

A型肉毒毒素血清学诊检的研究

马清钧 刘桂芝 王兴娟 刘传喧

(中国人民解放军 89943 部队)

应用肉毒毒素血清学诊检和分析肉毒毒素的方法,早已引起人们的注意。目前文献中介绍的血清学诊检肉毒毒素较好的方法有:(1)免疫电泳扩散法:可在两小时内检出14—50个小鼠 LD_{50} 的A型肉毒毒素^[1]。(2)间接血凝和血凝抑制试验:在4—18小时内,血凝试验可检出小于1个小鼠 LD_{50} 的A型肉毒毒素,血凝抑制试验可检出43个小鼠 LD_{50} 的毒素^[2-11]。(3)放射免疫法:在两小时内可检出400至3,000个小鼠 MLD 的毒素^[12]。

为了摸索特异、快速、简便的血清学诊检和分析肉毒毒素的方法,我们研究了间接血凝和对流免疫电泳诊断法,结果表明两种方法均能达到较满意的效果。

材料和方法

一、材料

(一)肉毒毒素

1. 培养原液: A型肉毒杆菌 61A01-188 菌

株,于5%玉米浆培养基中37℃培养5天的培养物即培养原液,毒力效价为 $1.5-2 \times 10^6$ 小鼠 LD_{50} /毫升。

2. 半纯毒素: 培养原液经酸沉淀和离子交换纤维素层析提纯所得制品即半纯毒素,毒力效价为 2×10^8 小鼠 LD_{50} /毫升,半纯毒素于琼脂扩散试验中,对抗A型肉毒毒素血清呈现三条沉淀线。

3. 纯毒素: 半纯毒素经 DEAE 纤维素柱层析进一步分离所得的毒素即纯毒素,毒力效价为 1.8×10^8 小鼠 LD_{50} /毫升,纯度为 10×10^8 小鼠 LD_{50} /毫克氮。纯毒素于琼脂扩散试验中对抗A型毒素血清呈现1—2条沉淀线。

(二)抗A型肉毒毒素血清

1. 粗制马血清: 效价为1,500单位/毫升,兰州生物制品研究所供给。

2. 精制马血清: 效价为10万单位/安瓿,兰州生物制品研究所供给。

3. 纯制兔血清: 将纯毒素经1.0—1.6%福

尔马林脱毒后,再以 Sephadex G-200 胶滤获纯抗原,加弗氏佐剂免疫家兔得单价特异性抗血清,效价为 800—5,000 单位/毫升,于琼脂扩散试验中对 A 型毒素原液呈现 1—2 条沉淀线。

二. 方法

(一)间接血凝试验

1. 血凝试验条件:

①血球悬液:采绵羊(或兔)血,与等量的 Alsever 氏液*混合,于 4℃ 保存,经离心沉淀,以生理盐水洗涤 5 次后,再以 pH7.0 生理盐水制成 50% 的悬液。

②稀释液:1% 正常兔血清生理盐水。

③致敏红血球:稀释液稀释的抗血清或毒素抗原 3.2 毫升,加 0.1 毫升 50% 血球悬液及 0.1 毫升 0.25M 戊二醛溶液,充分混合后置室温 30 分钟,离心后用 4—5 毫升稀释液清洗沉淀血球二次,最后将致敏血球悬浮于 0.9 毫升稀释液中。

2. 血凝实验方法及结果判断:

在平板每孔中加入递倍稀释的毒素或血清 0.5 毫升和致敏血球悬液 0.05 毫升,混匀后置 37℃ 0.5—2 小时观察结果,试验的对照有:

①检样对照:检样加未致敏的红血球。

②未致敏红血球对照:稀释液加未致敏的红血球。

③致敏红血球对照:稀释液加致敏红血球。

测定结果采用血凝滴度或凝集分级标准来表示。

(二)对流免疫电泳试验

1. 免疫电泳板的制备:采用进口琼脂以离子强度 0.1、pH8.6 巴比妥钠-盐酸缓冲液配成 1% 琼脂,取 15 毫升放在 7×10 厘米玻璃板上,待冷却后打孔,孔容积约 20 微升,抗原孔与抗体孔边缘距离 0.6 厘米,两者平行,孔底补少量琼脂,使整块琼脂板在通电时保持电流密度均匀。

2. 对流免疫电泳条件:

①缓冲液:同配 1% 琼脂时所用缓冲液。

②抗原端接负极,抗体端接正极。电流为

60 毫安,电位差为 6—8 伏/厘米。

③电泳 45—60 分钟后,观察两孔间形成的抗原抗体复合物的白色沉淀线。如抗原量极微,沉淀条纹不清晰,于 37℃ 保温数小时后再观察。

实验结果

一、间接血凝试验

(一)结合反应

1. 兔、羊血球的敏感性:

