

几种诊断犬种布鲁氏菌病抗原的制备

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 尚德秋 李兰玉 程尧章

自1966年Carmichael等在美国第一次从小猎犬中分到狗种布鲁氏菌(*B. canis*)后^[1,2],相继在德国、巴西、墨西哥、阿根廷等都有报道。

*B. canis*不仅感染狗造成狗的布病流行^[3],而且也能在小范围的人群中引起感染^[4~6]。因此,近年来,*B. canis*感染所致的布鲁氏菌病为人们所关注。1983年前我国尚未见有关*B. canis*情况的报告。

于1983年,尚德秋等^[7]用我室自制诊断犬种布病的试管凝集抗原检查从美国进口的Beagle狗和中国草狗,并从1只血清凝集阳性的Beagle狗和1只血清凝集阳性的中国草狗中首次分到*B. canis*菌。为了在我国对狗和人群的*B. canis*菌感染的流行病学调查,我们首次制备了几种诊断犬种布鲁氏菌感染的抗原制剂,现报告如下:

材料和试剂

一、菌种:本室冻干保存的国际标准株*B. canis* RM66/6和我国首次分离的*B. canis* 草7号。

二、动物:家兔,系本所动物室提供,体重2000~2500克。狗,从居民中购置的经布病检查阴性的健康狗。

三、试剂

1. 三-顺丁烯二酸盐缓冲液: A液—三-(羟甲基)氨基甲烷240克,马来酸(顺式丁烯二酸)232克溶解在蒸馏水中使最后容积为1,000毫升。B液—氢氧化钠200克,用蒸馏水溶解,最后容积为1,000毫升。将A液200毫升与B液150毫升混合,再加蒸馏水至1,000毫升。

2. 虎红染液:虎红有钠盐和钾盐之别,在本试验中用其钠盐: $C_2OH_2O_5I_4Cl_4Na_2$,分子量为1017.60,系北京化工厂出品,批号为810627。称虎红钠盐1克,加入100毫升灭菌蒸馏水,其浓度为1%,充分混匀,置4°C冰箱备用。

3. 饱和硫酸氨溶液。

4. 不完全佐剂:羊毛脂1份,液体石蜡2份,混合后高压灭菌备用。

结 果

一、犬种布鲁氏菌试管凝集(SAT)抗原制备:将RM66/6菌接种在肝琼脂斜面上,放37°C温箱培养36小时,用1~1.5毫升生理盐水洗菌,每支斜面培养物接种一个克氏瓶,经37°C36小时培养后,选择生长良好的克氏瓶,每瓶加灭菌蒸馏水20毫升,浸泡15~30分,使菌苔松软,轻摇动后,菌苔脱落,使其成均匀悬液,再用无菌纱布漏斗过滤,然后制成300~400亿/毫升菌悬液。此菌液经70°C1小时加热灭菌,每隔15分钟摇动一次。取此菌液1.5~2毫升接种到肝琼脂斜面上,在37°C温箱中培养48小时,如无细菌生长再延长培养48小时,仍无细菌生长时将已制备的菌悬液经4,000转/分离心30分钟,用灭菌蒸馏水洗2次,再用三-顺丁烯二酸盐缓冲液洗一次,沉淀菌用三-顺丁烯二酸盐缓冲液制成150亿/毫升,放4°C冰箱备用,临用时,用生理盐水稀释1:10即可。

在此应指出,如果培养菌超过36小时,离心洗涤时易成粘液状。我们用此抗原共检查近1,500份狗血清,结果稳定,特异性较强。现将所查170份狗血清列于表1中。

我们用草7号菌制备的凝集抗原检查犬血

表 1

用犬种布鲁氏菌抗原作试管凝集反应

检查犬血清数	试管凝集反应类别	血清稀释度(1:)									
		<20	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
170	犬种菌凝集反应	71	20	12	11	14	22	12	5	2	1
	光滑菌凝集反应	125	26	14	5						

清的结果与RM66/6菌是相似的。同时也看到，用我们制的犬种菌抗原检查到阳性反应在1:80以上的狗进行剖杀时，从大多数狗中分到犬种布鲁氏菌。

二、虎红平板凝集抗原制备:RM66/6菌的培养、灭菌等均同试管凝集反应。离心后称取湿重，制成6% (湿重/体积) 菌液，然后向100毫升菌液中加入6毫升的1%虎红水溶液，放4°C冰箱过夜，取出离心(4000转/分)30分钟，弃掉上清，沉淀物用三-顺丁烯二酸盐缓冲液洗2次，经4,000转/分离心30分，以三-顺丁烯二酸盐缓冲液制成菌悬液，灭菌纱布漏斗过滤，调整浓度为6%，pH值为8.9~9.0，放4°C冰箱备用。

用该抗原检查狗血清近1,000份中看到，凡是犬种菌虎红抗原凝集阳性血清，用犬种菌凝集抗原检查都是阳性，其效价大多数在1:80以上。

三、犬种菌的补体结合(CFT)抗原的制备:细菌培养及洗菌过滤等均同试管凝集抗原的制备。称取湿重的细菌，制成1%、10%、20%的菌悬液，经15磅110°C30分钟高压，然后离心取上清，以生理盐水透析24小时，再离心取上清即为可溶性犬种布鲁氏菌补体结合抗原。

