

布鲁氏菌病国外资料

选 编



1982

中华人民共和国卫生部地方病防治局

39

前 言

1981年末,我国布鲁氏菌病考查组访问了日内瓦世界卫生组织、希腊和地中海人畜共患疾病控制中心及英国卫桥实验中心。带回有关布鲁氏菌(文内简称布氏菌)和布鲁氏菌病(文内简称布病)方面学术资料六十余篇。为了便于学习和交流,我们委托中国医学科学院流行病学微生物学研究所组织人员从中选出三十余篇翻译成册,定名为“布鲁氏菌病国外资料选编”。

本选编约三十余万字,分病原学、噬菌体、诊断技术、免疫、临床治疗和防治经验、条例等六个部分,可供广大布鲁氏菌病防治、科研人员和基层卫生、畜牧兽医人员以及医学院校等有关单位工作和教学参考。

中华流行病学杂志编辑部承担了本选编的编辑工作,不少同志为本选编作了大量工作,在此一并致谢!

由于编译的时间仓促、人员水平有限,选编难免有错误和不足之处,请同志们批评指正。

中华人民共和国卫生部地方病防治局

一九八二年八月

布鲁氏菌噬菌体的性质、鉴定及其应用

正文见70页

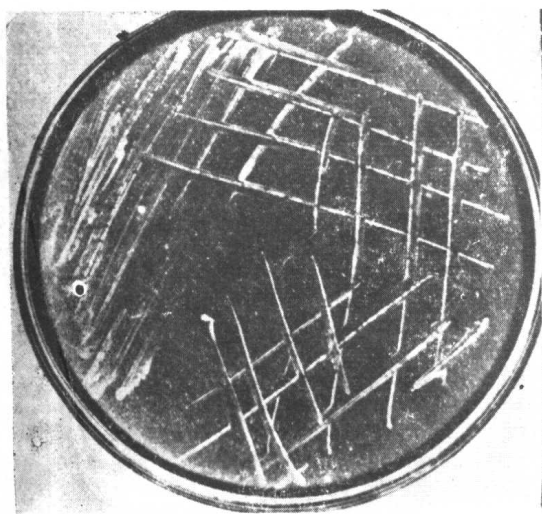


图1 携带噬菌体培养物敏感菌上的噬斑
此图系指携带噬菌体培养物(牛种布氏菌45/20+R噬菌体)在平皿上划线培养,在敏感菌上出现噬斑,也可见到白色粘液状、对噬菌体有抗性的集落。

