

马紫恒,赵鹏翔,马雪梅,等. 布鲁氏菌病的病原学、流行病学及防治研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(1):28-32,42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.01.005

布鲁氏菌病的病原学、流行病学及防治研究进展

马紫恒, 赵鹏翔, 马雪梅, 谢 飞

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要:布鲁氏菌病是世界公认的危害较为严重的人畜共患传染病之一。由于该病防治相对困难,在我国发病形势尤为严峻。尽管我国对于布鲁氏菌病防治采取了积极的措施,但仍然面临着巨大挑战。因此,认清布鲁氏菌病的病原学特征、传播途径以及自然史等流行病学特征,并了解当前布鲁氏菌病的诊断、治疗以及预防现状,对于预防布鲁氏菌病的发生、减少布鲁氏菌病对农业及人类造成的健康财产损害有着重要意义。

关键词:布鲁氏菌病;病原学;流行病学;诊断;防治

中图分类号:S855.1;R183.9

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2021)01-0028-05

布鲁氏菌病是《中华人民共和国传染病防治法》与《中华人民共和国动物防疫法》中的乙类传染病,也是世界普遍公认的危害较为严重的人畜共患病之一。世界上有 170 多个国家和地区存在布鲁氏菌病的发生和流行^[1],据统计全球每年约有 50 万布鲁氏菌病新增病例,然而此病发病早期不易与其他发热性疾病相鉴别,许多本病患者易被误诊为其他疾病,因此,该病实际的发病率要高出 10~25 倍^[2]。布鲁氏菌可侵犯人体各个系统,常合并导致关节炎和脊柱炎等,还可引起睾丸、子宫等生殖器官炎症,造成人类不孕不育^[3]。尽管人类布鲁氏菌病患者病死率比较低(<1%),但由于不明确诊断或急性期治疗不彻底,该病将转为长期慢性病,导致患者常年乏力,卧床不起,给患者造成沉重的家庭经济负担。2018 年我国布鲁氏菌病发病率位居第 8,仅次于肝炎、肺结核、梅毒和细菌性痢疾等。另外,布鲁氏菌还会通过感染牛、羊、猪等牲畜,造成大量牲畜流产、死胎等,给农业带来巨大损失,据统计,全世界每年因布鲁氏菌病造成的农业损失近 30 亿元^[4]。因此,我国高度重视该病的检测、预防和控制,然而布鲁氏菌病多数为隐性感染,在自然感染的诊断上经常被忽略,进而使得我国对于布鲁氏菌病的防治面临巨大挑战,有待于进一步提升对布鲁

氏菌的病原学研究以及诊断手段,进而控制其发病风险。笔者综述了目前布鲁氏菌病的病原学、流行病学及防治研究进展,以期为指导其防控提供一定的理论依据。

1 病原学与流行病学

1.1 病原学

布鲁氏菌属(*Brucella*)细菌大小为(0.5~0.7) μm \times (0.6~1.5) μm ,初次分离时多呈球状、球杆状和卵圆形,传代培养后渐呈短小杆状,不活动、微小,是革兰氏阴性的多形性球杆菌。在显微镜下涂片观察多为单个分散,组织涂片或渗出液中常集结成团,且可见于细胞内,培养物中多单个排列。布鲁氏菌属于 α -变形菌群中的布鲁氏菌属,专性需氧,无鞭毛以及天然质粒,形成芽孢,一般无荚膜,毒力菌株可有菲薄的荚膜,用改良 Ziehl-Neelsen 方法染色后镜检,布鲁氏菌菌体染成红色,背景为蓝色,可作为其鉴别染色法之一。布鲁氏菌不含有外毒素等毒力因子以及抗原变异性,这与大多数胞内寄生病原体不同,且是该菌能够躲避宿主防线成功入侵宿主并在其中进行复制的原因。布鲁氏菌逃避宿主免疫系统监视主要归结于其非经典的脂多糖(lipopolysaccharide,简称 LPS),由脂质 A、核心寡糖和 O-抗原多糖(OPS)组成,该结构不具有强内毒素活性,其中 O-抗原多糖介导病原体与细胞表面特异性受体的相互作用,保护布鲁氏菌免受杀菌肽和补体引发的裂解作用。另外,非经典的 LPS 结构在布鲁氏菌发挥毒力的过程中起到核心作用,该结构可能是逃避宿主免疫应答的策略之一,且可

