株被分为3种 MLVA 型, 其中来自患者的分离株 GZ-QN 1、GZ-QN 4 及 GZ-QN 6 共享 MLVA 型 1(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-7-4-3-4-6), 来自1患者分离株 GZ-QN 8 与来自1病羊分离株 GZ-QN A691 共享 MLVA 型 2(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-8-4-3-6-6), 来自1患者分离株 GZ-QN 14 为独立的 MLVA 型 3(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-8-4-3-7-6)。基于 MLVA-16 分型数据聚类显示, 引起贵州省本起疫情的布鲁氏菌与羊种生物3型菌株聚类较近, 且与来自福建、新疆的布鲁氏菌聚在同一小分支。 **结论** 引起本起疫情病原体为的羊种布鲁氏菌且具有 MLVA 型别多样性, 可能与福建、新疆等地的羊种布鲁氏菌菌株具有关联的输入性感染引起的聚集性疫情。

【关键词】 布鲁氏菌病; 布鲁氏菌; AMOS-PCR; MLVA; 贵州省

【中图分类号】 R378.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0802-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul.; 17(7): 802-806.]

Etiological investigation and molecular epidemiology of an aggregated epidemic of brucellosis in Guizhou Province

TAN Qin-qin^{1,2}, WANG Yue², LIU Ying², TAO Zhong-fa², YANG Xing-gui^{1,2}, MA Qing², HU Yong¹, LI Shi-jun^{1,2} (1. School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Guizhou provincial Center for Disease Control and Prevention) **

【Abstract】 **Objective** To provide etiological basis for case diagnosis and epidemic prevention and control, Pathogenic investigation and molecular epidemiological analysis were carried out on a suspected brucellosis epidemic an aggregated epidemic of suspected brucellosis in Guizhou Province in 2021 was performed by etiological investigation and molecular epidemiological analysis in Guizhou Province in 2021. **Methods** After the *Brucella* spp. strains were isolated from the blood samples of suspected infected patients and goats by blood culture method, they were further identified by genus and species/type using BCSP31-PCR and AMOS-PCR respectively, and also typed using multiple locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA-16). To analyze the clustering relationships of different strains, the MLVA typing results of *Brucella* spp. strains in Guizhou province were clustered with representative strains of *Brucella* spp. from other regions of China in recent years. In order to analyzed the clustering relationship in different strains, the results of MLVA typing were clustered with representative strains of *Brucella* spp. in Guizhou province and other regions of China in recent years. **Results** Six suspected *Brucella* spp. strains were isolated, including 5 isolates from 16 whole blood samples of suspected patients and 1 isolate from 19 whole blood samples of suspected sick goats, which were identified as *Brucella* by BCSP31-PCR *melitensis* (*B. melitensis*) by BCSP31-PCR and *melitensis* *Brucella* (*B. melitensis*) by BCSP31- and AMOS-PCR assays. MLVA-16 analysis showed that the six strains were divided into three MLVA types, among which three strains isolated from different patients (GZ-QN 1, GZ-QN 4 and, GZ-QN 6) shared MLVA type 1 (1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-7-4-3-4-6), the one patient strain (GZ-QN 8) (GZ-QN 8 isolated from a patient) and one sick goat strain (GZ-

* **【基金项目】** 贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合[2016]4021); 贵州省传染病人才培养基地建设项目子项目(No. RCJD2102)。

** **【通讯作者】** 李世军, E-mail: zjumedjun@163.com

【作者简介】 谭勤琴(1990-), 女, 四川德阳人, 在读研究生硕士, 主管检验师, 主要从事病原微生物学研究。E-mail: 837578481@qq.com

QN A691) (GZ-QN A691 isolated from a sick sheep) shared MLVA type 2 (1-5-3-13-2-3-2-4-20-8-4-3-6-6), and another one patient strain isolate (GZ-QN 14) (GZ-QN 14) isolated from the patient was an independent MLVA type 3 (1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-8-4-3-7-6). The clustering results analysis based on MLVA-16 typing data showed that *B. melitensis* *Brucella* spp. strains causing the epidemic in Guizhou Province were clustered closer to *B. melitensis* bv3, and clustered in the same small branch with *Brucella* spp. strains from Fujian and Xinjiang. The results of cluster analysis based on MLVA-16 typing data showed that the *Brucella* spp. strains causing the epidemic in Guizhou Province were closely clustered with *B. melitensis* bv3, and clustered in the same small branch with *Brucella* spp. strains from Fujian and Xinjiang.

