

白僵菌致病作用的实验研究

谢克群 赵子辰 李桂华 杨凤芹 冷兴志

(吉林省劳动卫生职业病研究所)

相连英 徐庆丰

李寅曾

(吉林省农科院植保所)

(北京医学院卫生系)

从事生产白僵菌人员,有时出现发烧、咳嗽、咯痰等症状,经我们调查研究,证实了白僵菌可以引起免疫性肺炎^[1]。为了进一步弄清其发病机理,我们对家兔吸入白僵菌的致病作用,进行了实验研究。

实验方法

选用体重1.5~3.5kg健康家兔22只(由白求恩医科大学动物室供应),分三组进行实验。

免疫染菌组(一组):8只家兔。预先用白僵菌抗原免疫,出现抗体后,再吸入白僵菌。

家兔免疫的方法:将白僵菌抗原2ml,在每只家兔背部(先脱毛)皮内注射(约40个丘疹)。

染菌的方法:将家兔固定好,使其鼻孔置于一个染菌的密闭箱中,其白僵菌浓度在1000~4000mg/m³之间,染菌时间为5~15分钟。

未免疫染菌组(二组):7只家兔。不预先用白僵菌免疫,只吸入白僵菌。染菌方法同前。

对照组(三组):7只家兔。不吸入白僵菌。

实验用白僵菌,系由吉林省农科院新近培养的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)。

抗原提取的方法:取白僵菌10gm,加灭菌生理盐水50ml,用组织搅拌机,搅拌20分钟,过滤。滤液移于透析袋中,室温下机械吹风,使其水分蒸发浓缩,加完全佐剂,用生理盐水调整其蛋白浓度为1mg/ml。

观察指标

一、沉淀素抗体的检查:每只家兔用琼脂扩散法检查其血清与白僵菌抗原,是否可出现沉淀线,出现为阳性,反之为阴性。

二、动物染菌后,记录出现的症状,体重的变化,进食的情况,活动等表现。

三、染菌动物在染菌后的1、4、9、24天，分别处死2只。处死方法：先用0.5%硫喷妥钠水溶液2~3ml作耳静脉注入，动物麻醉后，股动、静脉放血处死，剖解。记录各脏器肉眼所见，各脏器分别称重，并计算各脏器与体重之比。取材10%福尔马林溶液固定，石蜡切片，HE及PAS染色，镜下观察。

四、取肺、肾组织，立即冷冻切片，乙醇固定后，用IgG荧光抗体血清作荧光染色，在荧光显微镜下，观察是否有荧光复合物存在。

实验结果

一、沉淀素抗体的检出：

第一组动物用白僵菌抗原免疫后4周，多数动物(5/8)出现了琼脂扩散沉淀素试验阳性，第5周以后，全部动物均阳性，对照组动物皆为阴性。沉淀素抗体的检出，证实了用白僵菌抗原免疫家兔，可使家兔体内产生相应的抗体。

二、染菌后出现的症状：

家兔吸入白僵菌后，一般在2~4小时即出现轻重不一的症状。轻者仅有咳嗽，有时燥动，食欲尚正常。较重者出现呼吸频数、喘，食量减少，萎靡。重者肢体无力，伏卧不动，若予推动，勉强行走几步，步态不稳，拒食，开始呼吸可达150次/分，频繁咳嗽，继而出现呼吸深而慢，四肢软瘫，侧卧，最后抽搐死亡。

动物染菌后，体重明显下降，但发病较轻者，于5~7天体重基本恢复正常。

三、病理观察结果：

1、肉眼所见：一、二组家兔均可见肺脏有明显病变。肺脏明显增大，表面充血，部分家兔(7/15)可见散在小点状或片状出血，切面亦见点、片状出血，气管内有渗出的粘液，有的可见血性渗出物。染菌九天后处死的动物，肺脏胸膜增厚。肺/体重量比值，染菌组与对照组有明显差异(见表1)。