收稿日期:2020-04-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31500828,81602408)。

作者简介:马紫恒(1989—),男,河北承德人,硕士研究生,主要从事分子生物学检测方向研究。E-mail:maziheng@s-sbio.com。

通信作者:马雪梅,博士,研究员,博士生导师,主要从事氢分子生物学方向研究。E-mail:xmma@bjut.edu.cn。

能部分解释了造成慢性感染宿主中细胞免疫水平的相对抑制^[5]。

依据宿主偏好性的不同,布鲁氏菌分为 6 个经典种,根据生物学特性又将其分为 19 个亚型,分别为 *B. melitensis* (羊种,主要感染绵羊和山羊,包括 1、2、3 亚型)、*B. abortus* (牛种,包括 1、2、3、4、5、6、7、9 亚型)、*B. suis* (猪种,包括 1、2、3、4、5 亚型)、*B. canis* (犬种)、*B. neotomae* (沙林鼠种)、*B. ovis* (绵羊附睾种)。最近先后又鉴定到 5 个新种,分别为 *B. microti* (田鼠型)、*B. pinnipediae* (鳍型)、*B. cetacea* (鲸型)、*B. vulpis* (狐狸型) 和 *B. inopinata* (人类)。此外,还有从两栖类动物中分离出布鲁氏菌的报道^[6]。目前,我国已经分离到了布鲁氏菌的 6 个经典种及其所有亚型。

1.2 流行病学

在布鲁氏菌病的流行病学调查中,人对多种布鲁氏菌病原体易感,其中主要感染牛种、羊种及猪种布鲁氏菌,极个别报道人感染犬种布鲁氏菌的病例。人类患者在发病期间可通过汗液向体外排菌,但布鲁氏菌病罕见在人间传播。在我国动物布鲁氏菌病主要由羊种和牛种生物型引起,其次为猪种生物型,犬种生物型感染人的病例极少。有证据显示,当羊种生物型为感染的主要型别时,伴随着人布鲁氏菌病的广泛流行,而当牛种生物型为感染的主要型别时,布鲁氏菌病多以散发为主。因此人类流行性布鲁氏菌病中绵羊和山羊为主要传染源,人类主要散发性布鲁氏菌病传染源则是牛和猪^[7]。布鲁氏菌在自然环境中生活力较强,在自然环境中可存活 2~150 d,尤其是在病畜分泌物、排泄物以及死畜的脏器中能存活达到 4 个月左右。布鲁氏菌在阳光直射下仍可存活 4 h,但布鲁氏菌对湿热抵抗力不强,在水中,60℃加热 30 min 或 70℃加热 5 min 即被杀灭,煮沸则立即死亡。对常用的化学消毒剂如 2% 苯酚、来苏尔、氢氧化钠溶液或 0.1% 的氯化汞等较敏感,均可在 1 h 内被杀死,而 0.01% 苯扎溴铵只用 5 min 就能杀灭该菌^[8]。另外,强酸性环境即当 pH 值低于 3.5 时会导致菌体迅速死亡。

在自然界中,布鲁氏菌通过消化、呼吸、交配、黏膜接触甚至昆虫叮咬等方式传播,并可感染人等 60 余种动物^[9]。尽管布鲁氏菌可以通过多种途径感染,但是不同感染途径的感染率存在差异,总体来说对于破损的皮肤黏膜最为易感,而消化途径感染难度高于交配、其他部位黏膜接触等^[8]。通常动

物对同种布鲁氏菌最为易感,部分种型布鲁氏菌可在动物之间转移。如羊种布鲁氏菌除了易感染山羊和绵羊外,还可感染猪、牛等。病原菌通过病畜或带菌动物的乳汁、粪便、尿液和精液等分泌物以及排泄物被排出,尤其是妊娠母畜在流产或分娩时,胎儿、羊水、胎衣中携带大量布鲁氏菌,成为主要传染源,进而污染草场、畜舍、饮水等环境,使其他健康的牲畜被感染,最终导致病原菌四处扩散。

