

BCG-PPD 的制备及应用

薛 平 王国治 张雅珍¹ 邵建邦² 贾淑珍 寇丽杰 乔莱艳 许纯兰

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 用三氯醋酸 (TCA) 和硫酸铵 (AS) 综合法, 由卡介苗 (BCG) 培养滤液中提纯制得卡介菌素纯蛋白衍生物 (BCG-PPD)。BCG-PPD 的纯度和结核菌素纯蛋白衍生物国际标准 (PPD-S) 及中国标准 (PPD-C) 相近, 高于加拿大标准 (PPD-CT68) 和丹麦标准 (PPD-RT23)。在 BCG 免疫豚鼠中, BCG-PPD 的皮肤迟发型变态反应 (DTH) 大于结核菌素纯蛋白衍生物 (PPD) 的 DTH 反应。在结核菌感染豚鼠组中, BCG-PPD 的 DTH 反应小于 PPD 的 DTH 反应。在检查 333 名新生儿接种 BCG12 周后的免疫状况时, BCG-PPD 的阳性率和硬结反应均大于 PPD。在 97 名结核病患者身上, BCG-PPD 的 DTH 反应小于 PPD。本试验表明 PPD 制品在同种菌所致敏的机体上 DTH 的反应高于在异源菌种所致敏的机体上的 DTH 反应。本试验证明 BCG-PPD 用于考核 BCG 接种后的免疫效果优于 PPD。并揭示了用 BCG-PPD 和 PPD 作双臂试验可初步区分机体是 BCG 免疫还是结核菌感染。

关键词 卡介苗 (BCG); 卡介菌素纯蛋白衍生物 (BCG-PPD); 结核菌素纯蛋白衍生物 (PPD); 迟发型变态反应 (DTH); 阳转率

自 Koch 于 1890 年首次研制出结核菌素 (后被称为旧结核菌素, 简称 O.T) 以来^[1], 结核菌素的制备和应用等方面有了较大发展。本世纪 30 年代 Seibert 成功地从结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 培养滤液中分离出低分子量、无致敏性特征、稳定且有高反应性特性的蛋白质, 称为结核菌素纯蛋白衍生物, 简称 PPD^[2]。随着制备工艺的完善和改进, 出现了国际标准 PPD-S^[3]、丹麦 PPD-RT 23^[4]、加拿大 PPD-CT 68^[5] 和中国 PPD-C^[6] 等一系列的 PPD 制品。这些不同命名的 PPD 在诊断结核

菌感染、确定结核病和流行病学调查方面发挥重要作用, 同时也用于检查 BCG 接种后的免疫效果。但是这些 PPD 均由结核杆菌 *M.tuberculosis* 制成, 而 BCG 系牛分枝杆菌 (*M.bovis*) 减毒制成, 所以, 由于菌种之间差异的原因, 影响了用上述 PPD 检查 BCG 接种后免疫效果的特异性和敏感性。WHO 曾建议制备源于 BCG 的皮肤试验变态反应原, 用于 BCG 接种后免疫效果的考

1. 杭州市结核病防治院

2. 山东省胸科医院

核^[7]。我们首次从BCG培养滤液中制成了这样的皮肤试验变态反应原,命名为BCG-PPD。在检查BCG接种后免疫效果方面取得满意的结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种及来源

牛分枝杆菌 (*M.bovis*) BCG(CMCC* 94002): 来源于中国医学微生物菌种保藏管理中心。

(二)BCG 培养方法及培养液的制备

参照WHO的BCG培养方法^[8], 启开BCG菌种接种于骆氏鸡蛋培养基上^[9], 于37℃培养3周, 转种于苏通土豆培养基上^[9], 置37℃培养3周。挑选生长良好的菌膜移种于液体苏通培养液作表面培养, 置37℃培养2周。重复一次表面培养。然后将第二次液体苏通培养的生长旺盛的BCG作为种子, 转种于液体苏通培养液作大量培养, 置37℃培养8周, 以便BCG尽可能多地向培养液中分泌蛋白质。最后用高压蒸气121℃30分钟灭菌, 除去菌体, 得到含有BCG生长过程中分泌蛋白质的培养滤液。

