

# 感染症监测与控制

## II. 微生物抗原物质检测法及其发展前景

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 李之桂

对危害严重的法定传染病要监测与控制,同时也应注意监测一些新的感染症及可能造成的威胁在继续上升的感染症,如鼠伤寒感染症、假膜性结肠炎及链球菌感染症等。

应用科学的流行病学方法对各种传染病进行监测乃是行之有效的办法。据此监测结果进行综合分析,掌握流行规律并制订控制措施。过去几年的监测工作已取得了令人瞩目的成果。

科学的流行病学监测方法包括微生物学诊断技术,这些技术在分析判断传染病乃至感染症的数量与规律方面起着重要的作用。如医院内妇产科、小儿科病房发生多例甚至数十例鼠伤寒感染症,如果未分离到鼠伤寒沙门氏菌并进行血清分型及检定,就无法确诊为鼠伤寒感染症。此症的发病与流行主要是带菌者的存在和控制措施的不力所致。而在医院内及社会上检索出带菌者是一件量大而繁重的工作,利用现有的检测手段几乎无法实现。

近年来,病原体抗原的免疫学检查法的研究在进展,已有不少的感染症利用此法进行诊断,已达到了快速、简便、准确而且可做大数量的检索,可用于流行病学监测检查的目的。病原体抗原的免疫学检查法与正在大力发展着的DNA探针法两者均可看成为微生物检查诊断快速化的重要方向。虽然微生物抗原检查法还远远未达到广泛地应用于各种传染病的检测,但它作为一种发展方向已被确立。

### 关于病原微生物抗原物质的 免疫检测法

由于分子生物学的迅速发展,极大地影响着感染症的研究领域。使构成感染症的各种因子,如对病原体及宿主双方的各个因子,从物质水平、分子水平和遗传基因水平已逐步搞清。生物活性物质的高纯度精制技术及分析方法的急剧进步致使更容易精制病原因子—微生物的生物动态因子—biodynamics factor,并进而获得了高效价的特异抗体。单克隆抗体生产技

术广为普及,制作极高效价的高特异性抗体就更加容易。加之,免疫化学技术的进步,比血清学技术更加易于检测微量抗原和抗体。检查存在于病人材料里的微量病原因子已成为可能。

1917年,从病人体液中用沉淀反应法检查出肺炎链球菌的荚膜多糖抗原,但并未在当时引起人们的注意。1942年又利用荧光抗体技术从组织中证明了肺炎链球菌抗原的存在。1963年Bloomfield等开发了乳胶凝集试验法,检查隐球菌抗原。1971年Alter等用对流免疫电泳法(CIE)查出了乙型肝炎表面抗原(HBsAg),Greenwood等人检查了流脑菌抗原。在1970年之后陆续利用葡萄球菌蛋白A(SpA)的协同凝集试验、酶抗体法(ELISA)、DNA杂交技术等,开发应用于检查病原微生物抗原。ELISA法及单克隆抗体的开发乃是微生物学之外的科学进步;尤其需要快速诊断感染症以适应医疗的急需。这都是病原微生物抗原物质快速检测技术发展的客观因素。

迄近期以来,可用作试剂盒的免疫学微生物抗原检查法包括:荧光抗体法(FA),乳胶凝集法(LA),其中包括一部分红血球凝集法、葡萄球菌蛋白A协同凝集法(CoA),酶抗体法(ELISA),放射免疫测定法(RIA)等。应用于各种病原微生物抗原检测的情况请参见表1。这些种检查法的试剂盒在国内均有较快的发展。

用凝集反应方法检查各种细菌肠毒素是一种快速简易的方法,其发展前途及应用前景颇令人乐观(表2)。

### 微生物抗原免疫学检查法的原理

本文仅就可利用的方法原理简介如下(表3):

