

# 免疫血清对鼠疫杆菌的杀伤作用

高明<sup>1</sup> 陈怀春<sup>2</sup> 于晓涛<sup>3</sup> 纪树立<sup>1</sup> (指导)

鼠疫免疫的早期研究表明,单纯抗毒素不能提供有效的保护作用<sup>[1]</sup>,特异性免疫主要是针对细菌本身,阻止了细菌在体内的增殖。免疫动物的血液具有杀菌作用<sup>[2]</sup>。1943年Jawetz和Mayer证明血中的杀菌成分是白细胞<sup>[3]</sup>。鼠疫杆菌为兼性细胞内寄生菌,可以在单核细胞内增殖<sup>[6]</sup>。对单核巨噬细胞的研究揭示,免疫动物单核巨噬细胞系统活性增强,迟发型皮肤变态反应阳性。经鼠疫杆菌感染后恢复的动物取决于单核巨噬细胞系统是否被活化<sup>[7]</sup>。而特异性抗原致敏的T淋巴细胞则释放淋巴因子活化单核巨噬细胞系统<sup>[7]</sup>。

免疫动物体内的多种特异性抗体(主要有抗F1抗体等)的免疫保护,据认为是调理吞噬的结果。免疫血清被认为既不能溶解鼠疫杆菌又不能杀伤鼠疫杆菌。曾有报告指出在体外免疫血清与正常血清毫无差异地支持鼠疫杆菌生长<sup>[2]</sup>。Жуков-Вережников, Фάгеева和Дертева等人<sup>[1]</sup>亦持相同观点,并被广泛接受,视为经典。

1972年Карташова报告了鼠疫杆菌在超正常血清浓度的溶菌酶作用下,可被免疫血清中的抗体和补体溶解<sup>[4]</sup>。在前人大量工作的基础上我们沿用前人用以证明杀菌作用的主要方法之一——血清杀菌试验,以菌落形成单位数下降为杀菌的标准,模拟生理条件,进行了体外血清杀菌试验,观察到血清明显的杀菌活性。多次试验表明,该活性可重复见于免疫豚鼠和免疫家兔血清中。现将结果报告如下:

## 材 料

1.细菌:鼠疫杆菌活疫苗(EV株),强毒菌(559株)和弱毒株(EV76paris株,

简称EV<sub>p</sub>)的冻干菌种,二代培养后用于试验。

2.培养基:1%溶血赫氏琼脂培养基。

3.动物:豚鼠350~450克,家兔3~3.5公斤,健康,雌雄不计。

4.磷酸盐缓冲盐水(PBS),199综合培养液:均按常规配制。F1抗原致敏血球,效价4万。全部试验使用同批血凝液。

5.免疫血清制备:豚鼠经EV株活菌三次免疫获得免疫血清。混合血清PHA滴度1:80。家兔经EV株活菌二次(部分经一次EV株免疫,一次559株攻击)后获得。部分血清56℃30分灭活补体。家兔血清不混合,分只单独试验。

正常豚鼠,兔血清做为对照。

## 试验方法

1.指示菌:EV株,28℃36小时培养,PBS稀释。559株为14~36小时培养物,PBS稀释。

2.方法:总量1ml的溶液中含被检血清0.8ml,〔10<sup>6</sup>/ml〕细菌液0.1ml,盐水补足量。置37℃24小时孵育,定期取样0.1ml,适当稀释后涂平板,培养后计数菌落数,每份样品接种三个平板。取均数做为原始数据。进行t检验分析。

可疑菌落再次培养,进行噬菌体特异性裂解试验。

## 结 果

### 一、24小时杀伤结果:

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

2 内蒙哲盟地方病防治站

3 青海地方病防治研究所

1.豚鼠血清杀伤作用: EV株在正常血清和免疫血清中表现明显不同 ( $t=4.3949, P<0.01$ )。免疫血清有杀菌作用, 正常血清缺乏该活性。免疫血清灭活补体后, 该活性减弱 ( $t=3.6309, P<0.05$ ) (表1)。

表1 豚鼠血清对EV株的的杀伤作用

分 组	例 数	均数 $\pm 2\sigma$
正常血清	4	$2.2398 \pm 1.0374$
免疫血清	4	$-0.6736 \pm 0.9554$
灭活免疫血清	4	$1.0322 \pm 0.9238$
灭活正常血清	4	$3.2016 \pm 0.2526$

559株在正常血清(2份)和免疫血清(8份)中表现也明显不同(均数分别为3.86和0.9118,  $t=2.80, P<0.05$ ), 正常血清缺乏该活性。另一次试验中正常血清组与免疫血清组, 也相差悬殊。

