

乳胶凝集反应对炭疽芽孢快速检验的研究

王世若 梁焕春 黎育才

(长春兽医大学微生物学教研室, 长春)

乳胶凝集反应(简称乳凝反应)诊断沙门氏菌、脑膜炎双球菌、钩端螺旋体、脊髓灰质炎病毒和柯萨奇病毒等,具有快速、敏感和简易等特点^[1,2]。在此基础上,我们优选了炭疽血清致敏乳胶的最适条件,制备了乳胶炭疽血清。并对污染了炭疽芽孢的鲜葵花叶、水泥瓦、烤漆铁板、玻璃板、涂拉克漆木板和黄砂土等标本进行了实验检查。现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 菌种

试验用枯草杆菌、蜡样杆菌、蕈状杆菌、绿脓杆菌、产气杆菌、大肠杆菌由卫生部药品生物制品检定所提供。马铃薯杆菌、假炭疽杆菌、炭疽杆菌 C₄₀-202 由北京兽医药品监察所提供。白色葡萄球菌、普通变形杆菌为我室保藏。

(二) 血清

炭疽血清为兰州兽医生物药品厂生产。对照用血清采自健康壮龄马。

(三) 乳胶(即聚苯乙烯乳胶)

由长春生物制品所提供。

(四) 试剂

0.2% NaCl 和 pH 7.2 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 随用随配。胰酶系德国 E. MERCK 出品(批号 8367),用 pH 8.2 硼酸缓冲盐水 (BBS) 配成 1% 浓度备用。

(五) 乳胶血清的制备

1. 乳胶悬液的制备: 取 10% 乳胶原液 1 毫升,加蒸馏水 4 毫升稀释成 2%,再加 pH 8.2 BBS 12 毫升和 1% 胰酶溶液 2 毫升,充分混合,置 45℃ 水浴约 18 小时后,以 7500 转/分离心 30 分钟,弃上清液,往沉淀物中加入 pH 8.2 BBS

5 毫升,制成 2% 乳胶悬液备用。

2. 乳胶炭疽血清的制备: 以 pH 7.2 PBS 将炭疽血清稀释 1:20 后,在 56℃ 水浴中作用 30 分钟,取 0.2 毫升缓慢地滴加于经胰酶处理的 1% 乳胶悬液 1 毫升中,置 56℃ 水浴中致敏 2 小时,放室温下稳定 4 小时即成。

对照用乳胶正常血清,是健马血清按上述方法处理乳胶悬液制成。以上两种乳胶血清均无自凝现象。

(六) 抗原的制备

1. 优选炭疽血清致敏乳胶条件所用抗原的制备: 用 0.2% NaCl 溶液对 2×10^7 个/毫升炭疽芽孢悬液连续对倍稀释成 1:2—1:1024 等 10 个浓度。

2. 乳胶炭疽血清检查各种炭疽抗原的制备: 2×10^7 个/毫升活炭疽芽孢为第一组,该芽孢液在水浴中煮沸 40 分钟为第二组,然后以 4000 转/分离心 30 分钟,取上清为第三组,加 1% 甲醛溶液杀死的炭疽芽孢液为第四组。

3. 乳胶炭疽血清检查含杂菌标本时所用菌液的制备: 配制含一种杂菌的悬液时,系将枯草杆菌、蜡样杆菌、蕈状杆菌和假炭疽杆菌接种在琼脂斜面上,培养 4 天,绿脓杆菌,白色葡萄球菌、变形杆菌、大肠杆菌和产气杆菌接种在琼脂斜面上培养 1 天,洗下菌苔,分别制成每毫升约含 2×10^8 个芽孢或菌体的悬液。检查时,再用 0.2% NaCl 溶液将其连续对倍稀释成 1:2—1:16。

配制成含多种杂菌的炭疽芽孢悬液时,系将上述 10 种细菌的盐水原液等量混合,使每毫升所含杂菌总数为 2×10^8 个左右,但其中的枯草杆菌控制在不超过 2×10^7 个。检查时,以此混合杂菌悬液代替 0.2% NaCl 溶液,用其对炭

