

以串珠试验为基础的一种炭疽杆菌快速检验新系统

李良寿 过祥豹 汪美先*

(第四军医大学, 西安)

本文报告将炭疽杆菌串珠试验与早期增菌培养、沉淀素荧光抗体染色相结合, 由串珠湿片法和串珠荧光抗体法组成的一种新的炭疽杆菌快速检验系统。

实验结果及现场标本检验证明, 本系统检验时形态特征较突出, 在一定程度上不受杂菌影响, 具有较高的特异性和敏感性。对各类炭疽标本, 尤其是外环境标本, 可不经分离纯培养于 6—8 小时内得出检验结果。文中也提出在实际标本检验中, 仍可能存在的一些问题。

炭疽杆菌快速检验尚未能很好解决。阿司可利试验和菌体荧光抗体染色均存在相当的非特异性^[1]。串珠试验是一种特异性较高的试验^[2,3], 但原法仅能用于纯菌鉴定, 操作方法较复杂费时。我们设计将含炭疽芽胞和杂菌的标本经早期增菌^[4](37℃ 3—4 小时) 后直接用串珠湿片法检出, 结果表明是可行的, 并在一定程度上不受杂菌影响; 对出现非典型串珠反应的标本, 还可利用炭疽沉淀素荧光抗体染色法(简称串珠荧光法)进一步鉴定, 从而为炭疽杆菌建立了一种新的有较高特异性和敏感性, 并无须分离纯培养的快速检验系统。

材料和方法

(一) 试验菌株

1. 炭疽杆菌: 共 241 株, 其中实验室保存菌种 49 株(包括菌苗株 8 株), 从疫区人畜组织及皮毛标本中分离的 113 株, 从皮毛厂皮毛、水、土壤等标本中分离的 79 株。

2. 其他需氧芽胞杆菌: 计蜡样杆菌 7 株, 枯草杆菌 5 株, 巨大杆菌 1 株, 未定种 99 株, 共 164 株。

(二) 方法

1. 串珠湿片法: 将炭疽芽胞和其他需氧杆菌芽胞, 分别或按不同比例混合种入 2% 兔血清肉

汤或胰陈肉汤中, 37℃ 水浴中早期增菌培养 3—4 小时后, 加入青霉素(0.5 单位/毫升) 37℃ 作用 1 小时, 再加入福尔马林(最终浓度 2%) 作用 10 分钟, 以固定串珠和杀灭残余活菌后, 涂片镜检^[5]。

2. 串珠荧光法: 取经青霉素作用和福尔马林固定后的串珠培养物一接种环, 加于预先涂有薄层甘油蛋白的载玻片上。待自行干燥后, 用无水乙醇固定 15 分钟, 取出干后用炭疽沉淀素荧光抗体染色 30 分钟, 水洗干后, 荧光显微镜检查, 分别记录串珠形态及荧光强度。

(三) 结果判定

1. 阳性: 见有圆形或椭圆形、均匀而规则的串珠, 荧光强度在“+++”以上者。

2. 阴性: 串珠试验阴性或具有不典型串珠, 但荧光强度在“++”以下者。

3. 可疑: 具有不典型串珠反应, 荧光强度在“+++”以上者。

每一菌株均同时作串珠湿片法和菌体荧光抗体染色检查。

结 果

一、早期增菌培养物串珠湿片法和串珠荧光法镜检所见

炭疽芽胞在兔血清胰陈肉汤中, 经 2

本文于 1979 年 8 月 31 日收到。

* 技术协助: 卓文言、陈民新。

小时增菌培养,已能看到由 10 个左右圆珠组成的串珠,高倍镜下清晰可见。增菌培养 3 小时后,串珠珠数平均都在 50 个以上(图版 I-1),低倍镜下容易发现。增菌培养延长至 4 小时,串珠珠数平均达 186—259,串珠很长,涂片中串珠条数,也有较明显增加^[4]。因此,对含一定量(如每毫升含 250 个)炭疽芽胞的标本,增菌培养 2—3 小时,就可获得串珠湿片检查阳性。若标本中含炭疽芽胞较少(如每毫升含 50 个),延长增菌时间至 4 小时或稍长,也可获得阳性(图版 I-2)。

