

# 布鲁氏菌变态反应原的研究

## 2. 新制菌素的敏感性和化学成分

黄建 王菱章

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

**摘要** 我们用牛、羊、猪三个种的布鲁氏菌弱毒菌种, 分别制出牛、羊、猪及三个种混合的4种菌素, 发现猪种菌素致敏性较强, 又用猪种菌作短期(4和7天)间歇振荡培养和长期(14和28天)静止培养, 制出另外4种菌素。生化检测这8种菌素的总氮量和蛋白量相近。还观察到用牛、羊、猪三个种布鲁氏菌分别致敏豚鼠, 皮肤试验结果未见有明显差别。

**关键词** 布鲁氏菌新菌素; 改良法

布鲁氏菌素用作皮肤试验抗原诊断布鲁氏菌感染, 是一种敏感和特异的方法。但布鲁氏菌素的生产方法和质量无大改进, 在使用中常发现批次之间反应强度不一。为了查明原因, 稳定制品质量, 我们从生产菌种和培养方法方面进行了比较试验。所得结果将为改进我国现用菌素的生产菌种和培养方法提供数据。

### 材料和方法

#### (一) 菌种

牛布鲁氏菌 *Brucella abortus*(104M)、羊布鲁氏菌 *B. ovis*(M5) 和猪布鲁氏菌 *B. suis*(S<sub>2</sub>) 均为本所冻干保存菌种, 经传代后备用。

#### (二) 培养基

菌种传代用肝浸液琼脂斜面<sup>[1]</sup>; 生产菌素用普通肉水。

#### (三) 成品菌素

兰8301为兰州生物制品研究所生产。京8301为北京生物制品研究所生产。两批菌素均为效期内合格制品。

#### (四) 生产方法

1. 第一次制备: 用静止培养法, 共制得4批菌素, 即牛、羊、猪菌素和三者的混合菌素。

2. 第二次制备: (1) 静止培养法, 共制成两批, 即静止培养14天的静14猪菌素和静止培养28天的静28猪菌素。

(2) 振荡培养法: 将牛、羊、猪种布氏菌斜面培养物接种肉水后, 用磁力搅拌器37℃振荡培养, 每天振荡3—4次, 每次2小时, 共制成两批, 即振荡培养4天的振4猪菌素和振荡培养7天的振7猪菌素。

上述8种菌素, 均按“生物制品规程”中布氏菌素生产规程的要求<sup>[2]</sup>进行检定。另外以不接种布氏菌的肉水作为对照。

#### (五) 皮肤试验

1. 动物: 白毛豚鼠, 体重250g, 共20只。用104M、M5和S<sub>2</sub>菌种分别培养制成菌液, 浓度为每毫升20亿菌。用此菌液分别免疫动物, 后腿皮下注射每只0.5ml。每组5只, 另有5只不免疫做为对照。免疫后三个月备用。

2. 皮试: 在免疫动物背部两侧脱毛处, 分别用不同种类的菌素和对照液进行皮内注射。每只动物注射6—8个样品, 每个样品注射0.1ml, 相互间隔约2—3cm。

3. 判定: 注射后24和48小时各观察一次, 量出局部红肿和浸润面积。以公式(长×宽)/2, 分别求出每组动物的平均数和标准差<sup>[3]</sup>。

#### (六) 生化测定

1. 总氮: 用凯氏微量定氮法测定<sup>[4]</sup>。

2. 蛋白: 用福林酚法测定<sup>[4]</sup>。

3. 糖量: 用蒽酮法测定<sup>[5]</sup>。

4. 磷量: 用过氯酸法测定<sup>[9]</sup>。

## 实验结果

### (一) 各类菌素的检定结果

新制 8 种菌素按“规定”作成品检定, 结果全部合格。

### (二) 生化测定结果

各类菌素的总氮、蛋白、糖量和磷量的测定结果见表 1。

表 1 各类菌素化学成分测定 (单位: mg/ml)

次数	菌素类别	总氮	蛋白	糖	磷
1	牛菌素	3.34	11.9	0.675	9.6
	羊菌素	3.65	11.9	—	9.6
	猪菌素	3.65	11.0	0.610	9.6
	混合菌素	3.59	12.2	0.770	9.0
	京 8301 菌素	3.59	10.2	—	11.8
	兰 8301 菌素	3.45	5.4	0.975	10.5
2	振 4 猪菌素	2.43	14.0	—	
	振 7 猪菌素	2.60	15.0	1.145	
	静 14 猪菌素	2.93	14.9	0.760	
	静 28 猪菌素	3.05	14.9	1.225	

从表 1 结果看出: 第 1 次的各菌素之间的总氮、蛋白、糖、磷量相近, 第 2 次的各菌素之间

亦相近, 但兰 8301 菌素的蛋白量很低, 只有其它菌素一半。

### (三) 豚鼠皮肤试验结果

1. 不同菌种致敏豚鼠皮试结果: 用牛、羊、猪三个种的布氏菌致敏的三组豚鼠, 再分别用新制菌素(静止培养的 6 种菌素平均值)和成品菌素(兰 8301)致敏对照观察。不同菌种对豚鼠的致敏强度见表 2。

表 2 不同菌种致敏豚鼠皮肤试验结果 (单位: mm)

