

炭凝集反应在快速检出炭疽杆菌芽孢中的应用实验

王世若 梁焕春

(长春兽医大学, 长春)

由于炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 在外界环境中常以芽孢的形式存在, 且具有强大的抵抗力, 外界环境一旦被污染, 极易造成持久的疫源地, 严重地威胁着人畜的安全。目前所采用的串珠法和串珠荧光抗体法等技术, 都需要一定的设备和较长的时间才能得出结果^[1-3]。为此, 我们试用炭凝集反应快速检测炭疽杆菌芽孢的污染标本, 现将结果简报如下。

材料和方法

(一) 菌种

大肠艾希氏杆菌、产气杆菌、绿脓杆菌、蜡样杆菌、枯草杆菌、蛭状杆菌均由卫生部药品生物制品检定所提供。马铃薯杆菌、假炭疽杆菌、炭疽杆菌 C₆₀₋₂₀₂ 由农林部兽医药品监察所提供。普通变形杆菌、白色葡萄球菌为我室保藏菌种。

(二) 血清

未提纯的炭疽免疫血清是兰州兽医生物制品厂生产的马源抗炭疽血清, 以双缩脲法测定, 每毫升含氮量为 89 毫克。提纯的免疫血清, 系上述血清经 50% 饱和硫酸铵溶液盐析一次, 33% 饱和硫酸铵溶液反复盐析三次, 透析后获得, 该血清以双缩脲法测定, 每毫升含氮量为 37.25 毫克。因为健康家兔的血清与健康马匹的血清效果一致, 所以对照用的正常血清, 均采自健康家兔。

(三) 炭粉

药用活性炭系国营上海活性炭厂生产。针剂用活性炭系杭州木材厂生产, 732 型。木炭粉系 E. D. H. 分装。

(四) 盐溶液

新配制 pH 6.6 的 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.85% 和 1.5% NaCl 溶液和 pH 6.4、7.2、8.0 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。用于稀释抗原, 制备炭疽免疫炭血清和进行反应。

(五) 抗原的制备

1. 用于优选致敏炭粉

将每毫升约含 2×10^7 个炭疽杆菌芽孢液作原液, 然后以不同浓度的 NaCl 溶液及不同 pH 的 PBS 将其作连续对倍稀释成 1:2—1:1024 等 10 种浓度, 每毫升的芽孢数约为 2×10^6 — 1×10^1 。

2. 用于鉴定炭疽免疫炭血清特异性

(1) 制备菌悬液: 将枯草杆菌、蜡样杆菌、蛭状杆菌、马铃薯杆菌、假炭疽杆菌、白色葡萄球菌、普通变形杆菌、大肠艾希氏杆菌、产气杆菌及绿脓杆菌等分别接种于普通琼脂斜面上, 前 5 种细菌于 37℃ 下培养 72 小时, 后 5 种细菌培养 24 小时, 洗下培养物, 分别制成每毫升约含 4×10^8 个芽孢或细菌作为原液, 再用 0.2% NaCl 溶液对倍稀释成 1:2—1:128 等 7 种浓度, 每毫升含芽孢或细菌数约为 3×10^4 — 2×10^1 个。

(2) 制备含混合菌的炭疽杆菌芽孢悬液: 将上述 10 种细菌盐水原液等量混合, 制成混菌悬液。以 1 份炭疽杆菌芽孢原液与以上混菌悬液相混合, 制成 12 组混合悬液。使每组每毫升混合悬液中含的菌数共约 4×10^8 个, 但枯草杆菌芽孢控制在 2×10^7 个左右, 其中的炭疽杆菌芽孢数由第一组开始, 分别为 1×10^7 、 5×10^6 、 3.3×10^6 、 2.5×10^6 、 2×10^6 、 1.5×10^6 、 1.3×10^6 、 1×10^6 、 6.7×10^5 、 4×10^5 、 3.8×10^5 、 2×10^5 个。

(六) 炭血清的制备

取炭粉 10 克放于大离心管中, 加水约 300 毫升, 边加水边搅拌, 使成均匀混悬液, 以 200 转/分离心 5 分钟, 除去沉淀的大炭粒, 取上清液, 再以 3,000 转/分离心 30 分钟, 去上清液, 沉淀物即为供试验用的湿炭粉。

