

Angle

以螢光抗體法檢測志賀氏桿菌之探討

張淑楨

第五組

經紫外線照射後發出螢光之化合物，通稱為螢光物質，依照免疫學原理，免疫球蛋白可與特異性抗原相結合，用螢光染料標示之免疫球蛋白仍保持其原來特異，尚可與其特異性抗原相結合，且在螢光顯微鏡下放出螢光而進行免疫螢光顯微鏡觀察¹，本技術稱為螢光抗體法 (Fluorescent Antibody Technique) 簡稱 FA。

螢光抗體法²之特點包括1. 特異性 (specificity)：帶螢光物質之抗體間有相當高特異性結合反應。2. 快速性 (rapidity) 螢光染色過程及顯微鏡觀察只須數小時就可完成。3. 靈敏性 (sensitivity)：少量抗原與適量螢光抗體結合就可看到螢光。

志賀氏桿菌通常與密集發生之桿菌性痢疾有關³，這種病症常會引起死亡，可疑的食品包括經手操作或較少經熱處理 (minimum heat treatment) 動物類來源之食品，且其 pH 值在 5.5—6.5 之間，食品中若含大腸桿菌群、大腸桿菌及沙門氏桿菌者亦可能污染志賀氏菌。

目前有關應用 FA 檢測食品中 *Shigella* 之文獻極少，本試驗目的在於探討以 FA 檢測 *Shigella* 之可行性，並評估由食品中以 FA 檢測 *Shigella* 之實用性。

本實驗採用之菌種為 *Shigella dysenteriae*，係本實驗室從食物中毒檢體分離所得經 Microbact 24 E (Disposable Products, Australia) 鑑定者，該菌與血清 poly A, A₁ 反應 *Salmonella* 15 株及 *E. coli* 15 株為本實驗室從食物中分離所得之菌株。

本實驗採用之 Antisera 為能與標準菌產生凝集之 Polyvalent A (*S. dysenteriae*)，Polyvalent A₁ (*S. dysenteriae*) 和 Polyvalent C (*S. boydii*)。

標準菌株之螢光染色法步驟如下：

從 TSI agar 上挑菌以 0.85% saline 作成懸浮液取 OD₆₂₀=0.10 之稀釋液做成抹片，浸泡在固定液中三分鐘，並在 95% 酒精中浸洗 2-3 次加上 *Shigella* antiserum 置室溫 30 分鐘，以 phosphate buffered saline (PBS) 泡洗 3 次 (5 分鐘換一次 buffer) 風乾。覆蓋上 Dichlorotriazinyl aminofluorescein-conjugate。再置室溫、暗室中 30 分鐘，以 PBS 洗去過多之 FA reagent 後，浸泡於 PBS 中 10 分鐘，以無菌水沖洗後風乾，滴 glycerol-saline solution，於螢光顯微鏡下觀察之。

其結果如下：

(1) 螢光免疫抗體染色：

標準菌株經上述螢光染色處理後呈現黃綠色螢光 (如圖一) 製得之螢光染色玻片須馬上觀察、拍照，否則其螢光亮度會隨放置時間而降低。

(2) 靈敏性之測定：

Shigella 之標準菌液至少須達 10⁵./ml 始能進行顯微鏡觀察 (如表一)，如菌量小於 10⁵/ml，製得之細菌抹片太薄不足以觀察，反之，若菌量高於 10⁷/ml，抗原的表現遠大於結合後之抗體，將使螢光亮度降低。

(3) *Shigella* 與其他腸內桿菌交叉污染：

以 FA 檢測食品中 *Shigella*，其中一項缺點為，某些腸內桿菌如 *E. coli*, *Salmonella* 會與 *Shigella* 之抗血清結合，造成偽陽性 (如表二) 15 株 *Salmonella* (試驗菌數為 10⁵/ml) 中有 10 株 (66.7%)，15 株 *E. coli* (試驗菌數為 10⁵/ml) 中有 7 株 (46.7%) 會與 *Shigella* 抗血清發生凝集現象，此係 *Shigella* 之抗血清特異性不高，故若要檢驗食物中毒檢體中是否有 *Shigella*，須發展特異性較佳且可與所有

以螢光抗體法檢測志賀氏桿菌之探討



圖一 螢光染色後之 *Shigella*

表一 不同菌數之 *Shigella* 染色後之螢光亮度

亮度	<i>Shigella</i> 菌數 CFU/ml			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
強		V		
中			V	
弱				V
無	V			

備註：本表內使用之血清為 Poly A, A₁, C.

表二 *Shigella* 抗血清與 *Salmonella*, *E. coli* 凝集反應之結果

菌名	菌株數	與 <i>Salmonella</i> <i>antisera</i> 凝集之菌株數	凝集百分率 (%)
<i>Salmonella</i>	15	10	66.7
<i>E. coli</i>	15	7	46.7

備註：1. 本表內使用之血清為 poly A, A₁, C.

2. 本試驗中 *Salmonella*, *E. coli* 菌數為 10⁵/ml.

Shigella 結合之 polyantiserum，方能符合實際應用需求。

(4)將 *Shigella* 菌株接種鮮奶，以 GN broth 增菌一天，取增菌液經上述步驟進行 FA 觀察，無法觀察到螢光，可能增菌液須經過其它處理，才可進行如標準菌一樣的 FA 染色法，標準菌與 DTAF-conjugate 之結合已實驗證明其可行性，而食品因其本身成份複雜，經增菌後，雖然 *Shigella* 會大量繁殖，但亦可能增加其他菌的存在機會，取增菌液進行 FA 染色後不似標準菌容易形成 conjugate，即使形成且觀察到螢光亦不能確認究竟為 *Shigella*, *Salmonella* 或 *E. coli*. FA 在食品微生物檢驗上雖具有快速、靈敏、費用低之優點，卻受到 1. 抗血清特異性不高，易與其他腸內桿菌交叉反應造成偽陽性。2. 此法僅能當做一種篩選試驗，須再以生化試驗證實...等限制，故尚未能實際應用在食品上之檢驗。

參考文獻

1. 戴佛香。(1984)，微生物學(上)，第三版。P.23(台灣商務印書館)。
2. Kawamura, A. (1977); Fluorescent antibody technique, 2th ed. Ch. 2. published jointly by University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore and Manchester.
3. Mehlman, I. J. (1984) *Shigella*. In "Bacteriological Analytical Manual" 6th ed, US Food and Drug Administration, Washington, D. C.

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

STUDIES ON FLUORESCENT ANTIBODY METHOD FOR DETECTING SHIGELLA

RU-MAY CHANG

DIVISION OF FOOD MICROBIOLOGY

ABSTRACT

The purpose of this test is to evaluate the possibility of detecting *Shigella* in foods by indirect fluorescent antibody method. The results showed: (1) Sensitivity: a minimum of 10^5 *Shigella* per ml is needed. (2)

Cross reaction: the *Shigella* conjugated antisera reacted with *Salmonella* and *E. coli* up to 66.7% and 46.7%, respectively. (3) *Application of this method on food examination needs further study.*