

布鲁氏菌苗的免疫研究

I. 布鲁氏菌皮上接种的动物试验*

陸士夏 刘德铨 陈正仁

(卫生部生物制品研究所, 北京)

目前已有許多活菌苗, 例如卡介苗、土拉伦菌苗和鼠疫菌苗等, 都采用皮上接种的免疫方法。在布鲁氏菌苗方面, Смирнов^[1] 及 Вершилова^[2] 等都曾經提到皮上菌苗的应用, 同时在我国, 皮上接种的布鲁氏菌苗近年亦已大量地应用。为了对布鲁氏菌苗的皮上接种的特点及其免疫效力作进一步的探索, 我們用試驗室动物进行研究观察, 以便了解皮上接种后布鲁氏菌进入机体的时间和数量的关系、不同剂量和划刺方法的效果、菌种的选择以及免疫力試驗等等。这些試驗資料都能为布鲁氏菌苗的皮上接种免疫提供实验根据。

試驗方法

1. 皮上接种方法 选用 300—400 克豚鼠, 于背部两侧用脫毛剂处理脫毛后, 每处滴上 0.05 毫升布鲁氏菌液。用四股一排固定好的钢针作交叉划刺。划刺后用屯头揉磨划刺处十余次。划刺强度以不出血而随后有可见痕道为宜。

2. 动物内脏定量分离培养 击杀动物后, 解剖取出 4 种脏器作定量分离培养: 即 (1) 划刺处皮下组织 (刀片刮取); (2) 淋巴结 (包括全部鼠蹊, 腋下, 颞下, 颈和副主动脉淋巴结); (3) 脾脏和 (4) 肝脏。肝脏先称总重量然后取 1/8—1/10 量作分离培养。将上述脏器剪碎, 分別移入玻璃研磨器內, 加入少許细玻璃粉用力磨碎, 并加入定量生理盐水即可得脏器悬液。根据实验时脏器的活菌数会有差别, 将脏器悬液作不同倍数稀释, 或不做稀释。然后每稀释度接种 0.1 毫升于平皿培养基中, 至少 3 个。经 37°C 培养 4—10 日后计算平皿中布鲁氏菌落生长数。根据菌落数量推算出全部脏器应有的活菌数。此外在解剖时, 还取心血, 骨髓 (两侧股骨), 胆囊及膀胱做平皿培养, 计算菌落生长数。脏器悬液做涂片, 显微镜下检查可观察到仅有极少数完整细胞。

分离培养用的培养基是厚金格尔琼脂 (猪胰脏消化牛肉) 加 0.2% 活性炭。每批培养基用前均经过质量检查。

3. 免疫力試驗 经各种途径及不同剂量免疫 350—400 克豚鼠 30 日后, 用羊型 13 号布鲁氏菌皮下感染。再经 30 日后将动物剖杀, 取淋巴结、脾和肝脏分別接种培养。凡有布鲁氏菌落生长者均用硫堇染料纸片及醋酸铅纸条 (硫化氢反应) 作菌型鉴别。免疫动物分离培养时有羊型菌生长者算作未能得到免疫保护。每次试验均有对照动物做羊型毒菌感染。对照动物解剖分离培养时, 除做上述内脏分离培养外, 还取心血, 骨髓培养。凡对照动物的脾、肝脏或骨髓、心血中一项培养阳性者作为全身性感染。

4. 菌液活菌計数 免疫及毒菌感染时, 所用菌液均测定其活菌数。按卫生部药品生物制品检定所发给的标准仿苏玻璃粉的细菌比浊管肉眼测定菌液细菌浓度。调整菌液浓度至每毫升 10 亿菌, 然后作

* 在同位素工作中曾与本所苏万年, 邓玉平和周爱婷等同志合作。

本文为中国微生物学会 1964 年学术年会特稿。

10 倍稀释至按比浊菌数计算,每 0.1 毫升有 10 个菌浓度时,接种平皿,经 37℃ 4 日后计算菌落生长数。按进行过的 25 次活菌计数计算平均 10 个菌有 33.6 个菌落生长,计算标准差为 ± 5.7 ,误差系数 16.6%。因此文内所列细菌数字除写明是活菌外,均系比浊所得菌数,此外不另注明菌液的相应活菌数。

