

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.07

牛乳样品中布鲁氏菌的分离和鉴定

易新萍¹, 马晓菁¹, 闫晶华², 谷文喜¹, 刘丽娅¹, 叶 锋¹, 吐尔洪·努尔¹, 钟 旗^{1*}

(1. 新疆畜牧科学院 兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆动物卫生监督所, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘 要:为进一步改良布鲁氏菌(*Brucella*)的分离和鉴定方法,本研究于 2010 年~2012 年对新疆部分奶牛场进行 *Brucella* 病的监测,采用改良 *Brucella* 选择添加剂培养分离的方法,从试管凝集试验(SAT)检测阳性的 25 头奶牛的牛乳样中分离到 9 株分离菌,经 VirB8-PCR 方法扩增 *Brucella* 的 VirB8 基因对分离株进行鉴定,结果表明 9 个分离株均为 *Brucella*。同时采用 *Brucella* 分子分型 PCR 及生物学分型方法进一步对分离株鉴定,结果显示其中 7 个分离株为牛 3 型,另外 2 个分离株为羊 3 型。本研究为奶牛 *Brucella* 病的检疫与防控提供了快速分离及鉴定方法。

关键词:牛乳;布鲁氏菌;分离鉴定

中图分类号:S852.61

文献标识码:A

文章编号:1008-0589(2013)01-0028-03

Isolation and identification of *Brucella* in raw milk

YI Xin-ping¹, MA Xiao-jing¹, YAN Jing-hua², GU Wen-xi¹, LIU Li-ya¹, YE Feng¹,
TU Er-hong·Nuer¹, ZHONG Qi^{1*}

(1. Institute of Veterinary Research, Xinjiang Academy of Animal science, Urumqi 830000, China;

2. Xinjiang Animal Health Inspection Institute, Urumqi 830017, China)

Abstract: To investigate the prevalence of *Brucella* in Xinjiang and improve the isolation method, serum samples collected from 3 dairy farms were tested by serum agglutination test (SAT). The results indicated that 3 dairy farms were Brucellosis-positive between 2010 and 2011. Twenty-five raw milk samples were collected from Brucellosis-positive cows based on SAT test and 9 *Brucella* isolates were isolated by using a modified *Brucella* selective supplement in the culture, which were confirmed by VirB8-PCR. In addition to the AMOS-PCR assays, the 9 isolates of *Brucella* were identified as *B. abortus* (7 isolates) and *B. melitensis* (2 isolates), which were further classified into *B. abortus* biovars 3 and *B. melitensis* biovars 3 by biochemical test. The results showed that the method of rapid isolation and identification of *Brucella* was useful for detection of *Brucella*.

Key words: milk; *Brucella*; isolation and identification

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患的传染病,属于我国规定的二类动物疫病。奶牛是 *Brucella* 病最易感的动物之一,主要损害其生殖系统,造成奶牛流产、不孕及乳房炎等症,并可以经污染的奶制品、流产物等途径感染人,导致人的波状热、关节痛及泌尿生殖系统疾病^[1]。因此,奶牛 *Brucella* 病严重危害奶牛业,并对公共

卫生造成严重的威胁。

病原分离鉴定是诊断奶牛 *Brucella* 病的传统方法,但以往病原体的分离主要以病料、流产胎儿、流产物等为分菌样本,该类样本数少,取样困难,对操作人员安全危险性大^[2]。本研究直接采集奶样进行细菌分离,并采用 PCR 结合常规生化实验鉴定了分离的 *Brucella*,为新疆地区布病的诊断及防治

*Corresponding author

收稿日期:2011-09-21

基金项目:新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划(200911109);公益性行业(农业)科研专项(201103008)

作者简介:易新萍(1970-),女,湖北公安人,高级工程师,博士,主要从事布鲁氏菌病诊断与防控技术研究。

* 通信作者:E-mail:yyyzqok@yahoo.com.cn

提供了依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料 采集自3个不同地区奶牛场 SAT 检测为阳性奶牛(抗体效价 1:200~1:800)的牛乳样品 25 份, -20 °C 冻存储用; 布氏琼脂培养基(BBL™ *Brucella* Agar)和 TS 液体培养基均购自 Becton and Dickinson company 公司; 改良 *Brucella* 选择添加剂(OXOID Ltd)、PCR 所用试剂均购自北京庄盟生物有限公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; *Brucella* 国际标准菌株牛种 544A 和羊种 16M、国内疫苗株牛种 A19、羊种 M5 及猪种 S2、大肠杆菌 DH5 α 均由新疆畜牧科学院兽医研究所 *Brucella* 病研究室保存。

1.2 细菌培养 将冻融的奶样混匀, 取 300 μ L 奶样接种于含 *Brucella* 添加剂的布氏琼脂培养基上, 37 °C 5%~10% CO₂ 培养, 观察菌落形态。

