

付湘云,马晓菁,谷文喜,等. 羊种布鲁氏菌 16M 感染 BALB/c 鼠模型的建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):239-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.075

羊种布鲁氏菌 16M 感染 BALB/c 鼠模型的建立

付湘云^{1,2}, 马晓菁², 谷文喜², 叶 锋², 易新萍², 钟 旗²

(1. 新疆农业大学动物医学学院,新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆畜牧科学院兽医研究所,新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:为建立羊种布鲁氏菌 16M 强毒株的小鼠模型,选取体质量 18 g 左右的雌性 BALB/c 小鼠为实验动物,随机分为 7 组,5 只/组,分别腹腔注射 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/只羊种布鲁氏菌 16M 强毒株,对照组注射同等剂量 PBS。注射后分别于第 1 周和第 2 周剖杀小鼠,采集血液并无菌取小鼠内脏组织做病理组织学检测,脾脏称质量、细菌分离。结果表明,接毒后脾脏为其主要靶器官且第 2 周小鼠脾脏中含有较高菌量,肝脏其次。抗体检测 results 和脾脏分菌计数结果最终确定 1×10^4 CFU/只羊种布鲁氏菌 16M 强毒株腹腔感染最佳剂量。

关键词:羊;布鲁氏菌;16M;BALB/c 鼠模型;脾脏分菌

中图分类号: S858.26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0239-03

羊布鲁氏菌病是由羊种布鲁氏菌侵入机体后所引起的一种人畜共患慢性细菌性传染病。羊种布鲁氏菌的自然宿主是成年山羊和某些品种绵羊,其他动物也能受感染且除牛能在某种程度传播此病外,其余的都为最终宿主^[1-3]。羊种布鲁氏菌对人有相当强大的致病力,是世界上最严重的人兽共患病之一,在多个国家与地区流行^[4-5]。近年来,我国羊布鲁氏菌病时有发生且发病率呈上升趋势,截至 2013 年,有 32 个省(直辖市、自治区)发现人、畜布鲁氏菌病存在和流行,新疆地区 10 个定点监测点 2013 年羊的布鲁氏菌病阳性率上升至 2.7%,比 2010 年上升了 1.95%^[6]。全国布鲁氏菌病患者 30 万~50 万人,受布鲁氏菌病威胁的人口数达 3.5 亿,每年新发病人数为 5 000~6 000 人^[6-7],且我国人间布鲁氏菌病 90% 以上的致病菌为羊种布鲁氏菌 III 型^[12]。在马来西亚,人间布鲁氏菌主要由牛种布鲁氏菌和羊种 I 型布鲁氏菌引起,最近几年羊种 I 型布鲁氏菌成为主要菌种^[13]。

研究布鲁氏菌的致病性需要建立一个合理的动物模型,规范感染动物的操作,即可靠性、简易性、可重复性、安全性和经济性等^[7-9]。本研究以 BALB/c 鼠为动物模型,进行小鼠人工感染试验,以各组小鼠发病临床症状、病理变化、脾中菌含量等为指标来评价布鲁氏菌小鼠感染模型的疾病发生发展过程。

1 材料与方法

1.1 菌株

羊种布鲁氏菌强毒株 16M 株,购自中国兽医药品监察所。

1.2 试验动物及场地

BALB/c 雌鼠,购自新疆实验动物研究中心,许可证号:SCXK(新)2003-0002。BALB/c 雌鼠饲养于新疆天康生物技术责任有限公司 P3 级动物实验室。

收稿日期:2014-11-30

基金项目:新疆高技术研究发展计划(编号:201311102)。

作者简介:付湘云(1989—),女,新疆昌吉人,硕士研究生。E-mail:

daisy-fuxiangyun@foxmail.com。

通信作者:钟 旗。E-mail:yyyzqok@sina.com。

1.3 主要试剂

TS 培养基和布氏琼脂培养基,均购自 Becton and Dickinson company 公司。试管凝集实验(SAT)抗原,购自中国疾病预防控制中心传染病研究所。

1.4 细菌悬液的制备

将 16M 菌株划线接种于布氏琼脂培养基上,置于 37 ℃ 培养箱中培养 3 d。无菌挑取透明、边缘整齐,表面光滑湿润的单菌落接种于 TSB 液体培养基中,37 ℃ 培养 2 d 至菌的生长对数期,将菌液稀释成不同梯度并涂布于布氏琼脂培养基平板上,37 ℃ 培养 3 d 后计数。

