

结核病生物诊断试剂豚鼠模型建立

龚宝勇^{1,2}, 吴玉娥^{1,2}, 黄姣艳³, 崔玉华³, 张 钰^{1,2}

(1. 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广州, 510663;
3. 广东瀚森生物药业有限公司, 东莞 523808)

【摘要】 目的 建立结核病生物诊断试剂模型。**方法** 通过在豚鼠腹股沟皮下单次和多次注射不同剂量灭活 H₃₇Rv 全菌体, 制备结核病生物诊断试剂模型, 采用 0.1 mL (5 IU) 标准结核菌素 (TB-PPD) 对模型效果进行评价。**结果** 三组剂量 (0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL 和 0.5 mg/mL) 致敏豚鼠均能建立模型, 其中 0.2 mg/mL 剂量组皮试后 24 h 和 48 h 红斑纵横径值均大于 0.3 mg/mL 和 0.5 mg/mL 剂量组, 致敏效果最好; 多次致敏皮试红斑纵横径值与单次致敏比较无显著差异; 第 1 次皮试后 24 h 红斑纵横径值大于第 2 次、第 3 次和第 4 次皮试后红斑纵横径值 ($P \leq 0.05$); 此外, 灭活 H₃₇Rv 全菌体致敏后, 豚鼠体重持续增加, 部分豚鼠注射部位有溃烂发生。**结论** 应用 0.2 mg/mL 灭活 H₃₇Rv 全菌体单次致敏豚鼠, 可以建立良好的用于结核病生物诊断试剂评价的模型。增加致敏剂量和致敏次数不能增加变态反应强度。

【关键词】 H₃₇Rv; 豚鼠; 模型; 动物; 皮试

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0039-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.007

Establishment of a guinea pig model for biological diagnostic reagent of tuberculosis

GONG Bao-yong¹, WU Yu-e¹, HUANG Jiao-yan², CUI Yu-hua², ZHANG Yu¹

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou, 510663; 3. Guangdong Handsome Bio-Pharmaceutical Co., Ltd, Dongguan 523808)

【Abstract】 Objective To establish a guinea pig model for diagnostic reagent of tuberculosis. **Methods** By single or multiple subcutaneous injection of heat-killed H₃₇Rv in different doses in the groin of guinea pigs to establish a model of positive response to 0.1 mL (5 IU) standard tuberculin (TB-PPD) skin test. **Results** Three doses of heat-killed H₃₇Rv (0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL and 0.5 mg/mL) could be used to generate the model of biological diagnosis of tuberculosis. After 24 and 48 hours, the diameter of red spot by TB-PPD skin test was 15.4 ± 2.3 mm when a dose of 0.2 mg/mL heat-killed H₃₇Rv was administered for immunizing and allergizing the guinea pigs. The biggest red spot was induced at doses of 0.3 mg/mL and 0.5 mg/mL. The test results showed that the immune response induced by multiple injection to immunizing and allergizing guinea pigs was not significantly different than that induced by single immunizing injection, and the first skin test was better than the second, third and fourth skin test ($P \leq 0.05$). In addition, the body weight of the guinea pigs was still increasing after infection with heat-killed H₃₇Rv, and ulcers occurred in the injection sites in some guinea pigs. **Conclusions** A single subcutaneous injection of 0.2 mg/mL heat-killed H₃₇Rv in guinea pigs can be used well to establish a reliable model for biological diagnostic reagent of tuberculosis. Increasing the sensitizing

[作者简介] 龚宝勇 (1982 -), 男, 兽医师, 主要从事实验动物疾病模型研究。

[通讯作者] 张钰, 研究员, 主要开展实验动物的质量检测和感染疾病动物模型研究。

dose and multiple sensitization can not increase the intensity of the delayed-type hypersensitivity (DTH) response.

【Key words】 $H_{37}Rv$; Guinea pig; Animal model; Skin test; Tuberculosis

结核病是由结核分枝杆菌引起的人畜共患慢性传染病,在世界范围内具有高致病性和致死性。有关结核病的各项研究已成为全球学者关注的热点,特别是结核病生物诊断试剂的研究和开发^[1]。结核病生物诊断试剂的上市和临床应用必须经过动物模型评价,因此建立合适的结核病生物诊断试剂模型,可避免人体试验的风险,还可严格控制实验条件,增强实验材料可比性和重复性,有利于更全面认识生物诊断试剂的有效性和安全性^[2]。豚鼠对结核分枝杆菌高度敏感,迟发型超敏反应非常强烈,已经被广泛应用于抗结核药物和相关生物制剂检测中,成为人类结核菌素皮肤试验效能和结核检测生物制品鉴定效价的金标准^[3-5],而且根据《中国药典》2010 版第三部,必须应用致敏豚鼠来评价体内诊断类结核病生物诊断试剂^[7]。本研究旨在探索不同灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏剂量和致敏次数及皮试次数对模型结果的影响,为建立更简单、安全、可靠的结核病生物诊断试剂模型提供参考。

