

SpA协同凝集试验检测脆弱类杆菌的研究

南京铁道医学院微生物教研室

史俊华 张雪萍 刘功云 范子文 王思一 张建琼

提要 本文介绍了厌氧菌感染中常见的脆弱类杆菌的SpA协同凝集试验,并对其试验最适条件、敏感性、特异性等进行了研究。结果表明本法具有简易、快速、敏感、特异等优点。这种方法对其他厌氧菌的诊断也可能是有价值的。可进一步用于临床诊断。

关键词 SpA 协同凝集试验 脆弱类杆菌

近年来由于厌氧菌分离培养技术的发展,厌氧菌的检出率逐渐提高,据报道^[1~3],厌氧菌感染占腹部细菌感染的60.7%,占阑尾及肛旁脓肿感染的100%,占肝脓肿的87.5%,在阑尾穿孔、小肠、结肠、直肠及胃大部切除术后感染中占66.7%。过去临床上认为的无菌性炎症,其中多数都是厌氧菌感染。在厌氧菌感染中很大部分是脆弱类杆菌所引起的。鉴于厌氧菌的分离培养及鉴别诊断较繁琐、费时间、价格昂贵^[7],目前临床上误诊率仍较高。因此,寻找一种简单易行的方法诊断厌氧菌是很必要的。最近我们用SpA协同凝集试验(SpA-CoA)^[4~6]作厌氧杆菌拟杆菌属的脆弱类杆菌抗原的诊断获得了较满意的结果,现报告如下:

材料与方 法

一、脆弱类杆菌菌种: (*B. fragilis* CDC 14462菌株)由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所赠惠。

二、抗脆弱类杆菌血清的制备:选雄性家兔静脉免疫及皮下多点注射。经实验证明静脉免疫法较方便、效价高。抗原为10亿/ml浓度细菌。首先抽静脉血,取血清与脆弱类杆菌做凝集试验,如为阴性者即行免疫。静脉免疫共5次,注射剂量为0.5、1、1.5、2、3ml。两次间隔4天,末次注射后5天测效价,试管凝集效价为1:1280。

三、抗脆弱类杆菌IgG的制备:用DEAE-纤维素批量提取法。DEAE-纤维素处理过程是用0.5N NaOH浸泡→蒸馏水→0.5N HCl→蒸馏水→0.5N NaOH→蒸馏水→0.01M pH 7.4 PBS平衡,放在布氏漏斗内负压抽滤,除去水份。将抗脆弱类杆菌血清抗比例加入蒸馏水。按DEAE湿重,每5g处理血清加1ml的比例,加入处理好的DEAE-纤维素中,置4℃2小时(其间应搅拌2次),将此混有血清的DEAE-纤维素刮入布氏漏斗中,负压抽滤,滤液即为抗脆弱类杆菌IgG。

四、SpA稳定液的制备:用金黄色葡萄球菌1800株接种在其培养基上(牛肉膏5g、蛋白胨10g、葡萄糖1.5g、氯化钠3g、磷酸氢二钠2g、琼脂20g、加蒸馏水至1000ml pH7.4)置37℃培养18小时,多次传代后将菌苔用生理盐水洗下,以4000转/分离心20分钟洗两次后,沉淀用含甲醛的0.01M pH7.4的PBS制成10%菌悬液,4℃备用。

五、脆弱类杆菌抗血清标记SpA稳定液:取10% SpA稳定液1ml,加入抗脆弱类杆菌血清0.1ml,混匀后置37℃温箱30分钟,并不时摇动,用pH7.4 PBS洗两次(4000转/分离心30分钟)并制成1%悬液,即为脆弱类杆菌抗血清致敏的SpA试剂。此外,我们也将从抗血清中提取的IgG用同样的方法标记。

六、协同凝集试验:取脆弱类杆菌抗血清

致敏的1%SpA试剂一滴(约0.05ml)于玻璃片上(先用酒精棉擦干净),再加一滴不同浓度的脆弱类杆菌抗原,混匀,并以未致敏SpA的血清及未致敏血清的SpA和盐水作对照,2分钟内观察结果。菌体凝集成较大的颗粒或小颗粒,而颗粒周围液体为透明者即为阳性。若2分钟内始终均匀混浊者为阴性。IgG致敏SpA的试剂也用同样方法做此协同凝集试验。我们用脆弱类杆菌抗血清致敏的1%SpA试剂分别与产气荚膜杆菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、耶氏菌做协同凝集试验,结果均为阴性。