1.5 BALB/c 鼠体内感染 16 M 株剂量的确定

取 35 只体质量 18 g 左右雌性 BALB/c 小鼠,将小鼠随机分为 7 组,每组 5 只 BALB/c 雌鼠。依次按照 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/只的剂量对每只小鼠进行腹腔注射接种,对照组注射同等剂量 PBS。

1.6 16M 毒力测定

取体质量 18 g 左右雌性 BALB/c 小鼠 5 只,以 16M 感染剂量接种小鼠,14 d 后剖杀,取脾脏称质量,加 PBS 1.0 mL 研磨成匀浆,取匀浆分别按原液 1:100、1:10 000 稀释液进行细菌分离、计数。计算 1 只 BALB/c 鼠 1 g 脾脏载菌量(CFU/g),并取其平均值。

1.7 病料采集

观察小鼠临床症状,分别在注射后第 7 天和第 15 天杀死对照组和试验组小鼠,采集血液及内脏组织。无菌取其心、肝、脾、肺、肾,脾脏一分为二称质量,4% 多聚甲醛固定,组织脱水、透明、浸蜡和包埋,常规方法制备石蜡切片,HE 染色,镜检,观察 BALB/c 鼠器官组织病理变化。脾脏部分加入 1.0 mL pH 值为 7.2 的 PBS 研磨成匀浆,10 倍系列稀释匀浆液,每个梯度取 100 μ L 稀释液进行细菌分离、计数,确定 16M 毒株感染剂量^[10]。

2 结果与分析

2.1 小鼠体内感染 16M 毒株剂量的确定

小鼠在感染 16M 强毒株后 15 d 内无死亡现象。分别于

第 1 周、第 2 周杀死试验组和对照组小鼠,采集血液进行抗体检测,无菌取脾脏研磨进行脾脏分菌,并计算其 1 g 脾菌数。由表 1 可知,BALB/c 鼠感染 16 M 强毒株后 7 d 内血清中未出现抗体;以 1×10^2 CFU/只感染小鼠,15 d 后小鼠血清中仍未出现抗体,但 7 d 后就已经从脾脏中可分到布鲁氏菌,说明

16M 强毒株对小鼠的最小感染剂量为 1×10^2 CFU/只。以 1×10^4 CFU/只剂量感染小鼠,15 d 后小鼠血清中出现抗体。因此,根据血清抗体效价结果和脾脏分菌结果最终确定 16M 强毒株感染 BALB/c 鼠的最佳剂量为 1×10^4 CFU/只。

表 1 羊种 16M 强毒株感染 BALB/c 鼠脾脏分菌情况

试验类别		腹腔注射(CFU/只)						
		PBS	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7
第 1 周	SAT	-	-	-	-	-	-	-
	脾脏分菌	-	+	+	+	+	+	+
第 2 周	SAT	-	-	-	++	+++	+++	#
	脾脏分菌	-	+	+	+	+	+	+

2.2 16M 毒力测定

以 1×10^4 CFU/只 16M 强毒株感染 BALB/c 鼠 5 只,小鼠无死亡。于 15 d 宰杀剖检小鼠发现小鼠脾脏肿大明显,分菌结果其平均每克脾脏载菌量为 9.50×10^6 CFU,说明 1×10^4 CFU 的剂量虽不能使小鼠致死,但对小鼠毒理作用很强。

表 2 羊种 16M 强毒株毒力测定

试验组	接种剂量 (CFU/只)	BALB/c 鼠数量 (只)	脾脏平均 载菌量(CFU/g)
16M	1×10^4	5	9.50×10^6

2.3 BALB/c 鼠组织器官临床症状及病理变化

小鼠感染后不表现明显的临床症状, 1×10^7 CFU/只剂量接种小鼠,其后期略表现精神不佳、食欲下降、被毛无光泽。剖检小鼠可见,脾脏肿大明显(图 1)。随着感染剂量的增加,小鼠脾脏质量呈上升趋势,第 2 周小鼠脾脏质量增加情况比第 1 周明显(图 2)。

由表 3 可知,脾脏分菌结果显示第二周分菌数量较第一周多, 1×10^2 、 1×10^3 CFU/只接种小鼠组分菌结果无明显差异,但 1×10^4 CFU/只接种小鼠组后分菌结果差异显著。

