

炭凝集反应在快速检验马副伤寒性流产中的应用

长春兽医大学微生物教研组

(长 春)

以往对马流产沙门氏杆菌引起的流产的特异性诊断,均用常规的细菌学检查法^[1-4],这种方法需要较长时间,且要求检验条件较高,基层单位往往不易办到。为此,我们试验用简单易行的炭凝集反应,从马流产胎儿或妊马阴道分泌物等病料中,直接检查马流产沙门氏杆菌。

本试验是在鲍行豪及 Яфаев 等报道的炭凝集反应的基础上进行的^[5,6],首先以标准的马流产沙门氏杆菌为模型,检查了几项对炭凝集反应影响较大的因素,在此基础上制备了诊断用炭血清,对××畜牧场送来我组的8份马流产病料做了检查。为比较炭凝集反应的实践意义,对每份病料同时进行了常规细菌学检查。

材 料 和 方 法

(一)材料

1.菌种和病料:×站株,为我组保存的典型马流产沙门氏杆菌。供交叉反应应用腊状杆菌、枯草杆菌、无毒炭疽杆菌、金黄色葡萄球菌、绿浓杆菌、大肠杆菌、猪霍乱沙门氏杆菌、鼠伤寒杆菌均系我组保存的标准株马流产胎儿心血2份及胎儿胃内容物6份系××畜牧场送检的病料。

2.血清:特异性血清,系以×站株制成H抗原后,经免疫家兔获得,效价为1:12,800,56℃30分钟灭活后应用,其效价为1:5,600。对照用正常血清采自健康家兔,56℃30分钟灭活后应用。

3.炭粉:上海化学试剂公司E. D. H分装,批号59-09-23。

4.盐溶液:制备炭血清和实施反应,所用盐溶液系新配制的pH分别为6.4PBS、7.2PBS、7.4生理盐水及PH8.4PBS。

(二)方法

1.抗原制备:检验前,将×站株接至普通肉汤培养基中培养16小时,以琼脂平板法计数,每毫升平均菌数为14—16亿。检验时,以上述培养物做原液,用不同pH的盐溶液将其稀释成1:2

—1:256等8种浓度后备用。供交叉反应应用的另外8种细菌抗原按同样方法制备。

2.炭血清制备:取炭粉10克放于离心管中,加水约250毫升,制成均匀的混悬液,以200(转/分)离心5分钟,取上清液,再以3,000(转/分)离心30分钟,去上清,沉淀物即为供试验用的湿炭粉。

试验时,取0.25克湿炭粉于沉淀管中,加入不同稀释度的免疫血清(对照组为正常兔血清)3毫升,混匀后,在不同温度下作用一定时间,以3,000(转/分)离心10分钟,去上清液,再加入不同pH盐溶液5毫升,反复洗涤2次后,再往沉淀物中改加1%兔血清(用1%硼酸不同pH盐溶液配成)5毫升,混匀后,以3,000(转/分)离心10分钟,去上清液,再往沉淀物中加入以上1%兔血清1%硼酸不同盐溶液3毫升及1%硫柳汞0.05毫升,混匀后即成为免疫炭血清,保存备用。

3.炭凝集反应操作方法:进行对炭凝集反应影响因素的试验时,取20×40公分玻璃板一块,用1毫升吸管往玻璃板上依次滴加不同稀释度的马流产沙门氏杆菌肉汤培养物0.1毫升,对照液0.1毫升,再用另一支吸管分别往每滴菌液和对照液中加免疫炭血清或正常炭血清0.05毫升后,用小木棒将每一液滴搅匀。

检查病料时,用吸管分别吸取病料悬液、标准抗原及pH6.4PBS,往玻璃板上各滴2个滴,每滴0.1毫升,再分别往前3滴中各加免疫炭血清及后3滴中各加正常炭血清0.05毫升,用小木棒将每一液滴搅匀。置于11—13℃室温下静置数分钟观察结果。

结 果

(一)影响炭凝集反应四项因素的检查

1.以不同时间致敏炭粉对免疫炭血清效力的

本文于1976年12月16日收到。

影响：应用 pH6.4PBS 将免疫血清稀释 1:50 后，以 10, 30, 60, 90, 120 分钟等 5 个时间，在 37℃ 水浴中分别致敏湿炭粉，制成免疫炭血清，然后与不同稀释度的抗原作反应。结果（见表 1），炭粉

表 1 不同致敏时间对免疫炭血清效力的影响

1:50 免疫血清 致敏时间(分)	与不同稀释度抗 原反应的结果					pH6.4PBS 对照
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	
10	++++	++	+	-	-	-
30	++++	+++	++	-	-	-
60	++++	++++	+++	+	+	-
90	+++	+	-	-	-	-
120	+++	-	-	-	-	-
60 正常兔血清对照	-	-	-	-	-	-

