

某些细菌荚膜的免疫染色反应

张生民 高其栋 李桂芝 高履之

(青海省畜牧兽医科学研究所, 西宁)

1902年 Neufeld 氏发现肺炎双球菌与相应的抗血清混合后, 荚膜发生肿胀现象, 利用这个现象观察抗原与抗体之间的反应, 叫荚膜肿胀反应^[1,2,3]。我们在细菌检验工作中, 又发现一些细菌的荚膜, 用相应的抗血清处理后, 能被某些染料染色。利用免疫与染色相结合的方法, 来观察抗原与抗体之间的反应, 叫免疫染色反应。此反应用于观察某些细菌荚膜形态、K 抗原的分类鉴定和这类菌的快速检验等, 均获得满意结果。

材料与 方法

一、供试菌株

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 3 株, 产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*) 14 株, 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 2 株, 肺炎双球菌

(*Diplococcus pneumoniae*)、羊链球菌 (*Streptococcus ovis*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、马流产沙门氏菌 (*Salmonella abortus-equi*)、多杀巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、羊布氏杆菌 (*Brucella melitensis*)、猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、假结核棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、大肠弧菌 (*Vibrio coli*)、无乳枝原体 (*Mycoplasma agalactiae*) 各一株。

二、抗血清的制备

取上述各种细菌分别制成菌悬液, 加甲醛溶液杀菌后, 给家兔多次静脉注射, 然后采血, 分离血清备用。

三、反应方法

(一) 制作涂片

用生理盐水将固体培养基上的细菌制成菌悬液,涂抹于载玻片上。肉汤培养物可直接涂片,动物组织亦可作涂片。涂片要薄而匀,以利抗体与细菌接触。

(二) 固定

甲醇固定 30 秒,或 10% 甲醛溶液固定 2—5 分钟,也可在火焰上稍加热固定。若涂抹物不易脱落亦可不固定。

(三) 免疫血清处理

用蜡笔在载玻片中间划一条线,分成两半,两边均涂抹被检细菌,一半加阳性血清,另一半加阴性血清。放 37℃ 温箱中 15—30 分钟(置密闭潮湿容器中,防止干燥)。处理后用蒸馏水洗去血清,最后用滤纸吸干。

(四) 染色

处理过的标本可用以下任一方法染色。

1. 甲基蓝铬酸染色法:取 1% 甲基蓝溶液滴于载玻片上,加 3% 铬酸溶液(用量为甲基蓝溶液的一半)混匀,染 1—3 分钟后,水洗,吸干,镜检。阳性反应者染为蓝色,阴性反应者不染色。甲基蓝可用水溶性亚尼林蓝、光绿、快绿代替。铬酸可用三酸液(5% 盐酸、5% 硝酸、5% 硫酸各一份混合)或 5% 草酸酒精液(用量比 1:6)代替。

2. 快绿碘液染色法:取 1% 快绿酒精溶液滴于载玻片上,1—3 分钟后加等量的革兰氏碘液混合,再染 3—5 分钟,水洗,吸干,镜检。阳性反应者染为绿色,阴性反应者不染色。

实 验 结 果

一、大肠埃希氏菌乳酸变种(*E. coli* var *acitilactici*)^[4] (简称乳酸大肠杆菌)的免疫染色反应

此菌有丰富的荚膜,用一般染色法染色时,仅菌体着色,呈杆状(图 1)。用上述方法染色后,阳性血清处理者菌体周围有很厚的一层荚膜被染色,菌体呈椭圆形(图 2)。阴性血清处理者作对照,荚膜不染色,菌体染色很浅。由于荚膜比较厚,在作凝集反应时,有 K 抗原的细菌

