

应用被动免疫溶血试验快速检测大肠杆菌不耐热肠毒素

李淑琴 陈添弥

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

摘要 本文介绍了被动免疫溶血试验检测埃希氏大肠杆菌不耐热肠毒素的方法; 比较了四种不同培养基以及抗 CT 血清和抗 LT 血清对测定结果的影响。经对 236 株人源和 24 株猪源毒素源性大肠杆菌的测定结果表明, 该方法与固相放射免疫分析、LT 基因探针等方法的测定结果基本相符。说明被动溶血试验是一种快速、敏感和特异的检测方法, 不仅可用于流行病学调查, 在临床检验上也是一种可行手段。

关键词 肠毒素; 被动免疫溶血

产生不耐热毒素 (LT) 或耐热毒素或同时产生两种肠毒素的大肠杆菌 (ETEC) 是引起人和某些家畜腹泻的重要致病菌。为了调查研究 ETEC, 已建立了多种检测 LT 的方法。例如, 家兔肠段结扎实验^[1], 小鼠 Y-1 肾上腺细胞法和中国地鼠卵巢细胞 (CHO) 法^[2], 酶联免疫吸附法 (ELISA)^[3] 以及放射免疫测定法^[4] 等。但是, 所有这些方法需要有一定的条件和较高的实验技术, 且费时又不经济, 难于推广应用。我们对 Evans 的被动免疫溶血试验 (PIH)^[5] 进行了改进, 建立了一种更为快速简便的检测方法, 能为一般实验室所采用。

为了掌握较好的实验条件, 我们比较了不同培养基以及抗霍乱毒素 (CT) 血清和抗 LT 血清对测定结果的影响。经对 236 株人源和 24 株猪源大肠杆菌的测定结果表明, 改进的被动免疫溶血试验与固相放射免疫分析^[6] 和 LT 基因探针^[7] 等方法测定的结果基本相符。

材料和方法

(一) 材料

1. 供试菌株: 本研究所使用的人源 ETEC 株由北京市儿童医院提供, 猪源 ETEC 株由中国兽药监察所和江苏农学院赠送。产 LT 的标准株 H-10407 从卫生部药品生物制品检定所购买。

2. 培养基: Evans 培养基^[5], TYE 培养基^[8], Syncace 培养基^[9] 和 CAYE-2 培养基^[10]。以上培养基均分成加或不加林肯霉素 (90 μ g/ml) 的 A、B 两组。

3. 抗血清: 抗 CT 抗血清由美国纽约大学医学院 Maas 教授赠送; 抗 LT 抗血清购自上海市卫生防疫站。

(二) 实验方法

1. 绵羊红细胞 (SRBC) 悬液的制备: 新采取的静脉血与等量 Alsever's 液^[11] 混合, 贮于 4℃, 取所需量的 SRBC 用 6 倍 Koler's 液 (0.85% NaCl, 0.01% MgCl₂) 洗两次, 用 Koler's 液配成 5% SRBC 液, 取其中 0.2ml 用蒸馏水稀释 20 倍, 测 OD₅₅₀, 读值在 0.38—0.46 之间为宜。用前再用 Koler's 液稀释成 1% SRBC 悬液。

2. 抗 CT 抗血清用时用 Koler's 液稀释 20 倍; 抗 LT 抗血清稀释 40 倍。补体贮于 -20℃, 用前 10 倍稀释。

3. 菌体上清的制备: 用接种环从固体培养物 (原始分离单菌落) 上挑取一滴环, 用 50—100 μ l 含多粘菌素 B (0.25 mg/ml) 的 Koler's 液悬浮在 Eppendorf 型微离心管内, 37℃ 水

本文所引用的基因探针和固相放射免疫分析测定的资料由陈锦光、张兆山同志提供, 表示谢意。

溶 20 分钟, 10000r/min 离心 3 分钟。

4. 在 96 孔 U 形底的聚乙烯板上进行测定: 每个测定孔内先加入 50 μ l 1% SRBC, 再加入 25 μ l 菌体上清, 在微量振荡器上温和振荡数分钟混匀。37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 以使 LT 与 SRBC 吸附。再加入 25 μ l 抗 CT/LT 抗血清, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 使抗体与 LT-SRBC 复合物反应。最后加入 25 μ l 补体稀释液, 37 $^{\circ}$ C 保温 60—90 分钟。根据溶血情况判定结果, 溶血为 LT 阳性, 不溶血为 LT 阴性。

结果和讨论

(一) 不同培养基对 LT 测定结果的影响

为了节选有利于产生 LT 的培养基, 我们选用了四种不同的培养基, 并把它们分成加或不加林肯霉素两个组份。用 24 株已知 LT 阳性的猪源 ETEC 进行实验。结果表明, 在含有林肯霉素的所有培养基上培养的菌株, 除 TYE 培养基稍差外, 均得出阳性结果。而在不含林肯霉素的诸培养基上生长的细菌, 其检出 LT 的阳性率只达 83.3—91.7% (见表 1)。说明林肯霉素是促进 LT 产生的重要因素之一。Finkelstein 等人^[12]也曾报道, 当培养基中

