

# 大肠杆菌新菌毛抗原的研究

## · VI. 用凝集反应检验菌毛抗原

陈翠珍 房海

(河北农业技术师范学院, 昌黎 066600)

**摘要** 为了建立对新菌毛抗原  $F_{1987}$  的检验方法, 本试验采用了玻板凝集反应和反向间接血凝试验及葡萄球菌 A 蛋白(SPA)协同凝集试验等凝集性试验方法; 经用不同菌毛抗原菌株及对照试验等, 证明了三种方法的可行性。玻板凝集反应和 SPA 协同凝集试验可用于  $F_{1987}$  新菌毛抗原的定性试验; 反向间接血凝试验不仅能用于定性, 而且能用于定量。三种方法均具有特异性, 且简便易操作, 便于广泛应用。

**关键词** 大肠杆菌; 新菌毛抗原  $F_{1987}$ ; 凝集反应; 检验

凝集反应用于颗粒性抗原(包括用可溶性抗原制备的致敏颗粒)的检验, 以及用血清致敏颗粒对可溶性抗原的检验, 已成为对一些病

原微生物鉴定及传染病诊断的常规血清学技

---

国家自然科学基金资助项目。

术。我们本次将其应用于对一种大肠杆菌新菌毛抗原 $F_{1987}$ 的检验,包括有玻板凝集反应、反向间接血凝反应和葡萄球菌A蛋白(SPA)协同凝集反应等,取得了满意的检验结果。现将试验结果报告如下。

## 材料与方 法

### (一) 供试菌株

1. 大肠杆菌待检菌株:两株大肠杆菌记作

No. 1 和 No. 2,分离自腹泻病死的猪子病例,均产生一种新菌毛抗原 $F_{1987}$ 。

2. 大肠杆菌对照菌株:产生不同种菌毛抗原的各大肠杆菌标准株,及分离自不同动物并已知均不产生菌毛抗原的大肠杆菌分离株,各菌株抗原构造及来源见表1。

3. 葡萄球菌:富含A蛋白的葡萄球菌标准株(Cowan I)和不含A蛋白的葡萄球菌标准株(Wood46),均引自中国药品生物制品检定所。

表1 大肠杆菌对照菌株的菌毛抗原构造及其来源表

对照菌株	编号	菌毛	抗原构造	来源
标准株	44563	$K_{88ac}$	$O_8; K_{87}; K_{88ac}; H_{19}$	中国药品生物制品检定所
	44564	$K_{88ab}$	$O_{141}; K_{88ab}; K_{88ab}; H_4$	中国药品生物制品检定所
	83912	$K_{99}$	$K_{12}; H_{99}$	中国兽药监察所
	83915	987P	$O_9; K_{103}; 987P; NM$	中国兽药监察所
	83919	$F_{41}$	$O_{101}; K_{30}; F_{41}; H_-$	中国兽药监察所
分离株	I	—	$O_{149}$	猪腹泻病例
	II	—	$O_{23}$	貂腹泻病例
	III	—	$O_{60}$	貉腹泻病例
	IV	—	$O_{20}$	兔败血症病例
	V	—	$O_3$	鸡败血症病例

### (二) 血清

1. 菌毛抗原因子血清:分别用 $K_{88}$ (44563)、 $K_{99}$ (83912)、987P(83915)、 $F_{41}$ (83919)及 $F_{1987}$ (No. 1 和 No. 2)菌株,先分别免疫家兔制备相应OK抗血清,再以凝集吸收试验制备相应菌毛抗原因子血清,经交叉玻片凝集试验检验特异性合格后备用。

2. 健兔血清:取3只健康成年家兔血清等量混合,经与 $K_{88}$ 、 $K_{99}$ 、987P、 $F_{41}$ 、 $F_{1987}$ 菌毛抗原菌株做玻片凝集检验均阴性,合格备用。

### (三) 玻板凝集试验方法

将前述大肠杆菌株分别接种于Minca( $K_{88}$ 菌株接种于LB琼脂)培养基<sup>[1,2]</sup>,经37℃ 20h培养后,用0.01mol/L pH 7.1 PBS洗下并稀释成721分光光度计670nm波长10%透光率的菌悬液,作为待检抗原;分别取待检抗原液与1:10稀释的 $K_{88}$ 、 $K_{99}$ 、987P、 $F_{41}$ 、 $F_{1987}$ 等菌毛抗

原因子血清在玻板上等量混合,做相应的交叉凝集试验,按常规标准“卅、卅、卅、十、—”观察记录结果,以出现明显凝集(卅)判为同菌毛抗原型,在混匀后1分钟内判定结果。

### (四) 反向间接血凝试验

1. 抗体致敏血球的制备:首先制备10%的戊二醛化绵羊红血球悬液,再用No. 1( $F_{1987}$ )菌毛抗原因子血清制备抗体致敏红血球,此致敏血球最后用1%健兔血清生理盐水稀释成0.75%浓度,以0.01%硫柳汞防腐备用<sup>[3]</sup>。

