

厌氧棒状杆菌群抗血清的血清学分析

俞永平、童少清、李京平、叶玲仙、徐锡荣

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

厌氧棒状杆菌具有刺激网状内皮系统、抗感染、调节免疫反应、抑制肿瘤等一系列生物学活性。近年来制备的厌氧棒状杆菌菌苗作为肿瘤免疫治疗剂受到了重视。这类细菌的分类较混乱,1966年 Prevot^[1]将其分为12个属,但其中不少为同义名^[2,3]。1972年 Johnson 和 Cummins^[4]用细胞壁分析、DNA 同源性以及血清学研究分为3大群4个血清学群;〔即疮疱丙酸杆菌(*P. acnes*),又分为两个血清学群、颗粒丙酸杆菌(*P. granulorum*)和贪婪丙酸杆菌(*P. avidum*)〕。本试验即根据 Johnson 等提出的4个血清学群,制备得到标准抗血清,并初步进行了一些血清学分析。

材料和 方法

一、菌种

血清群 I (菌号 0207), 血清群 IV (菌号 4982、0589、0575) 由世界卫生组织供给; 血清群 II (菌号 10390), 血清群 III (菌号 10387) 由英国国家菌种收集中心供给。

二、培养基

1. 胰酶庖肉半固体培养基: 保存菌种用。
2. 硫乙醇酸钠液体培养基: 制备菌苗用。

三、菌苗制备

将各菌种接种硫乙醇酸钠液体培养基, 接种量为1%, 于36—37℃培养6天后, 加0.5%福尔马林, 放37℃24小时灭菌, 离心去上清, 菌体用0.85% NaCl 水溶液洗涤3次后, 再用此溶液制成菌悬液备用。

四、血清效价测定

1. 对流免疫电泳:

琼脂板: 厚度约2毫米, 用1% 国产琼脂制备。

缓冲液: pH 8.6 硼酸缓冲液, 离子强度 0.05 μ 。

电泳: 4伏/厘米, 0.5—1小时

2. 玻片凝集试验:

血清用2倍稀释法配成不同浓度, 各取一滴放在玻片上, 分别滴入等量菌液(20亿/毫升), 搅匀, 放室温, 10分钟内观察结果。

3. 琼脂双扩散:

所用琼脂板与缓冲液, 与对流免疫电泳法相同。中央孔加血清, 周围孔加抗原, 孔径2毫米, 放4—8℃冰箱, 扩散48—96小时记录结果。

五、免疫

体重2500克的健康家兔, 静脉免疫3—4

次,每次间隔 5—7 天。

试验结果

一、免疫血清效价及其交叉情况

各群血清的免疫效价及交叉效价见表 1。

表 1 结果说明,用对流免疫电泳法测定的

表 1 各群血清免疫效价及交叉效价

血清群别	测定方法	抗血清效价	交叉效价					
			I	II	III	IV		
						0575	0589	4982
I	对流	64		32	32	16	8	4
	凝集	8192		8192	8	—	—	128
	扩散	+		+	⊕	⊕	—	—
II	对流	256	8		4	8	8	16
	凝集	32768	1024		—	—	—	512
	扩散	+	⊕		—	⊕		—
III	对流	128	8	—		8	—	—
	凝集	16384	1024	—		—	—	—
	扩散	+	⊕	—		⊕	—	—
IV ₁ (4982)	对流	64	8	32	—			
	凝集	16384	128	4096	—			
	扩散	+	—	⊕	—			
IV ₂ (0575)	对流	16—32	—	—	—			
	凝集	512—1024	—	—	—			
	扩散	+	—	—	—			

注:琼脂扩散只作定性试验,只能观察有无沉淀线。“+”表示有沉淀线,“⊕”表示沉淀线不完全相联,“—”表示无沉淀线。

效价为 16—256,用凝集试验法测定的效价为 512—32768,两者结果基本平行。各群血清之间都有交叉反应,群 I 血清与 II、III、IV 群抗原交叉,群 II 血清与 I、III、IV 群抗原交叉,群 III 血清与 I、IV 群抗原交叉,群 IV 0575 血清无交叉;而 4982 血清与群 I、II 抗原交叉。II、III、IV 群血清交叉效价较低,群 I 血清与 II、III、IV 群抗原的交叉效价较高。

