

布鲁氏菌琼脂扩散反应方法的初步研究

恽肇权 郭章溉 朱惠珍

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

布鲁氏菌病为人、畜共患的疾病。在我国大力发展畜牧业中, 若诊断及检疫措施不能及时地配合, 此病蔓延将使国民经济及劳动人民的健康遭到损失。1958年^[1]我们曾在内蒙某地新老疫区中, 采用试管凝集反应及皮内变态反应对两千多农、牧民作流行病学普查。结果证实此综合性诊断方法完全能满足检疫的需要。近年来, 在国内许多疫区中, 人、畜布鲁氏菌病的弱毒活菌苗的预防接种工作日益扩大, 上述检疫方法将不能用以鉴别菌苗接种后反应与自然感染。因此, 我们进行了琼脂扩散反应的研究。今将实验及结果报告如下:

(一) 操作方法

我们根据1957年W. Mansi^[2]氏的琼脂扩散技术, 仿制成7孔铜质穿孔器2具, 其孔径为0.7厘米, 孔间距离相等, 分别为0.4及1.0厘米(见图1)。所用平皿含1%琼脂(pH 7.2)、0.1%氯化钠及最终浓度为1:1000的硫柳汞。操作时将熔化的琼脂倒入平皿中, 厚度约为1.0厘米, 然后

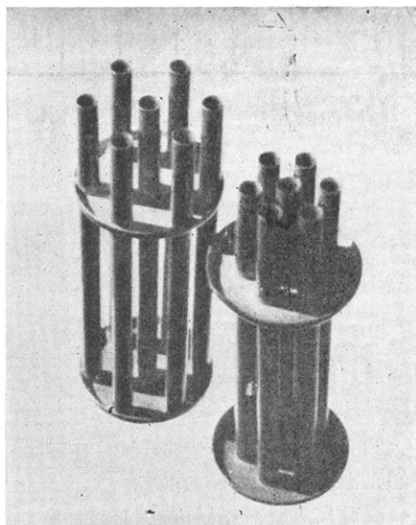


图1 琼脂穿孔器, 左侧的孔距为1.0厘米, 右侧的孔距为0.4厘米。

将穿孔器放置平皿中, 俟琼脂凝固后取出穿孔器, 在琼脂上的小孔中各加2—3滴熔化琼脂封闭孔底。试验时, 可根据不同的要求, 将已知阳性血清放中央孔而将待检抗原放四周孔中, 或者相反。当血清及抗原加完后, 将平皿放入垫有湿布的有盖容器中以防水分蒸发, 最后将容器放置37℃温箱中或室温中, 24及48小时后观察。

(二) 高价免疫血清的制备

用牛型544A、羊型16M及猪型1330S各菌株的48小时培养物, 分别对家兔作皮下注射8次, 每周1次。前4次注射量为10亿菌体(肠道比浊管计算), 后4次注射量加倍。在第8次注射后2周全放血时, 凝集素效价为1:25600, 向血清中加硫柳汞或硼酸粉末作防腐剂, 后放4℃冰箱中保存备用。我们用此法保存的血清1年后仍有效。

(三) 抗原的制备

以不等量的2.5%酚, 对以上三个型的布鲁氏菌48小时培养物在4℃中提取24小时, 离心沉淀, 所得上清即为所需抗原。我们所制备的羊型抗原, 放4℃及室温中已保存1年7个月仍有效。

(四) 实验结果

1. 家兔在第1次注射后第2周, 其血清中即有沉淀素。

2. 三个型菌的免疫血清皆能对三个型的抗原, 在靠近血清孔侧出现1—2条细沉淀线, 而与羊型抗原作用尚能在靠近抗原孔处出现1条为典型羊型菌(仅限于其结构为M>A者)所特有的粗沉淀线(见图2)。若中央孔中放阳性血清, 四周6孔内皆放入上述羊型抗原, 则可见羊型抗原所呈粗沉淀线互相衔接成六角多边形(见图3)。

3. 将羊型抗原放中央孔中, 将阳性原血清及其1:2、1:4、1:8、1:16和1:32稀释的血清放四周6孔中, 结果在血清稀释度为1:8时, 则无沉淀

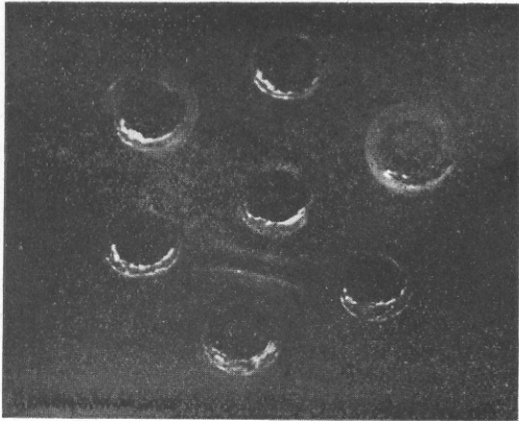


图2 左上角孔中为牛型抗原, 只有1条细沉淀线; 右上角孔中为猪型抗原, 只有1条细沉淀线; 下方孔中为羊型抗原, 除有1条细沉淀线外, 尚有1条粗沉淀线。

线产生。因此, 作此反应时血清不宜稀释。

4. 将阳性血清放中央孔中, 四周孔内放不同浓度的抗原 (即向1份羊型菌体中分别加入1—50份2.5%酚, 在冰箱中放置24小时), 用0.4厘米及1.0厘米两种孔间距离作琼脂扩散沉淀反应, 结果证明, 以孔距0.4厘米为适宜。提取抗原时, 抗原与酚量之比以不超过1:12为宜 (见表1)。不同浓度的抗原用两种孔间距离所作沉淀反应。

