

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.01

一株犬种布鲁氏菌的鉴定及毒力测定

张 贺^{1,2}, 徐 磊², 王苗苗², 王 楠², 张金亚², 丁家波², 朱良全²,
周桂兰³, 毛开荣^{2*}, 周双海^{1*}

(1.北京农学院, 北京 102206; 2.中国兽医药品监察所, 北京 100081; 3.北京市畜牧兽医总站, 北京 100107)

[收稿日期] 2017-06-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 09-0001-06 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 对分离到的一株疑似犬种布鲁氏菌进行生物特性和基因型鉴定,并用宿主实验动物(比格犬)测定了最小感染量和脾含菌量。形态与染色特性、培养特性、血清学特性、生化特性鉴定以及 Multi-PCR 和 16S rRNA 测序结果表明,该分离株为犬种布鲁氏菌,其对比格犬的最小感染剂量为 10^5 CFU/mL,对应的脾含菌量为 $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ CFU/g。

[关键词] 犬种布鲁氏菌;分离鉴定;最小感染剂量;脾含菌量

Isolation and Identification for a Virulent Strain of *Brucella canis*

ZHANG He^{1,2}, XU Lei², WANG Miao-miao², WANG Nan², ZHANG Jin-ya², DING Jia-bo²,
ZHU Liang-quan², ZHOU Gui-lan³, MAO Kai-rong^{2*}, ZHOU Shuang-hai^{1*}

(1. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. The Animal Husbandry and Veterinary Station of Beijing, Beijing 100029, China)

Corresponding author: MAO kai-rong, E-mail: kairongmao@sohu.com; ZHOU Shuang-hai, E-mail: 13522630832@163.com

Abstract: In this study, an isolated strain of *Brucella* was identified by biological feature and genotype, and determined the minimum infected dose (MID) and bacteria content of spleen in experimental animals (beagle). This isolated strain is *Brucella canis* which was identified by dyeing properties, culture characteristics, serological characteristics, biochemical characteristics, and further identified by Multi-PCR and 16S rRNA. The MID is 10^5 CFU/mL in beagle, and the content is $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ CFU/g in spleen.

Key words: *Brucella canis*; isolation and infection; minimum infected dose (MID); the content of bacteria in spleen

布鲁氏菌病(简称“布病”)是由布鲁氏菌引起的一种严重的人畜共患病。布鲁氏菌属分为 10 个种,即牛种、羊种、猪种、绵羊附睾种、犬种、沙林鼠种、海洋种(鲸型和鳍型)、田鼠型、湖浪型^[1]。其中牛种、羊种和猪种布鲁氏菌属于光滑型布鲁氏

菌,均可以引起人感染布病^[2];犬种布鲁氏菌属于粗糙型菌株,主要引起犬类动物发病^[3],临床症状表现为母犬流产、公犬附睾炎等。1966 年 L. E. Carmichael 等^[4]首次在患病犬的组织 and 阴道分泌物中发现了犬种布鲁氏菌,1987 年林锦光等^[5]首次

作者简介:张 贺,硕士研究生,从事布鲁氏菌病疫苗研究。

通讯作者:毛开荣,E-mail:kairongmao@sohu.com;周双海,E-mail:13522630832@163.com

在福建省分离到 1 株犬种布鲁氏菌。犬种布鲁氏菌对人的毒力较低^[6],但由于犬也是光滑型布鲁氏菌的易感动物,所以当光滑型布鲁氏菌感染犬后同样会对人类健康和公共卫生安全构成威胁。本研究对新分离到的一株疑似犬种布鲁氏菌(命名为 BJ1601 株)进行了形态特性、培养特性、血清学特性和生化特性鉴定,采用 Multi-PCR 和 16S rRNA 测序方法进行了基因型鉴定,确定该菌株为犬种布鲁氏菌,并测定了该菌株对比格犬的最小感染剂量。

