

# 两株非典型羊种布鲁氏菌的鉴定报告

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 李元凯 程尧章 曹珏

**提要** 本文报告了应用常规试验方法难以定种的两株非典型布氏菌株,而应用六群布氏菌噬菌体的代表株裂解试验和氧化代谢试验鉴定为变异深刻的羊种布氏菌。

**关键词** 布鲁氏菌 噬菌体敏感试验 氧化代谢试验

在布鲁氏菌的分类鉴定中,其常规方法是可以将大部分布鲁氏菌正确鉴定出种、型来。但是,有一部分变异深刻的非典型布氏菌株确难以定种。近年来由于临床上广泛应用抗菌素和其他各种因素的影响,至使分离到的布氏菌非典型株日趋增多,正确地鉴定其种、型可为布氏菌病的防治提供可靠依据。因而就需要应用较特殊的技术方法来进行鉴定。现就我们收集到的两株非典型布鲁氏菌用六群噬菌体裂解试验及氧化代谢试验等手段参考常规鉴定方法,给以正确的分类。现将鉴定结果报告如下:

## 材料与方 法

一、待检菌株:83062绵羊流产物中分离,83063人血中分离(均由内蒙古地方病所提供)。

二、参考菌株:16M、544A、1330S 国际标准菌株,为本室冻干保存。

三、六群噬菌体代表株:Tb、Wb、Fi75/13、Bk<sub>2</sub>、R、R/O、R/C为本室增殖保存。Iz噬菌体由M.J. corbel 1985年提供,后经本室增殖并保存。

四、常规鉴定方法<sup>[1]</sup>:其项目有菌落形态,涂片染色镜检,CO<sub>2</sub>的需要,H<sub>2</sub>S的产生,A、M、R单项血清凝集,染料抑菌试验等。

五、六群噬菌体鉴定方法:主要参考M.J. Corbel等的《布鲁氏菌噬菌体分种》等文献<sup>[2~5]</sup>推荐的方法进行。

六、氧化代谢试验方法:按《布鲁氏菌病实验研究技术》等<sup>[1,6,7]</sup>介绍的方法进行。

## 结 果

### 一、常规法鉴定:

1.菌落形态及染色:在肝琼脂培养基上生长的单个菌落呈半透明状、圆形、稍有隆起、以后渐变混浊、涂片染色镜检为革兰氏阴性的球杆菌;柯兹罗夫斯基染色呈红色球杆菌。

2.不需要CO<sub>2</sub>,不产生H<sub>2</sub>S。

3.染料抑菌试验:在含有1/5万、1/10万的硫堇培养基中和在含有1/5万、1/10万的碱性复红中均可生长。

4.单项因子血清凝集:这两株菌均不与抗“A、M”单项血清凝集,而与抗“R”血清发生凝集,在盐水中发生自凝。

5.三胜黄素变异试验为阳性(表1)。

从表1可见,用常规法鉴定难以定种。

二、六群布氏菌噬菌体裂解试验:这两株菌均不被RTD浓度的Tb、Wb、Fi、Bk<sub>2</sub>、R、R/O、R/C所裂解,而被10<sup>4</sup>RTD Bk<sub>2</sub>、R所裂解,产生不融合性噬斑,并可被Iz噬菌体完全裂解,这一结果可能证实该菌是粗糙羊种或粗糙猪种菌(表2)。

三、氧化代谢试验:根据多次反复测定,该两株菌均可利用第一组的氨基酸基质,其代谢类型与羊种布鲁氏菌的代谢类型相似(表2)。

从表2结果可看出,上述两株菌均为变异较深刻的羊种布鲁氏菌。

表 1 两株布氏菌常规试验鉴定结果

| 菌株    | 需要<br>CO <sub>2</sub> | 产生<br>H <sub>2</sub> S | 染料抑菌试验 ( / 万 ) |     |   |   |   | 因子血清 |   | 抗R血清 | 变异试验 |
|-------|-----------------------|------------------------|----------------|-----|---|---|---|------|---|------|------|
|       |                       |                        | 硫              | 堇   |   | 复 | 红 | A    | M |      |      |
|       |                       |                        |                | 2.5 | 5 |   |   |      |   |      |      |
| 16M   | -                     | -                      | -              | +   | + | + | + | -    | + | -    | -    |
| 544A  | -                     | +                      | -              | -   | - | + | + | +    | - | -    | -    |
| 1330S | -                     | +                      | +              | +   | + | - | - | +    | - | -    | -    |
| 83062 | -                     | -                      | -              | +   | + | + | + | -    | - | +    | +    |
| 83063 | -                     | -                      | -              | +   | + | + | + | -    | - | +    | +    |

