鼻疽菌定向变異及免疫的研究

韓有庫　李佑鈞　陈貴連　金　言　刘景华
(吉林农业大学)　(长春兽医大学)

提　　要

利用不同試剂加入甘油瓊脂培养基中，对典型的强毒鼻疽杆菌进行馴化培养，經20个月培育（220—291代）的結果，获得了在毒力上致弱，但仍保有免疫原性的菌株。前后用海猪63只进行过三次免疫試驗，証明有四組变異菌使海猪对强毒鼻疽菌的攻击有50—87.5%的保护率。

关于鼻疽杆菌的定向变異資料，据茨維地科夫的記載[1]，于1927—1928年苏联兽医研究所用苯胺染料作用于鼻疽菌，以期获得致弱的菌株，但并未記明其后的結果。据該氏記載，該所用重鉻酸鉀肉湯致弱鼻疽杆菌，証明通过十八代后对猫就不能引起发病。曾以此菌免疫了三匹馬，其中兩匹只有稀少的鼻疽結节，另一匹无結节，而对照未免疫馬得全身性鼻疽，即皮肤与內脏均有病变。

鼻疽菌变異問題，丰島等人（1939）[2]也作过研究，并証实了变異菌的形态和培养特性与毒力的关系。利用弱毒活菌于免疫的研究方面，Nicolle，M.（1906）[3]曾用少量活菌对海猪进行免疫，認为可賦与低度的免疫力。持田（1938）[4]利用D型变異鼻疽菌对小白鼠作免疫研究，認为有相当免疫效果。第十四回东亞家禽防疫会議报告記录上[5]，載有利用孔雀綠減毒鼻疽菌，对日本馬接种时能耐过30个白金耳活菌量，繼后用$^1/_{500}$白金耳强毒菌攻击时，可耐过感染。魏雪列斯基[6]曾利用弱毒活菌給幼駒进行免疫，認为免疫組比对照組病程迁延，易于耐过。Lobel[7]用牛胆汁培地培育鼻疽菌制成了弱毒菌苗。赵桐朴[8]用孔雀綠減毒鼻疽菌作免疫試驗，認为无免疫力。

我等从1954—1957年进行过鼻疽菌定向变異及免疫的研究，現將所得結果汇报于后，希同志們給以指正。

一、研究方法

（一）选用的菌株：选用的鼻疽菌系由病馬肺分离的典型光滑型菌，具有典型的形态学和生化学特征，在琼脂平板上，菌落整齐、光滑；菌体單在或成双，无長鏈。在抗原性方面，凝集原性和免疫原性均良好。毒力：对海猪的最小致死量为$^1/_{1000}$毫克。

（二）选用的試剂和馴化方法：选用錐黃素、孔雀綠、煌綠、牛胆汁、磺胺嘧啶鈉鹽和結晶紫等六种試剂。先檢查其对鼻疽菌的最小敏感量，然后使用小于最小敏感量的适当量作为开始的濃度。培育时先將試剂加于甘油琼脂內，培养24—48小时算作一代，每10—20代培育后，增进試剂濃度一次，經常注意观察馴化菌的菌落形和菌形，并不断

挑选典型菌落，以防变異为 R 型。伴随培育工作之进行，各試剂提高濃度为：錐黃素 1：20，孔雀綠 1：100，煌綠 1：200，牛胆汁 1：17，SD(Na) 1：1000，結晶紫 1：100。

二、形态学及生化学特性的变异

到1955年末止，已馴化將近20个月，其形态学和生化特性的变異如表1。

表1 各种馴化鼻疽菌形态学和生化学性狀的变异

菌株 \ 观察項目	革兰染色	形态	醱酸酵作用 葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	楊甘	H_2S	鹼基質	菌落
黃 (270)	—	混有长鏈	—	—	—	—	—	—	+	—	S
孔 (286)	—	正常	—	—	—	—	—	—	+	—	S
煌 (291)	—	正常	+	—	—	—	—	—	—	—	S
胆 (295)	—	正常	+	—	—	—	—	—	±	—	S
SD(245)	—	正常	+	—	—	—	—	—	—	—	S(D)
紫 (220)	—	混有长鏈	+	—	—	—	—	—	—	—	D
原株	—	正常	+	—	—	—	—	—	+	—	S
齐株	—	正常	+	—	—	—	—	—	+	—	S

