

# 布鲁氏菌氧化代谢试验的初步观察

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

杨莲芬 程尧章 姜顺求 王庆禧

目前所使用的布鲁氏菌分种分型的常规方法, 仅能确定大多数典型菌株, 难于确定非典型菌株。

1961年Meyer曾用11种氨基酸和7种碳水化合物测定了600多株布氏菌的氧化活性<sup>[1,2]</sup>, 表明不仅牛、羊和猪3个种的布氏菌的代谢类型有明显区别, 且对难于定种的菌株, 通过氧化代谢试验可给予归类<sup>[2,3]</sup>。同时Meyer推荐把这项试验作为布氏菌的分类鉴定方法之一<sup>[4]</sup>。1962年世界卫生组织将此项试验列入布氏菌的分类鉴定表<sup>[4]</sup>。目前国外一些实验室已将氧化代谢试验用于布氏菌的分类鉴定<sup>[1,4,5]</sup>。尤其用来测定六十、七十年代分离的其中包括非典型菌株的氧化代谢活性<sup>[4,5]</sup>。为了系统地开展分类鉴定工作, 从而查清我国布氏菌菌种菌型分布特点, 我们初步建立了本试验方法。并对牛、羊和猪3个种的7个生物型标准菌株和国内分离的15株布氏菌的氧化代谢活性作了测定, 结果如下。

## 材料和方法

一、菌株及静息细胞悬液的制备: 待测布氏菌37°C培养一定时间后, 用1/15M pH7.0的磷酸缓冲液(PB)或生理盐水洗下培养物, 以4000转/分离心15分钟, 洗涤3次, 末次沉淀物用相同溶液配成一定浓度的静息细胞悬液。

二、基质及试剂的配制: 使用的基质有以下11种。

L-Glutamate(左旋谷氨酸), 上海中国新中化学厂股份有限公司出品, 批号540105。

L-Alanine(左旋氨基丙酸), 上海生物化学制药厂出品, 批号601030。

L-Lysine(左旋赖氨酸盐酸盐), 一种由匈牙利进口, 北京市医药公司化学试剂科分

装, 批号760513; 一种是中国科学院上海生物化学研究所出品, 批号770940。

L-(+)-Arabinose(左旋阿拉伯糖), F-luka出品, 中国医药公司上海化学试剂采购供应站分装, 批号64-04-12。

D-Galactose(右旋半乳糖), 部颁暂行标准HGB3335-60, 上海试剂二厂出品, 批号760904。

D(+)-Xylose(右旋木糖), 部颁暂行标准HGB3333-60, 上海试剂二厂出品。

L-Asparagine(左旋天冬素即天门酰胺), 匈牙利进口, 北京市医药公司化学试剂科分装, 批号760521。

L-Arginine(左旋精氨酸), 上海化学试剂采购供应站试剂厂出品, 批号78-07-20。

DL-Citrulline(混旋瓜氨酸), 标准沪Q/HG12-844-65, 上海新中化学公司出品, 批号I 661009。

DL-Ornithine(混旋鸟氨酸), 厂牌不详。

D-Ribose(右旋核糖), purum CR Carlrothkarlsruhe Laborchemikalien

上述11种基质用1/15M pH7.0的PB配成1%的浓度, 并调pH至7.0, 但对混旋瓜氨酸须经15磅120°C高压15分钟, 否则不能被利用<sup>[6]</sup>。

使用的试剂有: pH7.0 1/15M的PB, 4%的氢氧化钾溶液和装在测压计里的检压液。常用的检压液为Brodie氏检压液<sup>[7]</sup>。

三、仪器: 瓦勃氏呼吸器, 日本东京, 文京有限会社高岛商店出品。

四、操作程序: 基本按细菌生理学有关章节和1975年Alton发表的布氏菌病实验室技术进行<sup>[6,8]</sup>。

1. 制备菌悬液：如前所述。

2. 调节水浴至一定温度，本试验为36.8°C。

3. 加样：按下列各项加入各种试剂。总量为3毫升。

温度与压力对照瓶：反应瓶里加入PB3毫升。

内呼吸对照瓶：反应瓶里加入PB1.8毫升，待测布氏菌悬液1毫升，中心杯里加4%氢氧化钾溶液0.2毫升。

试验瓶：反应瓶里加入PB0.8毫升，待测布氏菌悬液1毫升，侧球里加1%的基质液1毫升，中心杯里加4%氢氧化钾溶液0.2毫升。试验瓶的数目根据待测基质的数目而定。

每次试验时内呼吸和每种待测基质需平行地作两份试验。

4. 加好各种试剂后放36.8°C恒温水浴振荡1或2小时观察结果。

五、结果判定：根据1975年Alton等<sup>[1]</sup>对实验结果的判定是以每毫克细菌氮每小时的耗氧量≥50微升为阳性标准。本试验是以一定浓度的菌液1或2小时的耗氧量≥50微升作为阳性判定标准。

