

协同凝集试验快速诊断伤寒的探讨

安徽省宣城县卫生防疫站

袁新华 舒时隆 李文毅 卞洪水 陈国平 张永远

现人们将金黄色葡萄球菌A蛋白(简称SpA)作为一种载体,标记上特异性抗体作协同凝集试验,已得到越来越广泛的应用。我们运用协同凝集试验,探讨了快速诊断伤寒的可能性,现将试验方法报告如下:

材料和方法

一、SpA菌体试剂:系上海生物制品研究所产品,批号:82-3。

二、免疫血清:用于标记SpA的Vi、O₉因子血清,系上海生物制品研究所产品,于有效期内使用。血清效价:Vi 1:1280、O₉ 1:120。用于菌株鉴定的沙门氏因子血清系成都生物制品研究所产品,于有效期内使用。

三、SFM增菌液及HE培养基:参照文献处方,本室自制。

四、SpA菌体试剂的标记:于1毫升10% SPA菌体试剂中,加入0.6毫升(根据血清效价可以增减)Vi或O₉因子血清,充分混匀置37℃水浴标记30分钟,不时用手振摇。然后以PBS洗涤菌体二次,再用含0.1%叠氮钠的PBS制成2%(V/V)悬液沉淀菌体,即成Vi血清标记的SpA菌体试剂(简称SpA-Vi血清试剂)或O₉血清标记的SpA菌体试剂(简称SpA-O₉血清试剂)。

五、试验方法:

1.常规培养:粪便或肛拭标本置SFM增菌液放37℃24~48小时培养,划线分离于HE平板。分离鉴定程序参照常规方法进行。

2.协同凝集试验:试验分过筛试验和确证试验两步进行。具体方法如下:

①过筛试验:取SpA-Vi血清试剂二滴

于玻板上,然后加等量的粪便增菌培养物,混匀,衬以黑色背景,3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十、十、十、十四种反应,以十为阳性反应。

②确证试验:凡过筛试验为阳性的标本,再进行以下试验。取1毫升左右的增菌培养物于试管中,100℃水浴1小时。冷却后,再用SpA-Vi血清试剂和SpA-O₉血清试剂分别作协同凝集试验。两项结果均为阳性者判为伤寒阳性。

实验结果

一、特异性试验:

1.菌株来源:伤寒(菌号:50402)、甲型副伤寒(菌号:50001)、乙型副伤寒(菌号:50004)、猪霍乱(菌号:50019)、肠炎(菌号:50041)、鸭(菌号:50774)、阿伯丁(菌号:50107)、沙门氏菌、大肠艾希氏菌O₁₁₁K₅₈(菌号:44155)、枸橼酸杆菌(菌号:48018)、肺炎克雷伯氏菌(菌号:46114)、阴沟肠杆菌(菌号:45301)、粘质沙雷氏菌(菌号:41002)、蜂窝哈夫尼亚菌(菌号:45201)、摩根氏变形杆菌(菌号:49086)、奇异变形杆菌(菌号:49027)、产碱普罗菲登斯菌(菌号:42040)、副溶血性弧菌(菌号:20012)、硝酸盐阴性不动杆菌(菌号:25001)、粪产碱杆菌(菌号:40001)均为卫生部药品生物制品检定所供给。福氏志贺氏菌1a、2a、3a、4型,鲍氏、宋内氏志贺氏菌,爱德华氏菌,舒密次氏志贺氏菌,邻单胞菌均为本室分离。

2.试验结果:所有实验菌株均制备浓菌

液, 过筛试验阳性者, 再进行确证试验。结果伤寒沙门氏菌呈典型的阳性反应。其它菌株均为阴性。

二、敏感性试验: 取伤寒沙门氏菌(菌号: 50402)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, 同时取1毫升染菌的粪汁接种SFM增菌液, 37°C增菌24小时, 作增菌后协同凝集试验及HE平板分离, 结果见附表。

附表 协同凝集试验和常规培养法
敏感性比较

检 查 方 法	出现阳性反应的最低菌量个/毫升	
直接协同凝集试验	SpA-Vi血清试剂	2500万
	SpA-O ₉ 血清试剂 (菌液100°C 1小时)	2500万
增菌后协同凝集试验	SpA-Vi血清试剂	5
	SpA-O ₉ 血清试剂 (菌液100°C 1小时)	5
增菌后常规培养(H、E平板)		5

三、379例粪便检测结果: 379例粪便标本经SFM增菌后, 用协同凝集试验和常规培养法检查。

1. 过筛试验结果与常规培养法结果比较: 两法均阳性3份, 均阴性361份, 总符合率96.04%。过筛试验阳性, 经培养阴性15份, 假阳性率3.96%。

2. 确证试验结果与常规培养法结果比较: 两法均阳性3份, 均阴性376份, 总符合率100%。3份协同凝集试验阳性标本, 挑取玻片凝集颗粒作常规培养, 均分离出伤寒沙门氏菌。

实验方法及条件的说明

一、伤寒沙门氏菌V、VW型菌株, 在适宜条件下可产生丰富的Vi抗原。在D群沙门氏菌中, 唯有伤寒沙门氏菌具有Vi抗原。据此, 我们建立了快速诊断伤寒的协同凝集试验。本法对于失去Vi抗原的W型菌株造成漏检, 是其缺点, 但自人体初次分离的伤寒沙门氏菌一般都具有Vi抗原, W型菌株也较为少见。

本法分过筛、确证试验两步进行。过筛试验主要是检查培养物中的Vi抗原的有无, 对大量标本起筛选作用。确证试验主要是证实Vi、O₉抗原的存在, 确定伤寒沙门氏菌的诊断。同时也排除仅含Vi抗原的其它肠道细菌, 如枸橼酸杆菌O₂₉等。

二、加热处理的作用: 培养物经加热处理可消除Vi抗原对O抗原凝集性的抑制, 同时, 也可破坏粪便中存在的一种不耐热的能引起非特异性凝集反应的物质, 从而排除非特异性干扰。

三、菌液加热处理后, 与SpA-Vi血清试剂仍呈协同凝集性反应。这是因为含Vi抗原的培养物经加热处理, Vi抗原易与菌细胞分离, 但并未破坏, 菌液的上清液仍含有Vi抗原并具有抗原性。若与SpA-Vi血清试剂接触, 作为指示系统的葡萄球菌, 通过标记在表面的特异性抗体F(ab)端与特异性抗原互相连结而呈凝集反应。

摘 要

本文报告玻片协同凝集试验诊断伤寒的方法, 用伤寒杆菌诊断血清标记SpA菌体试剂。操作分过筛试验和确证试验两步进行, 并对方法的特异性、敏感性以及其它试验条件进行了探讨。

379例患者粪便标本, 以协同凝集试验的方法检测, 与常规培养法比较, 所得结果一致。

本法操作简便、经济, 有良好的特异性和敏感性, 可用于临床常规检验和流行病学调查。

ABSTRACT

A slide co-agglutination method for the diagnosis of typhoid fever was reported. SpA reagent coupled with antiserum against typhoid bacillus was used. The specificity and sensitivity of this method in different conditions were also tested. Examinations of 379 faeces samples from patients with both slide SPA coagglutination and routine culture methods were carried out. The same result was obtained with both methods. Slide SpA coagglutination method was found to be simple, economic, highly specific and highly sensitive. It can be used as a routine test in clinical laboratory diagnosis and epidemiological investigation.

(本文承宣城县人民医院传染科、肠道门诊提供标本, 孙宜雯、夏蔡宝同志参加部分工作, 特表谢意)