

免疫电镜对实验感染小鼠体内 Q 热立克次体的检出

王守良 俞树荣 张桂香 向信礼

(第三军医大学微生物学教研室, 四川, 重庆)

近年来用免疫电镜技术发现和鉴定病毒的报道日益增多^[1]。免疫电镜技术的特点是, 利用电镜高度的放大率和分辨能力, 能直接看到抗原抗体之间的特异性反应和免疫复合物的形态学特征, 故具有高度的敏感性和特异性。这对于发现和鉴定病毒与立克次体是十分有用的。为寻求 Q 热的快速和敏感的实验诊断方法, 我们作了免疫电镜技术检出实验动物中 Q 热立克次体的初步研究, 现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、免疫电镜凝集单位的测定

免疫电镜凝集单位是指在电镜下抗原抗体凝集反应的程度。抗原抗体发生凝集反应要求比例合适。确定抗原抗体复合物形成之合适比例的方法是:

1. 抗原: 为 Q 热立克次体 Henzerling 株 (I 相), 感染鸡胚卵黄囊, 用 2% 胰蛋白酶消化和乙醚提取的纯抗原。

2. 免疫血清: 用 Q 热立克次体 Henzerling 株, 按本室常规法制备的兔免疫血清, 经补体结合试验滴定其效价为 1:256 (I 相)。

3. 单位滴定法: 取小试管 49 支, 纵横各 7 排放置, 用磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) pH7.0, 分别将 Q 热立克次体免疫血清和抗原稀释成 1:4, 1:8, 1:16, …… 1:256, 每管 0.1 ml, 分别加入各试管内, 在第一排(行)各试管内的血清(或抗原)稀释度为 1:4, 第二排为 1:8, 依此类推。充分混合, 置 37℃ 水浴中作用 30 min; 然后于各管内分别加入 PBS 1ml, 以 1000 rpm, 离心 10 min, 轻轻吸出上清液, 各管留剩 0.1 ml

溶液, 用毛细滴管分别滴于 Formvar 膜载网上, 待干后用 2% 磷钨酸负染, 电镜观察。对照以 pH7.0 PBS 代替免疫血清, 判定结果*。

最高稀释度之免疫血清能与最高稀释度之抗原呈“++”凝集者为该血清的稀释度, 称之为 1 个电镜凝集单位。

二、脾标本的制备

取 Henzerling 株感染鸡胚卵黄囊 1 只, 置组织研磨器中磨碎, 加无菌肉汤配成 1:10 悬液, 经 1500 rpm 离心 10 min, 取上清用肉汤稀释成最后浓度为 0.2 ml 内含 100 个 MID₅₀。腹腔接种体重 10—14 g 小白鼠, 每只 0.2 ml。接种后逐日任取 4 只, 杀死取脾脏。每只脾加 pH7.0 PBS 1 ml, 研磨成悬液, 移入离心管内, 再加 2% 胰蛋白酶溶液 1 ml, 置 40℃ 水浴中消化 1 h, 至悬液澄清为止, 经 2000 rpm, 离心 10 min, 将上清液移入另一离心管内, 加 PBS 2 ml, 再经 5000—6000 rpm 离心 30 min, 沉淀物重复洗涤一次, 取上清 0.5 ml、此沉淀物 0.1 ml, 加内含 4 个单位免疫电镜凝集单位的 Q 热免疫血清 0.1 ml, 37℃ 水浴作用 30 min。其余操作和判定同单位滴定法所述。

三、电镜

国产电镜 DXA4-10, 观察和照相用 75KV 加速电压。

* “+++”立克次体完全凝集, 无单个存在, 免疫复合物很大(含立克次体 50 个以上); “++”立克次体多数凝集, 仅有少数散在, 免疫复合物较大(含 25—50 个立克次体); “+”立克次体多数凝集, 有部分散在, 免疫复合物较小(含 25 个以下立克次体); “-”未见立克次体凝集块或有 3 个以下立克次体凝集。

试验结果

一、适当凝集单位的选择

以不同免疫电泳凝集单位的抗体, 分别与不同稀释度Q热立克次体抗原混合, 观察免疫复合物的形成, 选出适当的使用单位(见表1)。

表1说明, 用2和4个免疫电泳凝集单位抗体时抗原的凝集效价达1:128, 用8个单位其效价为1:64, 用16个单位则效价只有1:16。由此可见, 在形成免疫复合物过程中, 抗体太多, 抗原抗体凝集效价反而降低; 在电泳下还可看到, 抗体愈多者, 所形成的免疫复合物愈小。立克次体表面还可看到絮状突起物(图1)。

表1 抗体凝集单位的确定

抗体浓度 (凝集单位)	抗原 稀 释 度						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
2	+++	+++	+++	+++	++	++	+
4	+++	+++	+++	++	+++	++	-
8	+++	+++	++	++	++	-	-
16	+++	+++	++	+	+	-	-