痘芽孢原液连续对倍稀释成1:2—1:512等9个浓度。

(七) 标本液的制备

将 2×10^6 个炭疽芽孢分别撒于20平方厘米鲜葵花叶表面,31.5平方厘米拉克漆木板、30平方厘米烤漆铁板和玻璃板上;将 5×10^6 个炭疽芽孢撒于30平方厘米水泥瓦上;将 2×10^7 个炭疽芽孢撒于1克黄砂土中。然后在不同时间内,用0.2%盐溶液2—5毫升冲洗或浸泡污染的标本,取洗脱液和浸泡液静置10分钟,取上清(即标本液)待检。

(八) 乳胶凝集反应

取不同浓度的炭疽芽孢液各0.1毫升,分别滴在玻璃板一端,对照盐溶液滴另一端,然后在芽孢液和对照液中分别滴加乳胶炭疽血清和乳胶正常血清各0.05毫升,混匀后,室温下静置5分钟,在对照显阴性反应的条件下判定结果。反应强度以“4、3、2、1、0”五个等级符号表示。“2”为判定阳性反应的起始点。

检查标本液时,除取标本液0.1毫升与乳胶炭疽血清0.05毫升进行反应外,同时作三组对照:阴性乳胶血清与含炭疽芽孢标本和不含炭疽芽孢标本,以及阳性乳胶血清与含炭疽芽孢标本。在三组对照完全正常的条件下,判定反应结果。

试 验 结 果

一、乳胶浓度的选择(见表1)

表1结果说明,以1%乳胶悬液吸附免疫血清,制成乳胶炭疽血清的检出效果最好,可与每毫升含 7.8×10^4 个炭疽芽孢液发生反应。

二、免疫血清浓度的选择

用pH 7.2 PBS 将免疫血清稀释成1:10、1:15、1:20、1:40、1:50、1:60和1:80等7种浓度,用其分别制成乳胶炭疽血清,然后与炭疽芽孢液进行反应。

表 1 乳胶浓度对凝集效果的影响*

致敏乳胶种类	乳胶浓度(%)	炭疽芽孢数 ($\times 10^4$ /毫升)									0.2% NaCl (对照)
		1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	
免疫血清	2.0	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0
	1.0	4	4	4	4	4	3	2	2	0	0
	0.5	4	4	3	2	2	1	0	0	0	0
	0.25	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
正常血清	1.0	0	0	0	0						

* 表中“4”示全部乳胶呈絮状小团块样凝集,液体澄清。 “3”示大部分乳胶凝集成较小颗粒,液体微混浊。
“2”示半量乳胶凝集成可见的细小微粒,液体较混浊。 “1”示仅少量乳胶凝集成肉眼可见的微粒,液体混浊。
“0”示全部乳胶呈乳状,无颗粒。

检查结果发现,将1:40、1:50、1:60和1:80稀释度的炭疽血清滴入乳胶悬液中,发生明显自凝。用1:15和1:20稀释度制备乳胶炭疽血清时效果最好,均能与每毫升含 7.8×10^4 个炭疽芽孢液发生反应。用1:10浓度制备时效果较差,仅能与每毫升含 6.25×10^5 个炭疽芽孢液发生反应。故在各项试验中均用稀释1:20炭疽血清致敏乳胶悬液。

