

SPA-IgG 直接免疫荧光菌团法应用于志贺氏菌的检定

倪庆文

(北京铁路局中心卫生防疫站)

本文利用金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 所具有的与人及多种哺乳动物 IgG 的 Fc 段非特异结合的特性^[1], 和免疫荧光技术相结合, 对 SPA 结合志贺氏菌抗血清的 IgG, 以及异硫氰酸荧光黄 (FITC) 标记 SPA-IgG 及其在志贺氏菌检定中的应用, 进行了初步探讨, 现将结果报道如下。

材料和方 法

(一) 菌种

宋氏、福氏、鲍氏志贺氏菌, 大肠杆菌, 变形杆菌, 沙门氏菌, 肠球菌, 枯草杆菌均由卫生部药品生物制品检定所提供。

(二) SPA-IgG 结合物的制备

宋氏, 福氏 1—6 型、鲍氏 1—6 型志贺氏菌分别免疫家兔, 获得的抗血清 (效价 1:640 以上) 用 DEAE 纤维素离心沉淀法^[2]提取 IgG。将 SPA 与抗志贺氏菌血清提取的 IgG 等量混合, 于 37°C 水浴 1 小时 (振摇), 即制成 SPA-IgG 结合物, 低温保存备用。

(三) FITC 标记 SPA-IgG 结合物的制备

FITC 分别标记宋氏、福氏 1—6 型、鲍氏 1—6 型志贺氏菌 SPA-IgG 结合物, FITC 与 SPA-IgG 结合物按 1:40 计算。用室温搅拌法制成 FITC-SPA-IgG 结合物荧光抗体。其 F/P 克分子比值为: FITC-SPA-IgG_(宋氏) 1:1.1; FITC-SPA-IgG_(福氏 1—6 型) 1:1.1; FITC-SPA-IgG_(鲍氏 1—6 型) 1:1.7。

(四) SPA-IgG 荧光菌团法的操作程序

在清洁的双凹载片上设 A、B 两点, 各点加一滴用胰酶水稀释的 SPA-IgG 荧光抗体 (SPA-抗宋氏、福氏、鲍氏志贺氏菌的 IgG 荧光抗体, 按它们的使用效价等量混合), 取急性腹泻病人粪标本接种于 A 点, 充分混匀, 再从 A 点

移种到 B 点混匀, 载片置湿盒内 37°C 培养 3—4 小时, 用“CARLZEISSJENA”荧光显微镜, 6.3×16 倍, 透射光和落射光明视野, 可观察到荧光菌团的形态结构和亮度。荧光菌团的有无以 (+)、(-) 表示。荧光菌团阳性 (+): 荧光菌团结构疏松, 不规则, 大小不一, 似棉絮或云雾状, 可见明显的纤丝状结构, 呈现明亮的绿色荧光 (图 1)。荧光菌团阴性 (-): 看不到典型的荧光菌团, 无荧光。荧光菌团 (+) 的混悬液再经分离培养和生物化学、血清学检定。

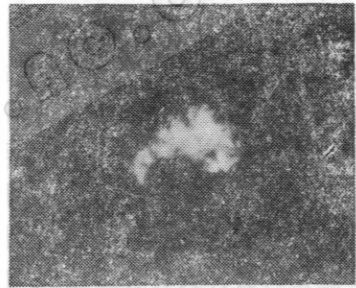


图 1 志贺氏菌的荧光菌团

试 验 结 果

(一) SPA-IgG 荧光抗体的敏感性观察

1. 对志贺氏菌检测的敏感性: 宋氏、福氏₂及鲍氏 2 型志贺氏菌形成的典型荧光菌团, 在每毫升菌液中含菌 10 个作用 4 小时, 含菌 80 个作用 2 小时, 含菌 800 个作用 1 小时均显阳性。结果说明了 SPA-IgG 荧光抗体检测志贺氏菌的作用时间与菌量呈反比关系。

2. 对人工模拟粪标本检测的敏感性: 在健康人粪悬液 (低速离心除粪渣) 中加入不同稀

本工作得到铁道部北京铁路总医院检验科陆静大夫提供标本, 特此感谢。

表 1 对人工模拟粪标本中志贺氏菌检测的敏感性

志贺氏菌数*	荧光菌团法			分离培养法		
	宋氏	福氏 2a	鲍氏 2型	宋氏	福氏 2a	鲍氏 2型
8×10^3	+	+	+	+	+	+
8×10^2	+	+	+	+	+	+
0.8×10^2	+	+	+	+	+	+
0.4×10^2	+	+	+	+	+	+
0.2×10^2	-	-	-	-	-	-
0.1×10^2	-	-	-	-	-	-

