

犬体 200 株布氏菌的判定与特性

黄 建

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

先后收到我国一些地区从犬体分离的待检布氏菌 200 株, 经细菌形态、生长特性和血清凝集等初步检查, 其中 176 株疑似布氏菌(85.59%)。用单相和粗糙血清检测、S 和 R 群噬菌体裂解试验, 证明均为犬种布氏菌。部分菌种作 DNA 同源性测定与电镜形态观察, 发现其基因系列和电镜图像与国际参考菌一致。在 R 血清反应中, 有 4.75% 菌株无凝集原性。在疏菌和复红染料抑菌试验中, 典型株占 72.49%; 对两种染料均不被抑制者占 22.75%。这部分菌和被 R/C 噬菌体裂解的粗糙羊种菌难以鉴别。

关键词 犬种布氏菌; 分类和特性

犬种布氏菌在 70 年代已确定了它的分类学地位, 被作为一个新种列入布氏菌属^[1]。后来不少国家也从犬体中分离到此菌。我国首先于 1979 年在台湾从家犬中分出犬种布氏菌^[2]。1983 年在上海从 Beagle 和草狗中各分出 1 株犬种菌^[3]。值得重视的是 1985 年在广西许多地区家犬中相继分离到犬种菌^[4]。由此, 我国各省(区)开展了广泛的调查和病原菌的分离工作。至 1989 年不少省(区)都先后分离到犬种菌。由于犬种菌为 R 型, 鉴定困难, 又有与其抗原决定簇产生交叉反应的细菌存在, 更易造成鉴定中的混乱。近年来, 各地送来许多菌种要求鉴定或复核, 促使我们建立了一些新方法, 对这类菌种作综合判定。现就 5 年来从犬体中分离到的疑似布氏菌的鉴定和分类结果, 以国际株为对照, 分述我国犬种菌的特性, 以供国内相关菌种的鉴别和国际交流参考。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 标准菌种: 55210 (16M), 55212 (A544), 55213 (S1330), 55226 (RM 6/66), 55247 (MEX51), 55007 (S₂), 55009 (M₃), 55010 (A104M), 55225 (63/290)。

2. 变异菌种: 16M 的 4 个变异株 (R₁, R₂, R₁₁, R₁₄), R-M28, R-MB115, 三株牛种布氏菌 (R-A45/20, R-A107, R-A117)。

上述菌株均由本实验室冻干保存备用。

3. 地方菌种: 来自广西、山东、湖北、四川、河南、安徽、上海、新疆、黑龙江等地犬体分离的待检菌株。

(二) 血清

1. 单相 A 和 M 血清: 来自英国兽医中心实验室。

2. S 型诊断血清: 85-1(抗牛种 104M) 血清, 本室自制冻干品。

3. R 型诊断血清: 87-1(抗牛种 45/20)、87-2(抗羊种 B₁₁₅)、87-3(抗猪种 IV 型)、87-4(抗犬种 MEX51)、87-5(抗犬种 C₃₀₉)、88-1(抗绵羊附睾种 63/290) 等血清均本室自制冻干品。

(三) 抗原

用上述各菌种的 48 小时培养物制成菌液, 比浊调浓度, 使与标准抗原一致。

(四) 噬菌体

1. S 群噬菌体株: 有 Tb、Wb、BK2 各株。

2. R 群噬菌体株: R、R/C、Bj-309 各株。

除 Bj-309 为本实验室分离备用^[9]外, 其他株来自英国兽医中心实验室。按 Corbel 法^[10]传代增殖。

(五) 仪器

日本岛津 UV-120-02 分光光度计; 美国 Pekin ELMER LAMBDA 17UV/vis 型分光光度计; 日本 HITACHI 20PR-52D 型自动高速离心机; 英国 MSE 超声波破碎器等。