制备炭血清时, 取 1.0 克湿炭粉放于沉淀管

本文于 1977 年 11 月 11 日收到。

中,加入不同稀释度的灭活免疫血清 12 毫升,混合后,在不同温度下致敏 5—30 分钟,以 3,000 转/分离心 10 分钟,去上清液,向沉淀物中加入含 1% 兔血清 0.5% 硼酸、pH 7.2 PBS 20 毫升,混合后,以 3,000 转/分离心 10 分钟,去上清液,再向沉淀物中加入含 1% 兔血清 0.5% 硼酸、pH 7.2 PBS 12 毫升,及 1% 水杨酸汞溶液 0.12 毫升,混合后,即为试验用的炭疽免疫炭血清。对照用的正常炭血清以同样方法制备。

(七) 炭凝集反应

取 20×40 厘米玻璃板一块,用 1 毫升吸管分别滴加不同浓度的抗原液各 0.1 毫升,在玻璃板上方滴加 0.2% NaCl 溶液 0.1 毫升作对照。再用

另一支 1 毫升吸管吸取炭疽免疫炭血清或正常炭血清,向上述的抗原滴或对照滴中各加 0.05 毫升,混匀后,在室温下静置 1—20 分钟,在对照滴阴性反应的条件下判定结果。

结 果

(一) 制备炭疽免疫炭血清的影响因素

1. 稀释液

(1) 用 NaCl 溶液稀释抗原: 用不同浓度的新鲜 NaCl 溶液稀释被检抗原,分别用 pH 6.4 PBS 将免疫血清作 1:10 稀释,66℃ 水浴作用 30 分钟,在 2℃ 下对湿木炭粉致敏 30 分钟后,以制成的炭血清进行炭凝集反应。结果见表 1。

表 1 不同浓度 NaCl 溶液稀释抗原对炭凝效率的影响

炭血清种类	NaCl 溶液 浓度(%)	抗 原 稀 释 度									对 照 0.2%NaCl 溶液
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
1:10 免 疫 炭血清	0.10	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	—	—
	0.20	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	—
	0.40	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	—	—
	0.60	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
	0.85	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—	—	—
	1.50	++++	++++	++++	+++	++	++	—	—	—	—
1:10 正 常 炭血清	0.20	—	—	—	—						

注: 炭凝集反应强度的判定标准(以下各表均同此)。
按以下五个等级表示反应的强度,以“++”作为判定反应的终点。
“++++” 炭粉在数分钟内迅速凝集,倾斜玻板时,凝集的炭粒呈微粒状向下滚动,液滴清朗。
“+++” 大部分炭粉呈微粒状凝集,液滴透明。
“++” 半量炭粉凝集,另一半呈黄豆粒大胶粘一起,摇而不散。
“+” 炭粉微见凝集,液滴不透明,振摇玻板时,胶粘的炭粉牢固团聚一起。
“—” 炭粉不凝集,液滴不透明。

从表 1 看出,应用的 NaCl 溶液浓度不宜过高,以 0.2% 浓度较好。

(2) 用 PBS 稀释抗原: 所用炭疽免疫炭血清的制备条件同上项,只是对被检抗原的稀释液改为 pH 6.4、7.2、8.0 的 PBS。结果见表 2。

从表 2 看出,在三种抗原稀释液中,以 pH 6.4 的 PBS 为好,但较 0.2% NaCl 溶液稀释的抗原低一个滴度。以下各实验所用抗原,均以 0.2% NaCl 溶液稀释。

(3) 用 PBS 稀释免疫血清: 炭疽免疫炭血清制备条件同上,只是分别用 pH 6.4、7.2、8.0 PBS

将免疫血清稀释成 1:10,然后与不同稀释度的抗原作试验。从表 3 结果看出, 3 种不同 PBS 稀释免疫血清,致敏炭粉制备的炭疽免疫炭血清,均能与一定稀释度的抗原发生反应,其中以 pH 7.2 PBS 稀释免疫血清的效率最好。

