

# 用间接荧光抗体染色法检查血中钩端螺旋体的试验探讨

广州军区军事医学研究所 温荣春

在钩体病早期快速诊断的各种方法中, 荧光抗体染色法具有较高的特异性和敏感性, 国内早已应用直接染色法, 但未见应用间接染色法的报道。一般认为间接法的敏感性比直接法高5~10倍。本文以提高钩体病早期快诊的敏感性为目的, 建立了间接染色法, 并观察到该法能使一种抗钩体免疫血清对国内13群钩体菌型都具有较好的染色效果。可见间接法比直接法有一定的优越性。随着轻便荧光光源的普及和羊抗兔IgG荧光抗体制剂的商品化, 间接染色法有一定推广价值。现将试验结果报告如下。

## 材料与方 法

### 材料:

1. 菌种: 国内标准13群15型钩体菌种。另有江4株(黄疸出血群)、04株(秋季热群), 来自武汉生物制品研究所。

2. 抗钩体免疫血清: 参照高剂量抗原快速免疫法<sup>[1]</sup>, 用家兔制成江4、04、波摩那(56608)三个菌型的免疫血清, 镜凝抗体效价: 江4 1:40,000, 04和波摩那 1:80,000。

3. 抗钩体荧光抗体: 将上述三种免疫血清按常规法制成荧光抗体制剂。

4. 羊抗兔球蛋白荧光抗体: 自制羊抗兔球蛋白免疫血清, 琼脂双扩散抗体效价为1:128。按文献<sup>[4]</sup>的方法制成荧光抗体制剂。

5. 缓冲液: 0.01M pH7.2磷酸缓冲盐水(PBS), 0.01M pH8.0磷酸盐缓冲液(pH8.0 PB)。

6. 离心机: CL-12型, 每分钟4,000转斜角离心机。

7. 荧光显微镜: 上海科艺光学仪器厂生产的72型轻便荧光光源, 西德的Leitz普通显微

镜, 用6倍目镜, 另配奥地利的Reichert 63倍物镜(用此物镜, 涂片可不封盖玻片)。

### 方法:

#### 1. 制片:

1. 纯培养物制片: 取0.5毫升培养物加入3.0毫升PBS稀释, 离心洗涤一次, 制成菌悬液后在无色薄玻片上涂片, 风干, 火焰固定。

2. 血液标本制片: 取1.0毫升血液加入2.0毫升1%枸橼酸钠溶液(含氯化钠0.5%)抗凝, 以离心集菌法处理<sup>[2]</sup>, 取沉淀物涂片, 风干。在涂片上滴加0.5毫升95%酒精, 室温固定5分钟, 倒去酒精后风干。

上述涂片经蒸馏水洗3分钟, 风干, 待染。

#### 2. 染色:

间接染色: 在涂片上滴加0.1毫升抗钩体免疫血清, 盖上一张18×18毫米盖玻片, 使血清均匀铺开。涂片放在湿染色皿内, 将染色皿浮于56°C水浴箱水面上染色15分钟, 涂片浸入水中让盖玻片自然脱离, 然后以PBS泡洗3分钟, 蒸馏水冲洗一次, 风干。羊抗兔球蛋白荧光抗体染色如前程序进行。最后用pH8.0PB洗一次。

直接染色法的染色条件与间接染色法相同。

#### 3. 结果判定:

钩体荧光亮度以“—、+、++、+++”符号表示。抗钩体免疫血清的染色效价是以钩体呈+++亮度的黄绿色荧光, 菌体清晰, 形态典型为判定标准。

## 结 果

一、三种抗钩体荧光抗体与13群17株钩体

直接染色结果：荧光抗体原液对同群菌型染色的荧光亮度呈“卅”以上，对异群菌型只有“十”或“十”的交叉染色。荧光抗体稍加稀释后，对异群菌型染色的荧光亮度更差。

二、三种抗钩体免疫血清与13群17株钩体的间接染色结果：从染色结果来看，相应抗原抗体的染色效价为1:160。江<sub>4</sub>、04免疫血清对异群菌型的染色效价都在1:20和1:40以上，波摩那免疫血清对异群菌型的染色效价较低(表1)。

