

酶联免疫吸附试验和反向间接血球凝集 快诊金葡萄菌肠毒素的效果观察

解放军59175部队 雷祚荣 曲丽云 王鲁明

目前我国对金黄色葡萄球菌食物中毒的检测方法仍以猫试验为主,而灵敏、特异、快速的血清学方法研究较少。因此,我们对ELISA和反向间接血球凝集检出金葡萄菌的试验条件及初步应用效果,作了比较观察。

实验方法

一、菌株: FRI₁₃₇产C₁型肠毒素; FRI₃₆₁产C₂型肠毒素,由美国Bergdoll教授提供。产毒培养基;胰酶消化酪蛋白。玻璃纸复盖琼脂法产毒。

二、肠毒素提纯:参考Borja和Avena^[1]等的方法加以简化,用CM-纤维素和Sephadex G-75柱层析分离,纯度达90%以上。

三、抗肠毒素血清制备:以改进的Genigeorgis^[2]免疫方案,福氏完全佐剂抗原注射。C₁、C₂型抗肠毒素血清效价1:128(双扩散)。

四、ELISA试验:辣根过氧化物酶(RZ:3.2, V型, Sigama厂产)。酶标抗体用Wilson^[3]等的改良法。微量酶联反应双抗体夹心法,底物邻苯二胺(OPD-H₂O₂溶液),40孔微量反应板。用改装的72型分光光度计测定,492nm测定OD值比阴性对照大三倍以上的为阳性。

阻断实验,将阳性血清与不同浓度待检毒素在试管中等量混合,置37℃ 1小时。然后做ELISA试验。如果阳性血清处理的毒素比未处理的同样浓度毒素OD值下降50%以上,为阻断实验阳性。

五、RPHA试验:新鲜绵羊红血球用甲醛

处理,配制成10%血球备用。致敏方法,铬鞣酸法^[4],微量血凝反应。

六、肠毒素实验污染及临床中毒食品:选用米饭、香肠、腊肠、酱肉、奶粉等食品,每种称取5g,加入10ml 0.035M pH7.2 PBS或生理盐水搅拌成泥浆,分别加入40μg/ml C₁、C₂型肠毒素搅匀离心(8000转/分)20分钟,吸取上清液备用。

1982年中毒奶制品4份,83年奶制品2份,凉粉皮1份,均由第四军医大学微生物教研室供给。可疑中毒食品奶油一份。

结 果

一、ELISA与RPHA最适反应条件的比较:ELISA实验中对包被抗体用量,酶标抗体及封闭羊血清浓度进行了比较观察。它们的合适条件是,5μg/ml抗体包被,酶标抗体1:3000~1:4000稀释,1%正常羊血清封闭。

RPHA试验中着重观察了IgG的致敏用量,IgG蛋白量在0.15mg/ml以下时,检出灵敏度下降1~2个滴度,高于此则灵敏度不再提高,所以选择0.15mg/ml为致敏量。

二、检测灵敏度:ELISA可检出2.5ng/ml左右的C₁、C₂型肠毒素。肠毒素浓度和OD值之间有非常显著的相关(图1)。RPHA检出C₁、C₂型肠毒素灵敏度下限为3ng/ml左右,比ELISA稍低。

