

142株布氏菌的分型鉴定

崔庆录 冬青 郭秀兰 严兆民 吴从雅

(内蒙古自治区地方病防治研究所,呼和浩特)

内蒙古哲盟地方病防治站,于1979年从科左中旗敖本台公社6个大队羊标本中检出142株布氏菌。经鉴定有牛羊两个种6个生物型。这些菌毒力弱,羊种菌变异多,为什么在一个小范围内检出如此多的菌株?是自然菌株还是既往畜间使用羊₅(M₅)或牛₁₉(A₁₉)菌苗造成?现将鉴定结果报道如下。

材 料 和 方 法

一、菌株

142株布氏菌采自羊的正产胎盘、死羔和流产胎儿。参考菌株:牛种菌有A₁₉、B_{a-19}、104M菌苗菌株和强毒菌544A、387A。羊种菌有M₅菌苗菌株和强毒菌M₂₈,以上菌株均由农业部兽医药品监察所和卫生部药品生物制

品检定所供给。

二、鉴定分型与变异检查

1. 菌型鉴定方法见文献[1]。

2. 变异检查: 0.1%吡啶黄凝集和热凝集试验。

三、培养基

胰蛋白胨液体和琼脂培养基(胰蛋白胨由英国进口)。

四、毒力测定

142株菌的毒力测定,用豚鼠脾菌数法随机抽检了羊种菌9、12、15、62、65、102、103、109号和牛种菌4、21、29、53、104号,反复进行了27次测定。同时对羊种菌109和牛种菌104菌株在豚鼠体内连传5代(每株菌以5亿菌/ml菌液1ml注入豚鼠,30天解剖,分离菌株

再传代)再测毒力。

五、与牛种菌 A₁₉ 和羊种菌 M₁ 菌苗菌株的比较试验

1. 赤藓醇敏感性试验：赤藓醇稀释后经蔡氏滤器除菌，加入 60—70℃ 的琼脂培养基中，使每毫升琼脂培养基含赤藓醇 1、2.5 和 5mg，制成相应的三种平板。将 18 株待检羊种菌、21 株牛种菌和 7 株参考菌株的 48 小时培养物，分别制成含 10 亿菌/ml 的菌悬液，取一白金环接种在三种平板上，37℃ 培养 72 小时观察结果。

2. 抗菌素敏感性试验：用液体培养基分别稀释青霉素 5—100，链霉素 0.05—5、四环素 5—20u/ml，各 5 个浓度，将待检 5 株牛种菌 6、29、51、53、104 和 5 株羊种菌 9、12、102、103、109 和 7 株参考菌株的 48 小时培养物，分别加入含不同浓度的抗菌素液体培养基中，使每毫升培养基含 1 亿菌。37℃ 培养 96 小时，取培养液 0.3ml，转种平板上，37℃ 培养 96 小时后计算菌落数。

3. 对短小芽孢杆菌敏感性试验：利用本所分离的一株蒙字 1 号短小芽孢杆菌、对布氏菌属菌株有选择性和不同程度的抑菌作用，对 15 株牛种菌和 10 株羊种菌进行敏感性试验，方法是将 48 小时布氏菌培养物稀释成含 10 亿菌/ml，涂布平皿，待干 2—3 小时后，取短小芽孢杆菌 20 小时的培养物少许分 4 点接种在涂有布氏菌的平皿上，37℃ 培养 72 小时观察结果。结果对猪种菌出现平均 7.5mm 的抑菌圈，对羊种菌无明显抑菌，对牛种菌出现 2—3mm 的抑菌圈或生长不受影响，但对牛种菌 A₁₉、B_{a-19} 菌苗菌株却出现 5—8 mm 的抑菌圈^[2]，故可作为一般牛种菌和牛种菌 A₁₉ 和 B_{a-19} 菌苗菌株的鉴别参考。

