

协同凝集试验快速诊断菌痢的观察

袁新华¹ 舒时隆¹ 李文毅¹ 顾乐¹ 田瑛¹ 杨尚清¹ 孙宜雯²

近十多年来,国外对金黄色葡萄球菌A蛋白(简称SPA),应用于免疫学与血清学的研究日见广泛。在国内,协同凝集试验技术在脑膜炎球菌分群^[1]、变形链球菌血清分型^[2]、志贺氏菌属分型^[3]等方面的应用已有报导。本文报告协同凝集试验用于菌痢快速诊断的初步结果。现介绍如下:

原 理

由于SPA具有与许多哺乳动物血清中IgG的Fc段发生非特异性结合的特性。当用痢疾杆菌(下称痢菌)免疫血清致敏后,SPA即与痢菌免疫血清中IgG的Fc段结合。结合后IgG的Fab段暴露于外,并保持其正常的抗体活性和特异性。当与含有相应抗原的患者粪便悬液混合后,抗原则与IgG的Fab段结合,而使已经抗体致敏的SPA相互联结形成协同凝集反应。

材料与方 法

一、SPA菌株:含丰富A蛋白的No.1,800株系由遵义医学院提供。

二、免疫血清:用于致敏SPA的福氏多价(效价1:12,000)、宋内氏(效价1:1,600)痢菌免疫血清均由解放军255医院供给。用于痢菌血清学分型的志贺氏菌属分型因子血清系北京生物制品研究所产品。

三、SS培养基:上海市医学化验所产品。

四、痢菌增菌液:配方及制备方法参照文献⁽⁴⁾。

五、粪便标本:系县医院、城关医院肠道门诊患者新鲜粪便。

六、SPA菌稳定液的制备:将金黄色葡萄球菌No.1,800株接种于普通琼脂培养基,37°C培养18~24小时,用PBS(0.15M氯化

钠,0.01M磷酸盐,pH7.4)洗下菌体,经4,000转/分离心后洗二次,以含0.5%甲醛的PBS制成10%(V/V)悬液,室温下作用3小时后,置水浴80°C15分钟,加热时不时摇动。取出后,迅速冷却,再以PBS洗三次。最后以PBS作成10%SPA菌稳定液,加入0.1%迭氮钠,放置4°C冰箱保存备用。但用前必须先经离心,沉淀菌体用PBS洗一次。

七、SPA菌试剂制备:于1毫升10%SPA菌稳定液中,加入0.1毫升痢菌免疫血清,混匀,室温下作用30分钟,不时用手振摇,以PBS洗涤菌体二次;沉淀菌体用含0.1%迭氮钠的PBS制成1%(V/V)悬液即成抗体致敏的SPA菌试剂,置4°C冰箱可保存5个月以上。

八、试验方法:

粪便标本的增菌:用无菌棉拭取粪便脓血粘液部分,先涂抹SS平板,作常规培养,再将同一棉拭放入痢菌增菌液4毫升中,37°C增菌12~24小时。

协同凝集试验:用滴管取福氏多价、宋内氏免疫血清致敏的SPA菌试剂各2滴分别滴于玻板上,然后各加增菌液2滴,混匀;衬以黑色背景,在数秒~2分钟内,肉眼观察结果;结果以凝集颗粒大小和液体清晰程度判定为+、++、+++四种反应,并以++以上为阳性反应。与某群SPA菌试剂发生凝集(++以上)判为某群阳性。

结 果

一、特异性试验:

菌株来源:福氏1型、2型、3型、4型、5型、X变种、Y变种和宋内氏、志贺氏2型及鲍氏痢菌,伤寒、副伤寒乙和鸭沙门氏菌,肺炎克雷伯氏菌,枸橼酸杆菌,亚利桑那杆菌(1,

1 安徽省宣城县防疫站

2 宣城县人民医院

2:1,2,5), 粘质沙雷氏菌, 普通变形杆菌, 大肠杆菌(O₁₁₁·B₄·H-)均为卫生部生物制品检定所供给; 爱德华氏杆菌, 粪产碱杆菌为我站分离。

试验结果: 所试福氏痢菌各型及宋内氏菌株均与相应免疫血清致敏的SPA菌试剂呈协同凝集试验阳性。其他实验菌株协同凝集试验

均为阴性, 未见交叉凝集现象。

二、敏感性试验: 取福氏1型及宋内氏菌各一株制备菌液, 定量加入正常人粪制成的50%粪汁内, 作直接协同凝集试验, 并接种SS平板作常规培养。同时, 取0.5毫升含菌粪汁接种痢菌增菌液, 37°C增菌, 分别于增菌8、12、24小时后作协同凝集试验(附表)。

附表 协同凝集试验和培养法检出阳性菌量敏感性比较

菌型	菌量 (个/毫升)	培养法 (SS培养基)	协同凝集试验			
			直接法	增菌法		
				8小时	12小时	24小时
宋内氏	9.6 × 10 ⁸	+	#	#	#	#
	9.6 × 10 ⁷	+	卅	#	#	#
	9.6 × 10 ⁶	+	卅	卅	#	#
	9.6 × 10 ⁵	+	卅	卅	卅	卅
	9.6 × 10 ⁴	+	卅	卅	卅	卅
	9.6 × 10 ³	-	-	卅	卅	卅
	9.6 × 10 ²	-	-	-	卅	卅
	9.6 × 10 ¹	-	-	-	-	卅
9.6 × 10 ⁰	-	-	-	-	-	
福氏	1.2 × 10 ⁹	+	#	#	#	#
	1.2 × 10 ⁸	+	卅	卅	#	#
	1.2 × 10 ⁷	+	卅	卅	卅	#
	1.2 × 10 ⁶	+	卅	卅	卅	卅
	1.2 × 10 ⁵	+	-	卅	卅	卅
	1.2 × 10 ⁴	-	-	-	卅	卅
	1.2 × 10 ³	-	-	-	-	卅
	1.2 × 10 ²	-	-	-	-	-
1.2 × 10 ¹	-	-	-	-	-	
1.2 × 10 ⁰	-	-	-	-	-	

