

# 一株布氏菌新种的综合鉴定

黄建 薛平 晏质

(中国药品生物制品检定所,北京)

**摘要** 从国外得到一株布氏菌新种,用常规以外的 DNA 同源性、多种 R 型血清凝集和对分群噬菌体裂解试验系列检查结果: G+C mol% 值为 57.1, T<sub>m</sub> 为 78.7°C, 与抗 IV 型猪种血清、抗牛种 45/20 菌血清、抗羊种 B115 菌血清的效价均为 1:3200, 与抗犬种 RM6/66 菌血清和阴性兔血清均为(-), 与 M 血清为(+), 与 A 血清为(-), 能被 Wb、BK<sub>2</sub> 噬菌体裂解, 对 Tb、Fi、R/C 和 Bj-309 噬菌体不敏感。其生长不需 CO<sub>2</sub>、不产生 H<sub>2</sub>S、对硫堇染料不敏感、对碱性复红染料敏感。由此证明, 此菌种为布氏菌属, 与苏联报道的猪 V 型布氏菌种相符。

**关键词** 布氏菌属; 新生物型菌种

布氏菌属的分类自 1943 年 Hudson<sup>[1]</sup> 提出牛、羊、猪三个种的分类法以来, 在布氏菌病专家委员会成立后, 不断地把一些新出现的菌种加入分类表。1957—1986 年, 该委员会及国际微联细菌学分类委员会布氏菌分委会, 先后多次对布氏菌的分类进行了修改<sup>[2-9]</sup>, 从而建立了一套常规检定法, 把布氏菌属分为 6 个种 19 个生物型。但是, 对一个新种的确立仅用常规法就不够了, 因它有新型菌株的特征, 不同于 19 个生物型, 为此我们增添了 DNA 同源性、多类型抗血清和对分群噬菌体的敏感性等方法进行综合鉴定分型。

## 材料和方法

### (一) 菌种

1. 参考菌种: 羊种 M16, 牛种 104M, 猪种 S1330, 犬种 RM6/66, 猪种 S2 均为我所冻干保存的冻干菌种。

2. 待检菌种(简称 NS): 自英国引进。

### (二) 布氏菌分群噬菌体

本试验共用 6 株噬菌体 Tb、Fi、Wb、BK<sub>2</sub>、

R/C 和 Bj-309, 前 5 株为英国 CVL 赠予, 经本所增殖, Bj-309 为我所发现的新犬种菌噬菌体<sup>[10]</sup>。

### (三) 各类型血清

S 型血清: 包括布氏菌诊断血清 (S-Anti 104M)、抗猪 IV 型血清 (S-Anti SIV)、A 和 M 单相血清和阴性兔血清(健兔一)。

R 型血清: 包括抗牛种 45/20 菌血清 (R-Anti 45/20)、抗羊种 B115 菌血清 (R-Anti B115)、抗犬种 RM6/66 菌血清 (R-Anti RM6/66)。

上述血清除 A 和 M 血清来自英国外, 均为本所制造, 冻干备用。

### (四) 常规试验

包括对 CO<sub>2</sub> 的需要, H<sub>2</sub>S 形成, 硫堇和碱性复红染料抑菌与变异检查等项。

### (五) DNA 同源性测定

用 DNA G + C mol% 法测定, 先将待检菌接种克氏瓶肝琼脂, 生长菌苔后, 制成菌液, 离心去上清得湿重菌体, 用 SDS 破碎菌体, 按林万明方法<sup>[11]</sup>提取 DNA, 用日本岛津分光光

度计测定升温时 OD 值的改变。按文献 [11] 方法计算百分率。

## 试验结果

### (一) DNA 同源性测定

参考菌株羊种 M16 和猪种 S1330 及待检菌株 NS 经 DNA 同源性测定, 所得 Tm 值和 G + C mol% 值列于表 1。

表 1 DNA 同源性测定结果

菌种	Tm(°C)	G+C mol%
羊种 M16	78.35	56.3
猪种 S1330	78.45	56.3
待检菌 NS	78.75	57.1

从表 1 结果看出, 待检菌株 NS 的 G + C mol% 值为 57.1, 在布氏菌属 56—58 范围之内。Tm 值为 78.7°C。

### (二) 噬菌体裂解结果

NS 株和牛种 104M、猪种 S2、羊种 M5、犬种 RM6/66 对 6 个噬菌体的裂解结果见表 2。

从表 2 看出, NS 株被噬菌体裂解图相与 S2 相符, 均可被 Wb 和 Bk<sub>2</sub> 噬菌体裂解。

表 2 各布氏菌被噬菌体裂解结果

菌种	Tb	Fi	Wb	K <sub>2</sub>	R/C	Bj-309
牛种 104M	+	+	+	+	-	-
猪种 S2	-	-	+	+	-	-
羊种 M5	-	-	-	+	-	-
犬种 RM6/66	-	-	-	-	+	+
待检菌 NS	-	-	+	+	-	-

