

反向炭凝试验 (RCAT) 用于评价钩端螺旋体 菌苗质量的初步探讨

鲍行豪 张锦麟¹ 罗海波² 刘燕 李岩金

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

评价钩端螺旋体(简称钩体)菌苗制剂的质量,常用理化性状鉴定、无菌试验、毒性试验、安全试验及免疫原性试验等。亦有人用暗视野显微镜作粗略计数,但此法无助于外膜菌苗的评价。为及时测知每批制剂的浓度,我们在钩体外膜菌苗(OE 菌苗)的研制过程中,提出了使用反向炭凝试验(RCAT)作为衡量菌苗质量的客观标准之一,并用 RCAT 对各批 OE 菌苗及多批钩体普通菌苗进行了测试,并对钩体活培养物 RCAT 滴度与暗视野计数法进行比较,发现本法有一定的规律性,现将结果报道如下。

材料与 方法

(一) 材料

1. 待试钩体菌苗:

(1) 外膜菌苗: 系作者等^[1,2]研制的各批单价与多价 OE 菌苗。

(2) 普通菌苗: 收集上海、成都、武汉等生物制品研究所制备的多批多价普通菌苗。

2. 钩体免疫炭血清: 按鲍行豪等^[3]方法制备(合格产品),并用兔血清盐水稀释至所需浓度(即应用液稀释 10 倍,其透光率为 $50 \pm 5\%$)。

3. 钩体: 用 56601、56603、56606、56607、56608、56609、56610 号钩体的 7—10 天培养物,镜检运动活泼。

(二) 方法

取各种钩体菌苗制品用 2% 正常兔血清盐水(或 pH7.2—7.4 PBS)作倍量稀释,将各稀释度菌苗 0.05 ml 置一系列 8×10 孔的(容量 0.2ml)有机板凹孔中,最后一孔仅加正常兔血清盐水 0.05 ml 作对照。每孔各加同一浓度的相应钩体免疫炭血清 0.05 ml 后,于微型振荡器上振荡 3—5 分钟,置室温(22℃ 以上)湿盒内作用 3—4 小时(或逾夜),观察结果,以菌苗最高稀释度孔内出现“++”凝集者为该菌苗的

1. 上海生物制品研究所, 2. 浙江医科大学。

RCAT 滴度。

结 果

(一) 活菌培养物 RCAT 滴度与暗视野活菌计数比较

取活菌培养物分别与相应免疫炭血清作 RCAT, 并与暗视野显微镜玻片活菌计数比较, 结果见表 1。从表 1 结果可见 RCAT 滴度与玻片活菌计数有一定关系, 即活菌数量多者 RCAT 滴度也较高。

表 1 RCAT 滴度与活菌计数比较

培养物菌号	免疫炭血清编号	RCAT 滴度	玻片活菌计数条数/VF × 400
56601	56601	1:256	110±
56603	56603	1:256	113±
56606	56606	1:1024	140±
56607	56607	1:128	100±
56608	56608	1:512	120±
56609	56609	1:1024	145±
56610	56610	1:1024	138±

(二) 不同批次制备的 OE 菌苗 RCAT 滴度比较

苗, 用 RCAT 测其滴度, 结果见表 2。表 2 结果说明, 板式超滤法滴度较低, 而管式超滤法均较高, 因板式超滤法损失盐变细胞和 OE 菌苗较

使用板式和管式超滤法制备多批 OE 菌

表 2 不同批次制备的外膜菌苗 RCAT 滴度的比较

制备方式	OE 菌苗群别及批号	免疫炭血清群别	RCAT 滴度	制备方式	OE 菌苗群别及批号	免疫炭血清群别	RCAT 滴度
板式超滤法	黄疽出血(70091)78-1	56601	1:2048	管式超滤法	秋季(56060)80-预	56606	1:16384
	波摩那(109)78-5	56608	1:4096		秋季(56060)80-1	56606	1:16384
	黄疽出血(70091)79-1	56601	1:2048		秋季(56060)80-2	56606	1:16384
	波摩那(109)79-2	56608	1:2048		流感伤寒(临6)80-3	56609	1:8192
	秋季(56060)793	56606	1:2048		犬(桂44)80-4	56603	1:4096
	流感伤寒(临6)79-4	56609	1:4096		流感伤寒(临6)80-5	56609	1:8192
	犬(桂44)79-5	56603	1:64		黄疽出血(70090)80-6	56601	1:16384
	秋季(56606)79-6	56606	1:64		流感伤寒(临6)82-1-1	56609	1:16384
	流感伤寒(临6)79-7	56609	1:64		秋季(56060)82-1-2	56606	1:16384
						黄疽出血(70091)82-1-3	56601

