

间接红细胞凝集反应检测 中华鳖血清抗体的方法

杨先乐

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)

贺 路 艾晓辉 周建光 柯福恩

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

摘 要 建立了间接红细胞凝集反应检测中华鳖血清抗体的方法。试验证明, 致敏抗原菌体浓度为 3×10^8 cfu/mL, BSA 浓度为 2.0mg/mL, 致敏红细胞浓度 2.5% 时(无论是人还是绵羊红细胞), 本方法能获得最敏感的结果。加入稳定剂后的致敏红细胞, 在 80d 内检测结果没有显著的差异。本试验测得该方法的灵敏度为 13.4 ± 4.2 而且证明本方法具有较高的特异性、灵敏度、准确性和重复性。

关键词 中华鳖, 抗体, 间接红细胞凝集反应, 检测

中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 属两栖爬行动物, 与其它龟鳖目动物一样, 免疫系统的发达程度高于鱼类 [Borysenko 和 Cooper 1972, Zapata 和 Fernandez 1984, 刘恩勇等 1991], 并能对某些免疫原产生较强的应答反应 [杨巨 1990]。因此, 人们企图通过疫苗或其它方式激发鳖的免疫应答, 有效地防止鳖病的发生 [杨先乐等 1995]。

鳖特异性的血清抗体含量高低, 是衡量鳖免疫应答强弱的重要标志之一, 建立其检测方法, 将会为鳖免疫学防治及免疫学理论的研究提供一个重要的工具。目前, 荧光抗体技术 (FAT), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 点酶法 (Dot-ELISA), 协同凝集试验 (Coagglutination test) 等血清学技术已经广泛地应用在鱼类抗体的检测及疾病的诊断上 [Mamoru 和 Takahisa 1985, Austin 1986, Oufemi 1986, Klesius 和 Johnson 1991, Davidson 等 1992], 但关于鳖特异性抗体的检测, 除一般凝集反应外, 其它血清学检验技术还无报道。间接红细胞凝集反应已广泛在人、兽医上应用 [Hirst 1943, Salk 1944, 首都医院基础组 1978, 刘玉斌和苟仕金 1989], 而此技术在鱼类, 尤其是鳖类方面的应用, 还鲜有报道。为了提供一种简便、有效地检测中华鳖特异性血清抗体的方法, 我们建立了间接红细胞凝集反应检测鳖血清抗体的方法。

1 材料和方法

1.1 致敏抗原、致敏红细胞及稳定剂

致敏抗原主要为中华鳖红底板病, 出血性肠道坏死症等致病菌 T₃、SL63、Tio63、T₃ 菌的

内脂多糖(LPS),淡水鱼细菌性败血症致病菌 9120(嗜水气单胞菌,本所分离),以及牛血清蛋白 BSA 等;致敏用的绵羊、人红细胞分别在湖北医学院和荆州市血库购买;抗原的纯化、LPS 的制备及红细胞的醛化与致敏参照 Fulvio[1985]、余 等[1982]、韩文瑜等[1992]和首都医院基础组[1978]的方法,并对某些方面的最佳条件(如红细胞的类别、浓度,致敏抗原的浓度等)进行了探讨。稳定剂的配制与添加参照黄祯祥等[1990]的方法,并比较致敏红细胞中稳定剂有无对检测结果的影响。

1.2 抗体

将上述抗原灭活分别免疫鳖、鲫鱼或兔,20d 左右后取血清制备而成。

1.3 测定方法

采用微量血凝板法测定[余 等 1982,韩文瑜等 1992],并以能使被检血清呈现 2^+ 或 2^+ 以上凝集强度的最高血清稀释度的倒数作为该血清的凝集效价。

1.4 方法学的评价(所有试验均采用 2.5%致敏绵羊红细胞)

1.4.1 特异性

比较鳖几种致病性菌株 T_3 、SL63、Tio63 及 BSA,淡水鱼细菌性败血症菌株 9120 与其鳖抗体 TT_3 、TSL63、TBSA(注:首大写字母 T、F、R 分别代表鳖、鱼、兔抗体; T_3 、LPS、9120、BSA 等代表相应的免疫原。以下同)以及正常鳖血清、鲫鱼血清的交叉凝集反应。