5. 同位素试验 将布鲁氏菌接种在含有 P^{32} 的肝浸液琼脂上。培养基的 P^{32} 放射性调整为每毫升培养基有 800 万脉冲/分钟。培养后洗下菌苔,离心沉淀 4 次,去上清液。取每毫升含菌 10 亿之菌液 0.5 毫升测定放射性。结果平均可得 19,046 脉冲/分钟。将带有 P^{32} 的布鲁氏菌接种动物后取内脏称重,将 100 毫克脏器剪碎,加入 2N NaOH 液乳化,烤干后测定放射性。定标器计数效率为 3.8%,本底为 21—23 脉冲/分钟。

6. 菌种 免疫用弱毒布鲁氏菌牛型 19-BA, 牛型 104M 及牛型 19 菌株均系得自卫生部药品生物制品检定所。牛型 40 毒菌得自农业部兽医生物药品监察所,自北京奶牛分离取得。羊型 13 毒菌,1955 年自内蒙古自治区病人分离取得。上述菌株均用冷冻干燥法保存。

试 验 结 果

1. 皮上感染布鲁氏菌后豚鼠体内的活菌数量 布鲁氏菌皮上感染豚鼠后经过多长时间细菌即能进入动物体内,进入的数量和分布情况如何都可以通过感染豚鼠后定期、定量分离培养进行观察研究。我们用 19-BA 布鲁氏菌在肝浸液斜面上 48 小时培养后,洗下制成菌液,调整浓度使每毫升含菌 400 亿。在皮上划刺 0.1 毫升(即 40 亿)后,经 15 分钟、1 小时、3 小时及 24 小时解剖分离培养。每次用 3 只豚鼠。所得结果见表 1,说明皮上感染 15 分钟后即有大量布鲁氏菌进入体内并且立即散布全身。

在皮上感染布鲁氏菌后较长的时间内,即 15 到 180 日,在豚鼠体内的活菌数量消长情况能够说明菌株在动物体内的增殖能力,并且对弱毒菌株来说这种增殖能力也代表一定程度的免疫能力。为此我们将 19-BA 及 104M 弱毒菌株同时做 40 亿皮上感染,而用牛型 40 菌株作对照。经定期剖解,每次 3 只豚鼠。平均每只动物体内总活菌数及各脏器活菌数列在表 2 及表 3 内。

表 1 19-BA 布鲁氏菌皮上感染后短时间内豚鼠体内活菌数

项 目	皮上感染后分离培养时间及体内活菌数			
	15 分钟	1 小时	3 小时	24 小时
3 只豚鼠平均总活菌数	1,950,200	1,009,580	5,810,600	4,050,700
脾	165,400	92,500	803,300	727,600
骨髓	11	6	66	70
血	671	248	330	48
膀胱	41	210	538	319

表 2 皮上感染 3 个布鲁氏菌株后豚鼠体内活菌数

菌株	皮上感染后(日)豚鼠体内活菌数						
	1	15	30	60	90	120	180
19-BA	4,454,000	917,800	11,895	48	0	0	0
104M	2,890,000	1,915,000	3,571,600	101,916	99,800	38	0
40	33,817,748	—	44,021,600	—	231,265	8,460	—

表 3 19-BA 及 104M 布鲁氏菌皮上感染后不同时期豚鼠脏器活菌数量变化

菌 株	脏 器	皮 上 感 染 后 (日) 脏 器 活 菌 数						
		1	15	30	60	90	120	180
19-BA	划 刺 处	1,420,000	500	0	0	0	0	0
	淋 巴 结	905,000	915,000	11,470	43	0	0	0
	脾	680,000	2,400	95	0	0	0	0
	肝	818,000	370	0	0	0	0	0
	骨 髓	46	268	0	0	0	0	0
104M	划 刺 处	1,100,000	0	300	0	0	0	0
	淋 巴 结	1,265,000	1,560,000	2,850,000	38,000	30,300	38	0
	脾	350,000	325,000	630,000	153,470	54,900	0	0
	肝	126,000	141,000	30,479	3,234	101	0	0
	骨 髓	24	25	61	90	50	0	0