炭疽杆菌经炭疽沉淀素荧光抗体染色后,荧光显微镜下见有发荧光的链杆菌,菌体细长,分节不消(图版 I-3),与其他交叉反应菌株在形态上无明显差别。炭疽杆菌串珠经荧光抗体染色后,则见发荧光的圆形细胞组成的串珠,其珠历历可数,荧光强度一般较杆菌亮(图版 I-4)。在滴加 pH8.0 缓冲甘油后,见周边部荧光更强(图版 I-5)。证明炭疽杆菌经青霉素作用变为串珠后,仍可被炭疽沉淀素荧光抗体染色,而且形态特征明显不同于其他需氧芽胞杆菌,有利于鉴别和检出。

其他需氧芽胞杆菌经青霉素作用后,大多数仍为杆菌形态,荧光抗体染色程度与未经青霉素作用的菌体同。其中某些交叉反应菌株荧光抗体染色虽较明亮,但无串珠的形态特征,容易与炭疽杆菌区别。在青霉素作用下,少数炭疽杆菌及其他需氧芽胞杆菌可形成不典型串珠,用串珠湿片法一般不易区别,经炭疽沉淀素荧光抗体染色后检查,发现荧光强度差别较明显,炭疽杆菌不典型串珠荧光强度均能达“+++”,而其他需氧芽胞杆菌的不典型串珠荧光强度多为“+”以下,个别(3/23)为“++”,一般说来,仍可区别(图版 I-6、7)。

二、含杂菌材料的串珠湿片法和串珠荧光法检查结果

串珠试验一般用于纯菌鉴定,混有杂菌时的串珠试验,文献中未见报道。为了探讨在快速检验中,不经分离纯培养过程,在混有杂菌条件下进行串珠试验的可能性,将枯草杆菌、巨大杆菌、根样杆菌和蜡样杆菌的芽胞,分别与炭疽杆菌(СТИ-1 菌株)按不同比例混合接种到胰脓肉汤中(此实验是在增菌培养基成份尚未最后确定时进行的,故用了胰脓肉汤增菌,但以后的人工污染标本和现场标本检验,均是用 2% 兔血清胰脓肉汤,同样收到较好效果)。炭疽芽胞浓度为每毫升肉汤接种 500 个。接种后于 37℃ 水浴中培养 3 小时,加入青霉素(0.5 单位/毫升)作用 1 小时后,福尔马林固定,涂片镜检。

结果如表 1。当炭疽芽胞为每毫升 500 个时,枯草杆菌、巨大杆菌芽胞数达炭疽的 1,000 倍,根样杆菌芽胞数达炭疽的 500 倍,37℃ 培养 3 小时,串珠试验仍能获得阳性结果。涂片中虽混有大量杂菌,串珠仍可辨认。但杂菌比例达 1,000 倍,有时湿片镜检为阴性,而用荧光抗体染色镜检,则仍能找到串珠,可见杂菌过多,有机械性影响。

蜡样杆菌与炭疽杆菌混合培养的串珠试验结果,则与上述结果有显著不同。当炭疽芽胞每毫升含 1,000 个时,蜡样杆菌芽胞数为炭疽的 5—10 倍,则串珠试验大受影响,这可能是蜡样杆菌产生青霉素酶的作用^[4]。

串珠荧光法检查结果基本与串珠湿片法同。当每毫升培养基接种炭疽芽胞 250—1000 个,枯草杆菌、巨大杆菌芽胞为炭疽的 500—1000 倍,根样杆菌芽胞为炭疽的 500 倍时,串珠荧光法检查均阳性。炭疽芽胞为每毫升 250 个,蜡样杆菌芽胞为炭

表 1 炭疽杆菌与其他需氧芽胞杆菌混合培养的串珠湿片法检查结果

混 合 培 养 物	杂 菌 芽 胞 数/炭 疽 芽 胞 数						
	1	5	10	50	100	500	1,000
炭疽芽胞+枯草杆菌芽胞			+++	+++	+++	+++	+++
炭疽芽胞+巨大杆菌芽胞			+++	+++	+++	+++	+++
炭疽芽胞+根样杆菌芽胞			+++	+++	+++	+++	+++/-
炭疽芽胞+蜡样杆菌芽胞	+++	-/++	-/++	-	-		

