

布鲁氏菌属内 S 型和 R 型菌种在动物体内干扰的研究

汪华 还锡萍 强福林 熊海平 王彩生 陈杰 陈智高 李德庆 李兰玉

【摘要】 目的 通过对布鲁氏菌属内 S 型与 R 型菌种在小鼠和犬体内相互作用的研究, 弄清我国布病防治中某些流行病学现象的机理。方法 将特定浓度的 S 型菌悬液分别与 R 型菌液混合后注射于小白鼠和犬体内, 20~25 天后解剖取小鼠局部淋巴结、肝、脾及犬脾进行培养、分离及鉴定。结果 在小鼠试验中, 各种 S 型布氏菌均明显地干扰了 R 型犬种菌的生存。但在犬体内进行的研究表明, 104M 菌被 RM6/66 菌干扰; Rev-1 菌与 RM6/66 菌则或相互干扰, 或相互平衡。S₂ 在与 RM6/66 相同菌量情况下, 两者可以共存, 以 S₂ 稍占优势, 呈互不干扰、相互共处之态。结论 研究结果能合理解释 S 型布病疫区内很难分离到 R 型布氏菌的流行病学现象, 并阐明其流行病学意义。同时提示人们, 当某地布病流行的优势菌被控制后, 很可能出现新的优势种的布氏菌传播、流行。

【关键词】 布鲁氏菌 抗原干扰

A study on the interference between smooth and rough species of *Brucella* in mice and dogs WANG Hua, HUAN Xiping, QIANG Fulin, et al. Jiangsu Health and Anti-Epidemic Center, Nanjing 210009

【Abstract】 Objective To find out the epidemiological phenomenon in the process of brucellosis control, a study was carried out. **Methods** Smooth-*B. abortus* 104M, *B. melitensis* Rev-1 and *B. suis* mixed with Rough-*B. canis* RM6/66 were injected to mice and dogs respectively. After 20-25 days the spleen, liver, lymphonodus of these animals were cultivated for culture and identification of bacteria. **Results** In mice, smooth *Brucellae* interfered the growth of the rough ones. But in dogs, the situation was different: 104M was disturbed by RM6/66, Rev-1 and RM6/66 played even while S₂ co-existing with RM6/66. **Conclusion** For the first time this study rationally explained the reason why rough *Brucellae* could not be isolated in epidemic focus of brucellosis with smooth species. It also pointed out that when dominate species were controlled in epidemic focus areas, there might occur new transmission and prevalence of new species of *Brucellae*.

【Key words】 *Brucella* Interference of antigens

多年来, 尤其是自 1983 年国内首次发现犬种布鲁氏菌(*B. canis*)^[1] 感染存在后所进行的大量人、畜和野生动物的 *B. canis* 感染

流行病学调查研究发现, 在羊、牛或猪种布氏菌流行优势区内, 很难或几乎查不到 *B. canis* 菌感染的存在; 而只在非牛、羊、猪种布病流行区内查到 *B. canis* 菌感染^[2]。

这些现象提示布鲁氏菌属内不同种的布氏菌在宿主体内存在相互作用, 为探索其相互作用关系、病原学及流行病学上的意义, 笔者进行了研究, 现将其结果报告如下。

作者单位: 210009 南京, 江苏省卫生防疫站(汪华、还锡萍、王彩生、陈智高); 南通市卫生防疫站(强福林、熊海平、陈杰、李德庆); 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(李兰玉)

材料与方 法

一、实验菌种:弱毒菌苗株(S型菌) *B. melitensis* Rev-1 株、*B. abortus* 104M 株、*B. suis* S₂ 株和犬种菌的标准株(R型菌) *B. canis* RM6/66 株,均系中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所布病研究室提供的冻干菌株。

二、实验动物:小白鼠:来源同上。昆明种,3~4月龄、体重18~20g,雌雄混合,S-SAT、R-SAT 阴性,每组5只分笼饲养。犬:江苏省南通市区当地饲养3~4月龄健康幼犬,雌雄混合,S-SAT、R-SAT 阴性,每组3只分笼饲养。