(三)BCG-PPD 的制备

按TCA和AS方法制备BCG-PPD^[10]。

(四) 对照标准 PPD

国家标准品PPD-C(批号80-1): 由中国药品生物制品检定所提供。

(五)BCG-PPD 纯度测定

用微量凯氏定氮法测定BCG-PPD中蛋白浓度, 蒽酮法测多糖含量, 紫外法测核酸含量。

(六) 动物效力比较

将活BCG(75mg/ml)和死结核菌(100mg/ml)分别于豚鼠腹股沟皮下注射, 每只1ml, 两组各10只, 免疫6周后重复加强免疫一次, 至8周时将BCG-PPD和PPD-C分别稀释至1,000IU、200IU、40IU。于豚鼠背部皮内注射, 每只0.2ml 3种浓度的BCG-PPD和PPD, 测量24及48小时的硬结大小。

(七) 人体反应比较

BCG免疫组: 对新生的和3个月内接种BCG满12周的333名婴儿, 按同体双臂分别

于前臂掌侧皮内注射, 每人0.1ml(50IU/ml)的BCG-PPD和PPD-C, 72小时后测硬结反应大小。

结核病患者组: 对93名结核病患者按同体双臂分别于前臂掌侧皮内注射, 每人0.1ml(50IU/ml)的BCG-PPD和PPD-C, 72小时后测硬结反应大小。

试 验 结 果

(一) BCG-PPD 与其它 PPD 的纯度比较 (表1)

表1 PPD 纯度比较

制品	蛋白 (%)	核酸 (%)	多糖 (%)
BCG-PPD	97.60	1.38	0.91
PPD-C	96.50	2.00	1.30
PPD-S*	92.00	1.20	5.90
PPD-CT68*	86.70	4.20	0.40
PPD-RT23*	74.90	25.60	0.40

* 资料源于文献 [10]

从表1看出, 本试验测得的BCG-PPD和PPD-C数据与文献[10]中的PPD-S、PPD-CT68和PPD-RT23的数据相比较, 蛋白质占PPD组分的百分率以BCG-PPD为最高(达97.6%), 和PPD-C、PPD-S同属于高纯度PPD类, 远高于PPD-CT68(86.7%)和PPD-RT23(74.9%)。蛋白质之外的其它物质被视为残余杂质。PPD中核酸含量除PPD-RT23(25.6%)过高外, BCG-PPD和其余PPD的核酸百分率基本相近, 均在5%以内。PPD中多糖含量以PPD-S为最高(5.9%), BCG-PPD的多糖含量(0.91%)低于PPD-S高于PPD-CT68(0.40%)和PPD-RT23(0.40%)。

(二) 动物效力比较

在结核菌免疫豚鼠组中, 3种不同浓度单位的PPD-C在24和48小时的DTH硬结, 均

大于 3 种相应浓度单位的 BCG-PPD 在相应时间的 DTH 硬结 (图 1)。而在 BCG 免疫豚鼠组中, 情况正相反, 3 种不同浓度单位的 PPD-C 在 24 和 48 小时的 DTH 硬结, 均小于 3 种相应浓度单位的 BCG-PPD 在相应时间的 DTH 硬结 (图 2)。此结果表明在 BCG 致敏动物中, BCG-PPD 的反应比 PPD 更敏感和特异。在结核杆菌致敏动物中, PPD 的反应比 BCG-PPD 更为特异和敏感。