1.4.2 灵敏度

取正常鳖血清分别多次测定,计算出平均凝集效价 G,以 2G 值作为该检测方法的灵敏度。将本检测方法的测定结果分别与直接凝集反应,琼脂双扩散,酶联免疫吸附试验的结果比较,确定其灵敏度的地位。

1.4.3 准确性

将同一血清稀释成几个稀释度后进行检测,比较各次检测的差异;将 2 个血清同时用间接红细胞凝集反应与直接凝集反应检测,通过 2 种检测方法凝集效价的差异倍数,确定其相对准确性。

1.4.4 重复性(精密度)

将 6 个不同血清重复检测 2~6 次,比较各血清各次检测结果的差异程度。

2 试验结果

2.1 方法学的建立

2.1.1 致敏抗原浓度

使用不同浓度的抗原致敏绵羊红细胞后,检测的三种抗血清的凝集效价的结果表明,当菌体抗原量为 3×10^8 cfu/mL 时,RT₃-1 和 TT₃-951(“-”后面的数字代表批次)抗血清的凝集效价最高,分别为 $6826.7 \pm 1930.8(3)$ 和 $1766.7 \pm 482.7(3)$,经 F 检验,各组之间有非常显著的差异($p < 0.01$,表 1)。用 BSA 致敏,致敏浓度为 2mg/mL 时,TBSA 凝集效价值最高[$2560 \pm 1810.2(3)$],以下依次为 1mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、0.5mg/mL 组,此 5 组组间有显著的差异(F 检验, $0.05 > p > 0.01$) (表 2)。

表 1 致敏抗原(致病菌)的浓度与凝集效价的关系

Tab. 1 The relationship between concentrations of sensitizing antigen(bacteria) and agglutination titer

抗血清 名称	致敏抗原(菌体)含量($\times 10^8$ cuf/mL)					
	1	3	6	10	20	30
RT ₃ -1	160.0 \pm 0(3)	6826.7 \pm 1930.8(3)	1706.6 \pm 482.7(3)	512.0 \pm 360.2(3)	149.3 \pm 79.8(3)	74.6 \pm 39.9(3)
TT ₃ -951		1766.7 \pm 482.7(3)	682.6 \pm 241.4(3)	128.0 \pm 90.5(3)	53.3 \pm 15.1(3)	32.0 \pm 0(3)

表 2 致敏抗原 BSA 的浓度与凝集效价的关系

Tab. 2 The relationship between concentrations of sensitizing antigen(BSA) and agglutination titer

抗血清 名称	致敏抗原 BSA 的含量(mg/mL)				
	4.0	3.0	2.0	1.0	0.5
TBSA	533.3 \pm 150.8(3)	853.3 \pm 301.7(3)	2560 \pm 1810.2(3)	1920.0 \pm 905.1(3)	373.3 \pm 199.6(3)

2.1.2 致敏红细胞

人、绵羊红细胞的比较: 用致敏人或绵羊红细胞的间接凝集反应的检测结果表明, 无论对于哪一种抗体, 二者均呈比较灵敏的检测结果, 且相差不显著; 但从总体上看, 致敏的人红细胞在某些方面似乎比绵羊红细胞的灵敏度略高(表 3)。

浓度: 表 4 是不同浓度的红细胞致敏后对 TT₃-204 抗血清的检测结果。无论是人还是绵羊红细胞, 当浓度为 2.5% 时, 其凝集效价最高, 均为 2560.0 \pm 0(2); 随着红细胞致敏浓度升高或降低, 灵敏度均呈下降趋势; 当红细胞浓度为 0.25% (人) 和 0.5% (绵羊) 时, 因其浓度过低, 红细胞聚集体太小, 几乎无法观察到红细胞的凝集现象。F 检验的结果表明, 各组间均有非常显著的差异(绵羊, $p < 0.01$) 或显著的差异(人, $p < 0.05$)。

表 3 用致敏人或绵羊红细胞的间接凝集反应检测结果灵敏度的比较

Tab. 3 Comparison of sensitivity by indirect agglutination titer of red cell used between man and sheep red cell

检测抗体 名称	致敏红细胞 (致敏用抗原均与被检测抗体相对应)	
	2.5% 人红细胞	2.5% 绵羊红细胞
	RLPS-1	2560
RLPS-2	20480	5120
TLPS	2560	2560
TR ₃	2560	2560
TT ₃ -1	1280	320
TT ₃ -2	2560	1280
TBSA	1024	1280