表 2 三种方法检查结果的比较

菌 种	串 珠 荧 抗 法			串 珠 湿 片 法			菌 体 荧 抗 法		
	阳 性	可 疑	阴 性	阳 性	“不典型”	阴 性	阳 性	可 疑	阴 性
炭疽杆菌									
实验室保存菌种	41	0	0	41	0	0	41	0	0
新分离菌种	185	7	0	185	7	0	192	0	0
菌苗株	5	1	2	5	1	2	8	0	0
合 计	231	8*	2	231	8	2	241	0	0
其他需氧芽胞杆菌									
蜡样杆菌	0	0	52	0	16	36	4	5	43
其他菌种	0	0	13	0	1	12	0	3	10
未定种菌株	0	0	99	0	6	93	6	17	76
合 计	0	0	164	0	23**	141	10	25	129
特 点									
特异性	100%(164/164)			85.2(141/164)			78.7(129/164)		
敏感性	99.2(231+8/241)			95.9(231/241)			100%(241/241)		

* 结合荧光强度可列入阳性。
** 除 1 株外余均可与典型串珠区别。

疽的 50 倍时,检查阳性。

实验结果表明,杂菌污染在一定范围内,对串珠试验无明显影响。因此,串珠湿片法和串珠荧抗法可能检出有杂菌污染的标本中的炭疽杆菌。

三、串珠荧抗法、串珠湿片法与菌体荧抗法特异性和敏感性的比较

241 株炭疽杆菌及 164 株其他需氧芽胞杆菌三种方法平行检验的结果如表 2。241 株炭疽杆菌中,串珠荧抗法明确阳性者 231 株,8 株可疑(串珠不典型),但结合荧光强度仍可辨认,故检出率(敏感性)为 $231 + 8 / 241 = 99.2\%$,仅二株菌苗株阴性。

菌体荧抗法的敏感性为 100%;串珠湿片法则为 95.9%。串珠荧抗法的最大特点是 164 株其他需氧芽胞杆菌全部阴性,特异性 100%;串珠湿片法的特异性为 85.2%;菌体荧抗法则只有 78.7%。可见,串珠荧抗法基本消除了菌体荧抗法的非特异性,同时也有利于鉴别某些不典型串珠菌株。

就检出所需菌量而言,串珠湿片法和串珠荧抗法当每毫升检材中含 250 个左右炭疽芽胞,经 3 小时增菌培养,即可获得阳性。离心集菌或延长增菌时间至 4 小时,敏感性可进一步提高。

讨 论

在炭疽杆菌串珠试验^[3]和炭疽杆菌早期增菌试验^[4]两项研究的基础上,我们将早期增菌与串珠试验相结合,建立了直接快速检出炭疽杆菌的新方法,其基本程序如图 1。

本串珠湿片法的特点是与早期增菌培养相结合,使标本中的炭疽芽胞转变为对青霉素敏感的幼龄繁殖型,增菌并可提高检验的敏感性。含炭疽芽胞的外环境标本,经 3—4 小时快速增菌培养后,以每毫升含 0.5 单位青霉素作用 1 小时后,镜检已能找到串珠,省略了移种、分离纯菌的手续,缩短了检验时间。杂菌(主要是其他需氧芽胞杆菌)的存在,除达到相当数量的蜡样杆菌外,其他如枯草杆菌、巨大杆菌和根样杆菌对炭疽杆菌的串珠形成都无明显影响。串珠试验的特异性已如前述^[3]。在个别情况下出现非典型串珠,应用串珠荧光法可以鉴别。

串珠荧光法利用了串珠试验和荧光抗体染色的双重特异性,串珠经炭疽沉淀素荧光抗体染色后效果良好。从本实验结果

看来,串珠荧光法基本消除了菌体荧光法的非特异性结果,164 株其他需氧芽胞杆菌中无假阳性,特异性(100%)显然较菌体荧光法(78.7%)为高;而且,通过荧光抗体染色,能鉴别炭疽杆菌的不典型串珠与其他需氧芽胞杆菌的不典型串珠,因而也比串珠湿片法的特异性(85.2%)为高,检验时间只比串珠湿片法增加了 1 小时。

