

用EDTA制备军团菌抗原检测 血清抗体的研究

王俊升¹ Brown-schlumpt Marguerite² Brown Arnold³

提要 用简化方法提取Lp1~6和Legionella micdadei (Tatlock)的EDTA抗原并和超声波抗原平行检测2份医院工作人员血清, Lp1抗体滴度均为1:80~160; 4例军团菌肺炎病人的7份血清中, 有3份用两种抗原检测Lp1抗体滴度均升高达1:1280~2560; 另4份血清用EDTA抗原检测, 结果比超声波抗原检测结果低1~3个稀释度; 但均达到诊断水平(1:320)。检测33份正常人血清, 与以上结果的趋势一致, 提示EDTA抗原的敏感性与特异性均比较好, 且制备方法简便, 值得进一步研究。

关键词 EDTA抗原 超声波抗原 敏感度 特异度

间接免疫荧光抗体试验是检测军团菌抗体广泛使用的方法。以后建立的酶联免疫吸附试验(ELISA)可将多种抗原混合, 以筛检相应抗体, 具有简便、快速、敏感等优点^[1,2]。由于军团菌菌型之间以及与铜绿假单胞菌和多种革兰氏阴性杆菌之间存在交叉抗原^[3,4], 超声波制备的军团菌抗原(超声波抗原)用于ELISA检测时, 有时出现较明显的交叉反应, 影响检测结果的判定。本研究的目的是制备一种敏感性和特异性较好的抗原, 提高ELISA的检测效果。

材料和方法

一、抗原制备:

1. EDTA提取法: 将Otten使用的方法^[5]稍简化。Lp1~6型、Tatlock菌株从CDC获得, 在BCYE培养基上培养72小时, 用pH7.4灭菌PBS洗下菌苔, 26000g离心20分钟, 弃去上清液。用pH7.4 PBS洗沉淀3次, 将沉淀称重, 每克沉淀加0.01M EDTA PBS10ml (pH7.4)混匀, 分成3份, 分别在45℃条件下振荡1、4和12小时提取抗原, 12000g离心20分钟, 上清液用0.22μm Millex过滤, 获检测用EDTA抗原。

2. 超声波法: 菌株来源同上, 在BCYE培养基上孵育72小时, 用pH7.2 PBS洗下菌苔, 加热灭活, 洗3次, 离心, 每0.1克沉淀加灭菌PBS 1.5ml, 4℃下用超声波破碎菌体, 25000g离心20分钟, 上清液即检测用抗原^[2]。铜绿假单胞菌抗原制备方法同上。

二、血清标本: 由细菌培养确诊为Lp1肺炎的4例病人采血7份; 实验室工作人员采血2份, 无疑似军团菌病病史。采33份正常人血清, 超声波多价抗原(Lp1~6)初筛抗体滴度为 $\geq 1:640$ 。

三、ELISA: 用上述两种抗原平行检测血清抗体。部分标本检测Lp1、4和Tatlock型抗体; 另33份正常人血清检测Lp1~6型抗体, 使用振荡4小时提取的EDTA抗原。检测步骤及判定标准同文献^[2]。被检血清均用铜绿假单胞菌抗原吸收。

结 果

一、不同提取时间制备EDTA抗原和超声

1 山西医学院流行病学教研室, 太原市, 邮政编码030001; 2 美国南卡州VA医院; 3 美国南卡州VA医院、南卡大学微生物学免疫学教研室。

波抗原检测结果比较：结果见表1。

康人血清，终滴度均为1:80~160，与超声波抗原检测的结果一致。表1显示检测2份病例的

用不同时间提取的EDTA抗原检测2份健康人血清，结果见表1。

不同时间提取EDTA抗原和超声波抗原检测血清抗体结果比较

	超声波抗原		EDTA抗原			起 始 稀释度
	L ₁	L ₂	L _{p1} (4h)	L _{p1} (4h)	L _{p1} (12h)	
病例号23	1:1280	1:1280	1:320	1:160	1:160	1:160
病例号28	1:2560	1:2560	1:1280	1:2560	1:1280	1:160

抗体，结果1、4和12小时提取抗原检测的抗体血清滴度基本一致。

L_{p1}病人抗体：结果见表2。

表2显示，用EDTA超声波L_{p1}抗原平行检测4例病人的7份血清，3份血清的滴度相

二、EDTA和超声波抗原检测健康人和

行检测4例病人的7份血清，3份血清的滴度相

表2

EDTA和超声波抗原检测健康人和肺炎病人抗体结果比较

	超声波抗原	EDTA抗原 (1小时)	超声波抗原	EDTA抗原 (1小时)	超声波抗原	EDTA抗原 (1小时)	起 始 稀释度
	L _{p1}	L _{p1}	L _{p4}	L _{p4}	Tatlock	Tatlock	
工作人员A	<1:320	<1:320	<1:320	<1:320	<1:320	<1:320	1:320
病例号23 第一份血清	1:2560	1:640	1:2560	1:320	1:1280	1:640	1:320
第二份血清	1:2560	1:320	1:1280	<1:320	1:1280	1:320	1:320
病例号28 第一份血清	1:2560	1:2560	1:2560	1:320	1:1280	1:640	1:320
第二份血清	1:1280	1:1280	1:640	1:320	1:1280	<1:320	1:320
第三份血清	1:2560	1:1280	1:1280	<1:320	1:1280	<1:320	1:320
病例号26	1:1280	1:1280	1:320	<1:320	1:640	<1:320	1:320
病例号46	1:2560	1:320	1:640	<1:320	1:1280	<1:320	1:320