Conclusion The *B. melitensis* was the pathogen that caused the of *B. melitensis* is the pathogen of the aggregation epidemic of brucellosis, and this human epidemic was caused by contacting goats infected with *Brucella* spp. The *Brucella* spp. causing the epidemic and had a diversity of MLVA types, had with MLVA type diversity, and owned a recent clustering relationship with strains from Fujian, Xinjiang and other regions. These data suggested that the epidemic may be an aggregated epidemic which may be an might be caused by an imported infection associated with *B. melitensis* *Brucella* spp. strains of sheep from in Fujian, Xinjiang, and other regions.

【Key words】 Brucellosis; *Brucella*; AMOS-PCR; MLVA-16; Guizhou Province

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌属细菌侵入机体引起具有传染性的变态反应性质的一种人畜共患病,是《中华人民共和国传染病防治法》规定报告的乙类传染病^[1]。人感染布鲁氏菌可出现发热、乏力、关节疼痛等症状^[2],动物感染布鲁氏菌可导致动物睾丸炎、流产等^[3],危害严重。1970年FAO/WHO把布鲁氏菌属分为6个种,19个生物型^[1],现已扩增至12个种^[4]。布鲁氏菌种/型的鉴定对于疫情判断及流行病学溯源分析较为重要,分子分型技术应用于细菌种型鉴定可在一定程度上克服传统分型方法的缺陷。因布氏菌属种间DNA同源性高^[5],故低分辨率分子分型技术应用受限,而多位点可变数目串联重复序列分析(Multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)是根据菌株基因组中不同位点的可变数量串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)的重复单元拷贝数的差异来进行分子分型的技术,具有分辨率高、重复性好、可比性高等优点^[6],现广泛用于分子流行病学溯源分析^[7-9]。

本研究对贵州省2021年的一起疑似布鲁氏菌病聚集性疫情开展病原学调查,从疑似患者及其饲养的羊群血液分离出布鲁氏菌疑似菌株,采用BCSP31-PCR和AMOS-PCR方法对分离株进行属和种/型鉴定,应用MLVA-16技术对来自患者和病羊的分离株进行分子分型,并与近年来贵州省及国内各地布氏菌代表株进行聚类分析,了解本起疫情中人与羊的分离株与近年来的各地分离株之间的关联性,为病例的确诊和疫情防控提供病原学依据。

材料与方法

1 材料

1.1 标本 采集自疫情发生地的16份人全血标本和19份羊全血标本。

1.2 主要仪器与试剂 PCR扩增仪购于德国华奥仪器有限公司;电泳仪和凝胶成像仪购于美国Bio-Rad公司。布鲁氏菌琼脂成品培养基购于美国BD公司生产;PCR试剂购于英国New England Biolabs Inc公司;引物由北京天一辉生物公司合成。

1.3 分析工具 MLVA分型在线网站 <http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/>及BioNumerics(Version 8.0)软件。

2 方法

2.1 细菌分离培养 按照《2019布鲁氏菌病诊断标准(WS269-2019)》提供的方法采集人和羊的全血接种于双相培养瓶,将双相培养瓶置CO₂孵箱于37℃下培养,观察1~2周,阳性菌落生长后挑取单菌落接种于布氏琼脂平板,进行纯培养。鉴于布鲁氏菌特殊的生长特性,培养周期达4周,若仍无细菌生长,则判为阴性。

2.2 DNA提取 挑取经37℃培养至对数生长期的布鲁氏菌疑似菌落至预先加入纯水的EP管制备菌悬液,采用水煮法提取菌株基因组DNA。提取布鲁氏菌疫苗株M5、A19、S2的基因组DNA作为阳性对照。

2.3 BCSP31-PCR法鉴定布鲁氏菌属 利用布鲁氏菌属特异性基因BCSP-31^[10-11]对布鲁氏菌属细菌进行鉴定,依据文献^[12]使用的引物B4和B5序列及扩增参数对疑似布鲁氏菌DNA进行扩增,同时采用布鲁氏菌疫苗株M5、A19及S2基因组DNA作为阳性对照,纯水作为阴性对照。扩增产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2.4 AMOS-PCR法鉴定布鲁氏菌种/型 以布鲁氏菌属特异性插入序列IS711^[13-14]为基础建立的多重PCR对布鲁氏菌进行种/型的鉴定^[15-16]。依据文献^[17]使用的引物序列和扩增参数对疑似布鲁氏菌DNA进行扩增,采用布鲁氏菌疫苗株M5、A19及S2基因组DNA作为阳性对照,纯水作为阴性对照。扩

