

恙虫病立克次体补体结合抗原的研究

冯慧敏 蔡孟瑜 钟之英 白施恩

(中山医学院微生物学教研组, 广州)

本文介绍应用兔睾丸单层细胞制备恙虫病立克次体补体结合抗原的方法, 并初步探讨了影响鸡胚卵黄囊膜抗原效价的一些因素。鸡胚卵黄囊膜抗原产量大、效价高、特异性较好。但有些恙虫病立克次体株在鸡胚中不易繁殖。而在组织培养中很易繁殖, 第一代即能获得大量立克次体, 有利于同时制备多株恙虫病立克次体抗原。

本文同时介绍了制备豚鼠及家兔免疫血清的简便方法。

补体结合试验是鉴定恙虫病立克次体及研究其抗原性的方法之一。制备恙虫病立克次体补体结合抗原的方法有数种, 简繁不一。粗制抗原往往只直接用组织悬液, 离心除去其他无关组织^[6,10,13,19], 或以乙醚处理^[1-5,9,11]。精制抗原则进一步用等电点沉淀杂蛋白, 用离子交换树脂、牛血清白蛋白、白陶土、皂土、去氧胆酸钠^[3,8,12,18,22,23]等提纯。可供制备抗原的材料有: (1) 感染鸡胚卵黄囊膜^[1-9], (2) 感染动物脏器, 如大、小白鼠、棉鼠的肝、脾、肺组织^[10-14], (3) 小白鼠、豚鼠的胸水或腹水抗原^[11,15-21]等。补体结合试验特异性较高, 不需特殊设备, 在鉴定恙虫病立克次体、分析抗原性及流行病学调查方面均有一定价值, 但需摸索一种简便的制备抗原的方法。

本文初步探讨一些影响卵黄囊膜抗原的因素, 并介绍用组织培养试制补体结合抗原, 以及较简便的制备免疫血清的方法。

材料及方法

(一) 抗原制备

1. 鸡胚卵黄囊膜抗原: 基本上按 Bengtson^[2]法, 但省略了用硫柳汞处理。以恙虫病立克次体⁽¹⁾

接种于鸡胚卵黄囊, 6—7 日后濒死前收获卵黄囊膜。以生理盐水制成 10% 悬液, 加 2—5 倍体积乙醚充分摇匀, 置冰箱过夜, 次日吸出液层即为抗原。

2. 组织培养抗原: 采用兔睾丸单层细胞^[14], 用 50 毫升扁瓶培养, 每瓶接种细胞 600—800 万个。一般于 5—7 日生长成片。成片后, 每瓶用感染小白鼠腹腔洗液 3 毫升感染之, 28—30℃ 培养 15 日后涂片, 即可见到细胞内外大量立克次体, 用以制备抗原。制备时先将营养液吸出, 每瓶加入生理盐水 1 毫升, 用毛细吸管将细胞片刮下, 用组织磨碎器磨碎, 加入 2—5 倍量乙醚, 充分摇匀后置 4℃ 冰箱过夜, 次日吸出液层即为组织培养抗原。

(二) 补体结合试验方法

用低温 (4℃) 总量 0.6 毫升法, 以完全不溶血的最高稀释度为抗原效价。

(三) 免疫血清制法

以感染小白鼠腹腔洗液或脾悬液 (1:30—1:50), 腹腔内注射以免疫豚鼠或家兔。豚鼠接种 1 毫升, 家兔接种 3 毫升, 注射 1 次或 5 次, 若注射 5 次时, 每次间隔一周。于免疫后不同时间采血, 测定抗体滴度。

本文于 1978 年 2 月 6 日收到。

1) 崔株及古株分别于 1953 及 1956 年自广州病人血液分离获得。“49”株于 1956 年自沟鼠分离获得。

结果及讨论

(一) 鸡胚卵黄囊膜抗原

1. 用乙醚处理的卵黄囊膜抗原, 效价最高的可达 1:32—1:64, 无抗补体反应。其抗原的特异性可由下述 4 种方法证明:

(1) 恙虫病立克次体卵黄囊膜抗原与正常豚鼠或兔血清呈阴性补体结合反应, 正常卵黄囊膜抗原与免疫豚鼠或兔血清也呈阴性反应。

(2) 用北京生物制品研究所的标准流行性及地方性斑疹伤寒立克次体抗原及免疫血清与本实验室制备的恙虫病立克次体免疫血清及抗原进行交互补体结合反应, 结果均为阴性。

(3) 自非流行区(北京)取正常人血清 94 份与阳性卵黄囊膜抗原进行补体结合试验, 除 17 份抗补体外, 其余 77 份均为阴性。

(4) 以恙虫病立克次体卵黄囊膜抗原与 11 份可疑恙虫病病人血清进行补体结合试验, 结果见表 1。除 3 例抗补体外, 补体结合试验的结果与分离恙虫病立克次体的结果基本一致。分离立克次体阳性者 5 例, 其中 4 例补体结合试验亦为阳性, 效价 1:16—1:256 以上。2 例血液分离立克次体阴性, 补体结合试验也是阴性。此外, 一例临床症状典型, 补体结合试验阳性, 但血培养未能分离出立克次体, 可能该例采血标本较迟, 病人已服用过大量合霉素, 因而影响血培养的阳性率。另一例血培养阳性而补体结合试验阴性, 该例曾两次抽血检查(间隔 3 周)均为阴性, 原因尚待进一步分析。

2. 影响卵黄囊膜抗原效价的若干因素

(1) 立克次体量与抗原效价的关系: 经滴定卵黄囊膜抗原 111 批的结果, 发现若涂片立克次体量 <20 个/油镜视野时,

表 1 可疑恙虫病病人立克次体分离结果与血清学反应的比较

病 例	立克次体分离结果	补体结合抗体滴度	OXK 抗体滴度
谢××	R+	—	1:160
戴××	R+	≥1:128	—
麦××	R—	≥1:256	1:256
何××	R+	≥1:256	—
伍××	R+	1:16	1:80
杨××	R+	1:32	—
彭××	R—	—	—
李××	R—	—	1:20

注: 3 例抗补体病例, 未列入表中。

抗原效价大部分 <1:4; 若涂片立克次体量 >50 个/油镜视野时, 则抗原效价在 1:16 或以上者占 65%。由于用同一卵黄囊膜的不同部位涂片, 立克次体的量可有较大差异, 因此, 如用此法作指标观察立克次体量与抗原效价的关系, 有时可出现不规则的结果, 但大多数涂片立克次体量多的, 抗原效价亦高。

(2) 加砂研磨与抗原效价的关系: 在感染的卵黄囊膜中, 大部分立克次体用以制备抗原时, 效价往往不高。因而于制备抗原时加中性玻璃砂研磨卵黄囊膜, 使细胞破裂, 放出其中立克次体以提高抗原效价。共试验 11 批, 结果见表 2。经加砂研磨后抗原升高 2 倍者 5 批, 抗原效价无改变的 4 批, 效价反而降低者 2 批, 故加砂研磨后抗原效价似略有升高。但未能排除是由于立克次体分布不均匀所致。

(3) 水层与中间组织层抗原效价的比较: 以乙醚处理立克次体悬液一夜后, 吸出水层及中层, 分别滴定其抗原效价, 经 4 批试验, 结果见表 3。其中 3 批中层抗原均较水层抗原效价高, 与 Bengtson^[2] 结果一致, 效价可升高 2—4 倍。但中层抗原混浊, 需经离心沉淀, 否则观察结果困难。

(4) 0.1% 福马林处理能降低抗原效价: 制抗原时以 0.1% 福马林盐水代替生

表 2 加砂研磨对卵黄囊膜抗原效价的影响

抗原批号	抗 原 效 价	
	不加砂研磨	加砂研磨
47	1:8	1:16
55	1:4	1:4
56	≥1:32	1:16
58	1:16	1:32
59	1:4	1:4
64	1:16	1:8
67	1:8	1:8
68	1:16	1:16
69	1:4	1:8
72	1:8	1:16
73	<1:4	1:4

