

钩端螺旋体感染早期出现的免疫细胞粘着现象

于恩庶 陈贻簪

(福建省流行病学研究所,福州)

本文报道家兔皮下接种钩端螺旋体后的免疫细胞粘着现象 (Immunocytoadherence ICA)。感染钩端螺旋体的家兔血液淋巴细胞用波摩那型抗原包被的绵羊红细胞进行 ICA 检测,发现结合抗原的细胞的增加先于特异性抗体的出现,并伴随着最初的抗体反应。大肠杆菌和鼠疫杆菌感染的家兔淋巴细胞并不出现钩端螺旋体免疫细胞粘着现象,而不同血清型钩端螺旋体间存在交叉反应,说明此现象具有属的特异性,因此 ICA 试验可望作为观察本病早期免疫反应和早期诊断的一种方法。

近年来在细胞水平上研究机体抗感染的细胞免疫反应时发现,在感染的早期,细胞表面产生特异的膜免疫球蛋白 (M-Ig) 具有细胞抗体的性质,能够特异地结合相应的抗原,即所谓免疫细胞粘着 (ICA)。这种免疫活性细胞称为玫瑰花瓣形成细胞 (Rosetteforming cells, RFC),它比体液抗体产生早,在传染病和寄生虫病方面,如乙型肝炎⁽¹⁾和弓形体病⁽²⁾等,已经得到证实。

本文研究钩端螺旋体感染早期,特异的玫瑰花瓣形成细胞产生情况,并探讨 ICA 作为早期诊断的问题。

材料与方 法

(一) 动物感染

1. 健康家兔 6 只,体重 1500—2500g 每只皮下接种生长良好的波摩那型钩端螺旋体标准株 (编号 56608) 0.5ml,菌液预先经 10^{-2} 稀释。另取健康家兔 3 只,每只皮下注射柯氏培养基 0.5ml,作为对照。在接种前和接种后 2 天起,每隔 4 天采家兔心血一次,进行 ICA 试验,直至接种后 22 天。

2. 为了观察钩端螺旋体菌型间的交叉情况,取生长良好的黄疸出血型毒株 (编号 829) 和秋季型毒株 (编号黄良友) 各接种 1—2 只健康家兔,每只皮下注射 10^{-2} 稀释的菌液 0.5ml。于感染后 4

天采家兔心血分离淋巴细胞,进行 ICA 试验。

3. 有关钩端螺旋体 ICA 现象特异性问题,用大肠杆菌和 EV 株鼠疫杆菌 1.0ml 活菌液 (约 10^{10} 亿条菌数) 分别皮下感染 2 只家兔,4 天和 8 天后进行 ICA 试验。

(二) 抗原包被

抗原包被过程参照钩端螺旋体间接血球凝集试验绵羊红细胞 (SRBC) 致敏的方法,仅最后一步将抗原包被的 SRBC 悬浮在含 10% 小牛血清的 199 液中,使成 $0.5—1.0 \times 10^8$ SRBC/ml 的浓度。小牛血清先用 56°C 30 分钟水浴灭活,并经正常 SRBC 和兔红细胞吸收。我们系采用本所自制的波摩那型抗原包被的 SRBC 进行 ICA 试验。

(三) 淋巴细胞的分离

5ml 肝素抗凝血和 1.7ml 3% 明胶混匀,置 37°C 培养 20—30 分钟,吸取富含淋巴细胞的上层液,经离心后用蒸馏水破坏残余的红细胞,即刻用 1.7% NaCl 液恢复等渗。细胞用 199 液洗 2—3 次后,置 37°C 30 分钟,使巨噬细胞附着于试管壁,达到清除的目的。分离的淋巴细胞最后用含 10% 小牛血清的 199 液配成 10^7 细胞/ml 浓度。

(四) ICA 试验

1. 0.25ml 兔淋巴细胞悬液和等量抗原包被的 SRBC 悬液及 0.5ml 含 10% 小牛血清的 199 液混匀后,试管置 37°C 水浴 5 分钟。

本文于 1980 年 11 月 8 日收到。

2. 低速 (100g) 离心 3—5 分钟, 沉淀物保持在 4℃ 2—4 小时。

3. 弃大部上清液后, 轻轻摇动试管, 使沉淀物再混匀, 缓慢加入冷的新配制的 0.8% 戊二醛液中, 在冰水中放置 20 分钟, 使已形成的玫瑰花瓣固定。

4. 加 1—2 滴 1% 美蓝液, 使淋巴细胞着色, 计算试管中淋巴细胞浓度和 0.01ml 混合液中 RFC 的数量, 求其 RFC 的百分率。凡一个淋巴细胞结合 5 个以上包被抗原的 SRBC 者为 RFC。