2. 菌毛抗原制备:将大肠杆菌No. 1( $F_{1987}$ )株同玻板凝集试验中的方法,制备成10%透光率菌悬液后,置60℃水浴作用30分钟脱菌毛,经6000r/min离心30min取上清液作为反向间接血凝试验用的菌毛抗原。

3. 反向间接血凝试验方法:

(1)反向间接血凝效价测定:用微量法做反

向间接血凝试验,先将 No. 1(F<sub>1987</sub>)大肠杆菌的离心上清液菌毛抗原用 1% 健免血清生理盐水在微量血凝板上做原液、1:2、1:4、1:8……的倍比稀释,最后一孔为 1% 健免血清生理盐水作对照,每孔约 0.025ml,然后各孔等量加入上述 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球,在微量振荡器上混匀后,室温下作用 120min 观察判定结果,以仍能呈现明显凝集(++)的菌毛抗原最高稀释倍数判为反向间接血凝效价。

#### (2) 对照试验:

① 健免血清致敏血球对照:用前述健免血清,按同样的方法制备健免血清致敏血球后,以此致敏血球代替 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球,按同样的微量法做对 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛抗原的反向间接血凝试验。

② 其它大肠杆菌株对照:取除 No. 1(F<sub>1987</sub>)外的各大肠杆菌株,制备相应抗原液后,分别与 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球做反向间接血凝试验。

4. 反向间接血凝抑制试验:将 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清在微量血凝板上用 1% 健免血清生理盐水做原液、1:2、1:4……的倍比稀释,最后一孔为 1% 健免血清生理盐水作对照,然后每孔中等量加入上述的 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛上清抗原液(做 1:100 倍稀释),混匀后置 37℃ 恒温下作用 15 分钟,再加入 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球,混匀后置室温下 2h,同上述方法观察判定结果。

5. 用不同时间培养物做反向间接血凝试验:将 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌株定量接种 Minca 液体培养管中,共接种 4 管,均置 37℃ 恒温培养,于培养后的 6、12、18、24h 各取出一管同上法做 60℃ 加热 30min 处理,离心取上清液作为待检菌毛抗原,同上述方法与 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球做微量反向间接血凝试验,以反向间接血凝价作为菌毛抗原表达能力的指标。

#### (五) SPA 协同凝集试验

1. 抗体标记 SPA 的制备:取上述的葡萄球菌 SPA<sup>+</sup>(Cowan 1)和 SPA<sup>-</sup>(Wood46)两菌株,制备成 10%(V/V)菌悬液,然后用大肠

杆菌 K<sub>88</sub>、K<sub>99</sub>、987P、F<sub>41</sub>和 F<sub>1987</sub>(No. 1)菌毛因子血清,分别标记 SPA<sup>+</sup>和 SPA<sup>-</sup>菌株,最后制成 1%(V/V)血清致敏葡萄球菌悬液即为 SPA 试剂;同样,用健免血清标记 SPA<sup>+</sup>和 SPA<sup>-</sup>菌株以供对照检验<sup>[4]</sup>。

2. 协同凝集试验及结果判定:分别将大肠杆菌株接种于 Minca(除 K<sub>88</sub>株接种于 LB 琼脂外)培养基,置 37℃ 培养 20h 供试。方法为先将 SPA 试剂分别滴于玻片上,然后用接种环取供试大肠杆菌培养物少许即刻与 SPA 试剂混匀,在 2min 内观察判定结果,以出现明显凝集(++)者判为阳性反应<sup>[4]</sup>。

3. 显微镜检查:取抗血清及健免血清分别标记的 Cowan 1(SPA<sup>+</sup>)、Wood46(SPA<sup>-</sup>)株试验所出现的协同凝集阳性及阴性反应标本,待结果明显出现后迅速涂开,自然干燥后做革兰氏染色镜检葡萄球菌与大肠杆菌的凝集情况。

## 结果与讨论

### (一) 玻板凝集反应

K<sub>88</sub>、K<sub>99</sub>、987P、F<sub>41</sub>、F<sub>1987</sub>等菌毛抗原菌株分别与相应因子血清呈现明显凝集(++),反应出现快,在 1min 内即可判定,结果明显易观察。其中的 No. 1 和 No. 2 两个同种菌毛(F<sub>1987</sub>)抗原株间存在同强度的交叉凝集(++),其余各不同菌毛抗原株间均无交叉凝集现象;对照用的猪(O<sub>149</sub>)、貂(O<sub>29</sub>)、貉(O<sub>60</sub>)、兔(O<sub>20</sub>)、鸡(O<sub>5</sub>)等 5 个已知均无菌毛抗原产生的菌株,与任何菌毛因子血清也均无凝集现象。显然,玻板凝集应用于 F<sub>1987</sub>新菌毛抗原的检出,仍为一种简便易行的方法。试验时,除了用待检菌悬液与血清等量混合外,也可直接用接种环取培养物与血清混合。但玻板凝集试验方法一般只用于初步的定生试验。