三、免疫血清处理温度的选择

用56℃、60℃和66℃水浴处理过的免疫血清,分别致敏乳胶悬液,制成乳胶炭疽血清,然后与炭疽芽孢液进行反应。

结果表明,以56℃处理的免疫血清效果最好,可与每毫升含 3.9×10^4 个炭疽芽孢悬液发生“2”反应。而60℃、66℃处理的血清,不仅

检出效果差,而且还能引起轻度自凝,不宜采用。

四、免疫血清致敏乳胶温度的选择

将免疫血清滴入乳胶悬液中,分别放于4℃冰箱中、15℃室温、37℃、45℃和56℃水浴中致敏,制成乳胶炭疽血清,然后与炭疽芽孢液进行反应。

结果表明,炭疽血清在56℃下致敏乳胶的效果最好,可与每毫升含 3.9×10^4 个炭疽芽孢液发生“2”反应。另外4种温度不宜采用。

五、免疫血清致敏乳胶时间的选择

将滴入免疫血清的乳胶悬液放水浴中,分别致敏5分、15分、30分、1小时、4小时、8小时和24小时后,制成乳胶炭疽血清,然后与

炭疽芽孢液进行反应。

结果表明,由各致敏时间制备的乳胶炭疽血清,均能与炭疽芽孢液发生反应,以2小时的致敏效果最好,可与每毫升含 3.9×10^4 个炭疽芽孢液发生“2”反应。随着致敏时间的延长,反应效力逐渐下降,致敏24小时制备的乳胶炭疽血清,只能与每毫升含 6.25×10^5 个炭疽芽孢液发生反应。

六、乳胶炭疽血清对各种类型炭疽抗原的检查

用上述最适条件制备的乳胶炭疽血清和乳胶正常血清,检查了用4种方法制备的炭疽芽孢抗原,其结果见表2。

从表2结果看出,所制乳胶炭疽血清对四种方法处理的炭疽芽孢抗原均能发生反应,但检出率不一样,对活炭疽芽孢可检出每毫升含

表2 乳胶炭疽血清对用不同方法

乳胶血清种类	抗原种类	抗 原 稀 释 度										0.2% NaCl (对照)
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
乳胶炭疽血清	活的芽孢	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1	0
	煮沸杀死	4	4	4	4	4	4	3	2	1	0	
	煮沸离心上清	4	4	4	4	4	4	3	2	1	0	
	甲醛杀死	4	3	3	3	2	1	0	0	0	0	
乳胶正常血清	活的芽孢	0	0	0								0
	煮沸杀死	0	0	0								
	煮沸离心上清	0	0	0								
	甲醛杀死	0	0	0								

3.9×10^4 个,对甲醛杀死的炭疽芽孢可检出每毫升含 6.25×10^5 个,用另外两种方法处理的抗原标本,检出率比第一种方法只低一个滴度。

七、乳胶炭疽血清对含杂菌标本的检查

1. 对含一种杂菌标本的检查: 乳胶炭疽血清对每毫升含 2×10^8 、 1×10^8 和 5×10^7 个枯草杆菌芽孢标本,分别发生“3”、“2”、“2”的反应,但不与每毫升含 2.5×10^7 和 1.25×10^7 个枯草杆菌芽孢标本和其它测定的细菌标本发生反应。

2. 对含多种杂菌的炭疽芽孢标本的检查(见表3)。

从表3结果看,由10种杂菌组成的混合菌液,对乳胶炭疽血清检出炭疽芽孢是有一定干扰的,检出炭疽芽孢率随被检标本配制时间的延长而下降。如在标本配制后的半小时检查,可与每毫升含 7.8×10^4 个炭疽芽孢标本发生反应。标本配制后120小时检查,每毫升需含 6.25×10^5 个炭疽芽孢才能被检出,说明被检标本不宜久放,应立即检查。

八、乳胶炭疽血清对六种污染标本的检查(见表4)

从表4结果看,炭疽芽孢在各种标本上残

表3 混合多种杂菌对炭疽芽孢检出的影响

乳胶血清种类	配制后时间(小时)	炭疽芽孢数(×10 ⁴ /毫升)									炭疽芽孢液 (对照)
		1000	500	250	12.5	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	
乳胶炭疽血清	0.5	4	4	4	4	4	4	3	2	0	4
	3	4	4	4	4	4	4	2	1	0	4
	6	4	4	4	4	4	3	2	1	0	4
	24	4	4	4	4	4	3	2	0	0	4
	48	4	4	4	4	4	3	2	0	0	4
	96	4	4	4	3	2	2	0	0	0	4
	120	4	4	4	3	2	1	0	0	0	4
乳胶正常血清	0.5	0	0	0							0
	96	0	0	0							0

