兔抗伤寒杆菌免疫血清在免疫学检验实验教学中的应用*

张淑莉¹, 李妮¹, 张琪² (1. 西安医学院医学技术系检验中心, 西安 710021; 2. 陕西省核工业 417 医院, 西安 710600)

【摘要】 目的 探讨制备高效价兔抗伤寒杆菌免疫血清的方法。方法 对家兔分组, 采用短程免疫法, 用伤寒杆菌“O”和“H”诊断菌液作为抗原, 分别小剂量连续多次接种后, 收集兔免疫血清, 利用玻片凝集实验、试管凝集实验和间接凝集实验, 测定血清中抗体的效价。结果 家兔在全程免疫后产生了高效价抗体, 效价分别达到了阳性, 1:1 280、1:640。结论 用伤寒杆菌免疫家兔, 制备的免疫血清在短时间内可以获得高效价的抗血清, 适用于免疫学检验本科实验教学。

【关键词】 伤寒杆菌; 免疫血清; 制备; 效价; 免疫学检验; 教学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2661-03

Application of rabbit anti-Salmonella typhi immune serum in experiment teaching of immunology test* ZHANG Shu-li¹, LI Ni¹, ZHANG Qi² (1. Testing Center, Department of Medical Technology of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. 417 Hospital of Shaanxi Provincial Nuclear Industry, Xi'an, Shaanxi 710600, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the preparation method of high titer rabbit anti-Salmonella typhi immune serum. **Methods** The rabbits were grouped. Using short-range immunization, with the typhoid bacillus “O” and “H” diagnostic liquid as antigen, after small dose and multiple respective inoculations, the rabbit immune serum was collected. The serum antibody titer was detected by using the slide agglutination test, tube agglutination test and indirect agglutination. **Results** The high titer antibodies in rabbits were produced after immunization and the titers reached positive 1:1 280 and 1:640 respectively. **Conclusion** The rabbit immune serum prepared by immunizing rabbits with typhoid bacillus can obtain the high titer immune serum in a short period of time, which is suitable for the experiment teaching of undergraduate immunology test.

【Key words】 Salmonella typhi; immune serum; preparation; titer; immunology examination; teaching

伤寒杆菌属沙门菌属, 为革兰阴性杆菌, 呈两端钝圆的短杆菌, 无芽胞和荚膜, 体周布满鞭毛, 伤寒杆菌的“O”、“H”抗原常用于临床诊断和实验室分型鉴定的抗原, “O”抗原为细菌壁脂多糖, 是性质稳定的菌体抗原, 耐热, “H”抗原属鞭毛蛋白质, 对热不稳定, 为鞭毛抗原, 可经甲醛固定, 利用上述特征将制备好的“O”和“H”抗原, 分别免疫健康家兔, 家兔体内可产生高效价的抗“O”和抗“H”血清。随后将这些抗血清应用于例如凝集反应、肥达反应等《临床免疫学与检验》实验教学中。动物免疫血清是一项常用的免疫学实验技术, 也是作者在医学教学中经常要用到的试剂。但目前市场上购买到的伤寒抗血清价格昂贵, 效价也不高, 因此为了节约经费, 使用方便, 提高实验课的教学质量, 多年来本实验室自制抗血清, 以伤寒杆菌“O”和“H”作为颗粒性抗原, 在短时间内制备出了高效价的免疫血清, 实验效果较为理想。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 实验动物 健康雄性家兔 10 只, 体质量 2~3 kg, 年龄 8 个月, 无免疫接种史, 做好标志, 分笼饲养, 随机分成 2 组, 由第四军医大学实验动物中心提供^[1]。

1.1.2 主要试剂 生理盐水, SRBC, 伤寒沙门菌“O”、“H”诊断菌液, 用甲醛灭活的伤寒沙门菌制成, 由宁波天润生物药业

有限公司生产, 浓度为 7.0×10^9 /mL。

1.1.3 设备与器材 冰箱, 离心机, 恒温水浴箱, 大剪刀, 止血钳, 眼科手术剪, 灭菌三角烧瓶, 动脉导管, 载玻片, 免解剖台, 试管, 吸管, 接种环, 2.5 mL 无菌注射器, 酒精灯, U 型微量反应板等。