* 在每毫升含杂菌 28.3×10^7 粪悬液中所含的志贺氏菌数。

表 2 SPA-IgG 荧光抗体特异性实验结果

菌株名称	株数	FITC-SPA-IgG(宋氏)	FITC-SPA-IgG(福氏)	FITC-SPA-IgG(鲍氏)
宋氏志贺氏菌	2	+	-	-
福氏志贺氏菌	13	-	+	-
鲍氏志贺氏菌	8	-	-	+
大肠杆菌	5	-	-	-
变形杆菌	3	-	-~±	-~±
沙门氏菌	2	-	-	-
肠球菌	1	-	-	-
白色葡萄球菌	1	-	-	-
枯草杆菌	1	-~±	-	-
粪悬液中的杂菌	1	-	-	-

表 3 荧光菌团法和培养法检出志贺氏菌的比较

标本数 (份)	荧光菌团法		培养法		符合数		荧光菌团法(+) 培养法(-)		荧光菌团法(-) 培养法(+)		不符合数	
	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%
225	75	33.3	59	26.2	205	91.1	18	8.0	2	0.9	20	8.9

注: 荧光菌团法与常规培养法所分离到的志贺氏菌, 菌型均一致。

度的志贺氏菌培养物 (37°C, 18 小时), 制成人工模拟粪标本。该标本按荧光菌团法操作, 取其荧光菌团进行分离培养, 结果在每毫升粪悬液 (含杂菌数 28.3×10^7) 中含有 40 个以上志贺氏菌, 作用 3 小时, 荧光菌团均呈阳性。该菌团再经分离培养仍能分离出典型的志贺氏菌 (见表 1)。

(二) SPA-IgG 荧光抗体最佳稀释度的选择

按 10 倍稀释的志贺氏菌悬液和不同稀释度的 SPA-IgG 荧光抗体之间, 经方阵法定选 1: 50—80 为最佳使用浓度 (2 个单位)。

(三) SPA-IgG 荧光抗体的特异性实验

1. 交叉反应: 用 2 个单位的 SPA-IgG 荧光抗体按荧光菌团法进行检测, 结果 SPA-IgG 荧光抗体对 37 株肠道菌均无明显的交叉反应, 不能形成典型的荧光菌团。变形杆菌和枯草杆菌虽偶见“±”反应, 但菌团结构不典型, 与志贺氏菌的荧光菌团易于识别 (见表 2)。

2. 阻断实验: SPA-IgG 荧光抗体预先经抗兔 r 球蛋白处理后, 再与特异性抗原作用, 按荧光菌团法观察荧光菌团能否形成, 结果为阴性。说明 SPA-IgG 荧光抗体的 IgG 被抗兔 r 球蛋白吸收后, 再与相应的抗原作用就不能形

成特异性的荧光菌团。

(四) SPA-IgG 荧光菌团法与常规荧光抗体法的比较

在健康人粪悬液中加入不同稀释度的宋氏志贺氏菌培养物,制成每毫升粪悬液(含杂菌数为 12.3×10^7)中含 5×10^3 、 1×10^3 、 5×10^2 、 5×10 、 2.5×10 个宋氏志贺氏菌的五个浓度,比较两种方法检测志贺氏菌的敏感性。结果每毫升粪悬液中含 50 个志贺氏菌时,荧光菌团法显阳性,而常规荧光抗体法显阴性。说明荧光菌团法较常规荧光抗体法敏感。

(五) SPA-IgG 荧光菌团法与常规培养法的比较

用荧光菌团法和常规培养法同时检测 225 份粪标本,结果荧光菌团法的检出率为 33.3%,常规培养法为 26.2%,二者的符合率为 91.1% (表 3)。

讨 论

1. FITC 标记 SPA-IgG 结合物,组成 FITC-SPA-IgG 复合物,将此荧光标记物做为一种试剂,在液体培养基中与特异性抗原相遇时,则抗

原与 IgG 的 Fab 段结合点结合,从而导致免疫学反应,形成 FITC-SPA-IgG 抗原结合物。在荧光显微镜下可观察到明亮绿色荧光的液体菌团。其中 SPA 分子具有载体协同作用,因此该方法具有更高的特异性和敏感性。由于 SPA-IgG 是一复合物,其结合的 FITC 较之单结合 IgG 要多得多,所以 FITC-SPA-IgG 抗原结合物发出的绿色荧光要明亮得多。由于组成的液体荧光菌团体积显著增大而且清晰,故便于观察。

2. 从 225 份标本的检测结果看,荧光菌团法不仅检出率明显高于常规培养法,而且漏检率 (0.9%) 也低于常规培养法 (22.8%),说明常规培养法存在着很大的假阴性问题。应用 SPA-IgG 荧光菌团法在很短时间内 (3—4 小时) 就可以得出比较准确的初报,同时能够获得活菌并检定出菌型,因此认为本法是一个比较快速、简单、敏感、特异的免疫学方法。该法既可节省抗血清又可节省人力、物力和时间。

参 考 文 献

- [1] 张颖悟等: 国外医学免疫学分册, 3(2): 65, 1980。
- [2] 倪庆文: 微生物学通报, 8(5): 222, 1981。