

D 群链球菌的间接免疫荧光快速检验法

杨素贤 孙晓康 甄宏太

(内蒙古进出口商品检验局)

在国际上以 D 群链球菌(粪链球菌)作为卫生指标菌进行水和食品的卫生监测已有多数。目前我国对某些出口产品也开始检验此菌。近些年来,随着对心内膜炎等的病因探索,该菌在临床上也日益受到人们的重视;检验方法已突破传统的环状沉淀反应法,提出了直接免疫荧光法^[1]、乳胶凝集法^[2]、协同凝集法^[3]等快速方法。但这些方法敏感性不够高(阳性符合率一般在 85% 左右)。本试验试用间接免疫荧光法,不但简便快速,而且敏感性高(检查 351 株 D 群链球菌的阳性符合率达到 98%)。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

不同种的 D 群链球菌 351 株,分离自冻肉、羊绒、兔毛、羽毛、污水等,经 23 项生理生化试验鉴定,其特性均符合 Bergey 氏《鉴定细菌学手册》^[4]及 Facklam 氏 D 群链球菌表解^[5]所述。A-O 群(包括 D 群)链球菌 12 株、葡萄球菌 5 株,得自卫生部北京药品及生物制品检定所。

(二) 免疫血清的制备

所用免疫原共 D 群链球菌 7 株,包括粪链球菌(*Streptococcus faecalis*) 2 株、粪链球菌产酶变种(*S. faecalis* var. *zymogenes*) 1 株、粪链球菌液化变种(*S. faecalis* var. *Liquefaciens*) 1 株、

屎链球菌(*S. faecium*) 1 株、坚韧链球菌(*S. durans*) 1 株和牛链球菌(*S. bovis*) 1 株。将以上各菌的 18 小时肉汤培养物,经过福尔马林处理,分别免疫两公斤以上健康家兔。凝集价达 1:512 以上时,放血,分离血清。

(三) 环状沉淀反应法

环状沉淀反应法基本参照文献[6]进行,将待测菌接种于 100ml 0.2% 葡萄糖肉汤内,于 37℃ 培养 18—24 小时。离心沉淀,将沉淀物用生理盐水洗涤两次。末次离心沉淀物悬浮于 0.5—1.0ml 0.5N 盐酸溶液内,并水浴煮沸 15 分钟。离心沉淀后取上清,加一滴溴麝香草酚蓝指示剂,用 0.2N 氢氧化钠将上清液中和至中性。如有沉淀再离心,直至无任何沉淀。以此上清为抗原,与免疫血清在小玻璃管内进行环状沉淀试验。

(四) 间接免疫荧光试验法

将待测菌的 4—6 小时肉汤培养物涂于洁净载玻片上,充分干燥后,浸入乙醇 6 份、三氯甲烷 3 份、福尔马林 1 份的混合液内固定 5 分钟。取出玻片,浸入 95% 乙醇内漂洗,自然干燥。加免疫血清浸没涂片,放于湿盒内,于 37℃ 静置 30 分钟。用缓冲盐水缓缓冲去血清,自然干燥。加 FITC 标记的羊抗兔球蛋白抗体,按上述方法处理涂片。最后滴加碳酸盐缓冲甘油封片。在荧光显微镜下镜检。

结 果

(一) 免疫血清的基本性能

表 1 免疫血清的效价测定结果

血清	抗 原	效 价	
		环状沉淀反应	间接免疫荧光法*
抗 32221	荚链球菌 32221	1:10	1:128
抗 H 069	荚链球菌 H069	1:20	1:264
抗 32118	荚链球菌产酶变种 32118	1:10	1:128
抗 H 051	荚链球菌溶化变种 H051	1:10	1:128
抗 H 182	尿链球菌 H182	1:20	1:528
抗 H 048	坚韧链球菌 H048	1:40	1:528
抗 H 020	牛链球菌 H020	1:40	1:528
以上七种抗血清的混合	以上七种抗原菌	1:10—1:20	1:128—1:264

* 间接免疫荧光法所用荧光素 (FITC) 标记羊抗兔球蛋白抗体的工作稀释度为 1:10。

1. 效价: 7 种免疫原所得免疫血清之效价如表 1, 间接免疫荧光法之效价比环状沉淀反应法约高 10 倍以上; 两种方法所测各血清效价高低顺次是一致的, 表明二者有一定的可比性。

表 2 免疫血清的交叉反应试验

菌 株	混合抗血清反应	
	环状沉淀反应	间接免疫荧光法
链球菌:		
A 群 32003	±	+
A 群 32115	—	—
B 群 32113	—	—
C 群 32117	+	++
D 群 32118 (荚链球菌)	++	+++
E 群 32119	—	—
F 群 32120	—	—
G 群 32121	±	+
H 群 32122	—	—
T 群 32124	—	—
M 群 32125	—	—
O 群 32144	—	—
涎链球菌	—	—
轻型链球菌	—	—
葡萄球菌:		
金黄色 26001	+	++
金黄色 26109*	—	—
柠檬色 26103	—	—
白色 26101	—	—
白色 26104	—	—

* 此菌为凝固酶阴性葡萄球菌。

2. 交叉反应试验 (表 2): 如表 2 所示, 环状沉淀反应与间接免疫荧光法所测交叉反应情况是一致的, 即与 C 群链球菌有明显的交叉反应; 而与 A 群和 G 群链球菌的交叉反应不明显; 而与其它所试菌不发生交叉反应。