表 4 红细胞的不同致敏浓度与间接凝集反应灵敏度的关系

Tab. 4 The relationship between sensitized concentrations of red cell and sensitivity of indirect agglutination

红细胞的浓度 (%)	凝集效价	
	绵羊	人
4.0	464.0 \pm 177.4(4)	373.3 \pm 199.6(3)
3.5	1280.0 \pm 0(2)	640.0 \pm 452.5(3)
3.0	1450.6 \pm 844.8(3)	1920.0 \pm 640.0(2)
2.5	2560.0 \pm 0(2)	2560.0 \pm 0(2)
2.0	1856.0 \pm 709.8(4)	1280.0 \pm 0(2)
1.0	832.0 \pm 192.0(6)	640.0 \pm 0(2)
0.5	320.0 \pm 0(2)	0 \pm 0(2)
0.25	0 \pm 0(2)	—

2.1.3 稳定剂对致敏红细胞的影响

将同批 T₃ 致敏的 2.5% 绵羊红细胞分成 2 份, 1 份加稳定剂, 另一份不加, 分装后分别于 4℃ 保存。并分别在第 0d, 10d, 20d, 30d, 40d 和 80d 对分装后 -80℃ 保存的 TT₃-51 抗血清进行凝集效价的测定。结果表明, 不加稳定剂组, 第 10d 时凝集效价就由开始测定时的 640.0 ± 0(2) 下降到 72.0 ± 11.3(2), 第 80d 时仅为 12.0 ± 6.9(2); F 测验, 各组间有非常显著的差异 (p < 0.01); 而加稳定剂组的凝集效价则一直在开始保存时的 576.0 ± 90.5(2) 的水平上徘徊, 第 40d 时为 416.0 ± 135.7(2), 第 80d 仍达 392.0 ± 222.3(2), 与开始保存时相比, 没有显著的差异 (t 测验, p > 0.9, 表 5)。

表 5 稳定剂对致敏红细胞测定结果的影响

Tab. 5 The influence of stabilizer on detecting results in use of sensitizing red cell

组别	保存天数对 TT ₃ -51 抗血清的测定结果					
	0	10	20	30	40	80
加稳定剂	576.0 ± 90.5(2)	832.0 ± 271.5(2)	576.0 ± 90.5(2)	448.0 ± 271.5(2)	416.0 ± 135.7(2)	392.0 ± 222.3(2)
不加稳定剂	640.0 ± 0(2)	72.0 ± 11.3(2)	56.0 ± 33.9(2)	52.0 ± 16.9(2)	13.0 ± 4.2(2)	12.0 ± 6.9(2)

2.2 方法学的评价

2.2.1 特异性

红细胞间接凝集反应的特异性试验结果表明, 除了抗血清 TSL63 与抗原 T₃、Tio63、9120, 抗血清 TT₃ 与抗原 SL63、Tio63、9120 有较弱的交叉反应之外 (与其相应的抗原比较), 其余均无交叉凝集现象, 表现出较好的特异性 (表 6)。

表 6 间接红细胞凝集反应的特异性

Tab. 6 The specificity of indirect agglutination of red cell

血清抗体名称	致敏用抗原				
	SL63	BSA	T ₃	Tio63	9120
TSL63	2970 ± 1751(5)	< 2	160	256	128
TT ₃	320	< 4	1291 ± 756(11)	340 ± 424(2)	320
TBSA	< 4	2901 ± 1361(6)	< 2	< 2	< 4
正常鳖血清	7 ± 3(4)	3 ± 1(3)	9 ± 10(8)	3 ± 1(2)	< 4
正常兔血清	< 2	< 4	< 4	< 4	< 2

2.2.2 灵敏度

用红细胞间接凝集反应对鳖正常血清检测的结果可得出该方法灵敏度为 13.4 ± 4.2 (表 7)。同时用此方法和直接凝集反应检测 TT₃-9011 等 5 个鳖血清抗体, 前者的灵敏度比后者要提高 23.4 ± 3.1(5) 倍 (表 8)。用 4 种血清学的方法对 F9120 血清测定的结果进一步表明, 琼脂双扩散、直接凝集反应、间接红细胞凝集反应和酶联免疫吸附试验的相对灵敏度是 1 : 5 × 2⁴ : 2¹² : 2¹⁴ (表 9)。