加入林肯霉素时可使 LT 量增加数倍。为了避免在 LT 测定中出现漏检, 根据溶血程度我们在正式实验中只采用含有林肯霉素的 CAYE-2 培养基。

表 1 不同培养基对 LT 检测的影响

培养基	检测菌数	LT 阳性检出率
(A) Evans	24	100%(24/24)
TYE		91.7%(22/24)
Syn case		100%(24/24)
CAYE-2		100%(24/24)
(B) Evans	24	91.7%(22/24)
TYE		83.3%(20/24)
Syn case		91.7%(22/24)
CAYE-2		91.7%(22/24)

(A)组培养基中未加林肯霉素。(B)组培养基中加有林肯霉素。

(二) 抗 LT/CT 抗血清对 LT 和 CT 毒素敏感性的比较

由于大肠杆菌不耐热毒素与霍乱毒素在结构、功能和免疫学上是相似的肠毒素, 在血清学检测中, 二者的抗血清可以相互代用, 为此, 我们比较了抗 LT 和抗 CT 血清与这两种毒素相互作用的敏感性。结果见表 2。

表 2 不同抗血清测定肠毒素的比较

毒素	抗血清	抗 血 清 稀 释 度							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
LT*	抗 LT	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
	抗 CT	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
CT**	抗 LT	+++	+++	++	+	—	—	—	—
	抗 CT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—

LT*: *E. coli* H-10401 的多粘菌素 B 裂解液上清。CT**: 0.8 μ g/ml(Sigma)。

从以上结果可以看出, 用抗 LT 血清或抗 CT 血清测定 ETEC 的 LT, 其敏感性无差异。但是, 若用抗 LT 血清测定 CT, 远不如抗 CT 血清敏感。

(三) 被动免疫溶血试验 (PIH) 敏感性的评价

为了检验 PIH 的敏感性, 我们用 1:20 稀释度 (最敏感浓度) 的抗 CT 血清测定不同浓度的 CT, 可测得低至 0.4 μ g/ml (或 1ng/25 μ l 标本) 的 CT 含量, 说明该方法是相当敏感的。

为了验证 PIH 与 Biken 法^[10]、RIA 和基因探针法检测 LT 的符合性, 我们对 236 株

表3 被动免疫溶血试验与其它检测方法的比较

菌株来源		Biken 法	RIA	Gene 探针	PLH
人源 <i>E. coli</i> *	1983 年标本	35/38**	37/38	37/38	37/38
	1984 年上半年标本	30/91	31/91	31/91	30/91
	1984 年下半年标本	—	—	0/97	0/97
猪源 ETEC		—	22/24	22/24	22/24

* 人源 *E. coli* 是从幼儿腹泻粪便中分离。

** 代表 LT 阳性菌株数/检测菌株数之比。“—”：表示未测。

人源 ETEC 和 24 株猪源 ETEC 分别进行了测定。测定结果基本相符(表 3)，也说明该方法敏感可行。

被动免疫溶血试验的缺点是，如果所检测的菌株自身含有溶血素，即使不产生 LT 也会发生溶血反应，出现假阳性结果。幸运的是 ETEC 中含有溶血素的菌株微乎其微。在我们检测的 260 株中只发现 1 株含有溶血素。只要在实验中设立不加抗体或补体的对照组，完全可以克服这一缺点。

总之，改进后的被动免疫溶血试验具有快速、敏感、简便等特点，检测的标本可以是液体培养物也可用固体培养基上的原始分离物，该试验既适合于流行病学调查也可适用于临床检验。

参 考 文 献

- [1] Carpenter, C. C. J. et al.: *J. Clin. Invest.*, 47: 1210, 1968.
- [2] Donta, S. T. et al.: *Science*, 183: 334, 1974.
- [3] Holmgren, J.: *Infect. Immun.* 7: 759, 1973.
- [4] Hejtmancik, K. E. et al.: *Infect. Immun.* 17: 621, 1977.
- [5] Evans, D. J. et al.: *J. Clin. Immun.* 16: 604, 1977.
- [6] 张兆山等: 中华微生物学和免疫学杂志 4:187, 1984.
- [7] 陈锦光等: 微生物学报 25(2): 119, 1985.
- [8] Reis, M. H. L. et al.: *Infect. Immun.* 29: 140, 1980.
- [9] Sack, R. B. et al.: *J. Infect. Dis.* 123: 376, 1971.
- [10] Honda, T. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 13: 1, 1981.
- [11] 余滨等编著: 临床免疫技术, 上海科学技术出版社, P. 82, 1982.
- [12] Finkelstein, R. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 18: 23, 1983.