由琼脂双扩散法测定的结果进一步看出,4 个血清学群相互之间有部分相同的抗原性,

在群 I 与群 II 之间有完全相同的抗原性(见图版 I-1、2),这与 Johnson^[4] 的试验结果一致。

二、各群血清的特异性

免疫血清加等体积的菌液,进行吸收,离心除去菌体,血清冻干保存。

经吸收后的各群血清效价及交叉情况见表 2、图版 I-2。4 个群血清中以群 III 血清特异性

表 2 吸收后的各群血清效价与交叉效价

血清群别	测定方法	血清效价	交叉效价					
			I 群抗原	II 群抗原	III 群抗原	IV 群抗原		
						0575	0589	4982
I	对流	8		4	—	—	—	—
	凝集	8192		4096	—	—	—	—
	扩散	+		+	—	—	—	—
II	对流	128			4	—	—	—
	凝集	8192			512	—	—	—
	扩散	+			—	—	—	—
III	对流	64	—	—		—	—	—
	凝集	8192	—	—		—	—	—
	扩散	+	—	—		—	—	—
IV (4982)	对流	64	—	—	—			
	凝集	8192	—	1024	—			
	扩散	+	—	—	—			

最好,其交叉效价已全部被吸收掉;群 II 血清与 I、III 群抗原仍有很低的交叉;群 IV 血清与群 II 抗原有一定交叉价;群 I 血清经吸收后对流电泳效价损失较大,且与群 II 抗原的交叉价仍较高,与本血清效价只差一个滴度。用双扩散试验检查,群 I 与群 II 之间存在完全相同的抗原成份,因此要制备特异性高的群 I 血清比较困难,尚需进一步试验。

三、各群血清检定厌氧棒状杆菌的情况

用对流免疫电泳法检定 10 株已知分群的国际菌种(见表 3),结果看出相应血清与相应菌株都能达到血清原效价,能够将相对应的菌株鉴别出来。

表 3 10 株国际菌种检定结果(对流电泳)

菌号及群别		四群血清	检定结果			
			I	II	III	IV
I	0207		8	2	—	—
	3706		8	2	—	—
	No. 25		8	—	—	—
II	10390		4	128	—	—
	No. 14		4	64	—	—
III	10387		—	4	64	—
	0507		—	4	64	—
IV	0575		—	—	—	32
	0589		—	—	—	64
	4982		—	—	—	64

四、IV 群 (*P. avidum*) 菌株的血清学性状

在制备厌氧棒状杆菌血清的过程中, 发现同属于 IV 群的 0575、0589、4982 等 3 个菌株的抗原性不完全相同(见表 4)。表 4 结果说明,

表 4 IV 群三个菌株的血清抗原性比较

测定方法	测定用抗原	血清		
		0575	0589	4982
对流电泳	0575	32	<4	32
	0589	—	128	64
	4982	—	<4	64
玻片凝集	0575	256	—	—
	0589	—	512	64
	4982	—	128	>2048

4982 血清抗体谱最广, 与 0589 和 0575 抗原之间有相同抗原, 0589 血清与 0575、4982 之间存在部分相同抗原, 而 0575 血清与其它两个抗原之间无相同抗原。双扩散试验进一步看出, 4982 血清与 0589 抗原存在完全相同的抗原, 但 0589

