

BA-ELISA和CoA法检测尿中军团菌抗原

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 毛 华 李之桂 万超群

摘要 本文报告了用自己建立的BA-ELISA法和CoA法检测嗜肺性军团菌血清I型(LP₁)感染豚鼠和病人尿标本的结果。BA-ELISA法的灵敏度为0.1ng蛋白/ml, CoA法为60ng蛋白/ml。两法综合判断, 军团病人的检出比为7/7。BA-ELISA法特异性较强, CoA法有4%的假阳性。

关键词 BA-ELISA法 CoA法 军团菌

我国不少省市有关单位的血清流行病学调查和病例报告证明, 军团病确实存在。但其临床症状不典型, 早期诊断较困难, 病原菌的分离、鉴定复杂费时。国外已将许多免疫学方法试用于军团菌抗原的检测[1,2]。我们将敏感性较高的生物素-亲和素酶联免疫吸附法(BA-ELISA)和简便快速的协同凝集法(CoA)试用于军团病患者尿中抗原的检测, 以供临床早期诊断和军团病的流行病学调查使用。

材料和方法

一、材料

菌种: LP₁菌(费城1型), 来源于美国亚特兰大市的CDC, 本所保存。金黄色葡萄球菌Co-Wan 1株, 北京医科大学微生物教研室保存。

制剂: 生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯(BNHS), 美国Sigma公司出品。亲和素-过氧化物酶结合物, 中国军事医学科学院五所制。EDTA提取抗原: LP₁菌经硝酸铁培养基〔蛋白胨10g, 酵母浸膏10g, 甘氨酸3g, 活性碳2g, 硝酸铁0.25g, L-盐酸半胱氨酸0.4g, 琼脂20g〕培养, 按Wreggitt[3]法提取。

抗体: 兔和羊抗LP₁抗体为自制。

被检标本: 动物, 将38只体重300~350克的健康雌性豚鼠随机分为8组, 分别以 1×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 个LP₁活菌腹腔注射。注射后第2天起取尿, 尿-20℃保存。人, 取已知或

未知病因肺炎病人尿和健康人尿, -20℃保存。

其它: 40孔聚苯乙烯微量反应板, 上海, 天津产。DG3021酶联检测仪, 华东电子管厂产。

二、方法

1. 生物素标记抗体

酯化生物素溶解于二甲基甲酰胺中, 抗体用0.1M NaHCO₃稀释为10mg/ml。抗体溶液与生物素溶液体积比为15:1。将不同重量比的抗体与酯化生物素混合, 按Kenkall[4]方法标记, 选择最佳标记条件, 结果如下: (表1)

表1 抗体与酯化生物素(BNHS)重量比对P/N比值的影响

	1	2	3	4	5(管号)
Ab/BNHS	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1
Ab(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BNHS($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/33.3	0.83/33.3	0.71/33.3	0.63/33.3	0.56/33.3
P/N*	15.0	25.5	20.0	12.0	4.6

* 测定用双抗体夹心法(见后), P为加抗原孔的OD均值, N为无抗原阴性孔的OD均值。

2. BA-ELISA法

检测方法: 试验中每步每孔所加试剂均为100μl。洗涤液为pH7.4, 0.01M PBS, 含0.5%吐温20。稀释液为含1%牛血清白蛋白的PBS缓冲液。用pH9.6, 0.05M的碳酸钠缓冲液稀释的羊抗LP₁抗体包被板, 4℃过夜, 洗

3次，加待检标本，37℃作用1小时。洗3次加生物素化兔抗LP₁抗体，37℃作用1小时。洗3次，再加亲和素-酶结合物，37℃作用30分。洗5次后，加常规联苯二胺底物液，37℃作用20分。用1M H₂SO₄终止反应。在酶联检测仪测OD值。

判定结果：每板设9孔阴性对照。凡等于或大于阴性对照OD均值与3倍标准误之和者为阳性。

经方阵试验选择各试剂最佳工作浓度分别为，包被抗体50μg/ml，生物素化抗体10μg/ml，亲和素-酶结合物1:500稀释。

3. LP₁抗原检测SpA-CoA诊断液的制备 制备方法见参考文献[5]。

4. 协同凝集法检测LP₁抗原

用直径2mm的白金耳环，取一环SpA-CoA诊断液，在载玻片上与3~4环待检标本混合，1分钟后判定结果。以出现少量颗粒，上清混浊为“+”；呈现较多颗粒，上清较混为“++”；呈现更多颗粒，上清较清为“+++”；呈现许多颗粒，上清透明为“++++”，“++”及以上为阳性。