(五) 钩端螺旋体显微镜凝集试验

每次采家兔心血分离淋巴细胞过程所获得的血浆明胶混合液置 4℃ 保存, 统一进行钩端螺旋体显凝试验, 定量测定抗体效价。

实验结果

(一) 正常家兔心血淋巴细胞 ICA 试验

6 只实验兔感染前和 3 只对照兔历次心血淋巴细胞 ICA 试验, 结果每 10⁴ 淋巴细胞 RFC 数目为 0—5.67 个, 平均为 3.15, 95% 正常值范围为 0.06—6.24RFC/10⁴ 淋

巴细胞, 见表 1。

(二) 感染波摩那型钩端螺旋体家兔 ICA 试验

6 只家兔人工感染波摩那型活菌, 于感染后 2 天, RFC 数目开始增加, 范围 8.25—14.90 RFC/10⁴ 淋巴细胞, 平均达 11.14 RFC/10⁴, 比同时测定的对照兔为高 (其平均值为 4.35/10⁴)。以后继续增加, 于感染后 10 天达到高峰, 为 20.00—55.38 RFC/10⁴, 平均达 38.71 RFC/10⁴。感染后 14 天 RFC 数目开始下降, 平均值达 16.59 RFC/10⁴, 仍比对照 (2.18 RFC/10⁴) 为高。从感染后 18 天起, 有 5 只家兔 ICA 试验结果与对照无差别, 但 5 号家兔到感染后 24 天 (观察期) RFC 数目尚比对照高, 超过 10 RFC/10⁴, 见表 1 和图 1。

(三) 感染波摩那型钩端螺旋体家兔显凝试验

6 只感染兔的血清, 用波摩那型菌液进行定量显微镜凝集试验, 感染前和感染后 2 天, 显凝抗体显示阴性。感染后 6 天

表 1 感染波摩那型钩端螺旋体家兔 ICA 试验

Table 1 ICA Test in Rabbits Infected Subcutaneously with *L. pomona*

| 分组 Group | 性别 Sex | RFC/10 ⁴ 淋巴细胞 Lymphocytes | | | | | | |
|----------------------|-----------|--------------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 感染前 Prior to infection | 感染后天数 Days after infection | | | | | |
| | | | 2 | 6 | 10 | 14 | 18 | 22 |
| 感染兔 Infected rabbits | | | | | | | | |
| 1 | ♀ | 0 | 8.25 | 30.19 | 41.10 | 9.32 | 3.70 | 5.56 |
| 2 | ♂ | 1.60 | 13.33 | 32.70 | 33.33 | 22.13 | 0.91 | 4.44 |
| 3 | ♀ | 2.11 | 10.50 | 31.96 | 36.13 | 1.83 | 3.80 | 1.05 |
| 4 | ♂ | 4.48 | 9.18 | 15.50 | 20.00 | 22.50 | 3.80 | 3.80 |
| 5 | ♂ | 4.00 | 10.67 | 42.22 | 55.38 | 22.33 | 13.82 | 12.37 |
| 6 | ♀ | 2.30 | 14.90 | 25.40 | 46.29 | 21.43 | 4.73 | 2.61 |
| ̄ | | 2.42 | 11.14 | 29.66 | 38.71 | 16.59 | 5.13 | 4.97 |
| 对照兔 Control rabbits | | | | | | | | |
| 1 | ♂ | 2.24 | 3.27 | 4.17 | 3.16 | 2.27 | 2.16 | 3.46 |
| 2 | ♀ | 1.87 | 5.56 | 3.08 | 4.41 | 0.53 | 2.17 | 0.65 |
| 3 | ♀ | 5.00 | 4.22 | 5.67 | 4.94 | 3.74 | 3.80 | 4.24 |
| ̄ | | 3.04 | 4.35 | 4.34 | 4.17 | 2.18 | 2.71 | 2.78 |