表 7 间接红细胞凝集反应的灵敏度

Tab. 7 The sensitivity of indirect agglutination of red cell

检测次别	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm S. D. (G)$	灵敏度(2G)
凝集效价	8	4	8	8	8	4	6.7 ± 2.1	13.4 ± 4.2

表 8 间接红细胞凝集反应与直接凝集反应灵敏度的比较

Tab. 8 Comparison of sensitivity between indirect agglutination of red cell and direct agglutination

血清抗体名称	直接凝集反应	间接红细胞凝集反应	二种方法的相对灵敏度
TT ₃ -9011F	64	1280	1 : 20
TT ₃ -9011	32	640	1 : 20
TT ₃ -i	40	1024	1 : 25.6
TT ₃ -ii	10	256	1 : 25.6
TT ₃ -iii	20	512	1 : 25.6
$\bar{X} \pm S. D.(N)$			1 : 23.4 ± 3.1(5)

表 9 间接红细胞凝集反应与其它血清学反应灵敏度的比较

Tab. 9 Comparison of sensitivity among indirect agglutination of red cell and other orrhoractions

血清学检测方法	琼脂双扩散	直接凝集反应	间接红细胞凝集反应	酶联免疫吸附试验	4种检测方法的相对灵敏度
抗体效价	2^3	5×2^8	2^{15}	2^{17}	1 : 5×2^4 : 2^{12} : 2^{14}

2.2.3 准确性

将 TT₃-9403 与 RT₃-3 血清分别按 1 : 1、1 : 5、1 : 8 和 1 : 10 稀释后同时进行测定的

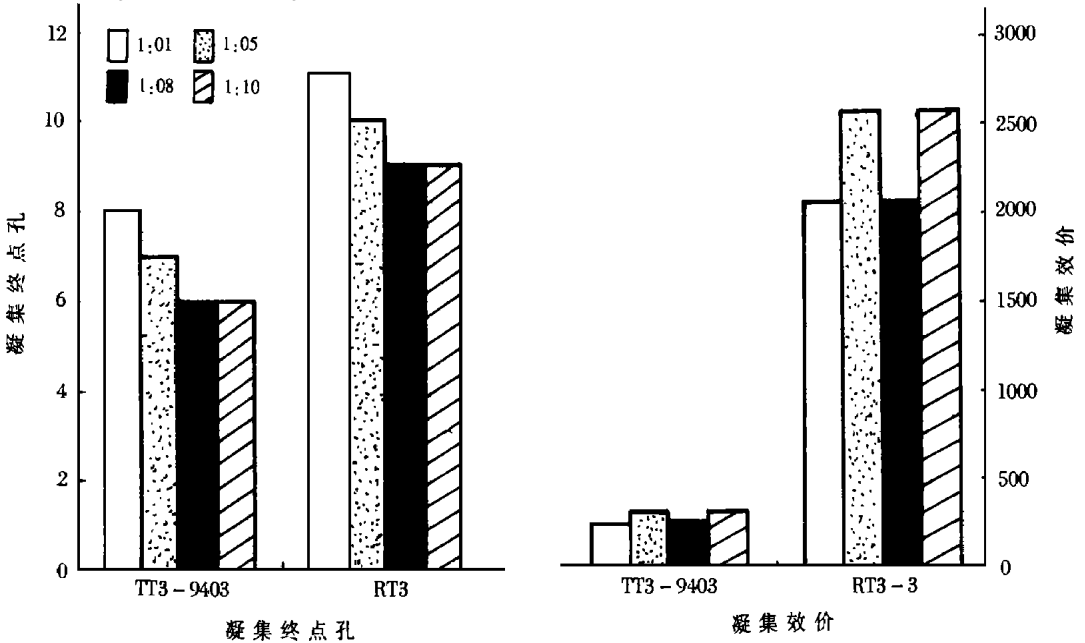


图 1 TT₃-9403 与 RT₃-3 血清不同稀释度测定结果的凝集终点孔及其效价

Fig. 1 The endpoint hole and aggluination titer of antibody TT₃-9403 and RT₃-3 in different concentrations