经用已知凝集反应阳性犬血清滴定表明，1%的菌悬液加热高压提取的抗原效价低于1:20，没有实用意义。10%和20%菌液的效价分别为1:50、1:100，可以作为补体结合抗原。

用加热高压提取的犬种布鲁氏菌的补体结合抗原检查56份犬血清的结果列于表2中。

可见CFT与SAT者并不完全一致，但SAT

表 2 加热高压提取犬种菌的补体结合抗原检查结果

检查犬血清数	犬种试管凝集反应结果	CFT(1:5以上)	
		+	-
56	1:20以上的47分	40	7
	<1:20 9分	3	6

阳性，CFT大多数是阳性。

四、犬种菌抗原的Coomb's反应的抗球蛋白的制备:在进行犬种菌布病的Coomb's反应时关键是制备兔抗犬血清球蛋白，取健康犬血清用33%饱和(NH₄)₂SO₄提取球蛋白^[8]。然后给家兔注射，其免疫程序见表3。

表 3 兔抗犬球蛋白血清制备程序

时间(周)	次数	注射样品	注射部位
一	1	γ球蛋白2毫克+0.5毫升生理盐水+不完全佐剂0.5毫升。	两侧足趾部及背部多点注射
二	2	γ球蛋白2毫克+1毫升生理盐水	耳静脉
三	3	γ球蛋白2毫克+1毫升生理盐水	"
四	4	同上	"
五	5	同上	"

末次注射后7~10天从耳静脉取血，分离血清作琼脂扩散反应，其效价达1:16以上可放血，分离血清，加等量饱和(NH₄)₂SO₄，放4°C冰箱过夜，离心，弃去上清，沉淀物溶于小量生理盐水中，再用生理盐水透析，测蛋白含量，可作犬种布鲁氏菌病Coomb's反应的第二抗原。我们用此制剂检查25份犬血清，其效价比SAT高2~8倍。

顺便指出，对于SAT反应的阴性管进行洗涤时要用三-顺丁烯二酸盐缓冲液，如果用生

理盐水洗涤时会出现大量假阳性。

讨 论

我们在制备上述各种抗原时既参照国际上现有方法，又根据实际情况作了部分修改。在培养RM66/6时，我们没有采用血清葡萄糖琼脂培养基，而用肝培养基，细菌生长良好。在进行SAT反应时，我们以生理盐水代替了三-顺丁烯二酸盐缓冲液，其结果二者是一致的。

在此说明的是，犬种布鲁氏菌虎红抗原与一般光滑型布鲁氏菌的虎红抗原不同。前者是用三-顺丁烯二酸盐缓冲液与虎红染液配制，pH值为8.9~9.0，是碱性抗原；后者是用乳酸制备，抗原的pH值为3.6~3.9，是酸性抗原。故两种抗原同时检查血清时二者的结果是不一致的。

在此还应提出的是，Corbel认为用热提取犬种布鲁氏菌的CFT抗原是不适合的；用超声波处理犬种布鲁氏菌提取CFT抗原较为恰当。但是，按我们的实验资料，用15磅110°C30分钟处理RM66/6菌提取可溶性抗原对犬血清进行CFT检查，其结果是满意的，而用超声波提取的可溶性抗原具有抗补体现象。其原因有待进一步研究。

摘 要

本文报告了我国首次用犬种布鲁氏菌RM66/6株制备几种诊断犬种菌布病的抗原：试管凝集抗原、虎红平板凝集抗原、CFT抗原，还包括制备兔抗犬血清球蛋白。用这些制剂检查有限数量的犬血清均获得

了满意的结果。为在我国开展犬种布病的流行病学调查和诊断病人提供了可靠的手段。

An Evaluation of Several *Brucella Canis* Diagnostic Preparations among Dogs Shang Deqiu, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine

This paper deals with the application of several *Br. canis* diagnostic agents among dogs as a first attempt in China. The antigens were made of *Br. canis* RM66/6 strain and in the form of tube agglutination antigen, Rose Bengal plate antigen and complement fixation test antigen. A survey using these antigens seems functioned quite satisfactory. Hence, we can provide these reagents for epidemiological survey in China.

参 考 文 献

1. Carmichael LE, et al. Characteristics of a Newly Recognized *Brucella* Species Responsible for Contagious Abortions in Dogs. *Cornell Vet* 1968; 58:579.
2. Carmichael LE, et al. Canine Abortion Caused by *Brucella Canis*. *J Am Vet Med Ass* 1968; 152:605.
3. Hall WH. Epidemic Brucellosis in Beagles. *J Infect Dis* 1971; 124:615.
4. Currier RW, et al. Canine Brucellosis. *J Am Vet Med Ass* 1982; 180:132.
5. Morisset R, et al. Epidemic Canine Brucellosis due to A New Species *Brucella Canis*. *Lancet* 1969; 2:1000.
6. Fredrickson Le, et al. A Serologic Survey for Canine Brucellosis in a Metropolitan Area. *J Am Vet Med Ass* 1974; 165:987.
7. 尚德秋, 等. 在国内首次分离出狗种布鲁氏菌的报告. *中华流行病学杂志* 1984; 5(6):345.
8. 姜顺求主编. 布鲁氏菌病防治手册. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 118~127.

本刊重要通知

1. 本刊从1987年1月始，对不录用稿件一律不退原稿，请作者投稿时自留底稿。
2. 本刊从1986年始设全年卷终索引，请今后投稿时提供关键词（中英文），把原中文摘要改为提要放文前。