由試驗結果看来, 19-BA 菌株增殖力較弱, 持續時間較短, 而 104M 菌株則較強, 活菌在淋巴結能持續至 120 日。而牛型 40 毒菌不但进入量較大, 持續時間长, 同时还可見到內脏病变, 例如肝脾及淋巴結异常肿大充血及肝脏表面出現小顆粒状結节。这些病变是毒菌与弱毒菌对动物致病力的区别所在。从表 3 所列划刺处的分离培养看来, 布鲁氏菌并不停留或儲存在局部划刺处。

將 7 只 19-BA 菌皮上感染 40 亿菌 24 小时后的豚鼠体内总活菌数作統計, 可得平均数为 3,033,000, 标准差为 $\pm 2,603,000$, 誤差系数 85.8%。

2. 皮下及皮上感染布鲁氏菌 皮下注射和皮上划刺这两种不同的感染途径, 由于細菌入侵的部位不同和进入的絕對数量差别, 可以想象不論在細菌的分布, 产生免疫的过程等等都是有所不同的。我們曾比較 19-BA 布鲁氏菌皮下注射 10 亿及皮上感染 40 亿菌后經 24 小时, 豚鼠体内的活菌数量及分布情况。两者感染菌量是不等的, 但从所得結果看来, 仍然可以了解到皮下注射后大部分活菌存留在皮下注射处而扩散到其他脏器的活菌数量反而不如侵入量較少的皮上法。試驗結果見表 4、图 1、图 2。从各脏器分离所得

表 4 皮下注射及皮上感染 19-BA 布鲁氏菌 24 小时后分离培养豚鼠体内活菌数量

项 目	皮 下 注 射	皮 上 接 种
试验动物数	3	4
接种活菌数量	2,880,000,000	11,500,000,000
动物体内平均总活菌数	204,890,000	7,360,000
接种处活菌数	203,800,000	4,690,000
其他脏器活菌数	1,090,000	2,670,000

表 5 皮下及皮上感染 P^{32} 标记 19-BA 布鲁氏菌 24 小时后豚鼠体内放射性量(脉冲/分钟)

项 目	皮 下	皮 上
每只豚鼠接种放射性	114,276	228,552
豚鼠体内总放射性	42,521	24,676
除接种处外, 脏器总放射性	3,377	3,611

的活菌数量来说,皮下法感染后 24 小时内,达到淋巴结、脾和肝的布鲁氏活菌也较皮下法为多。说明这两种感染方法各有其特点,细菌扩散的条件也不一样。

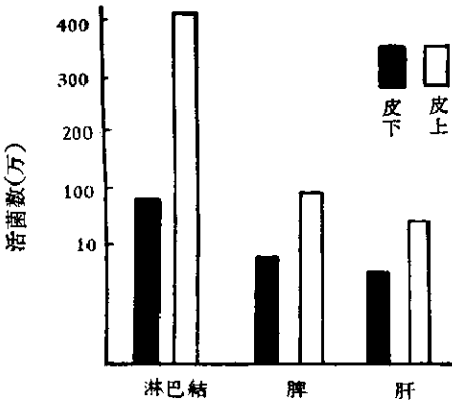


图 1 豚鼠内脏活菌数比较。

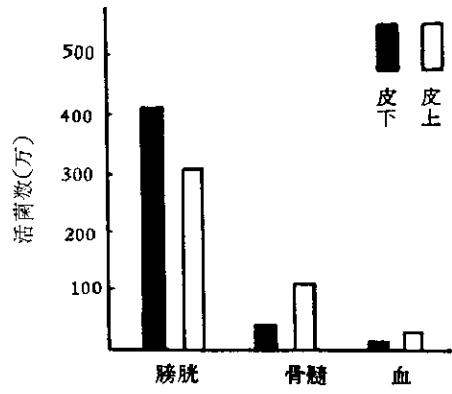


图 2 豚鼠体液分离培养。

此外,我们用 P^{32} 标记 19-BA 布鲁氏菌,皮下及皮上感染豚鼠,测定感染 24 小时后豚鼠体内各脏器的放射性。表 5 所列试验结果表明,到达各内脏的同位素放射性亦以皮上法为多。因此,用同位素的试验也同样说明皮上感染后短期内细菌扩散能力较强的特点。有关 P^{32} 标记布鲁氏菌动物试验情况可参阅有关文献^[3]。