三、特异性试验:型间交叉反应。C₁、C₂型酶标抗体同160ng/ml的A、B型肠毒素不发生交叉反应。C₁型诊断血球与100ng/ml的A、

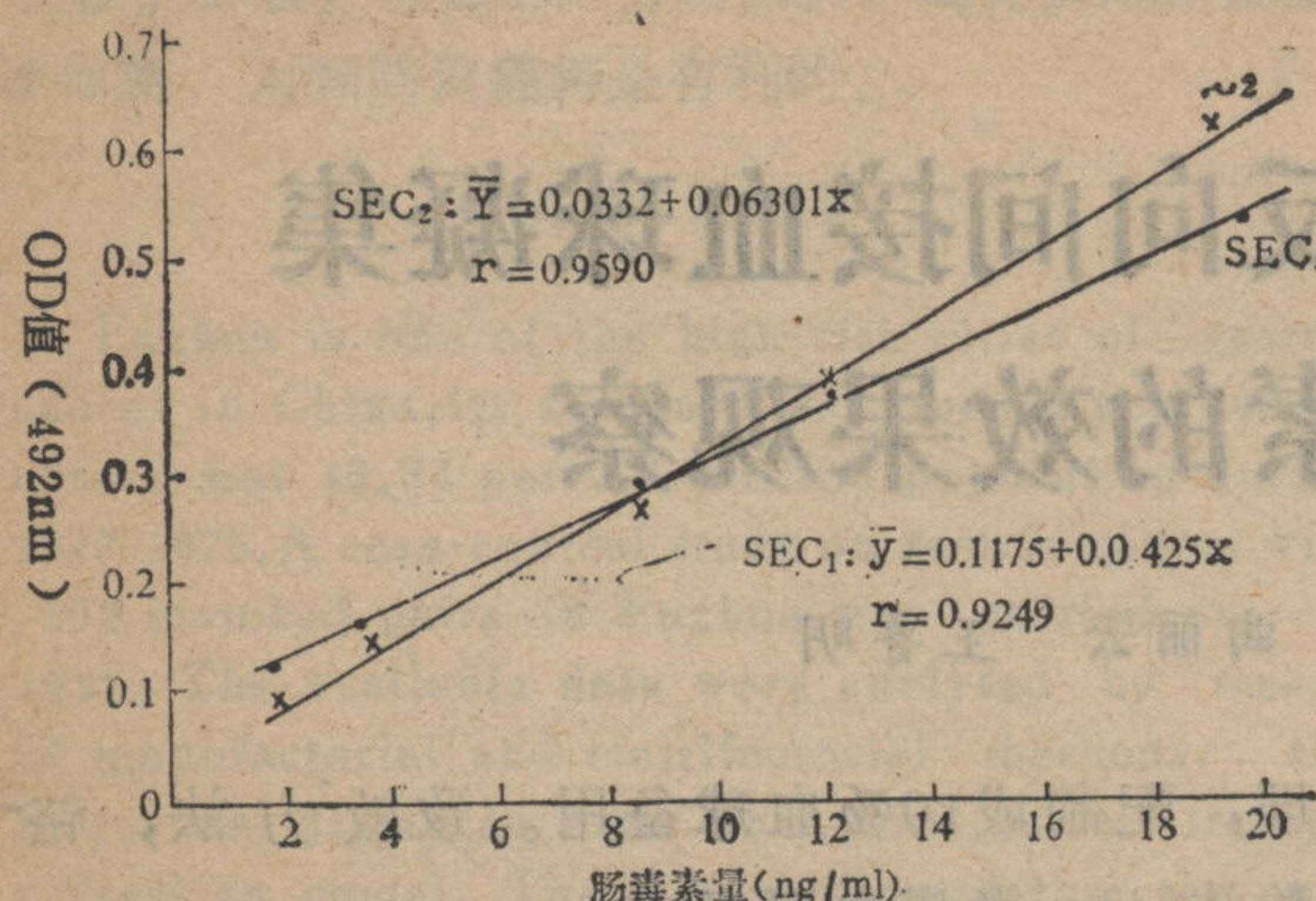


图1 C₁、C₂型肠毒素量和测定OD值之间的关系

B型肠毒素有微弱的交叉反应，同文献[5]。C₂型诊断血球同100ng/ml的A、B型肠毒素无交叉反应。

阻断试验：当肠毒素浓度在1.25ng/ml以上时，阻断阳性率为50%以上(图2)。

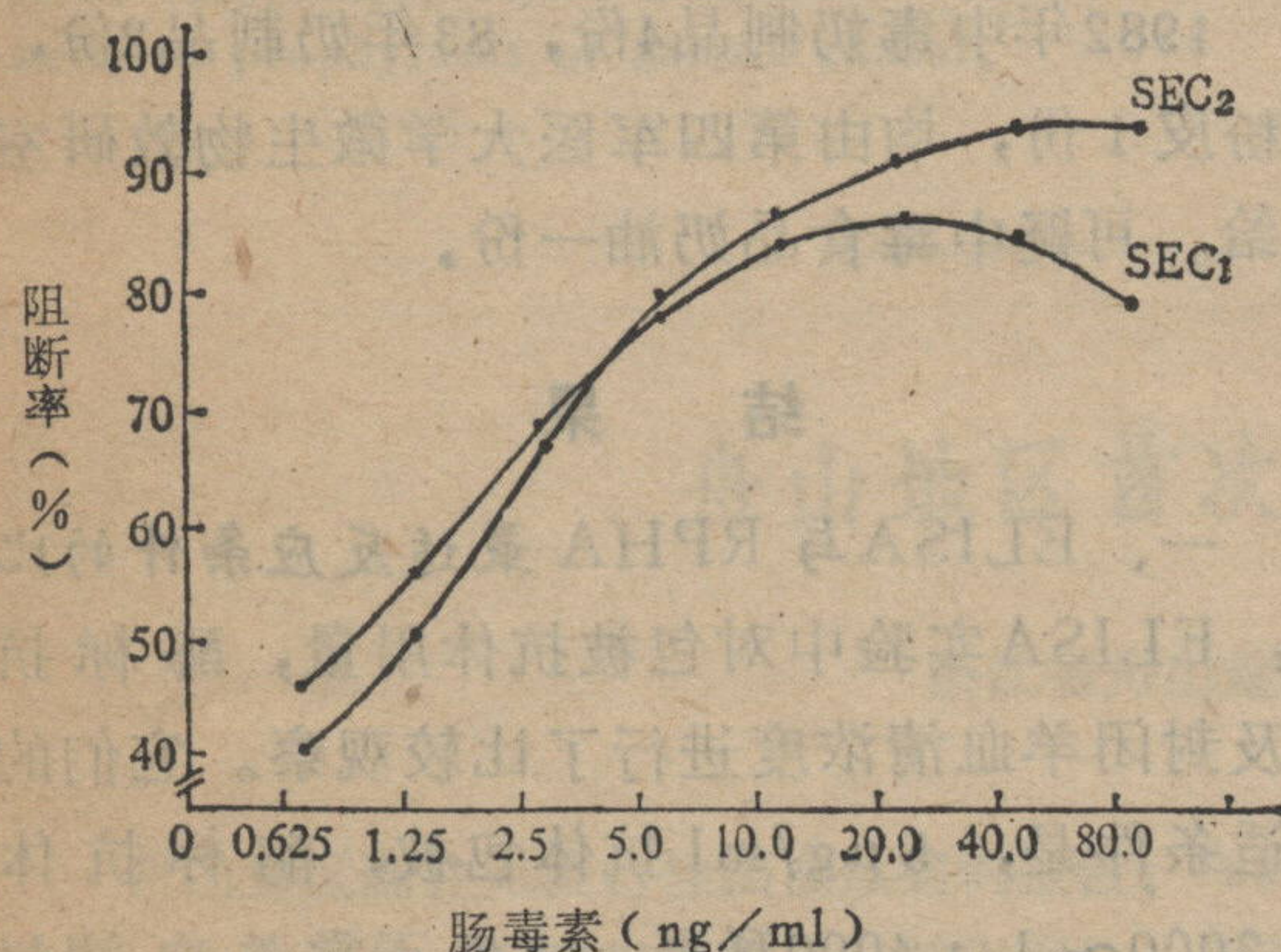


图2 肠毒素浓度和阻断率的关系

四、肠毒素实验污染食品的检出：ELISA 检出实验污染C₁、C₂型肠毒素的各种食品标本，其灵敏度与纯毒素相同或低一个滴度。RPHA 试验则比检出纯毒素低1~3个滴度。未加入毒素的同种标本均为阴性(附表)。

附表 两法对两型肠毒素检出量 (ng/ml) 的比较

食 品 种 类	ELISA		RPHA	
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
腊 肠	2.5	2.5	12.5	12.5
香 肠	2.5	2.5	12.5	12.5
酱 肉	5.0	2.5	6.25	6.25
米 饭	2.5	2.5	6.25	6.25
奶 粉	5.0	5.0	25.0	25.0

讨 论

我们利用酶标记抗体改良法[3]，不需使用二硝基氟苯和乙醇胺，标记成功率高。以廉价的正常牛、羊原血清代替牛血清白蛋白(BSA)封闭，效果满意。