(4) 用 NaCl 溶液稀释免疫血清: 炭疽免疫炭血清制备条件同上,只是用新制备的不同浓度的 NaCl 溶液将免疫血清分别稀释成 1:10,然后与不同稀释度的抗原作反应。从表 4 结果看出,以 0.85% NaCl 溶液稀释免疫血清制成的炭疽免疫炭血清的效率较好,可与 1:64 稀释的抗原发生

表 2 不同 pH 的 PBS 稀释抗原对炭凝效率的影响

炭血清种类	PBS 的 pH	抗 原 稀 释 度									对 照
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	PBS (pH7.2)
1:10 免 疫 炭血清	6.4	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	7.2	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
	8.0	++++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-
1:10 正 常 炭血清	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3 不同 pH 的 PBS 稀释免疫血清致敏炭粉的效率

炭血清种类	PBS 的 pH	抗 原 稀 释 度									对 照
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	PBS (pH7.2)
1:10 免 疫 炭血清	6.4	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	7.2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	8.0	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
1:10 正 常 炭血清	7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 4 不同浓度 NaCl 溶液稀释免疫血清致敏炭粉的效率

炭血清种类	NaCl 溶液 浓度(%)	抗 原 稀 释 度								对 照 0.2%NaCl 溶液
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
1:10 免 疫 炭血清	0.10	++++	+++	++	++	++	+	-	-	-
	0.20	++++	+++	++	++	++	+	-	-	-
	0.40	++++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
	0.60	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-
	0.85	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	1.50	++++	++++	+++	+++	+++	+	-	-	-
1:10 正 常 炭血清	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“++”强度的反应,但较 pH 7.2 PBS 的效力仍低一个滴度(见表 3)。以下各试验均用 pH 7.2 PBS 稀释免疫血清。

2. 免疫血清

(1) 不同稀释度的免疫血清致敏炭粉:用 pH 7.2 PBS 将免疫血清稀释成 1:10—1:160,制成炭疽免疫炭血清(制备条件同上),然后用它与不同稀释度的抗原作反应。从表 5 结果看出,以 1:40 稀释度的免疫血清致敏炭粉,制成的免疫炭血清的检出效率最好。

(2) 不同温度处理免疫血清后致敏炭粉:用 pH 7.2 PBS 将免疫血清稀释 1:40,分别以 56℃、60℃、66℃ 和 70℃ 的水浴处理 30 分钟后,用其与湿木炭粉在 2℃ 下作用 30 分钟,制成炭疽免疫炭血清,然后与不同稀释度的抗原作试验。从表 6 结果看出,以 60℃ 处理免疫血清制成的炭疽免疫炭血清的效率最好,不但反应快,而且出现的现象清晰。

(二) 炭疽免疫炭血清的敏感性和特异性

1. 敏感性

将免疫血清以 pH 7.2 PBS 稀释成 1:40, 在 60℃ 水浴中处理 30 分钟后, 与湿木炭粉在 56℃ 水浴中作用 10 分钟, 制成炭疽免疫炭血清 (以后各项试验中均按此法制备), 然后与不同稀释度的活炭疽杆菌芽孢、100℃ 40 分钟杀死的炭疽杆菌芽孢, 1% 甲醛液杀死的炭疽杆菌芽孢分别作反应。

从表 7 结果看出, 制备的炭疽免疫炭血清具有较高的敏感性, 可与经 1:512 稀释的 (每毫升约含 3.9×10^4 个炭疽杆菌芽孢) 活的或加热杀死的炭疽杆菌芽孢等发生 “++” 强度的反应。

2. 特异性

制备的炭疽免疫炭血清具有较好的特异性, 从表 8 结果可看出, 与炭疽杆菌芽孢液可呈现 “++++” 的反应。而标本中的杂菌对炭疽杆菌芽孢的检出有一定的干扰, 同时反应强度随标本配制时间的延长而逐渐减弱, 如标本在配制后的 26 小时, 只能检出每毫升约含 1.5×10^6 个炭疽杆菌芽孢的检样。