病理组织学切片结果(图 3)表明,与 PBS 对照组相比较,不同剂量试验组 BALB/c 鼠心脏、肺脏、肾脏都未见明显病理变化,肝脏和脾脏有明显病理变化。试验组脾脏出现脾小梁延伸、增宽现象、脾窦不同程度扩张充血;肝细胞不同程度水肿、间质血管充血、肝细胞损伤出血并出现造型坏死,部分区域炎性细胞浸润。

3 讨论

我国是布鲁氏菌病高发国家,近些年羊布鲁氏菌病的发病率有逐年递增的趋势,我国布鲁氏菌病的疫区由原来的十几个增加为 200 个以上,对人类健康、畜牧业发展、经济发展及畜产品的出口影响巨大,而近几年人间布病病例研究结果显示,羊种Ⅲ型布鲁氏菌是导致人间布病病例的重要病原^[6]。建立模拟自然感染状态下、临床症状相似的布鲁氏菌小鼠感染模型,可作为一种标准进行发病机制、疫苗保护力和判断菌株生存规律的研究,为病原生物学特性的基础研究提供平台。

目前应用于布鲁氏菌研究的实验动物很多,应用最多的主要有豚鼠、兔、大鼠、反刍兽以及非人类灵长类动物^[10],但由于大多数动物感染过程复杂,对环境要求严格、可重复性差

以及受到经济限制等因素,人们开始寻找替代动物。由于小鼠个体差异小,与人亲缘关系近,遗传背景清楚,环境要求低、操作简便等优点,小鼠作为试验对象来研究布鲁氏菌病已经成为潮流,但没有一种标准的操作规程。因此,建立小鼠的布鲁氏菌感染模型,可为药物筛选、疫苗评价奠定一定基础。

布鲁氏菌能通过呼吸道、消化道、皮肤及黏膜等途径传播^[1]。由于布鲁氏菌种型复杂,不同菌株毒力差别较大,确定感染剂量是本研究的关键。本研究将体质量差异不大的 BALB/c 雌鼠通过腹腔注射方式注射 16M 强毒株,感染剂量分别为 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/只,感染后第 1 周和第 2 周进行剖杀,收集血液分离血清做 SAT 血清学抗体检测,无菌条件下研磨脾,分菌并计算脾菌数。根据试验数据可知,腹腔注射 1×10^7 CFU/只组小鼠虽没有死亡,可能由于菌株保存时间过长或在稀释时部分流失,但小鼠普遍精神萎靡、食欲下降、被毛无光泽,且 2 周后剖检脾脏肿大明显,肝脏硬化;以 1×10^2 、 1×10^3 CFU/只感染组脾脏中虽分离到布鲁氏菌,但血清学检测未检测到抗体存在,说明该剂量毒株未达到在小鼠体内引起抗体反应的数量;从第 2 周宰杀的 1×10^4 CFU/只感染组开始就能检测到抗体的存在,但临床症状和病理变化不明显。考虑可能是细菌在长期纯化培养中毒力减弱,以及排除细菌计数出现的误差等因素,根据血清抗体效价和分菌所得脾菌数最终选择 1×10^4 CFU/只作为腹腔感染剂量。

通过观察小鼠组织病变发现小鼠感染布鲁氏菌后,脾脏是其侵害的主要靶器官,其次是肝脏,感染后 2 周脾脏内具有较高的细菌含量。但在 2 周的感染期内心脏、肺脏、肾脏无明显病变出现。

参考文献:

[1] 李金岭. 布鲁氏菌病的流行特点、症状及危害[J]. 兽医导刊, 2010(3):32,44.
[2] 薛青红,杜守山. 羊种布鲁氏菌分子生物学研究进展[J]. 中国兽药杂志,2004,38(12):26-30.
[3] 晁宜林. 家畜布鲁氏菌病流行情况调查与防控[J]. 山东畜牧兽医,2008,29(4):39-40.
[4] Cloeckaert A, Jacques I, Grilló M J, et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis[J]. Vaccine, 2004, 22(21/22):2827-2835.