表 3 水层与中层恙虫病立克次体抗原效价的比较

抗原批号	抗 原 效 价	
	水层抗原	中层抗原
47	1:8	1:32
55	1:4	1:8
60	1:8	1:4
64	1:16	≥1:32

表 4 以生理盐水或 0.1% 福马林盐水制备的抗原效价的比较

抗原批号	抗 原 效 价	
	生理盐水抗原	0.1% 福马林盐水抗原
107	1:32	1:16
109	1:32	1:16
110	1:16	1:8
114	1:16	1:8
115	1:16	1:8
118	1:8	1:4
119	1:8	1:8
120	1:8	1:4
122	1:8	1:4

理盐水制备 1:10 卵黄囊膜悬液,经 9 批试验,结果见表 4。除 1 批抗原效价不变外,其余 8 批用福马林盐水制备的抗原,效价均降低,一般低 2 倍。

(5) 保存时间对抗原效价的影响: 抗原保存在 4℃ 冰箱中,放置时间越长,其

效价越低。一般保存一个月左右,抗原效价无改变,保存 80 天,其效价降低约 2 倍。用 0.1% 福马林盐水稀释卵黄囊膜制备抗原,并不能延长抗原效价的保存时间。

根据试验的结果,说明卵黄囊膜抗原特异性高,若立克次体繁殖量丰富时,抗原效价可达 1:16—1:32 以上。用此法制备抗原,其产量较大,一只鸡胚能提供 30—60 毫升 4 单位抗原。这种抗原无抗补体作用,在冰箱(4℃ 左右)能保存一个月以上,便于运送。其缺点是不同的恙虫病立克次体株,在鸡胚中繁殖的适应能力不同,需多次传代。因此当比较各株的抗原性,进行交互补体结合试验时,要使多株立克次体同时适应于鸡胚是较困难的。

我们将 Bengtson 制备抗原的方法,省略了用硫柳汞处理,不但缩短了制备时间,简化了手续,同时提高了抗原效价。这可能由于恙虫病立克次体较脆弱,低浓度的硫柳汞、福马林等,也能部分破坏其抗原性。但用此种未加任何防腐剂的抗原接种于小白鼠腹腔,每只 0.5 毫升,结果动物不发病,说明这种抗原可能已失去对小白鼠的致病能力。

(二) 兔睾丸单层细胞组织培养抗原

共制备 66 批组织培养抗原,以 8 单位免疫血清进行滴定,结果如下:

1. 抗原效价

最高可达 1:64,在 1:8 以上的占 42.4% (28/66), 1:4 以下共 21 批。其中立克次体生长不够丰富的 8 批(达不到“++”,即立克次体很易找到,但量不够丰富)。做抗原时细胞片已全部脱落者 5 批。这些细胞中的立克次体可能已经死亡,抗原性受到影响。若将这 13 批除外,抗原效价 1:4 以下者只有 8 批。

2. 抗原效价与立克次体繁殖量的关系

涂片量达“+++”时(细胞内外有无数立

克次体),除了细胞片已脱落者外,抗原效价均在 1:16 以上。若涂片立克次体量为“++”-“+++”(每视野有不少细胞内外立克次体,但排列较稀疏),抗原效价一般可达 1:8 以上。