1 材料和方法

1.1 注射菌液制备

$H_{37}Rv$ 菌株用 Middlebrook 7H11 培养基培养 21 d,收集菌体,PBS 洗 3 次,115℃,10 l b 灭活 30 min,干燥,放于 4℃ 冰箱备用。称取灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体,加入注射用生理盐水和等量弗氏不完全佐剂,研磨均匀乳化至滴入清水不散开。共配成 3 个剂量组:0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.5 mg/mL,现配现用。

1.2 实验动物

SPF 级 Hartley 豚鼠,雌雄各半,35~45 日龄,广东省医学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2008-0002。动物饲养于屏障动物实验室,实验动物使用许可证编号:SYXK(粤)2012-0122,饲养管理严格按照《实验动物饲养管理和使用指南》进行。

1.3 致敏和皮试

致敏剂量评估:豚鼠检疫适应 7 d 后,分为 3 组(0.2 mg/mL 剂量组、0.3 mg/mL 剂量组、0.5 mg/mL 剂量组),每组 44 只,雌雄各半,每只豚鼠大腿内侧腹股沟皮下注射相应剂量灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体 0.5 mL,分 3 个位点进行注射。致敏后第 5 周背部剃毛,皮内注射 0.1 mL(5IU)标准结核菌素(TB-PPD)进行皮试。皮试后 24 h、48 h 各观察豚鼠 1

次,测量、记录皮试红斑硬结的纵横径值,对各组结果进行统计分析。

致敏次数评估:选择 8 只豚鼠,雌雄各半,接种 0.5 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏,每次 0.5 mL,每周 1 次,持续 3 周。首次致敏后第 5 周背部剃毛,皮内注射 0.1 mL(5 IU)标准结核菌素(TB-PPD)进行皮试。皮试后 24 h、48 h 各观察豚鼠 1 次,测量、记录皮试红斑纵横径值并计算统计其均值,与致敏剂量为 0.5 mg/mL 致敏 1 次的豚鼠进行比较。

皮试时间评估:选择 8 只豚鼠,雌雄各半,0.3 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏,致敏后第 5、7、9、11 周背部剃毛,皮内注射 0.1 mL(5IU)标准结核菌素(TB-PPD)重复进行皮试。比较不同皮试时间红斑的纵横径值。

1.4 观察指标

致敏后每周 1 次称量豚鼠体重,连续 5 周,制作体重生长曲线;致敏后每周观察豚鼠腹股沟皮下注射部位溃烂情况,连续 5 周。皮试后 24 h、48 h 各观察豚鼠 1 次,测量、记录皮试红斑的纵横径值并计算统计其均值。

1.5 判定依据

根据《中国药典》2010 版第三部,致敏豚鼠应用标准结核菌素(TB-PPD)皮试后 24 h 红斑纵横径值应大于 5 mm,才能用于评价体内诊断类结核病生物诊断试剂^[7]。

1.6 统计学方法

本研究测定数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,成组设计多个样本均数比较用 One-Way ANOVA 检验;不同时相两样本均数比较用 independent-samples *t* test 检验。所有数据使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 致敏豚鼠体重变化情况

不同剂量灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏豚鼠后,动物饮食、饮水正常,体重持续增加。在致敏后第 5 周,0.2 mg/mL 剂量组、0.3 mg/mL 剂量组和 0.5 mg/mL 剂量组平均体重分别为:(478.7 ± 38.5) g、(493.0 ± 53.0) g 和 (490.6 ± 43.5) g,与初始平均体重比较,体重分别增加了 158.6 g、142.1 g 和 195.7 g。结果见图 1。

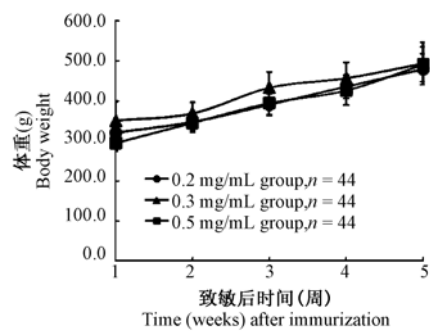


图 1 不同剂量灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏豚鼠体重曲线
Fig.1 The guinea pig body weight curves after sensitization with heat-killed $H_{37}Rv$ in various doses