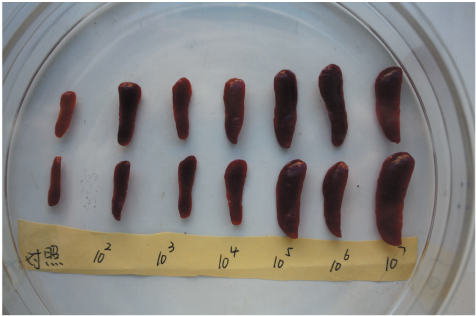


图1 试验组脾脏肿大

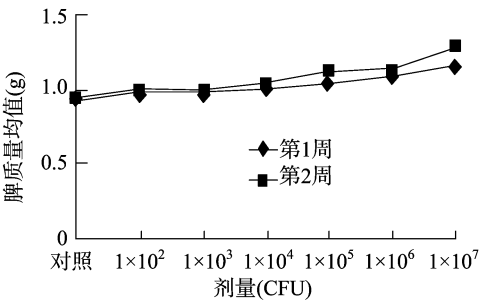


图2 16M 感染 BALB/C 鼠脾脏重量变化

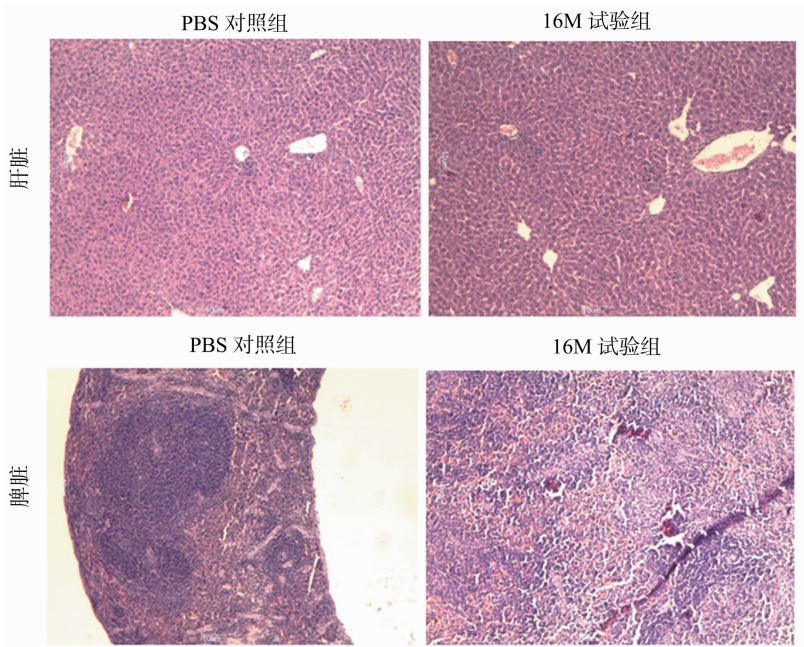


图3 16M 强毒株感染 BALB/c 鼠的病理组织学切片

表 3 脾菌数计算结果

接种剂量 (CFU/只)	脾菌数 (CFU/g)	
	第 1 周	第 2 周
1 × 10 ²	8.33 × 10 ³	4.17 × 10 ⁴
1 × 10 ³	4.32 × 10 ⁴	1.33 × 10 ⁵
1 × 10 ⁴	1.64 × 10 ⁵	9.50 × 10 ⁶
1 × 10 ⁵	1.67 × 10 ⁶	9.26 × 10 ⁶
1 × 10 ⁶	4.92 × 10 ⁶	2.87 × 10 ⁷
1 × 10 ⁷	8.75 × 10 ⁶	1.06 × 10 ⁷

[5] Elberg S S. A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis [M]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1981.

[6] Chen Y F, Ke Y H, Wang Y F, et al. Changes of predominant species/biovars and sequence types of *Brucella* isolates, Inner Mongolia, China[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 514 – 522.

[7] Campos E, Cravero S L, Delgui L, et al. *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 $\Delta bp26$: $luc \Delta bmp18$ double mutant lacking drug resistance markers[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 87(1): 1 – 13.

[8] 易新萍, 谷文喜, 李金平, 等. 评价牛型布鲁氏菌疫苗免疫保护力 BALB/c 鼠模型的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(6): 73 – 77.

[9] World Health Organization. Report of the WHO working group meeting oil brucellosis control and research; the development of new/improved brucellosis vaccine[R]. 1997.

[10] 李 勇. 布鲁氏菌小鼠感染模型的建立及在疫苗保护性评价中的初步应用[D]. 长春: 吉林大学, 2011: 19.

[11] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 649 – 651.

[12] 周晓艳, 陈燕芬, 崔步云, 等. 我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(5): 371 – 375.

[13] Jama'ayah M Z, Heu J Y, Norazah A. Seroprevalance of brucellosis among suspected cases in Malaysia[J]. Malaysian J Pathol, 2011, 33(1): 31 – 34.