1.3 布鲁氏菌属的 PCR 鉴定 挑取培养的疑似 *Brucella* 菌落置于含 500 μ L TS 液体培养基中, 37 °C 孵育 24 h 后 100 °C 10 min, 离心后取上清液作为 PCR 模板。采用 VirB8-PCR 方法扩增 *Brucella* 的 VirB8 基因, 进行 *Brucella* 属鉴定^[3]。

1.4 布鲁氏菌种和型的 PCR 鉴定 参照文献[4]和[5]AMOS-PCR 方法, 组合插入序列 IS711、牛种(1、2、4、3a 型)、牛种(5、6、9、3b 型)和羊种(1、2、3 型)4 个引物, 优化 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 60 s、60 °C 90 s、72 °C 60 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。对 *Brucella* 分离株进行种型鉴定。

1.5 *Brucella* 生物型的生化鉴定 按照布鲁氏菌标准鉴定方法进行细菌学鉴定^[6]。以 *Brucella* 国际标准菌株牛种 544A 和羊种 16M 为实验参考株进行生化鉴定试验, 实验中 CO₂ 需要量、H₂S 产生、染料抑制(硫堇、复红)、单项血清凝集(A、M、R)等试验结果均成立条件下判定分离菌株的生物型。

2 结果

2.1 细菌分离培养 将奶样接种于含 *Brucella* 添加剂的布氏琼脂培养基, 培养至第 4 d 后, 25 份样品有 9 份培养基上生长出 0.5 mm~2.0 mm 大小无色、闪光圆形、湿润、凸起的疑似小菌落(图 1)。



图1 牛乳中 *Brucella* 分离培养

Fig.1 Morphology of bacteria culture from raw milk sample

2.2 PCR 鉴定 应用 VirB8-PCR 方法^[3,4]对疑似 *Brucella* 菌落进行 PCR 鉴定, 以 A19 疫苗株、羊种 M5 株、猪种 S2 疫苗株和大肠杆菌 DH5 α 分别为阳性对照和阴性对照。VirB8-PCR 鉴定结果表明, 9 个 *Brucella* 分离株均扩增出约 700 bp 的特异性片段, 与阳性对照一致。阴性对照大肠杆菌 DH5 α 则未见目的片段(图 2)。

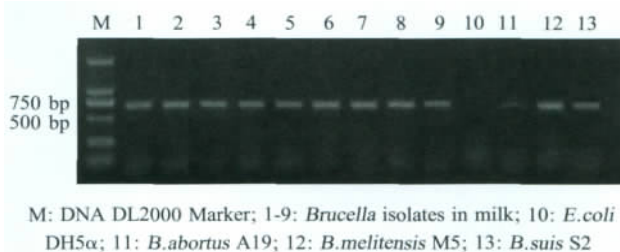
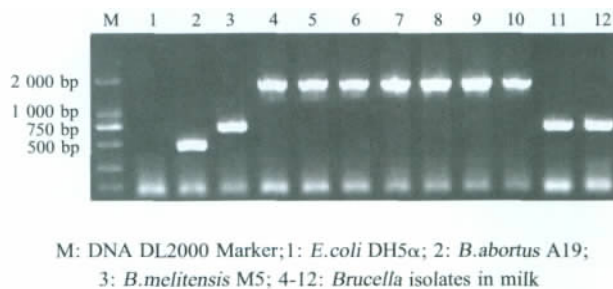


图2 牛乳中 *Brucella* 分离株的 VirB8-PCR 鉴定

Fig.2 Identification of *Brucella* in raw milk by VirB8-PCR

2.3 *Brucella* 种型 PCR 鉴定 采用 AMOS-PCR 方法^[4,5,7]对 VirB8-PCR 阳性 *Brucella* 分离株进行种型鉴定, PCR 结果表明牛种 *Brucella* (1、2、4、3a 型)扩增出约 500 bp 的特异性片段, 牛种 *Brucella* (3b、5、6、9 型)扩增出约 1 700 bp 的目的片段, 羊种 *Brucella* (1、2、3 型)扩增出 750 bp 的目的片段(图 3)。



M: DNA DL2000 Marker; 1: *E. coli* DH5 α ; 2: *B. abortus* A19; 3: *B. melitensis* M5; 4-12: *Brucella* isolates in milk

图3 牛乳中 *Brucella* 分离株生物型的 AMOS-PCR 鉴定

Fig.3 Identification of *Brucella* biotypes by AMOS-PCR

2.4 生化鉴定 应用常规生化试验对 PCR 鉴定的牛种(3、5、6、9 型) *Brucella*、羊种(1、2、3 型) *Brucella* 进行生物型鉴定。经中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 *Brucella* 病组鉴定表明, 从 2