2.2 不同剂量致敏豚鼠后注射部位变化

豚鼠注射 0.5 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏后,注射部位出现硬节和溃烂。溃烂出现的时间在致敏后第 4 周,有 18.9% 的豚鼠发生溃烂,第 5 周有 33.3% 的豚鼠发生溃烂,在整个实验周期内溃烂不会愈合。见图 2。



图 2 致敏后第 4 周,洞状溃烂,内有渗出
Fig.2 At the 4th week after immunization, the injection site showed skin ulcer and exudation

2.3 不同剂量灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏豚鼠后红斑纵横径值比较

皮试后 24 h,0.3 mg/mL 组和 0.5 mg/mL 组皮肤红斑纵横径平均值均小于 0.2 mg/mL 组 (15.4 ± 2.3) mm,三组比较,差异有显著性 ($P \leq 0.05$)。皮试后 48 h,3 个剂量组皮肤红斑纵横径值比较,差异无显著性 ($P \geq 0.05$)。结果见表 1。

2.4 多次致敏和单次致敏皮肤红斑纵横径值比较

实验结果显示,采用 0.5 mg/mL 致敏剂量连续三次致敏豚鼠,皮试后 24 h 和 48 h 红斑纵横径均值与单次致敏豚鼠的红斑纵横径均值相比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

2.5 不同皮试次数红斑纵横径值比较

实验结果显示,采用 0.3 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏豚鼠,第 1 次皮试后 24 h 红斑纵横径值大于第 2 次、第 3 次和第 4 次皮试后红斑纵横径值,各

组间比较有统计学差异 ($P \leq 0.05$) ;皮试后 48 h 测量发现第 2 次皮试后红斑纵横径值显著低于其它 3 次皮试后红斑纵横径值 ($P \leq 0.05$),结果见表 3。

表 1 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体不同致敏剂量皮试
红斑纵横径值比较 ($\bar{x} \pm s$) mm

Tab.1 Comparison of the diameter of red spot induced by TB-PPD skin test ($\bar{x} \pm s$) mm

组别 Groups (n = 44)	皮试后时间 Time after the skin test	
	24 h	48 h
0.2 mg/mL	15.4 ± 2.3	11.0 ± 2.2
0.3 mg/mL	13.1 ± 1.8 *	10.4 ± 1.3
0.5 mg/mL	12.3 ± 1.3 *	10.6 ± 0.9
F = 28.9, P = 4.16E-11		F = 2.3, P = 0.11

注: * 表示与 0.2 mg/mL 组比较 $P \leq 0.05$;

Note. * $P \leq 0.05$, vs. the 0.2 mg/mL group.

表 2 0.5 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体 3 次致敏与
单次致敏豚鼠皮试红斑纵横径值比较 ($\bar{x} \pm s$) mm

Tab.2 Comparison of the diameter of red spot induced by TB-PPD skin test after 3-time and single immunizing the guinea pigs. ($\bar{x} \pm s$) mm

组别 Groups	皮试后时间 Time after the skin test	
	24 h	48 h
3 次致敏 3-time injection (n = 8)	11.5 ± 1.6	10.4 ± 1.1
1 次致敏 Single injection (n = 44)	12.3 ± 1.3	10.6 ± 10.9

表 3 0.3 mg/mL 灭活 $H_{37}Rv$ 全菌体致敏后
不同皮试次数后红斑纵横径值的变化 ($\bar{x} \pm s$) mm

Tab.3 Comparison of the diameter of red spot induced by TB-PPD skin test after multiple skin test in the guinea pigs ($\bar{x} \pm s$) mm

组别 Groups (n = 8)	皮试后时间 Time after the skin test	
	24 h	48 h
第 1 次皮试 1st skin test	13.0 ± 1.7	10.4 ± 1.3
第 2 次皮试 2nd skin test	11.3 ± 1.2 *	8.7 ± 0.6 *
第 3 次皮试 3rd skin test	12.1 ± 1.4 *	10.3 ± 0.7
第 4 次皮试 4th skin test	11.5 ± 1.8 *	9.9 ± 0.9
F = 2.9, P = 0.04		F = 13.4, P = 6.82E-07

注: * 表示,与第 1 次皮试比较 $P \leq 0.05$ 。

Note. * $P \leq 0.05$, vs. the result of first time skin test.