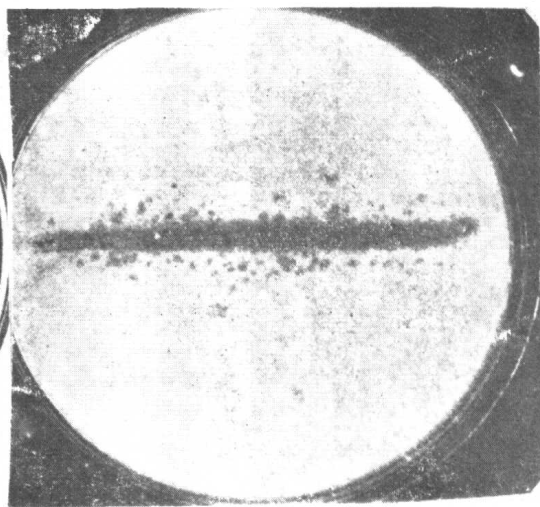


图2 按Fredericq法检查噬菌体/杀菌素释放

把携带噬菌体的菌(牛种布氏菌, 45/20+R噬菌体)在平皿中心划线培养然后用指示菌在其上作双层培养所产生的各种噬斑的情况。

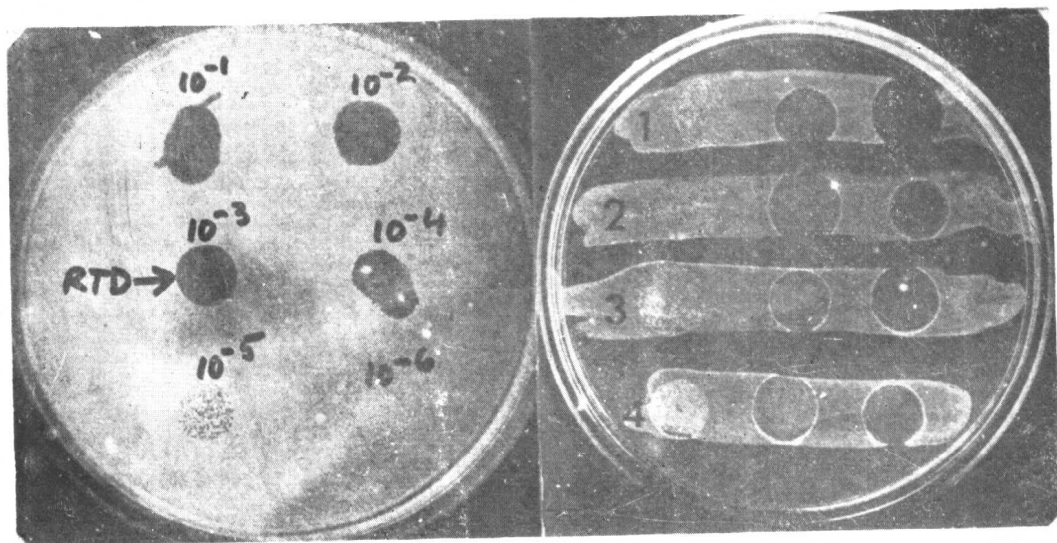


图3 在牛种布氏菌S19上测Tb噬菌体的RTD

高于RTD浓度产生融合性裂解, 低于RTD产生分散孤立噬斑。RTD是使指示菌刚刚产生融合裂解。本图表明, RTD是噬菌体的 $1/10^3$ 的稀释度。

图4 常规检查四个不同噬菌体浓度为测定适宜的应用浓度, 常规检查四个不同噬菌体浓度(1, 2, 3, 4), 在此例中, 第二个稀释度是适宜的, 大约是RTD。

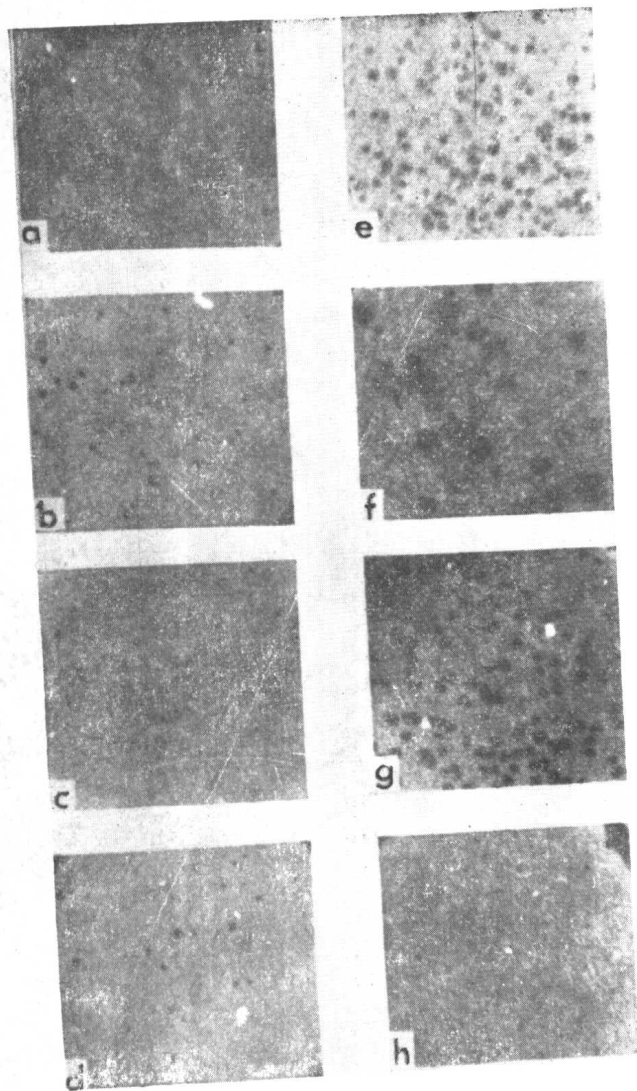


图5 噬斑形态

a. Tb作用到牛种布氏菌S19; b. Wb作用到牛种布氏菌S19; c. Fi作用到牛种布氏菌S19; d. Bk₂作用到牛种布氏菌S19; e. R作用到牛种布氏菌45/20; f. R/O作用到绵羊附睾种布氏菌63/290; g. R/C作用到小猎犬种布氏菌RM/66; h. R/M作用到羊种布氏菌B115。

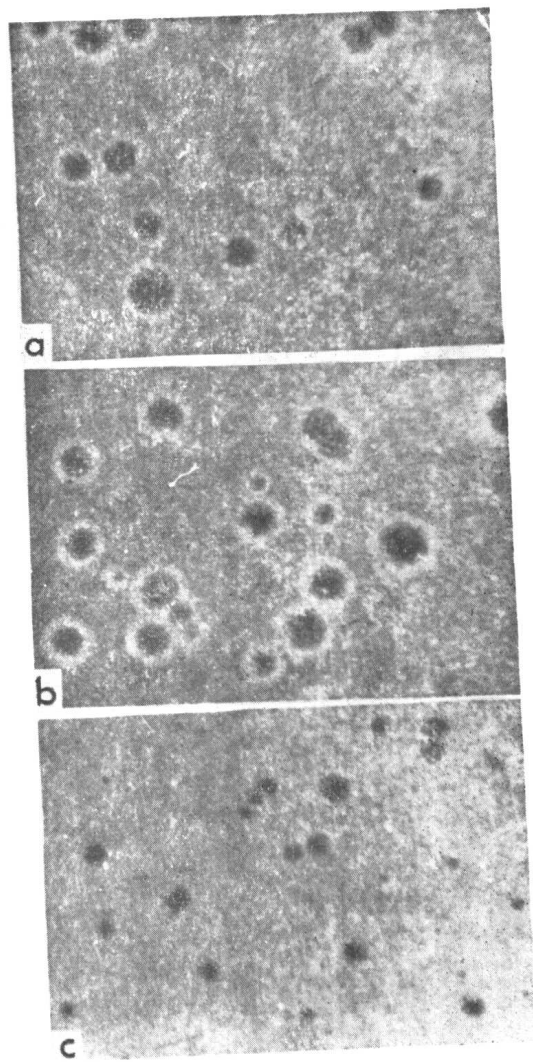


图6 噬斑形态

a. MC/75对牛种布氏菌544作用;
b. MC/75对猪种布氏菌1330作用;
c. MC/75对沙林鼠种布氏菌5k33作用。
a之噬斑大如小盾状, b之噬斑相似但稍小, c之噬斑最小。

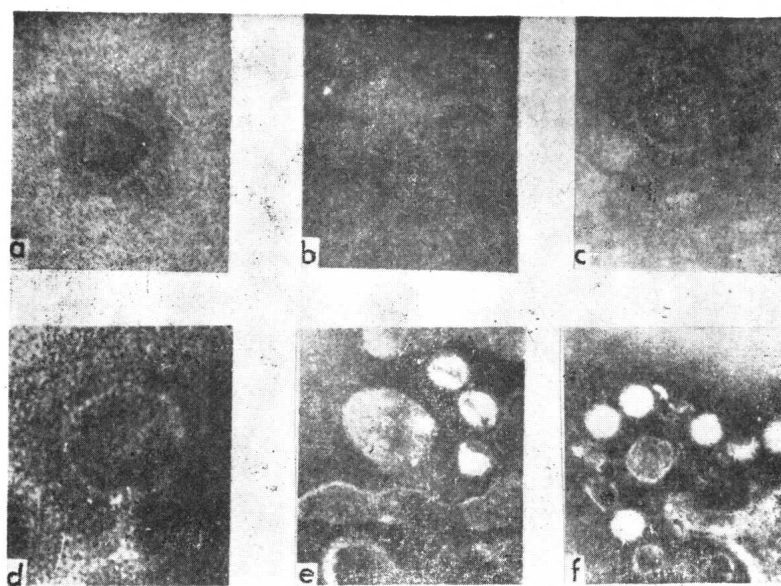


图 7 噬菌体负性标本染色的形态

a, Tb; b, A422; c, M51; d, S708; e, MC/75; f, D。除a是用uranyl acetate染色外, 其余全部是用Phospho-tungstate制备标本; a、b、c、d是放大37万倍, 而e、f放大20万倍; e、f图中可见纤维尾部。

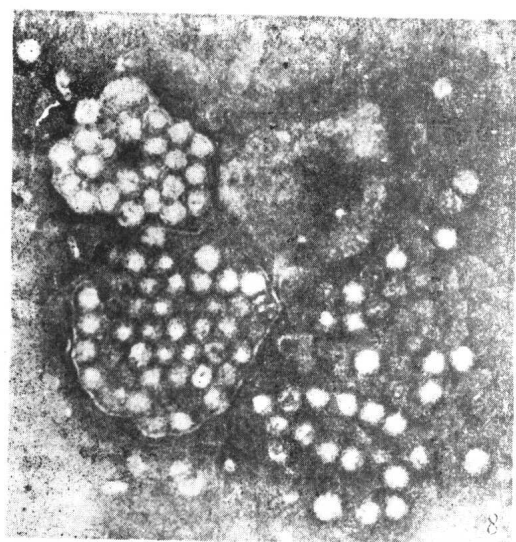


图 8 从感染细胞中释放R噬菌体的情形
新形成的噬菌体颗粒充满了宿主细胞并排成一定次序, 此图为 phospho tungstic acid染色, 放大120,000倍。