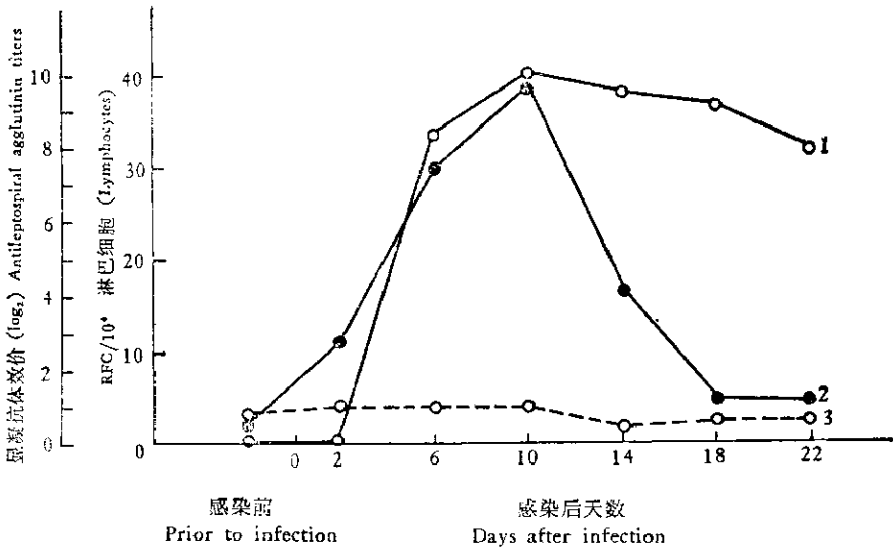


图 1 感染波摩那型钩端螺旋体家兔 ICA 和显凝试验结果

Fig. Cellular and humoral responses of rabbits infected subcutaneously with *L. pomona*

- 1. 感染兔抗体效价 Antibody titers in infected rabbits
- 2. 感染兔 RFC RFC in infected rabbits
- 3. 对照兔 RFC RFC in control rabbits

表 2 感染波摩那型钩端螺旋体家兔显凝试验

Table 2 Antileptospiral Agglutinin Titers in Rabbits infected Subcutaneously with *L. pomona*

| 分 组 Group | 抗体效价 Antibody titers | | | | | | |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 感染前 Prior to infection | 感染后天数 Days after infection | | | | | |
| | | 2 | 6 | 10 | 14 | 18 | 22 |
| 感染兔 Infected rabbits | | | | | | | |
| 1 | — | — | 1:128 | 1:512 | 1:64 | 1:16 | 1:8 |
| 2 | — | — | 1:1024 | 1:2048 | 1:1024 | 1:512 | 1:256 |
| 3 | — | — | 1:32 | 1:2048 | 1:2048 | 1:8192 | 1:2048 |
| 4 | — | — | 1:512 | 1:512 | 1:1024 | 1:512 | 1:256 |
| 5 | — | — | 1:512 | 1:512 | 1:1024 | 1:2048 | 1:1024 |
| 6 | — | — | 1:1024 | 1:2048 | 1:1024 | 1:512 | 1:256 |
| \bar{X}_G | — | — | 1:322 | 1:1024 | 1:724 | 1:574 | 1:256 |
| 对照兔 Control rabbits | | | | | | | |
| 1 | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — |

显凝抗体全部阳转，其效价达 1:32—1:1024，几何平均值为 1:322。感染后 10 天达最高，几何平均值为 1:1024。以后缓慢下降，感染后 22 天，抗体仍维持在 1:256 的较高水平，见表 2 和图 1。

(四) 感染黄疸出血型和秋季型钩端螺旋体家兔 ICA 试验和显凝试验

1 只家兔感染黄疸出血型毒株后 4 天，用波摩那型抗原包被的 SRBC 进行 ICA 试验，RFC 达 $35.71/10^4$ 淋巴细胞，高于正常

表 3 异型钩端螺旋体感染家兔 ICA 试验

Table 3 ICA in Rabbits Infected with Different Serotypes of Leptospire

| 动物编号 No. of rabbits | 感染菌型 Infected serotypes | 淋巴细胞 RFC/10 ⁴ Lymphocytes | 血清抗体效价 Ab titers |
|------------------------|--|---|---------------------|
| 1 | 黄疸出血型 <i>L. icterohaemorrhagiae</i> | 35.71 | 1:4 |
| 2 | 秋季型 <i>L. autumnalis</i> | 55.81 | — |
| 3 | 秋季型 <i>L. autumnalis</i> | 92.98 | — |

家兔的 RFC 值。血清用黄疸出血型菌液进行显凝试验, 抗体效价很低, 仅 1:4。

另外 2 只家兔感染秋季型毒株后 4 天, 用波摩那型抗原包被的 SRBC 进行 ICA 试验, RFC 分别为 55.81/10⁴ 和 92.98/10⁴, 大大高于正常家兔的 RFC 值。血清用秋季型菌液进行显凝试验, 结果阴性, 见表 3。

(五) 钩端螺旋体 ICA 现象的特异性

感染大肠杆菌和鼠疫杆菌的家兔, 用波摩那型抗原包被的 SRBC 进行 ICA 试验, 感染后 4 天和 8 天并未见到 RFC 数目的增加, 始终低于 8.00/10⁴。同期感染波摩那型钩端螺旋体的家兔 RFC 数目分别达 11.83/10⁴ 和 19.61/10⁴, 显而易见, 钩