### (二) 反向间接血凝试验

No. 1(F<sub>1987</sub>)菌株毛抗原与相应因子血清致敏的绵羊红血球呈现良好凝集,反向间接血凝效价为 1:262144。在对照检验中,该菌毛抗原与健免血清致敏血球无凝集作用;除 No. 1

菌株外,其它菌株 K<sub>88</sub> (44563、44564)、K<sub>99</sub> (83912)、987P(83915)、F<sub>41</sub> (83919)和 No. 2 株 (F<sub>1987</sub>)以及猪 (O<sub>149</sub>)、貂 (O<sub>29</sub>)、貉 (O<sub>60</sub>)、兔 (O<sub>20</sub>)、鸡 (O<sub>5</sub>)等菌株的上清抗原液,其中的 No. 2 菌株(F<sub>1987</sub>)与 No. 1 株(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球的反向间接血凝效价为 1 : 131072,比用 No. 1 菌株做的相应效价低一个滴度,表明了同种菌毛抗原的特异性反应;F<sub>41</sub> (83919)菌株与 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清致敏血球也出现了效价为 1 : 256 的凝集现象,比用 No. 1 菌株做的相应效价低 10 个滴度;其余菌株均无凝集现象。为了澄清 F<sub>41</sub> (83919)菌株反应的性质,又用了 No. 1(F<sub>1987</sub>)因子血清致敏血球和健兔血清致敏血球及不致敏的醛化血球同时与 F<sub>41</sub> (83919)菌毛抗原做对比检验,结果 F<sub>41</sub> 菌毛抗原与此三种血球均发生凝集,对 No. 1 (F<sub>1987</sub>)株菌毛因子血清致敏血球和不致敏的醛化血球凝集价均为 1 : 256,对健兔血清致敏血球为 1 : 64;表明凝集是非特异的。

另一方面,在用 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛因子血清做的反向间接血凝抑制试验中,呈现良好的抑制作用,其抑制效价为 1 : 80,进一步表明了 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌毛抗原与相应因子血清致敏血球的反向间接血凝作用是特异的。

在用液体培养不同时间的 No. 1(F<sub>1987</sub>)菌株生长物与相应菌毛因子血清致敏血球所做的反向间接血凝试验中,均呈现良好凝集,其凝集效价分别为 6 小时和 12 小时培养物均为 1 : 2048,18 小时培养物为 1 : 16384,24 小时培养物为 1 : 65536。结果提示,为方便和快速检出,可用液体培养方法,培养 6 小时后的生长物即可用于试验测定。

根据试验结果初步认为,反向间接血凝用于检验 F<sub>1987</sub> 菌毛抗原具有特异性强、敏感性高等特点,而且抗体致敏血球可以较长时间保存,若冻干存放则使用更为方便。本方法不仅用于

定性,更重要的是可以根据反向间接血凝价的高低用于定量,而且试验的可重复性好。

### (三) SPA 协同凝集试验

用 K<sub>88</sub>、K<sub>99</sub>、987P、F<sub>41</sub>、F<sub>1987</sub> (No. 1 株)菌毛因子血清标记的葡萄球菌 SPA<sup>+</sup> (Cowan 1) 所制备的 SPA 试剂,与相应菌毛抗原株均呈现良好凝集(卅~卅卅),而标记的葡萄球菌 SPA<sup>-</sup> (Wood46) 以及用健兔血清标记的葡萄球菌 SPA<sup>+</sup> (Cowan 1) 和 SPA<sup>-</sup> (Wood46) 则与各菌株均无凝集。

在试验中镜检发现,协同凝集试验阳性反应标本中,呈现革兰氏染色阳性葡萄球菌与革兰氏染色阴性大肠杆菌交织成大团块,分散的小颗粒也多是两种细菌相连在一起;而在阴性反应标本中,则未见到此现象,进一步表明了协同凝集反应的特异性。

SPA 协同凝集试验用于 F<sub>1987</sub> 菌毛抗原的检验,不仅特异、快速、而且操作简便。加之 SPA 试剂便于制备和保存,又是两种细菌靠抗体分子搭桥的凝集而使敏感性提高,且结果容易判定,以使其可作为定性试验时的一种较好方法。试验时发现所有阳性反应均于混匀后即刻出现凝集,一般在 1min 内即可呈现明显反应,凝集颗粒清晰,终判也不需超过 2min;若时间延长则易出现凝集颗粒的拉网现象,即使阴性标本若放置时间过长,也有时出现非凝集的轻度拉网现象,应在结果判定时予以注意区分。

### 参 考 文 献

1. 王光荣等:兽医科技杂志,3:40-43,1984.
2. Guinee P A M et al. : *Infection and Immunity*, 13(5):1369-1377,1976.
3. 郭景煜等:畜牧兽医学报,13(4):261-266,1982.
4. 王益寿编:葡萄球菌 A 蛋白,第 53-69 页,安徽科学技术出版社,合肥,1983.

(1992-6-12 收稿)