注: “+”为裂解;“-”为不裂解

### (三) 血清凝集试验结果

1. 单相血清玻片凝集试验: 按常规法进行, 结果见表 3。

表 3 单相血清测定结果

菌种	A	M
牛种 104M	+	-
猪种 S <sub>2</sub>	+	-
羊种 M5	-	+
NS 株	-	+

表 3 中看出, NS 菌仅对 M 血清凝集, 与 S<sub>2</sub> 株不同。

2. 试管凝集试验: NS 株与 3 种 R 血清, 2 种 S 血清和 1 种健康兔血清凝集结果见表 4。

从表 4 结果看出, NS 抗原除对犬种菌血

表 4 NS 抗原对 R 和 S 血清凝集结果

血清类型	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
R-Anti 45/20	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
R-Anti B115	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
S-Anti NS	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
R-Anti RM6/66	-	-	-	-	-	-	-
S-Anti 104M	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
健兔(-)	-	-	-	-	-	-	-

清和健康兔血清不凝集外, 对其他血清都有较高的凝集, 证明 NS 菌为布氏菌。

### (四) 常规法检查结果

NS 菌株与参考菌牛种 104M、猪种 S2 和羊种 M5 用常规法所测各项结果见表 5。

从表 5 结果看出, NS 菌已发生变异, 其特性接近猪种布氏菌, 但非猪 1 型菌。此外, 该菌株菌苔和菌落与布氏菌稍有不同, 具有琥珀样

表 5 常规法测定结果

菌种	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	疏菌	碱性复红	1% 三胜黄素
牛种 104M	-	++	-	+	-
猪种 S2	-	+++	+	-	-
羊种 M5	-	-	+	+	-
待查菌 NS	-	-	+	-	++

色素光泽, 镜检为革兰氏阴性球杆菌。

(下转第 125 页)

## 讨 论

为弄清从英国引进的一株新种布氏菌(NS)的分类地位, 本文对该菌进行了系统鉴定。该菌 DNA G + C mol% 的测定结果为 57.1, 证明该菌为布氏菌属。从分群噬菌体裂解试验结果看, 该菌只能被 Wb 和 BK<sub>2</sub> 裂解, 说明该菌为猪种布氏菌, 从各类血清凝集试验结果看, 与 A 血清不凝, 与 M 血清凝集, 同时与布氏菌抗牛种、抗羊种和抗猪种血清凝集, 而与抗犬种菌血清不凝, 但非犬种菌, 表明该菌有 R 型布氏菌特性。常规试验的结果亦说明了该菌具有猪种布氏菌特性, 但不同于猪 I、II、III 和 IV 型菌, 也非绵羊副宰种菌。通过上述试验的系统鉴定, 该菌基本符合布氏菌专家委员会第 6 报中所提的猪种菌生物 V 型的特点, 基本符合

Veshlova 报告的自苏联鼠类分离的布氏菌特性<sup>[12]</sup>。由此表明, 该菌为国际布氏菌分类中猪种菌的一个新种——生物 V 型菌, 我们已收集入库, 编号为 55248。目前世界各国尚未获得和应用, 美国 ATCC 和英国 NCTC 也未收集和编号。

## 参 考 文 献

- [1] Buleson IF: *Brucellosis in man and animal*, New York, 1943.
- [2] FAO/WHO: *Techn Rep Ser*, 148:24—25, 1958.
- [3] Myers DM et al.: *ICSB*: 12: 6, 1962.
- [4] FAO/WHO: *Techn Rep Ser*, 289: 28—30, 1964.
- [5] FAO/WHO: *Techn Rep Ser*, 464:24—28, 1971.
- [6] FAO/WHO: *Techn Rep Ser*, 740:110—114, 1986.
- [7] Corbel MJ: *ICSB*: 32:4, 1982.
- [8] Corbel MJ: *ibid* 34:7, 1984.
- [9] Corbel MJ: *ibid* 36:9, 1986.
- [10] 黄建等: 中国人兽共患病杂志, 5(5): 9—12, 1989.
- [11] 黄翠芬: 医学细菌分子生物学进展, 科学出版社, 北京, p. 209, 1984.
- [12] Vershlova PA et al.: *ICSB*, 33:399, 1983.