DOI:10.16016/j.1000-5404.1980.03.007

从图2的结果可以看出，鼻病毒609株和R_{17}株的免疫血清与腺病毒A_3株抗原；以及腺病毒A_3株和A_{06}株的免疫血清与鼻病毒609株抗原之间存在着广泛的交叉反应，进一步证明了鼻病毒与腺病毒之间具有交叉抗原，尤其以鼻病毒609株与腺病毒A_3株之间更为明显。

小　结

通过鼻病毒与腺病毒之间的双向交叉补体结合试验，吸收试验和交叉抗原滴定法，证明了鼻病毒与腺病毒之间确实具有交叉抗原。

参 考 文 献

1．王守良等：三医大科技 3:5，1978

2．Melnick, J. L.: Progr. Med.Virol. 8:400, 1966

3．Vikhnovich, E. M. et. al: Mikrobiol. ZH. 38(1):66, 1978；引自 Excerpta Medica, Sec. 47, Vol. 6, No. 8, Abst. No. 2403, 1976

免疫电镜对实验感染小鼠体内Q热立克次体的检出

训练部　王守良　俞树荣　张桂香　向信礼

在我国，人群Q热的感染，并非罕见。目前Q热的临床诊断尚缺乏可靠指征，必须依赖实验室的方法，将病理标本通过实验动物以分离Q热病原体，或取病人恢复期血清进行血清学试验测定特异性抗体，方能作出可靠诊断。但无论是分离病原体或血清学诊断，均嫌手续麻烦，费时较长，尚难以满足临床诊断和流行病学调查之要求。

近年来用免疫电镜技术发现和鉴定病毒的报导日益增多①。为了寻求Q热的快速和敏感的实验诊断方法，我们对免疫电镜技术及其从实验动物中检出Q热立克次体，进行了初步研究，现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、免疫电镜凝集单位的测定

免疫电镜凝集单位是指电镜下抗原抗体凝集反应的程度。抗原抗体反应要求抗原与抗体之间比例合适，为了确定在电镜下形成抗原抗体复合物之合适比例，实验如下：

（一）抗原：Q热立克次体Henzerling株（Ⅰ相），感染鸡胚卵黄囊，反复用2%胰蛋白酶消化和乙醚提取的纯抗原。

（二）免疫血清：用Q热立克次体Henzerling株，按本室常规法制备的兔免疫血清，经补体结合试验滴定其效价为1:256（Ⅰ相）。

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

（三）单位滴定法：操作如下

1．取8×70mm小试管49支，排列成方阵，纵横各7排。

2．Q热立克次体免疫血清用PBS（pH7.0）稀释成1:4、1:8、1:16……1:256,每管0.1毫升，分别加入各排试管内，在第一排7管内的血清稀释度均为1:4，第二排均为1:8，依此类推。

3.Q热立克次体抗原稀释度与免疫血清的相同，每管0.1毫升,分别加入每行的各管内，在第一行7管内之抗原稀释度均为1:4，第二行均为1:8，依此类推。

4．振摇试管，使抗原抗体充分混合，置37℃水浴中作用30分钟。

5．各试管内分别加入PBS1毫升，然后经离心沉淀（1000转/分，10分钟），弃去上清液，剩余0.2毫升左右与沉淀物轻轻混合，此时切勿用力吹打。

6．用毛细滴管将各管沉淀物分别滴于复有福尔蒙沃（Formvar）膜的载网上，待干后用2％磷钨酸负染色，电镜观察。

7．对照实验是以pH7.0 PBS代替免疫血清，其余步骤同正式实验一样。

8．结果判定：根据电镜下立克次体凝集的程度，表示如下：

“卅”代表立克次体完全凝集，免疫复合物很大（数量在50个立克次体以上），基本上看不到单个立克次体存在。

“++”代表立克次体大多数凝集，免疫复合物较大（数量在25—50个立克次体），有少数立克次体散在。

“+”代表立克次体大多数凝集，免疫复合物较小（数量在25个立克次体以下）和较少，并有部分立克次体散在。

“-”代表未见立克次体凝集块（包括3个立克次体以下的凝集块）。

最高稀释度之免疫血清能与最高稀释度之抗原呈“++”以上凝集者，该血清的稀释度称之为1个电镜凝集单位。

二、脾标本的制备

Q热立克次体Henzerling株感染鸡胚卵黄囊1只，称重后加无菌肉汤研磨，配成1:10悬液，经离心沉淀（1500转/分，10分钟），弃去沉渣，悬液在接种前用肉汤稀释成最后浓度为0:2毫升内含100个MID_{50}。