除选择我国经常发生中毒的食品如牛奶、香肠、酱肉、米饭等进行模拟实验外，还检查了7份临床中毒食品，1份可疑食品标本，检出灵敏度和纯毒素一致或稍低。食品标本没有用胰酶、蛋白酶、氯仿、乙醚等前处理，可以直接检验，食品成分不干扰检出。文献报道[4]多强调被检食品的前处理，但我们的实验证明，它可以省掉，使检出更方便和快速。

目前肠毒素检测的趋势是用特异的免疫学方法代替生物学测定。ELISA 和RPHA是两个较好方法，它们检出灵敏度高(毫微克水平)，特异性好。肠毒素型间基本没有交叉反应。检出快速(得到标本至出结果约4小时就可完成)，且重复性好。ELISA和RPHA比较，前者能定量，后者只能定性，但操作比前者更简单。

C₁、C₂型肠毒素免疫学反应完全相同，两者可互相代替，检测任一型的诊断试剂即可。

保存实验证明，酶标记C₁、C₂型抗体IgG置低温冰箱一年以上，冷冻干燥C₁、C₂型诊断血球放普通冰箱两年以上，使用效果不变。适合基层单位应用。

摘 要

本文用ELISA、RPHA快速诊断金黄色葡萄球菌C₁、C₂型肠毒素，并对某些条件进行了比较。发现5μg/ml抗体包被，1%羊血清封闭，酶标抗体1:3000~1:4000倍稀释，致敏抗体用量0.15mg/ml较合适。实验的灵敏度1.25~5.00ng/ml：特异性好，阻断实验阳性率50%以上，无论是实验污染C₁、C₂型肠毒素，还是金葡菌爆发的中毒食品检测都可达到毫微克水平，食品成分对检出没有干扰。检验的各种含毒食品标本，不需酶、酸、碱、氯仿等前处理，没有假阳性。