1 材 料

1.1 参考菌株、对照菌株的来源 参考菌株为 *B.canis* RM6/66,对照菌株包括 *B.abortus* A19、*B.melitenisis* M5 和 *B.suis* S2,均由国家兽医微生物菌种保藏中心保存。

1.2 实验动物 150 日龄的比格犬 12 只,母犬,购自维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂、仪器、材料及培养基 pH8.9 Menzel 缓冲液(蒸馏水 100 mL、碳酸钠 0.795 g、碳酸氢钠 7.14 g、氯化钠 5 g、苯酚 5 g); 2×Taq Master Mix 购自北京康为世纪公司;DNA Marker DL2000 购自 TAKARA 公司;生化特性鉴定试剂购自北京陆桥技术有限责任公司;硫堇和碱性品红染料购自北京鼎国生物技术发展中心;单因子血清 A、M、R 均由本实验室保存。

2 方 法

2.1 细菌的鉴定

2.1.1 形态特性鉴定 将分离到的 BJ1601 菌株 37 ℃ 培养 72 h,挑取单菌落涂抹于玻璃片上,火焰固定后进行革兰氏染色,观察;将 BJ1601 用戊二醛固定后做电镜观察。

2.1.2 培养特性与布鲁氏菌 S/R 型鉴定 将 BJ1601 分别在 TSA 和普通琼脂培养基上培养,观察菌落生长情况。将结晶紫染色液覆盖长满单个菌落的 TSA 平板,染色大约 20 s 后观察,并用光滑型 *B.abortus* A19 作对照。粗糙型菌落边缘着色,界限不清晰。光滑型菌落边缘不着色,整齐,圆润^[7]。

2.1.3 生化特性鉴定 按照文献^[3]的方法操作。CO₂ 需求试验:将 BJ1601 分别置于 5% CO₂ 和大气

环境中培养,48 h 后观察是否生长。H₂S 生成试验:将 BJ1601 接种于 H₂S 生化反应管内,观察生化反应管是否有褐色沉淀生成。染料抑制试验:将 BJ1601 分别接种于硫堇和碱性品红培养基中,48 h 观察是否生长。

2.1.4 血清学特性鉴定 取布鲁氏菌单因子血清 A、M 和 R,与等体积的 BJ1601 悬液充分混合,1~2 min 内观察结果。

2.1.5 Multi-PCR 鉴定 以灭活后的 BJ1601、*B.abortus* A19、*B.melitenisis* M5、*B.suis* S2、*B.canis* RM6/66 菌株为模板,各 1 μL,反应体系为 50 μL。参照文献^[8]合成 Multi-PCR 引物序列(表 1)。PCR 反应程序为:95 ℃ 变性 5 min;95 ℃ 50 s,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行凝胶电泳分析。

表 1 Multi-PCR 引物序列

Tab 1 The sequence of primers for Multi-PCR		
引物	序列	产物大小/bp
F1(猪、犬)	GGAACACTACGCCACCTTGT	272
R1(猪、犬)	GATGGAGCAAACGCTGAAG	272
F2(牛、羊、猪)	CTGGTGGGTATCGCATTACTCGG	591
R2(牛、羊、猪)	TTCAGGAAAGCCTGGCGGTACTG	591

2.1.6 测序比对 将 BJ1601 的凝胶条带胶回收后送测序,把测序结果进行 BLAST 比对。

2.1.7 16S rRNA 测序鉴定 参考文献^[9]合成的 16S rRNA 一对引物 F3-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG 和 R3-ACGGCTACCTTGTTACGACTT 对样品进行基因扩增。以灭活 BJ1601 和灭活 *B.canis* RM6/66 为模板,各 1 μL,反应体系为 20 μL。反应条件:94 ℃ 变性 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,进行 30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小正确后送测序。