和噬菌体荧光抗体染色法^[5]一样,串珠荧光法也是将荧光抗体染色与另一种形态上可见的特异性试验相结合的方法,但它较噬菌体荧光抗体染色法更为简便易行。

敏感性方面,就炭疽杆菌菌株的检出率而言,串珠荧光法的敏感性(99.2%)与菌体荧光法(100%)相近,而略高于串珠湿片法(95.9%),241 株炭疽杆菌中,仅二株菌苗株为阴性。至于检出所需菌量,串珠湿片法与串珠荧光法相同,一般每毫升检材中含 250 个炭疽芽胞经胰酶肉汤 3 小时培养,即可得阳性。若改进培养基成份(如加入 2% 兔血清)或延长增菌时间至 4 小时,或离心集菌,则敏感性尚可提高。

本检验系统曾经通过实验室人工污染

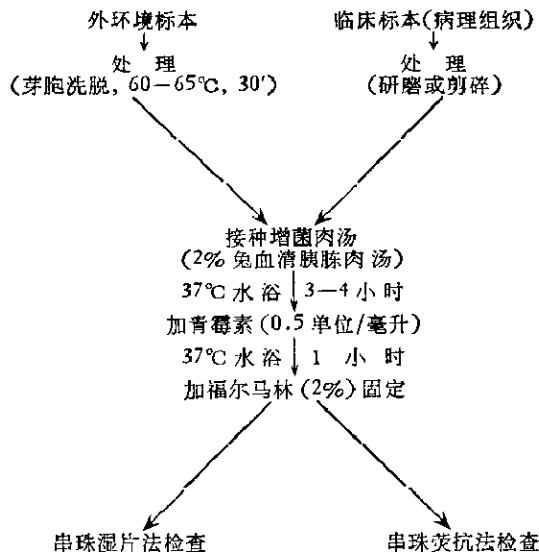


图 1 炭疽标本串珠湿片法和串珠荧光法快速检验程序

标本、炭疽疫区人畜病理组织标本和外环境标本检验考验(结果将另文陆续报道),证实:(1)具有较高的特异性和敏感性,203份人畜病理组织标本和337份外环境标本检验结果,本快速法与常规培养相符率达80—90%;(2)比较快速,不须分离纯培养,6—8小时(含标本处理时间)内可获得检验结果;(3)操作较简便,无须特殊设备,便于推广,在串珠湿片法明确阳性时,串珠荧光法可省略;(4)操作安全,镜检材料已经福尔马林消毒、固定。

但当标本中杂质、杂菌(尤其是产青霉

素酶的蜡样杆菌菌株)过多时,对串珠形成可能有一定影响;某些炭疽杆菌的特殊变异株或耐青霉素菌株,也可能得不到阳性结果。

参 考 文 献

- [1] 李良寿: 国外军事医学参考资料, 6: 133, 1962。
- [2] Jensen, J. and H. Klemyer: *Zbl. Bakt. I. (Orig.)*, 159:494, 1953.
- [3] 李良寿, 过祥豹: 微生物学报, 11(1), 81—88, 1965。
- [4] 过祥豹等: 微生物学报, 10(4): 514, 1964。
- [5] Dowdle, W. R. and P. A. Hansen: *J. Inf. Dis.*, 108(2): 125, 1961.

A NEW RAPID DETECTION SYSTEM FOR *B. ANTHRACIS* BASED ON STRING OF PEARLS TEST

Li Liangshou Guo Xiangbao Wang Meixian

(The Fourth PLA Medical College, Xian)

A new rapid detection system for *B. anthracis* has been developed. It's main procedures read as follows: 1. Cultivate spore containing specimen in rabbit serum tryptose broth for rapid enrichment; 2. Add penicillin (0.5 μ /ml) and incubate in 37°C water bath for 1 hour; 3. Fix the string of pearls and disinfect living cells with formalin; 4. Detect string of pearls of *B. anthracis* directly by microscopy of wet smear; 5. Stain string of pearls by fluorescent precipitin antibody for further identification, if necessary.

According to the results of the experiments of 231 strains of *B. anthracis* and 164 strains of other aerobic spore-forming bacillus, the detection of arti-

ficial contaminated specimens and specimens collected from epizootic area, it has been shown that this detection system has a higher specificity and sensitivity. The correlation rates between routine culture method and this system are 80—90% in the detection of 540 epizootic specimens. It may have been finished within 6—8 hours since the pure culture procedure was omitted, and may be performed in any bacteriological laboratories.

It should be pointed out that the positive result may not be got, if the specimen is heavily contaminated by other aerobic sporeforming bacilli, especially by *B. cereus* or the detected *B. anthracis* is a penicillin resistant variant.