2.家兔血清的杀菌作用与豚鼠血清中所见相似。免疫血清对EV株有明显的杀菌活性, 正常血清缺乏该活性 ( $t=3.7072, P<0.01$ )。免疫血清灭活后该活性减弱 ( $t=3.4269, P<0.05$ )。免疫血清对559株也有杀菌活性, 正常血清缺乏该活性 ( $t=2.1439$ ), 免疫血清灭活后活性减弱。

二、24小时内血清杀菌动态:

1.豚鼠免疫血清对EV株的杀伤自细菌与血清接触开始就可明显表现出来, 并持续整个24小时期间。豚鼠免疫血清对559株的杀伤明显见于12~24小时(图1,2)。

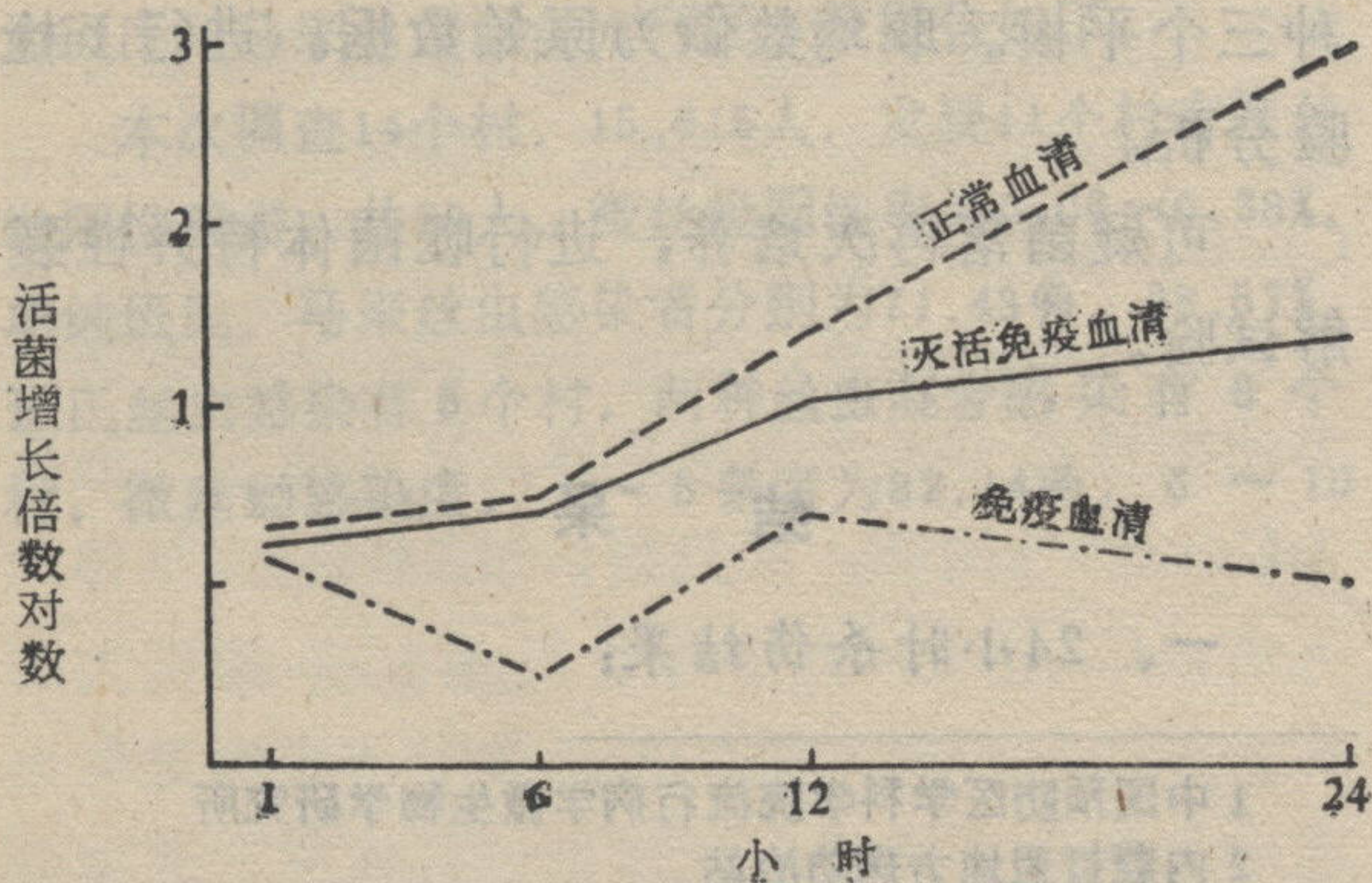