增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2.5 生物种型鉴定 根据布鲁氏菌菌落形态及生长特性,运用布鲁氏菌单项特异性 A/M 血清凝集试验,CO₂ 需求试验、噬菌体(TB 和 BK₂)裂解试验等进行生物种型鉴定,相关实验室操作严格按照《2019 布鲁氏菌病诊断标准(WS269-2019)》执行。

2.6 MLVA-16 技术对布鲁氏菌分型 根据文献^[6]使用的 16 个位点引物(表 1)及扩增参数行 PCR 扩增。MLVA-16 被分为 panel 1 (bruce06、bruce08、bruce11、bruce12、bruce42、bruce43、bruce45 及 bruce55)、panel 2A (bruce18、bruce19、bruce21) 和 panel 2B (bruce04、bruce07、bruce09、bruce16、bruce30)。Panel 1 扩增产物送北京天一辉公司进行纯化及双向序列测定。在所得序列上标记上游引物序列及下游引物序列的反向互补序列并去除侧翼序列得到该位点重复序列的长度。Panel 2 各位点用带 FAM 基团标记的引物进行扩增,扩增产物送公司进行毛细管电泳。电泳及测序所得结果参照布鲁氏菌各位点重复单元长度和重复数目换算表算出重复序列的重复数目。

表 1 布鲁氏菌 MLVA-16 分型实验的引物序列
Table 1 The primer sequence of *Brucella* mlva-16 typing test

位点 Site	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Bruce06	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	GCGTGACAATCGACTTTTTGTGTC
Bruce08	ATTATTGCGAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTTC
Bruce11	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
Bruce12	CGGTAAATCAATTTGCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
Bruce42	CATGCGCTCAACTATAACCGTCA	ACCGCAAAATTTACGCATCG
Bruce43	TCTCAAGCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCTGCCATAAAC
Bruce45	ATCCTTGCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
Bruce55	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCCAGTTGTCTT
Bruce18 ^{2A}	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG
Bruce19 ^{2A}	GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT
Bruce21 ^{2A}	CTCATGCGCAACCAAAAACA	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
Bruce04 ^{2B}	CTGACGAAGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
Bruce07 ^{2B}	GCTGACGGGAAGAACATCTAT	ACCTTTTTTCAGTCAAGGCAAAA
Bruce09 ^{2B}	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTAIGTTTTGTTGTACADAG
Bruce16 ^{2B}	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT	GGCCATGTTTCCGTTGATTAT
Bruce30 ^{2B}	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG

2.7 MLVA 基因型的聚类分析 将 MLVA 分型的数字化结果输入 MLVAbank(<http://microbes.genotyping.i2bc.paris-saclay.fr/>)与数据库比对。用 BioNumerics(Version 8.0)软件将贵州省本起疫情布鲁氏菌同近年来贵州省及国内各地布氏菌代表株进行聚类分析,构建聚类分析树状图和最小生成树(Minimum spanning tree, MST),聚类方式用非加权组平均法(UPGMA)。

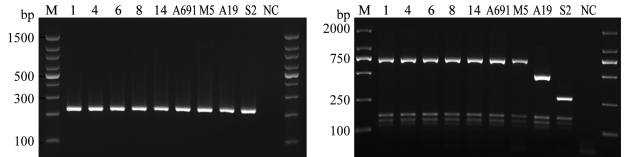
结 果

1 细菌分离培养结果

经培养共有 6 份全血标本出现疑似布鲁氏菌生长,1 份来自于羊,5 份来自于人。在布鲁氏菌专用固体培养基上,6 份标本长出的株菌均呈现无色半透明、圆形、表面光滑湿润,稍隆起,均质透亮的菌落形态,符合布鲁氏菌的典型形态。

2 BCSP31-PCR 对布鲁氏菌属的鉴定结果

疫情菌株、阳性对照及阴性对照的基因组 DNA 经 BCSP31-PCR 扩增所得产物除阴性对照外均出现分子质量大小为 223 bp 的特异条带,该条带大小与布鲁氏菌属特异性条带一致,可判定为布鲁氏菌属细菌(图 1A)。



1,4,6,8,14、A691 菌株标本号 M5 羊种疫苗株 A19 牛种疫苗株 S2 猪种疫苗株 NC 阴性对照

图 1 布鲁氏菌经 BCSP31-PCR(A)和 AMOS-PCR(B)鉴定结果

1,4,6,8,14、A691 Specimen numbers M5, A19, S2 Vaccine strains NC Negative control

Fig. 1 Results of *Brucella* by BCSP31-PCR(A) and AMOS-PCR(B)

