

用沈澱反應檢查細菌性 食物中毒的研究

周培安 李遠瑞

(中南軍區衛生研究所)

我們幾年來,接收了不少檢查細菌性食物中毒的樣品,如剩餘飯、點心、魚肉等;這些樣品大都是從外地寄來,達到實驗室時,常因時間太久,有的甚至7—8天方能接到,按一般常規檢查(細菌培養、動物試驗等),往往不能得到正確結果。尤其剩餘飯菜的樣品,大多數是些殘餘食物的混合物,含有各種佐味品,如辣椒、醬油、醋等,酸鹼度過高或過低,很不利於細菌的生存,在幾天的過程內,很可能死亡,因此培養時不能分離出細菌。動物試驗,又因刺激物太多,或雜菌太多,也不易鑑定。因此我們以沙門氏菌為中心提出菌體中的可溶性抗原與高價免疫血清作沉澱反應的方法,作了下列一些實驗。

材料與方法

(一) 細菌

沙門氏菌屬:腸炎桿菌,傷寒桿菌,副傷寒桿菌甲、乙、丙,莫斯科桿菌(*S. moscow.*),都柏林桿菌(*S. dublin.*)。

痢疾菌屬:志賀氏桿菌,福氏桿菌,宋內氏桿菌。

霍亂弧菌,大腸桿菌。

(二) 感染材料:牛肝、牛肉、小白鼠。

(三) 抗腸炎菌免疫血清的備製

菌種(中央生物製品研究所取來)通過小白鼠³代後,所見生長於瓊膠平板培養基上的菌落呈光滑型。接種於普通肉湯內,培養12小時,然後接種於大試管斜面瓊膠基上,孵育18小時後,懸於鹽水中,使成需要的濃度。加0.5%的甲醛溶液,放於37°C 24小時,按下列程序注射於3隻體重在2,600克以上的健康家兔內。

表1 家兔免疫程序

注射次數	注射菌量(濕)	間隔天數	注 射 途 徑	備 考
1	0.3 毫 克	3	皮 下	※ 5 天後採血檢定凝集價爲 20,480 倍 連續 3 天共採血 80 毫升
2	0.6 毫 克	3	皮 下	
3	0.3 毫 克	3	靜 脈	
4	0.6 毫 克	3	靜 脈	
5	1.2 毫 克	3	靜 脈	
6	1.8 毫 克	3	靜 脈	× 心臟採血 50 毫升
7	2.4 毫 克	3	靜 脈	
8	3.0 毫 克	3	靜 脈	
9	4.8 毫 克	4	靜 脈	
10	9.6 毫 克	3	靜 脈	
11	20. 毫 克	3	靜 脈	
12	30 毫 克	3	靜 脈	
※13	40 毫 克			
×14	50 毫 克	7	靜 脈	
	凝 集 價	20,480 倍		

(四) 沉澱原的製備

1. 培養物的濾液

將細菌培養於肉湯內，37℃ 14 天孵育，用 Berkeeld “w” 濾器過濾，取其濾液作實驗。

2. 酸性加熱提出法

將斜面培養基上的菌苔，刮至鹽水內，使其濃度與 14 天肉湯培養者相近，加 $\frac{1}{10}$ 當量的鹽酸使成 pH 3.5，在 100℃ 煮沸 1 小時，用氫氧化鈉中和之，使成 pH 7.0—7.2，遠心沉澱 3,000 轉 30 分鐘，取其上清液應用。

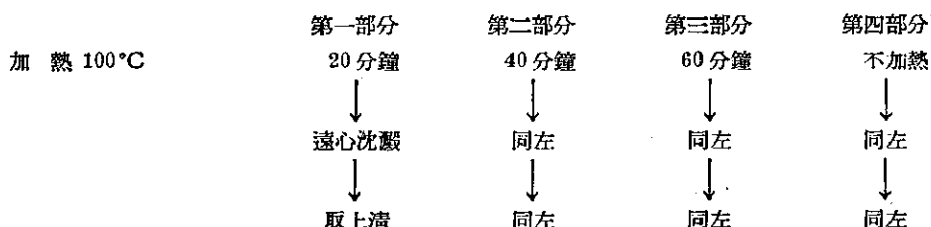
3. 從污染內臟中提出沈澱原

(1) 牛肝 30 克加 18 小時肉湯培養的腸炎桿菌 0.1 毫升，分別置於 35℃ 溫度下 5 天；10 天後提出其沈澱原。

(2) 牛肉 30 克加入 18 小時肉湯培養的腸炎桿菌 0.1 毫升，置於 25℃ 下，5 天，

10天後，分別提出其沈澱原。提出沈澱原的方法如下：

i. 在細菌繁殖的內臟內，加等量鹽水，用乳鉢磨碎之，製成懸液，分4部分進行：



ii. 將各份材料，以鹽酸滴至 pH 3.5，以同法進行；以後取上清液，以氫氧化鈉滴定 pH 至 7.0—7.2。

(五) 沉澱反應：將沉澱原（以下簡稱抗原）及免疫血清（以下簡稱抗體）各以 0.9% 的鹽水，稀釋成需要的濃度。在 0.3 厘米 × 0.3 厘米的小試管內，先放抗體 0.1 毫升，然後取抗原 0.1 毫升，沿管壁徐徐放下。置於 37°C 溫箱內，觀察其接觸面的沉澱環。