3. 抗原的保存时间

共试验 6 批,其中 3 批在冰箱保存 2

—11 个月,效价不变,也未产生抗补体反应。另 3 批同样保存在冰箱一个半至三个月,抗原效价降低 2—4 倍。

4. 应用组织培养抗原比较自不同来源(病人、野兔、恙螨)及不同年份分离的恙虫病立克次体株的抗原性,结果见表 5。实验结果说明单层细胞组织培养抗原除基本

表 5 恙虫病立克次体交互补体结合试验

抗体	抗原	血 清 稀 释											
		早 期 血 清						晚 期 血 清					
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
恙	恙 63-1 49	4	4	4	4	—	—	4	4	4	4	4	4
		4	4	4	4	—	—	4	4	4	士	—	—
		4	4	3	—	—	—	4	4	4	—	—	—
何	恙	0	4	4	4	3	3	0	4	4	4	3	士
		0	4	4	4	4	3	0	4	4	4	4	3
	何	0	—	—	—	—	—	0	3	3	1	1	—
		0	4	4	3	士	—	0	4	4	2	—	—
	63-1	0	4	4	2	1	—	0	4	3	—	—	—
		士	士	—	—	—	—	0	4	4	3	2	—
63-1	恙							0	4	4	4	4	3
								0	4	4	4	4	4
	何							0	4	4	4	4	3
								0	4	4	4	3	2
	63-1							0	4	4	4	2	—
								0	4	4	4	4	4

注: 1.菌株来源见[24]。2.早期血清: 免疫后 20—30 天内采血。晚期血清: 免疫后两个月采血。3.何及 63-1 各免疫 2 只兔。4.0 为该稀释度未做。

上具备鸡胚卵黄囊膜抗原的优点外,还有:

- (1)在制备立克次体原材料时,组织培养中的立克次体,在感染后第一代即能大量繁殖,而不像鸡胚那样需反复传代。(2)抗原产量大,一般一只兔的两侧睾丸可接种 20—30 瓶细胞。若感染后 42.4% 抗原效价在 1:8 以上,则一只兔可制 30—50 毫升 4 个单位的抗原,供 40—70 人份的血清学检查。(3)抗原制法简单,无抗补体及非特异性反应。(4)这种抗原具一定的稳定性,在

冰箱可储存一定时间,便于运送。

据不少学者报道,不同的恙虫病立克次体株间抗原性有差异^[1,25,26—32],因此研究各地区恙虫病立克次体的抗原性,无论对选择疫苗株或诊断用的抗原株均有实际意义。我国仅于、黄氏^[33,34]曾用交互免疫试验,分析福建各地及浙江、广东的立克次体株,证明株间抗原性无明显差别。我们以组织培养抗原,用交互补体结合试验法初步分析自广州恙虫、鼠、病人等不同来源获

得的恙虫病立克次体株间抗原性,初步证明我们试用的几株立克次体,虽然抗原性不完全相同,但具有较明显的交叉反应,而且早期血清(注射后20—30日间采血)也有交叉,未发现早期株有较显著的特异性。因此,若抗原性交叉仅出现于晚期血清,将给临床检验选择制抗原的菌株时带来困难。

比较了两种制备免疫血清的方法,并观察了自豚鼠及兔体内抗体产生的规律,结果见图1。

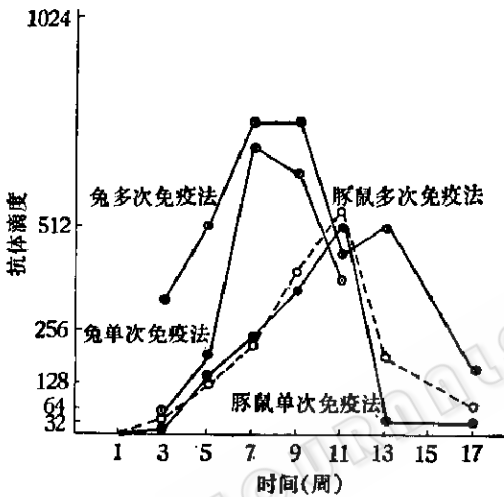


图1 豚鼠及兔产生恙虫病立克次体补体结合抗体的规律

豚鼠应用单次注射免疫法与多次注射免疫法,补体结合抗体的水平相差不远,在9—11周达高峰,但多次注射法抗体维持稍长。兔的免疫血清则抗体高峰出现较早(在第7周),同时维持抗体高水平的时间较长(7—13周)。多次注射免疫法抗体出现更早。兔血清产量大,但往往出现抗补体,因此在实践上,较常采用豚鼠单次注射免疫法。注射抗原后9—11周采血,可获高价不具抗补体的免疫血清。