不同浓度的马、兔抗血清致敏兔羊血球的敏感性见表 1。结果表明兔血球比羊血球敏感,兔抗血清致敏的兔血球更为显著。

表 1 致敏的兔、羊血球对血清敏感性的比较

血球种类	致敏抗血清		血凝滴度
	种类	浓度(单位)	
兔血球	马血清	400	10 ⁸
		40	10 ⁵
		10	10 ³
羊血球	马血清	400	>10 ⁸
		40	10 ³
		10	10 ³
兔血球	兔血清	100	10 ⁸
		25	10 ⁸
羊血球	兔血清	100	10 ³
		25	10 ³

2. 戊二醛浓度对结合反应的影响:

抗血清浓度在 5—200 单位时,用 0.05—0.25M 戊二醛致敏血球的效果较稳定,产生的变化最小。用 20—25 单位抗血清致敏时,用 0.25M 戊二醛效果最好(表 2)。

表 2 戊二醛浓度的影响

戊二醛浓度(M)	间接血凝试验	
	滴 度	特 异 性
0.30	1.6×10 ⁷	—*
0.25	1.6×10 ⁸	+
0.20	1.6×10 ⁸	+
0.10	1.6×10 ⁸	+
0.05	1.6×10 ⁸	+

* “—”出现非特异性凝集; “+”特异性凝集。

3. 结合时间的影响:

* Alsever 氏液: 1,000 毫升中含葡萄糖 20.5 克,柠檬酸钠 8.0 克,柠檬酸 0.54 克,氯化钠 1.05 克, pH6.1。

不同结合时间对结合反应的影响也不同。在室温 15 分钟,结合反应已完全,60 分钟以上易出现非特异性凝集,在实际操作中采用 30 分钟较合适。

(二)抗血清及毒素的纯度

比较不同纯度的抗血清及毒素致敏血球的敏感性(表 3),结果表明,抗血清及毒素的纯制品血凝滴度较其精制品和粗制品均低 10—20 倍。

表 3 不同纯度的抗血清或毒素致敏血球的敏感性比较

致敏血球的抗血清或毒素		血凝滴度
纯 度	浓 度	
纯兔血清	20—25 单位	10 ⁴
精制马血清		10 ⁵
粗制马血清		10 ⁵
纯毒素	5,000 LD ₅₀	2×10 ⁷
精制毒素		4×10 ³
粗制毒素		4×10 ³

(三)抗血清浓度

不同浓度的抗血清致敏血球,在 0.25M 戊二醛条件下对肉毒毒素血凝反应的影响见表 4。结果表明抗血清浓度与血凝反应的敏感性及特异性有密切关系。抗血清浓度过高,虽然敏感性高,但出现非特异性凝集,抗血清浓度过低则敏感性又受到影响。抗血清浓度一般在 25 单位左右较适宜。

表 4 抗血清的浓度对血凝反应的影响

抗血清浓度 (单位)	毒素浓度(小鼠 LD ₅₀)						
	100,000	10,000	1,000	100	10	1	对照
200	++++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100	++++	+++	+++	+++	++	++	++
50	++++	+++	+++	++	++	++	+
25	++++	+++	+++	++	+	+	-
5	++++	+++	+++	+	-	-	-

* “++++”呈致密的较大颗粒凝集;“+++”呈致密的颗粒凝集;“++”呈薄层凝集,边缘不齐,可见凝集颗粒;“+”呈红色窄环,边缘不齐;“-”沉积环宽而边缘整齐呈红色钮扣状。

(四)戊二醛致敏血球的稳定性

用 0.25M 戊二醛、20 单位的抗血清致敏的

兔血球于 4℃、-90℃ 置稀释液中储存,保存一个月的致敏血球是较稳定的,滴度无明显变化,为 2.6×10³—10⁶。

(五)检出最小量毒素的敏感性

A 型肉毒杆菌经紫外光诱变后挑取 66 个单菌落,它们的培养物毒力范围为 6—196×10⁴ LD₅₀/毫升。间接血凝反应检出最小量毒素的敏感范围(表 5),在 66 株中,能检出最小量毒素在 10,000 LD₅₀ 以下者占 98%,检出 1,000LD₅₀ 以下者占 82%,检出 100 LD₅₀ 以下者占 56%。

表 5 检出最小量毒素的敏感性

毒 力 (小鼠 LD ₅₀)	<1 (0.51)	1—10	10— 100	100— 1,000	1,000— 10,000	10,000— 100,000
标本数	1	8	28	17	11	1
百分率(%)	2	12	42	26	16	2

(六)对其它各型肉毒毒素的交叉反应

以 20 单位抗 A 型马血清及 0.25M 戊二醛致敏的红血球,对 A、B、C、D、E、F 型肉毒毒素及牛血清白蛋白进行血凝试验,观察其特异性,结果表明粗制或精制的抗 A 型肉毒血清致敏的血球对 B 型有明显的交叉,对 F 型出现极微的交叉,对 C、D、E 型及牛血清白蛋白无交叉反应。

二、对流免疫电泳

(一)毒素与抗血清浓度的影响

使纯毒素出现沉淀带的兔及马抗血清的浓度范围,实验结果表明:在 10 单位抗血清浓度范围内,随着抗血清浓度的增大,形成沉淀带所需的抗原量相对减少(表 6)。从检出小量毒素的目的来看,采用较浓的抗血清是有利的。