3 AMOS-PCR 对布鲁氏菌种/型的鉴定结果

疫情菌株、阳性对照及阴性对照的基因组 DNA 经 AMOS-PCR 扩增所得产物结果显示:疫情菌株和疫苗株 M5 的扩增产物均出现分子质量大小为 731 bp 的特异条带,可判定为羊种布鲁氏菌;疫苗株 A19 在 500 bp 附近有特异条带,疫苗株 S2 在 250 bp 附近有特异条带;阴性对照无特异条带出现(图 1B)。

4 生物种型鉴定结果

6 株布鲁氏菌均可在常规环境中生长,均可被噬菌体 BK₂ 裂解而不被噬菌体 TB 裂解,GZ-QN 6 菌株与 A、M 血清均不凝集,其余菌株与 A、M 血清均有凝集。故除 GZ-QN 6 外均被鉴定为羊种 3 型布鲁氏菌,GZ-QN 6 菌株生物型尚不能判定。

5 MLVA-16 分型鉴定结果

MLVA-16 将贵州省 6 株疫情布鲁氏菌分为 3 种 MLVA 型;其中来自患者的分离株 GZ-QN 1、GZ-QN 4 及 GZ-QN 6 共享 MLVA 型 1(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-7-4-3-4-6);来自 1 患者的分离株 GZ-QN 8 与来自 1 病羊的分离株 GZ-QN A691 共享 MLVA 型 2(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-8-4-3-6-6);来自 1 患者的分离株 GZ-QN 14 为独立的 MLVA 基因型 3(1-5-3-13-2-2-3-2-4-20-8-8-4-3-7-6)。

6 MLVA 基因型聚类分析结果

聚类分析树状图(图 2)显示引起本起疫情的布鲁

氏菌与来自我国福建和新疆的布鲁氏菌株处于同一分支,其聚类关系最近。MST图(图3)中以MLVA各位点串联重复序列单位差异 ≤ 2 进行分群(饼图中10株菌构成5种型聚为一个群),疫情菌株与福建、新疆的布鲁氏菌代表株合为一个群,引起本起疫情的布鲁氏菌与来自我国福建、新疆的布鲁氏菌遗传距离最近。

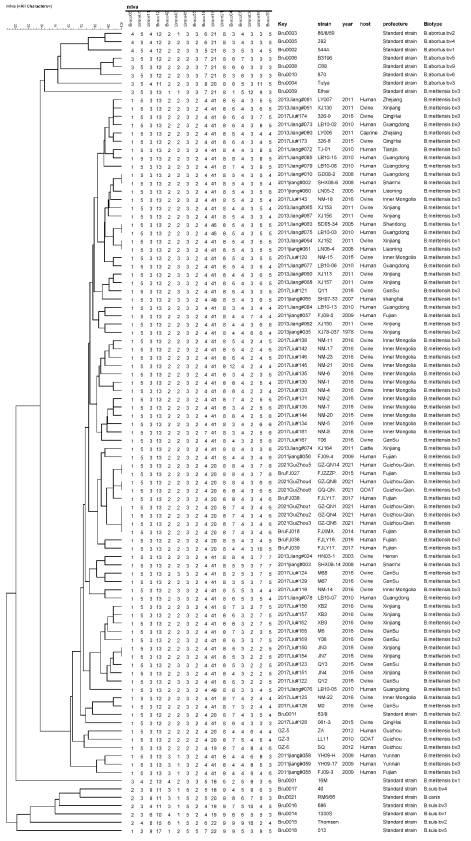


图2 贵州省疫情布鲁氏菌与国内各地的布鲁氏菌的MLVA-16聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram based on MLVA-16 genotyping analysis (UPGMA method) shows the correlation between 6 *Brucella* strains in Guizhou Province and *Brucella* strains from other regions in China

讨论

羊种布鲁氏菌是我国布病疫情的主要病原菌之一^[18],贵州省布病疫情也主要由羊种布鲁氏菌引起^[19]。本次发生在贵州省某养殖场的布病疫情,经流行病学调查,罹患率为15.5%(17/110),山羊血清经虎红平板凝集试验抗体阳性率为4.0%(308/7750)。为明确该起疫情的病原体并对其进行分子流行病学调查,本研究采用布鲁氏菌BCSP31-PCR、AMOS-PCR和传统生物分型技术对疫情分离株进行鉴定、采用MLVA分型方法对疫情菌株进行分子流行病学分析。