同(1:1280~2560)；另4份血清用EDTA抗原检测结果较后者低1~3个稀释度，但均达到或超过1:320。用两种方法制备的L_{p4}和Tatlock抗原检测以上标本，超声波抗原出现明显的交叉反应，而EDTA抗原的交叉反应则显著的低。两种抗原检测正常人血清抗体滴度均低于1:320。

计21份(63.6%)，而EDTA抗原检测阳性有12份(36.4%)，其中以L_{p1}和L_{p2}交叉多见。

讨 论

三、EDTA和超声波抗原检测正常人血清抗体：用两种方法制备的6个血清型抗原，平行检测33份经超声波处理的L_{p1}~6型多价抗原筛检出的阳性血清，其中，用EDTA抗原能确定某型抗体阳性21份(63.6%)，而用超声波抗原检测有12份(36.4%)，两者差异显著($\chi^2=4.30, P<0.05$)；两型或两型以上抗体阳性且滴度相同者则以超声波抗原检测结果多见，

简化Otten等^[5]的方法提取EDTA抗原，平行检测确诊L_{p1}型肺炎及健康人血清。其中2份健康人血清用两种抗原检测L_{p-1}、4和Tatlock型抗体，结果完全一致，均低于1:320，判为阴性；4例确诊病人的7份血清，有3份两种抗原检测结果一致(1:1280~2560)；另4份EDTA抗原检测结果较超声波抗原的结果低1~3个稀释度，但均达到或超过1:320水平。用两种方法制备的L_{p1}~6型单价抗原检测33份正常人血清，显示同样趋势，提示EDTA抗原的敏感性稍低于超声波抗原。将EDTA抗原

检测结果的阳性界值定为1:320, 超声波抗原判定标准仍为1:640, 则两种抗原检测的阳性结果一致; 而作为对照的2名健康人血清滴度均低于1:320。这样可补偿EDTA抗原敏感性较低的不足而不影响其特异性。

用超声波抗原检测Lp1肺炎病例抗体时, Lp4、Tatlock抗体滴度也明显升高, 个别标本结果与Lp1抗体滴度一致。而EDTA抗原检测结果则较易鉴别; 检测33份正常人血清亦显示同样趋势。同一份血清出现两型或两型以上抗体滴度相同时, 宜参考P/N值鉴别, EDTA抗原显示的P/N值的最小差值比超声波抗原检测结果的差值大。以上结果提示EDTA抗原的特异性较超声波抗原好。

用振荡1、4和12小时提取的EDTA抗原, 检测2名工作人员的血清抗体, 滴度均为1:80~160; 检测2例病人血清抗体滴度结果基本一致。本研究用4小时提取的抗原检测33份正常人血清亦获得良好效果。看来, 用振荡1或4小时提取的抗原是可取的。简化程序用EDTA提取抗原的方法值得进一步研究。

A Study on EDTA antigens for detection of IgG antibodies to Legionella Pneumophila
Wang Junsheng, et al., Shanxi Medical College, Taiyuan

The EDTA and Sonicate antigens used in ELISA for detection of IgG antibodies to Legionella Pneumophila serogroups 1~6 and Tatlock was evaluated. Sensitivity and specificity of EDTA antigens were compared with Sonicate antigens in three groups of subjects.

In two serum samples from healthy employees, the Lp1 antibody titers with EDTA and Sonicate antigens were $\leq 1:160$. Testing seven samples from patients indicated that four samples reacted with titers of 1:1280~2560 to Lp1

with EDTA and Sonicate antigens. But in another three samples, the antibody titers to Lp1 with EDTA antigen were lower 1~3 dilution than Sonicate antigen. One of the lowest titer to EDTA was 1:320 that was interpreted as positive. In all of the seven samples, the antibody titers to Lp4 and Tatlock raised to 1:640~2560 with soniccate antigens and significantly higher than the titers with EDTA antigens (1:320~640).

The comparison between the EDTA and Sonicate antigens showed that when the antibody titer with EDTA antigens $\geq 1:320$ was regarded as a positive mark the sensitivity of EDTA antigens was similar to Sonicate antigens and the specificity was better than Sonicate antigens. Preparation of EDTA antigen was simple. It is worth to further study.

Key words EDTA antigen Sonicate antigen Sensitivity Specificity

参 考 文 献

1. Elder EM, et al. Microenzyme-linked Immunoglobulin G and Immunoglobulin M Antibodies to Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* 1983; 17(1): 112.
2. Wang JS, et al. Seroprevalence of Legionella in Shanxi Province, China. *Infection* 1988; 16(3): 179.
3. Collins MT, et al. Cross-reactions between Legionella Pneumophila (Serogroup 1) and Twenty-eight other Bacterial Species, Including other members of the Family Legionellaceae. *Infect & Immun* 1983; 39(3): 1441.
4. Collins MT, et al. Crossed Immunoelectrophoretic Analysis of Legionella pneumophila Serogroup 1 Antigens. *Infect & Immun* 1983; 39(3): 1428.
5. Otten S, et al. Serospecific antigens of Legionella pneumophila. *J Bacteriol* 1986; 167(3): 890.

(1990年10月18日收稿, 1991年5月27日修回)