1.2 免疫抗原的制备

1.2.1 伤寒沙门菌 O(H) 诊断菌液 实验时, 以无菌生理盐水作 1:10 稀释, 使菌液浓度为 7.0×10^8 /mL, 4 ℃ 冰箱保存备用^[2]。

1.2.2 2% SRBC 悬液 取适量抗凝绵羊血置于离心管中, 加入适量生理盐水, 每次 2 000 r/min 离心 10 min, 用吸管吸去上清液, 再加入 2~3 倍体积的生理盐水, 用吸管反复吹打混匀, 如此反复洗涤 3 次, 除去血浆蛋白。最后 1 次弃上清液, 取红细胞压积, 用生理盐水配成 2×10^8 /mL (2%) SRBC 悬液, 置 4 ℃ 的冰箱备用。

1.2.3 致敏 SRBC 的制备 取 2% SRBC 悬液与等量 1:10 伤寒沙门菌 O(H) 菌液混合, 置 37 ℃ 水浴 2 h, 其间应该每隔 15 min 摇动 1 次, 取出后离心, 弃上清液, 用生理盐水洗涤 3 次, 最后用生理盐水配成 2% 的致敏 SRBC 悬液。

1.3 免疫途径和程序^[3-5] 选择 2~3 kg 健康家兔 10 只, 耳静脉抽血少许分离血清, 检测有无与伤寒杆菌相关的凝集素;

* 基金项目: 西安医学院质量工程检验实验示范中心(XYZL2010-18)。

作者简介: 张淑莉, 女, 本科, 实验师, 主要从事医学检验教学方面的工作。

将家兔分成 2 组,分别用伤寒杆菌“O”和“H”抗原进行免疫注射,每组各 5 只进行免疫,2 组免疫注射程序相同,具体免疫程序见表 1。

表 1 伤寒杆菌“O”和“H”抗原免疫家兔程序

次序	日期 (d)	抗原剂量 (mL)	免疫部位及途径	免疫原类型
1	第 1 天	0.5	背部皮内多点注射	伤寒沙门菌“O”或“H”抗原
2	第 5 天	1.0	背部皮内多点注射	伤寒沙门菌“O”或“H”抗原
3	第 9 天	1.5	耳缘静脉注射	伤寒沙门菌“O”或“H”抗原
4	第 13 天	2.0	耳缘静脉注射	伤寒沙门菌“O”或“H”抗原
5	第 18 天	—	试血	—

注:—表示无数据。

1.4 试血 在末次免疫后第 5 天试血,用无菌注射器在家兔耳缘静脉采血 1 mL,分离血清,37 °C 温育 1 h,3 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液置于 F 管中,初步测定采用试管凝集实验测定抗血清效价大于 1:320 时,即可收获血清,若效价不理想,可再注射抗原,再试血,直至达到要求。

1.5 采集免疫血清^[6] 称兔子体质量,以 3%浓度的戊巴比妥钠溶液,按 30 mg/kg 进行耳缘静脉推注麻醉,应一边注射一边注意观察兔子的眼睑反射、瞳孔和呼吸的变化,麻醉好后将家兔仰卧位,四肢固定于兔解剖台上,使其头部略低,以充分暴露颈部,剃毛并消毒皮肤。沿颈部中线用手术刀切开皮肤约 10 cm,分离皮下结缔组织,暴露出肌层,用刀柄轻轻分离,暴露颈总动脉,选择血管中段,远心端用细线结扎,近心端用动脉夹夹住动脉,注意勿损伤血管,用眼科小剪刀在近心端动脉壁上

剪一“v”形缺口,将事先用肝素浸泡的无菌动脉导管一端插入近心端动脉中并用丝线固定,动脉导管另一端放入灭菌三角烧瓶中,然后缓缓松开动脉夹,血液很快射入到灭菌三角烧瓶中,2.5 kg 家兔可放血 80~100 mL。将三角烧瓶中的血液置于 37 °C 水浴箱中,并做好标志,1 h 后置于冰箱 4 °C 过夜,待血块自然收缩后分离血清,分装冻存,保存备用。