2.2 脾含菌量和最小感染剂量测定

2.2.1 感染动物 用 TSA 扁瓶培养基繁殖分离菌株,用生理盐水将细菌洗下来,细菌计数后用生理

盐水稀释成 10^3 、 10^5 、 10^7 、 10^9 CFU/mL 四个菌液浓度,比格犬肌肉注射,3 只/组,1 mL/只,依次编为 1~12 号,饲养 30 d 后剖杀。

2.2.2 脾含菌量及其他组织含菌量测定 无菌剖杀,分别取脾脏、肝脏、肾脏、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结,各称取 1 g 研磨混悬,将研磨液接种 TSA 培养至少 72 h,根据生长的菌落数,计算各个组织的含菌量(CFU/g)。

2.2.3 全血及组织分离菌 Multi-PCR 鉴定 无菌剖杀后取全血涂板培养,接种 TSA 培养至少 72 h。挑取全血及各组织培养皿上的单菌落,灭活后做模板,同时设立 *B.abortus* A19、*B.melitenisis* M5、*B.suis*

S2、*B.canis* RM6/66 菌株对照,1 μ L/株,反应体系为 50 μ L。引物及反应程序按照 2.1.5 方法进行,PCR 产物进行凝胶电泳分析。

2.2.4 抗体效价测定 参考《中华人民共和国兽用制品规程》的方法用 *B.canis* RM6/66 制成试管凝集抗原。将采集的犬血分离血清按照参考文献^[6]方法进行微量试管凝集试验测定抗体效价。

3 结 果

3.1 细菌的鉴定结果

3.1.1 形态特性 革兰氏染色结果表明,BJ1601 为革兰氏阴性菌;扫描电镜(4000 $\times$)观察表明,BJ1601 为球杆状,无荚膜、无芽孢。结果见图 1。

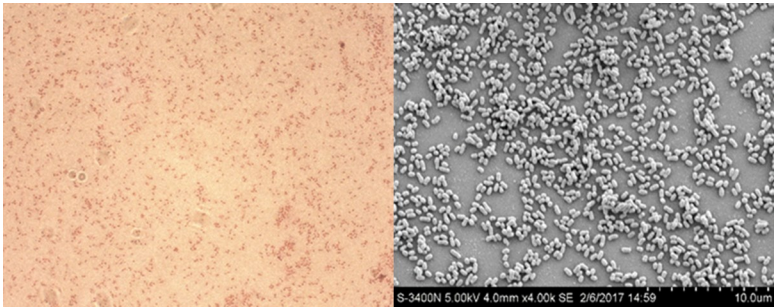


图 1 革兰氏染色 100 $\times$ (A)和扫描电镜照片 4000 $\times$ (B)
Fig 1 Photograph of Gram's(A)and SEM 4000 $\times$ (B)

3.1.2 培养特性与细菌 S/R 型鉴定结果 BJ1601 能够在 TSA 培养基上生长,呈透明、圆形、隆起的小菌落,培养时间至少 72 h。结晶紫染色后用放大镜观察菌落边缘着色情况:BJ1601 与粗糙型 *B.canis* RM6/66 菌落边缘着色,界限不清晰;光滑型菌株 *B.abortus* A19 边缘不着色,整齐,圆润,表明 BJ1601 为粗糙型布鲁氏菌。

3.1.3 生化特性和血清学特性鉴定结果 BJ1601 与 *B.canis* RM6/66 的生长都不依赖 CO₂ 且都不产生 H₂S。在加入硫堇染料(1:50000)的培养基上仍能生长,在复红染料(1:50000)的培养基上不能生长。单因子血清凝集试验只与 R 血清产生凝集现象。结果详见表 2。

表 2 布鲁氏菌生物分型结果
Tab 2 Result of typing of *Brucella* strain

菌株名称	需要 CO ₂	产生 H ₂ S	染料抑菌		单因子血清凝集		
			硫堇	复红	A	M	R
RM6/66	-	-	+	-	-	-	+
BJ1601	-	-	+	-	-	-	+