表 2 两株布氏菌应用噬菌体裂解试验及氧化代谢试验鉴定结果

| 菌<br>株 | 噬菌体裂解试验* |    |    |                 |    |     |     | 氧化代谢试验**         |                            |                  |                   |                   |                  |                       | 鉴定<br>结果 |                  |             |             |
|--------|----------|----|----|-----------------|----|-----|-----|------------------|----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------------|----------|------------------|-------------|-------------|
|        |          |    |    |                 |    |     |     | L<br>丙<br>氨<br>酸 | L<br>天<br>门<br>冬<br>酰<br>胺 | L<br>谷<br>氨<br>酸 | DL<br>鸟<br>氨<br>酸 | DL<br>瓜<br>氨<br>酸 | L<br>赖<br>氨<br>酸 | L<br>阿<br>拉<br>伯<br>糖 |          | D<br>半<br>乳<br>糖 | D<br>木<br>糖 | D<br>核<br>糖 |
|        | Tb       | Wb | Fi | Bk <sub>2</sub> | R  | R/O | R/C | Iz               |                            |                  |                   |                   |                  |                       |          |                  |             |             |
| 16M    | -        | -  | -  | +               | -  | -   | -   | 88               | 126                        | 101              | 16                | 8                 | 20               | 1                     | 6        | 6                | 8           | 羊           |
| 544A   | +        | +  | +  | +               | -  | -   | -   | 59               | 74                         | 59               | 17                | 16                | 8                | 87                    | 190      | 41               | 157         | 牛           |
| 1330S  | -        | +  | -  | +               | -  | -   | -   | 13               | 11                         | 8                | 34/93             | 36/89             | 29/84            | 136                   | 76       | 70               | 120         | 猪           |
| 83062  | -        | -  | -  | -*              | -* | -   | +   | 69               | 62                         | 36/52            | 0                 | 0                 | 37               | 21                    | 47       | 25               | 0           | 羊           |
| 83063  | -        | -  | -  | -*              | -* | -   | +   | 73               | 83                         | 16/48            | 41                | 28                | 44               | 30                    | 42       | 7                | 38          | 羊           |

\* 用RTD, \* 为10<sup>4</sup>RTD产生不融合噬斑;

\*\* 数字为1小时的QO<sub>2</sub>(N)值, 分子为1小时QO<sub>2</sub>(N)值, 分母为2小时QO<sub>2</sub>(N)值

### 分析与讨论

根据菌落形态、染色特性及单项血清凝集试验结果判定该两株菌可能是非典型粗糙布氏菌。

应用六群布鲁氏菌噬菌体裂解试验, 这两株菌均可被RTD的Iz噬菌体完全裂解, Iz噬菌体是最近印度从羊流产材料中分离到的新噬菌体株, 命名为Izatnagar(Iz)其宿主范围可裂解光滑型、光滑-中间型和中间型牛种, 沙林鼠种, 羊种和猪种布氏菌。它也可裂解粗糙型、粘液型羊种和猪种布氏菌, 对于绵羊副睾种和粗糙型牛种及犬种布氏菌很少有裂解活性。Iz噬菌体对于83062、83063两株粗糙型布氏菌可产生完全裂解噬斑, 虽然这两株菌在10<sup>4</sup>RTD的条件下也被R噬菌体部分裂解, 但它们不是粗糙牛种, 因为可被Iz噬菌体裂解。因此, 该两株菌可认为是粗糙型羊种或猪种布氏菌。而

这两株菌在10<sup>4</sup>RTD浓度下, BK<sub>2</sub>噬菌体也产生不融合性噬斑, 而在10<sup>4</sup>RTD的Wb噬菌体不产生噬斑, 这就提示我们这两株菌可能是变异较深刻的, 但仍然残留有BK<sub>2</sub>噬菌体受体的羊种布氏菌。

通过氧化代谢试验也可以看出这两株菌的代谢类型与羊种菌的代谢类型相似。应用氧化代谢试验对布氏菌属进行种的鉴定早在1962年第八届国际微生物学会议布鲁氏菌命名委员会就推荐了。1970年WHO提出分类鉴定表中增加7种代谢基质, 并将这些基质分为三组, 第一组包括L-丙氨酸、L-天门冬酰胺、L-谷氨酸; 第二组是由几种参予尿素循环的氨基酸组成包括DL-鸟氨酸、DL-瓜氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸; 第三组包括四种糖类: L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-核糖、D-木糖。通过细菌对这三组性质不同的基质的利用情况, 可将布氏菌属的6个种均能区别开来, 如羊种布氏菌

