

## 纯化布氏菌素的研制与应用\*

郝宗宇<sup>1</sup> 李恪梅<sup>1</sup> 张 莉<sup>2</sup> 张爱梅<sup>3</sup>  
吕家锐<sup>1</sup> 郭正印<sup>4</sup> 苏 城<sup>1</sup> 邓文斌<sup>3</sup>

(河南省地方病防治研究所 郑州 450003)

**摘要:** 用三氯醋酸和硫酸铵从布氏菌菌液中提取了纯化的布氏菌蛋白衍生物,对动物及布氏菌病人、布氏菌隐性感染者、布氏菌苗免疫者、肺结核和其他病人及健康人群做皮内变态反应试验。结果证明,该制品具有良好的皮肤变态反应原性,其特异性和敏感性与国际相关标准品完全一致;其显著特点是安全性好,无副作用,非特异性反应也大大低于现行菌素;同时提出了临床判定的阳性参考标准。

**关键词:** 纯化布氏菌素,研制与应用

**中图分类号:** R378.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0351-04

布氏菌病是一种由布氏菌所致的人兽共患传染病。1922 年著名免疫学家 Burnet 首次以布氏菌组份做皮肤试验诊断人群布氏菌病。70 多年来国内外有不少布氏菌病工作者,试制过各种类型的皮肤诊断制剂,用于人、畜布氏菌病的诊断和流行病学调查。我国现行的布氏菌素仍采用原苏联 60 年代的液体培养除菌滤液的生产工艺及标准<sup>[1]</sup>,其中的培养基成份、布氏菌的内毒素等杂质均能引起敏感机体的强烈超敏反应,有时还出现非特异性反应<sup>[2,3]</sup>。加之各国选用的制品不尽相同,诊断标准也不统一,给这些制品的规范化使用带来诸多不便。鉴于此,世界卫生组织布病专业委员会<sup>[4]</sup>和各国布病工作者一直期盼一种敏感性高、特异性强、反应性小、质量纯且易标准化的新型布病变态反应原早日应用于布病防治。在先前工作<sup>[5-8]</sup>的基础上,我们用除菌、盐析、酸沉淀等方法制备了纯化的布氏菌素并开展了较深入的研究,取得了理想结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

猪种布氏菌(Br.S2),由中国药品生物制品检定所冻干保存。

### 1.2 纯化布氏菌素参考标准品

法国 INRA 产品,1mg/支。

### 1.3 纯化布氏菌素

制备方法见[5]。

### 1.4 布氏菌素

北京高科生命科学技术公司,批号 97-1,有效期内使用。

### 1.5 试验动物

小白鼠,豚鼠均由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。

### 1.6 纯化布氏菌素的纯度测定

蛋白含量测定用 Lowry 法,多糖含量测定用蒽酮法,核酸含量测定用紫外分光法。

### 1.7 动物试验

**1.7.1 安全试验:** 选用 18~20g 昆明系小白鼠,经腹腔注射每只 150IU,试验 3 批,每批 3 只,腹腔注射后 7d 观察其存活情况。

**1.7.2 免疫:** 选用体重 300~400g 健康雌性白毛豚鼠按常规方法用布氏菌 104M 菌苗免疫。

**1.7.3 豚鼠皮肤试验:** 将致敏豚鼠背部脱毛,每只动物皮内注射试验样品均为 0.2mL,分别于 24h 和 48h 测量皮肤红肿反应,并计算其平均值。

\* 河南省科委九五重点科研课题(No.9712000300-7)

1 中国药品生物制品检定所

2 河南省结核病防治研究所

3 河南省卫生防疫站

4 河南洛阳地方病防治研究所

收稿日期:1998-05-05,修回日期:1998-10-20

1.8 现场观察

1.8.1 观察对象:布病病人:曾被确诊的布病患者。布病感染者:布病流行病学调查中证实为布氏菌素皮试阳性者。免疫人群:布病疫区经布氏菌苗免疫后 3 个月以上的免疫人群。结核病人:痰检涂阳的现症肺结核住院病人。其它感染病人:经血清学证实的呼吸道、消化道、接触感染的病毒、细菌、寄生虫住院病人。健康人对照:非布病疫区内,无明显布病流行病学接触史,无既往病史及临床症状体征、目前未患其它感染性、变态反应性疾病的健康青少年。