### 实验结果

一、影响布氏菌氧化代谢活性诸因素的试验：

1. 布氏菌菌龄的影响：为观察布氏菌培养时间与氧化代谢(以下简称代谢)活性的关系，取牛种菌104M分别培养24、48和72小时后用PB配成200亿/毫升的菌悬液，以1%的谷氨酸为基质作比较试验。结果培养24和48小时的布氏菌代谢基质的平均耗氧量相当接近(145、142微升/小时)，而72小时明显地低于前两个时间的结果(109微升/小时)。经F测验，3个时间的平均耗氧量之间 $P < 0.05$ ，有显著性差异。说明培养24和48小时的布氏菌适用于代谢试验，而培养72小时的布氏菌不宜采用。这与文献报导：布氏菌代谢试验多采用48小时培养物<sup>[6,9]</sup>，也有使用24小时培养物<sup>[10]</sup>是相一致的。

2. 振荡频率的影响：以60、80、120次/分3个振荡频率比较，经24小时培养的104M菌(用PB配成200亿/毫升的菌悬液)对基质谷氨酸的氧化活性，其结果分别为158、176、142微升/小时。经显著性测验，无明显差异，这3个振荡频率均可使用。

3. 不同溶液制备的菌悬液对基质代谢耗氧量的比较：通常布氏菌代谢试验用的菌悬液常以PB配制，我们将104M菌的24小时培养物分别用PB和生理盐水配成200亿/毫升的菌悬液作比较。结果两种菌悬液氧化谷氨酸的平均耗氧量非常接近，分别为178、181微升/小时，说明两种溶液均可采用。

4. 菌悬液浓度的影响：104M菌培养24小时后用生理盐水分别配成200、250、300亿/毫升的菌悬液，比较3个浓度的菌悬液对丙、谷、赖3种氨基酸以及阿拉伯糖的代谢耗氧量的结果(表1)。

表1 不同浓度104M菌液对基质代谢耗氧量(微升/小时)比较

菌液浓度 (亿/毫升)	左旋		左旋	
	丙氨酸	阿拉伯糖	谷氨酸	赖氨酸
200	63	59	175	21
250	66	54	221	17
300	79	57	217	18
	F = 2.6 P > 0.05	F = 0.51 P > 0.05	F = 15.9 P < 0.01	F = 0.9 P > 0.05

从表1可见，除对丙氨酸的代谢随着菌液浓度增加，耗氧量稍有增加外，而对另外3种基质的代谢耗氧量与菌液浓度并无这种对应关系。经F测验仅对谷氨酸有显著性差异(在阳性范围之内)。因此表明菌液浓度在一定范围内对布氏菌的代谢活性无明显影响。

二、布氏菌部分标准菌株氧化代谢活性的测定：本试验以1970年世界卫生组织提出的布氏菌分型鉴定表上所列种及其生物型的代谢特征作为标准作对比观察<sup>[11]</sup>。我们对牛、羊和猪3个种的7个生物型标准菌株(简称标株)作了代谢活性测定。待测菌株培养24小时后用生理盐水制成250亿/毫升的菌悬液，试验结果见

表2. 布氏菌羊<sub>1</sub>型、羊<sub>2</sub>型和牛<sub>1</sub>型3个生物型标株观察1小时的代谢特征与鉴定表上相应生物型菌的代谢特征完全一致。但其余4个标株对一些基质的代谢特征与表却不符。即耗氧量低于阳性标准。如猪<sub>1</sub>型标株1330S菌未氧化赖、精、鸟和瓜4种氨基酸、牛<sub>7</sub>型标株63/75菌未氧化天门酰胺和半乳糖等。

表2 布氏菌7个生物型标株对11种基质代谢耗氧量结果(微升)