试验结果

一、菌型鉴定和变异检查

142 株菌经分型鉴定，结果有羊种菌 69 株；生物型 1、2、3。牛种菌 73 株；生物型 1、3、6

表 1 出菌材料、菌型和菌株变异结果

菌	生物型	出 菌 材 料			合 计	菌 株 变 异	
		正产胎盘	死 羔	流产胎儿		变 异 数	变异率(%)
羊种菌	1	50	11	0	61	52	85.2
	2	2	0	0	2	0	0
	3	6	0	0	6	1	16.8
牛种菌	1	29	2	0	31	1	3.5
	3	27	2	1	30	1	3.5
	6	11	1	0	12	0	0
合 计		125	16	1	142	55	38.7

表 2 13 株菌的毒力测定结果

菌	变异否	生物型	测定株数	毒力 (万菌/g脾)
羊种菌	光滑型	1	2	9.6—15.0
		2	2	50.0—62.5
		3	1	7.3
牛种菌	粗糙型	1	3	1.4—50.0
	光滑型	1	2	9.7—27.5
		2	1	1.9
传 5 代的牛、羊种菌	光滑型	3	2	5—45
		1	1	0.84—31.2
		1	1	

(牛种菌均不需要 CO₂)，共 6 个生物型。142 株菌经变异检查，69 株羊种菌有 53 株变异，变异率为 76.8%，牛种菌 73 株有 2 株变异，变异率为 2.7% (见表 1)。作热凝集试验发现有 6 株菌加热前在 0.85% 盐水中发生明显的自凝现象，摇匀后再做变异检查，热凝集试验反为阴性结果，经传 2—3 代后自凝现象消失。羊种菌变异率之高，又有很多牛种菌转移宿主到羊，这在我区历年检出的布氏菌中是罕见的。

二、毒力测定

表 3 不同浓度赤霉菌对布氏菌抑制结果

赤霉菌浓度 (mg/ml)			1		2.5		5		合 计
			生长菌数	抑制菌数	生长菌数	抑制菌数	生长菌数	抑制菌数	
羊 种 菌	光滑型	1	5	2	5	2	5	2	7
		2	0	2	0	2	0	2	2
		3	1	1	1	1	1	1	1
	粗糙型	1	7	0	7	0	7	0	7
	合 计		13	5	13	5	13	5	18
牛 种 菌	光滑型	1	0	6	0	6	0	6	6
		3	3	4	3	4	3	4	7
		6	0	6	0	6	0	6	6
	粗糙型	1	0	1	0	1	0	1	1
		3	1	0	1	0	1	0	1
	合 计		4	17	4	17	4	17	21
参 考 菌 株	A ₁₉		+		—		—		
	B ₂₋₁₉		+		—		—		
	104M		+		—		—		
	A544		+		+		—		
	A387		+		+		+		
	M ₂		+		+		+		
	M ₂₈		+		+		+		

表 4 布氏菌对几种抗菌素敏感性试验结果

菌	生物型	测定菌号	青霉素 (u/ml)					链霉素 (u/ml)					四环素 (u/ml)				
			100	50	25	10	5	5	1	0.5	0.1	0.05	20	10	5	1	0.5
羊 种 菌	1	109	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—	++++	++++	+	+	++	++	+++
		51	—	—	—	++++	++++	—	—	—	—	—	—	—	++++	++++	++++
		9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	12	—	—	—	+++	++++	—	—	—	—	—	+	++	++++	++++	++++
		162	—	—	—	+++	++++	—	—	—	—	—	+	++	++++	++++	++++
牛 种 菌	1	104	—	—	++	+++	+++	—	—	—	—	—	+	++	++++	++++	++++
	3	51	—	—	—	++++	++++	—	—	—	—	—	+	++	++++	++++	++++
	6	53	—	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++	++++	++	++	++++	++++	++++
		79	—	—	++	++++	++++	—	—	—	—	—	+	++	++++	++++	++++
		6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	++++	++++	++++
参 考 菌 株	A ₁₉		—	—	—	+	++	—	—	—	—	—	—	+++	+++	++++	++++
	B ₂₋₁₉		—	—	—	+	++	—	—	—	—	—	—	++++	++++	++++	++++
	104M		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	M ₂		+	+++	+++	++++	++++	—	—	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	A544		+	+	+	++	+++	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	++++
	M28		++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—	—	—	++	+++	++++	++++	++++