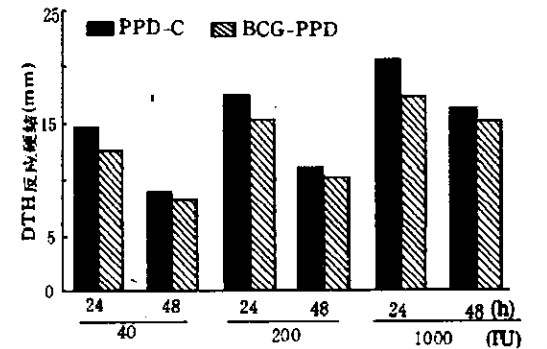


图 1 BCG-PPD 和 PPD-C 在 *M. tuberculosis* 致敏豚鼠上的 DTH 反应比较

(三) 人群反应比较

在新生儿组 (受 BCG 免疫) 中, 333 名婴儿无论阳转率还是 DTH 硬结大小均是 BCG-PPD 高于 PPD (表 2)。在结核病病人组 (受结核杆菌感染) 中, BCG-PPD 的 DTH 硬结直径小于 PPD, 阳性率基本一致 (表 3)。人体反应结果和动物反应一致, 均证实 PPD 对同种菌致敏的机体的 DTH 较异源菌更敏感。

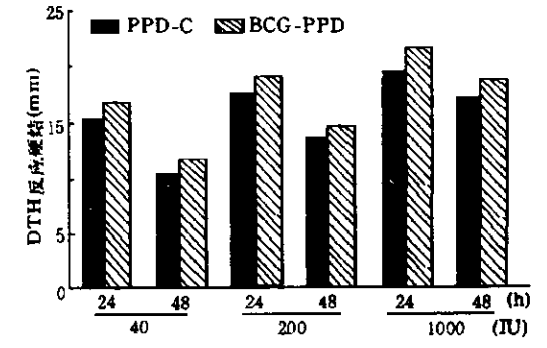


图 2 BCG-PPD 和 PPD-C 在 *M. bovis* BCG 致敏豚鼠上的 DTH 反应比较

表 2 BCG-PPD 和 PPD-C 在接种 BCG 婴儿上的 DTH 反应比较

制品	婴儿人数	阳转率 (%)	硬结平均直径 (mm)
BCG-PPD	333	90	8.6
PPD-C	333	86	7.6

表 3 BCG-PPD 和 PPD-C 在结核病病人上的 DTH 反应比较

制品	病人数	阳转率 (%)	硬结平均直径 (mm)
BCG-PPD	93	93.5	14.9
PPD-C	93	94.6	17.1

讨 论

无论动物试验还是人体反应试验均表明, 在 BCG 免疫的机体上 BCG-PPD 的 DTH 反应高于 PPD 的 DTH 反应。而 PPD 在结核杆菌致敏机体上的 DTH 反应, 又高于 BCG-PPD 在机体上的 DTH 反应。进一步证实了 PPD 在同源菌种致敏机体上的 DTH 反应, 强于在异源菌种致敏机体上的 DTH 反应。以表 2 为例, 如仅用 PPD 测试婴儿接种 BCG 后阳转率情况, 将有 4% 的 BCG 接种阳性婴儿被列为阴性, 需进行 BCG 复种。在已往的多次试验中证实, 大约有 5—10% 的 BCG 接种阳性婴儿被列为阴性 [7]。反之, 改用 BCG-PPD, 婴儿 BCG 接种阳转率就增加 5—10%, 使得这部分婴儿无需复种 BCG。提高了考核 BCG 接种效果的准确度和灵敏度。

当前, 关于如何鉴别结核杆菌感染还是 BCG 免疫的问题一直困扰着我们 [11]。历时多年的几个 BCG 现场实验也因此问题难以评价 BCG 的保护力 [12]。很多学者在这个问题上作了大量的尝试, 但结果均不甚理想 [13]。我们利用制备的 BCG-PPD 和 PPD 同时作双臂 DTH 反应, 对上述问题作了初步探讨。当 PPD 的 DTH 反应硬结大于 BCG-PPD 在同一群体的 DTH 反应硬结时, 可初步认为该群体为结核杆菌所感染。反之, 当 BCG-PPD 的 DTH 反应硬结大于 PPD 在同一群体的 DTH 反应硬结时, 可初步

