

结核菌荧光抗体的制备及其临床应用

庄玉辉 李国利 克丙申 韩元华

(解放军三〇九医院结核病研究室, 北京)

摘要 本文介绍以无毒人型结核菌菌悬液大剂量 (80mg/ml) 经皮下多点、静脉注射免疫家兔。获得凝集效价 1:160—1:320 免疫血清。提取免疫球蛋白制备免疫荧光抗体。用该抗体检查结核菌, 其敏感性与荧光素染色和抗酸染色基本相似。与 22 种抗酸菌和 3 种非抗酸菌进行交叉试验, 除与牛型结核菌、堪萨斯杆菌有交叉反应外, 其它被试细菌均呈阴性反应。用该抗体检查肺结核病人痰标本 155 例, 阳性率为 43.87%, 培养法阳性率 27.74%, 两法差异显著 ($P < 0.005$)。结果表明, 结核菌免疫荧光抗体可用做肺结核病细菌学的快速诊断。

关键词 免疫荧光技术; 结核分枝杆菌; 肺结核病

直涂荧光素染色法是目前检查结核菌较敏感的方法。但因缺乏种的特异性, 难于用做菌型鉴定。经典的微生物学方法和细胞化学反应

本文在 1985 年中国微生物学会第一届全国非放射性免疫标记技术讨论会 11 月 27 日大会上宣读。

操作繁杂而且费时。免疫荧光技术具有特异和敏感的优点,已广泛应用于免疫学和微生物学等各个领域中。早在六十年代初,Shepard^[1]等首先报道用免疫荧光染色法成功地鉴定分枝杆菌。至于免疫荧光技术检出结核菌的敏感性与特异性则未见详细报道。用于检查肺结核病人临床标本的报道亦很少,本文将本实验室在这几方面的实验结果介绍如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*) ATCC 3318,棒状杆菌(谷氨酸菌种)(*Corynebacterium glutamicum*) 1.542,均由中国科学院微生物研究所提供。绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由昆明医学院附属医院提供。表2所列的其它菌种均由北京市结核病研究所和卫生部药品生物制品检定所提供。

(二) 荧光抗体的制备

1. 免疫血清的制备:基本参照 Pater^[2]的方法进行。用紫外线杀死细菌。与不同的是免疫剂量和途径。本文具体的免疫方法是:无毒人型结核菌 H₃₇Ra 在苏通培养基内 37℃ 培养 3 周,制成每毫升 80mg(湿重)菌悬液,经紫外线杀死细菌后免疫家兔(体重 2.25—2.5kg)。共 4 次,隔周 1 次。第 1 次 0.2ml 注射耳静脉;第 2 次 0.5ml 加不完全佐剂,皮下多点;第 3 次 1.0ml 加不完全佐剂,皮下多点;第 4 次,0.5ml 注射耳静脉。末次免疫后 3 天试血。凝集反应效价为 1:160—1:320,免疫电泳 1:4—1:8,双向琼脂扩散试验呈现 3 条沉淀线。免疫血清置 4℃ 冰箱保存。

2. 免疫球蛋白:首先以 50% 饱和硫酸铵提取一次,再以 33% 饱和硫酸铵盐析 3 次,制取粗 IgG 备用。

3. 荧光免疫球蛋白的标记:异硫氰酸荧光素(上海第二军医大学红旗药厂)与蛋白质量的比例为 1:50,在 37℃ pH9.5,轻轻搅拌结合 2 小时。结合物经 Sephadex G-50 凝胶过滤去除游离的荧光素。F/P 比值为 4.1。免疫荧光抗

体染色效价 1:8。

(三) 染色方法

1. 免疫荧光染色:涂片直接染色法。被试细菌培养时间和稀释度按设计的要求进行。各被试菌种在相应培养基上培养至适宜的菌龄,以灭菌生理盐水制成指定浓度的菌悬液,涂片,用火灼或丙酮干燥。肺结核病人痰标本,取痰液 0.1ml 制备涂片,自然干燥后,用 10% 福尔马林液固定 30 分钟。将标记抗体滴于菌体抗原或痰涂片上,37℃ 湿室染色 30—60 分钟,荧光显微镜(Nicon)检查,油镜 100 个视野。判定标准:痰标本涂片,未见发荧光菌体为(-),找到 2 条以上特异性发荧光的菌体示(+). 菌悬液涂片,未见或偶见发荧光的菌体示(-);每视野内菌体数目较多,荧光亮度较弱为(+);菌体数目多,荧光亮度较强,菌体稍膨大,横径增宽,中间呈空隙状为(++);菌体数目多,菌体明显膨大,横径增宽,中间空隙大,荧光亮度强为(+++);模糊不清示(±)。