注: “—”菌生长受抑制, “+—+++”生长的菌数逐渐增加, “++++”形成菌苔。

对 8 株羊种菌和 5 株牛种菌的毒力测定, 脾含菌数最低为 1.4 万/g 脾, 最高为 62.5 万/g 脾。取其中羊种菌生物 1 型 109 和牛种菌生物

1 型 104 光滑型菌株, 在豚鼠体内连传 5 代后, 其毒力为 31.2 万菌/g 脾以下 (表 2)。说明经过返祖试验后两株菌的毒力并未提高, 证明两

株菌为弱毒菌。

三、与牛种菌 A_{19} 和羊种菌 M_5 菌苗菌株的比较试验

1. 在三个浓度的赤藓醇培养基上, 随机抽检牛种菌 21 株, 其中有 17 株在含 1mg 赤藓醇培养基上生长受到抑制。18 株羊种菌中有 5 株生长受抑制, 变异和未变异的菌株对赤藓醇的敏感性相同。牛种菌 A_{19} 菌苗菌株在含 2.5 mg 赤藓醇培养基上才受到抑制, 说明待检牛种菌对赤藓醇的敏感性高于 A_{19} 菌苗菌株。有 13 株羊种菌和参考菌株牛种菌 544A、387A 和羊种菌 M_5 不受赤藓醇的影响, M_5 在含 5mg/ml 赤藓醇培养基上受到微弱抑制(表 3)。

2. 对抗菌素的敏感性: 对青霉素的敏感性, 待检的 5 株牛种菌中有 4 株低于 A_{19} 菌苗菌株, 1 株(53 号)高于 A_{19} 。5 株羊种菌中有 4 株比 M_5 菌苗菌株敏感, 1 株(109 号)与 M_5 相似。对链霉素、四环素的敏感性, 待检的牛、羊种菌与参考菌株基本一致(表 4)。

3. 对短小芽孢杆菌的抑菌敏感性: 随机抽检的 15 株牛种菌中有 12 株出现抑菌圈 2—3 mm, 3 株生长不受影响, 与 A_{19} 、 B_{2-19} 的抑菌圈 5—8mm 有明显差别。10 株羊种菌和参考菌株的生长均不受影响。

讨 论

从上述试验结果看, 待检菌株除与 A_{19} 和

M_5 菌苗菌株属同一生物型外, 牛种菌还有 3、6 生物型, 羊种菌还有 2、3 生物型。从随机抽样检查结果看, A_{19} 菌在每毫升含 2.5mg 赤藓醇培养基上受抑制, 对青霉素 5u/ml 敏感, 而且易受短小芽孢杆菌的抑制。而待检的牛种菌特别是与 A_{19} 同一生物型的牛种菌, 对赤藓醇的敏感性比 A_{19} 高, 对青霉素的敏感性低, 有部分菌株受短小芽孢杆菌的抑制, 抑菌圈小于 A_{19} 菌。由此说明待检的牛种菌与 A_{19} 菌苗菌株不同。

对待检的 18 株羊种菌中有 13 株不受赤藓醇影响, 5 株被抑制, 而 M_5 在含 5mg/ml 赤藓醇培养基上有微弱抑制, 5 株被检菌株中有 4 株对青霉素比 M_5 敏感。上述均说明检出的布氏菌株与 M_5 菌苗菌株是有区别的。

送检的 142 株菌型复杂^[3], 并非菌苗菌株(牛₁或羊₁型), 虽属自然菌株, 但不引起人畜间发病, 但此菌能在人畜间感染存留, 又有牛种菌转移宿主到羊的现象, 这一现象的原因何在, 还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 农林部兽医药品监察所等译: 布氏菌病实验室技术, 科学出版社, 北京, 22—35 页, 1975。
- [2] 崔庆录: 微生物学报, 22(1): 95—97, 1982。
- [3] 姜继春等: 中华流行病学杂志, 2(4): 234, 1981。