抗原还存在不同于 4982 及 0575 的一个成份, 4982 血清与 0575 抗原之间的抗原成份只是部分相同(见图版 I-3)。

讨 论

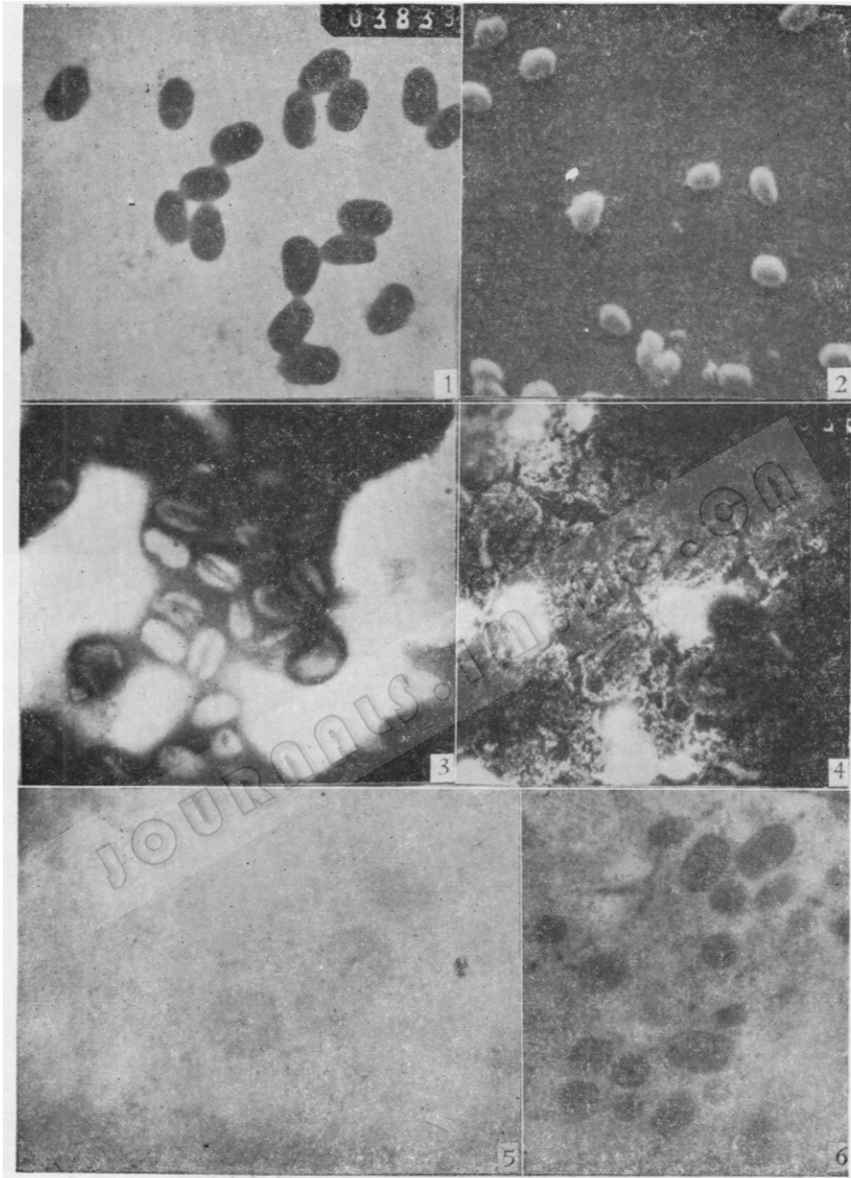
厌氧棒状杆菌的血清学检定方法, 一般用凝集试验, 也有用对流免疫电泳者, 本试验用两种方法测定血清效价基本平行。据 Joan, D.^[5] 试验证明, 厌氧棒状杆菌可溶性抗原具有生物学活性, 因此我们认为可用对流免疫电泳为厌氧棒状杆菌血清学测定方法, 可避免菌体发生自凝时带来的麻烦, 但不易得到电泳效价高的血清, 这是制备血清时的一个困难。

用 0207 菌株制备的群 I 血清很难将其中与群 II 抗原的交叉成份吸收掉, 双扩散试验看出, 用群 II 抗原吸收后的此群 I 血清含有相同的 I、II 群抗原成份(图版 I-2), 因此很难进一步吸收掉, 如进行再吸收, 则连同群 I 成份一起被吸收掉。因此是否存在比 0207 菌种特异性更好的群 I 菌株值得考虑。

由于群 IV 中的 3 个菌株在血清学抗原性方面各不相同, 所以对其血清学性能还应进一步研究。根据试验结果, 说明这 3 个菌株代表 3 个型。

参 考 文 献

[1] Prevot, A. R.: *Manual for the Classification and Determination of the Anaerobic Bacteria* (Tr. from French), London Kimpton, 1966, pp. 345—355.
 [2] Reid, J. D. and M. A. Joya: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 19: 273, 1969.
 [3] Zierdt, C. H. et al.: *ibid*, 18: 33, 1968.
 [4] Johnson, J. L. and C. S. Cummins: *J. Bacteriol.*, 109: 1047, 1972.
 [5] Joan, D. *ibid*, 120: 24, 1974.



