DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.01.018

技术与方法

梅毒螺旋体的间接免疫荧光染色法

唐书谦 叶庆俞 钟白玉 (第三军医大学西南医院皮肤科) 630038

梅毒的诊断主要是依据接触史、临床各期相应表现和血清学试验,病理学检查通常依据病变组织中血管内皮细胞增生、肿胀和血管周淋巴细胞与浆细胞浸润。在病变组织中查病原体,主要常用镀银染色法。本文用间接免疫荧光染色法(IIF 染色法)显示病理组织切片中的病原螺旋体,效果较好。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 10 例梅毒病人组织石蜡包埋保存标本,9 例为本科门诊或住院病例(其中 5 例病理及临床诊断为二期梅毒疹,3 例为二期梅毒疹扁平湿疣,1 例临床诊断为皮肤早发先天性梅毒)、1 例为重庆市第一人民医院皮肤科门诊病例(临床和病理诊断为二期梅毒疹)。发病部位:腹股沟、肛门旁、膝部、左小臂、小腿、腰部各一例,外阴部和腿部各 2 例。实验室诊断:6 例梅毒康、瓦氏反应强阳性,4 例不加热血清反应素(USR)法阳性,2 例临床涂片暗视野检查螺旋体阳性,1 例 Levaditi 组织块染色阳性。蜡块组织保存时间:最长 34 年,最短一年,平均为 15.1 年。

1.1.2 抗血清:冰冻干燥梅毒病人血清。来源于重庆医学检验试剂研究所。

1.1.3 荧光抗体:羊抗人 IgG 荧光抗体。来源于中国军事医学科学院流行病微生物研究所,批号:9108

1.1.4 Reiter 株螺旋体吸收液:来源于中国医学科学院性病皮肤病研究中心。

1.2 方法

1.2.1 IIF 染色法

1.2.1.1 石蜡切片脱蜡至蒸馏水。

1.2.1.2 胰蛋白酶消化(胰蛋白酶 0.1g、无水氯化钙 0.1g、蒸馏水 100ml,pH 7.8)置孵箱 37℃,30min。

1.2.1.3 水洗至 PBS 洗。

1.2.1.4 正常羊血清(1∶20 稀释)37℃孵育 20min,以滤纸吸去组织周围多余血清不洗。

1.2.1.5 加 Reiter 株螺旋体液吸收后的梅毒抗血清,37℃,30min。

1.2.1.6 PBS 洗 3 次,每次 5min

1.2.1.7 羊抗人 IgG 荧光抗体(1∶10)染色,置孵箱 37℃ 30min。

1.2.1.8 PBS 洗,同前。

1.2.1.9 蒸馏水速洗一次,风干。

1.2.1.10 缓冲甘油封片,荧光显微镜观片。

1.2.2 对照染色试验

1.2.2.1 阴性对照:用非梅毒病人血清代替冰冻干燥梅毒抗血清,其它步骤同前。

1.2.2.2 阳性对照:用同一组织标本以 Steiner 改良染色法,同时作对照染色。

1.2.3 观片标准

1.2.3.1 阳性:螺旋体可见荧光,呈明显螺旋形状,一般可见 2～3 个螺旋,少数可见 5 个螺旋者,菌体应粗细大小一致。

1.2.3.2 Steiner 改良法染色:菌体呈棕黑色,观片标准同前。

2 结果

IIF 染色法阳性率为 70%(7/10),菌体主要位于表皮细胞间,少数位于真皮浅层肉芽肿内,个别位于血管周。阴性对照染色:阴性。Steiner 染色:阳性率为 60%,菌体主要位于表皮细胞间,少数在真皮肉芽肿处。两种染色方法阳性结果比较无明显差异。

3 讨论

临床上梅毒螺旋体的实验室检查是诊断梅毒病人的重要手段,目前血清学检查梅毒螺旋体抗体方法主要可分为,非特异性的类脂质抗原试验和特异性密螺旋体抗原试验两大类。前者常用的是 USR,梅毒血清学诊断用快速血浆反应素(RPR)卡试验和梅毒血清学诊断用甲苯胺红不加热血清试验(TRUST),后者