图1 豚鼠免疫血清杀伤EV株动态

活菌增长倍数对数

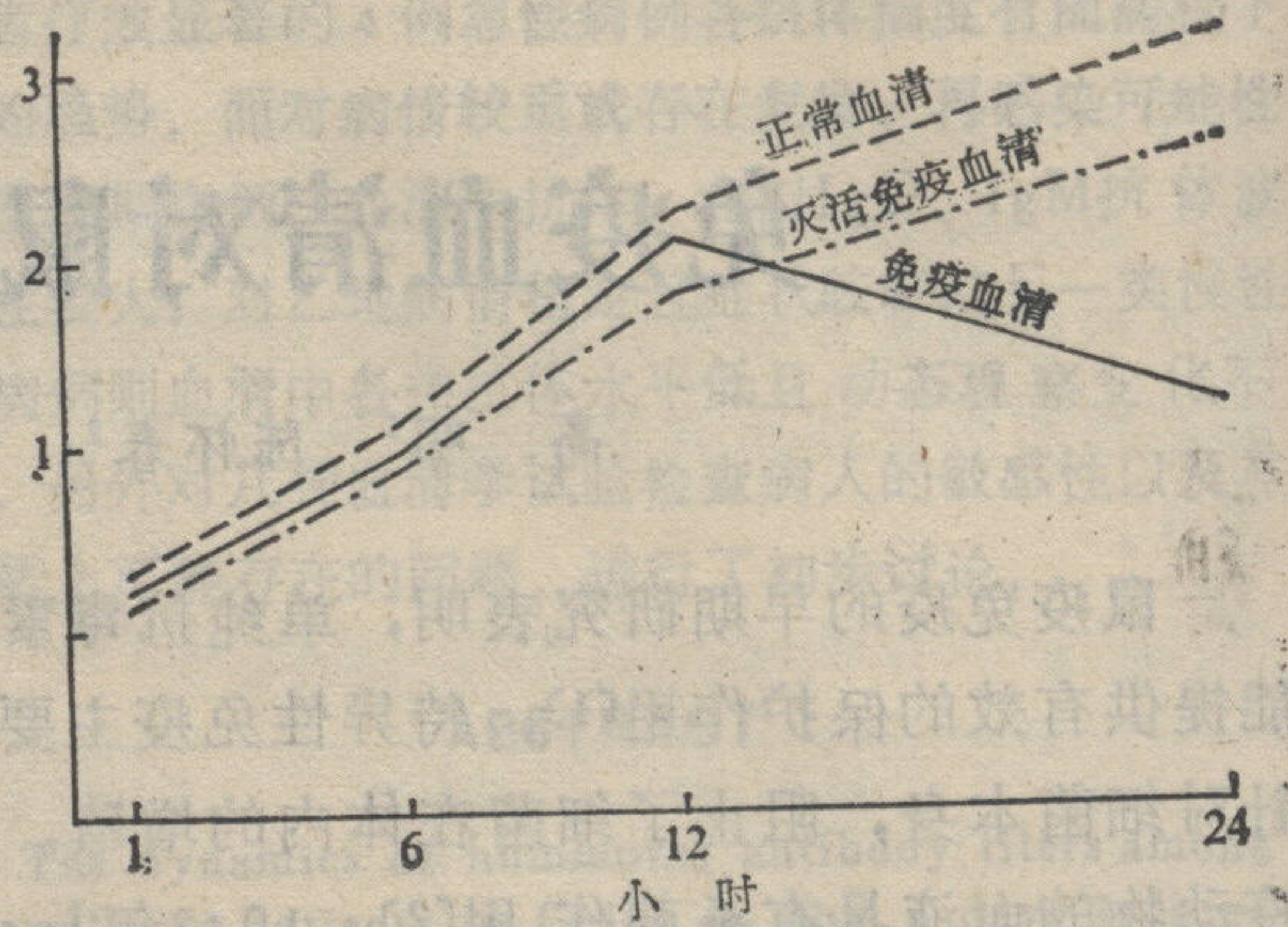


图2 豚鼠免疫血清杀伤559株动态

2.家兔免疫血清对EV株和559株的24小时杀伤动态与豚鼠免疫血清基本相同。对EV株的杀伤持续整个24小时期间, 对559株的杀伤明显见于12小时以后。

三、杀菌能力与血凝滴度的比较: 60匹豚鼠经PHA测定, 杀菌试验及直接保护力试验, 未见杀菌活动与PHA滴度间有数量关系。家兔免疫血清PHA滴度高, 杀菌能力强, 但动物数少, 不足以说明问题, 有待进一步研究确定。