基 质	羊 <sub>1</sub> ,16M	羊 <sub>2</sub> ,63/9	牛 <sub>1</sub> ,544A	牛 <sub>7</sub> ,63/75	牛 <sub>9</sub> ,L68	猪 <sub>1</sub> ,1330S	猪 <sub>3</sub> ,686
L-谷氨酸	101	74	59	147	163	8/19	42/79
L-丙氨酸	88	75	59	98	92	13/32	9/31
L-天门酰胺	126	73	74	34/84	33/65	11/18	9/20
L-精氨酸	7	11	20	3/7	18/21	24/58	25/66
L-赖氨酸	20	14	8	1/11	19/25	29/84	27/58
DL-鸟氨酸	16	16	17	28/46	10/22	34/93	39/104
DL-瓜氨酸	8	11	16	10/18	11/15	36/89	51
L-阿拉伯糖	1	4	87	52	57	136	19/39
D-半乳糖	6	19	190	45/87	41/74	76	27/42
D-核 糖	6	4	157	127	97	120	108
D-木 糖	8	9	41	42/92	35/72	70	36/79

注:表内凡是一项数字的为1小时结果,凡是两项数字的,其分子为1小时结果,分母则为两小时结果。

为此我们又进行了两种补充试验:

1.提高赖、精和鸟3种氨基酸的浓度,观察1330S对这3种基质代谢的耗氧量(表3)。

结果表明,提高3种基质的浓度并不能明显提高1330S菌株对这3种基质的代谢活性,即对基质代谢耗氧量仍在阳性标准以下。

表3 1330S菌对三种不同浓度基质的代谢耗氧量 (微升/小时)

菌株	L-赖氨酸				L-精氨酸			DL-鸟氨酸		
	1%	1.2%	2%	3.3%	1%	1.2%	1.5%	1%	2%	5%
1330S	19	22	25	33	20	29	38	32	31	43

2.延长氧化代谢试验的时间:由于一些标株在1小时条件下对某些基质的氧化活性达不到阳性指标,把时间延长至2小时后,对某些基质的代谢耗氧量阴性的菌株达到了阳性结果,而对另一些基质应为阴性者,在延长后仍为阴性(表2)。

综上所述,根据1和2小时的代谢活性测定结果,7个生物型标株的代谢特征与鉴定表上相应生物型菌的代谢特征完全一致。

三、氧化代谢试验对国内15株布氏菌定种结果:15株布氏菌经常法鉴定为,羊种4株,牛种2株,猪种2株;难以定种7株。

将上述15株菌培养24小时后用生理盐水配成250亿/毫升菌悬液,以上述11种基质分别观察其代谢活性,发现某些菌株的1小时结果不

能确定代谢类型,将时间延长至2小时时,难定种的7株菌有5株(57267、65062、71003、74004、74005)可定为羊种菌,1株(58049)定为牛种菌;只一株(57108)对11种基质全为阳性,不能确定其代谢类型,故难定种(表4)。

按常法定为羊种的4株菌(65077、74003、7607、7609),对11种基质的氧化代谢活性符合羊种菌的代谢类型。常法定为牛种的2株菌(64030、57086)和猪种1型的2株菌(74007、74009),根据1和2小时氧化基质的代谢特征,分别符合牛种和猪种1型菌的代谢类型。

## 讨 论

一、布氏菌菌龄与代谢活性的关系:从文献看到<sup>[8]</sup>,细菌代谢机能最活跃的时期是细菌

表 4

氧化代谢试验对国内 15 株布氏菌定种结果 (微升)

菌株号	常定结果	代定结果	左谷氨酸	左丙氨酸	左天门酰胺	左精氨酸	左赖氨酸	混鸟氨酸	混瓜氨酸	左阿拉伯糖	右半乳糖	右木糖	右旋核糖
57267	难定	羊	85	95	84	5	13	17	9	5	19	16	9
71003	难定	羊	69	72	63	9	13	12	11	10	34	18	10
74004	难定	羊	95	94	98	12	20	14	9	21	15	33	17
74005	难定	羊	77	107	76	5	6	17	5	4	14	21	6
65062	难定	羊	232	142	28/66	5/7	5/7	8/16	16/26	2/12	3/6	7/9	6/14
58049	难定	牛	68	89	67	15/35	11/21	15/27	11/16	31/73	62	22/46	116
57108	难定	未定	158	57	99	66	71	79	54	163	166	106	115
74003	羊	羊	107	88	97	11	18	17	9	3	14	9	8
7607	羊	羊	70	67	53	5	0	8	6	16	21	26	11
7609	羊	羊	64	85	61	7	9	8	3	12	6	7	15
65077	羊	羊	167	133	38/96	6/6	14/37	6/18	19/37	6/14	11/23	5/11	4/9
57086	牛	牛	70	71	39/89	6/14	11/11	4/8	12/17	35/76	68	19/39	145
64030	牛	牛	56	79	37/83	4/12	14/26	21/34	6/25	36/79	31/65	26/66	124
74007	猪	猪	25/43	29/47	21/41	33/69	39/92	28/68	41/95	169	136	102	102
74009	猪	猪	10/12	12/21	5/6	27/76	31/78	33/66	21/54	124	107	116	114