多, 其中有 3 批 RCAT 滴度仅在 1:64。

(三) 多价普通菌苗 RCAT 测定结果

收集上海、成都和武汉三个生物制品研究所生产的多价有效普通菌苗分别与其相应免疫炭血清作 RCAT 检测, 以观察各组成菌苗的炭凝滴度, 结果见表 3。从表 3 结果看出, 不同生产单位和不同批号制备的普通菌苗, 其 RCAT 滴度是有差别的, 上海生物制品所的 8141、8142 和 8146 炭凝滴度较高, 而上海生物制品所的 8136、8111、8151、8148 和成都生物制品所的 8228 及武汉生物制品所的 821 炭凝滴度较低。

(四) 不同 RCAT 滴度的 OE 菌苗对动物保护作用的关系。

用不同批次制备的不同 RCAT 滴度的 OE 菌苗以 0.2、0.5 和 1.0 ml 剂量分别免疫豚鼠, 14 天后用同群强毒活菌 1 ml 攻击, 观察不同 RCAT 滴度的 OE 菌苗对豚鼠的保护作用, 结果见表 4。

根据实验结果证明, RCAT 滴度在 1:2048 以上的 OE 菌苗, 除 0.2 ml 免疫组有个别动物死亡外(78-1和79-3), 其它均能达到保护。而炭凝滴度在 1:64 的 OE 菌苗, 除 1.0 ml 免疫组有

表3 多价普通菌苗 RCAT 检测结果

生物所	批号价数	对下列免疫炭血清的凝集滴度						
		56601	56603	56606	56607	56608	56609	56610
上海	8139 5价	1:128	1:128		1:256	1:32	1:64	
上海	8141 5价	1:128	1:256	1:256	1:256			1:256
上海	8142 5价	1:128	1:256	1:256	1:256			1:128
上海	8126 3价	1:256		1:256			1:128	
上海	8136 3价	1:64	1:128			1:32		
上海	8124 3价	1:128		1:32			1:64	
上海	8111 3价	1:64		1:64			1:32	
上海	8146 5价	1:128	1:128	1:64		1:32	1:64	
上海	8151 5价	1:64	1:64	1:64	1:128			1:64
上海	8148 1价					1:64		
成都	8228 3价	1:64			1:32	1:32		
武汉	82-1 4价	1:64	1:128			1:16		1:64

表4 不同 RCAT 滴度 OE 菌苗对实验动物保护作用的关系

OE 菌苗 群别及批号	RCAT 滴度	免疫剂量 (ml)	试验结果	OE 菌苗 群别及批号	RCAT 滴度	免疫剂量 (ml)	试验结果
黄疽出血 (70091) 78-1	1:2048	0.2	13/14	秋季 (56060) 79-6	1:64	0.2	0/5
		0.5	18/18			0.5	1/6
		1.0	17/17			1.0	2/8
波摩那 (109) 78-5	1:4096	0.2	10/10	流感伤寒 (临6) 79-7	1:64	0.2	0/6
		0.5	12/12			0.5	0/8
		1.0	11/11			1.0	2/7
黄疽出血 (70091) 79-1	1:2048	0.2	5/5	秋季 (56060) 80-1	1:16384	0.2	5/5
		0.5	5/5			0.5	6/6
		1.0	5/5			1.0	5/5
秋季 (56060) 79-3	1:2048	0.2	7/8	黄疽出血 (79001) 80-6	1:16384	0.2	6/6
		0.5	9/9			0.5	7/7
		1.0	9/9			1.0	5/5
流感伤寒 (临6) 79-4	1:4096	0.2	5/5	犬 (桂44) 80-4	1:4096	0.2	5/5
		0.5	5/5			0.5	5/5
		1.0	5/5			1.0	5/5
波摩那 (109) 79-2	1:2048	0.2	8/8	流感伤寒 (临6) 80-3	1:8192	0.2	6/6
		0.5	11/91			0.5	6/6
		1.0	5/5			1.0	6/6
犬 (桂44) 79-5	1:64	0.2	0/7	秋季 (56060) 80-2	1:16384	0.2	5/5
		0.5	0/5			0.5	5/5
		1.0	2/6			1.0	5/5

注：表中分母为试验动物数，分子为存活动物数。

个别动物被保护外，试验动物几乎全部死亡。从而表明菌苗的炭凝滴度与保护力有密切关系。

(五) 有效期和过期的 OE 菌苗及普通菌苗的炭凝试验结果

取有效期和过期的 OE 菌苗与普通菌苗，用 RCAT 测其滴度变化，结果见表 5。从表 5 可见 OE 菌苗放置 2—3 年，炭凝滴度可下降 4—8 倍。而普通菌苗有效期虽过，但与其相应