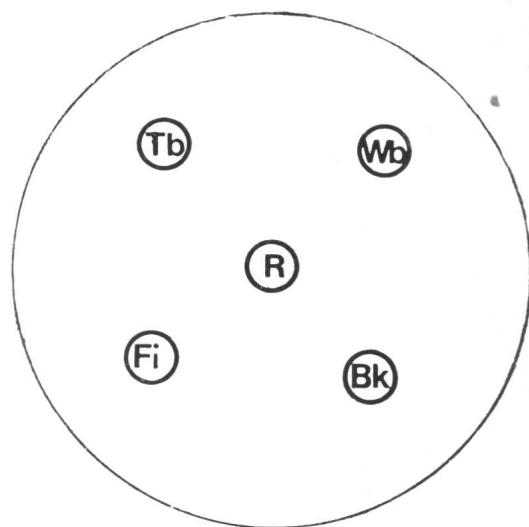


图 9 5株噬菌体接种到布氏菌菌苔上的培养方法

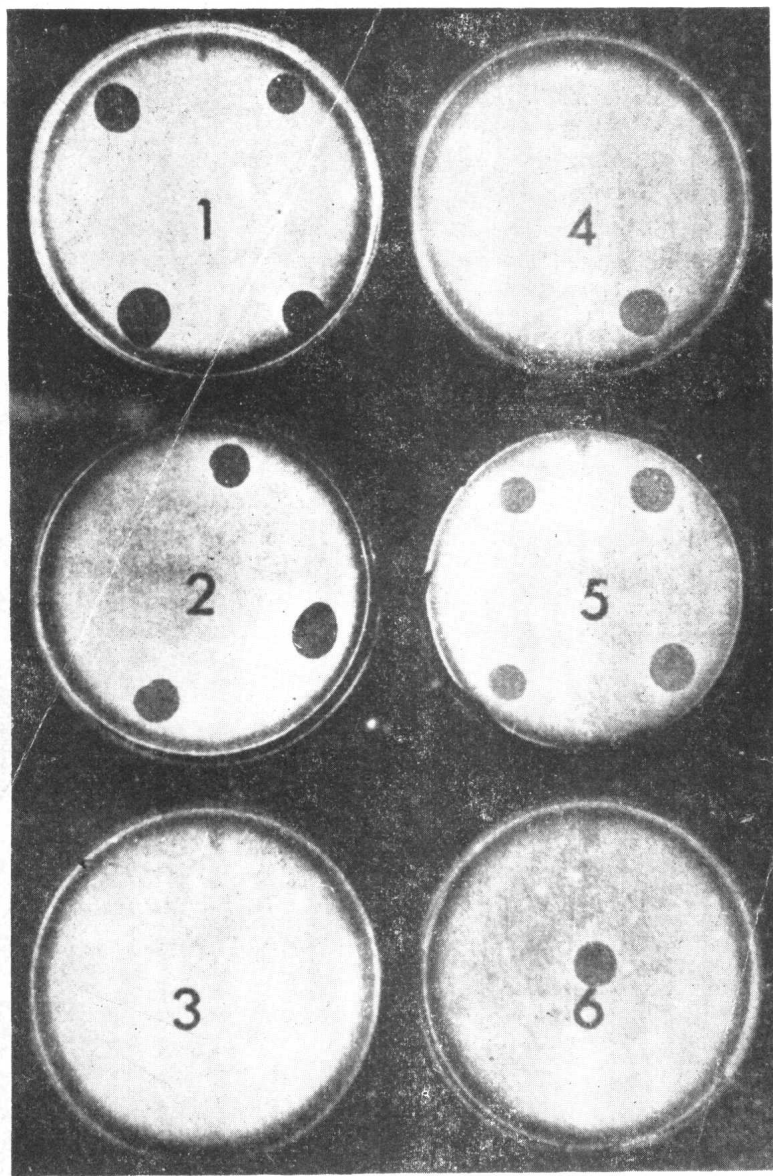


图10 由噬菌体Tb、Wb、Fi、Bk₂和R作用到布氏菌培养物上的裂解情况

1.牛种布氏菌544; 2.猪种布氏菌1330; 3.绵羊附睾种布氏菌(或小猎犬种布氏菌); 4.羊种布氏菌16M; 5.沙林鼠种布氏菌5k33; 6.牛种布氏菌45/20(R)。

布鲁氏菌病国外资料选编

目 录

病原学

- 从啮齿动物分离的布鲁氏菌培养物的特性..... (1)
- L型布鲁氏菌感染豚鼠的免疫状态研究..... (2)
- 犬种布鲁氏菌..... (3)
- 从牛分离的一株细胞壁有缺陷的牛种布鲁氏菌变种的特性..... (4)
- 布鲁氏菌属的分类近况..... (5)
- 布鲁氏菌的鉴定方法..... (10)
- 布鲁氏菌在转变成L型和返祖过程中抗原结构和化学成分的研究..... (34)
- 粗糙型布鲁氏菌的检查技术..... (35)

布鲁氏菌噬菌体

- 1970年以来研究布鲁氏菌噬菌体的进展..... (55)
- 用Firenze噬菌体鉴别布鲁氏菌猪4型与其它生物型..... (64)
- 新分离的布鲁氏菌噬菌体形态学及其观察..... (67)
- 布鲁氏菌噬菌体的性质、鉴定及其应用..... (70)

实验室诊断技术

- 1970年以来人类布鲁氏菌病血清学诊断方面的进展: 免疫扩散..... (97)
- 在回忆试验中用粗糙型和光滑型布氏菌抗原做CFT的鉴别作用..... (101)
- 牛布鲁氏菌病的间接溶血试验..... (102)
- 抗球蛋白试验在波兰作为诊断牛和猪布鲁氏菌病辅助试验方法的评价..... (103)
- 牛布鲁氏菌病补体结合试验中的前带现象..... (104)
- 补体结合试验在动物布鲁氏菌病诊断上的使用和说明..... (104)
- 布氏菌病不完全抗体理化特性问题..... (108)
- 布鲁氏菌抗原的生产与标化..... (109)
- 牛种布鲁氏菌病血清学诊断的改进..... (116)
- 布鲁氏菌素——一种用于诊断布鲁氏菌病的变应原..... (123)
- 布鲁氏菌病诊断标准实验室技术..... (125)