表 6 毒素与抗血清浓度对出现沉淀带的影响

血清类别	抗血清浓度 (单位)	合适的毒素浓度 (10 ⁴ LD ₅₀)
兔 血 清	0.2	36—360
	1	3.6—36
	6	2.4—36
马 血 清	1	20—360
	10	6—36

(二)毒素纯度的影响

在抗体为 1 单位兔血清时,三种不同纯度毒素对出现沉淀带的敏感性如表 7 所示。纯毒素含 0.22 微克蛋白,相当生物活性为 3.6—4.6

×10⁴ 小鼠 LD₅₀ 时,即可出现沉淀带,粗毒素要含 4.25 微克蛋白,相当生物活性为 2.8×10⁴ 小鼠 LD₅₀ 时才出现沉淀带。

表 7 不同纯度毒素的敏感性

毒素纯度	出现沉淀带之毒素浓度	
	蛋白(微克)	生物活性 (×10 ⁴ 小鼠 LD ₅₀)
纯 品	0.22	4.1
半 纯 品	0.63	3.0
粗 制 品	4.25	2.8

(三)电泳时间的影响

实验结果表明以电泳 45—60 分钟出现的抗原抗体复合物的沉淀带比较清晰、稳定。

(四)检出最小量毒素的敏感性

采用 4 单位的纯兔抗血清与精制马抗血清,诊检了 A 型肉毒杆菌培养物的 6 个标本。6 个标本的毒力范围为 168—236×10⁴ LD₅₀/毫升,检出最小毒素量的结果示于表 8。应用纯兔抗血清可检出小至 9,460±2,430 小鼠 LD₅₀ 的毒素,精制马抗血清可检出小至 2,712±451 小鼠 LD₅₀ 的毒素。我们曾应用 10 单位的抗血清敏感地检出约 1,000 小鼠 LD₅₀ 的毒素。

表 8 检出最小量毒素的敏感性

标 本 号	检出的最小量毒素(LD ₅₀)	
	兔 血 清	马 血 清
1	11,200	3,700
2	9,200	3,040
3	6,100	2,020
4	7,800	2,680
5	7,400	2,400
6	14,800	2,400
平均	9460±2430	2712±451

(五)诊检肉毒毒素的型间特异性

用抗 A 型纯兔血清及精制马血清对 A、B 型肉毒毒素进行诊检的结果表明,精制抗 A 马血清对 B 型毒素出现沉淀带,而用纯的抗 A 兔血清,则对 B 型毒素不出现沉淀带。因此应用纯抗血清可解决诊检肉毒毒素之型间交叉反应问题。

讨 论

1. 间接血凝和对流免疫电泳诊检 A 型肉毒毒素操作简便,诊检快速,在 30—60 分钟即可检出结果,同时敏感度也高,对流免疫电泳可测出小至 1,000—3,000 小鼠 LD₅₀ 的毒素,间接血凝可检出小至 10 以下—1,000 小鼠 LD₅₀ 的毒素。

2. 应用体外血清学方法易出现型间交叉现象。引起交叉反应的因素是肉毒毒素中含有血凝素。在我们的实验中,采用精制的不纯抗血清时,因其内含有抗血凝素的抗体,结果对 B 型毒素有明显的交叉反应,而采用纯的单价特异抗血清则无型间交叉反应。所以解决诊检肉毒毒素体外血清学方法的特异性,关键是要制备纯的单价特异抗血清。

3. 间接血凝及对流免疫电泳对肉毒毒素的诊检是一种定性反应,而不能精确地测定毒素的数量。

间接血凝法的重复性不够理想,试验中采用戊二醛致敏的血球较稳定,不发生溶血,血球制剂放 4℃ 或 -90℃ 冰箱可应用一个月,滴度无明显变化。对流免疫电泳法重复性较好,但敏感性不如间接血凝法高。

参 考 文 献

[1] Miller, C. A. and A. W. Anderson: *Inf. Immunity*, 4(2): 126—129, 1971.
[2] Русај, Т.: *Bull. Acad. Polon. Sci., Class II*, 4: 317, 1956.
[3] Силицын, В. А. Ж. М. Э. И., 3:22—26, 1960.
[4] Силицын, В. А. *ibid*, 4:102, 1960.
[5] Силицын, В. А. *Военно-Медицински Журнал*, 2: 24, 1961.
[6] Яфлев, Р. Х. и С. А. Чепелев: Ж. М. Э. И. 5: 21—25, 1961.
[7] Johnson, H. H. et al.: *J. Bact.*, 91(3): 967—973, 1966.
[8] Johnson, H. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 856—861, 1967.
[9] Johnson, H. H., et al.: *ibid*. 137: 973, 1971.
[10] Sugiyama, H. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27: 333—336, 1974.
[11] Sugiyama, H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 856—861, 1967.
[12] Boroff, D. A. and Shu-Chen, G.: *Appl. Microbiol.*, 25: 545—549, 1973.