注：++++ 炭粉在数秒钟内即凝集，倾斜玻璃板时，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，胶粘的炭粉牢固的团聚一起。
- 炭粉不凝集，液滴不透明，振摇玻璃板时，胶粘的炭粉牢固的团聚一起。
呈现 ++ 或 ++ 以上的凝集强度，方有诊断意义。结果中必须是加正常炭血清列均呈阴性，加免疫炭血清列的盐水滴呈阴性，标准抗原滴呈阳性，说明反应条件正常，方能对检验滴做判定。
以下各表均同。

致敏 60 分钟时，用其检验抗原的效果最好。

2. 以不同浓度的免疫血清致敏炭粉的效力比较：应用 pH6.4PBS 将免疫血清稀释成 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 后，再分别与湿炭粉在 37℃ 的水浴中致敏 60 分钟制成炭血清，然后用它与不同稀释度的抗原作反应。结果（表 2），以稀释 1:400 免疫血清致敏炭粉，进行反应的效果最好。

3. 不同 pH 环境对炭凝集反应效力的影响：应用 4 种不同 pH 的盐溶液稀释免疫血清和正常血清，并制备炭血清，然后与不同稀释度的相应抗原作反应。从表 3 结果看，不同 pH 的条件下反应的敏感性有明显的区别，在 pH 6.4 条件下进行反应，其敏感性最大，检出率最高。如将 pH 值提

表 2 不同浓度的免疫血清致敏炭粉效力的比较

免疫血清 稀 释 度	与不同稀释度抗 原反应的结果						pH6.4PBS 对照
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
1:10	+++	+++	++	+	+	-	-
1:50	++++	++++	+++	++	+	-	-
1:100	++++	++++	+++	++	++	-	-
1:200	++++	++++	++++	+++	++	-	-
1:400	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
1:600	++++	+++	++	+	-	-	-
1:10 正常兔血清	-	-	-	-	-	-	-

表 3 不同 pH 对炭凝集反应效力的影响

pH 值	与不同稀释度抗原反应的结果						pH 6.4 PBS 对照
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
pH 6.4 PBS	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
pH 7.2 PBS	++++	+++	++	+	-	-	-
pH 7.4 生理盐水	++++	+++	++	+	+	-	-
pH 8.4 PBS	+++	++	+	+	-	-	-
pH 6.4 PBS (正常兔血清)	-	-	-	-	-	-	-

表 4 不同温度对炭凝集反应效力的影响

致敏炭粉温度(℃)	与不同稀释度抗原反应的结果								pH 6.4 PBS 对照
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
6	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-
12	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-
37	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
56	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-
37(正常兔血清)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

高到 8.4 时,反应的效力则显著下降。

4.不同温度致敏炭粉时对炭凝集反应的影响:将免疫血清与炭粉分别置 6、12、37、56℃下致敏 1 小时(56℃下为 20 分钟),制成免疫炭血清,然后与不同稀释度的相应抗原进行反应。从表 4 结果看出,在 37℃ 下致敏炭粉制备炭血清,与相应抗原呈现的反应强度最明显。

(二)炭凝集反应特异性和敏感性检查

1.特异性:从表 5 的检查结果看,制备的马流产炭血清有较好的特异性。但可与鼠伤寒沙门氏杆菌缓慢地发生“++”常见状态的凝集,与大肠杆菌发生“++”形像特殊的假阳性凝集。

表 5 炭凝集反应特异性检查结果

炭血清种类	与不同细菌进行反应的结果								对 照	
	腊状杆菌	枯草杆菌	无毒炭疽杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌	大肠杆菌	猪霍乱杆菌	鼠伤寒杆菌	马流产杆菌	pH 6.4 PBS
免疫炭血清	—	—	—	—	—	++	—	++	+++	—
正常炭血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

2.敏感性:在 pH6.4 的条件下,以稀释 1:400 免疫血清,在 37℃ 水浴中,处理炭粉 60 分钟,制成的免疫炭血清,用它与不同稀释度的马流产沙门氏杆菌肉汤培养物作反应。从表 6 结果看,这

样的免疫炭血清最高可与 1:64 的肉汤培养物发生“++”的凝集强度。由琼脂平板法计数推算每毫升含 2,500 万个活菌的被检物就能出现阳性反应。

表 6 炭凝集反应对马流产杆菌培养物敏感性检查结果

炭血清种类	与不同稀释度抗原反应的结果									pH 6.4 PBS 对照
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
免疫炭血清	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
正常炭血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(三)马流产病料的检查

1.病料的常规检查和炭凝集反应检查结果的比较:从表 7.8 结果看出,由 6 份马胎儿胃内容物中均分出了细菌,以常规的细菌学检查法确定

为马流产沙门氏杆菌有 5 份,另一份为其它细菌。应用炭凝集反应对上述病料进行检查时,也获得了相同的结果,但用显微镜直接检查涂片时,全部阴性。

表 7 炭凝集反应对 3 份马流产病料的检查结果

病料号	常规检查由病料中分离培养物的结果										直接检查病料的结果					
	形态特征	菌落性状	动力	葡乳麦甘蔗紫					马流产血清玻片凝集反应	每毫升胃内容物中活菌数(百万)	毒力			炭凝集反应	镜检	
				萄萄糖	芽露	醇糖	试验	力								
								原液			1:2	1:4				
18	均 为	均 为	+	⊕	—	⊕	⊕	—	—	+	520	3/3	3/3	3/3	+	—
38			+	⊕	—	⊕	⊕	—	—	+		3/3	2/3	0/3	+	—
42	G-小杆菌	S型中等大菌落	+	⊕	—	⊕	⊕	—	—	+		3/3	1/3	0/3	+	—