BCSP31-PCR对布鲁氏菌属的鉴定结果显示疫情分离株均为布鲁氏菌属细菌,说明布鲁氏菌属细菌是引起本起疫情的病原菌。为进一步明确病原菌种型,AMOS-PCR对布鲁氏菌种/型的鉴定结果显示疫情



图3 贵州省疫情布鲁氏菌与国内各地的布鲁氏菌MLVA基因型聚类分析MST图

Fig. 3 Clustering analysis (minimum spanning tree for categorical data) based on MLVA-I 6 genotype data, showing relationships between the 6 *Brucella* strains from Guizhou Province and *Brucella* strains from other regions in China

分离株与羊种布鲁氏菌疫苗株M5均出现了分子质量大小为731bp的特异条带,定为羊种布鲁氏菌,故疫情病原体为布鲁氏菌属的羊种菌。传统生物分型技术将疫情分离株除GZ-QN6外均鉴定为羊3型布鲁氏菌,表明羊3型是疫情菌株的优势生物型,与我国近年来主要流行的布鲁氏菌生物型一致^[18]。

为进一步探究该起疫情病原菌的来源,找出菌株间的关系,本研究对疫情菌株进行MLVA分析。MLVA-16分型技术作为布鲁氏菌分型的主要手段被广泛用于布鲁氏菌亲缘关系和分子流行病学研究^[20-22]。MLVA-16将疫情菌株分为3种MLVA型,说明引起本起疫情的布鲁氏菌具有MLVA型别多样性。基于MLVA分型数据,将疫情布鲁氏菌同近年来贵州省及国内各地布氏菌代表株进行聚类分析,显示与2014年李世军等^[21]报道的布鲁氏菌亲缘关系较远(树状图上方阴影区为本次分离株,下方阴影区为2014年贵州省报道的分离株)。鉴于缺乏近几年贵州省布氏菌MLVA-16分型的数据,尚不能确定本次疫情是否是由贵州省本土布氏菌引起。树状图显示疫情布鲁氏菌与羊种生物3型菌株聚类较近,而疫情菌株除GZ-QN6外均为羊3型布鲁氏菌,说明MLVA分型与传统的生物分型具有一定关联性,同时也佐证了MLVA的高分辨率。树状图上方阴影区显示本起疫情菌株与福建、新疆等地布鲁氏菌亲缘关系最近。MST图显示,疫情

菌株与福建、新疆的菌株合为一个群,表明它们间的遗传距离最近。综合分析,提示本起疫情可能为与福建、新疆等地的羊种布鲁氏菌菌株具有关联的输入性感染引起的聚集性疫情。可将该结果结合流行病学调查发现暴发关联,查明传播途径,追溯传染源,指导防控,遏制疫情。

传统生物分型技术对布鲁氏菌生物型的鉴别基于表面抗原的血清学特异性,A或M抗原成分及比例的变化与相关基因的精细表达和调控有关^[23],GZ-QN6具体生物型相关研究鲜有报道,GZ-QN6具体生物型有待于后续研究。MLVA型别多样性体现在panel 2B的04和16位点存在差异,差异位点与田国忠等的^[24]报道一致,考虑方法学误差,本研究将2个差异位点进行3次平行试验,结果一致;panel 2B属高突变位点^[25],该疫情发生地宿主量(存栏羊7 750只)大,不排除布鲁氏菌因各宿主内环境不同以及在主要宿主及非主要宿主间传播过程中基因发生变化的结果^[26];流行病学调查显示,疫情发生前,养殖场曾对部分羊只进行跨地区交易,因交易未成羊只又拉回羊群,在这过程中不排除羊只因接触到不同布鲁氏菌传染源导致感染的可能。

羊种布鲁氏菌是本起布病聚集性疫情的病原体,结合流行病学调查发现疫情患病人群均为养殖相关人员,与羊及其流产物的接触史明确,且从人及羊全血标本分离出同一MLVA型布鲁氏菌,从而从病原学及MLVA基因型的角度证明了本次人间疫情因接触感染布鲁氏菌的羊所致。故加强对养殖人员的宣传教育,进行传染病相关知识的培训,增强他们的个人防护意识以及提供相应的防护物资应是有关部门下一步的工作重点。贵州省近年大力发展畜牧业,存在羊、牛等种畜从国内布病高发的区域引进及种畜去布病高发区域配种等情况,可能会导致布病传染源的输入。本次布病疫情经分子流行病学分析得出,可能为与福建、新疆等地的羊种布鲁氏菌菌株具有关联的输入性感染引起的聚集性疫情,结合流行病学调查,高度怀疑本起疫情与跨地区动物交易活动有关,故加强对跨地区动物检疫及疫情监测是相关部门需要关注的防控重点。近年来,贵州省散发和聚集性布病疫情时有发生,防控形式依旧严峻。本起疫情为贵州省布病疫情防控提出新要求,应引起畜牧部、动物检验检疫以及从事养殖相关人员的高度关注及重视。