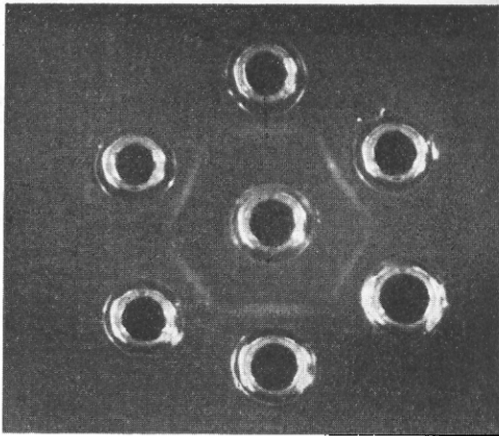


图3 四周孔中皆为羊型抗原, 6条粗沉淀线互相衔接构成1个六角多边形。

米及1.0厘米两种孔间距离作琼脂扩散沉淀反应, 结果证明, 以孔距0.4厘米为适宜。提取抗原时, 抗原与酚量之比以不超过1:12为宜 (见表1)。不同浓度的抗原用两种孔间距离所作沉淀反应。

表1 用不同量的2.5%酚所提取的抗原沉淀反应结果

观察时间 (小时)	孔间距离 (厘米)	2*	4	6	8	10	12	15	20	25	30	35	40	45	50
24	0.4	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	0.4	++	++	-	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.0	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+

注: * 1份羊型菌所加之不等份的2.5%酚。
“++”表示细沉淀线外还有一粗沉淀线;
“+”表示只有1粗沉淀线;
“-”表示无任何沉淀线。

(五) 讨论

1. 三个型的布鲁氏菌免疫血清皆能与典型羊型抗原起沉淀反应, 除细沉淀线外尚有一粗沉淀线。这说明三个型的菌中皆含有与此粗沉淀线相应的抗原。不过我们所采用的提取抗原方法, 只能从典型羊型菌或其抗原结构为M>A或M=A的菌株中将此抗原提取出来。

2. 在我们所作的家兔免疫试验中, 凝集素在接种5天后可达1:640—1:1280, 而沉淀素一般要在14天后出现。因此, 我们认为此反应不宜作为早期诊断指标。1958年W. Bruce等报导, 当

感染的活动性消失后, 沉淀素比凝集素消失得快^[3]。所以, 我们认为此反应也不宜作为追溯诊断。

3. 一般人认为由于弱毒活菌苗在机体内保存的时间短, 则可推知其所引起的沉淀反应亦应较强毒菌自然感染所引起的沉淀反应消失的快。因此, 我们有可能利用此反应作为菌苗接种后反应与自然强毒菌感染的鉴别诊断。

4. 沉淀反应较凝集反应的特异性高。我们曾将滴度为1:640的土拉伦免疫血清与此三型布鲁氏菌抗原作凝集反应, 发现其与牛、猪型的交叉反

应滴度为 1:80; 羊型抗原滴度为 1:40, 而此土拉伦免疫血清与布鲁氏菌沉淀抗原呈阴性反应; 与土拉伦菌沉淀抗原呈阳性反应。因此, 有可能在现场中利用此反应作鉴别诊断。

5. 我们最近的实验证明, 琼脂扩散沉淀反应与菌体的表面抗原结构有关, 而与菌型无关; 凡由表面抗原结构为 $M > A$ 或 $M-A$ 的光滑菌所提取的抗原, 皆与沉淀素血清呈阳性“M 型”沉淀反应 (即除 1 细沉淀线外尚有 1 粗沉淀线), 而原结构为 $A > M$ 的菌株无此“M 型”沉淀反应, 而 $M-A$ 的菌株又不多, 因此, 我们认为可利用此反应在大

部分的情况中代替抗 A 及抗 M 血清作布鲁氏菌的抗原结构^[4]分析及菌型鉴定的指标之一^[5]。

参 考 文 献

- [1] 恽肇权: 流行病学杂志, 5 期, 35—36 页, 1959。
- [2] Mansi, W.: *J. Comp. Path.*, **67**:297, 1957.
- [3] Bruce, W., Jones, L. M.: *Bull. W. H. O.*, **19**:187—196, 1958.
- [4] Redfearn, M. S. and Berman, D. T.: *Ibid.*, **23**:133—134, 1960.
- [5] Stableforth A. W. and Jones, L. M.: *Int. Bull. Bact. Nomenclature and Taxonomy.*, **13**:145—158, 1963.