

布鲁氏菌变态反应原的研究 V. 犬种菌的变态反应原性

黄建 马丽君

(中国药品生物制品检定所)

杨瑞芬

(北京丰台铁路卫生学校)

摘要 我们按照规程要求制备了犬种菌素。它在致敏豚鼠和人体中证明了：它虽为粗糙型菌种，但仍具有变态反应原性；用死菌液 10 亿/0.1ml 给致敏动物作皮试，亦出现良好的变态反应。24 小时反应强度为 15.8—18.4mm；48 小时为 6.8—10.8mm。犬种菌液热处理后，其上清液经硫酸铵透析，取其粗提蛋白作为变态反应原，用 50μg/0.1ml 给致敏动物作皮试，经犬种菌免疫的动物出现弱变态反应（24 小时均在 10mm 以下），经活菌苗致敏的动物出现较强的变态反应（24 小时为 13—14mm，48 小时为 10.5—11mm）。犬种菌的变态反应原性无种间特异性。

关键词 犬种布鲁氏菌；变态反应原

近年来，我国许多省、区从家犬中分离出犬种布氏菌^[1]，并就其生物学特性^[1-3]、电镜形态结构^[3]、致病力^[1-3]等方面作了广泛的研究。同时对免疫机体所产生的抗体性质也进行了有价值的探讨^[1,4,5]。但它引起机体细胞免疫的特点如何？国内尚未有人观察。为此，我们仅从其

对机体产生的变态反应原性这个侧面，来观察它所产生的细胞免疫现象。在我们以前的研究中证明：引起机体变态反应的主要成分是菌体蛋白及其生长代谢产物^[6-8]。为此，参照以前的经验，本文取犬种菌的代谢产物和热处理后提取的蛋白成分，对免疫动物作了皮肤变态反应

试验,还用犬种菌素对疫区人群作了皮试。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 国际参考菌种 RM6/66 (犬种): 本所保存。

2. 地方菌种: 犬₃、犬₄、犬₁₁₋₂和犬₂₂₋₁均为广西分离的犬种布氏菌代表株。

(二) 各类变态反应原

1. 菌体变态反应原: 将犬₃、犬₄、犬₁₁₋₂和犬₂₂₋₁菌液加热 80—85℃ 杀死,比浊稀释为 10^{10} 菌/ml,经无菌试验合格后备用。

2. 耐热蛋白变态反应原:

(1) 将 RM6/66 和犬₃、犬₄、犬₁₁₋₂、犬₂₂₋₁五株菌于肝琼脂斜面上生长的菌苔刮下制成菌液,浓度为 5×10^9 菌/ml,取 30ml,于 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 加热 30 分钟,离心两次,取上清液加等量饱和硫酸铵,于 4℃ 过夜,再离心,取沉淀物洗涤 2 次,透析,存放冰箱。

(2) 用 Folin 酚法测定各菌蛋白量^[6]: 测出五株菌的蛋白量后,其浓度均调整到 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 备用。

3. 布氏菌素: 兰州生物制品研究所生产的制品,批号为 85002,在有效期内使用。

4. 犬种菌素: 按成品菌素的生产检定规程进行制备^[8]。

5. 冻融变态反应原: 系用猪种布氏菌 (*S*₂株)制造。即制成菌液后,于 80℃ 加热 30 分钟灭活,浓度约 5×10^{10} 菌/ml,放入三角瓶,分别于 -30℃ 和 37℃ 交替作用,先后共 5 次,涂片检查可见大部分细菌破裂。经离心,去沉淀物,透析,用蒸馏水稀释至一定浓度,用 Folin 酚法测出每毫升中的蛋白量。冰箱存放备用。用时按要求稀释至所需浓度,再给动物作皮肤试验。

(三) 动物

用体重为 250—300g 豚鼠 30 只,其中 10 只用 RM6/66 死菌作皮下免疫;10 只以人用布氏菌活菌苗作皮下免疫;另外 10 只不免疫作为对照。动物经皮下免疫 3 个月后即可用于皮肤试验。再次使用时则加强一次免疫。

(四) 皮肤试验

试验方法及结果判定见文献[6,8]。

结 果

(一) 四株犬种菌体变态反应原皮肤试验结果

用犬₃、犬₄、犬₁₁₋₂、犬₂₂₋₁四株菌体变态反应原作皮肤试验。在活菌苗致敏的豚鼠背部拔毛处,分别将四株犬种菌液皮内注入 0.1ml (含 10^9 菌)。24 及 48 小时后测定局部红肿反应(见表 1)。

从表 1 结果看出,犬种布氏菌具有较好的变态反应原性,均以 24 小时为显著。

表 1 四株犬种菌体变态反应原皮肤试验结果

观察时间 h	变态反应原反应结果(mm)			
	犬 ₃	犬 ₄	犬 ₁₁₋₂	犬 ₂₂₋₁
24	18.4 ± 2.4	15.8 ± 3.3	17.5 ± 2.5	16.1 ± 1.8
48	10.0 ± 2.2	6.8 ± 3.3	10.8 ± 2.9	9.5 ± 2.7

(二) 犬种菌变态反应原性的观察

为了观察犬种菌变态反应原性,将 30 只豚鼠平分三组,一组以人用活菌苗免疫,一组用 RM6/66 死菌免疫,另设不免疫的对照组。再用犬种菌的四个变态反应原,分别给每组的每只动物皮内注入 0.1ml (含 $50\mu\text{g}$ 蛋白),分别于 24 和 48 小时观察结果(表 2)。