【参考文献】

[1] 姜海. 布鲁氏菌病诊疗及防控手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2020:1-28.
[2] Esmaeilnejad-Ganji SM, Esmaeilnejad-Ganji SMR. Osteoarticular manifestations of human brucellosis: A review[J]. World J Orthop, 2019, 10(2):54-62.

[3] Keriell A, Botella E, Estrach S, et al. *Brucella intracellular* life relies on the transmembrane protein CD98 heavy chain[J]. J Infect Dis, 2015, 211(11):1769-1778.
[4] Saavedra MJ, Ballem A, Queiroga C, et al. Etiology: the Genus *Brucella*[J]. *Brucellosis in Goats and Sheep: an endemic and re-emerging old zoonosis in the 21st century*, 2019:21-58.
[5] Suarez-Esquivel M, Chaves-Olarte E, Moreno E, et al. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20):7749.
[6] 杨杰, 赵素莲, 崔步云, 等. 多位点可变量目串联重复序列分型方法检测布鲁氏菌分型标准化操作方法的建立和应用[J]. 疾病监测, 2012, 27(2):137-140.
[7] Zhao ZJ, Li JQ, Ma L, et al. Molecular characteristics of *Brucella melitensis* isolates from humans in Qinghai Province, China[J]. Infect Dis Poverty, 2021, 10(1):1-6.
[8] 孙岩, 杜雅楠, 崔步云. 布鲁氏菌的分离、鉴定与分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(5):511-515.
[9] 马学平, 高建炜, 韩坤, 等. 宁夏布鲁氏菌多位点串联重复序列分型研究[J]. 宁夏医学杂志, 2020, 42(5):397-401.
[10] Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification[J]. J Trop Med Hyg, 1992, 95(4):271-275.
[11] Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, et al. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein[J]. Gene, 1988, 63(1):1-9.
[12] 李世军, 王月, 王定明, 等. 贵州省首例人间布鲁氏菌病例的病原学诊断与分析[J]. 中华地方病学杂志, 2012(6):643-645.
[13] Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 33(1):e00073-19.
[14] Ocampo-Sosa AA, Garcia-Lobo JM. Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*[J]. BMC Microbiol, 2008(8):17.
[15] Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(6):1640-1642.
[16] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(11):2660-2666.
[17] 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.
[18] 崔步云, 姜海. 2005-2016年全国布鲁氏菌病监测数据分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(3):188-192.
[19] 刘英, 王月, 马青, 等. 贵州省2013年人间布鲁氏菌病原种/型鉴定与分析. 中国人兽共患病学报. 2015. 31(01):45-48.
Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of *Brucella*- a systematic review [J]. Trop Med Int Health, 2017, 22(5):539-546.
[20] 宗俊, 丁晟, 田国忠, 等. 江西省羊种布鲁氏菌分子流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(8):1341-1344.
[21] 李世军, 刘英, 王月, 等. 贵州省2010-2012年间羊种布鲁氏菌分离株的遗传与分子流行病学特征研究[A]. 2014.
[22] 陈燕芬. 布鲁氏菌中国分离株遗传多态性研究[D]. 长春:吉林大学, 2012.
[23] 李明慧, 刘志国, 朴东日, 等. 我国羊种布鲁氏菌 rpoB 基因遗传多态性分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(3):193-197.
[24] 田国忠, 崔步云, 赵鸿雁, 等. 一起羊种布鲁氏菌暴发的流行病学和分子特征研究[J]. 疾病监测, 2017, 32(3):211-215.
[25] 韩腾伟, 林代华, 刘菁, 等. 福建省2008-2017年人间布鲁氏菌病流行特征及分离株 MLVA 分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(5):382-388.
[26] 刘志国. 内蒙古乌兰察布地区布鲁氏菌基因分型与体外药物敏感性研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2018.

【收稿日期】 2022-01-14 【修回日期】 2022-04-06