3 讨论

自从结核菌素反应被罗伯特·科克在一个世纪前发现以来,豚鼠就成为研究迟发型过敏反应 (DTH) 的动物模型,且其 DTH 反应与人类进行的 TB-PPD 皮试反应非常相似^[6]。根据《中国药典》2010 版第三部,必须应用豚鼠来评价体内诊断类结核菌生物诊断试剂^[7]。

我们的研究结果显示,采用 0.2 mg/mL $H_{37}Rv$ 灭活全菌体单次致敏豚鼠,24 h 和 48 h 皮试红斑纵横径均值分别为 15.4 ± 2.3 mm 和 11.0 ± 2.2 mm,

达到《中国药典》2010 版第三部规定的“致敏豚鼠皮试后 24 h 红斑纵横径值应大于 5 mm”的判定要求。张灵霞等^[11]采用 0.1 mL (5 mg) 灭活 H₃₇Rv 全菌体连续 4 次致敏豚鼠,皮试后 24 h 和 48 h 红斑纵横径均值分别为(8.25 ± 1.73)mm 和(7.41 ± 1.22)mm,小于我们的致敏结果。我们分析此模型皮试反应强度较弱可能与其未使用弗氏不完全佐剂有关。Suely S. Kashino 等^[8]应用 18b 结核分支杆菌活菌制备豚鼠模型比应用灭活 H₃₇Rv 全菌体致敏豚鼠模型 DTH 反应更强烈,24 h DTH 皮试反应红斑纵横径值为(18 ± 3)mm,但会引起动物消瘦甚至死亡。根据我们的研究结果和已知文献^[8,11],我们发现豚鼠 DTH 皮试反应的强度与结核分支杆菌是否灭活有关,与致敏次数无关,多次致敏不能达到增加变态反应强度的效果。当致敏剂量达到可引起明显 DTH 皮试反应的情况下,增加致敏剂量对皮试结果无显著影响,反而可能会引起接种部位的严重溃烂。

人类感染结核杆菌后,会引起嗜睡、精神萎靡、体重减轻直至死亡等^[9],本研究应用灭活 H₃₇Rv 全菌体致敏豚鼠,豚鼠体重持续增长,未观察到豚鼠有明显不适反应。注射部分出现溃烂主要是弗氏不完全佐剂引起的不良反应^[10],采用多点注射可以适当降低溃烂的发生率。

总之,本研究完善了结核病生物诊断试剂模型建立,改进了制备灭活 H₃₇Rv 全菌体致敏豚鼠模型的方法。与国内外文献记载的其他结核病生物诊断模型制备方法相比,本研究采用 0.2 mg/mL H₃₇Rv 灭活全菌体单次致敏豚鼠,可引起适当的变态反应(达到标准要求)且不会引起动物死亡,是比较合适的致敏剂量,可广泛应用于结核病生物诊断试剂的研制和评价。

参考文献:

- [1] Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project [J]. JAMA. 1999, 282:677 - 686.
- [2] 张昊凌, 张志勇. 结核分枝杆菌感染动物模型的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2012, 7(3):184 - 189.
- [3] Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis [J]. Tuberculosis, 2005, 85:277 - 293.
- [4] Turner OC, Basaraba RJ, Orme IM. Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 2003, 71:864 - 871.
- [5] Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, et al. The cellular immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the guinea pig [J]. J Immunol, 2007, 179:2532 - 2541.
- [6] McMurray DN. Guinea pig model of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis [M]. ASM Press; Washington; 1994: 135 - 147.
- [7] 中国药典 2010 版第三部,体内诊断类 [M]. 2010:325 - 327.
- [8] Kashino SS, Napolitano DR, Skobe Z. Guinea pig model of mycobacterium tuberculosis dormant infection [J]. Microbes Infect, 2008, 10(14 - 15): 1469 - 1476.
- [9] Kashino SS, Ovendale P, Izzo A, et al. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13:1014 - 1021.
- [10] Aachoui Y, Schulte ML, Fitch RW, et al. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: evaluation of new phytol derivatives in induction and persistence of specific immune response [J]. Cell Immunol, 2011. 271(2):308 - 318.
- [11] 张灵霞, 吴雪琼, 史迎昌, 等. 几种结核分支杆菌重组蛋白诱发豚鼠迟发型超敏反应的研究 [J]. 中国防痨杂志, 2002, 24:116 - 118.

[修回日期] 2014-07-18