注:表内凡是一项数字的为 1 小时结果, 凡是两项数字的其分子为 1 小时结果, 分母为两小时结果。

的迟滞期即幼龄菌。布氏菌的特点是生长缓慢, 一般实验室保存的菌株迟滞期大约 18~30 小时, 104M 菌约为 28 小时<sup>[3]</sup>。本试验得知, 培养 24 小时的细菌耗氧量最高, 符合本菌幼龄特点, 48 小时的细菌相当于布氏菌的对数生长期, 此时期的细菌保持有规律的高速繁殖, 氧化活性虽低于迟滞期, 但细菌数量多, 因而培养 24 与 48 小时的细菌耗氧量并无明显差异, 都适用于代谢试验。而培养 72 小时的布氏菌相当于平衡期, 其代谢机能明显低下, 本试验证明 72 小时的细菌耗氧量最低, 不适用于代谢试验。

二、菌悬液浓度: Cameron 氏的代谢试验所用布氏菌悬液, 以分光光度计比浊, 当波长为 600 毫微米时菌悬液透光度为 5%<sup>[12]</sup>; 而 Пинигин 用 400 亿/毫升的菌悬液<sup>[5]</sup>。我们考虑到布氏菌强毒株菌悬液用分光光度比浊, 器具不易消毒处理。因此, 我们以肠道菌比浊管比浊, 当分光光度计波长在 600 毫微米、透光度在 5.5~4.5% 范围内时, 此菌悬液相当于肠道菌比浊管浓度 240~250 亿/毫升。为观察菌悬液浓度对细菌代谢活性的影响, 本试验比

较了 200、250、300 亿/毫升 3 个浓度的菌悬液对 4 种基质代谢的耗氧量结果。经显著性测验未见明显差异, 说明这 3 种浓度均可使用。

### 小 结

一、我们用牛种菌 104M 株对 4 种基质进行了代谢试验, 初步证明所建立的布氏菌氧化代谢试验方法可以用于布氏菌的分种。

二、待测布氏菌以培养 24 或 48 小时为宜。每毫升 200 亿、250 亿、300 亿的菌悬液对基质氧化耗氧量之间没有明显差异。静息细胞悬液用 1/15M pH7.0 的 PB 或生理盐水配制均可。振荡频率高低 (60、80、120 次/分) 对布氏菌氧化代谢活性无明显影响。

三、通过对牛、羊、猪 3 个种的 7 个生物型标准菌株和国内 15 株布氏菌氧化代谢活性的测定, 初步认为利用氧化代谢试验能够对布氏菌进行种的鉴定, 对常规法不能定种的菌株 (除个别菌株外) 可以利用氧化代谢试验定种。

四、我们认为, 在我们实验室条件下, 氧化代谢试验应分别观察 1 和 2 小时的耗氧量, 才能对试验菌株作出较正确的分种。

## 参 考 文 献

1. Meyer ME et al: J Bact, 82 : 387, 1961.
2. Meyer ME: J Bact, 82 : 401, 1961.
3. 中国医学科学院流行病学微生物学研究所和新疆流行病研究所等合编“布鲁氏菌病”内部资料, 第16页, 第33页, 1976.
4. Драновская ЕА и др: ЖМЭИ (7) : 49, 1971.
5. Пинигин Аф: Ветеринария, (4) : 34, 1975.
6. Alton GG et al: Laboratory Techniques in Brucell-esis, 2ed, 52-57, Geneva, 1975.
7. 姚侃等译: 检压技术, 科学出版社, 第3页, 1961.
8. 张宽厚等: 细菌生理学, 人民卫生出版社, 第66页, 第291页, 1964.
9. McCullough NB: Methods in Microbiology, 10 : 210, 1978.
10. Meyer ME et al: J Bact, 78 : 130, 1959.
11. 中国医学科学院流行病学微生物学研究所举办的布病学习班讲义“布鲁氏菌属分类的概况”内部资料, 第4页, 1973.
12. Cameron HS et al: J Bact, 64 : 709, 1952.