在家畜中布鲁氏菌也以感染羊、牛、猪最为重要,羊种布鲁氏菌对牲畜的侵袭力和致病性都较强,所引起的疫情较重,多数羊种布鲁氏菌易引起人畜间布鲁氏菌病暴发和流行。牛种菌生物型相比羊种菌毒力较弱,对人的致病性较轻,往往造成感染率高而发病率低,但是对牲畜尤其是牛的危害较大,严重影响当地畜牧业发展,猪种布鲁氏菌毒力及侵袭力介于羊种和牛种之间。犬种布鲁氏菌主要引起犬、猫、牛等动物感染,极少感染人,且危害较轻^[10]。

2 布鲁氏菌病诊断和防治现状

2.1 布鲁氏菌病的血清学诊断

由于布鲁氏菌危险性强,且培养困难、分离率低、耗时长等问题,布鲁氏菌的病原学检测在实际临床应用中较少^[11]。血清学诊断是当前布鲁氏菌诊断和检疫的主要手段,根据检测目的与方式可初步分为初筛检测与确诊检测。血清学检测方法多样,主要包括各种凝集反应例如试管凝集反应 (SAT)、培养皿凝集试验 (PAT)、虎红培养皿凝集反应 (RBPT)、全乳环状试验 (CYT) 等,以及补体结合试验 (CFT) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和胶体金免疫层析检测技术 (GICA) 等,但目前不同方法均存在一定的不足^[12]。实验室常用的初筛手段包括 RBPT、GICA、ELISA 等。布鲁氏菌病的确诊检测方法包括 SAT、CFT、抗人球蛋白试验 (Coomb's test)。

布鲁氏菌病初筛方法中, RBPT 因其操作简单、敏感性强、耗时短、成本低等特点被广泛用作人与动物血清的布鲁氏菌感染大范围筛选试验及流行病学的研究。然而由于初筛方法假阳性率相对较高,易于与部分其他革兰氏阴性菌发生交叉反应,因此,往往须要通过确诊检测方法进行复核。相比初筛方法,布鲁氏菌病的确诊方法普遍特异性和准确度较高,然而其操作复杂、检测耗时长且对操作人员要求较高^[13]。在实际应用中,常与初筛方法配

合检测,作为初筛检测阳性后的分流确诊。如国内常用 RBPT 进行现场或牧区的大规模检疫,以 SAT 和 CFT 进行实验室最后确诊,其中 CFT 相较于其他血清学检测方法有一定的优点,如灵敏度高,能测定 $0.05\ \mu\text{g/mL}$ 的抗体,与间接凝集法的灵敏度相当,且可用于检测多种类型的抗原或抗体,试验条件要求低,不需要特殊仪器或只用光电比色计即可。因此,常被用来对 SAT 和 RBPT 检测为阳性或可疑的病例进行定性检测,CFT 检测被国际贸易指定用于牛、羊、绵羊附睾种布鲁氏菌病诊断的确诊试验。ELISA 对标本中布鲁氏菌抗体的检测敏感性比 SAT 和 CFT 高,尤其在对慢性患者诊断时 ELISA 比 SAT 有更高的敏感性^[14]。但是,对于急性期患者,RBPT 的检测结果与 ELISA 结果相一致,且 RBPT 检测费用更低。GICA 相比于 SAT 检测具有更多的优势,如灵敏度高、特异强、血清用量少、简便快速等,且在检测结果上二者无统计学意义上的差别。GICA 适合于布鲁氏菌病多种方面的检测,如临床诊断、流行病学调查、现场检测、人布鲁氏菌病的监测,具有较好的应用前景。

凝集反应检测布鲁氏菌病存在的一大缺点即无法鉴别布鲁氏菌与其他革兰氏阴性菌的交叉感染,由于凝集试验通过检测抗布鲁氏菌 LPS-O 链的抗体进行诊断,而布鲁氏菌的 LPS-O 链是多种革兰氏阴性菌的共同抗原。布鲁氏菌血清学诊断主要通过检测患者体内免疫球蛋白 M(IgM)抗体的滴度,为临床提供可靠的诊断。然而由于血清学检测不能直接检测布鲁氏菌病原,以及易与其他革兰氏阴性菌(主要是耶尔辛氏菌 O:9 型)发生交叉反应等因素,使得其特异性、准确度、灵敏度等方面都存在缺陷^[15]。此外,血清学诊断的最大缺陷是很难对自然感染与人工免疫产生进行区分,因此新的检测方法还须要进一步研究。