在形态学上，除黃、紫二組混有不少的長鏈菌外，其他組仍和对照菌一样，为典型的鼻疽杆菌。

在菌落形上，紫組变成小(D)形菌落，菌落直徑仅在0.3—0.5毫米（正常菌落为2—4毫米），SD組也部分变成D形，其他各組未变。但黃、孔組不断在S型菌落周圍出現伪菌苔。黃、孔二組丧失了醱酵葡萄糖的性狀，同时有三組（煌、SD、紫）丧失了 H_2S 的产生力，其它无变化。

三、抗原性的变异

为了观察变異菌的抗原性，选四种免疫血清对各不同菌系作凝集反应，結果如表2。

表2 各种馴化鼻疽菌的被凝集性

凝集原 \ 血清稀釋	原株 1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	煌 1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	胆 1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	黃 1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	抗原对照
黃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	⧺	⧺	⧺	—	—	—	—	—	—	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	—	—
孔	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	⧺	⧺	+	—	—	—	—	—
煌	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	⧺	⧺	+	—	—	—	—	—
胆	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	±	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	⧺	—	+	—	—	—	—	—
SD	⧺	⧺	⧺	+	+	±	—	+	+	+	±	±	±	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	±	±	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	—	+
紫	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	±	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	—	+
原	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	—	—	⧺	—	—	—	—	—	—	—

从2表看出，在以三种血清（原、煌、胆）所作的試驗中，黃和 SD 兩变異菌的被凝集性較其它各菌弱；但对黃組血清，黃和 SD 兩个菌系的被凝集性較好，所以初步看出黃、SD 兩組的抗原性（凝集原性的）似有所改变。

为了进一步观察抗原性的变異，进行了凝集素吸收試驗，結果如表3。

表 3　　凝集素吸收試驗結果

吸收菌	凝集原	免疫血清种类				吸收菌	凝集原	免疫血清种类			
		原株	胆	煌	黄			原株	胆	煌	黄
黄	黄	0	0	0	0	SD	黄	0	0	0	0
	孔	2	5	4	0		孔	2	4	3	0
	煌	3	5	4	0		煌	2	4	3	0
	胆	3	5	3	0		胆	2	3	2	0
	SD	0	0	0	0		SD	0	0	0	0
	紫	3	5	4	0		紫	2	3	2	0
	原	3	5	4	0		原	2	4	3	0
孔	黄	0	0	0	0	紫	黄	0	0	0	0
	孔	0	0	0	0		孔	0	0	0	0
	煌	0	0	0	0		煌	0	0	0	0
	胆	0	0	0	0		胆	0	0	0	0
	SD	0	0	0	0		SD	0	0	0	0
	紫	0	0	0	0		紫	0	0	0	0
	原	0	0	0	0		原	0	0	0	0
煌	黄	0	0	0	0	原	黄	0	0	0	1
	孔	0	0	0	0		孔	0	0	0	0
	煌	0	0	0	0		煌	0	0	0	0
	胆	0	0	0	0		胆	0	0	0	0
	SD	0	0	0	0		SD	0	0	0	0
	紫	0	0	0	0		紫	0	0	0	0
	原	0	0	0	0		原	0	0	0	0
胆	黄	0	0	0	0	說明	0＝1：400不凝集； 数字表明凝集价； 2＝1：800； 3＝1：1600； 4＝1：3200； 5＝1：6400。				
	孔	0	0	0	0						
	煌	0	0	0	0						
	胆	0	0	0	0						
	SD	0	0	0	0						
	紫	0	0	0	0						
	原	0	0	0	0						

从表 3 看出，各免疫血清（黄除外）用黄、SD 株吸收时，凝集素不能被吸淨，証明其抗原性有了改变。

四、毒力的变异

于馴化过程中，作过数次毒力檢查，結果如表4、5、6。

按表 4 看出，用肉湯培养菌 0.5 毫升注射腹腔內，有兩組（黄、胆）已丧失了对海猪的致死能力，屠杀后各脏器未培养出鼻疽菌。其它菌系仍保有相当毒力。

按表 5 結果，小白鼠对鼻疽菌比海猪鈍感，感染后病程經过長，但小白鼠是可以感染鼻疽的，有明显的脾鼻疽变狀（脾腫、鼻疽結节），細菌分离阳性（原株）。反之，馴化組（6 个菌系）已丧失了对小白鼠的致病力。