四、免疫凝集的影响: 由于免疫血清中存在凝集抗体, 细菌可能凝集成团块, 而造成活菌计数降低。凝集结果不受补体灭活与否的影响。为估计免疫凝集的影响, 将具有杀菌活性的免疫血清灭活后再进行杀菌试验。结果灭活补体后免疫血清杀菌活性降低。表明活菌数与补体有关。

五、血清杀菌能力与保护力的关系: 60匹进行过血清杀菌试验的豚鼠, 皮下攻击强毒559株。测其保护力, 初步结果表明两者有一定的相关性。杀伤EV株能力(活菌增长倍数对数)与保护力(死亡百分率)的直线回归方程  $Y=0.6718+5.5991x$ , 相关系数  $r=0.77$ 。杀伤559株能力(表示方法同上)与保护力(表示方法同上)的直线回归方程  $Y=1.0899+2.724x$ , 相关系数  $r=0.90$ 。原始数据见表2。

表 2 强毒菌攻击后动物死亡天数与血清  
杀菌、PHA滴度比较

动物号	EV株活菌增 长倍数对数	PHA滴度	存活天数
1	32.6575	-	7
2	63.6780	-	8
3	626.6583	-	8
4	1.2247	160	20
5	1.225	-	20
6	2.6944	40	20
7	2.5903	40	20
8	1.4697	-	20
9	0.3246	40	20
10	0.0122	-	20
11	22.3515	160	20
12	19.5958	-	20
13	1.2449	-	20
14	12.6963	-	20
15	0.0122	-	20
16	0.0184	80	20
17	18.3618	-	9
18	20.5218	-	7
19	15.6356	-	19
20	0.6887	-	20
21	0.2932	-	12
22	0.1856	-	20
23	0.0302	40	20
24	0.4301	-	10
25	0.7036	-	20
26	0.3714	-	15
27	0.0680	-	11
28	0.1076	-	20
29	0.2199	-	20
30	0.2345	160	20
31	0.0976	-	20
32	0.0029	40	20

注: 1、2、3、17、18、19为正常豚鼠血清

## 讨 论

据报告鼠疫杆菌是血清抗性菌<sup>[1, 3]</sup>。我们的实验中可见豚鼠、家兔免疫血清可以杀伤鼠疫杆菌的EV株和559株。两株菌受到杀伤的程度不同,但趋势相同。下面以EV株为主讨论。

试验的各组血清中,具有明显杀菌活性的是未经灭活补体的免疫血清,灭活补体后杀菌活性明显减弱。正常动物血清组活菌数的增长略低于同份灭活血清。这些结果表明单纯抗体

或补体均不能有效地控制细菌的增殖。只有在抗体、补体都存在的条件下才能获得最有效的杀伤。推测补体经抗原抗体的活化,参与了这一杀菌过程,并起十分重要作用。

F1抗原是一种抗补体物质<sup>[8]</sup>。可能因消耗了液相补体或在菌体外表面构成屏障,保护了菌体免受补体的杀伤。F1成分可能是杀菌作用的重要影响因素,但除此之外参与血清杀伤的特异性菌体成分(或称靶结构)可能还有其它因素,有待探讨。

由于在血清杀菌24小时动态观察中可见,活菌数因时间而变化,所以,24小时观察是必要的。此外,EV株在免疫血清中几乎不能增殖,559株则显然是进入对数期后才遭到杀伤。

保护力试验中可见14匹豚鼠血凝阴性,但可得到完全保护。因此,单纯依赖F1抗体间接血凝滴度反应评价免疫力的高低,是不全面、不精确的。血清的杀菌作用与保护力有一定的相关性,进一步改进的杀菌试验有可能有助于更全面地评价免疫力。

不过血清杀菌试验在目前的水平上还不能与抗鼠疫保护能力之间建立精确的数量联系。尽管如此,做为动物免疫力的体外模型,还有必要对杀菌试验进一步研究、改进。

## 摘 要

1. 豚鼠和家兔免疫血清对28°C生长的鼠疫杆菌株EV、559均有杀伤活性。该活性见于细菌和血清37°C作用一段时间后。

2. 鼠疫杆菌的不同株(EV、559)对免疫血清杀伤敏感性及其杀伤动态表现不同。前者的杀伤在接触早期就开始。后者在进入对数生长期后才开始。

4. 免疫血清杀菌能力初步认为与保护力相关。

5. 免疫豚鼠间接血凝(PHA)试验阴性并不能绝对认为是缺乏抗鼠疫免疫力。

## ABSTRACT

The bacterial viability of *Y. pestis* in animal the immune serum was studied by means of guinea pig and rabbit serum bacteriocidal assay. When *Y. pestis* EV and 559 (virulent) were exposed to these sera at 37°C, we found that strain EV was the first to

succumb at the beginning while strain 559 reduced its clone forming only during the logarithmic phase. We demonstrated too the correlation between this serum activity and guinea pig protection but foiled in show any relationship between the titre of passive haemoagglutination and the serum activity. It is suggested that the serum bactericidal test may be a useful tool in estimating the animal protection potency.

