

间接荧光抗体法在快速检验上的应用

食品细菌荧光抗体技术协作组*

细菌快速检验的方法是日前食品卫生工作中迫切需解决的问题。近年来我们应用间接荧光抗体法(以下简称“荧光抗体法”)对食品中污染的致病菌进行检验,取得了一定进展,并应用于生产实践中。初步结果表明,荧光抗体法在某些食品细菌的快速检验方面比常规细菌培养方法具有特异性强、敏感性高、快速、工作效率高、节省人力物力等优点。现将方法介绍如下:

一、材料和方法

(一)采样方法

用无菌棉拭子涂污染样品表面采样供检。

(二)增菌液及分离培养基

增菌液: 亚硒酸盐煌绿增菌液

亚硒酸盐增菌培养基

分离培养基: 伊红-美蓝琼脂培养基

SS 琼脂培养基

去氧胆酸盐枸橼酸盐琼脂培养基

三糖铁琼脂斜面

双糖铁琼脂斜面

(三)沙门氏菌诊断血清

系北京生物制品所,成都生物制品所及中国医学科学院卫生研究所制备的免疫血清。

(四)荧光抗体

系中国医学科学院卫生研究所、天津卫生检疫所共同制备的以 FITC 标记的羊抗兔荧光血清(批号 I—II),工作浓度 1:3—4。

(五)沙门氏菌的检验方法

1. 将涂取后拭子,放入亚硒酸盐培养基或亚硒酸盐煌绿增菌液内(8—10 毫升)置 37℃ 温箱培养。

2. 取培养 18—24 小时菌液进行荧光抗体染色,并接种 2—3 种选择性平板(SS 琼脂、伊红-美蓝琼脂和去氧胆酸盐枸橼酸盐琼脂平板)。

3. 记录荧光试验结果,并从选择性平板内挑取可疑菌落接种至双糖铁或三糖铁培养基内放 37℃ 温箱培养 12—18 小时。

4. 选取双糖铁可疑管,用“A-E-O”或“A-F-O”沙门氏菌混合血清及单价血清分别进行凝集试验,最后把分得的沙门氏菌鉴定到群,同时进行生化试验。

(六)荧光抗体间接染色方法

标本→涂片(室温干燥)→固定(标本固定液固定 15 分钟以上)→浸泡(95% 乙醇 1—2 分钟,取出干燥)→加“A-F-O”沙门氏菌多价诊断血清一滴(诊断血清效价不得低于 1:160)置保湿的容器中,于 37℃ 保温 30 分钟→用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液充分冲洗去诊断血清,置室温或温箱内干燥→加荧光抗体液一滴,仍置保湿的容器中,于 37℃ 保温 30 分钟→用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液充分冲洗去荧光抗体液→将玻片置盛有 pH 9.2 碳酸盐缓冲液的染色缸内浸泡,不得超过 3 分钟→再转入另一盛有 pH 9.2 碳酸盐缓冲液的染色缸内浸泡不超过 3 分钟→在蒸馏水中浸泡 1 分钟→将蒸馏水弃去,加入 95% 乙醇浸泡 1 分钟→取出干燥→立即用 pH 9.2 碳酸盐甘油缓冲液封片,放冷暗处待镜检。

(七)荧光结果判定标准

1. 在荧光显微镜观察下,根据菌形清晰度和亮环的荧光强度,进行判定标准如下:

菌形很清晰,菌体中部发暗,仅细胞壁发明亮,黄绿色荧光者(+++);菌形清晰,亮环显著,亮度较弱者(++);菌形及亮环能辨认清楚,亮度差者(++);菌形似见非见,亮环不显著,荧光微弱者(+);镜下无所见者(-)。呈现(++以上者,即判定为荧光阳性,呈(+)者需进行复验。

2. 如为增菌样品,除上述判定标准外,并需考虑菌量的多少,其判定标准如下:

菌量很多,每个视野都充满了所观察的细菌者

* 食品细菌荧光抗体技术协作组(中国医学科学院卫生研究所食品卫生研究室、天津卫生检疫所、天津市卫生防疫站、天津商品检验局、天津市食品一厂、呼和浩特商品检验局、沈阳市卫生防疫站、北京市食品公司、北京市食品研究所)。

(+++); 菌量较多, 每个视野能见到几十个以上的细菌者(++); 在多数视野中, 能见到10个以下细菌者(+); 在不少于10个视野中, 能见到1—2个细菌者(±); 镜下无所见, 或其它非典型细菌者(-)。呈现(+++)以上的, 即判定为增菌后菌量阳性。呈现(+)或(±)者需复验。