表1 各组肺/体重量比值比较

组别	动物数	肺/体比范围	均值	P值
免疫染菌组	8	0.39—1.35	0.789±0.30	两个染菌组分别与对照组比较P<0.05
未免疫染菌组	7	0.42—1.67	0.827±0.41	
对照组	7	0.26—0.47	0.337±0.076	

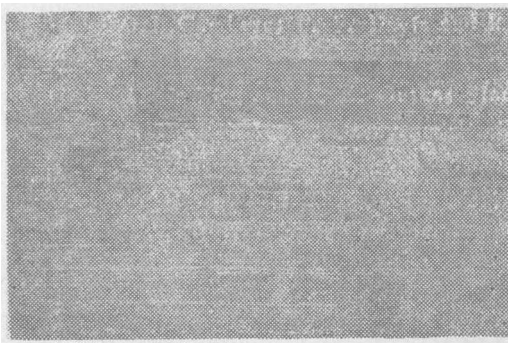


图1 免疫染菌组11号家兔，染菌后4天肺组织。可见肺间质增宽、水肿、细胞浸润，细支气管旁淋巴组织增生。管腔中可见少量炎细胞。H.E.(×100)

2、病理组织学所见

心、肝、脾、肺、肾等器官做石蜡切片，HE染色，镜检。染菌动物肺脏病变显著，可见细支气管周围、肺泡间质明显增宽和不同程度水肿，间质细胞浸润，主要为淋巴细胞、单核细胞，初期可见吞噬细胞和中性粒细胞浸润。肺血管扩张，并可见肺间质有多量的红细胞出现的出血征象。支气管上皮细胞增生，管腔及肺泡腔渗出增多(见图1~6)。

所用的IgG荧光抗体诊断血清，为上海生物制品研究所出产的，用异硫氰酸荧光素结合的。

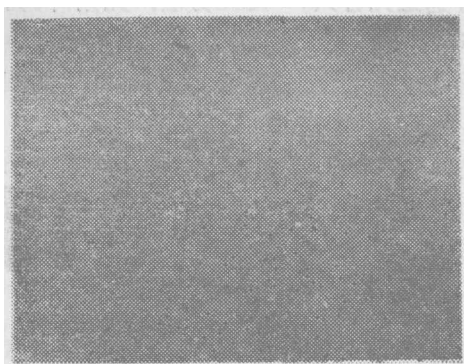


图2 免疫染菌组11号家兔,染菌后4天肺组织。可见细支气管旁肺间质出血、水肿,细胞浸润,主要有淋巴细胞、单核细胞,并有多核异物巨细胞。支气管上皮增生,管腔有炎细胞, H.E($\times 400$)

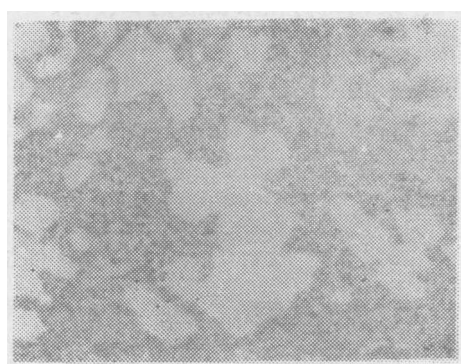


图3 免疫染菌组13号家兔,染菌后9天肺组织。可见细支气管旁肺间质增宽,细胞浸润,肺泡腔缩小,泡腔有渗出物及炎细胞,细支气管上皮细胞增生,管腔中有大量炎细胞。H.E($\times 100$)

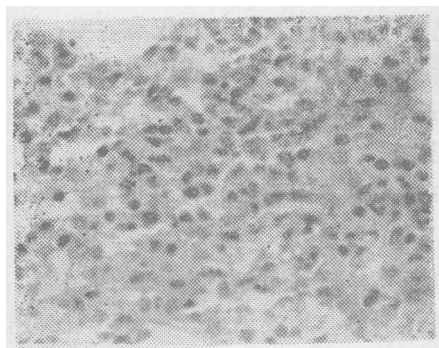


图4 免疫染菌组13号家兔,染菌后4天肺组织。可见间质细胞浸润,主要成分为淋巴细胞,单核细胞,以及中性粒细胞。H.E($\times 400$)