目前,国内外对于布鲁氏菌病的血清学诊断方法多样,然而各诊断方法均具有一定的自身局限性,需要多种方法相结合进行确诊。此外血清学诊断方法难以对布鲁氏菌病的治疗效果进行评价。因此,目前对于布鲁氏菌病诊断亟待解决的问题是开发特异性高、灵敏度高、且能够对布鲁氏菌进行型别鉴定的检测手段。

2.2 布鲁氏菌病的分子诊断

相比于血清学检测,分子生物学诊断技术以其极高的特异性和灵敏度等优势得以广泛地应用于

病原体感染的检测。布鲁氏菌分子诊断技术主要有分子杂交、各种类型的 PCR 以及 PCR 反应后的产物分析等。其中 PCR 检测技术以其快速、操作简便等优势迅速成为分子检测中的重要技术,且灵敏度与特异性极高从而被广泛地用于病原体的检测。Feteke 等首次报道了聚合酶链式反应(PCR)技术在布鲁氏菌病诊断中的应用,通过对布鲁氏菌外膜蛋白 43 ku 基因的部分序列进行扩增,获得 635 bp 的扩增产物;这种方法对布鲁氏菌所有种扩增获得相同的结果,且非常敏感(低于 100 个细菌)^[16]。之后 16Sr RNA、VirB7、插入序列 IS711、per 基因等先后被证实可以灵敏特异地用于布鲁氏菌的 PCR 检测^[17]。

布鲁氏菌分子生物学诊断技术另一个主要应用就是可以实现其在型别方面的区分和鉴定,Vemulapalli 等建立了一个能够鉴别疫苗株 RB51 和 S2308 的 PCR 方法^[18]。Cloeckert 等使用限制性核酸内切酶消化 PCR 产物与特异性 PCR-RFLP 鉴别指纹图谱相结合的方法,对布鲁氏菌 omp2A 和 omp2B 基因差异序列进行分析,能够将大多数布鲁氏菌种和生物型进行区分和鉴别^[19]。由于布鲁氏菌不同种型间的基因序列高度同源,布鲁氏菌的分子分型是布鲁氏菌当前研究的难点和热点,因此在不断的研究优化中又出现了多种方法,可以对布鲁氏菌进行种型的鉴别,还可以区分野毒株与疫苗株,此外更是鉴别出了一些 6 个经典种之外布鲁氏菌,如海洋布鲁氏菌等^[20]。利用布鲁氏菌可变数量串联重复序列(VNTR)的多态性,建立的多位点可变数量串联重复序列分析(MLVA)和多位点序列分析(MLSA)除了可以用于布鲁氏菌分离株的鉴别,还可以进行遗传关系分析^[21]。

目前,以 PCR 方法为代表的分子诊断技术在致病微生物的检测应用方面比较成熟,并具有明显的优势,而且对于布鲁氏菌的分种分型、布鲁氏菌的毒力基因等检测以及流行病学追踪和溯源都有着不可替代的地位。在 WS 269—2019《布鲁氏菌病诊断》标准中也加入了布鲁氏菌的 PCR 检测。其中通过 BCSP31 基因对布鲁氏菌属进行检测,同时通过对 AMOS-PCR 的扩增产物进行电泳,可根据条带进行羊种、牛种(1、2、4 型)、猪种 1 型以及绵羊附睾种布鲁氏菌进行鉴定。同时,通过对布鲁氏菌进行定量检测还可以监测病情治疗进展。布鲁氏菌病分子诊断的最主要限制是其相对较高的检测成本