三、菌悬液制备:将在肝琼脂培养基上生长48h的各生物种布氏菌,以无菌生理盐水制成菌悬液,以比浊法制成实验所需的菌浓度。

四、干扰试验:将所制成的S型菌悬液分别与R型菌液混合,取1ml注射于小白鼠和犬的左侧鼠蹊部皮下,同时设各菌对照组,于注射后20~25天解剖取小鼠的局部淋巴结、肝、脾及犬的脾。

五、分菌及鉴定:研磨所取脏器并接种于肝琼脂斜面上,37℃培养,每两天观察一次,10天后无菌生长,弃之。如长菌则按“布鲁氏菌病防治手册”有关操作规程及判定标准进行菌型鉴定。

六、血清学反应:按“布鲁氏菌病防治手册”操作规程及判定标准进行。

结 果

一、不同种布氏菌在小鼠体内干扰的研究结果:

1. 相同菌量混合的布氏菌的干扰现象:试验分组详见表1。试验组均只分到S型菌,对照组R型菌生存良好。说明在相同菌量时,S型明显干扰R型菌的生存。

2. 不同菌量的S型菌对RM6/66生存的影响:降低了S型菌的菌量继续试验(表2)。从表2可见,在小鼠体内S型菌1~10

万菌量对RM6/66菌皆有不同程度的干扰。所有1万S型菌皆出现不完全干扰。

表1 S型菌对RM6/66菌的干扰影响

组号	组 别	局 部 淋 巴 结	肝	脾
1	RM6/66 50万菌+ 104M 50万	3(S)/5	3(S)/5	5(S)/5
2	RM6/66 50万菌+ Rev- 1 50万	1(S)/5	3(S)/5	5(S)/5
3	RM6/66 50万菌+ S ₂ 50万	4(S)/5	3(S)/5	4(S)/5
4	RM6/66 50万菌	4(R)/5	2(R)/5	5(R)/5
5	104M 50万	2(S)/4	2(S)/4	3(S)/4
6	Rev- 1 50万	3(S)/5	3(S)/5	5(S)/5
7	S ₂ 50万	4(S)/5	3(S)/5	5(S)/5

注:S、R分别代表该菌对S型和R型血清的凝集;分子为阳性数,分母为动物数。

3. 不同菌量104M对RM6/66菌的生存影响:将104M 1万、0.5万、0.1万菌与50万RM6/66菌混合注射小鼠做进一步观察发现:1万104M菌组只分到S型菌,而0.5万、0.1万菌组均同时分到了S型和R型菌,说明0.1~1.0万104M菌仍对50万RM6/66菌有干扰作用,并随104M菌量减少而干扰减弱,因为分到的R型菌逐渐增多。

二、不同种布氏菌在犬体内干扰的研究结果:

1. 相同菌量的S型菌与RM6/66菌的相互作用:试验分组见表3。

对照组除104M外,其余均生长良好。第5组虽有轻度抗原抗体反应,但只分到了RM6/66菌,说明104M菌受到了一定的干扰;第6、7组是相同的两批试验,其血清学反应相似,但分到菌株各异,说明Rev-1菌与RM6/66菌势均力敌;第8组S、R型血清学反应均呈阳性,并分到了相应细菌,说明S₂与RM6/66菌有共栖之势。

2. 不同菌量104M与RM6/66菌的相互作用:基于前次试验100万104M菌组未获细菌,故增大其菌量进行试验(表4)。结果10万和100万104M菌皆很快被机体清除,1000万菌能在犬体内生存,但与等量的RM6/66菌混合进入体内后,仅分到RM6/66菌,说明RM6/66菌干扰了104M菌的生存。

表 2 不同菌量的 S 型布氏菌对 RM6/66 体内生存的影响

组号	组 别	局部淋巴结	肝	脾
1	RM6/66 50 万菌+ 104M 10 万	5(S)/5	-	4(S)/5
2	RM6/66 50 万菌+ 104M 1 万	5(S)/5	1(S)/5	5(S)/5
3	RM6/66 50 万菌+ Rev- 1 10 万	5(S)/5	-	5(S. R. S+ R)/5
4	RM6/66 50 万菌+ Rev- 1 1 万	4(S+ R)/5	1(S)/5	5(S)/5
5	RM6/66 50 万菌+ S ₂ 10 万	4(S. R)/5	1(S)/5	5(S)/5
6	RM6/66 50 万菌+ S ₂ 1 万	5(S. S+ R)/5	1(S)/5	5(S)/5
7	RM6/66 50 万菌	5(S)/5	1(S)/5	4(S)/5
8	104M 1 万	2(S)/5	-	5(S)/5
9	Rev- 1 1 万	4(S)/4	1(S)/4	2(S)/4
10	S ₂ 1 万	3(S)/5	2(S)/5	5(S)/5