**沉淀反应:**方法及所用装置简单,但敏感性较差。其中对流免疫电泳法(CIE)曾用于HBsAg检查,很快可获得结果。Elek改良法现在仍应用于检查产毒素大肠杆菌。

**凝集反应:**研制了各种载体,如红血球、乳胶

表1 各种微生物抗原的免疫学检查法

微生物抗原	方 法				
	FA	LA	CoA	ELISA	RIA
细 菌					
<i>Haemophilus sp.</i>		+	+		
<i>Neisseria sp.</i>		+	+	+	
<i>Streptococcus sp.</i>		+	+		
<i>Staphylococcus sp.</i>		+			
<i>Streptococcus A</i>	+	+		+	
<i>Streptococcus B</i>		+	+		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		+	+		
<i>Bacterioides fragilis</i>	+				
<i>Legionella pneumophila</i>	+			+	
<i>Treponema pallidum</i>	+				
衣原体					
<i>Chlamydia Trachomatis</i>	+			+	
<i>Chlamydia psittaci</i>	+				
真 菌					
<i>Candida albicans</i>		+			
<i>Cryptococcus neoformans</i>		+			
<i>Aspergillus</i>		+			
病 毒					
Hepatitis Bc antigen				+	
Hepatitis Be antigen				+	+
Hepatitis Bs antigen		+		+	+
Herpes simplex virus	+			+	
Rotavirus		+		+	
Cytomegalovirus	+				
RS virus	+			+	

FA: 荧光抗体法, LA: 乳胶凝集试验, 包括部分血凝试验, CoA: 葡萄球菌蛋白A协同凝集试验, ELISA: 酶抗体法, RIA: 放射免疫测定

葡萄球菌(蛋白A)等等。以抗体包被载体的方法有: 非特异疏水结合法、用鞣酸或福尔马林等化学的处理法等。利用葡萄球菌蛋白A的方法乃根据免疫球蛋白G的Fc部分与蛋白A具有非特异结合性质。从原理上来分析, IgG的Fab部分以向外的形态结合于葡萄球菌表面, 使它与相应抗原间的反应更加容易发生。这些种类的颗粒凝集反应的敏感性与特异性与下列因素有关系, 如: 粒子大小及种类, 抗体的类别和特异性, 缓冲液种类及颗粒浓度等。需补体法, 敏感度较高, 但补体不易稳定, 对广泛应用不利。

**标记法:** 利用种种标记物标记特异抗体, 用以检测对应抗原, 可判断是否有抗原存在或部位。标记物有荧光物质、酶及放射性同位素 ( $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ) 等等。

**荧光抗体法:** 需用荧光显微镜而且无法定量。酶

抗体法能用于多种抗原检查, 且可能判断抗原在组织及细胞中的部位, 并可检查微量物质。

### 微生物抗原物质检测法的特点

#### 一、微生物抗原种类:

1. 细菌游离的毒素, 如白喉外毒素;
2. 培养滤液提取的可溶性抗原;
3. 细菌溶解产物, 如曲霉菌、组织胞浆菌、球孢子菌、葡萄球菌肠毒素、肉毒梭菌毒素等;
4. 化学法提取的可溶性物质, 如链球菌、肺炎球菌荚膜、流感嗜血杆菌PRP;
5. 细菌细胞成分, 如肠道致病菌G(-)菌鞭毛(H)及O抗原; 全菌细胞(布氏菌、土拉伦菌)等。