存的数量、回收率和呈现“2”的时间各不相同,如葵花叶上残存的时间最短,需在3小时以内作检查;水泥瓦和烤漆铁板上的需在5、6小时以内作检查;玻璃板和拉克漆木板上的存留时间较长,分别为48、102小时;对土样的检查到34天还能呈现明显的阳性反应,说明残存的时间最长。这种不同结果的出现,原因尚待研究。

表4 对六种污染标本的检查结果

污染标本	回收的标本液			乳胶凝集反应(标本原液) “2”时间(小时)
	检查时间(小时)	存活炭疽芽孢数($\times 10^4$ 个/厘米 ²)	回收率(%)	
鲜葵花叶	1	4	40.0	3
	5	3.13	31.3	
	24	2.5	25.0	
水泥瓦	1	7	41.1	5
	24	3.56	20.9	
烤漆铁板	1	2.56	38.3	6
	6	2.36	35.3	
	48	2.32	34.6	
玻璃板	2	4.33	64.6	48
	24	3.43	51.1	
	48	3.06	45.6	
拉克漆木板	1	2.96	46.9	102
	24	2.47	39.0	
	48	2.09	31.1	
黄砂土	4 34(天)	3.25×10^6 2.3×10^6	16.3 11.5	>34天

讨 论

1. 为阻止试验中乳胶自凝,排除产生非特异性反应,提高对炭疽血清的吸附力,对所用乳胶悬液需经胰酶处理,处理过的乳胶悬液不能久放,超过3天,对炭疽血清的吸附能力明显下降,制成的乳胶炭疽血清对炭疽芽孢的检出率要低2个滴度。

2. 致敏乳胶时,免疫血清的用量必须适当,用量过大(如1:10),会抑制乳胶炭疽血清与特异抗原发生反应,用量过小(如1:60和1:80),制成的乳胶炭疽血清不但自凝,而且与盐水(对照)也发生强凝集。如选用1:15和1:20时,不但无自凝现象,而且对特异抗原的检出率也最高。由此可见,选择适当浓度的炭疽血清是制备合格的乳胶炭疽血清的重要条件。

3. 乳胶炭疽血清具有较好的敏感性,可检出每毫升含 3.9×10^4 个活炭疽芽孢或 7.8×10^4 个死炭疽芽孢的标本。由此可见,用煮沸杀菌法处理被检标本,对检出率影响不太明显。因为活炭疽芽孢的危险性极大,为保证检验者的安全,实际工作中以用死炭疽芽孢液作检查为适当。如改用甲醛法杀菌处理,比第一种处理方法要降低4个滴度,仅能检出每毫升含 6.25×10^5 个炭疽芽孢,此法不宜采用。

4. 试验中所用的黄砂土(pH 5.5—5.9)对
(下转第150页)