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最常用的是荧光密螺旋体抗体吸收试验(FTA-ABS)及血凝试验(TPHA)。关于梅毒皮损组织切片中螺旋体染色主要用 Levaditi 氏镀银染色法,但时间长而且不甚稳定。其次是 Steiner 染色法。最近 Winsome Garrey,等又对 Steiner 染色法进行了改良。本文 IIF 染色是以组织中病原菌为抗原,以病人血清为抗体,并以 Reiter 非致病螺旋体吸收抗血清后再染色,较为特异。此染色法是根据 FTA-BAS 染色法的原理而用于组织切片染色的一种方法,特异性和敏感性均较一般镀银染色法可靠,方法简便易掌握。两法相比较:镀银染法不很稳也不可靠,技术上较难掌握,并均属非特异性染色,特别是菌体易与黑色素细胞的树枝状突起相混淆。荧光染色法并可测其抗体滴度。

有作者提到 IIF 染色法应冰冻切片,因此该法经胰酶消化这一步骤甚为重要,可增加染色的敏感度和明显减少切片的背景染色。如果表皮或结缔组织的非特异性荧光染色太强,可用 1/5000 Even 氏蓝水溶液稀释荧光抗体,亦可减少背景的非特异性染色。

关键词 梅毒螺旋体;荧光抗体技术

参考文献

1. Garvey W, Fathi A, Bigelow F. Modified Steiner for the Demonstration of Spirochetes. J Histotech, 1985;8:15~17
2. 叶干运 徐文严 邵长庚,等。性传播疾病。南京:江苏科学技术出版社,1988:3~19,168~174
3. Jules M, Elias MA, Claire Greene BS. Modified Steiner Method for the Demonstration of Spirochetes in Tissue. Am J Clin Pathol, 1979;71:109~111

(收稿:1992-05-25;修回:1992-07-05)

血浆复钙与加热法制备 ABO 定型试剂的实验比较

郭永芳 肖瑞卿 林武存 尹 芳 吴 毅 (第三军医大学西南医院输血科) 630038

将血浆转变成血清的方法有复钙和加入轻质高岭土两种,作者把"废血浆"采用 56℃加热 1 h,以去除纤维蛋白和灭活补体,所得血清与用复钙法制备的血清,在当日、4℃保存 2 周,-30℃保存 2 月,进行抗体效价、纤维蛋白原(Fib)含量比较,一共实验了 8 批,每批结果完全相同。现介绍如下:

1 材料和方法

1.1 血浆来源与要求

离心时因包装袋破损,临床因故未输完退回的,外观不溶血,无脂血,颜色呈淡黄色或稻草黄的 A、B、O 3 种血型血浆。要求血浆亲和力在 15 s 以内,抗-A(B)效价 64 以上。

1.2 制备方法

(1) 复钙法:按文献[1]制备。(2) 56℃加热法:① 血浆在 56℃水浴中放置 1 h。② 冷却后用 2000×g 离心 30min。分离上清液,纤维蛋白弃去。

1.3 复钙和 56℃加热法所得的每批血清,按 ABO 血清质量标准检测[2],合格后,留取标本进行当日、4℃保存 2 周,-30℃保存 2 月,血清抗-A(B)效价及 Fib 含量检测。

2 结果和讨论

我们用复钙和 56℃加热法制备了 8 批 ABO 定型血清。在制备过程中,每批血清均按上述两种方法分别进行,共制备 4980ml,其中 A 型 2395ml,B 型 1645ml,O 型 940ml。并对每批两种方法制备的血清抗体效价和 Fib 含量,在当日(室温)、4℃保存 2 周、-30℃保存 2 月进行比较,结果是效价完全一致,Fib 也均 <10mg/L。从 ABO 血清质量检测结果来看,在同一批血浆中,加钙和 56℃加热法制备的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net