表2 各种肠毒素检查方法

肠毒素	方 法	被检材料处理法与检查法
<i>S. aureus</i> A、B、C 型肠毒素 (葡萄球菌)	被动乳胶凝集反应	①食品、粪便与10倍生理盐水混合，离心取上清待用； ②将分离菌用脑心浸液肉汤振荡培养 (37℃, 18小时)， 检查其离心后的上清。
<i>C. perfringens</i> (产气荚膜梭菌)	反相乳胶凝集试验	①发病初期患者粪便与10倍生理盐水混匀，离心取上清待 检； ②将分离菌在TGC培养基上培养 (37℃, 18小时) 再以 75℃, 20分处理。然后培养于产生肠毒素的培养基- Duncan-Strong 培养基 (37℃, 18~42小时)，将离 心上清通过0.45μm 滤膜过滤检查滤液。
<i>C. difficile</i> (难辨梭菌)	乳胶凝集反应	粪便0.5克，加稀释液0.5ml混合，离心取上清待检。
<i>V. cholerae</i> CT (霍乱弧菌)	反相乳胶凝集反应	霍乱菌培养于Syncase 培养基 (30℃, 18小时)，离心 取上清待检。
<i>E. coli</i> -LT 大肠菌		如系ETEC则用CAYE培养基培养 (37℃, 18小时)， 离心取上清待检。
<i>V. parahaemolyticus</i> (耐热性溶血毒素)	致敏血凝反应	将分离的菌，用甘露糖醇胨 (Mannitol peptone) 水 培养，离心取上清待检。
LT试验 (微研试验法)	Elek改良法	分离的大肠菌接种于Bicken琼脂培养基。

表3 微生物抗原的免疫学检查法原理

沉淀反应	双向免疫扩散法 (Ouchterlony法) 单向免疫扩散法 琼脂柱扩散法 (Oudin法) 对流免疫电泳法 (CIE) Immuno-halo法 (免疫光环法) Elek改良法 (Elek法)	一部分微生物个体，由机体内吞噬细胞吞噬等机制加 以破坏，使微生物组成成分释放在体液中。利用敏感 方法在感染初期，即在发病的1~2日内就可检查出该 微生物抗原。而检查血清中抗体，最早也需5~6日。 三、在感染持续期间，既或使用有效抗生素治疗 之后，一直可以查到该微生物抗原存在，而在此时却 培养不出该病原微生物。如有的流感嗜血杆菌性脑膜 炎病例，该菌抗原物质“PRP”可一直持续到体温下 降 (即感染结束) 止，20多天中均能查出阳性结果。
凝集反应	乳胶凝集反应 (LA) 血凝反应 (HA) 葡萄球菌协同凝集反应 (CoA)	四、有些致感染症的微生物属于正常菌群的细 菌，甚至人机体内还有自然抗体，故而无法利用检菌 或查抗体的办法进行诊断。但它可在特定部位查出该 种微生物而诊断该病。例如厌氧菌中的拟杆菌属感 染，可利用荧光抗体法从病理标本中查出该菌而确 诊。在诱感宿主即缺乏免疫能力的机体感染后用检查 抗体的办法不可能获得良好结果。
需补体法	被动免疫溶血法 (PIH) 脂质体 (Liposome) 溶解法	
标记法	放射免疫测定 (RIA) 酶抗体法 (ELISA) 荧光抗体法 (FA)	

二、微生物抗原物质检测法适用于感染症早期诊  
断。微生物感染机体后，经过在机体内繁殖的同时，

五、肠道菌感染的病人，从粪便上清液中查出肠  
毒素，如查出难辨梭菌肠毒素D-1、D-2则可确诊为

假膜性结肠炎。查出霍乱弧菌肠毒素CT、产毒素大肠菌肠毒素LT时可分别诊断为霍乱及大肠菌感染症。

### 关于微生物抗原检测法待解决的问题

一、抗原或毒素检测中的交叉反应性，干扰着它的实际应用。例如：霍乱毒素CT与产毒素大肠菌不耐热肠毒素LT间有着生物学及免疫学的共性，用一般的免疫学方法不可能鉴别。近来研制成功的抗LTs抗体及抗CTs抗体，制成免疫吸附柱，将特异性LT和特异性CT分离之后，按ELISA法就可确诊LT及CT。并进而诊断霍乱及大肠菌感染成为现实，但仍有多数微生物抗原或毒素物质的交叉反应有待研究。