结 果

一、检测方法的特异性和敏感性

BA-ELISA特异阻断试验：将已知量的EDTA提取抗原分别加入20%兔抗LP₁血清和20%正常兔血清中，以抗原加入正常尿为阳性对照，不加抗原的正常尿为阴性对照。结果见图1。加入20%兔抗LP₁血清的一排孔，OD值明显降低，说明此试验是针对LP₁特异的。

BA-ELISA敏感性试验：

将已知量的EDTA提取抗原加入正常尿中，以同一尿液为阴性对照，按上述判定阳性的标准确定BA-ELISA可检出抗原的最低蛋白量（即试验的敏感性）。从1孔到9孔的抗原量分别为 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} (μg/ml)。结果见图2。

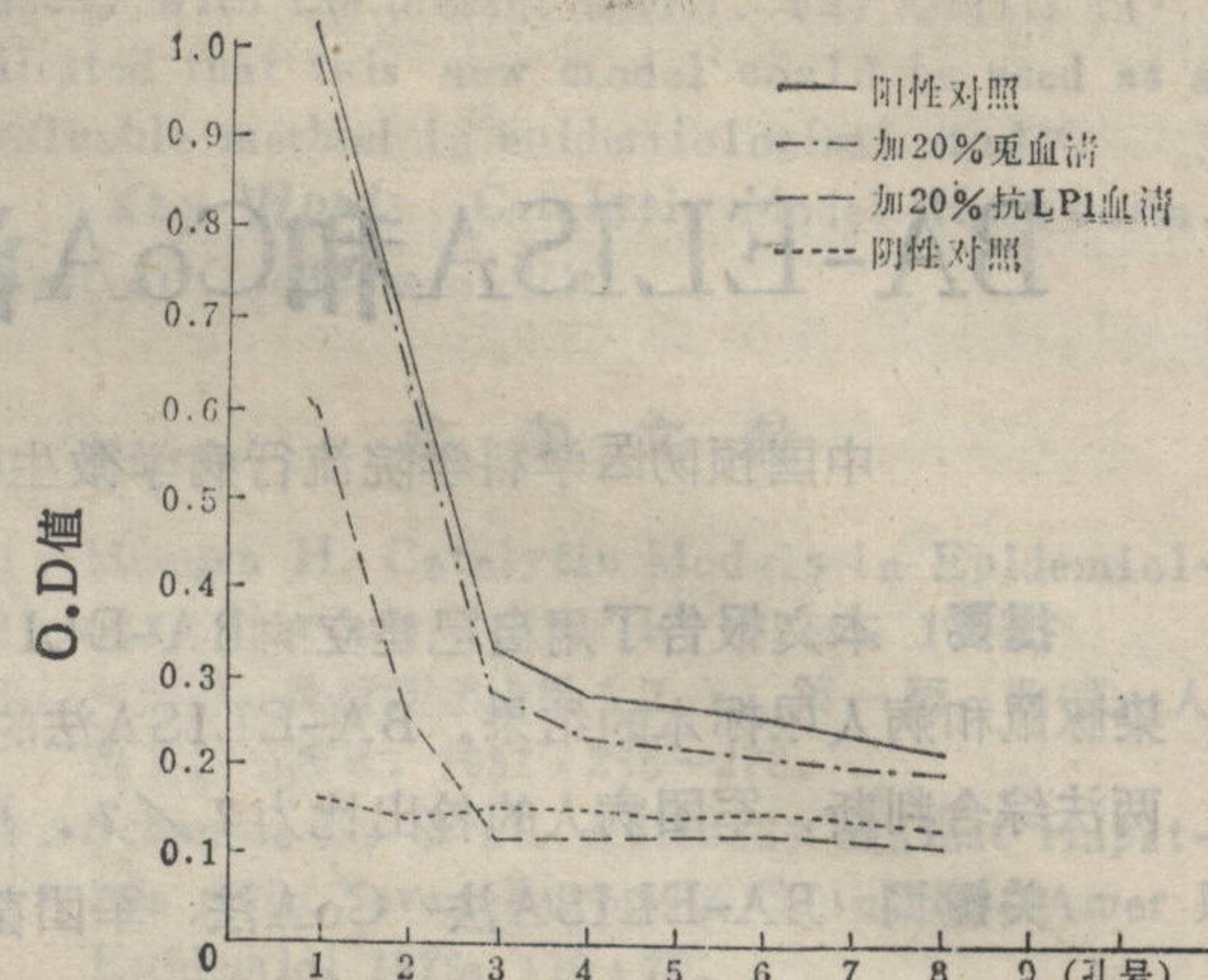


图1 BA-ELISA特异性阻断试验

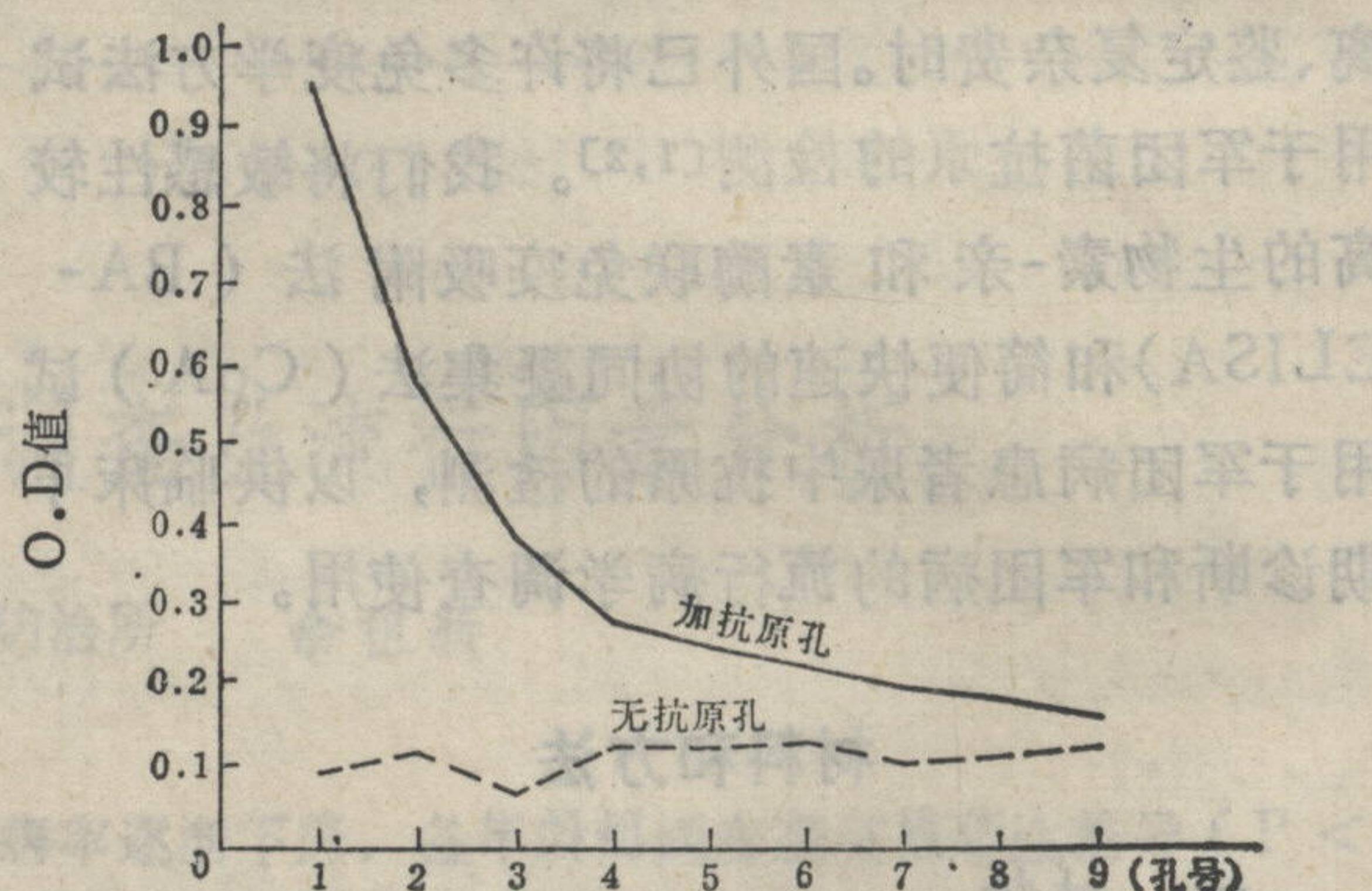


图2 BA-ELISA法检测抗原的敏感性

此试验阴性孔OD值均数为0.112，标准误(δ_x)为0.01，阳性下限为 $x + 3\delta_x = 0.134$ ，图中第8孔OD值为0.160，其抗原含量为 1×10^{-4} μg/ml，而第9孔的OD值低于0.143，故认为BA-ELISA法的敏感度为0.1ng蛋白/ml。