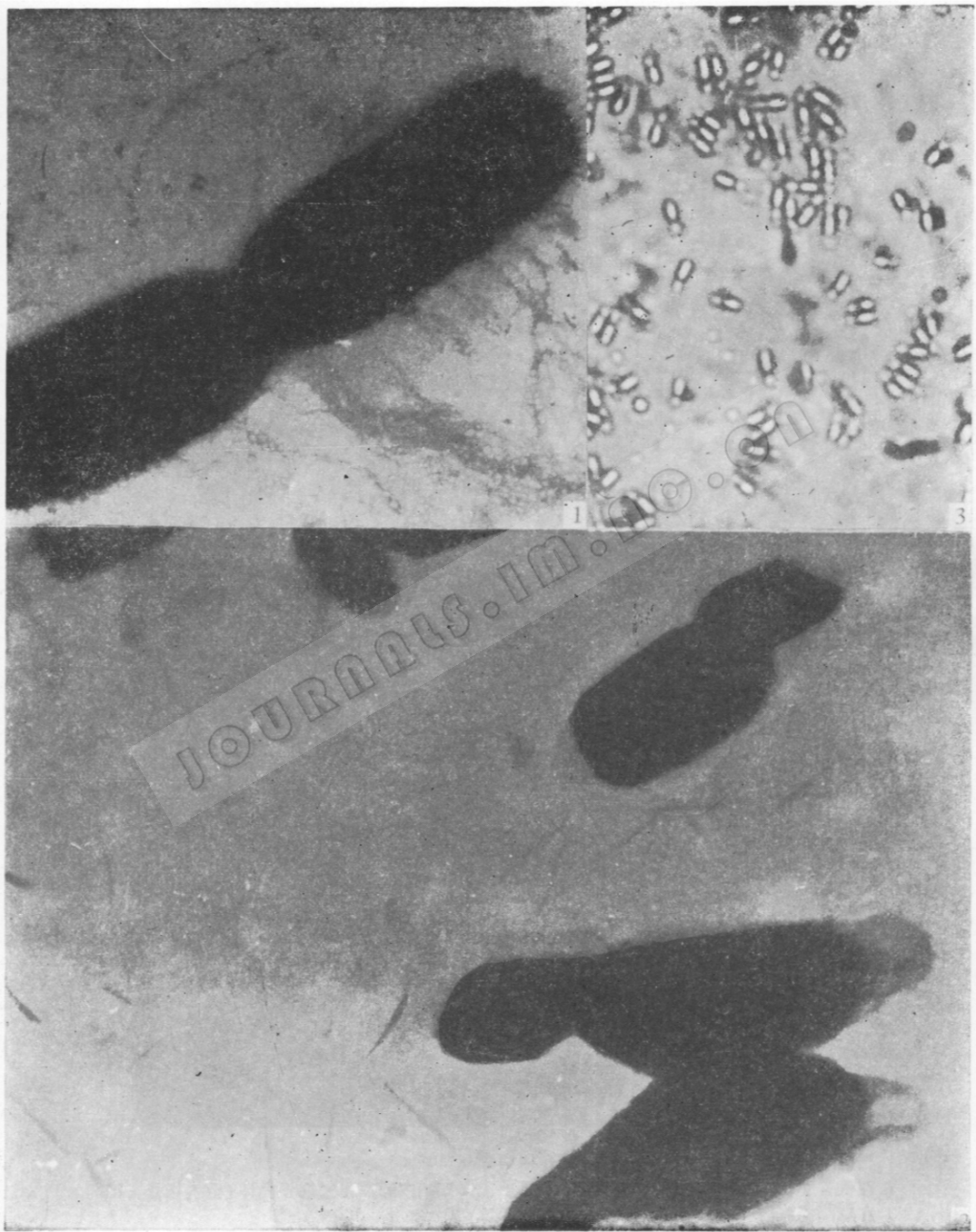
(上接第 124 页)

乳胶炭疽血清易发生自凝,经用 pH 8.2—8.4 的 0.2% NaCl 溶液调正 pH 为 7.8 左右,自凝现象消除,但产生的特异凝集现象极不明显,其原因可能是:开始时撒入的炭疽芽孢数过少,乳胶炭疽血清的敏感性达不到,或土样混悬液放置时间过长,大量的炭疽芽孢被土粒或其它杂质吸附而下沉,上清液中所含炭疽芽孢数过少,影