免 疫

- 对有感染布鲁氏菌病危险的职业人群的预防接种..... (144)
- 抗牛种布鲁氏菌病的免疫..... (147)
- 布氏菌病化学苗适宜剂量的测定..... (152)
- 羊种布鲁氏菌菌苗——Revl II, 1968~1980..... (153)

布鲁氏菌病的临床及治疗

消灭布鲁氏菌病的最有意义的问题之一——“潜在感染”	(160)
牛的先天性布鲁氏菌病	(161)
牛布鲁氏菌病	(162)
成功地治疗羊种布氏菌病心内膜炎	(165)
绵羊中绵羊附睾种布鲁氏菌感染	(166)
驯鹿布鲁氏菌病	(171)
犬布鲁氏菌病在动物和人中的感染现状	(173)
布鲁氏菌病的治疗	(177)
一种牛种布鲁氏菌引起的流产	(180)
人类布鲁氏菌病的诊断、治疗和预防	(181)

预防及控制

英国牛布鲁氏菌病的消灭历史	(213)
在英国，人的布鲁氏菌病和消灭牛布鲁氏菌病的进展	(217)
消灭布鲁氏菌病统一方法和条例	(220)
WHO 布鲁氏菌病研究和参考合作中心1979年报告的要点	(251)
自1975年以来美国麦迪逊市威斯康星大学兽医系布鲁氏菌病研究概况	(253)

征订启事

《布鲁氏菌病实验研究技术》	(219)
---------------------	-------

从啮齿动物分离的布鲁氏菌培养物的特性

M.J. Corbel等

据报道,从几个国家的野生啮齿动物中分离出来的布鲁氏菌培养物,在许多特征上与已知的布氏菌种和生物型不同。这些布氏菌株对于识别布氏菌种显然是重要的,并且它们还有可能成为家畜和人传染的天然贮藏所。我们实验室检查了这些培养物的代表株,包括5个从澳大利亚 *Rattus assimilus*, *Melomys cervinipes* 和 *Melomys Lutilus* 分离出的菌株和3个从苏联 *Mus musculus*, *Apodemus agrarius pall* 和 *Apodemus sylvaticus* 分离的菌株。

培养物的形态属于典型的布鲁氏菌

用聚丙烯酰胺圆盘电泳检查证明,这些菌株的酚醋酸提取物的蛋白成分与牛种布氏菌、羊种布氏菌和猪种布氏菌的参考株无区别。这些菌株提取物的免疫扩散试验表明,它们具有与光滑型布氏菌种参考株相同的内部抗原结构。用A和M单价特异性抗血清做的凝集试验表明,澳大利亚分离的培养物被抗牛种布氏菌生物型1的A表面抗原的抗血清所凝集。而苏联分离的培养物只与抗羊种布氏菌第1生物型的M表面抗原的抗血清所凝集。

变异检查,包括菌落形态学观察,草酸铵结晶紫染色,三肿黄素和抗绵羊布氏菌R抗原的抗血清的反应,在盐水中的稳定性和用抗牛种布氏菌的S和R株血清制备的荧光结合物做荧光抗体染色等,证明了澳大利亚培养物是中间光滑型细菌,而苏联培养物则完全是光滑型的。

用标化RTD(常规试验浓度)的布氏菌噬菌体做试验,这些菌株全都呈现猪种布氏

菌的裂解特征。它们不被RTD第比利斯噬菌体裂解,但被Firenze(佛罗伦萨)噬菌体部分裂解和被卫桥及Berkeley噬菌体完全裂解。将这些培养物与Firenze噬菌体做试验,呈现典型的猪种布氏菌生物型1、2和3的裂解结果。因此,牛种布氏菌544和森林鼠种布氏菌5k33产生的噬菌斑数是 10^{-4} ,而猪种布氏菌生物型4参考株大约为 10^{-3} 。

所有这些菌株全部被 10^4 RTD第比利斯噬菌体所裂解。

澳大利亚培养物的氧化代谢试验呈现出完全典型猪种布氏菌生物型3的特征。人们发现在氧化代谢上,澳大利亚菌株与猪种生物型3参考株有差别,但是这只是量上而不是质上的差别。这些苏联菌株表现出典型猪种布氏菌的代谢特点,除了独特的氧化L-天门冬酰胺外,它们还利用氨基酸、糖和尿素循环中间体。这些表明与任何已知猪种布氏菌的生物型不一致。除了很强地氧化L-天门冬酰胺外,这些菌株与猪种布氏菌生物型3最类似。

它们生长全不要求添加 CO_2 ,都不产生明显的 H_2S 。全都产生很强的尿素酶,即在 37°C 5分钟内在Christensen's琼脂上出现阳性反应。全部培养物在有1:50,000的硫堇存在的条件下生长良好。澳大利亚培养物在有1:50,000硷性复红条件下也很好生长,但苏联株被这一浓度的复红染料所抑制。所有培养物均被1:5,000的番红O、1:500,000的孔雀绿和1:100,000的甲基紫所抑制。对1:100,000的派洛宁的敏感性,与菌株的地理来源无关。

全部培养物在含有最终浓度为每毫升1毫克和每毫升2毫克的异-赤藓醇的条件下生长都很好。

用豚鼠、大白鼠、小白鼠、仓鼠(*Mesocricetus auratus*)、沙土鼠(*Meriones unguiculatus*)和库氏田鼠(*Clethrionomys glareolus*)做毒力试验,所有培养物同猪种生物型1、2、3和4参考株相比较,全都显示出高度致病性。澳大利亚和苏联培养物对仓鼠、沙土鼠和库氏田鼠有高度毒性。并在这些动物中产生比任何参考菌株高得多的死亡率或持续感染,苏联菌株对小鼠比澳大利亚或任何一个参考菌株都较毒些。虽然没有一个参考菌株对大白鼠是有毒的,但所有苏联株和澳大利亚几个培养物均可在大白鼠中引起持久的感染。对比来看,苏联和澳大利亚分离物对豚鼠的毒性要比猪种布氏菌生物型1参考株小。其它参考株在豚鼠中也未能建立起持久的感染。