(六) 试验方法

1. 常规及噬菌体裂解试验: 参见文献[7, 6]。

2. 豚鼠皮肤致敏试验: 动物致敏、菌素制备, 测试方法和结果判定均参见文献[8, 9]。

3. DNA 同源性测定: 包括 DNA 提取、纯化、G + C mol% 及 DNA 杂交参见文献[10]。

结 果

(一) 待检菌初测分类

送检 200 株菌按其繁殖、镜检、R 型血清和噬菌体裂解试验可分为两类: 一类拟似布氏菌犬种菌, 计 167 株。均为革兰氏阴性小球杆菌, 菌苔灰白色, 被 R/C 噬菌体裂解, 对 R 血清产生或不产生凝集; 另一类非布氏菌 33 株。其中 1 株传代不长, 7 株生长过快或过慢, 3 株革兰氏阳性, 7 株对 R 血清凝集, 但不被 R/C 裂解, 另外 15 株对 R 血清和 R/C 株均无反应。

(二) 生长发育特性

1. 一般性状: 全部菌株均不需 CO₂, 不产生 H₂S, 不与 A 和 M 血清凝集, 均水解尿素, 在三胜黄素液中凝集, 在盐水中不全部自凝, 少数菌株呈粘液状。

2. 染料抑菌: 在硫堇和复红培养基中生长试验呈典型特性的 121 株 (72.49%); 对此两种染料均生长的 38 株 (22.75%); 均不生长的 8 株 (8.75%)。

(三) 凝集原性

1. 与抗犬种菌血清的凝集: 全部菌株与 87-4 血清的凝集效价是 1:50 以下的 8 株 (4.75%), 1:100—1:200 的 9 株 (5.39%), 1:400—1:800 的 40 株 (23.95%), 1:1600—1:3200 的 110 株 (65.87%)。2 个国际株效价为 1:320。

2. 与非同种 R 血清的凝集: 与 87-1、87-2、87-3、88-1 4 批血清的反应结果列于

表 1 对各类 R 血清的凝集反应

Table 1 Agglutination with different R-sera

菌种类型 Strain phase	株数 Number	凝集效价 Various titer in SAT			
		87-1	87-2	87-3	88-1
S 型标准株 S—rs*	6	1:100—1:200	1:400—1:800	1:3200—1:6400	1:100—1:200
R 型标准株 R—rs*	3	1:1600	1:400—1:800	0—1:400	1:1600—1:3200
待检菌株 Strain tested	150	1:200—1:3200	1:200—1:1600	1:200—1:800	1:400—1:1600

*: reference strain

表 2 犬种菌变态反应原的皮肤试验

Table 2 Skin test with allergen of *Brucella canis* (mm²)

动物组别 Animal groups	观察时间 Observation (h)	成品菌素 Brucellin	犬种菌素 Allergens of <i>Brucella canis</i>			
			No. 3	NO.4	No. 11	No. (6/66)
致敏组 Sensitized	24	15.8±4.3	14.0±0.8	13.0±1.0	14.0±2.8	14.0±1.6
	48	15.0±2.8	11.0±2.8	10.8±1.0	10.5±0.8	10.8±3.0
对照组 Control	24	1.5	2	1.5	1.5	2
	48	0	0	0	0	0

注: 国际株菌素 Brucellin with reference strain.

表 3 对噬菌体的敏感性比较

Table 3 Comparison for sensitivity to phages

菌种 Strain	株数 Number	噬菌体株 Phage strains			三胜黄素反应 (0.1%) Tripoflavine
		BK2	BJ-309	R/C	
R-羊种 16M R-16M	4	—	+++	++	+++
R-羊种 28 R-28M	2	—	—	—	+++
R-羊种 B115 R-B115					
R-牛种 107 R-107A	2	+	+	+	+++
R-牛种 117 R-117A					
标准犬种菌 Reference <i>Brucella canis</i>	2	—	+++	+++	+++
待检菌株 Strains tested	40	—	+++	+++	+++