## 幼鸡对流行性乙型脑炎病毒的感受性

张永和\* 王秀瑜 郑云凯 王逸民

成鸡自然感染流行性乙型脑炎病毒的中和抗体阳性率极低, 即使接种大剂量病毒亦不产生明显的病毒血症, 然而雏鸡实验感染本病毒, 能够规律地产生滴度较高的病毒血症及血清中和抗体; 鉴于当年出生鸡到夏季本病传播季节, 一般还是未成熟的幼鸡(3~4月龄左右), 有必要了解幼鸡对本病毒的感受性。

本实验所用病毒为流行性乙型脑炎京卫研 I 株, 鼠脑 27~28 代。用不同剂量(从  $2.90 \sim > 5.52 \log LD_{50}$ ), 以 0.1 毫升皮下接种 12 只 3~4 月龄的雄莱亨鸡(体重 470~765 克), 每一剂量病毒接种 2 只。病毒滴定、病毒血症检查及中和试验均用 3 周鼠脑内法进行。

于接种病毒后 1~7 日间检查, 12 只鸡中有 11 只血中查到病毒。在小剂量病毒( $2.90 \log LD_{50}$ )接种的鸡中, 1 号鸡的血液接种小鼠无死亡, 接种 2 号鸡(接种病毒后 6 天)血液的 4 只小鼠有 2 只死亡, 其余 10 只鸡(3~12 号)从接种病毒到其血液开始致小鼠死亡的时间分别为 4 天(3、6 号), 3 天(7、8、10 号), 2 天(4、5 号)及 1 天(9、11、12 号); 后 3 只鸡是接种了较大剂量病毒的( $4.90 \sim > 5.52 \log LD_{50}$ ), 尤以 12 号鸡病毒血症持续时间较长, 其中 1 及 2 天的血液病毒滴度均为  $0.67 \log LD_{50}/0.03$  毫升。总的看来, 接种较大剂量病毒的鸡, 其血中开始查到病毒的时间较早, 较小剂量者较迟。

鸡血清经中和试验, 于接种病毒后 5 天 10 只鸡中有 2 只转为阳性(中剂量 3 号和大剂量 12 号)。中剂量( $> 3.52 \sim 4.90 \log LD_{50}$ )病毒接种组 4 只鸡于接种病毒后 3 个月转为阳性。

从王潜渊等的实验结果(王潜渊等: 中华医学杂志, 38 : 1050, 1952)看, 乙型脑炎病毒京卫研 I 株对 1 年成鸡皮下感染成功(可查到病毒血症)的最低接种剂量为  $6 \log LD_{50}$  左右; 2~14 日雏鸡感染成功的最低接种剂量约为  $2 \log LD_{50}$ 。本文 3~4 个月幼鸡接种  $2.90 \log LD_{50}$  病毒后, 引起极少小鼠死亡(2 号)或无死亡(1 号), 似接近感染成功的最低剂量。此介乎上述成、雏鸡两者之间, 而且幼鸡病毒血症最高滴度未有超过  $1.0 \log LD_{50}$  者, 与王潜渊等实验的成鸡相同。这些结果说明鸡对乙型脑炎病毒的感受性随生理年龄的增长而显著降低。

此种情况与鸭不同, 5 个月龄的鸭经皮下接种京卫研 I 株病毒  $1.62 \log LD_{50}$  后尚能产生低水平的病毒血症; 接种  $3.62 \log LD_{50}$  的病毒后则能产生明显的病毒血症(滴度可超过  $1.5 \log LD_{50}$ ), 并能引起较强的中和抗体反应[2]。这表明 5 个月的鸭的感受性比 3~4 个月的鸡为高。而且, 在北京的调查中发现当地成鸭血清乙型脑炎中和抗体阳性率远比成鸡为高。

蚊虫自然传播乙型脑炎的病毒量, 一般达不到上述实验感染的病毒剂量那样大, 故蚊虫叮咬感染不大可能引起鸡病毒血症。在北方地区, 嗜鸡血的主要蚊种是淡色库蚊, 其对人工感染乙型脑炎病毒的感染域甚高, 幼鸡这样低滴度的病毒血症远不足以感染这种蚊虫; 而且, 此种蚊虫自然感染乙型脑炎病毒的带毒率极低。综上所述, 幼鸡在本病流行中似不足以成为有效的病毒扩散宿主。

\* 中国医学科学院病毒学研究所