取体重10—14克小白鼠，腹腔途径接种上述悬液，每只0.2毫升，接种后逐日任取动物4只，解剖取出脾脏，每只脾脏加pH7.0 PBS1毫升，在乳钵内研磨成悬液，用滴管将悬液移入离心管内，再加2％胰蛋白酶溶液1毫升，置40℃水浴中消化1小时左右，液体变为澄清为止，经离心沉淀（2000转/分，10分钟），除去沉渣，将上清液移入另一离心管内，加PBS 2毫升，经离心沉淀（5000—6000转/分，30分钟），沉淀物重复洗涤一次，倾去上清液（保留0.5毫升左右于管内），取此沉淀物悬液0.1毫升，加4个单位（0.1毫升内）免疫电镜凝集单位的Q热免疫血清，在37℃水浴作用30分钟后，加入PBS1毫升，又以1000转/分离心沉淀10分钟，弃去上清液，其余操作和结果判定同上6—8。

三、电镜

国产电镜D×A 4—10，观察和照相用75 KV加速电压，照相底片为国产红旗电子感光板。

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

实 验 结 果

一、适当凝集单位的选择

以2、4、8和16个免疫电镜凝集单位的抗体，分别与不同稀释度Q热立克次体抗原混合后，在电镜下观察免疫复合物的形成，结果如表1。

表1　　抗体凝集单位的确定

抗体浓度（凝集单位）	抗原不同稀释度 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
2单位	卅	卅	卅	卅	廾	廾	+
4单位	卅	卅	卅	廾	卅	廾	—
8单位	卅	卅	廾	廾	卅	—	—
16单位	卅	卅	廾	+	+	—	—

使用2个和4个免疫电镜凝集单位之抗体，与抗原的凝集效价达1:128，用8个单位的效价为1:64，用16个单位的效价只有1:16。由此可见，在形成免疫复合物过程中，抗体太多，凝集效价反而降低。在电镜下还可看到，抗体愈多者，形成的免疫复合物愈小。且可看到立克次体表面上絮状突起物（图2）。

二、免疫电镜检查法的敏感性

与补体结合试验和试管凝集试验进行比较，分别对同一份Q热立克次体抗原进行测定，结果见表2。

表2　　三种方法敏感性的比较

方法	抗原不同稀释度 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
免疫电镜法	卅	卅	卅	卅	廾	廾	—
补体结合试验	卅	卅	卅	卅	卅	廾	+
凝集试验	卅	卅	廾	+	—	—	—

免疫电镜法检出Q热立克次体的敏感性与补体结合试验差不多，效价均为1:128，试管凝集试验则不敏感，效价只有1:16。

三、感染小白鼠脾内Q热立克次体的检出

用100个MID剂量的Q热立克次体感染一批小白鼠，逐日随取4只动物杀死，将其脾脏制成标本，与4个免疫电镜凝集单位之抗体作用后，在电镜下观察免疫复合物的形成。

表3　　小白鼠脾内Q热立克次体的检出情况

实验次数	感染后天数 1	2	3	4	5	6	7
Ⅰ	0/4	3(+)/4	4(廾)/4	4(卅)/4	4(卅)/4	4(卅)/4	4(卅)/4
Ⅱ	0/4	4(+)/4	4(廾)/4	4(廾)/4	4(卅)/4	4(卅)/4	2(卅)/2
Ⅲ	0/4	3(+)4	4(卅)/4	4(卅)/4	4(卅)/4	4(卅)/4	3(卅)/3

注：分母代表例数；分子代表检出阳性例数；括号代表平均凝集程度。

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

在三次实验中，感染后第1天均检查不出立克次体，第2天多数动物检出，但数量较少（+～++），电镜下见到的免疫复合物也较少（图3），第3天以后全部动物均能检出，立克次体数量随着感染时间的延长而增多，一般在感染后第5—6天，立克次体繁殖达到高峰，在电镜下观察到形成的免疫复合物很大，有时多到铺满整个格网（图4）。

讨论和小结

从初步实验结果来看，应用已知抗体作免疫电镜检出标本内的抗原，是一个有希望应用于实际的方法。这种方法具有较高的敏感性和特异性，通过Q热立克次体抗原的检查，表明免疫电镜法的敏感性与补体结合试验的差不多，但它比补体结合试验操作简单，无抗补体现象，并在较短时间（3—4小时）内出结果。