结果表明,其凝集终点孔均随稀释倍数的增加而相应减少,且各测定结果基本一致,变异系数分别为 12.8%和 11.0%(图 1)。分别用间接凝集反应和直接凝集反应测定 TT₃-18 和 TT₃-20 的凝集效价,二者的测定结果比较吻合,TT₃-18 和 TT₃-20 间接凝集效价分别为 320 与 1280,它们的直接凝集效价为 10 与 40。两种血清两种测定方法测定值的比值均为 1:4。

2.2.4 重复性

表 10 是 6 种血清重复测定的结果,终点孔一般均在 2 个稀释度上下徘徊,终点孔的变异系数均较小,范围为 4.56%~7.44%,平均为[5.83±1.12(7)]%。

表 10 间接红细胞凝集反应检测鳖(或兔)凝集抗体的重复性

Tab. 10 The duplicity of detecting turtle or rabbit antibody by indirect agglutination of red cell

抗体名称		检测次别						终点孔变异系数 (%)
		1	2	3	4	5	6	
TT ₃ -9604	终点孔	9	10	10	10			5.13
	凝集效价	512	1024	1024	1024			—
TT ₃ -51	终点孔	10	10	9	10	10		4.56
	凝集效价	1024	1024	512	1024	1024		—
TLPS-9602	终点孔	10	11	10	11			5.50
	凝集效价	1024	2048	1024	2048			—
	终点孔	10	9	10	9			6.08
	凝集效价	2560	1280	2560	1280			—
TBSA	终点孔	11	12	11	12	12	10	7.20
	凝集效价	2048	4096	2048	4096	4096	1024	—
RT ₃	终点孔	11	12	12				4.95
	凝集效价	4096	8192	8192				—
RLPS	终点孔	10	9					7.44
	凝集效价	2560	1280					—

3 讨论

载体红细胞的种类和浓度,致敏用抗原的剂量是影响间接红细胞凝集反应的主要因素之一。常用的致敏红细胞有鸡红细胞、牛红细胞、羊红细胞、人红细胞等,不同种类动物的红细胞对各种细菌多糖的吸附力是不一样的,因而凝集的敏感性就有很大的差异。本试验采用了人红细胞与绵羊红细胞作为载体,结果证明二者对中华鳖病原菌抗原及 BSA 等具有很强的吸附力,是间接红细胞反应的理想载体。在人、兽医上一般认为致敏红细胞检测时的最终浓度以 0.3%~0.5%为适宜[韩文瑜等 1992],本试验结果表明,无论是人还是绵羊红细胞,致敏时浓度为 2.5%(相当检测时最终浓度 0.5%)效果最好,与上述结论基本吻合。

致敏用抗原的浓度一般依抗原的种类不同而不同,并随着抗原浓度的提高凝集效价亦相应提高,但当抗原浓度超过了最适度,凝集效价反而降低。出现这种现象的原因可能是吸附了过多抗原的红细胞或多余未被红细胞吸附的抗原,在某种程度上干扰了凝集反应。本试验得到致敏用鳖病原菌抗原的最适浓度为 3×10^8 cfu/mL,BSA 的浓度为 2mg/mL(分别相当于检测时最终浓度 6×10^7 cfu/mL,0.4mg/mL)。

有人认为间接红细胞凝集反应因存在红细胞的自发凝集特异性较差,因红细胞批次不同或保存与操作原因而使重复性不太好[韩文瑜等 1992],使其应用受到一些影响。我们认为,

只要合理地掌握鞣酸化过程中鞣酸的浓度, 合适 pH 值、温度及鞣酸化过程的时间, 掌握致敏用抗原的适宜浓度以及用 1% 正常灭活兔血清生理盐水稳定鞣酸化红细胞, 其自发凝集现象即可避免。

影响本检测方法重复性的原因除了由红细胞的批次不同、个体差异所造成之外, 主要是操作问题。一般来说稀释棒采取标本及其稀释时的旋转是一个重要因素。除此之外, 稳定剂的添加与否也可影响检测结果。黄祯祥等[1990]报道用 10% 蔗糖、2% 正常兔血清及 0.2% 甲醛作稳定剂, 可在 4℃ 保存数月。我们用此稳定剂, 重复检测的结果在 80d 内无显著差异。试验证明, 本检测方法有较好的重复性, 重复检测结果的变异系数均在 10% 以下, 平均 5.85%, 符合检测要求。

