

应用抗恙虫立克次体的单抗检测 恙虫立克次体抗原

张惠君 陈 燕 黄松如 邵 兰 黄敏君 宋丽玉 何 似

摘要 应用斑点ELISA技术,以辣根过氧化物酶标记的抗恙虫立克次体Karp毒株的单抗分别检测了恙虫病患者血清、恙虫立克次体保种传代的小鼠血清、恙虫病流行地区的野鼠血清以及恙螨中的恙虫立克次体抗原,结果表明本法是早期诊断恙虫病和进行该病流行病学调查的一种简便而有效的手段。

关键词 恙虫立克次体 恙螨 单克隆抗体 斑点ELISA

恙虫病的诊断多依据流行病学史、典型的临床症状与体征、血清学检查结果及病原体分离等。病原体分离需时较长,且非一般实验室所能进行,观测血清中抗体增长的动态变化也存在一定的局限性,而检测患者血清中的恙虫立克次体抗原,则能有效地在疾病的早期作出比较明确的诊断。本文介绍我们应用抗恙虫立克次体的单抗进行斑点ELISA,检测恙虫病患者与鼠类的血清以及恙螨中的恙虫立克次体抗原,获得较为满意的结果。

材料和方法

一、含单抗的小鼠腹水的制备与标记:抗恙虫立克次体Karp毒株的单抗为本单位1989年所研制^[1]。将含高浓度单抗的小鼠腹水经羟基磷灰石柱层析提纯、浓缩后^[2],参照郭春祥等^[3]的方法用辣根过氧化物酶进行标记。

二、恙虫立克次体抗原的制备:选用L929传代细胞进行恙虫立克次体的培养,待细胞病变达Ⅲ时收集培养物,并按Shishido等^[4]介绍的方法将培养物经超声粉碎及高、低速离心以提纯抗原,测其蛋白含量后备用。

三、斑点ELISA:参照Pappas等^[5]及鲍行豪等^[6]的方法并适当加以改进,于硝酸纤维薄膜上压研出的凹孔中滴加待检标本或不同稀释度的恙虫立克次体抗原1 μ l,晾干后置5%

牛血清白蛋白液中于室温封闭30分钟,吸干水分后逐滴加入最适浓度标记的单抗,于37 $^{\circ}$ C作用30分钟,用TBS充分洗涤,然后移至含底物4-氯-1-萘酚的溶液中,于室温显色。当阳性对照标本显示出蓝紫色斑点时,用蒸馏水冲洗终止反应。每次试验均设阳性、阴性及TBS对照。

四、检测标本:

- 1.恙虫病患者血清56份,分别采自天津蓟县及福建平潭县经临床确诊的病例。
- 2.恙虫立克次体3个国际标准毒株的细胞培养上清液及立克次体保种传代的小鼠血清。
- 3.采自福建平潭县的野鼠血清37份。
- 4.自野鼠耳壳中收集的恙螨,计数后分别以每只野鼠为一组放入试管中,加PBS1ml,用玻棒反复研磨,离心沉淀后取上清液点样测试。
- 5.地方性斑疹伤寒患者血清20份。
- 6.其它发热性疾病患者的血清18份。
- 7.正常健康人血清156份,正常小鼠血清20份。

结 果

一、斑点ELISA敏感性及特异性的测定:应用标记的单抗分别对系列稀释的3种恙虫立克次体毒株的细胞培养抗原进行斑点

本文作者单位:100050 北京热带医学研究所(张惠君、陈燕、黄松如、邵兰、黄敏君);福建省卫生防疫站(宋丽玉、何似)

ELISA, 测得本法所能检出的Karp毒株的最小抗原量为 $6.7\text{ng}/\mu\text{l}$, 同时对Gilliam及Kato毒株抗原也呈阳性反应, 但所能检出的最小抗原量则明显大于Karp毒株; 分别为 $210\text{ng}/\mu\text{l}$ 及 $100\text{ng}/\mu\text{l}$ 。以此法检测上述3种恙虫立克次体毒株的细胞培养上清液及保种传代的小鼠血清中恙虫立克次体抗原亦均为阳性。但与地方性及流行性斑疹伤寒立克次体、Q热立克次体以及斑点热组的立氏立克次体抗原则无交叉反应。

二、应用斑点ELISA检测不同标本中恙虫立克次体抗原: 用标记的单抗进行斑点ELISA检测56例具有典型临床症状与体征的恙虫病患者血清, 52例(92.9%)呈阳性反应, 其中用标记的Kp3(IgG₁)检测为阳性者44例; 用混合标记的Kp4~6(IgM)检测为阳性者51例, 经统计学处理二者无明显差异($P>0.05$)。与此同时曾用ELISA法检测患者血清中抗恙虫立克次体的抗体, 41例(73.2%)为阳性。若按采血时间分别统计, 抗原阳性平均出现于发病后第7天, 而抗体阳性则平均出现于发病后第11天。经统计学t值处理, 两组间有一定差异($P<0.05$)。

20例地方性斑疹伤寒患者中, 有2例血清斑点ELISA呈弱阳性反应(滴度 $<1:32$)。

37只野鼠的血清, 恙虫立克次体抗原100%为阳性, 但仅有3只野鼠的血清抗体同时呈阳性反应。37只野鼠中有29只携带恙螨4~190个不等。分别检测从每只野鼠所收集的恙螨, 结果有26组(89.7%)斑点ELISA呈阳性反应。156份正常人血清及20份正常小鼠血清均为阴性。