注: S+ R 代表该菌对 S 型和 R 型血清都凝集, - 代表未作。分子、分母意义同表 1。

表 3 S 型菌与 RM6/66 菌在犬体内的相互作用

组号	组 别	脾脏细菌 培 养	RBPT		SAT		菌型鉴定 R 型或 S 型
			S	R	S	R	
1	104M 100 万	-	-	-	-	-	-
2	S ₂ 100 万	#	+	-	+	-	S
3	Rev- 1 100 万	##	+	-	+	-	S
4	RM6/66 100 万	##	-	-	-	-	R
5	104M 100 万+ RM6/66 100 万	#	+	-	±	-	R
6	Rev- 1 100 万+ RM6/66 100 万	+	+	+	+	+	R
7	Rev- 1 100 万+ RM6/66 100 万	+	+	+	+	+	S
8	S ₂ 100 万+ RM6/66 100 万	#	+	+	+	+	S, R

注: 1 脾脏细菌培养+ ~ # 代表分到不同菌量: + 10 个菌落以下, # 11~ 19 个菌落, ## 20~ 29 个菌落, # 30 个菌落以上。- 为阴性。

2 血清学反应: - 阴性, ± 可疑, + 阳性。

3 菌型: S 代表 S 型菌(104M、S₂、Rev- 1), R 代表 R 型菌(RM6/66)。

表 4 不同菌量 104M 菌与 RM6/66 菌的作用

组号	组 别	脾脏细菌 菌培养	RBPT		SAT		鉴 定 R 型或 S 型
			S	R	S	R	
1	104M 1000 万	#	+	-	+	-	S
2	104M 100 万	-	+	-	+	-	-
3	104M 10 万	-	+	-	+	-	-
4	RM6/66 1000 万	#	-	+	-	+	R
5	104M 1000 万+ RM6/66 1000 万	#	+	+	+	+	R

注: 表内说明同表 3。

3. 不同菌量 S₂ 对 RM6/66 菌的生存影响: 由犬第一阶段实验可知 S₂ 菌似乎不受 RM6/66 菌的影响, 故选择 S₂ 菌 100 万、10 万分别与 100 万 RM6/66 菌混合注射犬作进一步探索, 结果对照组皆分到了相应的细菌, 试验组也同时分到了 S 型和 R 型菌。此两种菌组合几乎处于互不干扰的状态, 两者可以共存。

三、不同种布氏菌与 RM6/66 菌在小鼠

和犬体内相互作用的比较: 对比两种动物试验可知其结果并不一致, 甚至有相反现象。104M 菌在小鼠体内干扰 RM6/66 菌, 前者 0.125 万可与 50 万 RM6/66 菌相平衡(相差 400 倍), 而在犬体内则 RM6/66 干扰 104M, 单独 1000 万 104M 菌可在犬体内生存繁殖, 但与等量 RM6/66 菌混合进入机体则分不到 104M 菌。Rev- 1 菌在小鼠体内明显干扰 RM6/66 菌, 与 104M 菌类似, 在犬体内相同菌量时相互干扰, 呈势均力敌之态。S₂ 在小鼠体内干扰 RM6/66 菌, 但稍弱于 104M 菌, 在犬体内则与前两种 S 型菌不同, 呈互不影响, 共栖之势。

讨 论

1、S 型布氏菌和 R 型布氏菌在体内的相互作用: 根据本项研究, 布氏菌 S 型和 R

型在体内的相互作用可分为两种类型:一般宿主型和最适宿主型。

小鼠对各类布氏菌都是非敏感动物,也非其最适宿主。给各种布氏菌提供的生存条件几乎是一致的。布氏菌在其体内的生存、繁殖均藉不同种布氏菌固有特点进行。因此,在小鼠试验中各种 S 型布氏菌均明显地干扰了 R 型犬种菌的生存。但在犬体内进行的研究表明,104M 菌不仅不能干扰 RM6/66 菌,反而被后者干扰,尽管干扰强度不大(表 3、4)。Rev-1 菌与 RM6/66 菌在犬体内或相互干扰,或相互平衡(表 3)。S₂ 在与 RM6/66 相同菌量情况下,两者可以共存,以 S₂ 稍占优势,呈互不干扰、和平共处之态。