动物组别	自制菌素		兰 8301	
	24h	48h	24h	48h
猪种免疫组	18.1±0.9	13.5±1.8	8.8±0.5	1.6
牛种免疫组	18.5±1.5	12.0±1.3	10.6±3.1	0
羊种免疫组	21.1±1.6	16.8±2.4	11.4±3.1	4.4
对照组		/	1.4	0

由表 2 看出: 不论 24 或 48 小时, 不同菌种对豚鼠的致敏强度稍有差异, 但不显著。兰 8301 成品菌素对各组动物的致敏反应均弱。

2. 不同菌种制备的菌素敏感性比较: 牛、羊、猪三个菌素及三个种混合菌素的敏感性比较结果见表 3。

表 3 不同种菌素的敏感性比较 (单位: mm)

组别	观察时间 (小时)	牛菌素	羊菌素	猪菌素	混合菌素	兰 8301	对照
S <sub>2</sub> 致敏动物	24	17.4	16.8	19.0	18.2	8.2	0.8
	48	10.8	11.8	15.8	14.0	3.2	0
M5 致敏动物	24	16.2	17.0	19.0	19.9	5.6	0
	48	8.0	11.2	14.0	14.0	0	0
104M 致敏动物	24	20.6	21.8	23.6	20.6	11.4	2.2
	48	15.6	17.8	19.6	19.2	4.4	0
总计	24	18.0±2.2	18.5±2.5	20.5±2.7	19.6±1.2	8.6±2.9	1.0
	48	11.5±3.8	13.6±3.3	16.5±2.9	15.8±2.9	2.5±2.2	0

表 4 不同培养方法所得布氏菌素的敏感性比较 (单位: mm)

观察时间 (小时)	振 4 猪菌素	振 7 猪菌素	静 14 猪菌素	静 28 猪菌素	京 8301	兰 8301	肉水
24	18.4±2.1	20.2±2.9	21.8±2.9	20.6±2.6	16.2±1.6	11.4±3.2	2.2
48	13.6±1.3	19±1.0	21.6±0.5	15.2±1.9	15.8±1.3	4.4±3.6	0

从表 3 看出: 从牛、羊、猪三个种的菌素致敏的动物组来看, 均以猪菌素的皮肤变态反应最强, 尤其 48 小时的结果最显著, 兰 8301 菌素的敏感性最差。

3. 不同培养方法的菌素敏感性比较:  $S_2$  菌种分别经振荡培养和静止培养后, 所得菌素的敏感性见表 4。

从表 4 看出: 不论 24 或 48 小时所得结果、振 4 猪菌素比振 7、静 14 和静 28 猪菌素的皮肤变态反应稍差, 但与京 8301 菌素相近, 高于兰 8301 菌素。振 7 猪菌素与静止培养的猪菌素反应结果相近。

## 讨 论

从本次试验所得结果看出以下几个问题。

1. 我国主要以羊种布氏菌为主要传染源, 但在局部地区也有以牛种或猪种布氏菌为主要传染源, 为了考核布氏菌菌素对不同种的布氏菌感染后致敏机体反应有无不同, 故用三个种布氏菌致敏动物, 在同一条件下注射菌素进行对比, 从表 2 看出, 三个组稍有差异, 以牛种菌致敏的动物对菌素反应稍高, 其次为猪种菌致敏组, 羊种菌致敏组反应为轻。这一结果可在用菌素进行布氏菌病普查时予以注意。进一步应考虑在羊种菌感染地区, 皮试阳性标准也应有所不同。

2. 菌素的生产一直是用静止培养一个月后弃菌的滤液。本试验改用振荡培养 4 天和 7 天, 静止培养 14 天和 28 天, 结果证明: 振荡培养

7 天能得到较好的效果。若进一步改变振荡条件, 增加振荡时间, 可能还会得到更好的效果, 大大缩短培养时间。另外还发现静止培养 14 天的结果与 28 天的相似。说明生产菌素的经典方法是可以改进的。

3. 生产菌素一直沿用牛、羊、猪三个种的布氏菌培养液混合而成。这三个种的菌素是有交叉反应的, 存在着共同抗原决定簇。试验比较了三个种的菌素及三个种的混合菌素对致敏动物变态反应的强弱。结果说明致敏动物变态反应的强弱与菌种有关, 混合型菌素并不高于单一型菌素, 在菌种中以猪种菌较好, 其生产的菌素致敏性较强。如表 3 所示, 尤以 48 小时的结果更为明显。还值得提出的是, 兰 8301 批引起的皮肤反应很弱, 比本试验制备的任何一种菌素均差, 这是一个需要重视的问题, 否则会给防病工作带来不利。但从表 1 的化学成份分析中看到, 兰 8301 蛋白量为 5.4mg/ml, 比其它各类菌素的蛋白量低一倍, 反应弱可能与此有关, 说明成品菌素的检定, 应增补其它方面的检测方法(蛋白量等), 以保证每批制品质量的稳定性。

## 参 考 文 献

- [1] 孙承恩等: 布鲁氏菌病, 宁夏人民出版社, 1985。
- [2] 中华人民共和国卫生部: 生物制品规程, X 诊断用品, 2-01-03, 1979。
- [3] 黄建等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(4): 236-239, 1982。
- [4] 朱俭等: 生物化学实验, 上海科学技术出版社, 1981。
- [5] 卢东升等: 中华医学杂志, 60(9): 531, 1980。