以及较严格的仪器和试验条件,因此当务之急仍是开发简易、低成本的布鲁氏菌分子检测方法。

2.3 布鲁氏菌病治疗

根据布鲁氏菌的特点,患者在确诊感染布鲁氏菌后,应该尽早进行治疗,为防止复发以及慢性化,还须要联合、足量、足疗程用药,必要时延长疗程。国内外均推荐以多西环素联合利福霉素类药物的治疗手段作为人布鲁氏菌病急性慢性期的首选治疗方式,疗程为 8 周。对于难治性病例,可使用其他药物,包括磺胺类、喹诺酮类、三代头孢类等药物^[22]。单独用药或者联合应用治疗效果并不相同,如世界卫生组织(WHO)数据显示短期治疗(30 d 以内)的失败率和复发率均高于长期(6 周以上),且单药治疗的失败率高于联合用药。如多西环素联合利福平治疗效果低于喹诺酮类联合利福平,但是后者治疗费用更高^[23]。在一些特殊情况中,特别是在怀孕、患者免疫力低下或伴随并发症等情况下,应在基础治疗的同时对并发症进行治疗,同时对特殊人群进行调整用药。如在布鲁氏菌病合并睾丸炎病例抗菌治疗同上,可短期加用小剂量糖皮质激素。对于出现布鲁氏菌病引起的并发症,如脊椎炎、关节炎、心内膜炎等其他器官或组织脓肿患者,可联合使用 3 种药物治疗,如多西环素和利福平联合应用的基础上加入三代头孢类药物,同时给予对症治疗甚至外科干预。对于特殊人群如孕妇和儿童可选用利福平联合磺胺类药物,对于妊娠 12 周以内的孕妇须选用三代头孢菌素类药物联合复方新诺明治疗^[24]。

在布鲁氏菌病治疗期间,患者须要注意休息及补充营养,以提高机体免疫力,同时由于多西环素、利福平等药物副作用较大,用药期间须监测血常规、肝肾功能等。布鲁氏菌属于细胞内寄生菌,杀灭难度大。布鲁氏菌病的治疗是个长期的过程,且疗效差、易复发。有报道显示,临床治愈后 4 个月以上的患者布鲁氏菌核酸检测仍可呈阳性^[25]。因此,还须要开发新的药物来进一步提高布鲁氏菌病的治愈率并缩短治疗疗程。

2.4 布鲁氏菌病疫苗现状

布鲁氏菌病疫苗的研制一直是布鲁氏菌病防控的研究热点。目前,仍然缺乏安全的人用布鲁氏菌疫苗,只有在极少数国家和地区曾用牛布鲁氏菌苗 BA-219 和 104M 活疫苗预防人布鲁氏菌病,但是由于存在毒力返强的危险,很快被停止使用^[26]。

畜用的疫苗主要是采用减毒活菌苗和灭活菌苗,已开发的畜用减毒活菌疫苗主要应用于牛、猪、羊等,如牛布鲁氏菌苗 S19、猪布鲁氏菌苗 S2、羊布鲁氏菌苗 M5 和 Rev-1、粗糙型牛布鲁氏菌苗 RB51 等,畜用灭活苗有牛布鲁氏菌 45/20、羊布鲁氏菌 53H38 等。其中灭活疫苗的安全性高,且便于储存运输,但是保护时间短,且由于灭活后的菌体不能繁殖,诱导免疫较差^[27]。减毒活疫苗相比灭活疫苗,可以提供更持久的保护力^[28],且成本更低,是当前的主要应用疫苗。如羊布鲁氏菌苗 Rev-1 可预防绵羊和山羊的布鲁氏菌病,该疫苗在欧洲使用广泛。我国广泛使用的(牛羊)疫苗 S2,具有毒力稳定的特点,一般为口服免疫,其保护率高于 Rev-1 和 53H38^[29]。M5 疫苗具有免疫原性好的优点,通常可通过皮下、肌肉、口服等多种免疫途径,并且该疫苗制备了单克隆抗体,因此,可鉴别由 M5 疫苗接种感染或自然感染的动物,但其缺点是会导致牲畜流产,可引起接触气雾的人较严重的反应,且经豚鼠传代后菌株毒力升高^[30]。粗糙型牛布鲁氏菌苗 RB51 对牛具有良好的保护力,由于这种粗糙型菌株 LPS 缺少 O 链,因此用 RB51 疫苗免疫后的动物血清学检测通常为阴性,可减少布鲁氏菌病诊断的干扰,但该疫苗在对牛以外的动物保护力较差^[31]。

减毒苗持续存在于免疫动物体内,通过不断刺激免疫系统产生抗体,提供长效的保护力。然而活菌苗具有一定毒力,经常发生疫苗免疫而产生的感染,且在不同物种间的保护力存在差异,又由于产生的抗体会带来检测的困难,难以对活菌苗的免疫效果进行监测。此外,疫苗经多次传代后有毒力回升的现象,并对于治疗布鲁氏菌的常用药物存在阻碍问题^[32]。因此,开发毒力稳定、安全、覆盖范围广且免疫持续时间长的疫苗是布鲁氏菌疫苗研发的挑战。