褐边绿刺蛾颗粒体病毒的颗粒体

1. 透射电子显微镜下的颗粒体 (20,000 ×);
2. 扫描电子显微镜下的颗粒体 (11,000 ×);
3. 未完全碱解的颗粒体 (20,000 ×);
4. 颗粒体外壳溶解释放稍弯曲的病毒粒子 (25,000 ×);
- 5, 6: 脂肪体细胞中的颗粒体 (48,000 ×, 25,000 ×)

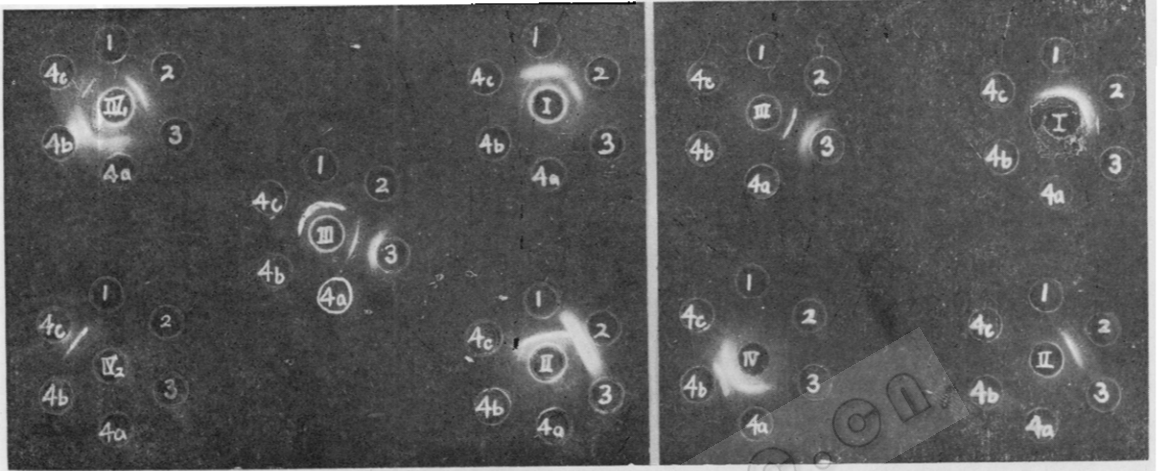


图 1 群血清与抗原之间的交叉反应

中央孔：各群血清

周围孔：各群抗原(4a:4982, 4b:0589, 4c:0575)

图 2 吸收后各群血清与抗原之间的交叉反应

中央孔：同图 1

周围孔：同图 1

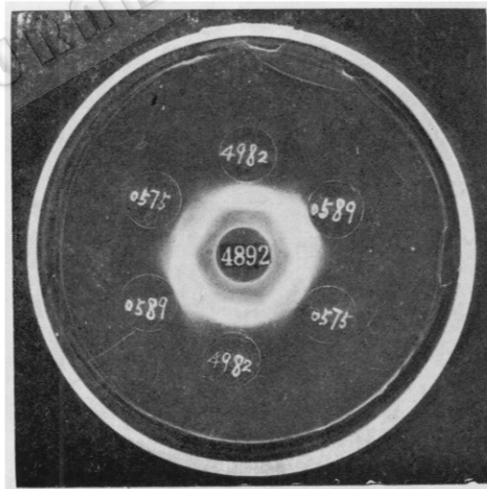


图 3 IV 群三个菌株的血清抗原性

中央孔：4892 血清

周围孔：抗原