2. 荧光素染色:按全国结核病细菌学检验标准化规程进行。金胺染色。痰标本涂片荧光显微镜油镜 100 个视野找到 3 条菌为(+). 2 条以下为(-)。

3. 抗酸染色:参照齐-尼二氏法进行。

选例与痰标本的处理:经临床和 X 线检查证明为肺结核的住院病人留晨痰(留痰前 1 天停药一切抗结核药物)。痰液加等量 4% 硫酸处理,37℃,消化 30 分钟。之后取 0.1ml 接种于改良罗氏培养基上,37℃ 培养 8 周。

结 果 与 讨 论

(一) 荧光抗体检查结核菌的敏感性试验

以无毒人型结核菌 H₃₇Ra 为模型菌,以荧光素和抗酸染色为对照,比较荧光抗体检查结核菌的敏感性。先制备 0.5mg/ml 菌悬液,按 5 倍级稀释。取 10μl 稀释液滴在载玻片上,油镜 100 个视野计数细菌数。3 次重复,每次 2 份样品平行试验,结果见表 1。

从表 1 看出,三种染色方法检验结核菌的敏感性基本相似。但当菌悬液浓度在 0.0008

mg/ml 时, 荧光抗体染色法易检查到菌体, 而抗酸染色法菌体不易查到。同时荧光抗体染色还可看到荧光较亮的破碎的菌片或颗粒 (经鉴定不是非特异染色)。这点对于陈旧培养物的检查可能是有益的。

表 1 三种染色方法检查结核菌的敏感性比较

染色方法	菌 浓 度 (mg/ml)			
	0.1	0.02	0.004	0.0008
荧光抗体	125.3* (112—140)	35.0 (28—41)	25.1 (14—52)	14.2 (9—22)
荧光素	90.8 (69—137)	42.8 (36—54)	14.6 (11—17)	6.0 (2—13)
抗酸	114.0 (72—143)	25.5 (15—39)	7.8 (1—11)	2.2 (1—4)

* 3 次实验的平均数。括弧内的数据为全距。

(二) 特异性试验

结核菌荧光抗体的特异性用以下试验证明。

1. 特异染色: 由人型结核菌菌悬液制成的涂片用荧光抗体染色, 结果呈特异性染色, 用正常兔荧光血清染色呈阴性。

2. 吸收试验: 取适量的含 3—4mg/ml IgG 的荧光结合物, 加入等量的含 5—10mg/ml (湿重) $H_{37}Ra$ 菌悬液, 37℃ 作用 1.5 小时, 4000Y/min 离心 20 分钟, 取上清液染色, 与相应菌呈阴性反应, 说明菌的吸附是特异性抗体与菌作用的结果。