组分疫苗通过布鲁氏菌部分特异性蛋白或核酸组分免疫动物,产生一定的保护作用。组分疫苗的免疫原性强且不会出现菌体毒力增强现象,但同样具有免疫期短的不足,此外组分疫苗由于不具有整体的菌体结构,很难产生综合性免疫效果,此外组分疫苗的生产工艺要求高且相对复杂,成本较高^[33]。目前,布鲁氏菌的基因组已经被深入研究,而利用布鲁氏菌的特异性结构基因如外膜表面蛋白(OMP)及一些毒力因子(LPS、过氧化氢酶、超氧

化物歧化酶等)开发基因工程苗也是布鲁氏菌病疫苗研发的新的切入点。如通过分子生物学技术敲除 1 个或多个布鲁氏菌毒力基因建立的基因工程弱毒活疫苗^[34];Tabynov 等通过将布鲁氏菌的特异性免疫抗原组分整合到其他毒性较弱的载体细菌或病毒(A 型流感病毒)的基因组中,并对怀孕的母牛产生了保护作用,展示了活载体疫苗在布鲁氏菌病防控上的前景^[35]。核酸疫苗通过将含有布鲁氏菌保护性抗原以及增强免疫反应的细胞因子等编码基因的重组质粒在人或动物细胞内进行表达并刺激机体产生抗体来进行免疫,目前已有多种基因被研究可用于布鲁氏菌核酸疫苗的开发,然而免疫效果还有待验证^[36]。

3 结论

布鲁氏菌病危害严重,又难以治愈,且尚无安全有效的人用疫苗进行防护。加之因为布鲁氏菌的传染源广泛、传播途径多样、以及在环境中有较强的适应能力等特性使得布鲁氏菌的预防变得十分困难。此外,由于布鲁氏菌病的致死率低,患病症状多不典型,导致人们对于布鲁氏菌病还缺乏必要的重视,感染布鲁氏菌后若没有及时获得准确的检测和治疗,极易发展成慢性布鲁氏菌病而终生带菌。因此,布鲁氏菌病的防控须要跨学科协作^[37],如在公共教育领域加强对于布鲁氏菌病的认知;在疾病控制领域同时根据其病原的特点,加强布鲁氏菌病的防护意识,同时制定可靠的发病风险评估体系;在医疗领域积极开发新的布鲁氏菌病检测及防治方案,对布鲁氏菌病的有效防控以及降低布鲁氏菌病的危害有较实际的意义。

参考文献:

- [1] 谢松松,崔步云,郑嵘昊,等. 丝绸之路沿线国家布鲁氏菌病的流行特点及防控策略[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(5): 416–420.
- [2] Katie M E, Robert E N, Natkunam K. Short report: brucellosis in northern Australia [J]. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene,2010,83(4):876–878.
- [3] 邵善红. 布鲁氏菌病流行与诊断[J]. 畜牧兽医科学,2020(3): 132–133.
- [4] 王国栋,刘书梅. 国内外牛布鲁氏菌病防治研究进展[J]. 安徽农学通报,2013,19(16):134–135,137.
- [5] Smith J A. *Brucella* lipopolysaccharide and pathogenicity: the core of the matter[J]. Virulence,2018,9(1):379–382.
- [6] 杨 勇,段博芳,董国栋,等. 人畜间布鲁氏菌病研究进展[J].