“-”表示结果为阴性;“+”表示结果为阳性
“-” means the result is negative; “+” means the result is positive

3.1.4 Multi-PCR 鉴定结果 BJ1601 与 *B. canis* RM6/66 均有一条 272 bp 的条带,牛、羊均只有一条 591 bp 的条带,猪分别有 272 bp、591 bp 两条条带,与参考文献^[8]的鉴定结果一致,结果详见图 2。将 PCR 产物胶回收后测序,测序结果显示该片段为预期大小 272 bp,通过 BLAST 分析显示,BJ1601 与 NCBI 上代表性的菌株相似性均在 99% 以上,其中与 *Brucella canis* RM6/66 株、*Brucella canis* HSK 株以及 *Brucella canis* SVA13 等菌株的核苷酸序列基本一致。

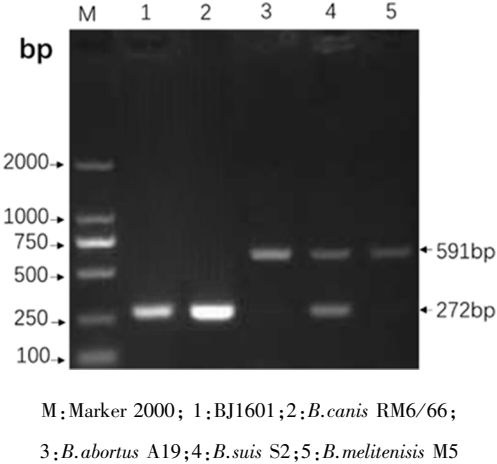


图 2 BJ1601 的 Multi-PCR 鉴定

Fig 2 Multi-PCR identification for BJ1601

3.1.5 16S rRNA 比对结果 用 16S rRNA 引物扩增分离菌株的基因序列,结果显示得到一条大小约为 1400 bp 的片段(图 3)。测序结果显示,该分离株的 16S rRNA 基因序列与预期大小一致,该菌株与 NCBI 上代表性的菌株相似性均在 99% 以上,其中与 *Brucella canis* RM6/66 株、*Brucella canis* HSK 株以及 *Brucella canis* SVA13 等菌株核苷酸相似性为 100%。上述结果表明 BJ1601 为犬种布鲁氏菌,正式命名为 *Brucella canis* BJ1601 株。

3.2 脾含菌量与最小感染剂量测定结果

3.2.1 脾含菌量及其他组织分离到的细菌数 脾菌落分离结果显示,脾含菌量最高为 $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ CFU/g,超过了布鲁氏菌强毒(脾含菌量 2×10^5 CFU/g 以上)的判定标准^[10],表明 BJ1601 为布鲁氏菌强毒株。其他菌落分离结果表明:淋巴结分离

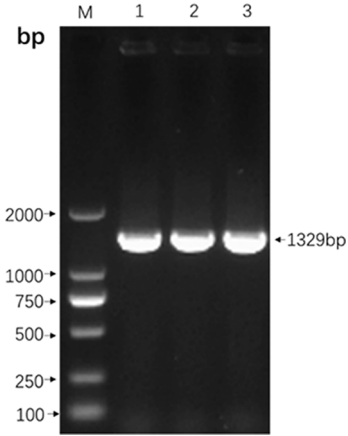


图 3 BJ1601 的 16S rRNA-PCR 鉴定

Fig 3 16S rRNA-PCR identification for BJ1601

到的菌量相对较多,肝脏次之,肾脏分离到的菌量最少,且随着感染剂量的增加,各组织中分离到的菌量也逐渐增加。感染剂量为 10^3 CFU/mL 组的 1/3 只犬所有组织和全血中均未分离到菌, 10^5 CFU/mL 组的 3/3 只犬各组织全部分离到菌,因此将 10^5 CFU/mL 确定为最小感染剂量,结果详见图 4。