总之,这些观察证实了以前的研究,即从啮齿动物分离出的澳大利亚和苏联菌株也许是猪种布氏菌。澳大利亚菌株具有轻度变异的猪种布氏菌第3生物型的一般特征。并

且可以把这种菌株看成为适应了啮齿动物的猪3型菌株。经过比较,苏联菌株不同于任何已知的猪种生物型。鉴于它们的特点,包括占优势的M表面抗原,不典型的氧化代谢表现,对啮齿动物、尤其是对Cricetidae科的高度毒性和它们在有些地理区域的流行等,似乎已达到确定一个新布氏菌生物型所需要的最低标准,而且似乎有理由把它们看作代表一种特殊的猪种布氏菌的生物型。这个生物型具有以下特点:不依赖CO₂,不产生H₂S、尿素酶强阳性反应、在1:50,000的硫堇中生长,但在1:50,000硷性复红上不生长。通常为光滑型菌落形态,被单价的M特异性抗血清凝集,但不被单价A特异抗血清所凝集。不被RTD的第比利斯或粗糙特异性噬菌体裂解,可被RTD的卫桥和Berkeley噬菌体裂解。被RTD的Firenze噬菌体部分溶解,氧化L-天门冬酰胺, L-谷氨酸, D-葡萄糖, D-吡喃木糖, i-赤藓醇、D-核糖、L-精氨酸、L-赖氨酸、DL-鸟氨酸和DL-瓜氨酸、不氧化戊五醇、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、或L-丙氨酸。常见的天然宿主是鼠和Criceti的啮齿类动物。

(魏涛译 郭幸溉校)

L型布鲁氏菌感染豚鼠的免疫状态研究

П. А. Вершилова

将强毒牛种布鲁氏菌生物型6培养在每毫升6,500单位青霉素培养基上,传十二代后得到L型菌。用该菌经腹股沟皮下给豚鼠注射10亿菌体,经30、45、60、90、120和180天后用各种血清学方法测到属于大分子和小分子的完全和不完全抗体。因此证明L型布氏菌具有抗原活性。通过细菌学研究证明该菌在豚鼠体内存在着相对稳定阶段,具有在

淋巴结局部适应的特点,并且没有表现出L型的返祖。在L型牛种布氏菌感染豚鼠六个月后,用强毒羊种布氏菌565攻毒,结果全部实验动物均得到保护,并且在感染后1~6个月的过程中,动物机体的变态反应改造是很弱的。

(王庆禧译 尚德秋校)

犬种布鲁氏菌

培养基:血清葡萄糖琼脂

赛德(Oxoid)血琼脂2号 40克
(或奥赛德血清葡萄糖琼脂)

蒸馏水 1 公升

马血清(56°C 30分钟灭活) 50毫升

25%(重量/体积)D(+)葡萄糖 40毫升

在103.5KPa高压15分钟

将奥赛德基础培养基悬浮在水里,混合10~15分钟以防止结块,温热帮助溶解,然后高压103.5KPa15分钟。当冷却至56°C时,无菌操作加入马血清和葡萄糖溶液,充分混匀,立即倒成平面(制备琼脂斜面 and 罗氏长颈瓶)。

RM6/66菌株抗原的制备*

1.将菌株接种在一些血清葡萄糖琼脂斜面并在大气环境37°C孵育24小时(时间太久易出问题)。

2.将几支斜面生长物悬浮于胰酶消化大豆肉汤(也可用灭菌蒸馏水代替),以肉眼比浊测定,制成最终浓度每毫升 $10^8 \sim 10^9$ 菌体。

3.用接近3毫升体积的这种悬液物接种到SDA(血清葡萄糖琼脂)的罗氏长颈瓶。将琼脂层颠倒放置孵育在大气中37°C26小时。

4.对每个瓶培养物做纯菌检查和革兰氏染色涂片镜检。

5.收获时,加10~15毫升灭菌蒸馏水和少许玻璃珠,然后摇动长颈瓶至菌体都变成悬浮物。

6.在60°C加热1小时以杀灭悬浮物中的细菌。

7.将悬浮菌液通过纱布过滤到消毒的离心瓶中,在20,000g离心10~15分钟。再悬浮在无菌水中和重复离心。

8.重复7的离心过程至细菌用无菌水洗过5次。

9.再悬浮沉淀在三-顺丁烯二酸盐缓冲液至最后得到一个象SAT(血清凝集试验)抗原浓度一样的混浊度。

10.以三-顺丁烯二酸盐缓冲液作1/10~1/200稀释。在分光光度计上以空白的缓冲液对照,读光学的密度为450nm的数值,计算稀释至一个3.30 OD的稀释度。

11.放在一个琥珀玻璃瓶贮存在4°C备用(可以冻干)。

三-顺丁烯二酸盐缓冲液的配制(pH 9.0, 0.4克分子/公升):

A溶液:

三-(羟甲基)氨基甲烷 242克

马来酸(顺式丁烯二酸) 232克

溶解在蒸馏水中使最后体积成1公升。

B溶液:

溶解氢氧化钠200克于蒸馏水中成1公升。

混合A溶液200毫升和B溶液150毫升,蒸馏水稀释至1公升。

按血清凝集反应常规操作进行(如牛种布鲁氏菌),但用犬种抗原时,稀释液应当用三-顺丁烯二酸盐缓冲液。

虎红抗原的生产

1.培养接种和洗抗原方法同血清凝集试验抗原。

2.细菌悬浮在蒸馏水中,浓度为每立升125克(湿重)。加热60°C灭活1小时。

3.悬浮液加入适当体积的蒸馏水使之调整到近似6%(重量/体积)。

*记住:犬种菌是致病菌。

4. 配一个1% (重量/体积) 虎红水溶液, 加成6毫升/100毫升比率的悬浮液。

5. 染色的细菌保留4°C过夜后10,000g离心10分钟。

6. 沉淀的细菌悬浮在三-顺丁烯二酸盐缓冲液, 离心洗两次。

7. 悬浮在缓冲液中, 用纱布层粗滤, 调整到6% (重量/体积)。可在温特罗布氏管 (译者注: Wintrobe管即血沉淀管) 以1600g离心40分钟沉淀测得菌浓度。

8. 抗原放在一个琥珀玻璃瓶中保存在4°C (或者冻干)。

犬种布鲁氏菌兔抗血清的生产

1. 将犬种布鲁氏菌接种在一些罗氏长颈瓶内, 象前述血清凝集试验抗原1~8的步骤制备抗原。

2. 以3,000g离心20分钟得到细菌。

3. 从2收集上清液, 以60,000g离心6小时得抗原菌并丢弃上清液。

4. 混合上述2和3的沉淀细菌。

5. 沉淀物重新悬浮在0.15克分子/公升氯化钠20个体积内, 反复冻融。冷藏R型抗原溶液在4°C至需用时。

6. 乳状抗原溶液加入一个相等体积的福氏(Freund)不完全佐剂。

7. 注射6只家兔 (生产300~400毫升血清)。用乳状液2毫升在左侧皮下4个位置注入。七天后重复在右侧注射。

8. 四星期后放血, 每只家兔单独收集血清。

9. 测定所得血清的特异性和效价。假如有牛种布鲁氏菌的抗体存在, 则应作吸收除去。

(吴从雅译 陆士良校)