“+”阳性, “-”阴性, “⊕”产酸产气, 小白鼠死亡数/小白鼠实验数。

对 2 份马流产胎儿心血的检查,却出现了与上述不同的结果,常规的细菌学检查为阳性,炭凝集反应和直接镜检均阴性。

2.炭凝集反应对新鲜马流产病料的敏感性:从表 9 可见,应用 pH6.4PBS 将新鲜病料做高倍

稀释后,仍然能与免疫炭血清发生明显凝集,如每毫升胃内容物含菌量为 5.2 亿个的 18 号病料,虽经 1:256 稀释,仍然能与免疫炭血清发生“++”的反应强度。由此推算,炭凝集反应,可检出每毫升含菌量达 203 万个菌的胃内容物标本。

表 8 炭凝集反应对另外 5 份病料的检查结果

病料号	常规检查由病料中分离培养物的结果								直接检查病料的结果	
	形态特征	菌落性状	动力	葡 乳 麦 甘 紫 蔗 凝	马 流 产 H-	炭凝集反	镜 检			
				萄 芽 露				糖 糖 糖 醇 乳 糖	免 疫 血 清 玻 片 凝 集 反 应	
心血 1	均 为	均 为	+	⊕ - ⊕ ⊕ - - -	+	-	-			
胃内容物 2			-	- + + + - + +	-	-	-			
胃内容物 3			+	⊕ - ⊕ ⊕ - - -	+	+	-			
胃内容物 4			+	⊕ - ⊕ ⊕ - - -	+	+	-			
心血 5			+	⊕ - ⊕ ⊕ - - -	+	-	-			

“+”阳性，“-”阴性，“⊕”产酸产气。

表 9 炭凝集反应对新鲜马流产病料敏感性检查结果

组 别	病料号	流产胎儿胃内容物的稀释倍数											对 照	
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	pH 6.4 PBS	培养物
免 疫 炭血清	18	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	+
	38	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	-		
	42	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	-	-	-		
正 常 炭血清	18	-	-	-										
	38	-	-	-										
	42	-	-	-										

表 10 炭凝集反应对放置 14 天的 4 号病料的检查结果

组 别	检查时间	流产胎儿胃内容物的稀释倍数						对 照	
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	pH 6.4 PBS	培养物
免 疫 炭血清	当 时	++++	++++	+++	+++	+	-	-	+
	14 天后	++++	++++	+++	++	+	-	-	+
正 常 炭血清	当 时	-	-						
	14 天后	-	-						

3.炭凝集反应对陈旧马流产病料的敏感性:
从表 10 看出,放置 14 天后的病料,再用同批炭血清做检查,其反应强度变化不大,基本上仍保持原有水平。

(四)炭血清的保存期试验

将制备的炭血清保存于 4℃ 普通冰箱中 8 个月,仍保持较好的反应原性,可与 1:16 的抗原发生“++”的反应强度。更长时间的保存期,还有待今后继续做检查。

结 语

本反应除可与马流产沙门氏杆菌具有类属关

系的鼠伤寒沙门氏杆菌缓慢地发生“++”的凝集现象,与大肠杆菌发生形像特殊的假阳性反应外,与试验的另外 6 种细菌均不发生非特异的交叉反应,但与相应抗原相遇时,在 1—2 秒钟内,即发生非常明显的凝集。炭凝集反应还具有较好的敏感性,与每毫升含菌量不少于 2,500 万个的培养物相遇时,即可发生明显的凝集。

对马流产胎儿胃内容物的检查,本反应也得到了与分离培养相一致的结果,因此就可以甩掉在检验中间分离培养的复杂程序,大大的缩短了检查时间,在 10 分钟内即可预报结果,为在现场检查马副伤寒性流产提供了一个简便而特异的方法。

法。但是必须指出,炭凝集反应不适宜于对心病料的检查,因为其中的红血细胞和血清蛋白等胶体物质过多,严重的干扰反应的进行,使得反应现象变的模糊不清,无法判定。如将病料煮沸滤过后应用,虽然解决了反应现象的观察,但却失去了特异的凝集性,所以对这种病料的检查还有待进一步研究。

参 考 资 料

- [1] 兽医检验手册:上海人民出版社,97—102,1970.
- [2] Рево, М. В. : Ветеринарная Микробиология, 223, 1958.
- [3] Merchant, A. : Veterinary Bacteriology and Virology, 369, 1961.
- [4] 兽医微生物学:农业出版社,230—231,1962。
- [5] Яфаев, Р. Х. : Ж. М. Э. Н.,(9)93, 1963.
- [6] 鲍行豪:微生物学报,14(1):112—119,1974.