表 3 不同种 D 群链球菌环状沉淀反应和间接免疫荧光反应结果对比

菌 种	试验株数	环状沉淀反应						间接免疫荧光反应							
		阳性反应				阳性数	阳性率	阳性反应					阳性数	阳性率	
		—	+	++	+++			—	+	++	+++	++++			
粪链球菌	38	1	6	30	1	37	97	0	0	1	25	12	38	100	
粪链球菌液化变种	22	0	3	19	0	22	100	0	0	0	21	1	22	100	
粪链球菌产酶变种	1	0	0	1	0	1	100	0	0	0	1	0	1	100	
屎链球菌	26	0	0	26	0	26	100	0	0	0	12	14	26	100	
坚韧链球菌	24	0	3	21	0	24	100	0	0	0	14	10	24	100	
离链球菌	5	0	0	5	0	5	100	0	0	0	3	2	5	100	
牛链球菌	12	1	4	7	0	11	92	0	0	1	5	6	12	100	
马链球菌	1	0	0	1	0	1	100	0	0	0	1	0	1	100	
合 计	129	2	16	110	1	127	98	0	0	2	81	46	129	100	

(二) 两种方法鉴定 D 群链球菌对比结果

用两种方法对比鉴定 129 株不同种的 D 群链球菌, 结果如表 3。其中间接免疫荧光法所测阳性率 100%; 环状沉淀反应 98%, 表明间接免疫荧光法比环状沉淀反应法更加灵敏。

(三) 间接免疫荧光法鉴定结果

D 群链球菌 351 株和非 D 群链球菌 34 株用间接免疫荧光法鉴定, 结果见表 4。351 株 D

群链球菌中有 345 株为阳性, 阳性率 98%, 其中 6 株呈阴性, 用环状沉淀反应法测定似为阴性, 说明这 6 株菌的群抗原微弱。所测 34 株非 D 群链球菌中有 3 株阳性, 阳性率为 9%。6 株阴性的 D 群链球菌和 3 株阳性的非 D 群链球菌均未定菌名, 根据形态和过氧化氢酶阴性等特征, 可初步定为链球菌属。

表 4 间接免疫荧光法鉴定 D 群和非 D 群链球菌结果

菌 种	试验株数	间接免疫荧光法阳性反应	
		阳 性 数	阳性率 (%)
D 群链球菌:			
粪链球菌	69	69	100
屎链球菌	158	154	97
坚韧链球菌	70	69	98
禽链球菌	24	24	100
牛链球菌	27	26	96
马链球菌	3	3	100
合 计	351	345	98
非 D 链球菌	34	3	9

讨 论

本试验通过对 129 株 D 群链球菌的对比试验和对 351 株 D 群链球菌及 34 株非 D 群链球菌的抗原测定, 证明用间接免疫荧光法代替传统的环状沉淀反应法鉴定 D 群链球菌是可能的, 而且有一定的优点。

1. 环状沉淀法和间接免疫荧光法在测定不同血清之效价、检出 D 群链球菌的阳性率和非 D 群链球菌的交叉反应等方面都有良好的可比性。说明间接免疫荧光法可以真实地反映 D 群链球菌抗原情况。

2. 在相同条件下, 间接免疫荧光法比环状沉淀法灵敏, 可获得更高的阳性符合率。此结果与 Pavlova 报告的一致。还有文献记载, D 群链球菌常有抗原微弱或分布不均匀的菌株出现, 成为血清学假阴性结果的原因^[5-7]。使用间接免疫荧光法将有助于克服这一缺陷。

3. 环状沉淀反应法操作繁琐、费时, 不适于

大量样品的常规检验。而间接免疫荧光法则较简便、快速。每个试验菌株只需接种 0.5—1.0 ml 肉汤 37℃ 培养 4—6 小时后涂片, 做荧光抗体染色, 当天即可出结果, 样品多少均不受仪器限制。

4. 间接免疫荧光法同样可以反映血清与某些非 D 群链球菌的交叉反应, 甚至更加显著。交叉反应一般安排在培养计数和一些简便的生理生化试验之后进行。这样绝大部分交叉反应菌在免疫荧光试验之前已被淘汰, 所以出现假阳性结果的可能性是不大的, 如某些金黄色葡萄球菌 (26001), 虽呈免疫荧光阳性反应, 但与 D 群链球菌不同, 它能产生过氧化物酶, 在免疫荧光试验前, 经过氧化物酶试验, 已将其排除, 因此不会影响结果的正确判断。

参 考 文 献

[1] Pavlova, T. M. et al.: *Appl. Microbiol.* 29: 731—736, 1972.
[2] Chang, G. T. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 17: 804—806, 1983.

- [3] Bosley G. S. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 18: 1275—1277. 1983.
- [4] “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, 8th Ed, 1974, Williams and Wilkins, Baltimore.
- [5] Facklam, R. R.: *Appl. Microbiol.* 23: 1131—1139. 1972.
- [6] Jelinkova, J. et al.: Identification Typing of Eeterococci in T. Bergan and J. R. Norris, 1978. *Methods in Microbiolgy* Vol. 12. Academic Press. P. 199—217.
- [7] Pagel. J. E. et al.: *Can. J. Microbial.* 26: 1320—1327, 1980.