表4 馴化鼻疽菌第一次毒力檢查（对海猪） （馴化代数70—110代）

海猪号	使用菌株及馴化代数	腹腔注射内量	生死及經过日数	結果：临床	剖檢	菌分离	判定	备考
1	黄	四十八小时肉湯培养菌 0.5 cc	生	短时热反应	—	—	減弱	50天杀
2	110 代		生		—	—	減弱	同上
3	孔		死（9天）	+	+	+	强	
4	110 代		死（15天）	+	+	+	强	
5	煌		死（10天）	+	+	+	强	
6	110 代		死（13天）	+	+	+	强	
7	胆		生	—	—	—	減弱	50天杀
8	90 代		生	—	—	—	減弱	同上
9	SD		死（7天）	+	+	+	强	
10	80 代		死（22天）	+	+	+	强	
11	紫		死（21天）	+	+	+	强	
12	70 代		死（5天）	（其他事故死）				
13	原株		死（7天）	+	+	+	强	
14			死（7天）	+	+	+	强	

注：海猪体重600—800克

表5 馴化鼻疽菌第二次毒力檢查（对小白鼠）

（馴化代数为145—180代）

小白鼠号	菌株及代数	注射量	經过	剖檢变状：肺	肝	脾	菌分离：肺	肝	脾
1	黄 160代	四十八小时肉湯培养菌 0.1cc 腹腔内	于第三十二天杀死	—	—	—	—	—	—
2				—	—	—	—	—	—
3				—	—	—	—	—	—
4	孔 180代			—	—	—	—	—	—
5				—	—	—	—	—	—
6				—	—	—	—	—	—
7	煌 180代			—	—	—	—	—	—
8				—	—	—	—	—	—
9				—	—	—	—	—	—
10	胆 150代			—	—	—	—	—	—
11				—	—	—	—	—	—
12				—	—	—	—	—	—
13	SD 145代			—	—	—	—	—	—
14				—	—	—	—	—	—
15				—	—	—	—	—	—
16	紫 145代			—	—	—	—	—	—
17				—	—	—	—	—	—
18				—	—	—	—	—	—
19	原株	0.1cc	9天死	—	—	K2.5×	—	+	∞
20				—	—	K2.5×	+	+3	∞
21		0.01cc	32天杀	—	—	K2×	+	+	∞
22			28天死	—	—	K2×	+	+	∞
23		0.001cc	32天死	—	—	K2×	—	—	+
24			32天死	—	—	2×	—	—	+3

注："K"为結节；"×"指脾肿程度。培养"+"为菌落数十个发育之意；十个以下菌落并附以数字；"∞"为长菌苔。

从表6毒力檢查証明，四个变異菌系（孔、煌、胆、紫）在馴化到220—295代以后，对海猪的致病力已显著減弱，注射 $^1/_{20}$ 毫克的菌量也不能使海猪致死。但煌和孔兩个菌系，于接种后在局部可形成小指头大的膿腫，破膿后形成瘢痕而痊癒，部分动物有一过性热反应（升高1.5℃，持續1—3天）。在第58天屠杀时，从脏器中未分离出鼻疽菌。

对猫的毒力檢查：

于1956年6月，以煌和胆兩个菌系对猫作了毒力檢

查，以$^1/_{10}$毫克的菌量接种于后腦部皮下，每个菌系各接种 2 只猫，观察20天，局部有腫脹和化膿現象，破潰后形成瘢痕，屠杀后剖檢并进行細菌分离培养，所有 4 只猫的脏器未分离出細菌。据文献載，猫对鼻疽菌最易感，得病后多因急性敗血症而死。此次虽接种菌量較大，但仍耐过，可見变異菌的毒力确已相当減弱。