为了观察间接染色法对血液标本的染色效果，选交叉染色效价较低的56607、56612菌株和04、江<sub>4</sub>菌株分别感染豚鼠，当动物发烧时抽心血制片。用04、江<sub>4</sub>1:5~10稀释的免疫血清进行染色。结果是钩体呈“卅”荧光亮度反应，1:20稀释的免疫血清染色，钩体荧光亮度有所减弱。用人为的含菌人血液重复试验，结果相似。

表1 三种抗钩体免疫血清对13群17株钩体的间接荧光抗体染色效价

抗 原		免疫血清(1:~)		
菌 型	菌号	江 <sub>4</sub>	04	波摩那
沃尔登	56601	80	40	<10
爪哇	56602	80	80	40
犬	56603	40	80	<10
拜伦	56604	40	40	20
致热	56605	80	80	20
秋季	56606	40	80	10
澳洲	56607	80	40	20
波摩那	56608	20	80	160
临6	56609	80	80	40
七日热	56610	80	80	<10
巴叶赞	56612	20	40	10
豕	56613	80	80	40
曼耗II	67020	80	80	20
七日热溶血	67024	80	40	40
七日热乌尔夫	67071	80	80	20
	04	20	160	10
	江 <sub>4</sub>	160	80	20

三、间接染色法检查不同含菌量血液标本的结果：给抗凝豚鼠血液加入一定数量的钩体，

同法设置阴性对照。经制片后用间接法染色。在镜检时，把含菌和不含菌涂片搞乱，进行盲目检查。另外，将含菌血液接种于柯氏培养基，于30°C培养4周。结果见表2、3。

表2 间接荧光抗体染色法检查不同含菌数血液标本结果

每毫升血液含菌数	试验次数	阳性	阴性
1×10 <sup>3</sup>	6	6	0
1×10 <sup>2</sup>	20	18	2
对照	20	0	20

表3 不同含菌数血液标本培养分离结果

每毫升血液含菌数	培养管数	阳性	阴性
1×10 <sup>3</sup>	10	10	0
1×10 <sup>2</sup>	10	5	5
1×10 <sup>1</sup>	10	2	8

每毫升血液含菌数1×10<sup>3</sup>的涂片，镜检几个视野即能找到钩体，含菌数1×10<sup>2</sup>的涂片，镜检10分钟也能找到2~3条钩体，钩体多呈典型形态。对照涂片镜检20分钟，找不到与钩体形态相象的荧光丝状物。

### 讨 论

一、间接染色法显示出较好的菌群间交叉染色性能：由于间接法具有较高的敏感性，能明显地提高菌群间的交叉染色效果。因此，选择一种染色性能良好的高效价抗钩体免疫血清，对异群菌型染色，似乎都可以获得满意的效果。这就克服了直接法对异群菌型染色差，须制备多种抗钩体荧光抗体的缺点。

二、间接染色法的敏感性和可靠性：试验结果表明，间接染色法从每毫升含1×10<sup>2</sup>钩体的血液标本中多能获得阳性结果。该法比免疫炭凝(最小检出菌数为5~10万/毫升)<sup>[3]</sup>的敏感性高。