间接红细胞凝集反应自本世纪 40 年代创立后, 已得到了广泛应用。它除了灵敏度高、特异性强、精密性好等优点外, 快速和简便是其它血清学技术所不能替代的。本检测方法应用于检测鳖血清抗体, 通常只经 1~2h 即可判断结果, 如若在载玻片上实施, 则 5min 内即可报告结果。本检测方法要求条件低, 不需要仪器, 容易实施。如果将本检测方法略加改进制成诊断液检测抗原, 即是一种十分有效和方便的鳖病诊断手段。

参 考 文 献

- 刘玉斌, 苟仕金. 1989. 动物免疫学实验技术. 长春: 吉林科技出版社. 59~70
- 刘恩勇, 陈万芳, 朱普智. 1991. 中华鳖外周细胞形态学观察. 南京农业大学学报, 14(3): 91~94
- 余, 谢少文, 杨桂贞等. 1982. 临床免疫技术. 上海: 科学技术出版社. 74~89
- 杨巨. 1990. 甲鱼嗜水气单胞菌灭活菌苗的研究. 水产科技情报, 4: 111~113
- 杨先乐, 贺路, 柯福恩. 1995. 鳖病研究的现状及其展望. 中国水产科学, 2(4): 78~85
- 首都医学院基础组. 1978. 关于双醛被动血凝法若干问题的探讨. 微生物学报, 18(1): 52~58
- 黄祯祥, 洪涛, 刘崇柏. 1990. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社. 157~164
- 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 1992. 病原细菌检测技术. 长春: 吉林科学技术出版社. 228~237
- Austin B. 1986. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunodorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric red mouth furunculosis in fish farms. J Fish Dis, 9: 469~474
- Borysenko M, Cooper E.J. 1972. Lymphoid tissue in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. J Morph, 138: 487
- Davidson G A. 1992. Anelispot assay for the quantification of specific antibody-secreting cells to aeromonas salmonicida in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis, 15(1): 85~89
- Fulvio S. 1985. Chemical composition of the lipopolysaccharide from *Edwardsiella tarda*. Fish Pathology, 20(2/3): 187~191
- Hirst G K. 1943. Studies of antigenic differences among strains of influenza by means of red cell agglutination. J Exp Med, 78: 407
- Klesius P, Johnson K. 1991. Development and evaluation of an enzyme-linked immunodorbent assay for catfish serum antibody to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Aquatic Animal Health, 3: 94~99
- Mamou Y, Takahisa K. 1985. A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial. Fish Pathology, 20(2/3): 243~261
- Oufemi B E. 1986. Application of the fluorescent antibody technique(FAT) to the demonstration of aspergillus organism in formalin-fixed tissues of tilapias. J Fish Dis, 9: 91~93
- Salk J.E. 1944. Simplified procdure for titrating hemmagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J Lmmunol, 49: 87
- Zapata A, Fernandez J. 1984. Ultrastructure of splenic white pulp of the turtle, *Mauremys caspica*. J Morph, 220: 845~855

**A METHOD OF DETECTION OF ANTIBODY
IN *TRIONYX SINENSIS*
BY INDIRECT AGGLUTINATION OF RED CELL**

YANG Xian-Le

(*Key Lab of Ecology and Physiology in Aquaculture of the Ministry of Agriculture,
Shanghai Fisheries University, 200090*)

HE Lu, AI Xiao-Hui, ZHOU Jian-Guang, KE Fu-En

(*Yangtze River Fisheries Institute, Shashi 434000*)

ABSTRACT A method of indirect agglutination of red cell was established, by which antibody in soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*, was detected. It demonstrated that the highest titer could be obtained while the concentration of sensitizing antigen was 3×10^8 cfu/mL for bacteria and 2.0mg/mL for BSA, and that of sensitizing red cell of man or sheep was 2.5%. There was no significant differences within 80d in the results of detecting with sensitive red cell, to which stabilizer was added. Furthermore, the sensitivity of this method was higher, and the method also better in accuracy, specificity and duplicity.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, Antibody, Indirect agglutination of red cell, Detection