

免疫酶技术用于 Q 热立克次体的检查*

余国泉 李芹阶 向信礼

(中国人民解放军第三军医大学,重庆)

免疫酶技术是继免疫荧光和放射免疫之后发展很快的一门新技术,分为酶联免疫吸附试验及酶标抗体染色两类。由于方法敏感、快速、简便,不需要特殊设备,目前已广泛应用于医学基础理论和临床实用的研究。但用于立克次体的报告尚不多。除了酶联免疫吸附试验检测战壕热、斑疹伤寒群及恙虫病立克次体抗体的 4 篇报道外^[1-4], Serbezov 等^[5]曾以酶标抗体作 Q 热立克次体和康氏立克次体的染色。陈德蕙等在自然感染蜱血淋巴涂片中检出斑点热群立克次体。我们于 1979 年建立了辣根过氧化物酶标记抗体的方法,并应用于 Q 热立克次体抗原的检出,现将初步结果报告如下。

材料与 方法

一、酶标记抗体的制备

1. 羊抗兔 IgG 的制备: 将兔血清用硫酸铵盐析,初步分离和浓缩球蛋白,再通过 DEAE 纤维素柱层析和精制,经纯度和定量测定 IgG 后,免疫山羊。同法提纯羊抗兔 IgG,经琼脂扩散试验效价 1:16—1:32 即可应用。

2. 羊抗兔 IgG 的标记: 用辣根过氧化物酶(西德制造)按过碘酸盐法制备标记抗体^[6]。5 毫克酶液加 5 毫克羊抗兔 IgG (混入 1 毫升 0.1M pH9.5 Na₂CO₃ 缓冲液中),室温轻轻搅拌 2 小时,标记物加 5 毫克 NaBH₄,放冰箱 3 小时后用 0.02M pH7.4 PBS 透析过夜。在搅拌下滴加等体积饱和硫酸铵,冰箱内静置 1 小时后,3500 转/分离心 15 分钟,再用半饱和硫酸铵洗沉淀物 2 次。以 1 毫升 0.02M pH7.4 PBS 溶解沉淀物。经纯化后的标记物分装安瓿,贮存于 -20℃ 冰箱备用。另以部分标记物用分光光度

计测 Ig 量 (280 毫微米 OD.) 和酶量 (403 毫微米 OD.)。按公式计算酶量、Ig 量和酶与 Ig 的克分子比值。

二、Q 热立克次体免疫血清制备

家兔腹腔接种 Q 热立克次体 Henzerling 株 (I 相) 感染的鸡胚卵黄囊膜 10⁻¹ 肉汤悬液 2 毫升,35 天后采血,分出血清,低温冰箱冻存备用。补体结合试验效价 1:512 (I 相)。

三、立克次体印片制备

用 Q 热立克次体 Henzerling 株感染的鸡胚卵黄囊膜 1:30 悬液感染体重为 17—20 克的小白鼠,每只腹腔注射 0.2 毫升,分别于 8、16、24、48 及 72 小时解剖,取脾脏印片。酶标记抗体染色者,用甲醇固定 10 分钟,Jiménez 法^[7]染色者,则以火焰固定。

四、酶标记抗体染色法(间接法)

1. 固定后的标本以 0.01M pH7.4 PBS 振荡冲洗,每次 5 分钟,连续换液 3 次。

2. 加中间层血清: 将上述兔抗 Q 热立克次体血清行 1:5 稀释,覆盖于标本上,作用 30 分钟,同法荡洗 3 次。

3. 加标记物: 以接种环或小滴管加酶标记抗体 (1:1 稀释) 于标本片上,涂匀,置室温 30℃ 左右或 33℃ 孵箱作用 1 小时,同法荡洗。

4. 显色: 标本置 DAB-H₂O₂ 底物内显色 30 分钟。用蒸馏水或自来水冲洗,自然干燥,油镜检查 (底物溶液制备: 3,3-二氨基联苯胺 50 毫克溶于 0.05M pH7.7 Tris-HCl 缓冲液 100 毫升

