

对流免疫电泳快速测定白喉杆菌毒力

罗 安 良

(湖南省邵阳地区卫生防疫站)

鉴定新分离的白喉杆菌，或检查由人群中白喉杆菌带菌者所分离的菌株时，毒力实验常作为致病能力的最后依据。测定白喉杆菌的毒

力常用动物试验和 Elek 氏平板法^[1]。前者可因动物机体敏感性不同而有差异，后者因培养基制造繁琐而费时。

本试验采用对流免疫电泳^[2]测定新分离的白喉杆菌的毒力。方法简便,快速,准确,敏感性较强,特异性高,适用于大批标本的测定。

材料与 方法

一、材料

1. 产毒培养基: 以豚旦白胨配制 pH7.8 的肉膏汤,高压灭菌,加 10% 无菌 (60℃ 30 分灭活)羊血清,分装于小试管约 2 毫升。

2. 培养液的制备: 大量刮取吕氏血清斜面 (或 10% 血清营养琼脂平皿) 上的白喉杆菌新鲜菌苔,接种于产毒培养基内, 37℃ 培养 24—48 小时后,经 58℃ 水浴 30 分钟,冰箱保存备用。

3. 白喉抗毒素: 系武汉生物制品所生产,批号 792—7,每安瓿含量为 10,000 单位。

4. 标准白喉类毒素: 武汉生物制品所生产,含量为 7300 絮状单位(L_t)。

5. 电泳缓冲液: pH 8.6, 离子强度为 0.1M 巴比妥钠-盐酸缓冲液。

二、方法

在纯化琼脂与缓冲液配制成 1% 的琼脂凝胶板上,并排打孔,孔径和孔距均为 4 毫米。以培养液作为抗原,以无菌蒸馏水稀释白喉抗毒素至 800 单位/毫升作为抗体。分别将培养液滴入靠负极孔内,白喉抗毒素滴入靠正极孔内,然后置电泳槽内电泳,电流按板宽 3.5—4 毫安/厘米计算,电压为 100—120 伏。电泳 2 小时后,在斜射光线黑色背景下观察结果,凡两孔之间出现白色沉淀线者为阳性,否则为阴性。如沉淀线不甚明显,可放置冰箱过夜后再行观察。

实验完毕,琼脂板及有关用品及时消毒处理。

结果与 分析

1. 以流行区白喉病人及由带菌者所分离的 43 株形态典型、生化反应符合的白喉菌株用对流免疫电泳法进行实验,以传统的 Elek 氏平板法作为对比,以假白喉杆菌作为阴性对照。比较结果见表 1、2。

表 1 两种菌株毒力实验方法结果的比较

菌株类别	实验株数	Elek 氏平板法		对流免疫电泳法	
		阳性(%)	阴性(%)	阳性(%)	阴性(%)
白喉杆菌	43	39(90.7)	4(9.3)	40(93.02)	3(6.08)
假白喉杆菌	7	0(0)	7(100)	0(0)	7(100)

表 2 两种方法测定结果的相符情况

		Elek 氏平板法		合计
		阳性	阴性	
对流免疫电泳法	阳性	39	1	40
	阴性		3	3
合计		39	4	43

以上结果经统计处理, $\chi^2=0.155$, $p>0.05$, 两法无显著性差异,两法符合率为 97.67%, 阴性两法符合率为 100%。Elek 氏平板法阴性而对流免疫电泳法阳性的为 1 株,经家兔皮内接种毒力试验仍为阳性。两法测定均阴性的为 3 株,经家兔皮内接种毒力试验仍为阴性。表 1 中两种方法测定 7 株假白喉杆菌毒力均为阴性,说明此方法特异性高,无交叉沉淀反应。

2. 抗毒素适当浓度的选择: 将白喉抗毒素用无菌蒸馏水稀释成每毫升含量为 100、200、300、500、600、800、1000 单位,与白喉杆菌 18 号及 35 号菌株的培养液进行抗毒素适当浓度的选择测定。结果见表 3。

表 3 抗毒素适当浓度选择测定结果

菌株号	抗毒素含量 (u/ml)						
	100	200	300	500	600	800	1000
18 号	-	-	+	++	++	+++	++++
35 号	-	±	+	++	++	+++	++++

注: (-)表示未见沉淀线, (±)表示可疑, (+)表示微弱可见, (++)表示沉淀线明显可见, (+++)表示沉淀线增粗, (++++表示沉淀线增粗并面积增宽。

以上结果表明,当抗毒素的含量在 300—1000 单位/毫升范围内,都可呈现可见的沉淀线,抗毒素最适当浓度应为 500—800 单位/毫升。

3. 对流免疫电泳法的敏感度测定: 将标准白喉类毒素(7300L_t)用缓冲液逐倍稀释成 100、

50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.195、0.092L_t，以不同浓度的标准白喉类毒素与抗毒素(500 单位/毫升)进行电泳，测定结果表明，当类毒素含量为 0.39L_t 时，仍可出现微弱可见的免疫沉淀线。说明对流免疫电泳法用于白喉杆菌毒力的测定敏感性较强，只要当白喉杆菌在产毒培养基内产生的外毒素的含量相当于类毒素 0.39L_t 以上，均可以测出。

4. 将 22 株白喉杆菌培养物作几种不同处理：冰箱保存 22 天、58℃ 水浴 30 分钟、100℃ 水浴 5 分钟，再行电泳。其结果见表 4。

表 4 22 株菌培养液电泳结果

	冰箱保存22天		58℃水浴 30'		100℃ 水浴 5'	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
结果	22	0	22	0	0	22

以上结果说明，白喉杆菌所产生的外毒素，经过较长时间的低温保存及 58℃ 水浴 30 分钟

的处理，其抗原性并无改变。

小 结

白喉杆菌所产生的外毒素是它在生长繁殖过程中的一种代谢产物，具有高度的抗原性。因此，只要携带产毒基因噬菌体的白喉杆菌在合适的液体培养基中生长时^[3]，即有一定量的毒素产生，故可以测其毒力。

目前，对流免疫电泳技术已广泛应用于 HB_sA_g、AFP、流脑诊断等各方面，因此，用此法测定白喉杆菌毒力，易于推广，可作为白喉杆菌毒力快速测定的实验方法。

参 考 文 献

- [1] 上海市卫生防疫站编：《卫生防疫检验（细菌检验）》，p183，上海科学技术出版社，1979。
- [2] 上海第二医学院主编：《医用微生物学》，p150，人民卫生出版社，1978。
- [3] 王季午主编：《传染病学》（第二版），p228，上海科学技术出版社，1979。