参 考 文 献

1. Pollitzer R: WHO Monograph Series, No.2 Plage,

p160, 1954  
2. Malone RH: Ind J Med Res, 13: 121, 1925  
3. Jawetz E et al: J Immunol, 149 (1): 15, 1944  
4. Капрашова А. Л.: Ж М Э И, (2): 116, 1972  
5. 向进敏等译:《细胞与组织培养》, 1965  
6. Cavanaugh DC: J Immunol, 83: 348, 1959  
7. Wong JF: J Inf Dis, 135 (1): 67, 1977  
8. Williams J E: J Inf Dis, 126: 225, 1972

(全昱东、崔百忠、郭志祥, 方东升同志参加部分工作, 特此致谢)

由尘螨引起变态反应性哮喘的调查

周荣林\* 叶树棠\* 俞 谦\* 董瑞男\* 仲利洁\*

变态反应性哮喘是一种常见病, 其病因复杂。1983年10月, 作者开设尘螨性哮喘专科门诊, 在对病人的随访中, 进行了病家调查, 报道如下:

**患者宋××**: 女性, 13岁, 学生, 哮喘病史四年余。每年秋季好发, 持续1~2个月。幼年曾患过敏性鼻炎, 对破伤风抗毒素皮试有过敏史。病前无呼吸道疾患, 亦无寄生虫感染史和吸入刺激性气味病史。哮喘常因气候变化、呼吸道感染、疲劳时诱发。患者自9岁起, 一回到家即感胸闷喘息, 故一直住在外婆家(离自家约7里远)。专科门诊检查: 呼吸25次/分, 两肺满布哮鸣音。尘螨浸出液(上海第十三制药厂供应)1:5万皮内试验。20分钟后出现红晕、肿胀, 直径1.6厘米, 判为阳性。第二周起, 尘螨浸出液1:5万, 0.1毫升, 穴位皮下脱敏治疗。当晚出现少量的荨麻疹, 次日自愈。以后每周一次, 变换穴位12次为一疗程, 1:5万尘螨浸出液0.1~0.5 ml, 未出现副作用, 治疗到第三、四次时, 哮喘明显好转, 两肺未闻及哮鸣音(12次为一疗程), 再做皮内试验, 肿胀直径缩小到1.3厘米。

流行病学调查发现: 患者的住宅系老式大宅, 共住三户人家, 患者居住二楼, 中等清洁, 光线暗, 通风较差, 湿度大。采集软垫家具、毛毯等处屋尘, 每克尘埃中尘螨300只。

**患者的妹妹朱×**: 11岁, 已有二年哮喘病史, 但发作较轻。检查: 呼吸20次/分, 两肺闻及哮鸣音。

1:5万尘螨浸出液皮内试验, 皮肤红晕肿胀, 直径3.0厘米, 以后做脱敏治疗, 方法同前。治疗到第五次时, 两肺哮鸣音消失, 至今哮喘再未发作。一个疗程后皮内试验, 结节直径为2.0厘米。患者的父母, 无哮喘病史, 1:5万尘螨浸出液, 皮内试验为阴性。

**患者张××**: 女, 20岁, 1982年秋患哮喘, 住房比较潮湿。采集被褥、枕巾、床架上积尘, 每克尘埃中尘螨250只。对患者用1:5万尘螨浸出液作皮内试验, 20分钟阳性结节直径达1.2厘米。

**患者沈×**: 女, 6岁, 1983年立秋季节时发生哮喘。检查: 呼吸20次/分, 两肺满布哮鸣音。住房潮湿, 阳光照射不足, 居住较拥挤, 采集被褥, 枕巾, 床架积尘, 每克尘埃尘螨300只。对患者用尘螨浸出液1:1万, 皮上划痕试验阳性。由于以上两患者均未到专科门诊进行脱敏治疗, 哮喘发作未减轻, 随访皮上划痕试验仍为阳性。

根据病史、流行病学调查, 尘螨浸出液皮试阳性和脱敏治疗反应, 提示该住宅内, 四例变态反应性哮喘病人的致敏原为尘螨。

\* 苏州医学院流行病学教研室

\* 苏州市沧浪区人民医院