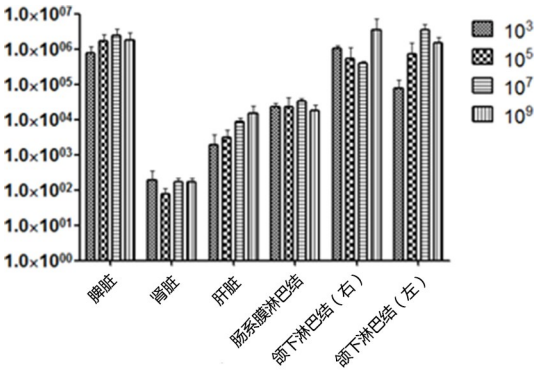
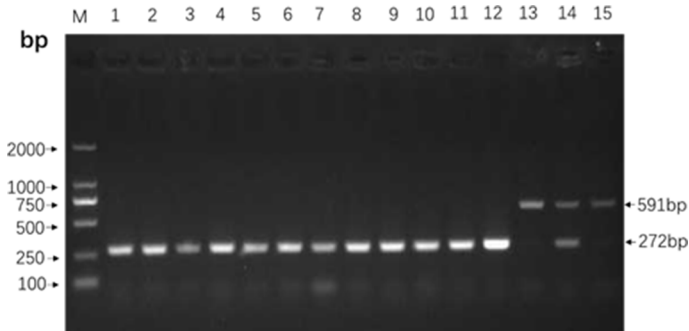


图 4 各组织分离到的细菌数(CFU/g)

Fig 4 The number of bacteria isolated from different organs

3.2.2 全血及组织分离菌的 Multi-PCR 鉴定结果 对 4 组试验犬的组织分离培养结果表明,除了 10^3 CFU/mL 组 3 号犬的组织分离物培养皿中没有长出菌落,其他组犬的肝、脾、肾、肠系膜淋巴结、颌下淋巴结分离物培养皿中均长出菌落,通过 Multi-

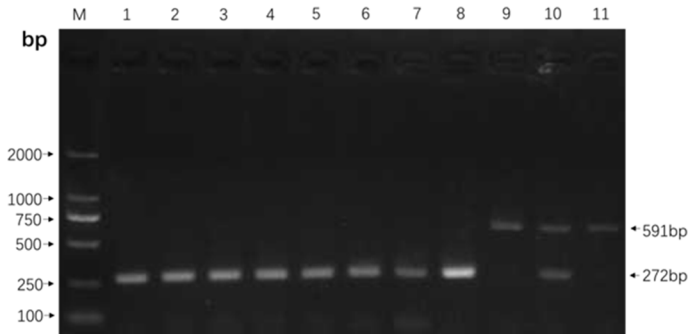
PCR 检测结果为阳性(图 5)。全血培养发现 2、4、7、10、11、12 号犬也分离到了阳性菌 BJ1601,表明犬的布病能够引发犬出现菌血症。结果详见图 6。



M:Marker 2000;1-11: 犬 1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12; 12:*B.canis* RM6/66;13:*B.abortus* A19;14:*B.suis* S2;15:*B.melitenisis* M5

图 5 脾脏分离菌的 Multi-PCR 鉴定

Fig 5 Multi-PCR identification for tissue



M:Marker 2000;1-7: 犬 2、4、7、10、11、12; 8:*B.canis* RM6/66;9:*B.abortus* A19;10:*B.suis* S2;11:*B.melitenisis* M5

图 6 全血分离菌的 Multi-PCR 鉴定

Fig 6 Multi-PCR identification for whole blood

3.2.3 抗体效价测定结果 各组试验犬的血清都有抗体效价,随着 BJ1601 感染剂量的增加,试验犬血清的抗体效价也上升。结果见表 3。

表 3 抗体效价测定结果

Tab 3 Result of Micro tube agglutination test				
感染剂量 分组	抗体效价			
	10 ³ CFU/mL	10 ⁵ CFU/mL	10 ⁷ CFU/mL	10 ⁹ CFU/mL
1	1 : 80	1 : 80	1 : 160	1 : 320
2	1 : 80	1 : 80	1 : 160	1 : 320
3	1 : 80	1 : 160	1 : 160	1 : 320