从牛分离的一株细胞壁有缺陷的牛种 布鲁氏菌变种的特性

M. J. Corbel等

本文介绍从一只屠宰的布病病牛淋巴结中分离到一株非典型布氏菌株的特性。其为革兰氏阴性、呈多形态性 (球状、球杆状、短小杆状、分枝状和不规则形态)。用家兔制备的抗粗糙型和光滑型牛种布氏菌血清的荧光抗体检查为阳性。产生卵磷脂酶, 至少

需要15%的马或牛血清才能生长, 不需要CO₂, 产生H₂S。布氏菌染料、噬菌体可抑制其生长, i-赤藓醇能部分抑制其生长。对豚鼠、小白鼠不致病, 主要能激发粗糙型布氏菌抗原产生抗体。

(王庆禧译 尚德秋校)

布鲁氏菌属的分类近况

M.J. Corbel等

目前对布氏菌属的分类是根据1963年国际细菌学命名委员会的布氏菌分类委员会分会所介绍的方法进行的,并在以后的报告中进行了补充。本分类方案是为了解决由常规鉴定方法(包括布氏菌株对二氧化碳的需要、硫化氢的产生、对染料的敏感性以及对单相特异性抗血清凝集反应)将布氏菌鉴定为羊种布氏菌、牛种布氏菌和猪种布氏菌所提出的问题而制定的。应用噬菌体裂解试验和作用于酶底物的氧化代谢试验方法有助于解决布氏菌在分类上存在的问题。而且由这两种方法鉴定的菌种与其流行病学资料是一致的。因而在目前,噬菌体裂解试验和氧化代谢试验已作为布氏菌种别鉴定的主要方法,而常规试验则是鉴定生物型的试验方法。

关于对布氏菌属鉴定所采用的标准,在国际细菌学分类委员会布氏菌分类委员会分会所介绍的方法中已作了说明。在鉴定时,首先要对待鉴定菌株作形态学以及有关培养、代谢及血清学特性的检查。而对于非典型分离物的鉴定,根据测定脱氧核糖核酸嘌呤-嘧啶碱基的构成和核苷酸的顺序,用电泳分离测定用酚-醋酸获得的可溶性蛋白的电泳图谱,以及对细胞色素a、c带的吸收光谱和测定与参考菌株是否有共同的细胞内抗原成分的存在才能确定。另外,因为作为布氏菌结构中的脂酸能一定程度上反映布氏菌特征的一个侧面,所以用气-液色谱测定脂肪酸甲酯可作为一种辅助性的鉴定方法。

噬菌体裂解试验和氧化代谢试验均可用于布氏菌种别的鉴定,而且由于噬菌体裂解试验对布氏菌是特异的,因而本试验也可作为细菌属别的鉴定。鉴定布氏菌的常规试

验包括菌株对二氧化碳的需要、对染料的敏感性、硫化氢产生、尿素酶活性和与单相特异性抗血清凝集反应的检查。这些试验方法在对种别的鉴定上具有辅助检查并还可用于主要布氏菌种即牛种、羊种和猪种布氏菌生物型的鉴别。现将布氏菌属及其种的特征描述如下:

布氏菌为微小的无动力的革兰氏阴性球菌、球杆菌或短杆菌,其形态为棒状或表面稍凸起,其宽为 $0.5\sim 0.7\mu\text{m}$,长 $0.6\sim 1.5\mu\text{m}$ 。多见单个排列,少数成对,短链状或串状排列,不形成荚膜、芽胞或鞭毛。通常不呈现双极着色,不耐酸。但当采用Macchiavello或改良的Köster染色法时,布氏菌可抗弱酸或弱碱的脱色作用。

布氏菌为需氧菌。但许多菌株在生长时需要增加 CO_2 的含量($5\sim 10\%$),尤其在初代分离时。布氏菌具有完整的营养需求。它们的需要包括复合的氨基酸、硫胺(VB_1)、烟酰胺(V_{pp})、生物素和镁。有些菌株生长时需要血清或其他胶体物质,但不需要氧化高铁血红素(X因子)和烟酰胺腺嘌呤、二核苷酸(V因子)。除沙林鼠种布氏菌、绵羊附睾种布氏菌和一些牛种布氏菌菌株外,通常含有过氧化氢酶和氧化酶。除沙林鼠种布氏菌外,在常规培养基上不发酵糖,但能氧化各种氨基酸和糖。通常除牛种布氏菌外,能还原硝酸盐为亚硝酸盐。它们能不同程度的水解尿素。

不同种别和生物型的布氏菌产生 H_2S 的量不同。不利用柠檬酸盐作为所需碳的唯一来源。不产生吲哚。甲基红试验和VP反应为阴性。不液化明胶和不溶解红血球。石蕊

奶或者无变化或者变为碱性。

布氏菌所需的温度为20~40°C, 而最适温度为37°C。最适pH为6.6~7.4。最适渗透压为2~6个大气压(0.05~0.15克分子浓度的氯化钠液)。

电子传递系统包括细胞色素a、a₃、b和o。不同种别布氏菌对不同种的噬菌体其敏感性是不同的。而且用气-液色谱法测定布氏菌的脂肪酸, 因为甲基酯存在反映了一定结构的特点。不同种别的布氏菌抗原经圆盘电泳表明, 溶于酚-醋酸液的可溶性结构蛋白质是菌属共有的特异性蛋白质。光滑型和非光滑型菌株间主要的表面抗原区别较大, 但对某些细胞内抗原成分所有菌株都是共有的, 具有菌属的特异性。

脱氧核糖核酸中的鸟嘌呤(G)+胞嘧啶(C)碱基对含量为56~58克分子%。在杂交研究中脱氧核糖核酸多核苷酸顺序为90%表现出同源性。

由于布氏菌具有在细胞内寄生的特点, 因而在动物中引起广泛传播。

布氏菌属各种与生物型特性已列入于表1、2中。

布鲁氏菌种别

1. 羊种布氏菌: 不需要CO₂。在蛋白胨培养基上不产生硫化氢, 或产量极微。通常能在含有碱性复红或硫堇的培养基上生长。分解尿素。光滑型菌株与M、A或A和M单相特异性血清发生凝集, 这与其生物型相关。不被常规稀释度(RTD)或10⁴常规稀释度(10⁴RTD)的Tb、Fi或Wb噬菌体所裂解。但光滑型培养物能被RTD和10⁴RTD的Bk₂噬菌体裂解。

能氧化L-丙氨酸, L-天门冬酰胺, L-谷氨酸, D-葡萄糖和i-赤鲜醇。不氧化L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-核糖, D-木糖, L-精氨酸, DL-瓜氨酸, DL-鸟氨酸, 或L-赖氨酸。