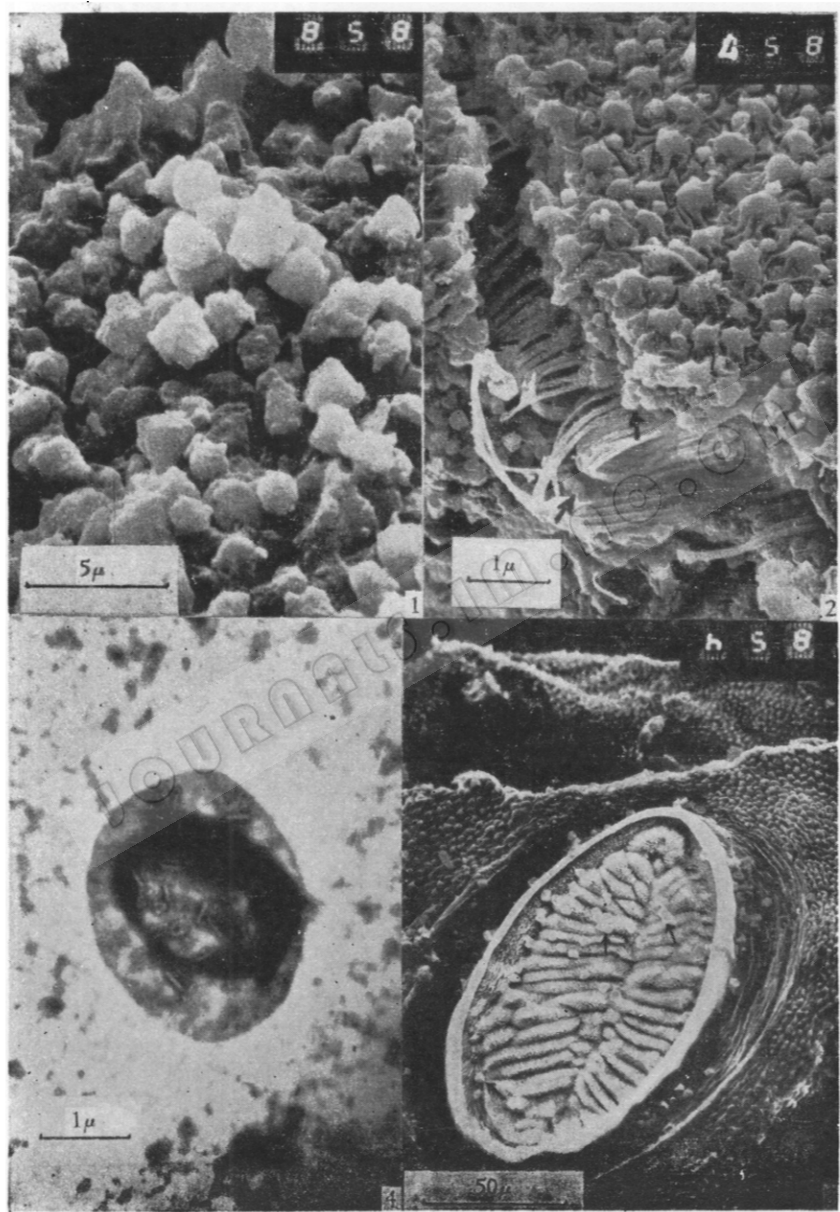
响阳性反应的出现。故在土样混悬液调 pH 时必须充分振摇,放置适当时间。土壤类型多,上述方法是否可行还有待试验。