出现 O 抗原的不凝集现象,其原因是由于 K 抗原隔断了抗体与菌体之间的直接联系。

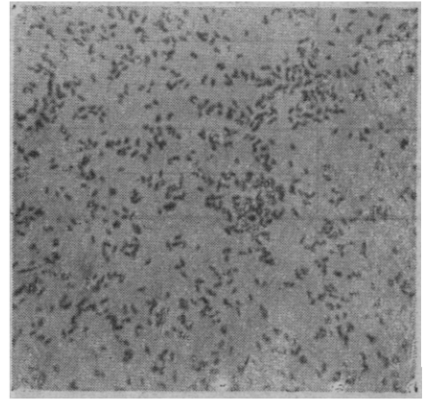


图 1 乳酸大肠杆菌(17号)琼脂斜面培养菌,1% 龙胆紫染色,菌体呈杆状。×1000。

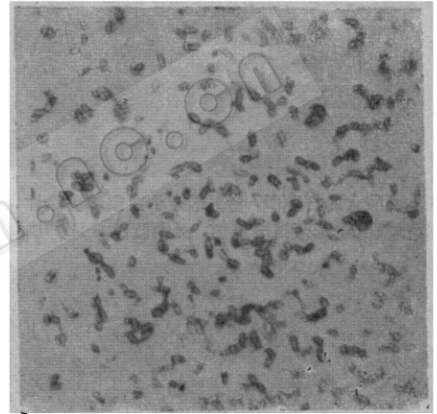


图 2 涂片同图 1,甲基蓝铬酸染色,菌体周围的荚膜染成蓝色,菌体不染色。×1000。

用乳酸大肠杆菌和那波里大肠杆菌(*E. coli* var. *neapolitana*)以及溶血性大肠杆菌各一株作交互免疫染色反应。结果与前者不发生反应,而与后二者能发生反应,说明该反应能用于有 K 抗原结构菌的鉴定。

小白鼠接种该菌死亡后,取其脾脏抹片,阳性血清处理者荚膜染色(图 3),阴性血清处理者对照,荚膜不染色,呈现空白区(图 4)。用自然发病而死亡的绵羊脏器涂片,染色效果与小白鼠相同。说明动物体内的细菌具有丰富荚膜,能够利用该方法进行快速检验。

免疫染色法的效果与血清效价有关,效价高者着色明显,作用时间也缩短,效价低者着色不明显。

表 1 用乳酸大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌比较平板凝集反应与免疫染色反应

菌 名	反应种类	血 清 稀 释 度						
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
乳酸大肠杆菌	平板凝集反应	+	+	±	-	-	-	-
	免疫染色反应	+	+	+	+	±	-	-
肺炎克雷伯氏菌	平板凝集反应	+	+	+	±	±	-	-
	免疫染色反应	+	+	+	+	+	+	-