可氧化第一组的基质而牛种菌可氧化一、三组基质，猪种菌的特点可利用第二组的基质。而我们鉴定的菌株，83062利用第一组基质的 $QO_2$  (N)值均在50以上，而83063株除利用第一组基质外对第二组、第三组的某些基质也似乎可利用。试验中我们又延长细菌与基质的作用时间。结果第一组基质继续氧化，而第二组的DL-鸟氨酸，DL-瓜氨酸仍未超过50。

氧化代谢试验对于鉴定非典型布氏菌培养物是有很大大意义的，布氏菌株因受到外界环境的影响而发生某些特性的改变，但其代谢类型改变甚微，所以应用这一技术就可以将发生变异的菌株进行鉴定。

到目前为止，噬菌体裂解试验和氧化代谢试验已作为布氏菌种的鉴定主要方法，常规试验方法，则是鉴定生物型的试验方法。

A Study of Identification on Two Atypical Strains of *Brucella melitensis* Li Yuankai, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

This paper reports that two atypical strains of *Brucella melitensis* can be difficultly assigned to one of the typical biovars by using the routine methods. However we identified them as two deep going variants of *B. melitensis* by using *Brucella* phages and Oxidative metabolic tests.

Key words *Brucella* Phages sensitivity test Oxidative metabolic test

参 考 文 献

1. 中国医学科学院流行病学微生物学研究所布病室编. 布鲁氏菌病实验研究技术. 北京: 中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 1983: 15.
2. Corbel MJ. Phage typing of *Brucella*. *Methods in Microbiology* 1984; 16: 23.
3. 李元凯, 等. 布鲁氏菌噬菌体不同增殖法的比较及在布鲁氏菌属分类鉴定中的应用. *中国地方病杂志* 1985; 4(2): 130.
4. Corbel MJ. Recent advances in *Brucella*-phage research. *Veterinary Bulletin* 1984; 54(2-3): 65.
5. WHO. FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Geneva: WHO, 1986: 9.
6. 杨莲芬, 等. 布鲁氏菌氧化代谢的初步观察. *中华流行病学杂志* 1981; 2(3): 185.
7. Meyer ME. Metabolic characterization of the genus *Brucella*. *J Bact* 1961; 82: 401.

(本文承尚德秋副研究员审阅, 谨此致谢)

儿 童 血 压 与 钠 的 关 系

中国医学科学院阜外医院 张开华 刘力生 张秀娥 首钢医院 林美清 桂瑞玲 杜家惠

钠盐与高血压的关系已引起人们的关注。通过尿钠测定以估计钠摄入量已被公认是可行的调查方法。我们于1984年及1985年4月对首钢两所幼儿园四个全托班3~6岁正常儿童共135名(男74, 女61)进行了24小时尿钠、钾、钙、肌酐及血压、心率、身高和体重的调查, 其中一组88名儿童留三次非连续24小时尿标本, 二组47名儿童留一次24小时尿标本, 留尿当日同时进行食物记录, 测量血压及一分钟心率, 一周内测量身高和体重。尿钠、钾、钙测定用火焰光度计法, 肌酐测定用付林吴氏法。

结果示两组儿童平均24小时尿钠为 $88.5 \pm 37.1$  mEq(相当于5.2克氯化钠)、钾 $15.5 \pm 6.8$  mEq, 钠/钾为 $6.1 \pm 2.0$ , 钙 $2.0 \pm 1.7$  mEq、肌酐 $223.1 \pm 89.3$ 毫克; 平均收缩压为 $91.3 \pm 5.0$  mmHg, 舒张压(第4音)为 $52.9 \pm 7.7$  mmHg, 心率 $101.9 \pm 14.7$ 次/分, 身高 $102.1 \pm 6.5$ 厘米, 体重 $17.4 \pm 2.0$ 公斤。对一组88名

儿童平均24小时尿钠等电解质与血压进行单因素相关分析显示尿钠与舒张压(第4音)成正相关(相关系数=0.2316,  $P < 0.05$ ), 收缩压与钠无相关, 血压与尿钾、钙、身高、体重等无相关。

根据三天食物记录分析, 两组儿童食物中的钠有46~63%来源于烹调用食盐, 20~49%来源于烹调用酱油, 其余部分来源于副食。由于饮食习惯不同, 每人每天摄钠量差别较大。我国12个省市3105名成人调查平均24小时尿钠排泄为192.7~432.8 mEq(相当于氯化钠11.3~25.3克), 我们调查的3~6岁年龄组儿童尿钠较低于我国成人, 且血压均在相应年龄组第90百分位数以下, 但已显示舒张压与钠阳性相关。基于上述发现, 我们认为世界卫生组织建议每人每天吃盐限制在70~100 mEq(相当于氯化钠4~5.8克)是合理的, 自儿童时期开始养成低钠饮食习惯, 对预防成人高血压的发生可能有益。