参 考 文 献

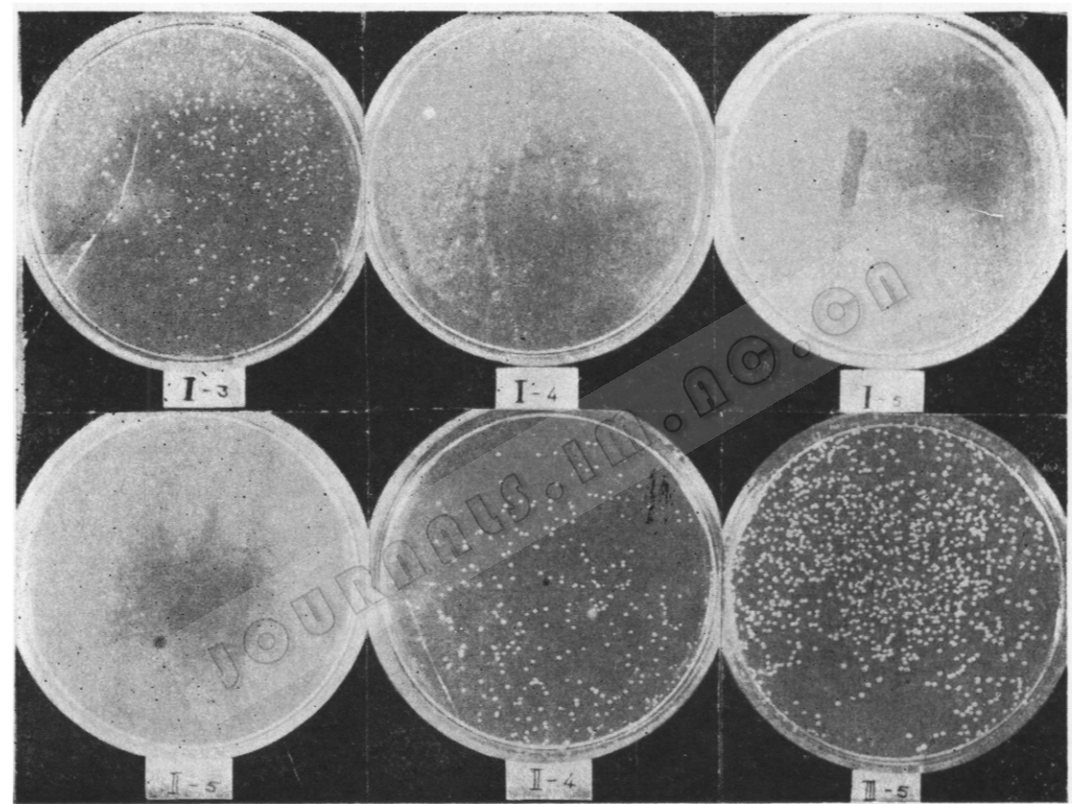
- [1] 浙江人民卫生实验院微生物研究所: 中华医学杂志, 8: 487, 1973。
- [2] 徐宜为: 实验免疫学技术, 科学出版社, 北京, 1979 年, 第 104 页。



图中：1. CW-1 菌株营养细胞 (20200 \times)。
2. CW-1 菌株芽孢和伴孢晶体 (37500 \times) 芽孢和晶体不分离。
3. CW-1菌株的芽孢囊,不分离的芽孢和晶体及游离的晶体。在少数芽孢囊中可见到在芽孢二端各有一个晶体 (2000 \times)。



图中：1. 扫描电子显微镜下观察到的茶尺蠖多角体病毒 (4800×)
2. 在气管肋丝的周围可见到从解体的气管基质上皮细胞内释放出来的多角体 (箭头指处, 1400×)
3. 在气门筛板(气门栅)上有不少逸散出的多角体 (箭头指处, 500×)
4. 多角体呈透明状圆球时, 显示出封存在里面的杆状病毒粒子及未全部溶解的黑色多角体被膜仍残留在表面。(10000×)