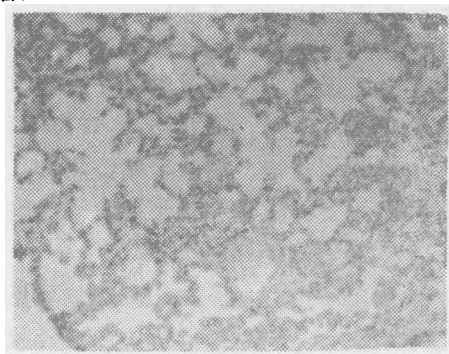


图5 未免疫染菌组22号家兔,染菌后24天肺组织。可见肺间质、肺泡壁稍增宽,肺泡腔已基本恢复,未见有渗出物。H.E($\times 100$)

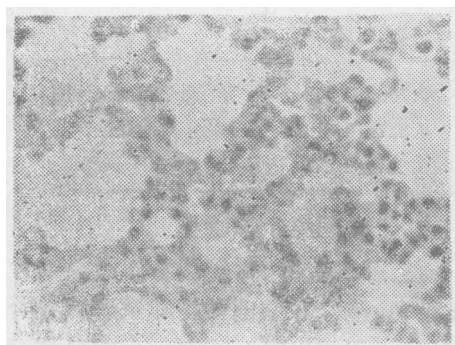


图6 未免疫染菌组22号家兔,染菌后24天肺组织。可见间质稍增宽,肺间质无水肿,淋巴细胞及单核细胞稍增多。H.E($\times 400$)

染菌组动物的心、肝、脾、肾多属正常,仅有个别动物出现脾充血、淤血,肝脏枯否氏细胞增生,窦内淋巴细胞浸润,以及肾小管上皮细胞轻度混浊肿胀,肾间质淋巴细胞浸润。

3、免疫复合物检出结果:

这次实验中,染菌组的大部分动物,在肺间质中检出了免疫复合物(见表2)而对照组未检出。

讨 论

白僵菌是一种存在于自然界的真菌,国内外利用白僵菌防治虫害研究较多。我国许多省份已广泛应用于林业、农业害虫的防治,并获得较好的效果。但白僵菌对人的毒性的研究却很少。苏联学者认为白

表2 免疫复合物检出结果

组 别	被检动物数	阳性动物数	百分数%
免疫染菌组	5	3	60.0
未免疫染菌组	6	4	66.7
对照组	5	0	—

僵菌是非致病菌，仅能引起弱变态反应⁽²⁾。太原市卫生防疫站报道了生产白僵菌工人，可发生发热、咳嗽、咯痰等症状，并认为可能是白僵菌所致⁽³⁾。

我们经过了1977年~1979年的现场调查，提出了白僵菌对生产工人有致病作用，可引起间质性肺炎为特征的免疫性炎症⁽¹⁾。

免疫性疾患也叫变态反应。变态反应可分两大类，即速发型变态反应和迟发型变态反应。

从现场发病病例观察，用琼脂扩散法检查出沉淀素抗体，证实了白僵菌工人体内已存在着白僵菌抗体⁽¹⁾。本实验用白僵菌抗原注入家兔体内，5周后全部家兔血清中均出现了相应的抗体，这说明了白僵菌具有成为外源性抗原，可使机体产生抗体，这就具备了引起生物体发生免疫性反应的病原学条件。

生产白僵菌工人发病，多在吸入较高浓度的白僵菌后，经一小时至数小时发病，轻者微热、咳嗽、不适感。重者高热、咳嗽、胸闷、喘、无力感。与这次动物实验出现的以呼吸系统症状为主的表现相一致。

人与动物发病迅速，这一特点是符合速发型变态反应。人群调查，凡接触较高浓度的白僵菌者，多数人都发病。这与我们此次实验凡是染菌的动物都发病的结果，是相吻合的。这不同于I型变态反应，I型变态反应接触同一抗原，仅有少数过敏体质者发病。