联合国粮农组织与世界卫生组织(FAO/WHO)的羊种布氏菌新种和生物型参考菌株如下:

羊种布氏菌16M(生物型1)英国编号10094, 美国编号23456。

羊种布氏菌63/9(生物型2)英国编号10508, 美国编号23457。

羊种布氏菌Ether(生物型3)英国编号10509, 美国编号23458。

2. 牛种布氏菌: 通常生长需增加5%二氧化碳, 尤其在初代分离时。通常分解尿素, 产生中等量的硫化氢, 但有些菌株可以不产生。通常在碱性复红培养基中生长, 有些生物型也能在硫堇培养基中生长, 而有些可被这两种染料所抑制。光滑型菌株可能有A、M或A和M表面抗原, 能与单相特异性抗血清发生凝集, 这与其生物型相关。

光滑型或中间型培养物可被RTD的Tb、Fi Wb和Bk₂噬菌体裂解, 而非光滑型培养物则可被RTD的R/C噬菌体所裂解。

可氧化L-丙氨酸, L-天门冬酰胺, L-谷氨酸, L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-葡萄糖, D-核糖和i-赤鲜醇。而不氧化D-木糖, L-精氨酸, DL-瓜氨酸, DL-鸟氨酸或L-赖氨酸。

通常对牛致病, 引起流产; 也能感染其他种的家畜(包括绵羊、山羊、骆驼、牦牛、水牛、马、犬)和人。

FAO/WHO的新种和生物型参考菌株如下:

牛种布氏菌544(生物型1)英国编号10093, 美国编号23448。

牛种布氏菌86/8/59(生物型2)英国编号10501, 美国编号23449。

牛种布氏菌Tulya(生物型3)英国编号10502, 美国编号23450。

牛种布氏菌292(生物型4)英国编号10503, 美国编号23451。

牛种布氏菌B3196(生物型5)英国编号

10504, 美国编号23452。

牛种布氏菌870 (生物型6) 英国编号

10505, 美国编号23453。

牛种布氏菌63/75(生物型7)英国编号

10506, 美国编号23454。

牛种布氏菌C68(生物型9)英国编号

10507, 美国编号23455。

牛种布氏菌生物型8不再被人们承认。

表1

布氏菌属种的分类

种	常规稀释度噬菌体						氧 化 基 质												最常见宿主	
	Tb	Wb	Fi	Bk ₂	R/O	R/C	L-丙氨酸	L-天门冬酰胺	L-谷氨酸	L-阿拉伯糖	D-半乳糖	D-核糖	D-葡萄糖	D-木糖	L-精氨酸	DL-瓜氨酸	DL-鸟氨酸	L-赖氨酸		i-赤鲜醇
牛 种•	L	L	L	L	PL	NL	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	+	牛
羊 种•	NL	NL	NL	L	NL	NL	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	山羊、绵羊
猪 种•1	NL	L	PL	L	NL	NL	±	-	-	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	猪
2	NL	L	PL	L	LN	NL	-	±	±	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	猪、野兔
猪种•3	NL	L	PL	L	NL	NL	±	-	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	猪
4	NL	L	L	L	NL	NL	-	-	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	驯鹿
未分类	NL	L	L	L	NL	NL	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	鼠*
沙林鼠种	PL	L	L	L	NL	NL	±	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-	-	+	沙漠森林鼠
绵羊附 睾种	NL	NL	NL	NL	L	L	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	绵羊
小猎犬种	NL	NL	NL	NL	NL	L	±	-	+	±	±	+	+	-	+	+	+	+	±	狗

注: + = $QO_2N > 50$; - = $QO_2N < 50$; ± = QO_2N 不恒定; NL = 不裂解, PL = 部分裂解; L = 裂解; *光滑型菌; *包括鼠亚科和朝鲜鼠亚科啮齿动物。

3. 猪种布氏菌: 不需要 CO_2 。能迅速水解尿素。产生大量硫化氢或完全不产生, 这取决于生物型。能在硫堇培养基上生长, 但通常被碱性复红所抑制, 而有些菌株可在含有这两种染料培养基中生长。光滑型菌株通常与A单相特异性抗血清发生凝集, 而有些菌株可以与M或A和M单相特异性抗血清发生凝集, 这取决于生物型。光滑型菌株不被RTD的Tb噬菌体裂解, 但对于 10^4 RTD的Tb噬菌体以及RTD的Wb和Bk₂噬菌体, 猪种菌能被裂解, 而只能部分地被 10^4 RTD的Fi噬菌体裂解。能氧化D-核糖, D-葡萄糖, i-赤鲜醇, D-木糖, L-精氨酸, DL-瓜氨酸和DL-鸟氨酸。通常不氧化L-丙氨酸或L-天门冬酰胺。而对L-赖氨酸, L-谷氨酸, L-阿拉伯糖和D-半乳糖的氧化能力视不同生物型而异。

通常猪种菌除生物型4对驯鹿致病外, 其余生物型都对猪致病。也可以感染其他种类的动物(包括野兔, 啮齿动物、狗)和人。

FAO/WHO的新型和生物型的参考菌株如下:

猪种布氏菌1333(生物型1), 英国编号10316, 美国编号23444。

猪种布氏菌Thomsen(生物型2), 英国编号10510, 美国编号23445。

猪种布氏菌686(生物型3), 英国编号10511, 美国编号23446。

猪种布氏菌40(生物型4), 英国编号11364, 美国编号23447。

4. 沙林鼠种布氏菌: 不需要 CO_2 。产生硫化氢。能迅速分解尿素。在碱性复红培养基上不生长, 但能在硫堇培养基(1:150,000)

中生长。光滑型菌株有A表面抗原能与单相特异性抗血清发生凝集。光滑型菌株能被RTD的Tb噬菌体部分地裂解,能被10⁴RTD的Tb噬菌体完全裂解。也能被RTD的Fi, Wb和Bk₂噬菌体裂解。在蛋白胨培养基中可分解D-葡萄糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖和D-木糖, 产酸。能氧化L-天门冬酰胺, L-谷氨酸, L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-葡萄糖, i-赤鲜醇和D-木糖。不氧化L-丙氨酸, L-精氨酸, DL-瓜氨酸, DL-鸟氨酸或赖氨酸。而对D-核糖的氧化不恒定。本菌在英国西部的沙漠森林鼠间引起感染。但能否引起其他种动物感染现尚不清楚。

FAO/WHO的参考菌株:

