

改良间接免疫荧光方法在军团病 诊断上的应用

山东省卫生防疫站 王继斌 赵克义 吴俊英 曹金福 李云圃 (指导者)

提要 本文用IFA与改良IFA法平行对Lp-I、Ⅲ~Ⅵ型与各型抗血清和有关病原体抗血清及31株肺炎病原菌与Lp各型抗血清进行交叉试验,两法结果相同。检测46例肺炎病人双份血清和116份正常人血清抗体,两法结果基本一致。证明改良IFA与原法一样,具有较高的灵敏性和特异性,可用于军团病的实验室诊断。

关键词 军团病 改良间接免疫荧光方法 间接免疫荧光方法 灵敏性 特异性

间接免疫荧光试验(IFA)已公认为军团病的血清学诊断方法,具有较好的敏感性和特异性^[1,2]。但在应用时需要正常鸡胚卵黄囊液(NYS)稀释抗原等,手续较繁,不适用于大量的流行病学调查。我们对此进行改进,简化手续,与原IFA法进行了比较,效果良好。现报告如下:

材料与方 法

一、材料:

- 1.肺炎病人急性期和恢复期血清46对(92份),正常人血清116份,共计208份。
- 2.Lp-I、Ⅲ~Ⅵ型菌种由南京市卫生防疫站提供。
- 3.羊抗人IgG荧光抗体(批号8602)工作效价1:16;羊抗兔IgG荧光抗体(批号8501)工作效价1:16,均由上海生物制品研究所生产,在有效期内使用。
- 4.Lp各型抗血清由本室免疫家兔获得。
- 5.鼠疫杆菌、肺炎支原体、钩端螺旋体(波摩那型)抗血清由中国预防医学科学院流研所提供。
- 6.肺炎球菌、肺炎杆菌、绿脓杆菌、白色念珠菌和白色葡萄球菌均由本室从肺炎病人中分离。

二、方法:

1. IFA方法: 见参考文献^[2]。

2. 改良IFA方法:

①细菌抗原的制备: 将Lp-I、Ⅲ~Ⅵ型菌种分别接种于军团病杆菌属-猪肺消化液(LEG-PLP)琼脂培养基斜面, 35℃, CO₂烛缸培养3天, 取下菌苔混悬于无菌蒸馏水中, 置沸水浴20分钟杀菌。培养无细菌生长后, 离心去上清液, 用无菌蒸馏水洗涤两次, 加0.1% NaN₃, 4℃保存。用前以无菌蒸馏水稀释上述菌液, 测OD值达0.08, 然后将各型菌液涂在特制带孔玻片上, 加热固定后应用。此处省略以无菌蒸馏水配制0.5% NYS稀释菌液和丙酮溶液固定抗原包被的载玻片。

②IFA方法: 被测血清用pH7.6, 0.01M PBS配制的2.5% NYS稀释。

③改良法: 待检血清用pH8.0, 0.01M PBS液, 自1:4倍比稀释至1:256。将各稀释度血清分别滴在上述菌悬液涂片上, 置湿盒35℃, 30~40分钟。用pH8.0, 0.01M PBS洗去玻片上多余的血清, 用滤纸拭干涂片。每个菌膜上滴加足量羊抗人IgG荧光抗体, 置湿盒35℃, 30~40分钟。按以上方法再洗一次, 用蒸馏水冲洗干净, 自然干燥后, 菌膜上滴加适量1:10 PBS甘油缓冲液, 盖玻片后荧光显微镜检查。

④判断结果：荧光强度标准按常规法判断，以每个视野至少50%被检菌产生荧光的血清最高稀释度为效价终点。每次试验设阳性和阴性(PBS)对照。肺炎病人双份血清抗体滴度增长 ≥ 4 倍并达1:128或均 $\geq 1:256$ ，正常人血清滴度 $\geq 1:128$ 判为阳性^[3]。

结 果

一、Lp-I、III~VI型与各型抗血清试验结果：各菌型之间交叉滴度一般在1:200以下，少数可高达1:800，而同型滴度均 $\geq 1:12800$ (表1)。

表1 Lp-I、III~VI型与各型抗血清交叉试验结果

菌型	抗 血 清 (1:)				
	I	II	IV	V	VI
I	12800	200	200	200	200
II	200	12800	200	200	200
IV	<100	800	12800	100	800
V	<100	<100	200	12800	800
VI	200	800	800	400	51200

注：稀释滴度从1:100开始，与原IFA试验结果一致

二、Lp各型与其它有关病原体抗血清试验结果：Lp各型与鼠疫杆菌、肺炎支原体抗血清的交叉滴度分别为1:4和1:2(其中I型与肺炎支原体抗血清无交叉反应)，与钩端螺旋体抗血清无交叉反应，该结果与原IFA试验结果一致。

三、Lp各型抗血清与有关细菌试验结果：31株肺炎病原菌与Lp-I、III~VI型抗血清试验结果表明，除与白色葡萄球菌(1株)的交叉滴度为1:2外，与肺炎球菌(16株)、肺炎杆菌(11株)、绿脓杆菌(2株)、白色念珠菌(1株)均无交叉反应。该结果与原IFA试验结果一致。

四、肺炎病人双份血清检测结果：46例肺炎病人双份血清，Lp-I、III~VI型抗体阳性者中有1例双份血清抗体滴度均达1:256，其余者呈 ≥ 4 倍升高。两法无显著差别(表2)。