表 6　馴化鼻疽菌第三次毒力檢查（对海猪）

（馴化代数220—295代）

馴化菌及代数	注射量皮下	使用海猪数	局部反应数	死亡数	培养时出現細菌数	备考
孔 286 代	$^1/_{20}$mg	6	4/6	0/6	0/6	58天杀
煌 291 代	$^1/_{20}$mg	6	5/6	0/6	0/6	58天杀
胆 295 代	$^1/_{20}$ mg	6	0/6	0/6	0/6	58天杀
紫 220 代	$^1/_{20}$ mg	6	0/6	0/6	0/6	58天杀
原　株	$^1/_{200}$mg	6	6/6	6/6	6/6	8—28天死

注：分母为动物数；分子为反应数、死亡数或出現細菌海猪数。

毒力恢复試驗：

取三株变異菌（孔、胆、紫）用不加試剂的甘油琼脂連續通过 5—7 代，結果未发現毒力有恢复現象（以$^1/_{10}$毫克各注 2 匹海猪，結果无变化）。

由上表 4、5、6 以及对猫的实驗結果来看，可知伴随馴化繼代，鼻疽菌的毒力可逐漸降低，对海猪注$^1/_{20}$—$^1/_{10}$毫克菌、对猫注$^1/_{10}$毫克菌、对驴注 2—6 毫克菌（見下述免疫原性檢查）也不能使之发病，只在接种局部引起硬結性腫脹和化膿，部分动物出現一过性热反应。

五、免疫原性檢查

为了进一步研究当鼻疽菌毒力減弱之后，是否仍保有免疫原性。于是用馴化菌作預防接种，对海猪和驴进行了下列免疫試驗，結果如表 7、8、9。

第一次免疫試驗結果如表 7，間隔 7 天作兩次免疫后，免疫的四个組各死一只，其余 4 只耐过，60天后宰杀时，所有脏器及淋巴結均未分离出細菌（煌、胆組各有 1 只海猪局部細菌培养阳性）。对照組全部感染鼻疽致死，剖檢和培养証明为阳性。

表 7　　第一次鼻疽免疫試驗　　（1956年 4—7 月）

組別		海猪数	第一次免疫注射	第二次免疫注射	免疫期間	强毒攻击菌量	感染数 数	感染数 %	免疫数 数	免疫数 %
免疫組	孔（286 代）	5	$^1/_{500}$mg（皮下）	$^1/_{20}$mg（皮下）	60天	$^1/_{50}$mg（皮下）	1	20	4	80
	煌（291 代）	5					1	24	4(1)	80
	胆（295 代）	5					1	20	4(1)	80
	紫（220 代）	5					1	20	4	80
对照組		5	——	——	——	同上	5	100%	0	

注：（1）为在60天后屠杀时在局部培养出細菌。

第二次免疫試驗結果如表 8，免疫后过20天用强毒菌攻击，各組的免疫率分别是：孔 7/9，胆 6/10，紫7/10。对照組感染致死率为80%。

第三次免疫試驗結果如表9，此次試驗用制成的冻干菌苗进行的，免疫接种經29天后，以强毒菌攻击，免疫組的保护数为孔 $^{3}/_{6}$、胆 $^{7}/_{8}$，对照組的致死数为 $^{7}/_{9}$。

对驴的免疫試驗：

为了研究对驴的接种反应和免疫力，选健驴6匹，其中4匹作免疫，2匹作对照。免疫組注射2次，第一次注2毫克（当天計算活菌数，孔为22亿个菌，胆为18.8亿个

表8 第二次鼻疽免疫試驗 (1956年9—11月)

組別		海猪数	免疫注射	免疫期	强毒攻击菌量	感染数		免疫数	
						数	%	数	%
免疫組	孔 (268代)	9	$^{1}/_{10}$ mg	20天	$^{1}/_{10}$ mg	2	22	7(1)	78
	胆 (295代)	10				4	40	6(1)	60
	紫 (220代)	10	(皮下)		(皮下 (	3	30	7(2)	70
对照組		10	——	—	同上	8	80	(22)	20

注：（1）在局部分离出細菌数；（2）未死海猪于第58天杀死进行剖檢。

表9 第三次鼻疽免疫試驗 (1957年4—7月)