从表 2 看出,四种粗提耐热蛋白变态反应原对人用活菌苗免疫的豚鼠,均具有较好的变态反应原性,而对 RM6/66 死菌免疫的豚鼠,其变态反应原性较弱,均不明显,48 小时反应已近消失。

(三) 强化 RM6/66 免疫动物的致敏性

为了观察强化 RM6/66 免疫动物的致敏性,经一个月后,又用 RM6/66 死菌 (2×10^9 菌/ml)再给每只豚鼠皮下注射 0.5ml,使之二次免疫。同时用布氏菌素和犬种菌素与 RM6/66、犬₃、犬₄、犬₁₁₋₂、犬₂₂₋₁耐热蛋白变态反应原作对比观察,结果见表 3。

从表 3 看出,用 RM6/66 免疫的豚鼠经加

表 2 粗糙的耐热蛋白变态反应原皮肤试验

免疫组	观察时间 (h)	各变态反应原反应 (mm)			
		RM6/66	犬 ₃	犬 ₄	犬 ₁₁₋₁
人用活菌苗免疫	24	14.0±1.6	14.0±0.8	13.0±1.0	14.0±2.8
	48	10.8±3.0	10.0±1.2	10.8±1.0	10.5±0.6
RM6/66 死菌免疫	24	5.5±1.0	5	5.0±1.0	—
	48	3	3	3	—
未免疫	24	2	1.5	2	1.5
	48	0	0	0	0

表 3 RM6/66 死菌免疫动物加强致敏后的皮肤试验结果

观察时间 (h)	各种变态反应原反应 (mm)					
	布氏菌素	犬种菌素	RM6/66	犬 ₃	犬 ₄	犬 ₁₁₋₁
24	12.5±1.7	12.5±0.6	6.5±1.7	7.0±1.4	6.3±1.2	6.0±2.0
48	9.0±0.5	5.0±1.2	5.0±1.2	5.0±1.2	5.3±1.9	4.4±2.2

表 4 耐热蛋白与冻融蛋白变态反应原反应的比较

观察时间 (h)	布氏菌素	冻融蛋白反应 (mm)			耐热蛋白反应 (mm)		
		100 (μg/0.1ml)	50 (μg/0.1ml)	25 (μg/0.1ml)	100 (μg/0.1ml)	50 (μg/0.1ml)	25 (μg/0.1ml)
24	15.8±4.3	17.5±8.7	21.3±2.5	13.0±4.3	8.8±2.5	3.8	2.7
48	15.0±2.8	14.5±6.7	10.0±5.7	6.3±6.0	2.7	0	0

强免疫后致敏性有提高,表现在皮肤试验时,对 RM6/66 等五种耐热蛋白变态反应原的反应强度比一次免疫时(表 2)有所增高,但仍不如人用活菌苗一次免疫的好。同时还看出,两种菌素的变态反应原性均较五种耐热蛋白为好。

(四) 比较不同剂量的耐热蛋白和冻融蛋白变态反应原对形成变态反应强弱的影响

用加强后的 RM6/66 免疫组豚鼠,比较犬、耐热蛋白和冻融蛋白变态反应原的不同剂量(25、50、100 μg/0.1ml),对形成变态反应强弱的影响,同时与布氏菌素比较(表 4)。

从表 4 看出,冻融蛋白变态反应原优于犬、耐热蛋白变态反应原,其 50 μg/0.1ml 的剂量在 24 小时内即能达到布氏菌素的反应水平,但 48 小时后明显下降。

讨 论

1. 通过本次试验,基本上证明了犬种菌虽为粗糙型菌,但仍具有变态反应原性。犬种菌素和五个犬种菌的耐热蛋白,均能使活菌苗致敏的豚鼠产生明显的变态反应(表 1, 2)。

2. 用犬种菌致敏动物,在皮肤试验时出现的变态反应比用活菌苗弱(表 2)。经加强免疫,仍不如活菌苗。其原因可能与死菌的致敏性比活菌差有关。

3. 从试验中看出,各类变态反应原的变态反应原性,以各种菌素最好,其次为冻融蛋白,耐热蛋白最差(表 4)。其原因可能与制备方法有关。因后者经热处理后,可能使某些变态反应原成分被破坏,而冻融蛋白虽比耐热蛋白好,但

也不如菌素中的代谢产物——有效蛋白成分齐全,因此菌素的变态反应原性最好。它对致敏性较弱的动物(如 RM6/66 死菌致敏),也能测出反应原性。又如在犬种布氏菌病流行区用犬种菌素给88人作皮肤试验^[9],有 8 例阳性(9.1%),也表明了菌素具有较强的变态反应原性。

参 考 文 献

1. 黄建等: 中国地方病防治杂志,5(2): 96,1990。

2. 黄志雄等: 中国人兽共患病杂志,4(5): 13,1988。

3. 谢念铭等: 微生物学报,28(4): 371,1988。

4. 杨静华等: 宁夏医药杂志,5(6): 326,1987。

5. 杨静华等: 中国地方病防治杂志,5(1): 12,1990。

6. 黄建等: 微生物学报,25(3): 270,1985。

7. 黄建等: 微生物学通报,27(1): 83,1987。

8. 卫生部: 生物制品制造及检定规程,人民卫生出版社,北京,2-01-03,1979。

9. 黄志雄等: 地方病通报,2(1): 1,1987。