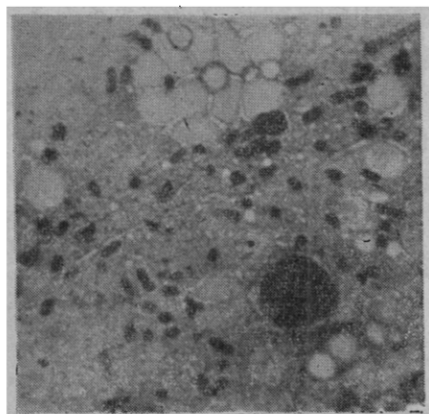


图 3 乳酸大肠杆菌(17号)感染小白鼠脾脏涂片,抗血清处理,甲基蓝铬酸染色,荚膜蓝色。×1000。



图 4 涂片同图 3,阴性血清处理,甲基蓝铬酸染色,荚膜不染色,菌体染色极淡。×1000。

比较免疫染色反应与平板凝集反应,证明两者有相关性(见表 1)。把抗血清稀释以后进行检验,结果稀释倍数低者染色深,稀释倍数高者染色浅或不被染色。

二、肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)的免疫染色反应

用一株未作检定的有 K 抗原结构的肺炎克

雷伯氏菌作试验,结果与乳酸大肠杆菌相同。

三、多杀巴氏杆菌(*P. multocida*)的免疫染色反应

取分离自黄牛的一株多杀巴氏杆菌作试验,结果荚膜染色非常清楚。用接种本菌而死的小白鼠脾脏作涂片,阳性血清处理者荚膜染色,对照则不染色(图 5、6)。

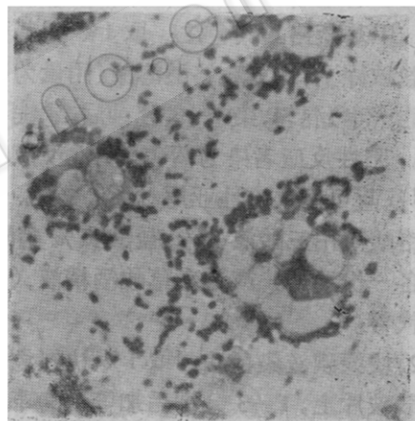


图 5 多杀巴氏杆菌(C54-2)人工感染小白鼠脾脏涂片,阳性血清处理,甲基蓝铬酸染色,荚膜蓝色。×1000。

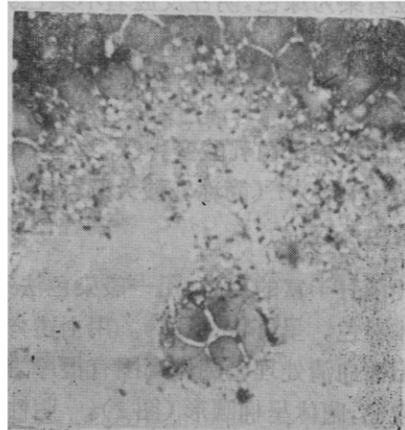


图 6 涂片同图 5,对照,荚膜不染色,菌体染色极淡,×1000。

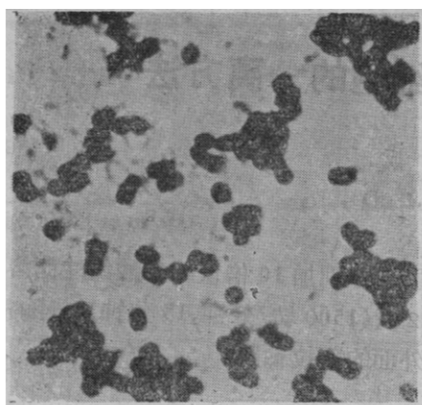


图7 产气荚膜杆菌C型,阳性血清处理,甲基蓝铬酸染色,丰富的荚膜染成蓝色。×1000。

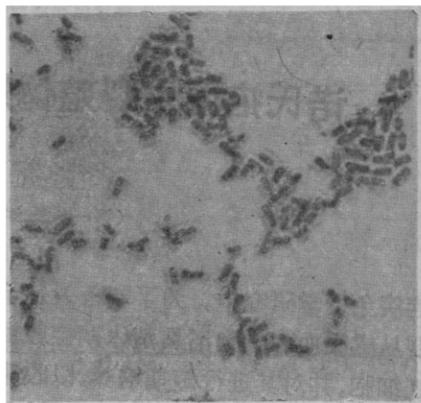


图8 涂片同图7,对照,荚膜阴影可见。×1000。

四、产气荚膜杆菌 (*Cl. perfringens*) 的免疫染色反应

用上述方法染色,荚膜着色很深,对照则不着色或仅有阴影可见(图7、8)。由于菌体着色很深故需与对照比较。

用26株产气荚膜杆菌B、C、D型细菌,取其中14株制成抗血清,与之进行交互染色反应,结果共出现11种不同的K抗原。证明此染色法能用于这类细菌的K抗原分类鉴定。

五、羊布氏杆菌 (*Br. melitensis*) 的免疫染色反应

用平板凝集价为1:20的抗血清作试验,作用一小时。用生理盐水缓冲液冲洗,再用等量的甲基蓝与铬酸液混合,染3分钟。结果阳性血清处理者菌体周围染成蓝色,菌体不着色;对照相反,菌体着色而周围不着色。用不呈现凝集反应和凝集反应效价极低的抗血清时,未获良好效果。

六、其他细菌

肺炎双球菌、羊链球菌、马流产沙门氏杆

菌、猪丹毒杆菌、炭疽杆菌、肉毒梭菌、假结核棒状杆菌、大肠弧菌、无乳枝原体,均未获得满意结果,其原因尚待研究。

讨论

1. 用一些化学试剂处理大肠杆菌的涂片,然后再用上述方法染色,很容易看出试剂对荚膜的影响,如强酸能破坏荚膜的抗原性,而双氧水则不破坏荚膜的抗原性,但有破坏抗体的作用。

2. 免疫染色反应的作用机制还不清楚。经一些试验证明,被染色的物质不是抗体球蛋白,而是荚膜与抗体结合后形成的一种具有染色特性的复合物。

参考文献

- [1] 翁心植等: 医学检验技术, 人民卫生出版社, 1962年, 第48页。
- [2] Mitruka, Brij M.: *Methods of Detection and Identification of Bacteria*, Cleveland, CRC, 1976, p. 23.
- [3] 天野恒久、小山次郎、山村雄一: 免疫, 共立出版株式会社, 1973, p. 63。
- [4] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. London, Bailliere, 1957, p. 338.