

酶标 SPA 染色法快速检出感染组织中炭疽杆菌的研究

徐志凯 汪美先

(第四军医大学微生物教研室, 西安)

利用炭疽杆菌毒株在动物机体内可形成荚膜的特性, 本文采用酶标葡萄球菌 A 蛋白染色法(酶标 SPA 法), 检测人工感染动物组织中的炭疽杆菌, 并与荧光抗体法及常规培养法作了比较。

材 料 和 方 法

1. 实验动物: 小白鼠(昆明种) 50 只, 体重为 8—12g/只; 家兔(日本大耳白) 7 只, 体重为 1.85—1.9 Kg/只。

2. 感染菌株、剂量及途径: 用能产生荚膜的炭疽杆菌弱毒株感染小白鼠, 剂量为 80 万活菌/只; 用炭疽杆菌强毒株畜羊系感染家兔, 剂量为 250 MLD/只。感染均通过皮下进行。

3. 抗炭疽荚膜血清: 以带荚膜炭疽杆菌免疫家兔制备。

4. 荧光抗体: 异硫氰酸荧光素标记羊抗兔 IgG。上海生物制品研究所出品, 工作浓度为 1:20。

5. 酶标 SpA (工作浓度为 1:150)、酶底物、稀释液及洗涤液见文献[1]。

6. 检测方法: 将动物于感染后的不同时间解剖。取其脏器组织作常规细菌学分离培养。同时制成组织印片, 经 10% 中性福尔马林固定 15 分钟后进行检测。酶标 SpA 法染色程序如下: ①用 1% H₂O₂ 处理组织印片 10 分钟, 洗涤待干。②加抗炭疽荚膜血清, 置 37℃ 湿盒中孵育 30 分钟, 洗涤待干。③加酶标 SpA, 再置 37℃ 湿盒中孵育 30 分钟, 洗涤待干。④加酶底物后置 37℃ 湿盒中避光显色 10 分钟, 洗涤待干后镜检。

结 果

一、酶标 SpA 法检测组织中炭疽杆菌的形态学特征

感染组织印片的酶标 SpA 及荧光抗体染色结果见图 1—4。在酶标 SpA 染色组织印片中识别炭疽杆菌的主要根据, 是炭疽杆菌的荚膜被染成棕黄色或深棕色; 荚膜不够完整的仅作为诊断参考; 无荚膜而菌体被染成均匀淡黄色的不能确定为炭疽杆菌。

二、酶标 SpA 法检测感染组织中炭疽杆菌的敏感性及其特异性

1. 敏感性检验: 取感染组织研磨, 稀释后进行滴定, 测出每毫升组织悬液中的细菌数。将不同浓度的组织悬液涂片后进行染色检查。结果无论是酶标 SpA 法或荧光抗体法, 一般每毫升组织悬液中含有 1000—5000 个炭疽杆菌时, 即可被检出。

2. 特异性检验: 取其他几种细菌单独或分别与炭疽杆菌混合感染的小白鼠组织, 进行检查, 结果见表 1。从感染组织印片的染色结果看, 纯菌感染中, 2 株炭疽杆菌感染者均为阳性, 1 株巨大杆菌被机体滤除, 其他细菌感染者均未出现假阳性。混合感染中, 同样表明巨大杆菌被滤除, 其他细菌虽与炭疽杆菌同时存在, 但并不影响炭疽杆菌的检出。上述结果均由常规培养法证实。

本文工作得到过祥豹副教授、薛采芳讲师的具体辅导; 检测感染家兔组织的部分工作得到军事医学院庄汉澜副教授等的指导和帮助; 文中统计数据蒙郭祖超教授审阅。一并致谢。

表 1 两种染色法检测人工感染动物组织中炭疽杆菌的特异性试验

| 感 染 菌 种 | | 试验株数或组数 | 染 色 结 果* | | 常规培养法结果 |
|------------------|-----------|---------|---------------|---------------|-----------|
| | | | 酶标 SpA 法 | 荧光抗体法 | |
| 纯 菌 感 染 | 炭疽杆菌 | 2 | +++ / ++, +++ | +++ / ++, +++ | 炭疽杆菌 |
| | 蜡样杆菌 | 2 | - / ±, + | - / ±, + | 蜡样杆菌 |
| | 枯草杆菌 | 2 | - / ± | - / ± | 枯草杆菌 |
| | 巨大杆菌 | 1 | - | - | - |
| | 根样杆菌 | 1 | - / ± | - / ± | 根样杆菌 |
| | 产气荚膜杆菌 | 1 | - / ± | - / ± | 产气荚膜杆菌 |
| | 肺炎球菌 | 1 | - | - | 肺炎球菌 |
| 混 合 感 染 | 炭疽杆菌+蜡样杆菌 | 1 | ++ / ++, +++ | +++ / +++ | 炭疽杆菌+蜡样杆菌 |
| | 炭疽杆菌+枯草杆菌 | 1 | ++ / ++, +++ | +++ / ++, +++ | 炭疽杆菌+枯草杆菌 |
| | 炭疽杆菌+巨大杆菌 | 1 | ++ / ++, +++ | ++ / +++ | 炭疽杆菌 |
| | 炭疽杆菌+根样杆菌 | 1 | ++ / ++, +++ | ++ / ++, +++ | 炭疽杆菌+根样杆菌 |

