

# 酶联免疫吸附试验检测产不耐热肠毒素大肠杆菌的研究

杭州市卫生防疫站 许新强 余文炳 邵立军 王一泓

**提要** 本文报道了ELISA法检测产不耐热肠毒素大肠杆菌 (ETEC/LT<sup>+</sup>)的研究。用酶标抗-CT建立的ELISA, 检测杭州市医院病人分离的70株和动物分离的56株大肠杆菌, 以及来源于腹泻患者的10株沙门氏菌、亲水气单胞菌、类志贺氏邻单胞菌和耶尔森氏菌, 结果仅从病人菌株中检出3株ETEC/LT<sup>+</sup>, 阳性率为4.3%; 未发现与其它4种肠道病原菌有交叉反应。这是一种特异、敏感、快速检测ETEC的方法, 在感染性腹泻的病原研究中有推广应用价值。

**关键词** 酶联免疫吸附试验 大肠杆菌 不耐热肠毒素 霍乱肠毒素 腹泻

产肠毒素大肠杆菌 (ETEC), 业已被证明是传染性腹泻的重要病原菌。国内既往多采用家兔肠段结扎试验和乳鼠灌胃试验, 来检测ETEC所产的不耐热肠毒素 (LT) 和耐热肠毒素 (ST), 但敏感性和重复性较差。近年来, 应用Biken法检测虽有较好的特异性, 但其敏感性较差, 且需3天后才能报告结果。我们利用ETEC所产LT与霍乱弧菌肠毒素 (CT) 具有共同抗原的特性, 建立了酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行实验研究, 取得较为理想的结果。现报告如下:

## 材料和方法

### 一、试剂:

1. 辣根过氧化物酶: Sigma VI。
2. 霍乱肠毒素抗血清 (抗-CT): 浙江医学研究院医学微生物研究所提供。
3. 抗ETEC-LT血清 (抗-LT): 上海市卫生防疫站提供。
4. 酶标反应板: 40孔聚苯乙烯微量反应板, 四川分析仪器厂出品。
5. 包被缓冲液: 为pH9.6、0.05M碳酸盐缓冲液。
6. 酶标抗体稀释液: 为pH7.4、0.02M 0.05% Tween-20 PBS加10%小牛血清。

7. 洗涤缓冲液: 为pH7.4、0.02M 0.05% Tween-20 Tris缓冲液。

8. 底物溶液: 25ml磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 加10mg邻苯二胺, 临用时再加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 32.5μl, 立即使用。

9. 反应终止剂: 为2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

### 二、被检菌株:

1. 阳性对照菌株: 为ETEC LT<sup>+</sup>(129<sup>#</sup>)、ETEC LT<sup>+</sup>ST<sup>+</sup>(142<sup>#</sup>)和ETEC LT<sup>+</sup>ST<sup>+</sup>(88414、88415), 分别由上海市卫生防疫站和军事医学科学院赠送。

2. 待检菌株: 为本市医院肠道门诊病人中分离的70株和动物中分离的56株大肠杆菌; 另有来源于腹泻患者的10株沙门氏菌、亲水气单胞菌、类志贺氏邻单胞菌和耶尔森氏菌。

3. 以Biken法测定LT作对照。

### 三、方法:

1. 辣根过氧化物酶标记抗-CT的制备: 采用改良过碘酸盐法<sup>[1]</sup>。

2. ETEC LT的检测 (夹心法):

① 抗-LT包被: 在微孔塑料板中, 每孔滴加0.1ml抗-LT (用pH9.5碳酸盐bf稀释2.5μg/ml), 4℃包被24小时, 再用pH7.4 Tris-Tween-20 bf洗涤3次 (留1孔不包被作为空白)。