这次实验，免疫染菌组与未免疫染菌组的动物都同样发病，而且病状与病理改变都没有明显差异。这与人群调查首次吸入白僵菌者，也同样能发病的结果是一致的。这一现象不同于I、IV型变态反应，其发病需先接触抗原以后，再次接触抗原才能发病。而首次接触抗原即能发病，正是III型变态反应的特征之一。

当抗原首次浸入机体之后，形成抗原抗体复合物，就有发生III型变态反应的可能性。

抗原抗体复合物的形成，就其本质来讲，是机体的一种防御保护反应，其作用清除抗原对机体的损害作用，但在一定条件下，亦可引起机体的病理损害。这是由于抗原、抗体在血清中比例不同所决定的。当抗原量大大超过了抗体量时，形成细小($<19S$)可溶性复合物，易通过肾小球血管壁，随尿排出体外，当抗原与抗体量比例适当时，形成大的($\geq 19S$)不溶性复合物，在血液中沉淀下来，被吞噬细胞清除。上述两种情况，对机体没有致病作用。只有抗原稍多于抗体的量时，形成中等大小($\approx 19S$)可溶性复合物，即不能通过肾小球随尿排出，又不能沉淀下来为吞噬细胞吞噬清除，而易嵌留于血管基底膜中，引起组织损伤，形成局部病灶，类似典型的Arthus反应。早期主要表现是：复合物嵌留部位，出现多形核白细胞，血小板的聚集，随后出现单核细胞浸润为优势的病理改变。

这次实验中，从多数动物的肺组织中，检查出特异性抗原抗体复合物。这一发现，就进一步证实了白僵菌侵入机体之后，刺激机体免疫系统，使机体形成抗原抗体复合物，在一定条件下，可引起III型变态反应。这一发现亦对确定白僵菌所引起的变态反应，属于III型变态反应提供了重要的依据。

从病理改变情况看，染菌的一、二组动物，病变主要是肺脏，肺体比明显增高，镜下可见肺间质增宽、充血、水肿，肺泡腔缩小，间质有单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞浸润，支气管上皮增生，管腔及肺泡腔亦有渗出细胞成分，这些都是间质性肺炎表现。

综上所述：家兔吸入白僵菌发病的实质是间质性肺炎。致病的机理可能是白僵菌侵入

机体后,形成了抗原抗体复合物,引起Ⅲ型变态反应。

至于白僵菌的毒素能否有致病作用的问题,有待进一步研究。

关于预后问题:从染菌后24天处死的动物,其肺部病变已有明显的减轻及修复的迹象表明,与我们已往现场调查结果,多数病例经2~4月基本恢复正常,是一致的。我们初步认为:其病变是可逆的。但我们未做亚急性及慢性反复多次染菌实验,故尚不能得出最后结论。

我们认为:人和动物吸入较多量的白僵菌,都可以引起肺部免疫性疾患,在生产中应重视预防工作,改进生产工艺,增设必要设施,加强个体防护措施,建立健全安全卫生制度,防止疾病发生。一旦发病,要采取相应措施。

对过敏体质以及肺、肾有器质性疾患者,应调离白僵菌工作。

小 结

本文通过对家兔吸入白僵菌的实验,研究了白僵菌的致病作用。可引起免疫性间质性肺炎,可能属于Ⅲ型变态反应。同时认为在实际工作中,应重视预防工作,采取积极有效的防护措施,防止其危害人体健康。

荧光复合物实验,承蒙王泰玲教授指导,特此致谢。

参 考 文 献

- (1) 赵子辰等: 1981, 白僵菌致病作用的探讨, 中华预防医学杂志, 11, 5: 272
- (2) Израйлет Ли, и др. 1973, Гигиеническая Оценка бовверина и некоторые перспективы применения микробиологически^x средств защиты растений. гигиена и Санитария 11: 91.
- (3) 太原市卫生防疫站: 1978, 生产白僵菌杀虫剂操作人员健康调查报告(内部资料), 未发表。