3. 炭粉种类

将免疫血清以 pH 7.2 PBS 稀释成 1:40, 在 60℃ 水浴中处理 30 分钟后, 分别与上海药用活

表 5 不同稀释度免疫血清致敏炭粉的效率

致敏炭粉的血清种类	血清稀释度	抗 原 稀 释 度										对 照
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
免疫血清	1:10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-
	1:20	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-
	1:40	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	1:80	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-
	1:160	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清	1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 6 不同温度处理免疫血清后致敏炭粉的效率

致敏炭粉用血清种类	灭能血清温度(℃)	抗 原 稀 释 度											对 照
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
1:40 免疫血清	56	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
	60	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-
	66	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-
	70	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40 正常血清	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 7 炭凝集反应对检出活死炭疽杆菌芽孢的效率

炭血清种类	抗原种类	抗 原 稀 释 度										对 照	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		0.2% NaCl 溶液	30% 甘油水
1:40 免疫炭血清	活的	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
	煮沸杀死	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-
	甲醛杀死	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:40 正常炭血清	活的	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	煮沸杀死	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	甲醛杀死	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 8 炭凝集反应特异性检查结果

炭血清种类	检查时间 (小时)	含杂菌的炭疽杆菌芽孢数(万)												对 照	
		1,000	500	330	250	200	150	130	100	67	40	28	20	炭疽芽孢液	0.2% NaCl 溶液
1:40 免疫炭血清	0.5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	++++	-
	1.5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	++++	-
	6.0	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	-	-	++++	-
	18.0	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	++++	-
	26.0	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	++++	-
1:40 正常炭血清	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	26.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

表 9 不同牌号炭粉被致敏后的效率

血清种类	炭粉种类	抗 原 稀 释 度									对 照
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	0.2%NaCl 溶液
1:40 免疫血清	药用活性炭	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	-	-	-
	针剂活性炭	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-	-	-
	进口木炭粉	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	-	-
1:40 正常血清	药用活性炭	-	-	-							
	针剂活性炭	-	-	-							
	进口木炭粉	-	-	-							

性炭湿炭粉、杭州针剂活性炭湿炭粉、进口湿木炭粉在 56℃ 水浴中作用 10 分钟，制成炭疽免疫炭血清，然后与不同稀释度的抗原作反应。

从表 9 结果看出，以免疫血清致敏进口湿木炭粉制成的炭疽免疫炭血清与抗原作反应时，较另外二种活性炭的效率高一一个滴度，可与 1:512 稀释变的抗原发生“++”强度的反应。

小 结

制备免疫炭血清质量与所用炭粉的种类有关，如用木炭粉吸附血清的效率较好，制成的炭血清，其阴性反应和阳性反应的界限也较清晰，而且不发生自凝现象，这一点与已往的报道有区别^[1]。制备的炭疽免疫炭血清对炭疽杆菌芽孢表现了较高的敏感性，较反向间接血凝有较明显增高^[2]。在特异性方面，除枯草杆菌芽孢外，对试验的 9 种单菌不发生或仅发生轻微的交叉反应，虽然和枯草杆菌芽孢发生了较为明显的交叉反应，但只是在含有大量芽孢的情况下才出现，如每毫升芽孢少于 2.5×10^7 个时则不发生交叉反应；因此，炭凝集反应对炭疽杆菌芽孢的检查，比荧光

抗体法为特异^[3]。但如同时含有多种大量杂菌时，对炭疽免疫炭血清的检出率是有影响的，它只能检出每毫升约含 4×10^4 个炭疽杆菌芽孢的污染标本，较对纯粹炭疽杆菌芽孢培养物的检出率低 90% 以上，且随采集标本时间的延长。检出率逐渐下降。

因此，制备的炭疽免疫炭血清，有用于来自外界环境中直接检出炭疽杆菌芽孢的可能性。至于在污染现场的应用价值，有待今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Шляков, Э. Н.: Сидирская язва, 72, 1975.
- [2] Gibson, T. and Gordon, R. E.: Part 15 Endospore-Forming Rods and Cocci, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (ed. by Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.), The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1974, p. 535.
- [3] 安徽农学院畜牧兽医系:《荧光抗体技术及其在兽医上的应用》，上海人民出版社，1975，第 113 页。
- [4] 鲍行豪:微生物学报, 17 (2), 154, 1977.
- [5] 陈仁等:《免疫学》，北京人民出版社，1965，第 306 页。