协同凝集试验的敏感性

将已知量的EDTA提取抗原加入正常尿中，分别试验。直至抗原量降到60ng蛋白/ml时，仍有“++”的凝集，故认为CoA法的灵敏度为60ng蛋白/ml。

二、两法检测豚鼠尿中抗原

将尿室温下融化后直接测定。试验检测了豚鼠感染后第1天到第43天采集的尿。从测定结果的总趋势看，感染后第1天至35天，多数

尿中都可测出抗原。有些动物排出抗原时间较晚或持续时间不长。部分动物抗原排出为间歇性的。

CoA法及同BA-ELISA法的比较

用CoA法检测了35份受感染豚鼠的尿和20份正常豚鼠尿。感染豚鼠的尿均为阳性，正常豚鼠的尿均阴性。把两法结果相比，均阳性的32份，均阴性的20份。有3份感染豚鼠的尿CoA法阳性而BA-ELISA法为阴性，这3份尿经加热100℃，30分钟后，结果仍不变。

三、两法用于人尿的检测

共检测了38份正常人和76份病人的尿。病人包括疑似军团病患者和已知或未明病因肺炎病人，男48名，女14名，年龄从19岁至74岁。

军团病诊断依据，①病后间隔一定时间的两次血液中特异抗体滴度有4倍以上改变或一次测定间接荧光抗体滴度大于1:128；②临床表现疑似军团病，又查不出其它病因；③其它抗菌素疗效不佳，改用红霉素后明显有效。同时具备上述三条件者，诊断为军团病。

1. 病人检出率

检测病人尿标本的BA-ELISA和CoA法与动物试验同。尿检测前经100℃，30分处理。试验中共有7名病人按上述条件诊断为军团病。他们的尿标本共13份，有人2份，有人3份。最早取自发病后第2天，最晚104天。病后第2天的尿，不经浓缩，BA-ELISA和CoA法均阳性。2份取自病后20多天的尿，CoA法阳性，BA-ELISA法尿经浓缩后才出现阳性。其它几份都是经浓缩后两法才阳性。两法结果综合判断，军团病的检出比为7/7。

2. 两法的特异性

收集的63份非军团病患者的尿，包括已明确病因的11名（即分离出致病菌），其中结核菌5例，金黄色葡萄球菌2例，绿脓杆菌1例，肺炎双球菌3例。无论抗体检测或尿中抗原检测均为阴性。其余的病人BA-ELISA法阴性，有2名患者的尿CoA法呈假阳性。

3. 两法的比较

BA-ELISA法检测38名正常人尿结果均阴性，CoA法有2名假阳性。与病人检测结果一并计算，两法的符合率为96.5% (110/114)。CoA法的假阳性率为4% (4/101)。

讨 论

用亲和素-生物素ELISA法和协同凝集法检测LP₁菌感染的豚鼠和军团病人尿中的抗原。将EDTA提取的细菌可溶性抗原定量加入尿中。BA-ELISA法检出抗原的最低量为0.1ng蛋白/ml，与同类方法的灵敏度一致^[6]。用BA-ELISA法检测感染豚鼠尿，从感染后第1天到第35天，多数尿中可测出抗原。但并非每个动物或感染后每天排出的尿都能测出。考虑除动物个体差异外，可能还有以下因素：①尿中抗原排出量；当一次收集尿量较大时（稀释度大），测不到抗原的情况就多些。②距离感染时间越长，阳性率越低；③有个别动物在整个试验中，尿中都未测到抗原。国外报道，军团病人发病后第1天尿中就有抗原排出，有的病人发病后326天尿中仍可测出抗原^[7]，而有的病人发病后十几天尿中就测不到抗原^[8]。本试验检出的阳性尿，最早在发病第2天，最晚为104天。国外检测病人尿多数未经浓缩，而本试验检测的13份尿，12份是经浓缩后，BA-ELISA法才为阳性的。这可能由于①采尿时间较晚；②病人在尚未确诊前曾用多种不敏感的抗菌素治疗，抑制了细菌的生长；③试验方法尚不够敏感。