图1 抗体过多;凝集块小,立克次氏体表面有絮状突起物

二、免疫电泳检查法的敏感性

免疫电泳检查法与补体结合试验和试管凝集试验分别对同一份Q热立克次体抗原标本进行测定, 结果见表2。

表2说明, 免疫电泳法检测Q热立克次体抗原的敏感性与补体结合试验相同, 效价均为1:128, 试管凝集试验则不敏感, 只有1:16。

表2 三种方法敏感性的比较

方 法	抗 原 稀 释 度						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
免疫电泳法	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
补体结合试验	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
凝集试验	+++	+++	++	+	-	-	-

三、感染小白鼠脾内Q热立克次体的检出

用100个MID₅₀剂量Q热立克次体感染一批小白鼠, 逐日随取4只杀死, 制其脾脏标本, 与4个免疫电泳凝集单位的抗体作用后, 观察免疫复合物的形成(见表3)。表3说明, 三次试验的感染后第1天脾内均未检出立克次体, 第2天则多数动物脾中检出, 但数量较少(+-+), 电泳下见到的免疫复合物也较小(图2), 3

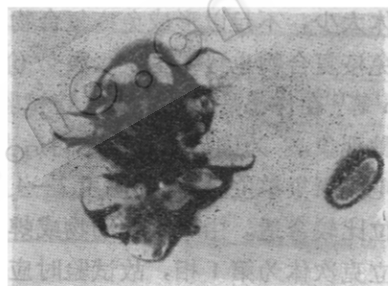


图2 感染后第2天小白鼠脾标本立克次体凝集现象

天以后全部动物均能检出, 立克次体数量随感染时间的延长而增多, 一般在感染后5-6天, 立克次体繁殖达到高峰, 在电泳下观察到所形成的免疫复合物很大, 有时多到铺满整个铜网(图3)。

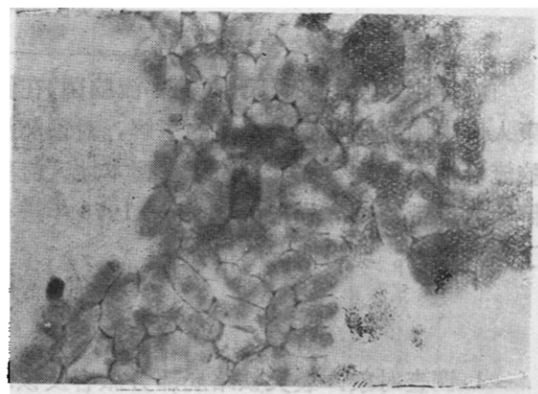


图3 感染后第4天小白鼠脾标本立克次体凝集现象

表3 小白鼠脾标本Q热立克次体的检出情况

试验次数	感 染 天 数						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0/4	3(+)/4	4(++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4
2	0/4	4(+)/4	4(++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	2(+++)/2
3	0/4	3(+)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	4(+++)/4	3(+++)/3

注：分母代表小白鼠只数；分子代表检出阳性只数；括号中“加号”代表平均凝集程度。

讨 论

本试验初步证明，用已知Q热抗体作免疫电泳检查未知标本的Q热抗原，是一个有希望的方法。免疫电泳法的敏感性与补体结合试验相近，但比其操作简单，无抗补体现象，可在短时间（3—4小时）内出结果。

免疫电泳中使用适当浓度的Q热抗体很重要。抗体太少，不足以形成免疫复合物；抗体太多，免疫复合物也可减少，凝集效价降低。Kapikian等^[2]在作鼻病毒的免疫电泳试验时，也看到此种现象。为确定Q热抗体的适当浓度，测免疫电泳凝集单位，试验证明用2—4个电泳凝集单位比较合适。由于人和动物或蜱标本中的Q热立克次体为第I相，故试验时应注意用含第I相抗体的免疫血清。

Linde等^[3]用胰蛋白酶消化感染鸡胚卵黄囊，可使立克次体大量释放，但胰蛋白酶对立克次体的抗原性并无影响。用Q热立克次体感染的小白鼠脾脏，经胰蛋白酶消化可获得Q热立克次体含量多的标本，供免疫电泳检查，并且第2天多数能检出，第3天全部能检出。推测，如果用免疫电泳技术检查乳（牛、羊）、水（羊水或屠宰场的污水）和尿（病人的或感染动物的）中的Q热立克次体，可能更为简便和适用。

参 考 文 献

- [1] Doane, F. W.: Identification of Viruses by Immunoelectron Microscopy, *Viral Immunodiagnosis* (ed. by Kurstak, E. and R. Morisset), Academic Press, New York, San Francisco, London, 1974, pp. 237—255.
- [2] Kapikian, A. Z. et al.: *J. Virol.*, 10:142, 1974.
- [3] Linde, K. and H. Urbach: *Acta Virol.*, 7:90, 1963.