实验结果

一、协同凝集试验最适条件的探讨:

1.用抗血清标记SpA代替用提纯IgG标记SpA:我们用抗脆弱类杆菌血清提取IgG、标记SpA做协同凝集试验,其结果不敏感(蛋白含量为2.2mg/ml),而用0.1ml抗血清标记SpA的结果却极敏感。

2.用不同浓度(1%和0.5%)SpA标记抗脆弱类杆菌血清做协同凝集试验结果相同。因此,我们选用0.5%或1%的SpA均可。

3.SpA标记时间的选择:在37℃条件下,用等量抗体分别标记30分钟及1小时,其试验结果相同。因此,我们选定标记时间为30分钟。

4.标记时温度的选择:实验结果表明,标记时无论在37℃或室温及先放37℃后再置冰箱,SpA-COA结果基本相同。

二、脆弱类杆菌SpA-COA试验的敏感性:

1.用活菌与死菌作为被检抗原的结果:我们把细菌加热100℃15分钟(加热后再培养无细菌生长)与活菌同时做SpA-COA试验,其结果完全相同。做了6个不同的抗原浓度,无论活菌或死菌都在1分钟内出现阳性结果。

2.能测出被检抗原的最低浓度:我们比较了不同浓度抗原用SpA-COA试验检测的结果,表明当抗原浓度在0.0625亿/ml时仍是在1分钟出现阳性结果。若按规定2分钟为阳性判断

时间,其浓度还可以继续降低。

三、脆弱类杆菌SpA-COA试验的特异性:从附表结果可见,脆弱类杆菌抗血清SpA-COA试验与常见厌氧菌中的产气荚膜杆菌无交叉,与需氧菌中的大肠杆菌、痢疾杆菌及耶尔森氏菌均无交叉凝集反应。

附表 脆弱类杆菌SpA-COA试验的特异性

菌种	标记脆弱类杆菌抗血清SpA试剂	对 照		
		抗血清 ^①	SpA ^②	盐水
脆弱类杆菌	卅 ^③	—	—	—
大肠杆菌	—	—	—	—
耶尔森氏菌	—	—	—	—
痢疾杆菌	—	—	—	—
产气荚膜杆菌	—	—	—	—

注:①抗血清不标记SpA; ②SpA:0.5%SpA悬液; ③卅表示强阳性颗粒凝集块较大

讨 论

一、一般文献报道用IgG标记SpA比抗血清效果好,但我们试验结果却是抗血清标记SpA比提纯IgG好,因此我们认为不用提纯IgG效果好,又可以简化试验步骤。

二、在我们试验中分别用活菌与死菌做抗原进行了对比试验,结果无差别。这在今后临床诊断脆弱类杆菌感染上是很有意义的。因为此菌为严格厌氧菌,若取标本、运输过程及实验操作过程中任何环节的疏忽都可能使此菌迅速死亡。但通过本试验证实,死菌仍可被迅速测出。

三、通过脆弱类杆菌SpA-COA试验与常见厌氧菌感染致病菌中的产气荚膜杆菌及需氧菌中常见的大肠杆菌均无交叉凝集,即可避免误诊。但脆弱类杆菌是属于拟杆菌属的,在脆弱类杆菌群里有5种,其中脆弱类杆菌(*B. fragilis*)为其中之一,这些种之间抗原性上有无不同需进一步探讨。

四、脆弱类杆菌属于革兰氏阴性无芽胞厌氧拟杆菌属,是人肠道菌群的主要成员之一,既有对宿主的营养、代谢、生长、发育、免疫

等生理作用有利的一面，又可以作为条件致病菌，还参与致癌作用及传递耐药质粒给其他病原菌的作用^[10,11]，特别在临床上，据报道胆道感染中约50%为脆弱类杆菌^[9]。还有的报道指出，拟杆菌属的细菌占全部厌氧菌感染的35%。通过本试验我们认为SpA-COA方法可应用在此菌的辅助诊断上，也避免了复杂的厌氧培养过程，既简单、经济、快速，又适合基层临床单位。但在试验过程中我们也感到本实验所探索的最适条件，敏感与特异性只是在实验室内进行的，在实际临床应用中其效果究竟如何，有待继续探讨。

