

钩端螺旋体高价免疫血清制备方法的研究

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

张婉荷 张哲夫 陈瑞珍 白秀芬 王宏英

为了得到高价钩体免疫血清，我们从抗原和免疫途径方面进行了试探，结果通过淋巴结免疫获得了高滴度的免疫血清。

一、材料和方法：

1、菌株：黄疸出血群赖株。

2、家兔：体重2~3公斤，免疫前血液不含钩体抗体。

3、抗原制备：赖株感染金地鼠，濒死，剖取肝组织培养于切氏培养基，2~3代后接种汉33综合培养基，培养7天。取纯净、生长良好的培养物离心沉淀，以pH7.4 1/15M磷酸缓冲液制成原培养物1/100浓缩菌液，再按下法分别制出两种溶解抗原。

①胆盐抗原：将浓缩菌液用胆盐处理按原培养物1/2稀释，加等量2%去氧胆酸钠。放37°C三小时后，经1000转/分离心30分钟，取上清透析冻干。

②冻融抗原：将浓缩菌放-20°C和37°C反复冻融，镜检菌体全部裂解。静置，取上清，冻干。

4、检查抗原的方法：免疫后每两周试血一次，同时作凝溶试验及琼脂免疫扩散试验：①凝溶试验按常规进行；②琼脂免疫扩散试验：

A琼脂板的组成为，粉末琼脂（日本产）1%，氯化钠10%，溶于1M磷酸缓冲液中，pH7.4, NaN_3 0.7%。加热溶化后，取3毫升放到8.7×2.8厘米玻片上，打孔，孔间距0.3厘米。

B结果判定：取干燥抗原，稀释成3~6毫克/毫升，放于中心孔，不同稀释的试验血清放于周围孔，一孔不加血清为对照，每孔加入量为0.015毫升，放37°C，24及48小时观察结果，将血清出现沉淀线的最高稀释度定为效价。

5、免疫方法：

①淋巴结皮下多点免疫法：以75毫克/毫升卡介苗0.6毫升注射家兔后脚趾间6处皮内，两周后腠窝淋

巴结肿大，第一次免疫用6毫克抗原溶于0.3毫升蒸馏水，加福氏完全佐剂0.3毫升混合后，注射两侧淋巴结内。于免疫后26、40、51、63、及86天进行加强免疫，每次均用6毫克抗原加福氏不完全佐剂等量混合，在背部取4点皮下注射。

②静脉免疫法：抗原，免疫剂量，间隔时间均与淋巴结皮下多点免疫组相同，仅抗原内不加佐剂。

二、结果：

1、淋巴结皮下多点免疫与静脉法比较：赖株冻融抗原，淋巴结法免疫5只家兔，静脉法免疫6只。两组兔后14、23、40、50、63及87天试血。用两法检查抗体效价。

①凝溶试验抗体水平：历次试血的抗体滴度表明淋巴结组显著高于静脉组，两组抗体均免疫后63天达最高峰，淋巴结组的滴度为1:334,200；静脉组为1:46,240，前者较后者高8倍。

②琼脂免疫扩散反应抗体水平：两组历次试血，有明显的不同，静脉组多为阴性，只有个别出现阳性；而淋巴结组在免疫后40天均为阳性，在87天效价最高，达1:64~128。

2、胆盐抗原与冻融抗原比较：赖株胆盐抗原与冻融抗原免疫用淋巴结皮下多点免疫法，各免疫5只家兔，试血日期、检查方法均同前，结果两种抗原均可产生较高效价抗体：凝溶试验抗体效价为1:127,300，冻融组为1:245,500；琼脂扩散抗体效价为1:64~128。

本试验采用凝溶试验，也使用了琼扩反应，一般血清凝溶效价在1:10,000以上时，才能产生琼扩反应，呈一条清楚的沉淀线。在抗体效价较高时，可出现两条沉淀线。淋巴结免疫法可产生较高效价抗体，故均可产生琼脂免疫扩散反应，而钩体常规所用静脉法却不能。