- 中国动物检疫,2020,37(4):76–83.
- [7] 陈礼朋,张 森,李新生,等. 我国人畜间布鲁氏菌病流行状况[J]. 中国动物检疫,2018,35(10):1–5.
- [8] 任清明,汪春晖,杨义军,等. 布鲁氏菌病的流行特点与防治对策[J]. 中华卫生杀虫药械,2020,26(2):97–102.
- [9] 施旭光,凌 锋. 布鲁氏菌病研究进展[J]. 浙江预防医学,2014,26(6):576–580.
- [10] Galińska E M, Zagórski J. Brucellosis in humans: etiology, diagnostics, clinical forms [J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine,2013,20(2):233–238.
- [11] 丁 雪,王 岩,刘丽蓉,等. 布鲁氏菌病检测和防治方法研究进展[J]. 中国动物检疫,2019,36(5):43–48.
- [12] Nielsen K, Yu W L. Serological diagnosis of brucellosis [J]. Prilozi,2010,31(1):65–89.
- [13] 王慧飞,宗 鹏,徐 磊,等. Brucellacapt、RBT、SAT、iELISA 四种血清学检测方法对布鲁氏菌病检测价值的比较研究[J]. 现代生物医学进展,2019,19(4):641–672.
- [14] Ducrotoy M J, Muñoz P M, Conde – Álvarez R, et al. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis[J]. Preventive Veterinary Medicine,2018,151:57–72.
- [15] 李宏艳. 布鲁氏菌 Vir B12 的重组表达及其用于标记疫苗细胞免疫鉴别研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2019.
- [16] Fekete A, Bantle J A, Halling S M, et al. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction[J]. The Journal of Applied Bacteriology,1990,69(2):216–227.
- [17] 秦立得,南文龙,陈义平. PCR 技术在布鲁氏菌检测与鉴别中的应用[J]. 中国动物检疫,2018,35(10):63–67.
- [18] Vemulapalli R, Mcquiston J R, Schurig G G, et al. Identification of an IS711 element interrupting the *whoA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,1999,6(5):760–764.
- [19] Cloeckert A, Verger J M, Grayon M, et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus[J]. Microbes and Infection,2001,3(9):729–738.
- [20] López – Santiago R, Sánchez – Argúez A B, De Alba – Núñez L G, et al. Immune response to mucosal *Brucella* infection[J]. Frontiers in Immunology,2019,10:1759.
- [21] 王 勋,米吉提·莫合他汗,孙明军,等. 布鲁氏菌 MLVA – 15 分型方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2018,52(8):12–18.
- [22] del Pozo J S G, Solera J. Systematic review and meta – analysis of randomized clinical trials in the treatment of human brucellosis[J]. PLoS One,2012,7(2):e32090.
- [23] Rahil A I, Othman M, Ibrahim W, et al. Brucellosis in Qatar: a retrospective cohort study [J]. Qatar Medical Journal,2014(1): 25–30.
- [24] Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations[J]. PLoS Medicine,2007,4(12):e317.