表 4 DNA 中 G + C 值的测定

Table 4 DNA of strains tested containing G + C mol%

菌种 Strain	株数 Number	DNA 纯度* DNA purity	DNA G + C mol%
待检菌株 Strains tested	17	1.66—1.86	54.5—58.9
羊种布氏菌 16M <i>Brucella melitensis</i> 16M	1	1.74	57.2
犬种布氏菌(6/66) <i>Brucella canis</i> (6/66)	2		56.4, 57.6
艾氏大肠杆菌(K12) <i>Escherichia coli</i> (K12)	2	1.86	51.2, 51.2
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1.79	69.3
耶尔森氏结肠炎 0:9 菌 <i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	1	1.93	48.5

* 260/280 (OD)

表 5 DNA-DNA 杂交率的测定

Table 5 Measures of DNA-DNA hybridization

菌种 Strain	复性速率 Renaturation rate			与羊种菌 16MDNA 杂交 Hybridization with DNA of 16M(%)
	Va(1)	Vb(2)	Vm(3)	
羊种布氏菌16M <i>Brucella melitensis</i> 16M	2.43	2.43	2.43	100.0
犬种布氏菌 MEX51 <i>Brucella canis</i> MEX51	1.57	2.20	1.70	81.7
犬种布氏菌(6/66) <i>Brucella canis</i> (6/66)	2.03	2.00	1.97	95.8
待检菌株* Strains tested				
No. 1 (307)	1.50	1.90	1.77	109.0
No. 2 (GH32)	2.13	2.40	2.27	101.0
No. 3 (GH34)	2.43	2.53	2.55	106.0
No. 4 (87-9ShD)	2.13	2.17	2.00	86.0
No. 5 (87-10ShD)	2.43	2.77	2.53	94.8
No. 6 (87-22ShD)	2.13	1.73	1.80	72.1

* 选出的不典型代表株 Untype strain: 1. Va 标准菌种 Reference strain; 2. Vb 待检菌株 Strain tested; 3. Vm 两者结果 Both Strains

表 1。

由表 1 看出: 地方株对各 R 血清均有凝集。88-1 血清用犬种菌吸收为 88-1(a), 被测验的 20 株菌的效价对 88-1 为 1:400—1:800, 而对 88-1(a) 为 1:100—1:400。

(四) 变态反应原性

1. 对 S 型菌致敏豚鼠的反应: 用 3 个地方犬种菌变应原 (No. 3、4、11) 和 1 个国际犬种变应原(6/66)作皮试, 并以成品菌素为对照, 结果见表 2。

由表 2 可看出: 各犬种菌变态反应原对 S 型致敏豚鼠均有良好的交叉变应原性。

2. 对犬种菌致敏豚鼠的反应: 于 24 和 48 小时观察, 成品菌素的结果为 12.5 和 9.8 mm^2 , 其他 3 个变应原均有反应出现, 约小 1 倍。

(五) 对分群噬菌体的敏感性

1. 与 S 和 R 群噬菌体的作用: 牛种、羊种、猪种各 2 株 S 型菌只对 S 群噬菌体敏感, 不被 R 群株裂解; 167 株地方菌仅被 R/C 和 Bj-309 株裂解, 不被其他株裂解, 与 2 个国际犬种菌的结果一致。

2. R/C 株的特异性: 除用犬种菌外, 另用羊种和牛种 R 菌共 8 株, 裂解结果见表 3。

由表 3 看出, R/C 和 Bj-309 还能裂解某些 R 型羊种菌 (R-16M)。这一新特性的发现, 表明这类菌株难以和对染料不敏感的犬种菌鉴别。

(六) DNA 同源性测定

1. DNA 中 G + C mol% 测定: 17 株地方犬种菌的结果列于表 4。

由表 4 看出: 17 株地方菌株的 DNA 中 G + C mol% 值为 54.5—58.9, 其中 2 株为 54.5, 略低于对照菌株, 其他菌株 G + C 值均在本属菌的范围内。