人们常常担心“假钩体”现象对结果判定的干扰。这种“假钩体”与血浆抗凝不充分而形成纤维蛋白有关。为防止血浆纤维蛋白的形成，本试验采用1%枸橼酸钠溶液增强抗凝作用，

很少发现带荧光的与钩体形态相象的丝状物，从而基本上排除了“假钩体”对结果判定的干扰。

三、在制片染色操作中的几点经验：

1. 在37°C30分钟条件下染色，其效果既不够理想又费时间。经不同染色温度和时间的比较试验，证明56°C15分钟的染色条件是适宜的。

2. 含血浆较多的涂片在水洗过程中极易脱落。所以在沉淀物中尽量去除血浆，涂片要薄，这样，涂片才固定得牢。

3. 用电热吹风机加热风干涂片，以提高工作效率，钩体形态并不发生明显改变。

4. 染色时加盖玻片不仅节省血清，而且使

温度能迅速均匀的作用于涂片上。

小 结

本文为提高钩体病早期快速诊断的敏感性，建立了间接荧光抗体染色法，并观察到该法具有使一种抗钩体免疫血清对异群菌型有较好的交叉染色性能。

参 考 文 献

1. 鲍行豪等：生物制品通讯，4：185，1979。
2. 浙江省卫生防疫站：钩端螺旋体病防治研究技术资料汇编，第一集，204页，1972。
3. 浙江省卫生防疫站：钩体病防治研究工作情况交流，1：11，1973。
4. 59175部队：荧光显微术。

### 浙江省义乌市肺吸虫病流行情况初步调查

浙江省义乌市卫生防疫站 刘书臣 喻开瑞

我县既往无肺吸虫病报道。1980年经初步调查证实有流行。现报告如下：

一、自然环境：义乌市地处浙江中部，系半山区。调查16个公社中11个公社有肺吸虫病流行，占调查数的68%。流行区一般都系高山区，海拔在400~800米之间；地质多属沙岩，不易风化，水质清彻，有利于川蜷螺孳生。在高山段的溪流中有大量川蜷螺孳生，最高密度110只/尺<sup>2</sup>；非流行区有5个公社，占调查数的32%，都系低山区，海拔均在200米以下；地质多属夏岩，水质混浊，在此溪段川蜷螺很少或无。

二、感染方式：调查疫区1,580人，有食蟹史者550人，占34%，尚阳公社慈溪大队人群食蟹率高达100%。食蟹方法多为生食。儿童在溪水中捉到溪蟹即剥食；或置炉灶内煨红半生食；或用酒糟醉食(生食)；或加热水煮或油炒；吃生水的人占100%。

三、中间宿主：捕获川蜷螺25,800只(鉴定为放逸短沟蜷)，剖检260只，有肺吸虫尾蚴的2只，感染率为0.76%。

捕获溪蟹704只，肺吸虫囊蚴阳性的312只，阳性率44.3%，东朱公社雪峰水库上溪段溪蟹囊蚴感染率高达100%。检出囊蚴总数1,685只，平均每只溪蟹含囊蚴5.4只。

704只溪蟹中，浙江华溪蟹665只。囊蚴阳性的

297只，阳性率44.7%；长江华溪蟹39只，囊蚴阳性的15只，阳性率38.5%(P<0.05)。

四、人工感染动物结果：2只幼犬各喂饲活囊蚴86只，感染后分别于7~10天出现各种临床症状和体征。两犬分别存活48天和107天。两犬生前均经粪检、痰检、血检、X光摄片，均获阳性结果。尸检肺部，两犬分别获肺吸虫成虫44和64条，人工感染囊蚴成活率为51.1~74.7%。尸检还在一犬的锁骨中段下层疏松组织内，检出一包囊剖出肺吸虫成虫一对，包囊内有大量肺吸虫卵，此系穿透胸膜的肺吸虫异位寄生所致。剖检出的肺吸虫成虫，经鉴定为卫氏并殖吸虫。

五、人群感染：皮试260人，阳性120人，阳性率46.2%；男性阳性率52.3%(68/130)；女性阳性率39.4%(52/132)P<0.05。28例皮试强阳性者，4例痰检虫卵阳性，阳性率14.3%，其中一14岁女孩，伴癫痫史9年余，确诊为脑型肺吸虫病。28例皮试阳性者，嗜酸性粒细胞增高者16例，占57.1%。

六、小结：经调查证实义乌市为肺吸虫病流行区；对少年儿童危害较大，首次确诊4例病人。感染方式以生食或半生食溪蟹为主要感染方式，生吃溪水亦能感染；动物和人的易感地段，多在溪流上段海拔400米以上的高山区。