②待检样品的处理及加样：将待检菌株接种于Elek平板上（约 $1\text{cm}^2$ ）， $37^\circ\text{C}$ 培养18小时以上。用牙签刮入盛有 $0.15\text{ml}$  pH7.4 PBST的Eppendorf管中，含多粘菌素B 25 000IU/ml， $37^\circ\text{C}$ 作用1h，尔后离心5分钟（rpm 10 000），上清液为粗提LT。每样品取 $0.1\text{ml}$ 滴加于孔内， $37^\circ\text{C}$ 作用2小时，洗涤3次。

③加酶标抗体：每孔滴加 $0.1\text{ml}$ 稀释的酶标抗体， $37^\circ\text{C}$ 作用2小时，洗涤3次。

④加底物溶液：每孔滴加 $0.1\text{ml}$ 底物溶液， $37^\circ\text{C}$ 作用30分钟，阳性孔充分显色后，每孔加1滴 $2\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应；此时阴性对照应无色。

⑤结果判定：底物溶液（即空白孔）校正零点，测 $492\text{nm}$ 各孔的OD值。样品OD值与阴性对照孔OD值之比大于3为阳性。

## 结 果

一、包被抗体最适浓度选择：将纯化抗-LT作连续倍比稀释包被，加入定量的标准阳性菌株ETCE LT<sup>+</sup>（129<sup>#</sup>）抗原，取OD值为1时的包被抗体浓度为最适包被浓度。本方法的最适浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加 $0.1\text{ml}$ 。

二、ELISA结果：本市肠道门诊分离的70株大肠杆菌中，检出3株产LT的ETEC，阳性率为4.3%。已知产LT的ETEC 129<sup>#</sup>、142<sup>#</sup>、88414和88415株全部阳性。重复5次，阳性和阴性结果完全一致，每菌株的各次OD值偏差在0.05以内，整个实验过程在6小时内完成。

所有动物源性大肠杆菌均未测出LT。同时检测的沙门氏菌、亲水气单胞菌、类志贺氏邻单胞菌及耶尔森氏菌，亦未发现与ETEC LT的交叉抗原。

ELISA法与Biken法比较，结果相同，但报告时间可提前2.5天。以连续对倍稀释法计算本实验室制LT敏感性，其浓度为 $0.18\text{mg}/\text{ml}$ ，

对倍稀释至第5孔仍可检出，故可测出的最低含量为 $0.0072\mu\text{g}$ 的LT。

三、感染ETEC LT<sup>+</sup>的病人情况：检出ETEC LT<sup>+</sup>菌株的3例腹泻病人，未检出其它肠道病原菌，证明杭州市腹泻者中存在ETEC的感染。3例均为儿童，未发现可疑饮食史。临床症状主要为：较严重的黄色水样便，每日4~6次不等；但未见明显失水者和粘膜脓血便，无明显腹痛和发热。3例经口服痢特灵或黄连素等治疗，3~7天后痊愈。

## 讨 论

本文应用ELISA试验检测ETEC的LT，共检查杭州市腹泻病人分离的大肠杆菌70株，北京和上海赠送的ETEC 4株，以及沙门氏菌、亲水气单胞菌、类志贺氏邻单胞菌和耶尔森氏菌计10株，结果与Biken法完全一致，证明ELISA具有特异性。据文献报道<sup>[2~4]</sup>，ELISA的LT与霍乱弧菌的CT在免疫源性、毒素分子量和致病机理方面，均有许多相似之处。两法不同点是：CT产量远较LT为高。因为CT是分泌至胞外的蛋白质，而LT是细胞结合的外膜或周浆蛋白质。因大肠杆菌缺乏分泌蛋白质的能力，故目前ETEC的LT来源较为困难。我们利用CT的高产量以及LT与CT免疫源的相似性，建立了ELISA。

ELISA可在6小时内报告结果，比Biken法提前2.5天，是本病早期诊断的较好方法。通常ETEC LT的产量不高，因此，必须有一个敏感的检测LT方法。本法可测出 $0.0072\mu\text{g}$ 的LT，其敏感性几乎可与放射免疫法媲美，且不需要后者必备的昂贵设备。