3. 交叉染色试验: 为证明该荧光抗体有无种的特异性, 我们用抗酸菌属内 22 种菌和属间 3 种菌作为模型, 以直接荧光素染色作为对照,

表 2 兔抗人型结核菌荧光抗体对 25 种菌的交叉反应

菌 种 名 称	荧 光 抗 体 稀 释 度*			荧光素染色
	1:4	1:8	1:16	
人型结核菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	++	++	++	+
牛型结核菌 (<i>M. bovis</i>)	++	++	+	+
堪萨斯分枝杆菌 (<i>M. kansasii</i>)	+	+	+	+
猿分枝杆菌 (<i>M. simiae</i>)	—	—	—	+
海分枝杆菌 (<i>M. marinum</i>)	—	—	—	+
瘰癧分枝杆菌 (<i>M. scrofulaceum</i>)	—	—	—	+
鸟分枝杆菌 (<i>M. avium</i>)	—	—	—	+
胞内分枝杆菌 (<i>M. intracellulare</i>)	—	—	—	+
蟾分枝杆菌 (<i>M. xenopi</i>)	—	—	—	+
溃疡分枝杆菌 (<i>M. ulcerans</i>)	—	—	—	+
胃分枝杆菌 (<i>M. gastri</i>)	±	—	—	+
土分枝杆菌 (<i>M. terrae</i>)	±	±	±	+
无色分枝杆菌 (<i>M. nonchromogenecum</i>)	—	—	—	+
迪氏分枝杆菌 (<i>M. diernhoferi</i>)	—	—	—	+
次要分枝杆菌 (<i>M. triviale</i>)	—	—	—	+
偶发分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i>)	—	—	—	+
耻垢分枝杆菌 (<i>M. smegmatis</i>)	±	±	±	+
龟分枝杆菌龟亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>)	—	—	—	+
草分枝杆菌 (<i>M. phlei</i>)	±	±	—	+
金黄分枝杆菌 (<i>M. aurum</i>)	±	±	—	+
淡黄分枝杆菌 (<i>M. flaveicens</i>)	—	—	—	+
牡牛分枝杆菌 (<i>M. vaccae</i>)	—	—	—	+
星状诺卡氏菌 (<i>Nocardia asteroides</i>)	—	—	—	+
棒状分枝杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	—	—	—	—
绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	—	—	—	—

* 判定标准详见材料和方法

3次重复。结果见表2。荧光素染色抗酸菌属内的22种菌均为阳性,而免疫荧光染色,除牛型结核菌,堪萨斯杆菌有交叉反应外,其它菌种均无明显的交叉反应。这与 Ronald^[3]报告的9种分枝杆菌中只有土分枝杆菌有交叉反应的结果不同。为消除交叉反应,将荧光抗体的工作效价提高到1:16,结果牛型结核菌和堪萨斯杆菌的荧光亮度有减弱但未消失。其它可疑交叉反应有(±)的菌种基本看不清。

对于有明显交叉反应和可疑交叉反应的菌种,用相应菌悬液吸附荧光抗体的方法,交叉染色基本消失。由此可见,制备交叉吸收血清对鉴定菌种的特异性是有帮助的。

4. 临床分离菌株的验证:

① 用本室分离的抗酸菌菌种进行荧光抗体染色特异性的试验。结果(见表3)表明表中仅有的三种菌特异性是强的。

表3 抗酸菌临床分离株染色的特异性

菌种名称	株数	荧光抗体染色	荧光素染色
人型结核菌 (<i>M. tuberculosis</i>)	13	+++	+
胞内分枝杆菌 (<i>M. intracellulare</i>)	3	-	+
淡黄分枝杆菌 (<i>M. flavescens</i>)	1	-	+

② 肺结核病人痰标本的检查: 取肺结核病人痰标本155例,以人型结核菌荧光抗体直涂染色法检查,进一步验证临床的实用性。并与荧光素染色和分离培养作比较,结果见表4。从

表4看出,结核菌荧光抗体染色法的阳性率为43.87%,荧光素直涂染色的阳性率为40.65%,经统计学处理(t试验),两组差异不显著。培养的阳性率为27.7%,与荧光抗体染色法比较, $P < 0.005$,两组差别非常显著。结果表明,荧光素直涂染色法检查痰菌的阳性率与荧光抗体染色法相比,基本相似,而这两种染色法检查痰菌的阳性率明显地高于培养法。究其原因,可能痰液中含有死菌或因抗痨药物作用后生活力低下的细菌,难于培养。

表4 肺结核病人痰标本三种检查方法阳性率比较

	荧光素直涂染色	荧光抗体直涂染色	培养
病例总数	155	155	155
阳性例数	63	68	43
阳性率(%)	40.65	43.87	27.74

用人型结核菌荧光抗体染色肺结核痰标本涂片,可见特异染色的菌体形态,即菌体中央未显色(空隙状),周边膨大,或菌体均匀发荧光,周边附有不整齐的抗体结合物,这一特点有利于诊断。

参考文献

- [1] Nassau E. et al: *Tuberculosis*, 51: 430, 1970.
- [2] Parter W. D. et al: *Applied Microbiology*, 27(4): 753, 1974.
- [3] Ronald. R. et al: *Amer. Rev. Resp. Dis.* 108: 979, 1973.