

用免疫染色法鉴别炭疽芽孢杆菌

甄宏太 杨素贤 孙晓康

(呼和浩特进出口商品检验局)

本文着重介绍适于鉴别炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)的免疫染色方法,此法是将免疫学方法与普通染色技术结合起来,以显示抗原与相应抗体的特异性反应,简单易行,特异性和敏感性均较好,可作为一般试验的鉴别手段。

张生民等^[1]曾将经过免疫血清处理的乳酸大肠杆菌(*E. coli* var. *acitilactici*)、肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、产气荚膜杆菌(*Cl. perfringens*)、羊布氏杆菌(*Br. melitensis*)和多杀巴氏杆菌(*P. multocida*)五种菌用甲基兰铬酸法染色,取得较好结果。本试验用另一种方法,特异性和敏感性均较佳。

材料和方法

一、供试菌种

炭疽芽孢杆菌强毒株 33 株(自待毁的病羊皮上分离而得),无毒炭疽芽孢 II 号菌苗(由内蒙古兽医生物药品制造厂供给),蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) 4 株、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*) 2 株、蕈状杆菌(*B. mycoides*) 2 株、枯草杆菌(*B. subtilis*) 6 株、马铃薯杆菌(*B. mesentericus*) 1 株(均由卫生部药品生物制品检定所和兰州生物制品研究所供给)。将各菌株接种在碳酸氢钠琼脂平板上,在含 15% CO₂ 的容器中于 37℃ 培养 18—24 小时,以 5% 甲醛盐水将菌洗下,稀释成约 10 万/ml 的菌悬液,于 4℃ 保存备用。

二、免疫血清

1. 抗炭疽荚膜血清: 参照 Cherry 等的方法^[2]用炭疽杆菌 II 号菌苗的碳酸氢钠琼脂平板培养物,经甲醛盐水灭活后,给家兔静脉注射。

2. 羊抗兔血清: 用健康家兔血清提取球蛋

白 IgG, 给绵羊注射,一针股前淋巴腺,两针后腿肌肉,效价满意后采血,4℃ 贮存备用。

三、染色方法

1. 将菌液涂片浸入由酒精(60份)、三氯甲烷(30份)、甲醛(10份)混合而成的固定液内 3—5 分钟,95%乙醇漂洗后,自然干燥。

2. 涂片上加抗炭疽荚膜血清,于 37℃ 下结合 30 分钟;水洗去血清,干燥后染色。若血清效价偏低,可在染色前再加羊抗兔血清,37℃ 下结合 30 分钟,水洗、干燥。

3. 用革兰氏结晶紫液染涂片 3—5 分钟,水洗干燥后,再加革兰氏碘液 3—5 分钟,水洗干燥后浸入 56℃ 左右的偶氮胭脂红染液内 16—20 秒,迅速水洗干燥。镜检。

四、免疫染色法与荧光抗体法的对比

以倍比稀释的 FITC 标记的羊抗球蛋白荧光抗体血清^[3],代替羊抗兔血清,处理涂片,作免疫染色后镜检。对比两种方法的染色效果。

试验结果

一、炭疽芽孢杆菌的形态

33 株生有荚膜的炭疽杆菌,经免疫染色后,菌体染成深紫色,荚膜染成粉红色(图版 I-1),与荧光抗体法(图版 I-2)对比,二者所显示的荚膜形态和荚膜厚度基本一致。

二、五种好氧性芽孢杆菌的免疫染色

试验用的蜡样芽孢杆菌 4 株、巨大芽孢杆菌 2 株、蕈状杆菌 2 株、枯草杆菌 6 株、马铃薯杆菌 1 株,用免疫染色法染色后,菌体呈深紫

色,菌体周围无粉红色痕迹,表明五种菌不具有与炭疽杆菌荚膜相似的抗原,不存在与有荚膜炭疽杆菌的交叉反应问题。

三、免疫染色法与荧光抗体法染色效价比较 (见表1)

表1 免疫染色法与荧光抗体法染色效价比较

染色方法 \ 血清稀释倍数	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
免疫染色法	4+*	4+	3+	3+	2+	±	-	-
荧光抗体法	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	+

* 免疫染色法效价结果的判定主要根据炭疽芽孢杆菌荚膜的厚度而定,并参照荧光抗体法的标准^[2]。“4+”荚膜厚于菌体,有黄绿色荧光。“3+”荚膜厚相当菌体,有黄绿色荧光。“2+”荚膜较厚,荧光较弱清晰。“+”荚膜不显,荧光暗淡。“-”无黄绿色荧光的菌形。“2+”以上者均判为阳性。

从表1结果看出荧光抗体法所用血清稀释浓度比免疫染色法高1—3个滴度,对炭疽芽孢杆菌的鉴定毫无影响。所以在无荧光显微镜设备的实验室,使用免疫染色法鉴别炭疽芽孢杆菌较为适用。

讨 论

1. 免疫染色法使炭疽杆菌的荚膜染成粉红色的底物主要是抗体球蛋白,因为偶氮胭脂红是一蛋白染色剂^[4]。虽然因所试的一些不形成荚膜的革兰氏阳性杆菌和球菌也可染出很薄的红色环,由于有荚膜的炭疽杆菌经染色后即有抗原抗体特异性结合的免疫学特性又有形态学特征,菌体深紫色荚膜粉红色,故仍易鉴别。

2. 偶氮胭脂红染液对结晶紫有强脱色作用,为防止色素形成结晶而预热至56℃^[6],使脱色作用更强。因此在此染液内的复染时间不宜太长,否则菌体也染成红色,使荚膜失去衬

托,给鉴别造成困难。

3. 免疫效价判定的准确性是随荚膜的染色度和厚度的加大而提高,故使用的免疫血清的染色效价应事先测定,选用最适宜的血清稀释度。

4. 检查组织标本时,涂片一定要薄,以便于鉴定较多的游离炭疽杆菌。

参 考 文 献

- [1] 张生民等:微生物学通报,7(1):26—29,1980.
- [2] Cherry B. W. et al.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 175: 582—604, 1959.
- [3] Akiyoshi Kawamura, Jr.: Fluorescent Antibody Techniques and their Applications, 2th Ed. University of Tokyo Press, 14—64, 1977.
- [4] 中山大学生物系生化微生物学教研室编:生化技术导论,人民教育出版社,258—259,1979,北京.
- [5] 甄宏太等:微生物学报,19(4):439—442,1979.
- [6] H. J. 科恩:微生物学染色剂,王文译,科学出版社,106,1958,北京.