表 6 不同方法皮上感染 104M 布鲁氏菌与豚鼠体内活菌数的关系

项 目	划 刺 方 法 与 体 内 活 菌 数			
	■	≡	+	不划刺对照
每只动物接种活菌数	12,100,000,000	12,640,000,000	12,640,000,000	12,640,000,000
动物体内总活菌数	4,450,000	3,320,000	2,280,000	3
统 计 学 差 异	$\chi^2 = 2.1795, P > 0.30$ 差异不显著			

表 7 皮上感染不同菌量的 19-BA 布鲁氏菌 24 小时后,豚鼠体内的活菌数

项 目	感 染 菌 量 与 分 离 体 内 活 菌 数		
	40 亿	20 亿	10 亿
接种活菌数	15,360,000,000	7,680,000,000	3,840,000,000
动物体内活菌数	1,250,000	609,000	178,000
统 计 学 差 异	$\chi^2 P = 0.99$, 剂量与进入量成比例		与 20 亿比, $\chi^2 P = 0.99$, 同前

3. 皮上感染菌量和划刺方法试验 皮上感染时,划刺痕道多少对布鲁氏菌侵入数量是否有直接关系,可以用动物试验说明。我们将脱毛后豚鼠背部作交叉划刺:四条痕道、二条痕道及一条痕道。经 24 小时后解剖分离培养。结果见表 6。用统计学计算 3 种方

法无差别。但是对照不划刺者则仅能够分离出有极少布鲁氏菌。

用相差 1 倍的菌量作皮上划刺感染,即 0.1 毫升含菌 40 亿、20 亿及 10 亿,经 24 小时后进行解部分离。从表 7 结果看来,感染菌量 40 亿与 20 亿相差 1 倍,体内活菌数亦差 1 倍;20 亿与 10 亿相比,体内活菌数也相差 3 倍多。也即是说接种量减少,进入体内菌量相对地也减少。从 X^2 统计看来,感染菌量多少是与进入量成比例。

4. 动物免疫力试验 为了说明布鲁氏菌皮上接种后对豚鼠皮下毒菌感染的免疫效果,我们采用 3 种比较方法: (1) 用 10 倍递增的毒菌感染量,即 10、100 及 1000 个毒菌皮下感染,计算 ID_{50} ; (2) 用不同的免疫剂量比较; (3) 用免疫效期方法比较,即免疫 1 个月至 12 个月期间,分别用毒菌感染,观察不同免疫期间的动物免疫力。此外,还用不同剩余毒力的弱毒菌株作皮上免疫试验比较。

(1) 用 19-BA 布鲁氏菌作皮下 10 亿菌及皮上 40 亿菌免疫,1 个月后用 3 种 10 倍增加的毒菌量感染。所得免疫试验结果见表 8。表中所列试验动物数,有些是多次试验结果的积累。例如皮下免疫项中,10 个毒菌感染者有 30 只豚鼠。此数系经 3 次用同一方法、同一菌株免疫、同一毒菌感染、同样的操作人所得的结果,因此加在一起。试验证明 19-BA 菌皮上免疫较皮下法差。

对 19-BA、19 及 104M 三个剩余毒力不同的弱毒菌株作皮上 40 亿免疫,然后用 10 倍增加的毒菌感染。表 9 的试验结果说明 19 及 104M 菌的皮上免疫效果显然较 19-BA