认为是BCG免疫。如果进一步提高BCG-PPD和PPD各自的特异性抗原成分,使两者在同一机体上的DTH反应硬结有更大差别,相信会较好地解决免疫和感染这一难题。

各类PPD中参与DTH的主要物质是蛋白质,这种蛋白质为参与DTH的T淋巴细胞所识别,且不为血清抗体所反应。而多糖类物质并不被这类T细胞所识别,因而不参与机体的DTH反应^[14,15]。实际上多糖物质在血清学反应方面发挥着重要作用。因此大量多糖物质的存在会干扰PPD的DTH反应的灵敏度和准确性。同时,多糖物质的存在能导致PPD在使用过程中发生一些副反应。分离和降低多糖物质含量是制造各类PPD的最主要改进步骤之一。我们制造的BCG-PPD多糖含量低于PPD-S和PPD-C,略高于PPD-CT68和PPD-RT23。Youmans^[16]等证实核酸虽可作为免疫原产生保护力,但本身不导致形成DTH反应。核酸也被认为是PPD中的杂质。BCG-PPD核酸含量低于其它PPD制品,而和PPD-S接近。Landi报道同时用TCA和AS方法制备的PPD能降低多糖和核酸含量^[10]。BCG-PPD的纯度表

明,同时用TCA和AS方法制备BCG-PPD,能获得较高的纯度,而且优于仅用TCA法的PPD-RT23和仅用AS法的PPD-S。

参考文献

1. Burrows W: Textbook of Microbiology, 21st Edition, W.B.Saunders Company, pp.699 — 701, 1979.
2. Bendinelli M: Mycobacterium tuberculosis, Plenum Press, p.8 — 9, 1988.
3. WHO: WHO Technical Report, Ser. No 56, p.6, 1952.
4. Magnusson M: Bull. Wild. Hlth. Org., 19:829 — 843, 1958.
5. Landi S: Annali Sclavo, 22:899 — 907, 1980.
6. 朱滋英等:生物制品通讯, 8:273 — 276, 1979。
7. 黄建:河南预防医学杂志, 1:73 — 74, 1990。
8. WHO: WHO Technical Reports. Ser. No 638, p.116 — 147, 1979.
9. Chadwich M: Mycobacteria, John Wright & Sons Ltd., p.25 — 41, 1982.
10. Landi S: The Mycobacteria, Marcel Dekker Inc. p.505 — 535, 1984.
11. WHO: Childhood tuberculosis and BCG vaccine, EPI Update Supplement, 1989.
12. Fine P E M: Rev. Infect. Dis., 11:353 — 358, 1989.
13. Kochi A: Tubercle, 72:1 — 6, 1991.
14. Kniker W T: Am. Rev. Resp. Dis., 89:29 — 40, 1964.
15. Nagai, S.: Infect. Immun., 31:1152 — 1160, 1981.
16. Youmans G P: J. Bacteriol., 97:134 — 139, 1969.

(1992-6-12 收稿)

PREPARATION AND APPLICATION OF BCG-PPD

Xue Ping Wang Guozhi Zhang Yazhen Shao Jianbang
Jai Shuzhen Kou Lijie Qiao Laiyan Xu Chunlan

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological products, Beijing 100050)

BCG Purified Protein Derivative (BCG-PPD) was isolated and purified from BCG Culture filtrate by trichloroacetic acid and ammonium sulfate methods. The purity of BCG-PPD was similar to PPD-S(international standard) and PPD-C(China), but more than that of PPD-CT68 (Canada) and PPD-RT23(Danish). The Delayed-Type Hypersensitivity(DTH) to BCG-PPD was more sensitivity than other PPD on BCG vaccinated guinea pigs, but less sensitivity than other PPD on Mycobacterium tuberculosis infected guinea pigs. The conversion rate and induration diameter to BCG-PPD was higher than PPD in 333 of 12 weeks after BCG vaccination newborns, but lower than that of other PPD in 97 tuberculosis patients. It was shown that DTH reaction to PPD was more sensitivity in Mycobacteria homogeneous strain vaccinated individual than Mycobacteria heterogeneous strain vaccinated individual. It was demonstrated that BCG-PPD was better than other PPD on observation conversion rates and induration diameter of BCG vaccinated individual. It maybe help to identification BCG vaccinated or tuberculosis infected with DTH of BCG-PPD

and PPD in same individual.

Key words BCG; BCG Purified Protein Derivative (BCG-PPD) ; Tuberculin Purified Protein Derivative (PPD); Delayed-Type Hypersensitivity (DYH); Conversion Rates