Study of SpA-Coagglutination in Detection of *Bacteroides fragilis* Shi Junhua, et al., Dept of Microbiol., NRMC, Nanjing

The SpA-Coagglutination method was used to detect of *Bacteroides fragilis*, which is the most common bacteroides species isolated from clinical specimens and plays a role in anaerobic infections. A serious of study has been carried out to determine its optimal condition, susceptibility and specificity. The results suggested that this method might be useful as a simple, quick, susceptible and specific tool in diagnosing *B. fragilis* infection.

Key words SpA Coagglutination Ba-

cteroides fragilis

参 考 文 献

1. Goding JW. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods* 1978; 20: 241.
2. 孙荫, 等. 96例阑尾炎的厌氧菌分析. *中华检验杂志* 1985; 8(2): 99.
3. 康白. 菌群失调与外科感染. *实用外科杂志* 1984; 4(6): 325.
4. 刘功云, 等. 特异性抗血清致敏葡萄球菌提纯A蛋白检测脑脊液中脑膜炎球菌A群抗原的研究. *江苏医药* 1982; 8(1): 2.
5. Zimmeman SE, et al. Identification and grouping of neisseria meningitidis directly on agar plates by A containing staphylococci. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 470.
6. 袁新华, 等. 协同凝集试验快速诊断伤寒的探讨. *中华流行病学杂志* 1984; 5(3): 180.
7. 张颖悟, 等. 特异性抗体致敏葡萄球菌对脑膜炎球菌分群的研究. *流行病学杂志* 1980; 1(2): 111.
8. 李涤生, 等. 厌氧菌. 第1版. 合肥: 安徽科学技术出版社. 1983年: 152~154.
9. 熊德鑫. 国内外对拟杆菌属认识的近年进展. *中华流行病学杂志* 1982; 3(2): 116.
10. Pruzzo C, et al. Piliated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and are more sensitive to phagocytosis by human Neutrophils than Nonpiliated strains. *J Infect Immun* 1984; 43(1): 189.
11. Duerden BI, et al. A schem for the identification of clinical isolates of Gram-negative anaerobic bacilli by conventional bacteriological tests. *J Med Microbiol* 1980; 13: 231.

大面积室内灭鼠控制流行性出血热效果报告

山东省济宁市郊区卫生防疫站 陈龙宝

1982年济宁市郊区在山东省首次爆发了家鼠型出血热的流行，疫源地调查证实室内褐家鼠为主要传染源。为此，我们在1984年11月和1985年4月进行了两次全民性突击灭家鼠活动，有效地控制了发病与流行。

灭鼠毒饵为万分之五的敌鼠钠盐玉米(70%)小麦(30%)混合毒饵。第一天每间房投饵两堆，每堆投饵50克。第二、三、四天每天检查补饵一次，吃多少补多少，吃光加倍。每次灭鼠前后在各个乡(镇)随机抽取3~5个自然村，采用鼠夹法进行鼠密度调查，根据灭鼠前后鼠密度计算灭鼠率。

第一次灭鼠时间为1984年11月21日至30日，灭前20天调查鼠密度14.65%(573/3911)，灭后20天调查鼠密度1.31%(50/3818)，灭鼠率91.06%；第

二次灭鼠在1985年4月21日至30日进行，灭前一个月调查鼠密度5.63%(316/5613)，灭后一个月调查鼠密度0.67%(38/5665)，灭鼠率88.10%。本区1984年流行性出血热春、夏季(1~7月)流行高峰发病1182例，比前一年秋、冬季(10~12月)流行高峰发病137例上升7.6倍；而灭鼠一个月后的1985年流行性出血热春、夏季流行高峰发病119例，比前一年秋、冬季流行高峰发病182例下降34.6%。本区灭鼠后1985年全年流行性出血热发病169例，比1984年全年发病1385例下降87.80%；而全市其它十个县(区)1985年全年流行性出血热发病4689例比1984年全年发病4594例上升2.1%。可见疫区鼠密度与流行性出血热发病有密切关系，控制该病流行灭鼠是个关键。