表2 原IFA与改良法检测46例肺炎病人双份血清Lp抗体结果比较

类别	检测例数	IFA		改良IFA	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
急性期	46	1	2.17	1	2.17
恢复期	46	22	47.83	21	45.65

$$\chi^2=0.25, P>0.05$$

五、正常人血清检测结果：116份血清，原IFA法Lp-I、III~VI型抗体滴度阳性10份，阳性率8.62%；改良IFA法阳性12份，阳性率10.34%，符合率98.28%。改良法灵敏性100%，特异性98.11%。两法无显著差别(表3)。

表3 原IFA与改良法检测正常人血清Lp抗体结果比较

	IFA		合计	
	+	-		
改良IFA	+	10	2	12
	-	0	104	104
合计		10	106	116

$$\chi^2=0.5, P>0.05$$

我们试用原IFA与其改良法对血清抗体滴度 $\geq 1:64$ 者进行了三次试验，并分别观察了菌膜滴加待检血清和羊抗人IgG荧光抗体后，分别置湿盒35℃作用30分钟与40分钟的效果。表明改良IFA法的重复试验是稳定的。

讨 论

IFA是军团病血清学诊断的常规方法，我们通过实践认为试验步骤较繁，检测时易发生非特异性荧光，影响结果的判断。故我们对该法进行了改进，简化了步骤。

与原法做平行试验的结果表明，Lp-I、III~VI型与各型抗血清交叉滴度 $\leq 1:800$ ，同型滴度 $\geq 1:12800$ ；Lp各型与有关病原体抗

血清及我们分离的31株肺炎病原菌与Lp各型抗血清均无交互关系,证实改良IFA与原方法一样,具有较高的灵敏性和特异性。检测46例肺炎病人双份血清, Lp-I、III~VI型抗体阳性者中除1例双份血清抗体滴度均达1:256外,余均呈 ≥ 4 倍升高,两法结果基本一致。检测116份正常人血清抗体亦获得满意的结果。我们还对肺炎病人及正常人血清抗体滴度 $\geq 1:64$ 者进行了三次试验,证实改良IFA法的重复试验是稳定的。对军团病的临床诊断和流行病学是一种有实用价值的方法,建议试用。

Modified IFA Assay in Diagnosis of Legionellosis Wang Jibin, et al., Sanitary and Anti-epidemic Station of Shandong Province, Jinan

IFA and modified IFA assay were used for the antigen-antibody reaction between *L. pneumophila* type I, III to VI and their anti-sera as

well as anti-sera of other related bacteria, and between 31 strains of pneumonic pathogens and various types of Lp-antisera. The same results were obtained by using these two methods, 46 pneumonia cases with paired sera and 116 normal sera were examined for Lp-antibody. The results obtained by both were almost the same. It was shown that the modified IFA assay was sensitivity and specific as the original one, and it could be used in laboratory for the diagnosis of Legionellosis.

Key words Legionellosis IFA Modified IFA Specificity Sensitivity

参 考 文 献

1. 钱宇平主编, 退伍军人病研究进展, 流行病学进展, 第三卷, 第一版, 北京: 人民卫生出版社, 1985; 186.
2. 冯根宝, 等. 南京地区正常人军团病杆菌1型抗体水平的初步调查. 医学资料 1983; 61-62: 22.
3. 胡修元. 军团病. 医学资料 1983; 61-62: 1.

精神发育迟缓儿童巨细胞病毒抗体调查

湖南医科大学第一临床学院中心实验室

邬若楠 赖伏英 陈 争 李镇辉

本文对1986年1月至1987年6月我院儿科、产科及神经内科遗传门诊的各种精神发育障碍患儿98例(包括大脑发育不全、精神发育迟缓、脑性瘫、痴呆、小头畸形、脑积水等)用免疫酶染色法检测血清中巨细胞病毒IgG及IgM抗体,与同期住院的非神经系统疾病的其他患儿81例,20至40岁女献血员58例及同期收集的脐带血118例进行比较。患儿组均经外周血染色体核酸型分析正常以排除染色体异常所致的遗传因素。免疫酶染色法测IgM阳性的标本均经乳胶法测类风湿因子为阴性以排除所引起的假阳性反应。检测结果脐血组IgG阳性率73.72%, IgM阳性率34.74%, 献血员组分别为79.31%和37.93%, 两组相比IgG及IgM阳性率均无显著差异。患儿组与对照组各按年龄分为小于4个月、5月~2岁、2~6岁和6~8岁四个组。IgG测定在患儿的

4个年龄组中阳性率分别为80%、71.87%、73.46%和75%,在对照儿童的四个年龄组分别为75%、69.56%、70.83%和100%。两组儿童按年龄组比较IgG阳性率均未发现明显差异。IgM测定在患儿的四个年龄组阳性率分别为40.0%、21.87%、26.53%和33.33%,在对照儿童的四个年龄组分别为12.5%、30.43%、37.5%和50%。两组儿童按年龄分组后的IgM阳性率相比亦未发现显著差异。

本文调查脐血IgM阳性率高达34.74%,但两组4月龄以下婴儿IgM阳性率之间无显著差异,小于4月龄的患儿组与脐血组相比亦无显著差异,说明本次IgM抗体调查未能发现精神发育缺陷与先天性巨细胞病毒感染间的关系。