表 1 牛乳中分离菌株生化鉴定结果
Table 1 The results of identification of isolated *Brucella* strains by biochemical test in raw milk

生化鉴定试验 Identification of biotypes by biochemical experiments			牛场编号 No. of farms			标准菌株 The standard strains of <i>Brucella</i>	
			1	2	3	牛种 544A <i>B.abortus</i> 544A	羊种 16M <i>B.melitensis</i> 16M
分离菌株数 Isolation of strains			5	2	2	/	/
CO ₂ 需要量 CO ₂ requirements			+	+	-	+	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production			+	+	-	+	-
染料抑制 试验 Dye inhibition	硫堇(W/V)	1/25000	+	+	-	-	-
	Thionin	1/50000	+	+	+	-	+
		1/100000	+	+	+	-	+
	复红(W/V)	1/50000	+	+	+	+	+
单项目血清凝集 Agglutination with mono-specific antisera	Rosein	1/100000	+	+	+	+	+
	A		+	+	+	+	-
	M		-	-	+	-	+
	R		-	-	-	-	-
生物型 Biotype			牛 3 型 <i>B.abortus</i> biovar 3	牛 3 型 <i>B.abortus</i> biovar 3	羊 3 型 <i>B.melitensis</i> biovar 3	牛 1 型 <i>B.abortus</i> biovar 1	羊 1 型 <i>B.melitensis</i> biovar 1

个牛场的牛乳中分离到的 7 株 *Brucella* 为牛种 *Brucella* 生物 3 型, 1 个牛场中分离的 2 株 *Brucella* 为羊种 *Brucella* 生物 3 型(表 1)。

3 讨 论

病原分离鉴定是诊断 *Brucella* 病的传统方法和金标准, 但采集病料困难, 操作风险大, 方法繁琐、分菌率低。牛乳中含有多种细菌, 在细菌的分离过程中, 常用的 *Brucella* 培养基中添加了改良的 *Brucella* 选择性添加剂, 有效地抑制了 *Brucella* 以外的各类细菌的生长, 能分离到 *Brucella* 病原体。本实验研究表明, 对奶牛 *Brucella* 病同一感染群, SAT 检测奶牛 *Brucella* 病抗体效价为 1:200~1:400 时, 奶牛的乳样分菌率高达 50 % 以上。该方法省时、简便, 取样容易, 一般在 3 d~5 d 内就可得到病原体, 为奶牛 *Brucella* 病的确诊提供了切实可行的诊断方法, 同时对生牛乳 *Brucella* 污染的监测具有重要的食品卫生学意义。

各型 *Brucella* 在各种动物间有跨物种间传播, 确认动物感染群及其病原的种型, 对确定流行病学状态、传染源及采取合适的防控措施有着重要的实用价值^[8]。本研究结合 PCR 技术, 快速准确地对新疆地方 *Brucella* 分离株进行了种的鉴定。该方法减少了操作者在不可控情况下接触活菌的机会, 极大地降低了 *Brucella* 扩散污染的生物安全问题。应用

生化试验确诊了新疆地方 *Brucella* 分离株的生物亚型为牛种 3 型和羊种 3 型。从牛乳中分离到羊种 *Brucella* 3 型更进一步表明该地区 *Brucella* 羊种 3 型已成为该病流行的优势菌种^[9], 这将严重威胁当地的公共安全。本研究结果为制定新疆地区 *Brucella* 病的防控措施提供了重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 吴艳, 权亚玮. 奶牛场防控布鲁氏菌病存在的问题及净化措施[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(5): 120-121.
- [2] 杨莲茹, 乌伦吉如嘎. 奶牛布鲁氏菌病原 PCR 检测方法的建立[J]. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(2): 1-5.
- [3] 钟旗, 范伟兴, 吴冬玲, 等. 布鲁氏菌 VirB8-PCR 方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1): 50-54.
- [4] 钟旗, 易新萍, 李博, 等. 布鲁氏菌 PCR 鉴定方法的研究与应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(3): 241-245.
- [5] 钟旗, 范伟兴. 用 AMOS-PCR 对布鲁氏菌种型鉴定的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(7): 683-686.
- [6] 闻玉梅主编. 现代微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999, 455-469.
- [7] Ocampo-Sosa A A, Balbin J. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5,6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3 [J]. Vet Microbiol, 2005, 110: 41-51.
- [8] 尚德秋. 布鲁氏菌流行病学及分子生物学研究进展[J]. 中国地方病防治, 1996, 11(6): 335-348.
- [9] 王远志, 陈创夫, 崔步云, 等. 羊种布鲁氏菌生物 3 型的分离和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 29(10): 753-755.

(本文编辑: 彭永刚)