二、根据抗原或毒素检测可作出快速诊断，但该菌株对各种抗菌药物感受性尚无法判定。恰恰在临床治疗中需要掌握抗药种类及程度，藉以确定治疗方针。这个问题有待查明抗药机制及与此机制有关物质的免疫学的特异性，并开发更新的检查法来解决。细菌对抗菌药有种种抗药因子，抗药性遗传性质粒即R-质粒则属多见。故而研究R-质粒检查法，查明R-质粒存在与否当可指出所使用的抗菌药的范围。

### 微生物抗原检查法的将来

微生物分离培养法在诊断感染症中存在着无法克服的弱点，因为它生长繁殖需要时间。而将微生物的抗原作为一种特异物质进行免疫学检查则预期今后会有迅猛的发展。因前述特点及客观需要，决定着广阔发展的前景。例如，①新生儿脑脊髓膜炎、败血症等

的病死率很高，需要早期有效的化学疗法，而准确的病因微生物检测乃属前提；②需尽早进行隔离等措施的传播性强的法定传染病，如霍乱等需早期快速确诊；③人工培养较为困难的病毒、立克次体、原虫等的快速诊断急需发展以利及时采取防治措施。④虽能培养出来，但需时较长的抗酸菌、真菌等；⑤投与抗菌药之后，检查病因微生物等均适于而且需要利用微生物抗原检测法；⑥单克隆抗体应用于抗原检测的研究必将发展，因为它能提高特异性；⑦由于抗原检测属于一种物质检测，有利于自动化，大数量检测，它将成为流行病学调查研究一种得心应手的工具，因此它的发展前景将更广阔。

### 参考文献

1. Stevens RW. Diagnostic devices. Manual and Directory, Immunology and Microbiology Tests. Marcel Dekker Inc., New York, 1986.
2. Wicher K. Microbial Antigenodiagnosis. Vol 1 and 2. CRC Press Inc., Florida, 1987.
3. Panigrahi D, et al. Evaluation of immunodot-blot assay for detection of cholera-related enterotoxin antigen in Salmonella typhimurium. J Clin Microbiol 1987; 25: 702.
4. 本田武司. 下痢便中のエンテロトキシンの検出法. 臨床検査 1986; 30: 601~607.
5. 本田武司. 病原体抗原の免疫学的検査法—現状と展望. 臨床検査 1988; 32: 7.

## 一起福氏菌痢疾爆发的调查报告

北京铁路局中心卫生防疫站 印惠俊 冯晓媛 陈华新 仇庆文

1988年6月至7月，白涧车站铁路大修队发生一起由F<sub>2</sub>a、F<sub>3</sub>a引起的急性细菌性痢疾爆发，因慢性细菌性痢疾（以下简称慢痢）带菌污染及饮食卫生不良造成本病的流行。

一、流行特征：6月27日首发，二十天内发病62例，其中男性60例，女性2例，发病率为22.63%，该队以成年男性为主，发病以50~岁为多。

二、流行因素：该队人员来自全国各地，大部分来自农村，可能存在慢痢带菌者。食堂工作人员14名，均未进行健康体检。首例病人为炊事员，病后未隔离，继续食堂操作，且个人卫生习惯和卫生条件差，引起同宿舍生活接触传播，以致7名炊事员发病，

这7名病人未隔离，继续原工作。同时，由于病人随地便溺，6月30日，7月3、4、5、7日降大雨，其排泄物可能污染了堆放在地面的蔬菜，后因食堂于6月30日7月3、4、8日做凉菜出售，造成该队陆续发病。

三、控制措施：患者经痢特灵、黄连素治疗，控制了流行，食堂、厕所常规消毒，对密切接触者投痢特灵、黄连素3天量预防及进行卫生宣传教育，流行终止。

因此，加强慢痢的管理和饮食卫生是控制菌痢爆发流行的重要环节。

（本文承本站曹元其副主任医师修改，特此感谢。参加本项工作的还有：董贻华、李宁、王秀芝等同志）