两种动物试验结果有如此显著差异,可从布氏菌随野生动物向家畜的衍变、进化中找到答案^[4]。以犬种布氏菌为例,在漫长的进化过程中,犬成为其寄生的最适宿主。其他布氏菌尽管毒力较强(一般测毒法),即使偶然进入犬体——转移宿主,其寄生力不强。但 S₂ 菌的毒力(一般测毒法)低于 104M 和 Rev-1 菌,在犬体内 S₂ 可以和 RM6/66 菌共存,甚至还稍占优势,其原因是由于犬种菌源于猪种布氏菌^[5]。最初分到犬种布氏菌时,曾就其作为猪种菌第 4 生物型还是作为独立种引起争论。猪种菌的最适宿主最为广泛,且不止一个,如猪 1、3 型菌最适宿主是猪,犬是猪 1、3 型菌的第二最适宿主。基于此,不难理解两者在犬体中的共存现象。

二、布氏菌属内种间干扰现象在流行病学上的意义:研究机体内病原微生物间存在的干扰和协同形象^[3]具有重要的理论意义及实用价值。在 1983 年我国首次发现了犬种菌后,全国范围内进行了人畜流行病学调查,发现在我国东北部和西北部省区很难查到 *B. canis* 菌感染的存在;在南部和东部省区较易分到 *B. canis* 菌。这个现象与我国牛、羊种布氏菌的流行分布呈相反态势^[2]。

刘志文等人在新疆石河子地区调查 *B. ovis* (R 型) 时也发现了类似现象:即凡出现 *B. ovis* 菌感染的地区皆非布病疫区^[6]。

通过对布氏菌属内各种间在体内干扰现象的研究,可以解释这些令人难以说明的流行病学现象。本项研究还提示人们,当某地区的布病流行的优势菌被控制后,并不意味着该地的布病被完全控制,很可能相继出现原非当地优势种的布氏菌,上升为优势种并传播、流行。近年对我国布病流行菌株的分析也为此论点提供了有力的佐证。80 年代前,羊种菌占我国分到布氏菌的 73.8%,80~90 年代,在羊种菌布病得到控制的情况下,羊种菌占分到布氏菌的 25.14%,牛、猪种则上升为 55% 以上^[7]。

以上的布病研究资料已清楚地说明本项研究在布病流行病学分析中的现实意义。不仅如此,本项研究的意义已超出了布病本身,该论点同样地适用于其他致病微生物引发传染病的流行优势种的说明。

参 考 文 献

- 1 尚德秋,李兰玉,程尧章.在国内首次分离出犬种布鲁氏菌病的报告.中华流行病学杂志,1984,5:345-348.
- 2 尚德秋,李元凯,李兰玉,等.我国犬种布鲁氏菌病的调查研究.中华流行病学杂志,1989,10:24-29.
- 3 Dipeolu OO, Otesile EB, Fagbemi BO, et al. Pathogenicity of Eperthrozoon suis alone and when mixed with Baesia trautmanni in experimentally infected pigs. Vet Paras, 1983, 13:127-134.
- 4 尚德秋.布鲁氏菌病学.刘秉阳,主编.北京:人民卫生出版社,1989.104-117.
- 5 Meyer ME.动物布鲁氏菌病.尚德秋,主译.北京:科学技术文献出版社,1992.1-15.
- 6 阎守敦.中国布鲁氏菌病及其防治(1982~1991).高淑芬等,主编.北京:中国科学技术出版社,1994.10-12.
- 7 崔庆祿,冬青.内蒙古自治区 8 年检出布鲁氏菌的分析研究.见:尚德秋,主编.中国 80 年代布鲁氏菌病防治研究进展.北京:中国科学技术出版社,1991.50-52

(收稿:1999-08-11 修回:1999-10-11)