1.8.2 观察方法:登记:将上述各类对象按类别逐一登记并编号。标记:纯化布氏菌素应用于左臂,标记为左或“X”;菌素应用于右臂,标记为右或“J”。注射:两种制品均固定专人、专用注射器、固定手臂,以前臂掌内侧腕上 10cm 处常规皮肤消毒(不用碘酒),分别以 0.1mL 的剂量皮内注射。

1.8.3 观察时间:分别在注射后的 30min、24h、48h 各观察 1 次,必要时,个别人可延长观察时间。

1.8.4 观察内容:局部:红、肿、浸润及硬结。要与观察对象的正常皮肤相比较。全身反应:发热(量体温)、出汗、乏力、上肢酸、困、疼痛及淋巴管、淋巴结红肿疼痛,全身关节疼痛。虚脱、休克。局部注射处的速发型反应:注射后 30min 内观察注射处红晕、伪足等反应,以上观察内容应认真填写在相应表格内。测量反应面积:在观察的同时准确测量出红肿、浸润的长、宽直径,以 cm 为单位详细记录,并计算出其面积。

2 结果与讨论

2.1 纯化布氏菌素的制备

本次制备的 3 批纯化布氏菌素其布氏菌蛋白含量均达到 95% 以上。多糖、核酸含量均在 3% 以下(表 1)。

表1 三批纯化布氏菌素冻干后生化测定结果

批号	1	2	3
蛋白(%)	97.0	96.3	97.4
多糖(%)	1.8	2.5	1.9
核酸(%)	1.2	1.2	0.7

2.2 动物试验

2.2.1 安全试验:3 批小白鼠腹腔注射 1 周后,无一死亡,而且体重明显增加。说明安全性好。

2.2.2 效价标定:(表 2)。

表2 三批纯化布氏菌素与参考标准品  
动物标准化(mm)

批号	1			2			3			标准品
浓度	1:0.5	1:1	1:2	1:0.5	1:1	1:2	1:0.5	1:1	1:2	4IU
24h	11.6	15.3	17.3	14.6	16.8	17.5	14.9	17.0	18.1	16.5
48h	7.6	9.3	13.7	10.6	12.6	14.1	11.4	12.1	15.6	13.7
平均	9.6	12.3	15.5	12.6	14.7	15.8	13.2	14.6	16.5	15.1
比值	0.64	0.81	1.03	0.83	0.97	1.05	0.87	0.96	1.12	

从表 2 结果可以看出,我们制备的 3 批纯化布氏菌素,其预标剂量与参考标准品 4IU 比值均在  $1:1 \pm 0.2$  范围内,达到了国家生物制品规程上的合格要求。

2.2.3 致敏效应试验:实验组与对照组皮肤反应未见明显区别。

2.2.4 稳定性试验:两次稳定性试验结果均符合国家生物制品规程要求。

上述实验结果显示,纯化布氏菌素蛋白纯度高,可定量,质量也可控制,且易实现标准化。再者是便于生产。动物实验亦显示其具有良好的变应原性。

2.3 现场观察

本次现场观察,选择我省疫情较重的灵宝、陕县、宜阳、偃师、方城作为布病病人、隐性感染及免疫人群的观察点,郑州邙山区、叶县为非布病疫区健康人群观察点,河南省结核病防治研究所为结核病观察点,河南省卫生防疫站发热待查门诊作为其他病人观察点。共观察布病病人 682 例,隐性感染 683 例,免疫人群 397 例,肺结核病人 206 例,其他病人 80 例,健康人群 141 例。

2.3.1 纯化布氏菌素安全性效果观察:本次现场观察结果显示纯化布氏菌素的安全性优于现行市售菌素,表现为:

速发型反应发生率:布氏菌感染机体后导致的迟发型超敏反应已为大家所公认,近些年的实验研究又发现,变应原注入致敏机体后,局部皮肤可出现 Arthus 现象<sup>[6]</sup>,我们已往现场应用菌素时,也曾发现较多的局部速发型超敏反应,主要表现局部红晕及伪足。从生物制品的角度来看,肉汤等培养基成份及热原(LPS)等杂质可能是导致速发型反应的主要原因。本次 3 组人群观察结果显示纯化布氏菌素和菌素所致机体局部速发反应发生率有极显著差异(表 3)。

局部反应轻微:局部反应是指变应原注射部位在

表3 两种变应原速发反应发生率观察

人 群	观察 例数	菌 素		纯化布氏菌素		P值
		阳性数	%	阳性数	%	
布病病人	682	486	71.26	172	25.22	<0.01
隐性感染	683	345	50.51	94	13.76	<0.01
免疫人群	397	121	30.48	36	9.07	<0.01

24h 和 48h 后出现局部淋巴细胞浸润、疱疹样变、淋巴管向心性红肿至肘上甚至腋下、腋窝淋巴结肿大等表现。从本次现场研究发现,菌素可引起布病病人、隐性感染、免疫人群不同程度的局部反应,其发生率尤以布病患者为高 18.48%(126/682);其次为布病感染者 2.78%(19/683);较低的为免疫人群 0.5%(2/397)。结核病人、其它病人以及非布病疫区健康人群则不出现上述局部反应。而纯化布氏菌素在以上各类人群应用时均未发现局部反应。

未见全身反应:本次现场观察发现,肺结核病人、其他病人、非布病疫区健康人、布病隐性感染者以及布氏菌苗免疫人群均未出现明显的全身反应,唯布病病人表现为全身或四肢大关节疼痛(79/682)、乏力(19/682)、发热(10/682)、多汗(8/682)、纳差(4/682)等,未发现休克病例。

鉴于纯化布氏菌素、菌素两种变应源同时注入同一观察对象体内,难以辨别全身反应系何种变应原所致,我们又对某学校接受布氏菌苗免疫 3 个月后的 90 名学生,以每组 30 人分为 3 个观察组,分别观察单用纯化布氏菌素、菌素组及双用组的全身反应。结果除局部反应面积有差别外,3 组观察对象均未见明显的异常全身反应。虽然未对布病病人实施单独的全身反应观察,但用纯化布氏菌素侧除局部有小范围程度不同的红肿浸润外,尚无其它发现,而用菌素侧有上臂酸、困倦,淋巴管向心性红肿至腋下,同侧腋窝淋巴结肿大等表现,结合注射菌素的局部皮肤出现疱疹样变,似可证实全身反应主要系菌素所致。

2.3.2 纯化布氏菌素的诊断标准:作为诊断制品都涉及量化以及今后判定标准的制订问题。据了解,现行布氏菌素的阳性判定标准是国内外同类制品判定标准的 3~4 倍。从其制备工艺可看出,制品内含有培养基等非特异性成份,不能进行特异蛋白定量注射,亦不能与新型变应源纯化布氏菌素在同一水平上进行比较,用其原液实验时红肿反应明显偏大。为此,我们

首先对两种变应原皮内变态反应的面积进行了观察,结果显示在 3 组人群中,24h 及 48h 反应面积,菌素均大于纯化布氏菌素(表 4)。因此,在制订纯化布氏菌素的判定标准时,应考虑小于菌素 2.5×2.5cm 的现行标准。

表4 两种变应原不同时间反应面积观察(cm<sup>2</sup>)

人 群	观察例数	菌 素		纯化布氏菌素	
		24h	48h	24h	48h
布病病人	682	18.00	25.00	3.40	4.00
隐性感染	683	7.50	7.50	2.00	1.50
免疫人群	397	12.00	16.00	2.40	3.60