如果进行增菌后的荧光抗体染色, 宜分别记录荧光强度和菌量的结果。

二、实验结果

1. 荧光抗体法检查污染样品的结果: 按前述方法对800份污染样品进行沙门氏菌检查, 荧光抗体法之检出率为86.6%, 培养法为85%, 荧光抗体法高1.6%, 见表1。

表1 对污染样品进行沙门氏菌检查结果

检查方法	检查样品数	阳性结果数	阳性率(%)
荧光抗体法	800	693	86.6
培养法	800	680	85.0

2. 荧光抗体与培养法检查结果的比较: 根据检查结果, 进一步分析荧光抗体法与培养法二者之符合率达97.9%(见表2、表3)。

表2 荧光抗体与培养法检查污染样品沙门氏菌的结果

		荧光抗体法	
		阳性	阴性
培养法	阳性	678(84.8%)	2(0.2%)
	阴性	15(1.9%)	105(13.1%)

注: 1. 样品总数为800份。
2. 两法符合率=97.9%。

三、讨论

1. 从用两种方法检查800份污染样品的结果来看, 培养法的阳性率为85.0%, 荧光抗体法为86.6%, 二法之符合率(阳性及阴性结果)高达97.9%。从五个不同实验室的结果看, 其符合率大部在99%左右, 说明荧光抗体法不仅具有一定的可靠性, 且有一定的实

际应用价值。

2. 从荧光抗体法与培养法不符合情况进行分析, 不外乎出现两种情况, 即荧光阴性培养阳性或相反, 从前者情况来看, 染色操作可直接影响检查结果的准确性, 我们在实验开始时, 曾对10份荧光反应不清晰, 亮度较弱, 不能判为阴阳性的标本, 经改进固定及染色方法后, 其中9份都呈现阳性, 且有5份荧光亮度较强。实践证明采用乙醇-氯仿-甲醛(60:30:10)固定液固定, 固定时间必须延长至10—15分钟, 或先通过火焰固定后再以固定液固定10分钟, 始能获得较好的效果。

从后者情况来分析培养法的各项操作往往是导致两种方法不符合的重要因素, 实验中曾对荧光法(+)培养法(-)的结果, 经反复增菌及挑菌后获得阳性结果者共23份, 这说明荧光抗体法比培养法灵敏度高。

增菌培养液的种类和成份, 对培养法和荧光抗体法的结果也有一定影响, 用四硫磺酸盐肉汤增菌, 不仅影响荧光亮度, 且沙门氏菌的检出率也不够理想, 用亚硝酸盐煌绿肉汤增菌时, 培养基中含有牛磺胆酸钠及甘露醇与不含此二成份者对比, 似以不含此二成份者之荧光亮度较好, 背景较清晰, 二者之检出率是否有差异尚需今后进一步探讨。

所用分离培养基的差别对培养法有一定影响。实验中, 当同样采用亚硝酸盐煌绿增菌培养基后, 再分别采用不同分离培养基时, 发现以SS培养基检出率最高, 达70.9%。伊红-美蓝琼脂培养基次之, 为64.2%, 去氧胆酸盐枸橼酸琼脂培养基较差, 仅59.4%。因而也可能影响培养法与荧光抗体法的符合率。

由于各实验室所用增菌培养液, 分离培养基等不一致, 操作技术也有差别, 加以未作复查工作, 以致影响了培养的阳性率, 降低了两者的符合率, 从1000份左右样品的结果看。符合率仅为80—90%左右。

3. 所用沙门氏菌诊断血清对间接荧光抗体法检查结果的影响并不明显, 本实验中由于实验室及地区的不同, 所采用沙门氏菌诊断血清亦各不相同, 但从实验结果来看, 并无明显差别。沙门氏菌多价诊断血清组合方法的改进, 将进一步扩大荧光抗体法的应用范围和使用价值。

表3 不同实验室用荧光抗体法与培养法检查污染样品沙门氏菌情况

实验单位	检查样品总数	两法符合数			两法不符合数		
		阳性	阴性	符合率(%)	荧光(+)培养(-)	荧光(-)培养(+)	不符合率%
沈阳市卫生防疫站	102	85	16	99.0	0	1	0.1
天津市卫生防疫站、天津卫生检疫所	112	86	25	99.1	0	1	0.9
中国医学科学院卫生研究所	186	135	42	95.1	9	0	4.9
呼和浩特商品检验局	100	78	19	97.0	3	0	3.0
天津商品检验局	300	294	3	99.0	3	0	1.0
总计	800	678	105	97.9	15	2	2.1