2. DNA-DNA 杂交试验: 选出 6 株不典型的地方菌株与羊种菌 16M 株杂交, 其结果见表 5。

由表 5 可见, 除 No.6 株外, 杂交率均在 80% 以上。

(七) 电镜形态观察

选出 8 株菌, 与标准牛种、羊种和猪种菌相比较:

1. 外表形态: 无荚膜, 无鞭毛, 未见芽胞形成, 呈球或短杆状。球状菌直径 0.7—0.73 μm 。短杆菌长 1.0—1.2 μm , 宽 0.58—0.62 μm 。较猪种菌略小, 略大于羊种菌。表面褶皱, 又常见单个或多个乳头状突起, 直径 0.1—0.2 μm 。

2. 内部结构: 超薄切片见胞壁由外膜和肽聚糖构成; 突起部也见同样结构。冰冻断裂蚀刻片见到胞膜外蚀刻面有密聚微粒, 朝内则微粒稀少。扫描观察见菌体中央呈不规则凹陷。

待检菌的上述结果与标准株基本一致。

讨 论

1. 从犬体分离的培养物用布氏菌常规法检定较困难。但对与布氏菌生长和形态相似的菌株, 如 R 血清为阴性反应, 却能被 R/C 噬菌体裂解者, 基本上可判为犬种菌。

2. 如实验室条件许可可作 DNA 同源性测定, 即可肯定是否为布氏菌属。这样可简化其他细菌学检查方法。补作噬菌体裂解试验, 即可进行布氏菌属内分类。

3. R 血清有许多问题要进一步研究, 如同种菌株的抗原性差别, 各类 R 抗原有共同决定簇等, 因而影响到对 R 血清凝集结果的评价。

4. 某些犬种菌对染料抑菌试验呈现非典型性(对硫堇和复红均不敏感), 它们与某些 R 型羊种菌(能被 R/C 裂解株)特性相同, 目前尚无特异方法鉴别。这也是我们在试验中发现的一个新问题。

参 考 文 献

- [1] WHO: Series Technical Report, No:464:63. 1971.
- [2] 蔡义雄: 台湾畜牧兽医学会会报, 42: 91, 1983.
- [3] 尚德秋等: 中华流行病学杂志, 5(6): 345, 1984.
- [4] 黄志雄等: 地方病通报, 2(1): 1, 1987.
- [5] 黄 建等: 中国人兽共患病杂志, 4(4): 19, 1988.
- [6] Corbel, M. J. et al.: *The Brucella phages Booklet*, 2266: 18, 1980.
- [7] WHO: Technical Report Series. No. 740:10, 1986.
- [8] 黄 建等: 微生物学报, 25(3): 270, 1985.
- [9] 黄 建等: 微生物学通报, 18(3): 149, 1991.
- [10] 林万明等: 细菌分子遗传学分类检定法, 上海科学技术出版社, 上海, 第101页, 1990.
- [11] Jelazewicz, I. et al.: *Bacterial Toxin and Cell Membranes*, Academic Press London, p. 60, 1978.

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF 200 STRAINS OF *BRUCELLA CANIS* UNDER TEST FROM CHINA

Huang Jian

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

200 cultures of *Brucella canis* under test were received from some provinces in our laboratory. 167 (85.59%) of them were identified as *Brucella* according to morphology, growth properties and serologies. And then, they were proved as *Brucella canis* with R-serum agglutination and lysed test of phage R/C. Some strains also were performed DNA homologous determination and observation of electron microscopic morphology. The results found out that the genetic constitution and picture of them identified with that of reference strains. Non-agglutination reaction was 4.75% of all strains in R-serum test. 72.49% of them appeared typic reaction in dye sensitivity test. 22.75% was resisted to both thionin and fuchsin, which separated difficulty with R phase strains of *Brucella melitensis* lysed by phage R/C.

Key words *Brucella canis* from China; Identification and characterisation