抗体效价为血清稀释倍数
The serum dilution times indicated the titer of the antibody

4 讨论

近年来,随着人们生活水平的不断提高,犬的饲养量也大幅度增加,更多的人选择犬作为宠物饲养。同时犬的疫病流行也随之变得严重和复杂,其中犬布病在我国广泛流行^[10],由于犬布病不容易察觉,只在出现流产症状的时候才被怀疑感染布病,因此采用主动检测是发现犬布鲁氏菌病的有效途径。本实验室从北京的几只同群宠物犬身上分离到 3 株疑似布鲁氏菌菌株,通过对其中一株菌株的全面鉴定,显示其具有典型的犬种布鲁氏菌的特性,证实为犬种布鲁氏菌,并命名为 BJ1601。进一步的毒力测定显示,其具有较强的毒力,符合强毒

布鲁氏菌的特性,并测得其对比格犬的最小感染剂量为 10^5 CFU/mL,对建立犬布鲁氏菌病感染研究模型具有一定参考价值。本次试验直接用比格犬是考虑到其他动物不是犬种布鲁氏菌的敏感动物,但受条件所限,本次感染试验共采用 12 只比格犬,分为 4 个试验组,其中 10^3 CFU/mL 组有一只犬的血清中测出了抗体效价,但组织器官及全血中没有分离到菌, 10^5 CFU/mL 组中三只犬的抗体水平不均一,考虑可能是由于样本数量不足导致个体差异明显,有待进一步的探究。

参考文献:

- [1] Olsen S C. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination[J]. Revue Scientifique Et Technique, 2013, 32 (32): 207-217.
- [2] Baumgarten D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay[J]. Vet Microbiol, 2002, (90): 63-69.
- [3] Alton G G, Jones L M. Techniques for the brucellosis laboratory [M]. 2nd ed. World Health Organization, 1975.
- [4] Carmichael L E, Kenney R M. Canine abortion caused by *Brucella canis*[J]. J Am Vet Med Assoc, 1968, 152(6): 605-616.
- [5] 林锦光,于恩庶,尚德秋. 福建省首次分离出犬种布鲁氏菌 (*B.canis*) [J]. 中国人畜共患病杂志, 1987, 3(3): 30-31.
- Lin J G, Yu E S, Shang D Q. *Brucella canis* isolated from Fujian province for the first time [J]. Chinese Journal of Zoonosis, 1987, 3(3): 30-31.
- [6] Lucero N E. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(2): 280-285.
- [7] 毛开荣. 动物布鲁氏菌病诊断技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- Mao K R. Diagnostic technique of animal brucellosis [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
- [8] 陈 思. 牛羊猪犬布鲁氏菌多重 PCR 方法的建立及试剂盒研制[D]. 长春: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014: 16-17.
- Chen S. Establishment of multiplex PCR method and kit for *Brucella* in sheep, pig and dog [D]. Changchun: Chinese people's Liberation Army, Military Medical Science Academy of the PLA, 2014: 16-17.
- [9] 孙 明,刘巧荣,宋文静,等. 宠物犬布氏杆菌的 PCR 检测及部分序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(12): 2520-2525.
- Sun M, Liu Q R, Song W J, *et al.* Detection by PCR and sequence analysis of *Brucella canis* [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 47(12): 2520-2525.
- [10] 周桂兰,李旭妮,吴 启,等. 一株犬种布鲁氏菌的分离鉴定 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 11-13.
- Zhou G L, Li X N, Wu Q, *et al.* Isolation and identification for a strain of *Brucella canis* from a poodle [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(2): 11-13.

(编辑:李文平)