* 本文承俞树荣、张淑莲二位老师指导,谨此致谢。

中,避光搅拌 2 小时,过滤,置 4℃ 冰箱备用,3 天内效果较好。临用前加入 1% H_2O_2 (1 毫升)。

五、 MID_{50} 测定

将感染 Q 热立克次体 48 及 72 小时的小白鼠脾脏标本分别测定其 50% 感染量。每个稀释度腹腔注射 5 只 18—20 克小白鼠,每只 0.2 毫升。第 6 天解剖,取脾脏印片,分别以酶标记抗体及 Giménez 法染色,油镜下观察 25 个视野,平均每视野发现一个以上立克次体者判为感染,按雷孟二氏法计算 MID_{50} 。

结果与讨论

分别用酶标记抗体染色和 Giménez 法染色,检查感染 Q 热立克次体后五种时间的小白鼠脾脏印片。正常小白鼠脾脏印片为对照。检查 25 个视野,凡平均每个视野立克次体量 1—10 个为“+”,11—100 个为“++”,100—1000 个为“+++”,1000 个以上为“++++”(表 1)。

表 1 酶标法及 Giménez 法检出 Q 热立克次体结果

感染时间 (小时)	第一次实验		第二次实验	
	酶标法	Giménez 法	酶标法	Giménez 法
8	—	—	—	—
16	—	—	—	—
24	±	—	±	—
48	+++	—	+++	—
72	+++	++—+++	+++	++—+++

从表 1 可以看出,酶标记抗体染色法比 Giménez 染色法检出立克次体早 24 小时,于 48 小时就更明显,镜下立克次体多散在,形态比较大,中心着色较淡,周围显色较深,呈棕色。而 Giménez 法却要 72 小时后方出现明显结果。对照组按试验组相应的时间进行解剖,同样方法染色,结果两法均未查见立克次体。同时以正常兔血清代替中间层 Q 热抗体,染色后镜下亦未见到明显的立克次体形态,即使试验组呈现

+++—++++, 对照标本仍显示阴性结果,说明本试验具有较高的特异性。关于酶标染色法检出 Q 热抗原的非特异性问题尚有待进一步研究。

两种方法试验还证明,48 与 72 小时的两个组的脾标本内镜检出立克次体的含量不同,48 小时组测得 MID_{50} 为 4.5, 72 小时组 MID_{50} 为 6.0 以上。酶标法在 MID_{50} 为 4.5 时,即可见到 Q 热立克次体,而 Giménez 法 MID_{50} 到 6.0 以上才能检出,说明酶标法检测 Q 热立克次体比 Giménez 法敏感至少一个半对数级以上。在 MID_{50} 的测定中,同样显示出酶标法敏感。酶标法与间接免疫荧光对比,两种方法的敏感性相同。由于酶标染色不需要荧光显微镜,没有自身荧光和激发荧光熄退的干扰,而且染色片可长期保存,便于复查,因而酶标染色法用作快速检出特异性抗原较为理想。

关于酶标抗体的染色时间,我们认为以 1 小时为好。试用同样标本,加结合物后作用 30 分钟,结果不明显,显色很浅,镜检立克次体不能明确辨认。作用 2 小时者标本中所含立克次体量与显色程度,与 1 小时者无多大区别。

参 考 文 献

[1] Herrman, J. F. et al.: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1977, p. 154, 285.
[2] Halle, S. et al.: J. Clin. Microbiol., 6(2): 101, 1977.
[3] Hollingdale, M. R. et al.: J. Inf. Dis., 137(5): 578, 1978.
[4] Dasch, G. A. et al.: J. Clin. Microbiol., 9(1): 38, 1979.
[5] Serbezov, V., E. Alexandrov and I. Delivitchev: Detection and Identification *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii* Using the Direct and Indirect Immuno-peroxidase Techniques, Proceedings of the 2nd International Symposium on Rickettsia and Rickettsial Diseases (ed. by Kazer, J. and R. A. Ormsbee), Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 1978, p. 383.
[6] 田荣福等: 解放军医学杂志, 5: 107, 1980.
[7] Gimenez, D. F.: Stain Technol., 39:135, 1964.