表 8 19-BA 布鲁氏菌皮下及皮上接种免疫力试验

毒菌感染数量	皮 下		皮 上		对 照
	*	%	*	%	**
10	1/30	96.6	6/40	85.0	13/13
100	7/20	65.0	13/30	40.0	15/15
1000	12/20	40.0	25/29	13.8	15/15
ID_{50}	325		62.5		

* 分母是试验动物数,分子是试验动物中,毒菌分离阳性动物数。

** 对照动物感染是指全身性感染。

表 9 布鲁氏菌株经皮上接种后免疫力试验

毒菌感染菌数	19-BA		104M		19		对 照
	*	%	*	%	*	%	**
10	6/40	85.0	1/10	90.0	1/10	90.0	24/25
100	13/30	40.0	3/9	66.6	3/10	70.0	15/15
1000	25/29	13.8	5/9	44.4	6/10	40.0	15/15
ID_{50}	62.5		344		329.6		

*, ** 说明见表 8。

菌为佳,与 19-BA 菌皮下免疫效果不相上下。用 ID₅₀ 計算亦說明 104M 及 19 菌較 19-BA 菌皮下免疫效果高 5.5 倍。由此可見,菌株間的剩余毒力不同,对免疫效果亦有差异。

(2) 为了說明皮下接种免疫菌量与免疫力的关系,将 19-BA 菌液調整浓度为 400 亿、200 亿、100 亿及 50 亿,在豚鼠皮肤上划刺 0.1 毫升免疫,然后用 10 个羊型 13 毒菌皮下感染。結果見表 10。当免疫菌量减少时,免疫效力也随着有所下降。

表 10 19-BA 布魯氏菌皮下免疫不同剂量后免疫力試驗

毒菌感染数量	免疫剂量 (亿)	皮 上 接 种		对 照
		*	%	
10	40	4/30	86.6	12/13
	20	4/36	88.8	
	10	9/29	68.9	
	5	4/10	60.0	
5	—	—		12/14

* 说明见表 8。

(3) 免疫效期試驗 用 19-BA 布魯氏菌做皮下 10 亿及皮下 40 亿菌免疫,分別在 1、3、6 及 12 个月后用羊型 13 毒菌攻毒。表 11 內列举皮下法的免疫效力在 3—6 个月时不如皮下法,但是在后期(6—12 月时)两者相仿。

表 11 19-BA 布魯氏菌皮下及皮下免疫 1 年期间免疫力試驗

毒菌感染 数量	免疫方法	1 月		3 月		6 月		12 月	
		*	%	*	%	*	%	*	%
10	皮下 10 亿	1/10	90.0	2/10	80.0	3/8	62.5	6/13	53.8
	皮下 40 亿	4/10	60.0	4/10	60.0	3/9	67.0	6/10	40.0
10	对 照	9/10		10/10		4/5		4/4	

* 说明见表 8。

討 論

布魯氏活菌苗的皮下划刺接种法已經在各地应用。为了說明此种菌苗的皮下免疫特点及其效果,我們試图通过动物試驗来探索一些問題。Таран^[4,5], Котурга^[6] 及 Баландин^[7] 都曾用豚鼠进行布魯氏菌的皮下感染試驗,說明皮下免疫效果。我們在皮下感染 19-BA 及 104M 布魯氏菌后发现在 15 分钟时即有大量細菌进入豚鼠体内并且散布全身。而皮下注射之后,在短期內大部分細菌仍然停留在局部注射部位。扩散的速度及数量上,皮下法在 24 小时內不如皮下法。这一点用 P³² 标记的布魯氏菌进行动物試驗亦得到証明。至于布魯氏菌如何通过划破的皮肤迅速进入体内以及通过什么途径达到快速分布全身,目前尚不清楚。至少从血培养阳性的結果看来布魯氏菌已經进入血流。我們在比較不同的皮下接种菌量試驗中看到剂量与进入量有密切关系,同时进入量也是有規律的,与接种量成比例的。这方面能够为确定布魯氏菌苗的人体接种剂量提供参考。同时划刺的痕迹