注: 三法的对照组均为阴性。

从附表看出, 直接协同凝集试验所采用的福氏致敏SPA菌试剂检出痢疾杆菌最低量为120万/毫升, 而宋内氏为9.6万/毫升。增菌后协同凝集试验敏感性较直接法增高1,000倍。

三、粪便检测结果: 273份标本中, 协同凝集试验阳性82份, 阳性率30.0%; 培养法阳性62份, 阳性率为22.7%。协同凝集试验阳性率略高于培养法。

273份标本以两种方法检测结果对比, 两法均阳性52份, 两法均阴性181份, 总符合数233份, 总符合率为85.3%。

培养法阳性而协同凝集试验阴性10份, 占3.7%; 培养法阴性而协同凝集试验阳性的30份, 占11.0%。

两法均阳性的52份, 协同凝集试验结果为: 福氏致敏SPA菌试剂阳性47份, 宋内氏致敏SPA菌试剂阳性5份。52株痢菌血清学鉴定结果与之完全相符, 即福氏痢菌47株, 宋内氏痢菌5株。

四、SPA菌试剂的稳定性: 制备好的SPA菌试剂, 在4°C条件能够保存多久, 我们作了初步观察。我们将制备好的SPA菌试剂, 装

于有塞试管中,保存于冰箱(4 °C但不冰冻)。每隔一定时间测定其与相应抗原的凝集强度。从制备时起,冰箱中保存已达5个月,SPA菌试剂凝集效果没有改变。

讨 论

一、送检的273份粪便标本,两种检测方法的总符合率较高(85.3%),说明协同凝集试验具有一定的敏感性和特异性。但还存在着一定比例的假阳性率或称可能阳性率(11.0%)和漏检率(3.7%),值得注意。

漏检率的出现,分析可能有二方面的原因:①自制痢菌增菌液对杂菌的抑制能力不强。这样,粪便中的杂菌会与痢菌同样繁殖。当粪便中的痢菌含量较少时,由于杂菌的大量繁殖,反而不利甚至阻碍痢菌的生长,致使增菌效果不良,而达不到测定需要的菌量,就会造成漏检。若在增菌液中加入适量的抑制大肠杆菌生长而对痢菌无害的药物,来增强增菌效果,漏检率可能会降低。②协同凝集试验漏检的10份标本中,有3份标本整个平板上仅见1~2个典型痢菌菌落生长。实验中采用同一棉拭采取标本,涂抹平板后,再接种增菌液作协同凝集试验。若粪便含菌量较少,平板涂抹后,棉拭上附着的菌量必然减少。若菌量减少到本方法最小检出菌量,就可能造成假阴性结果。因此,正确地采集标本,也能有效地克服漏检。

关于假阳性问题,也受多种因素的影响。分析原因,可能有以下几点:①本方法(增

菌后)比常规培养(SS平板)敏感100~1,000倍,具有较高的阳性检出率。②常规培养选用SS培养基,有的痢菌在此培养基上生长受抑制,造成一定数量的假阴性结果。③免疫血清未经吸收处理,存在一定的非特异凝集素,也会引起一定的非特异交叉反应。④观察结果时的人为因素。判定协同凝集试验结果是以“++”以上为阳性标准的。本实验30份假阳性标本中,有15份为“++”凝集。这“++”的凝集强度,对不同检验者的观察是有差别的,特别是初学者容易造成判断误差。综上所述,如能选用经过吸收的高效价免疫血清,并提取和纯化IgG来制备SPA菌试剂;常规培养选用痢菌检出率的选择性培养基;检验者熟练操作,减少人为误差;假阳性率可能会降低到一定限度。

二、在菌痢快速诊断中的应用价值:就协同凝集试验而论,由本文所述,可以说明该法敏感、快速、具有一定的特异性。与常规培养比较,本法经济、省事、省时,而且本法操作容易,不需要特殊设备,抗体致敏SPA的方法又简便,影响因素少,试剂稳定,不易污染变质,可保存较长时间。因此,易于在基层推广使用。如能在方法上进一步改进,用于菌痢的快速诊断,是一个较为合适的方法。

参 考 文 献

- 1.张颖悟等:流行病学杂志,1(2):111,1980。
- 2.陈廷祚等:中华微生物学和免疫学杂志,1(4):251,1981。
- 3.周惠民等:流行病学杂志,2(2):126,1981。
- 4.薛德义等:上海医学,4(1):37,1981。

本刊1982年第2期更正

页	栏	行	误	正
83	左	倒19	10~14岁4例	10~14岁21例
83	右	末		张金铭整理
113	右	7	59例	159例
113	右	17	HBeAg阴性血清	HBeAg在阴性血清
113	右	20	72例	12例
89	右	倒2	如表1所示。	去掉