1.6 检测免疫血清效价

1.6.1 玻片凝集实验 取洁净玻片 2 张,用记号笔分为 2 个等分,在玻片的左上角分别标明“1”和“2”。于上述两玻片的左端用灭菌的接种环各加生理盐水 1~2 环,同样右端各加 1:20 伤寒沙门菌免疫血清 1~2 环,将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌,冷却后取少许伤寒杆菌菌液,先置于第 1 号玻片左端与生理盐水混匀,再取同种细菌加至第 1 号玻片右端与伤寒杆菌免疫血清混匀,轻轻摇动玻片,1~2 min 后观察结果。同样,取大肠杆菌菌液加于第 2 号玻片两端。并与 1 号玻片比较观察。

1.6.2 试管凝集实验测抗 O(H)血清效价 取 9 支试管,依次编号并做好标志。将待测血清进行系列倍比稀释后与一定浓度的免疫用细菌菌液混匀,设生理盐水对照管,使抗原抗体充分反应,肉眼观察每个试管的凝聚程度,以凝集出现“++”的最高稀释度为血清中抗体的凝集效价。见表 2。

1.6.3 间接凝集实验 取 U 型微量反应孔 9 个,依次编号,伤寒沙门菌的多糖抗原与 2%的绵羊红细胞混匀于 37 °C 作用下即为致敏红细胞,将待测血清用盐水作连续倍比稀释,同时设生理盐水对照组,加入致敏 SRBC 悬液,充分混匀后置 37 °C 水浴 2 h 观察结果。见表 3。

表 2 试管凝集操作程序

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9(对照)
生理盐水 (mL)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
待测血清 (mL)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃去 0.5
血清稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	—
诊断 O(H)菌液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—

注:摇匀后置 37 °C 水浴 2~4 h,或室温过夜后观察结果。—表示无数据。

表 3 间接血凝实验操作程序

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9(对照)
生理盐水 (mL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
待测 1:10 O(H)血清 (mL)	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25
血清稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	—
致敏 SRBC (mL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
最终血清稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—

注:—表示无数据。

2 结果

2.1 玻片凝集实验测定血清效价结果 在充足光源黑色背景上观察,可见 1 号载玻片右端液面会出现肉眼可见大小不等的乳白色的凝集颗粒或凝集块,混合悬液由均匀浑浊变为澄清透明,为凝集反应阳性(+),说明制备的免疫血清与伤寒菌液抗原发生特异性结合,第 1 号玻片的左端和第 2 号玻片的左、右

端生理盐水与菌液不发生凝集,反应后混合悬液仍呈均匀浑浊,没有出现凝集现象为阴性(-)结果。

2.2 试管凝集测定血清效价结果 判断凝集实验结果,同样需要有良好的光源和黑色的背景,应先观察盐水对照管,先不振摇,管底沉淀物呈圆形、边缘整齐,轻轻摇动试管,细菌分散呈均匀混浊,说明对照管无凝集现象。然后再分别观察各实验

管的凝集情况,并与对照管相比较。根据底部凝集物和凝集颗粒的松软度、大小、均匀度等性状及上清液的混浊程度,凝集程度通常以“++++”“+++”“++”“+”符号记录。伤寒沙门菌“O”抗原凝集物呈颗粒状沉于管底,轻摇时不易散开,黏于管底,“H”抗原凝集物呈絮状,疏松而大块地沉于管底,轻摇易离散。本次制备的伤寒诊断抗血清试管凝集效价为 1:1 280。见表 4。

表 4 试管凝集测定血清效价结果

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280	1:2 560	—
凝集程度	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	—

注:—表示无数据。

表 5 间接凝集测定血清效价结果

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280	1:2 560	—
凝集程度	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