多少看来并没有重大影响,但是假如皮肤没有创伤也不划破,那么细菌就几乎完全不能入侵。这一点在考虑到接触感染时是有一定的参考价值的。

通过动物免疫力试验,我们认为皮下及皮上法在用同一菌株免疫时是有差别的。但是假如选用适当剩余毒力的菌株,虽然用皮上法免疫亦能产生良好免疫效果。例如用剩余毒力较强的 104M 菌株,其免疫效果 ID_{50} 就与 19-BA 菌皮下免疫效果一样。而弱毒菌株的剩余毒力本文亦曾列举试验比较,104M 菌株皮上感染后在动物体内繁殖数量及持续时间较 19-BA 为长,与免疫效力有密切关系。

在许多试验报告中^[8,9]早已提到脾脏及其他内脏的研磨制成悬液计算菌数。本文所用定量分离培养方法是初步应用。我们的操作缺点仍然较多,误差系数较大,有待进一步改善。但是可以认为定量方法仍能反映出一定的规律性,说明一些问题。

摘 要

皮上感染布鲁氏菌之后,在短期内(15 分钟)即有大量细菌进入豚鼠体内并且迅速散布全身。在比较皮下及皮上接种方法时发现皮下注射后大部分细菌停留在局部注射处,而扩散到各内脏的活菌数反而不如皮上法。从细菌的扩散来考虑,皮上接种看来是一个适宜的活菌免疫途径。

皮上接种时菌量与布鲁氏菌进入量有密切关系,而划痕的道数却不是决定性的。

动物免疫力试验说明具有较强剩余毒力的菌株,例如 104M 菌株,在皮上免疫后有较好的免疫力。因此在选择皮上接种用的布鲁氏菌苗菌株时有必要考虑菌株的这一免疫性能。

参 考 文 献

- [1] Смирнов, С. М.: Ж. М. Э. И., (11): 41, 1958.
- [2] Вершилова, П. А.: Вул. W. H. O., 24:85, 1961.
- [3] 苏万年等: 生物制品集刊, 35, 1963.
- [4] Таран, И. Ф. 等: Ж. М. Э. И., (3): 21, 1963.
- [5] Таран, И. Ф. 等: Ж. М. Э. И., (6): 128, 1963.
- [6] Котурга, Л. Н.: Ж. М. Э. И., (3): 39, 1963.
- [7] Баландин, Г. А. 等: Сравнительная иммунологическая эффективность накожной и подкожной экспериментальной вакцинации против бруцеллеза, 单行本。
- [8] Gerichter, C. B.: J. Hyg., 58:307, 1960.
- [9] 谢昕等: 布氏杆菌病研究报告, 农业部兽医生物药品监察所, 1959.

STUDY ON THE IMMUNITY OF *BRUCELLA* VACCINE

I. ANIMAL EXPERIMENTS BY PERCUTANEOUS INOCULATION

S. L. LU, D. Z. LIU AND C. Y. CHEN

(National Institute of Serum and Vaccine, Peking)

Following percutaneous inoculation (epidermic method) of *Br. abortus* 19-BA and 104M, we found that the organisms migrated rapidly in the guinea pigs and distributed all over the body. For instance, 15 minutes after inoculation, the microbes entered the blood stream and were found in the liver and spleen as well. 24 hours later, the organisms recovered from the organs of guinea pigs became more than that inoculated by the subcutaneous route. Meanwhile, it was of interest to find that majority of the organisms introduced subcutaneously was localized at the site of inoculation. It was also found that the number of organisms penetrated the skin was parallel to the dosage given upon the skin, and there was no correlation between the number of scratch lines and the number of organisms detected.

In the protection test using strain 19-BA, it was found that the ID_{50} after percutaneous immunization was less than that of subcutaneous injection. However, using the strain 104M which possesses higher residual virulence, the protection test after percutaneous inoculation gave better results, and the ID_{50} was equal to that of subcutaneous immunization by strain 19-BA. Therefore according to the experimental results obtained, the immunity produced by *Brucella* vaccine inoculated percutaneously was in no way inferior to that given by subcutaneous injection as far as a proper vaccine strain was chosen.