- harvesters[J]. Computers & Electronics in Agriculture, 2014, 101(2): 84–92.
- [38] Whiting M D, Wolford S D, Peterson D L. Fresh – market quality tree fruit harvester Part I: Sweet cherry[J]. Applied Engineering in Agriculture, 2003, 19(5): 539–544.
- [39] Sarig Y. Robotics of fruit harvesting: A state – of – the – art review [J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 1993, 54(4): 265–280.
- [40] Erdoğan D, Güner M, Dursun E, et al. Mechanical harvesting of apricots[J]. Biosystems Engineering, 2003, 85(1): 19–28.
- [41] Strike B. Blueberry production and research trends in north American[J]. Agriculture, 2006, 715: 173–184.
- [42] 霍 强. 蓝莓采摘车采摘系统及植株振动模型仿真分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [43] 刘绍金, 卢炜乐. 我国蓝莓产业现状和发展趋势[J]. 现代园艺, 2018(22): 18.
- [44] 吕 洋. 梳齿式蓝莓采摘机械手的设计与实验研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2018.
- [45] 郭艳玲, 鲍玉冬, 何培庄, 等. 手推式矮丛蓝莓采摘机设计与试验[J]. 农业工程学报, 2012, 28(7): 40–45.
- [46] 关慷慨, 刘 维, 陈 雪, 等. 矮丛蓝莓采摘机的机械结构设计[J]. 吉林化工学院学报, 2017, 11(11): 50–53.
- [47] 耿 雷, 郭艳玲, 王海滨. 高丛蓝莓采摘机采摘系统设计与试验[J]. 农业机械学报, 2016, 47(3): 67–74, 81.
- [48] 赵玉龙. 蓝莓采摘机虚拟样机设计[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2014.
- [49] 鲍玉冬, 李志鹏, 郭艳玲, 等. 振动式蓝莓采摘机对果实收获的影响试验[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2014, 40(1): 96–100.
- [50] 王景巍, 王海滨, 李志鹏, 等. 振动式蓝莓采摘机槽型凸轮传动装置的设计与分析[J]. 东北林业大学学报, 2017, 10(10): 88–93.
- [51] 梁 钊. 蓝莓采收机自行走装置的设计及性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2019.
- [52] 曹肆林, 何义川, 王 敏, 等. 沙棘果机械化采收技术的研究现状与思考[J]. 农机化研究, 2012, 34(5): 12–15.
- [53] So J D. Vibratory harvesting machine for boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) berries[J]. Transactions of the ASAE, 2003, 46(2): 211–221.
- [54] 王 敏, 曹肆林, 何义川, 等. 机械振动式沙棘采收机的设计[J]. 农机化研究, 2013, 35(1): 109–111.
- [55] 王 敏, 曹肆林, 何义川, 等. 机械振动式沙棘采收机的试验研究[J]. 农机化研究, 2013, 35(9): 202–208.
- [56] 卢勇涛, 王 敏, 曹肆林, 等. 机械振动式沙棘采收机的改进[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(10): 2649–2651.
- [57] 张 最, 肖宏儒, 丁文芹, 等. 振动式枸杞采摘机理仿真分析与样机试验[J]. 农业工程学报, 2015, 31(10): 20–28.
- [58] 张文强, 张明明, 张俊雄, 等. 振摇枸杞采收机设计与试验[J]. 农业机械学报, 2018, 49(7): 97–102.
- [59] 张文强, 李召召, 谭豫之, 等. 变间距梳刷式枸杞采收装置优化设计与试验[J]. 农业机械学报, 2018, 49(8): 83–90.
- [60] 赵金鱼. 一种枸杞采摘头: 201410807305. 3 [P]. 2014–12–23.
- [61] 张焕高, 徐博豪, 周一笛, 等. 一种气吸式枸杞采摘机: 201320129765. 6 [P]. 2013–03–21.
- [62] 宋志禹, 梅 松, 肖宏儒, 等. 枸杞采收方法对比试验与分析[J]. 中国农机化学报, 2019, 40(10): 110–116.
- [63] 赵 健, 陈 云, 王亚磊, 等. 便携式枸杞振动采收装置参数优化试验研究[J]. 农机化研究, 2019, 41(3): 176–182.
- [64] 陈 军, 赵 健, 陈 云, 等. 振刷式枸杞采收机设计与试验优化[J]. 农业机械学报, 2019, 50(1): 152–161, 95.
- (上接第 32 页)
- [25] Elfaki M G, Uz – Zaman T, Al – Hokail A A, et al. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2005, 53(1): 1–7.
- [26] Perkins S D, Smither S J, Atkins H S. Towards a *Brucella* vaccine for humans[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(3): 379–394.
- [27] 刘志国, 王 妙, 崔步云, 等. 布鲁氏菌胞内存活及疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(5): 430–439.
- [28] Avila – Calderón E D, Lopez – Merino A, Sriranganathan N, et al. A history of the development of *Brucella* vaccines [J]. BioMed Research International, 2013(7): 743509.
- [29] Jiang H, Du P C, Zhang W, et al. Comparative genomic analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain M5 provides insights into virulence attenuation[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70852.
- [30] Barradas – Pina F, Nez – Herrera N D, Peniche – Cardena A, et al. Effectiveness of *Brucella abortus* RB51 and S19 strains to reduce abortion rate[J]. World Applied Sciences Journal, 2012, 16(5): 715–720.
- [31] 金松然. 布氏杆菌疫苗研究进展[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(20): 7–8.
- [32] Surendran N, Hiltbold E M, Heid B, et al. Live *Brucella abortus* rough vaccine strain RB51 stimulates enhanced innate immune response *in vitro* compared to rough vaccine strain RB51SOD and virulent smooth strain 2308 in murine bone marrow – derived dendritic cells[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(1/2): 75–82.
- [33] Wang Z, Wu Q M. Research progress in live attenuated *Brucella* vaccine development[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14(10): 887–896.
- [34] Conde – Alvarez R, Afee – Gorvel V, Gil – Ramirez Y, et al. Lipopolysaccharide 3s a target for brucellosis vaccine design[J]. Microbial Pathogenesis, 2013, 58(1): 29–34.
- [35] Tabynov K, Yespembetov B, Sansyzbay A. Novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on influenza A viruses expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins: evaluation of protection in pregnant heifers[J]. Vaccine, 2014, 32(45): 5889–5892.
- [36] 景志刚, 严家瑞, 范伟兴. 布鲁氏菌疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(2): 188–199.
- [37] Franc K A, Krecek R C, Häsler B N, et al. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action[J]. BMC Public Health, 2018, 18(1): 1–9.