所测标本中，包括已明确诊断的一些病例，有结核菌，肺炎双球菌，金黄色葡萄球菌，绿脓杆菌的感染。这些病人的血抗体和尿中抗原检测均为阴性，初步说明检测方法较为特异。这与国外许多作者的结果相符^[9,10]。

两法检测动物和病人标本，都出现几例BA-ELISA法阴性而CoA法阳性的现象。就两法的灵敏度看，CoA法远不如BA-ELISA法，为什么有此现象，是否可考虑：①两法检测的抗原成分不完全相同；②有些尿中可能存在

在某些促进凝集的其它成分；这可用正常尿加入诊断液后有时也出现少量凝集颗粒的现象解释。③模拟试验用的EDTA抗原，不能完全代表实际尿中抗原的情况。

Detection of Legionella Antigens in Urine by Biotin-Avidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Coagglutination Test Mao Hua, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive, Beijing

This article reported a Biotin-Avidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (BA-ELISA) and a Coagglutination test (CoA) to detect Legionella-Soluble antigens in urine specimens of 38 artificially infected guinea pigs and 63 patients. The BA-ELISA was found to be able to detect as little as 0.1 ng protein/ml, and the CoA was 60 ng protein/ml.

The urine specimens of 7 patients with Legionnaires' Disease diagnosed by indirect fluorescent assay (IFA) were found to have positive result in both tests. No false positive result was found in BA-ELISA in patients suffering from pneumonia other than Legionellosis as well as 'healthy' persons. 2 patients and 2 'healthy' individuals, however, revealed false positive in CoA test.

Key Words BA-ELISA CoA Legionnaires' Disease Bacterium

参 考 文 献

1. Boonmee Sathapayavonge, et al. Rapid diag-

- nosis of Legionella disease by urinary antigen detection, comparison of ELISA and RIA. Am J Med 1982; 72: 576.
2. Tang PW and Toma S. Broad-spectrum ELISA for detection of Legionella soluble antigens. J Clin Microbiol 1986; 24 (4): 556.
3. Wreggitt TG, et al. An ELISA test for the detection of antibodies to Legionella pneumophila. J Clin Pathol 1982; 35: 657.
4. Kendall C, et al. Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J Immun Meth 1983; 56: 329.
5. 龚志术, 等. SpA协同凝集试验快速检测副霍乱弧菌可溶性抗原的研究. 全国第一届非放射标记会议资料. 1984.
6. Pekka Vilja, et al. A rapid and sensitive non-competitive avidin-biotin assay for lactoferrin. J Immun Meth 1985; 76 (1): 73.
7. Kohler RB, et al. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J Clin Microbiol 1984; 20 (4): 605.
8. Kohler RB, et al. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease. Ann Rev Respir Dis 1980; 121: 317.
9. Edelstein PH, et al. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. 1980; 121: 317.
10. Kohler RB, et al. Cross-reacting bacterial antigens in a radiometric assay for urinary Legionella pneumophila antigen. In: C. Thronberry eds. Legionella-Proceeding of the 2nd International Symposium. Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1984: 40-42.

本刊1988年首次编委常委扩大会议在京召开

本刊1988年首次编委常委扩大会议，于元月19日在京召开。会议由总编辑何观清教授主持。参加会议的有副总编辑蒋豫图、耿贯一、刘汉明教授及编委常委魏承毓、于潜、郑锡文、张孔来和编辑室的张宝安、金蕴生同志。在京编委范明远、曹家琪同志列席了会议。

会上首先由编辑部同志汇报了一年来的工作情况，嗣后讨论了办刊的有关事宜：

1. 本刊每年收稿量较大，刊用的较少，稿件刊出周期较长，因此要严格控制每篇文稿的字数，一般论著应限制在3500字内，综述、讲座不超过5000字；
2. 为不断提高本刊的质量水平，要有计划地组织一些高水平的文稿，特别是综述、讲座之类的文章。会上，一些常委主动承担了撰写综述的任务，其中包括腹泻病、艾滋病等方面研究的最新情况，并预定从下半年开始连续刊登；
3. 为加速文稿周转，可把一些同类文章汇集起来，以“来稿摘要”形式刊出，所选用的文稿享有与其它文稿同等待遇，即仍属公开发表。

最后，与会者集体审阅了今年第三、四两期的每篇文稿，并提出了具体的修改意见。会议决定，下次编委常委会议将于6月中旬在京召开。