在免疫电镜实验中，掌握抗体使用的适当浓度是很重要的。最好事先通过实验把它确定下来，抗体太少，固然不足以形成免疫复合物，而抗体太多，免疫复合物也可减少，凝集效价降低。Kapikian等② 在作鼻病毒的免疫电镜试验时，也观察到这种现象。为了确定Q热立克次体免疫电镜中使用合适的抗体浓度，曾试用免疫电镜凝集单位的测定，根据实验结果，用2—4个电镜凝集单位比较合适。由于动物脏器或其他现场标本中的Q热立克次体多为第Ⅰ相，因而试验时应注意应用含第Ⅰ相抗体的免疫血清。

Linde等③报告，使用胰蛋白酶消化感染鸡胚卵黄囊，使立克次体从组织内释放出来，借以制备抗原，对立克次体的抗原性并不影响，张帮燮等④用胰蛋白酶消化感染小白鼠脾脏，再用离心沉淀浓缩立克次体，可提高早期诊断的阳性率，据此我们曾用100个MID_{50}剂量的Q热立克次体感染小白鼠之后，取整个脾脏进行胰蛋白酶的消化，再作免疫电镜检查，证明感染后第2天在多数动物的脾脏中能够检出Q热立克次体，第3天全部动物能够检出。可以推测，如果利用免疫电镜技术检查乳（牛、羊乳）、水（羊水或屠宰场的污染水）和尿（病人尿或感染动物的尿）中的Q热立克次体，可能是更简便和适用的一个方法。

参考文献

1. Doane, F. W: Identification of Viruses by Immunoelectron Microscopy. PP. 237—255. In Viral Immunodiagnosis (E. Kurtak and R. Morisset), Academic Press, Inc, New York san Francissco London 1974。

2. Kapikian, A. Z. et al: J. Virol.10:142, 1972。

3. Linde, K. and H. Urbach: Acta Virol. 7:90, 1963。

4. 张帮燮等：第七军医大学论文汇集26:23, 1964。

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

免疫电镜对实验感染小鼠体内Q热立克次体的检出 （正文见第16页）

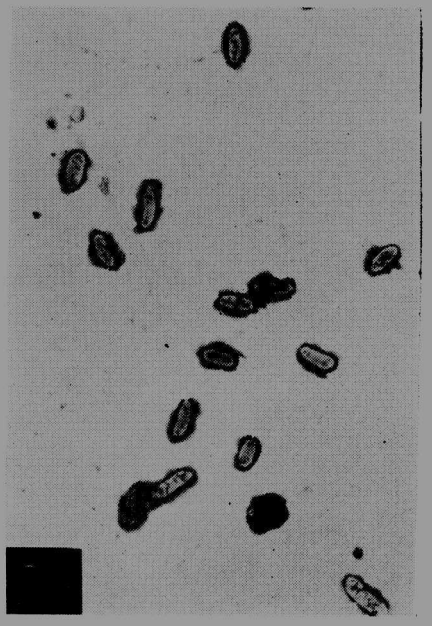


图1。 未加免疫血清对照，立克次体散在分布 ×4500



图2。 抗体过多，凝集块小，立克次体表面有絮状突起物 ×9500



图3。 感染后第2天小白鼠脾标本内立克次体凝集现象 ×7000

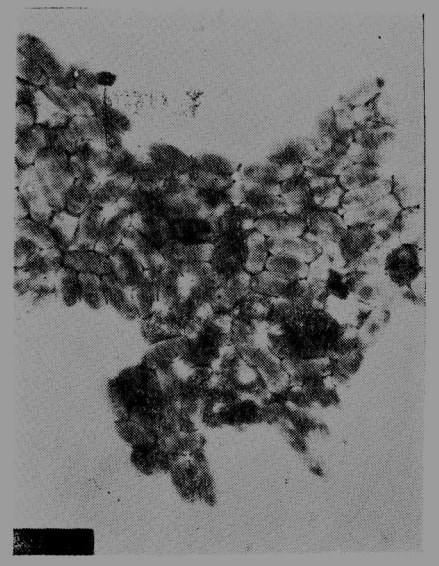


图4。 感染后第4天小白鼠脾标本内立克次体凝集现象 ×8000

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