参考文献

- [1] Bengtson, I. A.: *Pub. Health Rep.*, 60: 1483, 1945.
- [2] Bengtson, I. A.: *Pub. Health Rep.*, 61: 895, 1946.
- [3] Bengtson, I. A.: *Pub. Health Rep.*, 61: 1403, 1946.
- [4] Wolfe, D. M.: *J. Bact.*, 51: 247, 1946.
- [5] Topping, N. H.: *Pub. Health Rep.*, 61: 701, 1946.
- [6] Bailey, C. A. et al.: *J. Imm.*, 60: 431, 1949.
- [7] 穴戸亮: ウイルス, 11: 246, 1961.
- [8] 小林譲: ウイルス, 13: 54, 1963.
- [9] 川村明义: 医学中央雑誌, 148, 966, 1959.
- [10] Forrest, F. et al.: *Lancet*, 2: 729, 1945.
- [11] Joseph, E. S.: *J. Exp. Med.*, 83: 133, 1946.
- [12] 川村明义: 日本细菌学雑誌, 16: 752, 1961.
- [13] 赵树萱: 中山医报, 7: 1, 1952.
- [14] 川島丰作: 日本细菌学雑誌, 16: 408, 1961.
- [15] 陈一德: 中华医学杂志, 44: 260, 1958.
- [16] 河野二郎: 医学中央雑誌, 144: 516, 1959.
- [17] 西本恵治: 医学中央雑誌, 143: 324, 1959.
- [18] 大西譲: 医学中央雑誌, 143: 324, 1959.
- [19] 高树正浩: 冈山医学会雑誌, 72: 79, 1959.
- [20] Jiro, Mino (三野二郎): 冈山医学会雑誌, 71: 6025, 1959.
- [21] 周炯勋等: 恙虫与恙虫病研究, 中山医学院科学论文集, 第四辑第581页。
- [22] Yuzuru Kobayashi et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18: 942, 1969.
- [23] Yuzuru Kobayashi and Nobuyoshi Tachibana: *J. Imm.*, 95: 412, 1965.
- [24] 冯慧敏等: 微生物学报, 9: 280, 1963.
- [25] Bengtson, I. A.: *Pub. Health Rep.*, 61: 887, 1946.
- [26] Bell, E. J. et al.: *PSEBM*, 62: 133, 1946.
- [27] Smadel, J. E.: *PSEBM*, 62: 138, 1946.
- [28] Fred L. Rights and J. E. Smadel: *J. Exp. Med.*, 87: 339, 1948.
- [29] Byron, L. B. et al.: *J. Imm.*, 62: 453, 1949.
- [30] Kalra, S. L.: *Trop. Dis. Bull.*, 57: 234, 1960.
- [31] Lewthwaite, R. and S. R. Savor: *British J. Exp. Path.*, 21: 117, 1940.
- [32] 高桥秀: 医学中央雑誌, 143: 325, 1959.
- [33] 于恩庶、黄育默: 中华寄生虫传染病杂志, 2: 100, 1958.
- [34] 于恩庶等: 微生物学报, 7: 189, 1959.

PREPARATION OF COMPLEMENT FIXATION ANTIGENS FROM *RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI*

Feng Hui-min, Cai Meng-yu, Zhong Zhi-ying, Bai Shi-en

(Department of Microbiology, Chungshan Medical College, Guangzhou)

Methods for preparing the complement-fixation antigens from tissue cultures were presented. Factors which influenced the titres of yolk sac membrane antigen were also investigated.

Large amount of antigen could be easily prepared from infected yolk sac without non-specific reaction. However, the sensitivity of yolk sac antigen for each strain of *R. tsutsugamushi* varied to some extent, and it was difficult to obtain good yield from all the adapted strains of

R. tsutsugamushi. Since *R. tsutsugamushi* multiplied very well in the tissue cultures, we could usually obtain luxuriant growth even in the first passage. Because of the ease to prepare antigen from tissue culture of any strain of *R. tsutsugamushi*, we considered it was of advantage in the preparation of antigens from several separate strains for cross-fixation tests as well as for clinical laboratory diagnosis of the disease.