将被检标本滴于硝酸纤维膜后存放 4°C 冰箱, 并分别于1、2及3周后进行斑点ELISA, 其结果与当天进行检测完全一致。

讨 论

恙虫立克次体的病原学检查在恙虫病的诊断及流行病学调查中具有重要意义, 但进行病

原体分离需要一定的技术条件, 非一般实验室所能完成, 而且其阳性率常受病程及其它因素的影响。于恩庶等〔7〕于50年代对福建平潭县的恙虫病患者、贮存宿主及传染媒介的调查中, 利用小白鼠进行病原体分离, 阳性率分别为50.3%、8.3~42.8%(平均18.4%)及14.2~18.1%(平均10.7%)。

应用抗恙虫立克次体的单抗进行斑点ELISA检测不同标本中的恙虫立克次体抗原, 具有操作简便、灵敏、快速和特异性高等优点。待检标本滴于硝酸纤维膜后在 4°C 存放3周, 不致影响结果, 同时所需待检标本量极少, 且能目测结果, 适合于基层及现场应用。

本试验所用抗恙虫立克次体的单抗仅具有群特异性而无株特异性〔1〕, 故应用范围较广, 但用此法所能检测出Karp毒株的最小抗原量明显小于其它两个标准毒株, 是否具有一定的分型价值, 有待进一步观测。我们用此法检测恙虫病患者与野鼠血清及恙螨体内的恙虫立克次体抗原, 阳性率分别为92.9%、100%及89.7%, 相应地均比于恩庶〔7〕等进行病原体分离的阳性率为高。此外检测血清中恙虫立克次体抗原的阳性率比检测抗体的阳性率为高, 且检出时间也较后者为早, 有利于本病的早期诊断。

本组20例地方性斑疹伤寒患者中有2例血清恙虫立克次体抗原呈弱阳性反应(滴度 $<1:32$), 不能排除该2例患者同时感染恙虫病的可能性。于恩庶等曾报道, 从住宅内捕获的鼠类如沟鼠、屋顶鼠及食虫鼠中分离出恙虫立克次体, 阳性率在16.7~8.3%之间, 同时还证实这些鼠类也都携带有恙螨。

至于我们在平潭捕获的野鼠, 其血清中恙虫立克次体抗原100%呈阳性反应, 而血清抗体阳性者仅3只, 是否系免疫耐受有待进一步证实。于恩庶等在对66只鼠类的38次恙虫立克次体的分离工作中, 有7次为阳性, 但其中仅1只OXK为1:1280, 其余均小于1:80, 与我们

检查的结果有相似之处。

(本项工作承福建省防疫站于恩庶教授及平潭县防疫站大力协助, 谨致谢意)

Detection Antigen of Rickettsia tsutsugamushi by Using Monoclonal Antibody Zhang Huijun, et al., Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing, 100050

Dot-ELISA was used with HRP-labelled monoclonal antibodies Kp3 (IgG₁) and Kp4-6 (IgM) against antigen of the Karp strain of *Rickettsia tsutsugamushi* to detect the antigen of *R. tsutsugamushi*. The positive rate of sera of 56 acute scrub typhus patients and 37 wild rats caught from the countryside of the endemic area as well as 29 batches of chiggers collected from the wild rats were 92.9%, 100% and 89.7%, respectively. No cross reaction was found with antigens of other rickettsia groups such as *R. mooseri*, *R. prowazeki*, *R. burneti* and *R. rickettsi*. In patients suffering from acute scrub typhus the antigen of *R. tsutsugamushi* could be detected earlier in the course of illness than the antibody.

This method is very sensitive that an amount of antigen of 6.7ng/ μ l can be detected.

It is easy to perform and the results can be read by naked eye.

Key words *Rickettsia tsutsugamushi*, Chigger Monoclonal antibody Dot-ELISA

参 考 文 献

- 1 黄松如, 等. 建立分泌抗恙虫病立克次体的单克隆抗体的杂交瘤细胞株. 中华流行病学杂志, 1989, 10(特刊3号): 50.
- 2 张惠君, 等. 用国产羟基磷灰石纯化抗恙虫立克次体的单克隆抗体. 首都医学院学报, 1992, (待发表).
- 3 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 1983, 3: 97.
- 4 Shishido A, et al. Particulate and soluble antigens of *Rickettsia tsutsugamushi* in the complement fixation test. J Immunol, 1969, 103: 480.
- 5 Pappas MG, et al. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): A micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J Immunol Methods, 1983, 64: 205.
- 6 鲍行豪, 等. 免疫斑点技术检测LT和CT的研究. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6: 22.
- 7 于恩庶, 等. 1955年平潭县恙虫病355例临床症状分析及病原学检查. 福建医刊, 1957, 1: 43.

(收稿: 1992-07-31 修回: 1992-10-14)

抗原基因克隆筛选中出现的一个问题

毕德增 张远富 蔡虹 宋秀萍

我们在做普氏立克次体抗原基因克隆的筛选中, 出现了一个原先没有预想到的问题。正常大肠杆菌与普氏立克次体免疫的兔血清呈阳性反应, 无论怎样洗涤菌体, 也不论菌体的浓度是高是低, 只要加上血清就呈阳性反应。如果只加菌体, 不加血清, 反应呈阴性, 反之亦然。显然, 阳性反应与血清有关。后来, 我们将血清用大肠杆菌吸收处理, 吸收处理后的血清不再与大肠杆菌起反应。我们追究其原因是用于免疫的兔

子不是无菌动物, 也不是无特殊病原菌(SPF)动物。免疫后, 为了喂养、管理及观察之方便, 将兔子放在卫生条件差的楼梯口饲养, 致使兔子被大肠杆菌感染。这个问题值得我们注意, 为保证实验结果的可靠性, 必须注意动物的质量。

本文作者单位: 102206 北京市·中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所