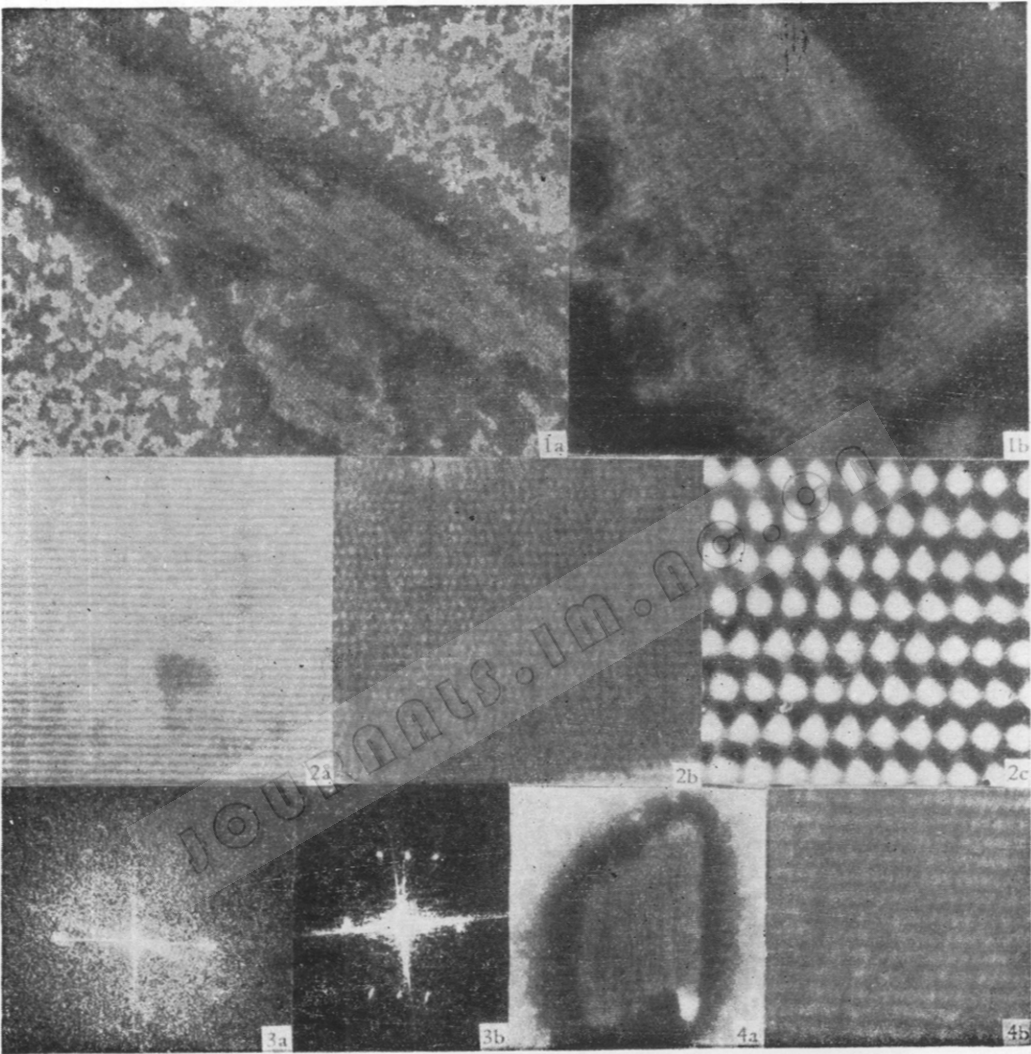


室内日光照射时间与平皿位置对细菌生长的影响

距窗 100 厘米：I-3 照射 90 分钟；I-4 照射 120 分钟；I-5 照射 5 小时。

距窗 195 厘米：II-5 照射 120 分钟；II-4 照射 5 小时。

放暗处(对照)：III-5 照射 5 小时。



牛肝过氧化氢酶结晶照片

1. 电子显微镜照片。a 电子放大 20,000 \times ，光学放大 3 \times ；b：电子放大 32,500 \times ，光学放大 3 \times 。白色晶格线为酶分子排列的带，晶格线间距 84.4 \AA ；黑色部分为负染色剂磷钨酸。
2. 电子显微镜照片。a 电子放大 40,000 \times ，光学放大 3 \times ；b：电子放大 54,000 \times ，光学放大 3 \times ；c：图 b 经光学处理后的图象。白色晶格线为酶分子排列的带，白点是单个酶分子。晶格线间距为 84.4 \AA ，晶格线上分子的间距为 33.9 \AA ，黑色部分为负染色剂磷钨酸。
3. 激光光学衍射图。a：图 2a 的衍射图；b：图 2b 的衍射图。
4. a：用正常运转的 Hitachi H-500 型电子显微镜拍摄(电子放大 4200 \times)；b：在调试中的电子显微镜拍摄(电子放大 94,800 \times ，光学放大 3 \times)。