結 果

1. 沙門氏菌屬 D 組以傷寒菌、莫斯科菌、都柏林菌作代表，研究它們對腸炎菌的免疫血清呈陽性反應（表 2）。

2. 沙門氏菌屬 A 組、B 組、C 組（以副傷寒桿菌甲、乙、丙為代表），研究它們對腸炎菌的免疫血清呈陰性反應（表 3）。

3. 霍亂弧菌、痢疾菌對抗腸炎菌血清呈陰性反應。

4. 大腸菌對腸炎菌免疫血清呈弱陽性反應（表 2）。

5. 肉湯對腸炎菌免疫血清，與腸炎菌抗原對健康家兔血清呈陰性反應（表 2）。

6. 細菌培養物，用酸性加熱沉澱法所提出的沉澱原，與抗腸炎菌血清沉澱反應的結果與用老培養物的濾過液作沉澱原所得者同。

7. 染菌臟器抗原的提出，100°C 60 分鐘加熱者最敏感，不加熱者最遲鈍，酸性加熱提出者，與加熱提出者相同；進行沉澱反應時，稀釋 20× 及 10× 者反應最強（表 4）。

8. 沉澱反應出現時間，以 37°C 60—120 分鐘最適宜。

9. 染菌臟器，放於 35°C 下 10 天後再提取最好。

10. 沉澱反應進行至 3 小時後，反應環逐漸不明顯，沉澱物彌散，全管混濁。

表2 抗原特殊性的測定

抗原種類	抗體稀釋	抗 原 稀 釋									
		1*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000
腸炎桿菌	1*	4	4	4	4	3	3	2	2	1	0
	1:5	4	3	3	3	3	3	1	1	1	0
	1:10	3	3	2	2	2	2	1	0	0	0
	1:20	2	1	±	0	0	0	0	0	0	0
	1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肉 湯	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大 腸 桿 菌	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 沒有稀釋的抗原或抗體。
4=++++ 強陽性 3=+++ (強中度陽性) 2=++ (弱中度陽性) 1=+ (弱陽性)
±=可疑 0=陰性。

表3 各種沙門氏菌的肉湯培養濾過液與抗腸炎菌血清的沈澱反應

抗 原	抗 體	0×	3×	5×	10×	20×	40×	80×	100×	200×	400×
		0×	3	2	1	0	0	0	0	0	0
傷 寒 菌	5×	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	10×	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	20×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	80×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. moscow</i>	0×	4	4	3	1	1	1	1	0	0	0
	5×	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
	10×	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	20×	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>S. dublin</i>	0×	4	4	3	3	2	2	2	1	0	
	5×	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
	10×	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	20×	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副傷寒菌甲	0×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副傷寒菌乙	0×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副傷寒菌丙	0×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 4 用各種溫度時間所提出的染菌肝臟與牛肉抗原，對抗腸炎菌血清的
沈澱反應強度(以陽性的“+”號數所表示者)的總比較

反應“+”總數與平均 提出抗原之溫度		肝 臟 提 出 抗 原				牛 肉 提 出 抗 原		計	平 均
		35°C× 5 天	35°C× 10 天	25°C× 5 天	25°C× 10 天	25°C× 5 天	25°C× 10 天		
不 加 熱 抗 原		16 (8.0)	21.5 (1.075)	16 (0.8)	12 (0.6)	19 (0.95)	25.5 (1.275)	110	0.92
加 熱 抗 原	100°C×20分	39 (1.95)	35.5 (1.775)	36 (1.8)	45.5 (2.275)	29 (1.45)	39.5 (1.975)	224.5	1.87
	100°C×40分	51 (2.55)	56 (2.8)	48 (2.4)	45 (2.25)	35 (1.75)	53.5 (2.675)	288.5	2.40
	100°C×60分	55 (2.75)	57 (2.85)	52 (2.6)	53.5 (2.675)	38 (1.9)	55 (2.75)	310.5	2.59

此外，我們曾用小白鼠腹腔內注射 18 小時肉湯培養的腸炎菌 0.1 毫升或用食餌法感染。小白鼠死亡後，立即解剖取其肝臟，提出沉澱原；又將肝臟放於 25°C 或 35°C 下，5 天或 10 天後，提出沉澱原。用同法與抗腸炎血清行沉澱反應。其結果，立即提出之肝臟抗原原液與稀釋 10 倍與抗腸炎菌血清的反應為強陽性，孵育後所提出抗原的反應與表 4 同。

又用酸性加熱沉澱法所提出上列材料的沉澱原，對抗腸炎菌血清的沉澱反應的結果與上面結果同。

結 論

檢查沙門氏菌屬食物中毒的樣品時，如不能培養出細菌，或者因細菌培養所需時間太長，延誤診斷與治療時，如能將樣品中細菌菌體的抗原成份用簡單方法提出，進行血清學反應，則可克服此種困難和缺點。我們用加熱方法所提出的耐熱性抗原，具有特異性，可與特異血清發生沉澱反應。現在將初步結果在此地發表，以作同道的參考並希望給予指正。

PRECIPITATION METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF FOOD POISONING

CHOU, P.A. AND LI, Y.T.

Hankow

In view of the difficulty involved in the diagnosis of bacterial food poisoning by the *Salmonella* group with the culturale methods, an attempt has been made to utilize the demonstration of precipitating antigen for the same purpose. Meat and other foods have been artificially infected with organisms of various groups, such as, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* and *Escherichia*, and after varying length of interval, antigens were prepared by the acid treatment. By means of the ring test, it was found that by the use of a potent anti-enteritidis serum, all the infections belonging to the *Salmonella* D group could be detected by positive reaction, while all the rest were negative. Antigen prepared from uninfected foods was also negative. It is suggested that this method might be tried in the diagnosis of *Salmonella* food poisoning.