表5 不同效期菌苗的炭凝滴度比较

菌苗类型及批号	价数及效期	对下列免疫炭血清的 RCAT 滴度						
		56601	56603	56606	56607	56608	56609	56610
OE79-3-2	1价 未定				1:16384* 1:4096			
OE79-10	1价 未定					1:4096* 1:512 1:4096*		
OE80-1-2	1价 未定					1:1024		
OE80-1	4价 未定	1:2048* 1:512	1:1024* 1:512	1:2048* 1:2048			1:4096* 1:1024	
OE82-1-1	1价 未定						1:16384*	
OE82-2	1价 未定			1:16384				
OE82-3	1价 未定	1:8192						
OE82-1	3价 未定	1:4096		1:4096			1:4096	
上海普苗: 7735	3价 79.3	1:256		1:256			1:64	
7850	5价 80.3	1:128	1:64		1:256	1:32	1:128	
7831	3价 80.4	1:256		1:256			1:128	
8019	3价 82.4	1:256				1:32	1:128	
8109	3价 83.3	1:256		1:64			1:64	
成都普苗: 8236	3价 84.4	1:64	1:64					1:64
武汉普苗: 828	4价 84	1:64			1:64	1:64		1:64

* 为制备时炭凝滴度,未注明者为 82 年 5 月 29 日测定的滴度。

免疫炭血清的凝集滴度似乎未见下降,表明过期的普通菌苗抗原性依然存在。

讨 论

1. RCAT 用于疾病诊断和菌株鉴定已有不少报告^[3-5]。我们曾用此法作钩体菌株的快速鉴定,发现既敏感又特异,而且操作简便,反应迅速,结果判断容易等^[6]。此后又为湖南湘西卫生防疫站^[7]证实方法的可靠性。

RCAT 主要是将特异性抗体致敏于活性炭微粒上,然后用此种带有抗体的炭粒(免疫炭血清)与相应抗原作用,观察炭微粒的被动凝集来判定被检材料中相应抗原的存在与含量。我们在钩体 OE 菌苗的研制过程中,使用 RCAT 来衡量菌苗质量的优劣,获得了一定效果^[8]。如以定量法作试验,则炭凝滴度与标本中抗原含量成正比关系。因此,本法可间接衡量标本中存在抗原的量。并证实炭凝滴度在 1:2048 以上的 OE 菌苗免疫动物,其保护作用良好,而炭凝

1:64 的菌苗,则几乎完全没有保护作用。本文用 RCAT 作为评价钩体菌苗质量的标准之一,看来是有现实意义的。试验证明炭凝滴度与培养物中钩体数量或抗原物质含量密切相关,如以 400 倍暗视野显微镜作活菌计数,发现炭凝滴度随钩体数量的增多而增高,一般每个视野有钩体 100 条左右,炭凝滴度为 1:128,而有 140 条左右者,炭凝滴度可达 1:1024。在使用 RCAT 对三个生物制品研究所生产的钩体多价的普通菌苗测试中发现,生产批号不同,炭凝滴度也有差别。但总的来看,上海生物制品所生产的炭凝滴度较高,而成都及武汉生物制品所稍低。是否与对成都和武汉生物制品所的批次测试太少有关,需作进一步探讨。但我们认为免疫炭血清的质量对试验结果有较大影响,使用不同滴度免疫血清去致敏炭粒所制成的免疫炭血清,其敏感性会有差异。因此,标化免疫炭血清是一个值得注意的问题。根据作者过去的报告^[2],免疫血清炭凝滴度在 1:25600 以上

者, 稀释 20—30 倍致敏炭粒, 而炭凝滴度在 1:12800 者稀释 15 倍致敏炭粒, 效果稳定且好。此等制品能与 13—25 条/400 倍钩体悬液发生明显的凝集反应^[6], 才被认为是合格的。但本文试验系用同批制品, 批间误差可能较小。

2. 在对不同有效期的菌苗测试中发现, OE 菌苗放置 2—3 年, 炭凝滴度可下降 4—8 倍, 而普通菌苗有效期虽过, 但炭凝滴度未见下降。本试验对普通菌苗制备时虽未作 RCAT 测定, 则可从有效期内的或过期的菌苗炭凝滴度比较未见差异这一点看出, 普通菌苗有效期虽过, 其抗原性依然存在。

以上实验结果表明, RCAT 能够比较客观地反映被检菌苗(包括 OE 及普通菌苗)中抗原

浓度的高低, 对菌苗质量的鉴定提供了一个简便、快速、易于观察等具有实用价值的方法。至于制备菌苗时 RCAT 滴度达到多少才成为“合格”产品, 尚需作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 鲍行豪等: 微生物学报, 20(3): 316, 1980。
- [2] 鲍行豪等: 微生物学报, 14(1): 112, 1974。
- [3] Яфлэев РХ: ЖМЭИ, 9: 93, 1963。
- [4] 白常乐等: 流行病学杂志, 3(1): 20, 1965。
- [5] 长春兽医大学微生物教研组: 微生物学报, 17(2): 158, 1977。
- [6] 鲍行豪等: 微生物学报, 14(1): 120, 1974。
- [7] 湖南湘西苗族土家族自治州卫生防疫站等: 流行病防治研究, 3: 206, 1974。
- [8] 张锦麟等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1(3): 174, 1981。