端螺旋体 ICA 现象与这些细菌感染没有交叉反应, 见表 4。

讨 论

感染波摩那型钩端螺旋体的家兔, 血清循环抗体于感染后 6 天开始出现, 感染后 22 天仍维持较高水平。而 ICA 试验于感染后 2 天就可见到 RFC 数目增多, 感染后 10 天达最高峰, 以后迅速下降, 感染后 18 天多数感染兔 RFC 数目与正常家兔没有差异。这些事实说明, ICA 现象是免疫反应的早期表现, 先于并伴随着最初的抗体反应。这是因为大部分 RFC 是 B 细胞, 而 B 细胞是抗体形成细胞的前身细胞^[3]。因此, ICA 现象是疾病早期的显著特点。

波摩那型、黄疸出血型和秋季型钩端

表 4 不同细菌感染的家兔钩端螺旋体 ICA 现象

Table 4 ICA in Rabbits Infected with Other Bacteria

| 感染菌 Infected bacteria | 动物编号 No. of rabbits | RFC/10 ⁴ 淋巴细胞 RFC/10 ⁴ Lymphocytes | | |
|-------------------------------|------------------------|--|----------------------------|-------|
| | | 感染前 Prior to infection | 感染后天数 Days after infection | |
| | | | 4 | 8 |
| 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | 1 | 4.60 | 1.63 | 7.83 |
| | 2 | 0.65 | 7.41 | 0 |
| 鼠疫杆菌 <i>Y. pestis</i> | 1 | 1.65 | 0 | 0 |
| | 2 | 0.97 | 0 | 0.72 |
| 波摩那型钩端螺旋体 <i>L. pomona</i> | 1 | 0 | 11.83 | 19.61 |
| 对 照 Control | 1 | 2.27 | 0 | 0.50 |

螺旋体感染的家兔用波摩那型抗原包被的SRBC进行ICA试验,都显示RFC数量的大量增加,说明钩端螺旋体感染的动物ICA存在型间交叉。但其他细菌如大肠杆菌和鼠疫杆菌感染的家兔的ICA试验则无此现象,显示RFC是特异的免疫活性细胞,对无关抗原不起反应,ICA现象具有属的特异性。这与钩端螺旋体间接血球凝集试验一致。因此只要用单型钩端螺旋体抗原包被的SRBC,就可对不同型别钩端螺旋体感染的机体进行ICA测定。

免疫反应时细胞间相互作用的研究已证明,抗体形成初期需要T细胞和B细胞的协同作用,后者进一步分化成抗体形成细胞。此外,巨噬细胞在免疫诱导中也有重要作用。在一定条件下,这些细胞都可以形成玫瑰花瓣^[4,5]。我们在分离淋巴细胞过程中,已将大部分巨噬细胞清除,因此由巨噬细胞引起的非淋巴系统的ICA可减到最低程度。这些就造成正常淋巴细胞也会出现非致敏性粘着,但RFC数目极少,即

所谓“本底”。我们测定正常家兔淋巴细胞钩端螺旋体的RFC数目平均为 $3.15/10^4$,其95%的正常值范围为 $0.06-6.24/10^4$ 。Maqliulo等人^[2]在人弓形体ICA研究时,以每 10^4 淋巴细胞RFC数目相等于或超过6个,作为判定弓形体病早期、活动期的标准。对于钩端螺旋体病,我们初步考虑以每 10^4 淋巴细胞RFC数目相等或超过8个作为早期诊断的标准。当然,这需要在人钩端螺旋体病上进行全面验证。

参 考 文 献

- [1] Maqliulo, E. et al.: VI International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, Warsaw, Preprints, Vol. II, 1974, 90—98.
- [2] ———: *Exper. Parasitology*, **39**: 143—149, 1976.
- [3] Julius, M H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 1934—1938, 1972.
- [4] Storb, U. et al.: *J. Immunol.*, **102**: 1474—1485, 1969.
- [5] Wilson, J. D. et al.: *J. Immunol.*, **1**: 501—503, 1971.

IMMUNOCYTOADHERENCE TEST OF *LEPTOSPIRA*

Yu Enshu Chen Yikai

(Fujian Research Institute of Epidemic Diseases, Fuzhou)

The rosetts-forming cell (RFC) response of rabbits immunized with *Leptospira pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. autumnalis* was studied by immunocytoadherence (ICA). Red blood cells coated with erythrocyte sensitized substrates (ESS) of *L. biflexa* were bound to surface receptors on lymphocytes appeared in peripheral blood of rabbits, a few days

after subcutaneous injection of living *L. interrogans*. RFC appeared before specific antibody, then decline in number, while the antibody response was maintaining on a high level. The applicability of this phenomenon to field of human Leptospirosis was discussed as a new diagnostic approach to the early diagnosis.