沙林鼠种布氏菌5K33, 英国编号10084, 美国编号23459。

本种菌现尚未发现其它生物型。

5. 绵羊附睾种布氏菌: 生长需要增加5~10%的CO₂。不产生硫化氢。通常不水解尿素, 但有些菌株在培养后7天可见轻度反应。在碱性复红和硫堇培养基上生长。不分解硝酸盐。不存在光滑型培养物, 即在初代分离时就是粗糙型。与A和M单相特异性抗血清不发生凝集。但能与抗粗糙型血清发生凝集。与犬种和其他非光滑型布氏菌发生交叉反应。不被任何浓度的Tb、Fi、Wb或Bk₂噬菌体裂解, 但能被RTD的R/C噬菌体裂解。能氧化L-丙氨酸, L-天门冬酰胺和L-谷氨酸。不氧化L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-葡萄糖, D-核糖, i-赤鲜醇, D-木糖, L-精氨酸, DL-瓜氨酸, DL-鸟氨酸或赖氨酸。尤其能氧化核糖醇, 这对于沙林鼠种和绵羊附睾种布氏菌的鉴定是有用的, 因为它们对这个基质的氧化活性在布氏菌属中是唯一相一致的两个种。

对绵羊的致病性是引起公绵羊患附睾炎和母羊流产。

对其他种动物能否引起感染现尚不清楚。

FAO/WHO参考菌株:

绵羊附睾种布氏菌63/290, 英国编号10512, 美国编号25840。

本种菌现尚未发现其生物型。

6. 小猎犬种布氏菌: 不需要CO₂。能迅速水解尿素。不产生硫化氢。通常还原硝酸盐, 但有些菌株不能还原。通常能在硫堇培养基中生长, 但不能在碱性复红培养基中生长。在初代分离时总是粗糙型或粘液型菌。与抗A和M抗原的单相特异性血清不发生凝集, 但能与抗R抗原的血清发生凝集。与绵羊附睾种布氏菌和其他非光滑型布氏菌在血清学上存在交叉反应。不被任何浓度的Tb、Fi、Wb, Bk₂噬菌体裂解, 能被RTD的R/C噬菌体裂解。能氧化D-核糖, D-葡萄糖, L-精氨酸, DL-瓜氨酸, DL-鸟氨酸和L-赖氨酸。不氧化L-丙氨酸, L-天门冬酰胺, L-谷氨酸, L-阿拉伯糖, D-半乳糖或D-木糖。对i-赤鲜醇的氧化不恒定。

小猎犬种菌可使公狗患睾丸、附睾炎和使母狗患子宫炎和流产。对人也有感染性。

FAO/WHO参考菌株:

小猎犬种布氏菌RM6/66, 英国编号10854, 美国编号23365。本种菌现尚未发现其生物型。

布鲁氏菌的分型

由于布氏菌对人有感染性, 因此对布氏菌培养物的检查应该具备一定的设备条件并由技术熟练的人员操作, 以防发生意外感染。另外, 在携带布氏菌株时, 为安全起见, 必须有特殊规定。

在大多数情况下, 在从事调查研究或对布氏菌进行确诊过程中, 所分离的布氏菌属的培养物经涂片后用革兰氏染色法镜检, 并对血清葡萄糖琼脂或类似培养基上的菌落形态进行观察, 若为光滑型菌落则与光滑型布氏菌抗血清发生凝集, 若为粗糙型菌落则与粗糙型布氏菌抗血清发生凝集, 同时做噬菌

体裂解试验。根据这些试验结果,可很容易对本菌属作出鉴定。其后做常规试验,则很容易对布氏菌属的种别和生物型作出鉴定结果。

表2 布氏菌属生物型的分类

种	生物型	CO ₂ 需要	H ₂ S产生	在染料培养基上生长 ^①		与单相特异血清凝集			
				硫堇	碱性复红	A	M	R	
牛种	1	(+) ^②	+	51	+	+	-	-	
	2	(-)	+	-	-	+	-	-	
	3 ^③	(+)	+	+	+	+	-	-	
	4	(+)	+	-	(+)	-	+	-	
	5	-	-	+	+	-	+	-	
	6 ^③	-	(-) ^②	+	+	+	-	-	
	7	-	(+)	+	+	+	+	-	
	9	-	+	+	+	-	+	-	
	10	-	-	+	+	-	+	-	
羊种	1	-	-	+	+	-	+	-	
	2	-	-	+	+	+	-	-	
	3	-	-	+	+	+	+	-	
猪种	1	-	+	+	(-)	+	+	-	
	2	-	-	+	+	+	-	-	
	3	-	-	+	+	+	-	-	
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	
未分类	1	-	-	+	-	-	+	-	
	2	-	+	-	④	-	+	-	
	3	-	-	+	-	-	+	-	
沙林种		-	-	+	(-)	-	-	+	
绵羊附睾种		+	-	+	(-)	-	-	+	
小猎犬种		-	-	+	(-)	-	-	+	

注: ①浓度=1/5万(重量/体积); ②(+)=大多数菌株阳性; (-)=大多数菌株阴性; ③应用1/2.5万的硫堇培养基牛种菌生物型3和6有非常明显的区别,生物型3=阳性; 生物型6=阴性; ④在1/15万的硫堇培养基上能生长。

这些方法简便且在有一般细菌学设备和有必要安全设备的实验室就能够完成。相反,氧化代谢试验不适合作为常规鉴定方法。因

为开展本试验,需要有贵重的仪器,并由受过培训的人员进行操作,且试验中有一定的危险性,同时也是很耗时间的一种试验方法。氧化代谢试验最好在对这些方法有经验的参考中心实验室完成。现已有人介绍了一种比氧化代谢试验更为简便且能半定量测定氧化代谢活性的薄层层析法。这种方法比测压技术方法容易操作、安全且所需设备简单。这两种方法所获得的实验结果并非总是一致的。但是这种方法不同于测压试验方法,它不受非氧化基质分解的影响。总之,根据薄层层析法测定利用基质情况已证明适用于布氏菌种别的鉴定。

氧化代谢试验对非典型培养物(例如对通常所分离的很少见的抗噬菌体型光滑型菌及由光滑型菌变异而来的非光滑型菌)的鉴定具有十分重要的意义。而对总是非光滑型的绵羊附睾种及小猎犬种布氏菌,目前是应用噬菌体裂解和常规试验进行鉴定的。

建议国家布病中心对于本国所分离的培养物应用噬菌体试验及常规试验仔细地进行检查。对于所确定的菌型不一致或是从异常宿主中分离的菌株应在分离后尽快地冷冻干燥或真空干燥保存。

在分离到一定数量的且很可能具有一定流行病学意义或特殊价值的类似培养物时,联合国粮农组织和世界卫生组织参考中心应当给予足够的重视,并应着手制定有关布氏菌培养物在国家间运送时应遵守的制度。完善的初步鉴定的实验结果资料、来源和历史都应与培养物一起作国际间交流。

(杨莲芬译 尚德秋校)