本文结果表明，应用ELISA检测ETEC的LT，其特异性、敏感性和重复性都较为理想。在ETEC腹泻的病原学调查和研究中，值得推广应用。



**A Study on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Escherichia Coli of Heat-Labile Enterotoxin.** Xu Xinqiang, et al., *Sanitary and Anti-Epidemic Station of Hang Zhou.*

A study on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Escherichia coli of heat-labile Enterotoxin (ETEC/LT<sub>2</sub>) was reported. There were a new quick and specific method. Seventy strains of E. coli isolated from patients with diarrhoea in the hospital of Hang Zhou and fifty strains from animal, and ten strains of Salmonella, Aeromonas hydrophila, plesiomonas shigelloidis, Yersinia enterocolitica isolated from patient with diarrhoea were detected by Horseradish Peroxidase labeled anti-CT. Three strains of ETEC/LT<sub>2</sub> have only been found in diarrhoea patients. Positive rate was 4.3%. The cross reaction with other four enteropathogens hasn't been found. These results indicate that is a method of specific sensitivity

(capacity of most lowest detected is 0.0072µg/ml) and can rapid detected ETEC/LT. This method is a useful method for the ETEC pathogenic investigation in the infectitious diarrhoea patients.

**Key words** ELISA E.coli LT CT Diarrhoea

**参 考 文 献**

1. Boorsma DM, et al. Periodate or Glutaraldehyde for Preparing Peroxidase Conjugates. *J Immunol Meth* 1979; 30: 245.
2. Kaper JB, et al. Molecular Characterization of Environmental and Nontoxigenic Strains of Vibrio Cholerae. *Infect Immun* 1981; 32: 661.
3. Honda T, et al. Differential Detection of Cholera Enterotoxin and Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin and by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with Antibodies Specific to the Two Toxins. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 664.
4. Yolken RH, et al. ELISA for Detection of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 439.

**1988年流行病学信息交流学术讲座会在承德举办**

1988年流行病学信息交流学术讲座会于1988年6月27~29日在河北省承德市举办，来自全国27个省市自治区流行病学教学、科研和防疫等单位的160余名代表参加了会议。

北京医大魏承毓教授和中山医大王志瑾副教授在会上传达了第11届国际流行病学科学会议（1987年8月于赫尔辛基），天津医学院耿贯一教授传达了第二届国际MONICA（心血管疾病监测）会议（1987年8月于赫尔辛基）、第六届世界吸烟与健康学术会议（1987年11月于东京）、国际流行病学协会地区性科学会议（1988年1月于泰国Pattaya）等。

有关专家在会上介绍了腹泻（北京医大魏承毓教授）、艾滋病（流研所郑锡文副研究员、中山医大王志瑾副教授）、出血热（病毒所宋干研究员）、肝炎（北京医大庄辉副教授）、计划免疫（北京生物制品研究所苏万年研究员）、小儿生长监测（北京儿童保

健所张蔼丽主任医师）、细菌变迁（河北医学院李仲兴副教授）和医院内感染（华北煤炭医学院吕宝成副教授）等专题的国内外进展和信息。中山医大王志瑾副教授还介绍了加拿大流行病学教学信息。会议代表交流和宣读了论文。会议进行了新检测仪器、消毒药品、流行病学专业书籍交流和技术转让活动。会议开得比较活跃。

以流行病学信息形式举办的学术会议在我国还是首次。这次会议是由华北煤炭医学院吕宝成副教授倡议筹办的，北京医大魏承毓教授和天津医学院耿贯一教授等积极支持此会，并参与筹办。

该会内容已汇编为《流行病学信息交流讲座》一书，包括会议信息、专题讲座和国内外会议论文摘编等（每本3.0元，购者请邮款至河北省唐山市华北煤炭医学院吕宝成副教授）。

（吕宝成供稿）