3.1 本次免疫血清的制备是一连续性、综合性、系统性实验,本实验采用伤寒杆菌“O”和“H”标准菌液直接作为抗原免疫家兔,方法操作简单,避免了抗原制备的繁杂程序,从实验结果分析,本次制备的伤寒诊断免疫血清试管凝集效价为 1:1 280,间接凝集效价为 1:640,本次实验获得的抗血清效价较高,整个实验方案从免疫原的制备,动物的饲养,免疫程序的制定与实施,动物的采血,一直到抗血清的鉴定、保存。在整个实验过程中实验者既学习了自制抗血清的方法,又使实验者在理论上可印证抗原刺激机体产生免疫应答的过程,对抗原、抗体等抽象的概念得以直观理解,从实验角度包括了动物实验技术、抗原的制备、凝集反应等重要的免疫学技术。同时还能充分调动学习者的积极性和主动性,培养实验者分析问题和解决问题的能力,增强实验者创新思维、动手能力及加强实验者的团队协作能力^[7-8]。

3.2 将适当的颗粒性抗原物质(如细菌、红细胞等)反复多次注射到动物体内,使之产生免疫应答,经过一段时间动物血清中出现大量特异性抗体,这种含抗体的血清称为抗血清(或免疫血清)。免疫血清是经过抗原免疫动物的血清,含有特异性免疫球蛋白。它不仅在病原生物学、免疫学检验方面应用十分广泛,而且是一种非常重要的生物制品,大量用于病原体诊断与感染性疾病的紧急预防和治疗^[9]。

3.3 通过本次实验的设计及实验过程和结果来看,在 1 个月内制备的兔抗伤寒免疫血清,具有免疫时间短,整个实验过程操作简单易行,效价高,成本低,并将收集的抗血清作为诊断试剂随后应用于凝集反应、肥达反应等免疫学检验实验教学中,

2.3 间接凝集实验测定血清效价结果 先观察生理盐水对照孔,红细胞集中沉积孔底,呈一小圆点,边缘整齐,不发生凝集为阴性。然后自第 1 孔开始观察孔内液体的浑浊程度及孔底凝集块的大小。若红细胞凝集,则均匀分布于孔底周围,可根据红细胞凝集程度判断阳性反应的强弱,以出现“++”凝集的最高稀释度为血清中抗体的凝集效价。本次制备的伤寒诊断抗血清间接凝集效价为 1:640。见表 5。

实验效果明显,达到了实验教学的要求,是高校免疫学检验教学实验中制备免疫血清简便、实用的方法。

参考文献

- [1] 孙向彬. 制备高效价细菌免疫血清应重视的几个因素[J]. 农垦医学, 2005, 27(3): 244-245.
- [2] 邵长玲, 孔军伶. 制备免疫血清免疫法改良和效果[J]. 卫生职业教育, 2011, 29(9): 111-112.
- [3] 陶永平. 短程免疫方案制备抗血清的效价观察[J]. 山西医药杂志, 2013, 42(5): 514-515.
- [4] 陈小挺, 樊娟娟, 张玲娇, 等. 实验教学中颗粒性抗原与可溶性抗原制备抗血清的方法及其应用[J]. 健康研究, 2010, 30(1): 15-17.
- [5] 吴震杰, 蔡玲斐, 王金鑫, 等. 不同免疫程序制备伤寒抗血清的效价比较[J]. 杭州师范学院学报: 医学版, 2007, 27(5): 317-318.
- [6] 王娅, 王金勇, 王淑兰. 伤寒、副伤寒免疫血清的制备[J]. 数理医药学杂志, 2005, 18(2): 178-179.
- [7] 陈建芳, 高静, 于桂霞. 开展免疫学综合设计性实验的探索[J]. 中国医学创新, 2010, 7(24): 172-173.
- [8] 侯晋, 周烨, 刘星光, 等. 文献汇报在医学免疫学教学中的实践和探讨[J]. 基础医学教育, 2011, 13(11): 969-971.
- [9] 刘辉. 临床免疫学和免疫检验实验指导[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 1.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-04-21)

(上接第 2660 页)

Candida orthopsilosis isolated from blood culture[J]. Mycopathologia, 2008, 165(2): 81-87.

[7] 金云, 等. API20C 和科玛嘉显色培养基鉴定酵母菌的比较[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(5): 497-498.

[8] Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API20C AUX system for the identification of clinically important yeasts [J]. Rev Soc Brasil Med Trop, 2005, 38(3): 261-263.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-05-15)