注:此组数据为非正态分布,表内数据取中位数表示。

纯化布氏菌素敏感性效果观察:敏感性是衡量制品的重要内容之一,鉴于上述反应面积的观察结果,我们对纯化布氏菌素组划定了若干个标准,分别计算其阳性率,经统计学处理,菌素组与纯化布氏菌素组 1.5×1.5、2.0×2.0、2.5×2.5 均有高度显著性差异(P 值均 < 0.01);而与纯化布氏菌素组 0.5×0.5、1.0×1.0 均无显著性差异(P 值均 > 0.05)。根据上述结果见表 5,我们认为纯化布氏菌素的阳性判定标准应从 0.5×0.5cm、1.0×1.0cm 中选择。

表5 不同判定标准(cm)的敏感性(阳性率%)比较

人 群	观察 例数	菌 素						纯化布氏菌素					
		2.5×		0.5×		1.0×		1.5×		2.0×		2.5×	
		2.5	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
布病病人	682	87.54	88.71	83.87	66.72	55.57	31.09	87.54	88.71	83.87	66.72	55.57	31.09
隐性感染	683	68.52	66.18	64.13	33.68	23.87	6.59	68.52	66.18	64.13	33.68	23.87	6.59
免疫人群	397	89.67	91.18	88.16	60.96	40.55	19.14	89.67	91.18	88.16	60.96	40.55	19.14

纯化布氏菌素特异性效果观察:布病的临床表现易与风湿、伤寒、结核、疟疾等疾病相混淆,其病人免疫血清与多种病原微生物均有交叉凝集反应<sup>[9~11]</sup>。我们以两种变应源对非布病患者进行了观察(表 6),3 个人群阴性率比较,经统计学处理,菌素组与纯化布氏菌素

表6 两种变应原特异性(阴性率%)观察

人 群	例数	菌 素		纯化布氏菌素	
		2.5×2.5 (cm)	0.5×0.5 (cm)	1.0×1.0 (cm)	1.0×1.0 (cm)
健康人	141	98.58	100.00	100.00	100.00
结核病人	206	98.06	99.03	100.00	100.00
其他病人	80	98.75	98.75	100.00	100.00

组  $0.5 \times 0.5$ 、 $1.0 \times 1.0$  均无显著性差异 ( $P$  值均  $> 0.05$ )，鉴于菌素组与纯化布氏菌素组  $0.5 \times 0.5$  均出现了个别假阳性，而纯化布氏菌素组  $1.0 \times 1.0$  尚未发现阳性反应，因此建议纯化布氏菌素的阳性判定标准以  $1.0 \times 1.0\text{cm}$  为佳。

### 3 结论

动物实验及现场观察显示，纯化布氏菌素为纯度高、毒副作用小、非特异反应少、敏感性好、易标化的新型布鲁氏菌病诊断制剂，推广后，将为国内外布病防治提供一种优质的新制品。

致谢 对参加本项工作的夏仲禹、白聚仓、于心安、兰正周、张秀成、申宝霞、李 鸣等同志表示感谢。

### 参 考 文 献

[1] 卫生部编. 中国生物制品规程(一部). 北京: 中国人

口出版社, 1996. 283.

- [2] 王淑琴. 地方病通报, 1992 7(2): 29.
- [3] 高秀萍. 内蒙古地方病防治研究, 1993 18(3): 113.
- [4] FAO / WHO Expert Committee on brucellosis, Six report technical report series 740, World Health Organisation. Geneva. 1986, 100.
- [5] 李格梅, 王国治, 黄 建等. 中国地方病防治杂志, 1995, 10(5): 268.
- [6] 黄 建, 李格梅. 微生物学通报, 1991, 18(3): 149.
- [7] 张爱梅, 郝宗宇, 吕家锐等. 中华流行病学杂志, 1993, 14(特 8): 60.
- [8] Hao Zongyu, Xie Changli, Zhang Aimei. ICCV VII, 1992, 90.
- [9] 谢世宏, 姜顺求. 中国地方病学杂志, 1985, 4(2): 151.
- [10] 黄 健. 中华流行病学杂志, 1982, 3(1): 30.
- [11] 张爱梅, 郝宗宇, 吕家锐等. 中国卫生检验杂志, 1997, 7(5): 284.