組別		海猪数	免疫注射菌数	免疫期	强毒攻击数	感染数		免疫数	
						数	%	数	%
免疫組	孔 (286代)	6	1.3亿个	29天	$^{1}/_{50}$ mg	3	50	3	50
	胆 (295代)	8	1.8亿个		(1,571万个)	1	12.5	7	87.5
对照組		9	——	—	(皮下)	7	78	2	22

注：攻击菌为572号鼻疽菌。免疫时使用冻干的活菌。

菌），过10天后，又接种6毫克（頸部皮下）。接种前后每天檢溫，每隔7天作变态反应和血清学（凝反和补反）檢查。免疫接种后1—2天，有热反应（39.3—41.2℃）和局部腫脹（开掌大）反应，7—8天后消腫，但未化膿。免疫后过25天用强毒572号鼻疽菌攻击（$^{1}/_{5}$毫克），此菌对海猪的最小致死量为 $^{1}/_{5000}$ 毫克。对照組驴2匹于第7和第9天死于急性鼻疽；免疫組4匹驴也分别于10—13天患急性鼻疽死亡，經剖檢和細菌培养均为阳性。由上述結果証明，对驴看不出賦与免疫力（表略）。

从以上免疫試驗的結果看，对海猪共使用63匹作免疫試驗，前后共作三次，其免疫力分别为50—87.5%（四种变異菌的免疫力差别不明显），証明对海猪可賦与一定的免疫力，但对驴免疫則无效。

六、結　　論

我等利用不同試剂（錐黃素、孔雀綠、煌綠、牛胆汁、磺胺嘧啶鈉鹽、結晶紫）加入培养基中对典型的强毒鼻疽菌进行馴化培养，經20个月馴化（220—291代）的結果，其变異情形如下：

1. 在形态学和菌落方面的变化，黄、紫二組在鏡檢上若干菌体有形成長鏈傾向。紫株且变成了小型（D）菌落，SD 株有趋向小型菌落的傾向，其它基本上仍保持 S 型菌落的特征。在醣酸酵能力上，黄、孔二組丧失了对葡萄糖酸酵的能力，而煌、SD、紫三組也同时丧失了 H_2S 的产生力，其它无大变化。

2. 在抗原性的变異方面，依交互凝集和交互吸收試驗的結果，发現黄、SD 兩株的抗原性发生了深刻的变異，推測系丧失了某些抗原性因子。其余各株看不出明显的变化。

3. 在毒力变異方面，随馴化的进展，毒力可逐漸降低变为弱毒株。在馴化的各株中，黄和胆二組的毒力是最先降低的（70—110代），其它各株随繼代增进也相繼降低。馴化到20个月（220—291代）以后，馴化菌对海猪（用 $^1/_{20}$—$^1/_{10}$ 毫克）、猫（$^1/_{10}$ 毫克）、驴（2—6 毫克）等都丧失了足以引发典型疾病的毒力，只在接种局部可引起硬結性膿腫，还可看到一过性热反应。

4. 在免疫原性檢查上，先后用63只海猪进行过三次免疫試驗，証明有四組馴化菌（孔、煌、胆、紫）对海猪可賦与一定程度（50—87.5%）的免疫力，但对驴免疫未获結果。对馬匹的免疫試驗，有待于今后进行。

参 考 文 献

〔1〕 Цветков, Н. Е.: Сап, сельхозгиз, стр. 215, 1947.

〔2〕 丰島等：南滿兽医畜产学会杂志，13卷，3、4号，31頁，1931.

〔3〕 Nicolle, M.: Brit. Med. J. Lond. II, 1571, 1906.

〔4〕 持田勇：南滿兽医畜产学会杂志，19卷，2号，20卷，4号，1937—38.

〔5〕 第十四回东亚家畜防疫会議报告記录，減毒鼻疽菌に依る免疫の研究。

〔6〕 Коляков, я. Е.: 楊本升等譯：兽医微生物学，448—449，1952年。

〔7〕 Hutyra, F. et al.: Special pathology and therapeutics of the diseases of domestic animals, 1946.

〔8〕 赵桐朴等：軍馬卫生科研所研究資料汇編，一輯，89頁。