* 分子表示荚膜厚度,分母表示荚膜或菌体着色程度

表 2 三种方法检测感染动物组织中炭疽杆菌结果

| 被 检 组 织 | | 份 数 | 阳 性 份 数 (阳 性 率 %) | | |
|-----------------------|----|-----|-------------------|-----------|-----------|
| | | | 酶 标 SpA 法 | 荧 光 抗 体 法 | 常 规 培 养 法 |
| 小 白 鼠 组 织 | 皮下 | 50 | 50(100) | 50(100) | 50(100) |
| | 脾 | 50 | 41(82) | 40(80) | 42(84) |
| | 肝 | 50 | 36(72) | 37(74) | 43(86) |
| | 心血 | 50 | 32(64) | 32(64) | 32(64) |
| | 脑 | 50 | 27(54) | 27(54) | 25(50) |
| 家兔组织 | | 63 | 21(33) | 21(33) | 21(33) |
| 总 计 | | 313 | 207(66) | 207(66) | 213(68) |

三、酶标 SpA 法与荧光抗体法及常规培养法的比较

从表 2 看出,同样的 313 份人工感染炭疽杆菌的动物组织标本,酶标 SpA 法、荧光抗体法及常规培养法的阳性检出率分别为 66%、66% 和 68%,相差不显著。酶标 SpA 法检测结果与荧光抗体法及常规培养法的符合率分别为 96.17%、94.25%。通过二项分布中 95% 可信限的比较,说明三种方法基本一致。

讨 论

本文所述酶标 SpA 法的血清学基础是炭疽杆菌荚膜抗原抗体反应,即荚膜肿胀反应。该反应及炭疽荚膜荧光抗体染色法具有较高的特异性⁽²⁾。文献中曾报道用该法鉴定 NaHCO₃ 平板加 CO₂ 培养的其他需氧芽胞杆菌时,与巨大

杆菌有交叉反应^(3,4)。其原因是某些巨大杆菌在上述条件下也可生成荚膜,且其荚膜亦含有与炭疽杆菌荚膜同样的 D-谷氨酸多肽成份⁽⁵⁾。本文在用酶标 SpA 法检查上述培养条件下的其他需氧芽胞杆菌时,亦见到巨大杆菌有着色的荚膜。但是,将本方法用于组织标本的检测时,结合细菌的致病性与形态学特征进行判断,则可避免交叉反应,清楚地辨别感染组织中的炭疽杆菌(表 1)。在感染组织中,绝大多数炭疽杆菌都具有清晰而着色明显的荚膜,而巨大杆菌则可能被机体滤除,其他几种细菌虽可能使小白鼠感染或致死,但均未见有着色的荚膜。即使是混合感染,也并不影响组织中炭疽杆菌的检出。

用两种染色法检查组织中炭疽杆菌时,采取标本的时机很重要。死亡动物应及时解剖。

如置室温中(18—22℃)24小时后解剖,则组织中炭疽杆菌荚膜变薄,染色变淡;60小时后再解剖,炭疽杆菌荚膜结构即已基本丧失。因此如现场检测有困难时,也应尽量采取新鲜组织,制成印片固定后保存。经本文所述方法固定后的印片,置4℃冰箱保存4个月后检查,仍可清晰地显示带荚膜的炭疽杆菌。制备组织印片时应尽可能菲薄,因为印片中组织细胞或细菌太多时,往往会影影响染色和结果判定。

本研究证明,酶标 SpA 法的敏感性,特异性及快速性(2—3 小时内可得出结果)均与荧光抗体法相似,检测结果符合率很高。这与作者用上述方法检测炭疽病人血清荚膜抗体所得结

果一致^[1]。由于酶标 SpA 法具有不需要荧光显微镜、标本片易于保存、适用范围较广等优点,因此它可代替荧光抗体法,便于基层单位推广试用,并可早于常规培养法作出诊断。

参 考 文 献

- [1] 徐志凯等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4: 253, 1982.
- [2] Cherry, W. B. et al.: *Zbl. Bakt. I. Orig*, 175:582, 1959.
- [3] Tomov, A. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig*, 243: 119, 1979.
- [4] 甄宏太等: 微生物学报, 19: 439, 1979.
- [5] 张宽厚: 《细菌生理学》,人民卫生出版社,北京,第10页,1962年。