ABSTRACT

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Reversed Passive Hamagglutination (RPHA) were used for rapid detection of staphylococcal enterotoxins C1, C2. Some experimental conditions were compared, it was found that 5 μ g/ml of coating antibody, 1% covering sheep serum and 1:3000~1:4000 dilution of antibody enzyme conjugate and sensitized with 0.15mg/ml of purified anti-enterotoxin immunoglobulin are more advisable. Assay sensitivity ranges from 1.25ng to 5.0ng of toxin per ml of sample. The procedure has a good specificity. The rate of blocking (inhibition) test reached more than 50%. Minute amounts of enterotoxins were added to a variety of representative foods that were usually implicated in staphylococcal food poisoning outbreaks. The toxins were consistently detectable by ELISA and RPHA at enterotoxins levels of about 2.5-12.5ng/g of food. In detection

of toxin from contaminated foods, the pretreatment with enzyme, acid or base or chloroform is not necessary. No false positive reactions were encountered.

参考文献

1. Borja CR et al: Biochemistry, 6: 1467, 1967
2. Genigeorgis C et al: Appl Microbiol, 21(5): 832, 1971
3. Wilson MB et al: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978: 216-224.
4. 王林发等: 生物制品通讯, 8(4): 174, 1979
5. Spero L: J Immunol, 120(1): 86, 1978
6. Fread RC et al: Appl Environ Microbiol, 44(6): 13449, 1982

(本工作承蒙李俐副研究员指导, 产毒培养基由吕春兰同志制做, 特此致谢)

无血琼脂分离脑膜炎双球菌的效果观察

福建省莆田市卫生防疫站 程法稷 林 琴 曾广达 朱恒芳

脑膜炎双球菌目前所用的培养基需加入一定量的血液, 配制繁杂且不易保存。最近国外报道用一种无血培养基分离弯曲菌取得与含血培养基几乎相等的效果。脑膜炎双球菌与弯曲菌有相似的培养条件, 为寻找经济简便的分离方法, 我们用一种无血含炭培养基与含血培养基进行脑膜炎双球菌分离比较试验, 取得了较满意的结果。

常规培养基用50%蛋黄盐水, 糖发酵培养基, 猪血水巧克力琼脂, 均按常法配制; 无血含炭琼脂的基础部分为每1000毫升水用日本豚10克, 胰脏10克, 酵母浸膏5克, 氯化钠5克, 医用炭4克, 琼脂18克, 上述成分除炭外加热溶化, 调节pH值为7.2~7.4后, 再将炭加入混匀, 于15磅灭菌20分钟, 待培养基冷至约50°C时加入多粘菌素B(25单位/毫升)、万古霉素(3.3微克/毫升), 混匀后倒平板。流脑诊断用多价及单价诊断血清系上海生物制品研究所出品, 均在有效期内使用。

以消毒棉拭子采集鼻咽腔分泌物, 置蛋黄盐水中, 3~4小时内送至实验室, 每份样本同时接种于猪血水巧克力琼脂和无血含炭琼脂平板, 接种后平板置烛缸内于37°C温箱培养24小时, 挑出疑似菌落按常

法进行鉴定。鉴定标准照常规。少数菌株其菌形、菌落及生化反应同脑膜炎奈瑟氏菌相似, 但与流脑诊断血清不起凝集反应者作为不凝集菌株。

菌落在两种培养基上均为圆形、光滑、湿润, 有光泽、半透明, 不产生色素, 在猪血水巧克力琼脂上, 菌落呈淡灰色, 大小为1~2毫米; 在无血含炭琼脂上, 菌落呈灰黑色(与培养基颜色相似), 大小约1.5~2.5毫米。在165份鼻咽腔标本中, 两种培养基共检出阳性标本103份, 阳性率为62.4%, 其中猪血水巧克力培养基检出91份, 阳性率为55.2%, 无血含炭琼脂检出93份, 阳性率为56.4%。两种培养基检出共同阳性80份, 共同阴性59份, 符合率为86.7%。103株脑膜炎双球菌经诊断血清玻片凝集试验结果, B群93株(90.3%), 319群2株(1.9%), 未能分群8株(7.8%)。

脑膜炎双球菌在猪血水巧克力琼脂和无血含炭琼脂上所形成的菌落形态相似, 两种培养基的分离符合率为86.7%, 而无血含炭培养基成本低, 配制方便, 易于保存, 更方便于分离工作, 有进一步探讨的价值。

(参加本实验的还有: 梁爱民和祁燕同志)