

# 用间接免疫荧光抗体法快速诊断痢疾志贺氏菌

仇 庆 文

(北京铁路局中心卫生防疫站,北京)

细菌性痢疾是常见多发的肠道传染病。细菌性痢疾的早期诊断、对及时采取针对性的防治措施有重要的现实意义。我们应用间接免疫荧光抗体技术对痢疾志贺氏菌的快速诊断作了探讨,现将结果报告如下。

## 一、免疫荧光抗体的制备

1. 方法: 用饱和硫酸铵法提取兔  $\gamma$  球蛋白, 免疫原与完全福氏佐剂 1:1 混合, 分别注射到羊的肩胛和脊椎的两侧, 共免疫四次, 每次间隔 10 天。 $\gamma$  球蛋白注射量第一次 50 毫克, 第 2, 3 次各 100 毫克, 第 4 次 200 毫克(不加佐剂), 末次后 10—15 天试血, 作环状沉淀反应, 测其效价, 效价达 1:4000 以上放血, 提取抗血清。

2. 抗血清(抗 IgG)的提取: 用葡聚糖凝胶 G25 层析法去除  $\gamma$  球蛋白提取过程中的硫酸铵离子, 然后立即与 DEAE 纤维素 10:1 混合, 4℃ 静置 30 分钟, 离心沉淀, 上清液即抗 IgG (见图版 I-1)。

3. 荧光素的标记: 用异硫氰酸荧光黄 (FITC) 室温搅拌法标记抗 IgG。荧光素与抗体蛋白的比为 1:60。葡聚糖凝胶 G25 层析去除游离的荧光素, DEAE 纤维素漏斗过滤去除过量标记的抗体蛋白质, 收集液即羊抗兔荧光抗体, 真空冷冻干燥保存。

## 二、免疫荧光抗体间接染色法

1. 染色程序: 标本直接涂片, 干燥后固定液固定 2 分钟, 水洗干燥后加一滴痢疾志贺氏

菌四种多价诊断血清\*, 于湿盒中 37℃ 培养 30 分钟, 用 0.01M pH 7.2 PBS 冲洗 1 分钟, 干燥后加荧光抗体一滴, 于湿盒 37℃ 30 分钟, 再浸于 0.025 M pH 7.2 CBS 溶液中 1 分钟, 干燥后用 CBS 甘油封片。

2. 荧光显微镜: 用“CALZEISSTENA”荧光显微镜, 高压汞灯 HBO 200, 蓝紫光明视野观察。激发滤光板 BG12/6 毫米, 阻断滤光片 G247, 目镜 6.3×, 物镜 16×、40×。

3. 染色结果的判别标准: 阳性者菌体形态典型规则, 菌体膨大呈空圈状有清晰的亮环, 呈绿色荧光。阴性者看不到典型形态, 无空圈和亮环。

## 三、免疫荧光抗体的质量鉴定

1. 荧光素与抗体蛋白结合的克分子比 (F/P) = 1:1.8。

2. 荧光抗体特异性实验: 选用宋内氏、福氏、志贺氏 I、II 型痢疾志贺氏菌以及大肠杆菌, 水弧菌, 枯草杆菌, 肠球菌等 37 株, 进行荧光抗体间接法染色。结果志贺氏 I、II 型, 宋内氏、福氏痢疾志贺氏菌呈现典型的荧光亮环。其它非痢疾志贺氏菌均为阴性。

3. 荧光抗体对照实验: 宋内氏痢疾志贺氏菌分别和生理盐水、磷酸盐缓冲盐水、正常兔血清、正常羊血清及经宋内氏痢疾志贺氏菌吸收过的痢疾志贺氏菌四种多价诊断血清相作用,

\* 由北京生物制品研究所供给, 批号 771, 效价 1:160。

进行荧光抗体间接法染色,结果均无荧光反应。

4. 荧光抗体的敏感性和最适稀释度的选择: 将不同稀释度的宋内氏痢疾志贺氏菌和倍比稀释的荧光抗体经间接法染色, 用方阵法选定 1:4 稀释的荧光抗体为最适稀释度, 其敏感度为 1 万个菌/毫升就能检出典型的荧光菌体。

四、荧光抗体间接染色法对痢疾志贺氏菌的检验效果

124 份标本分别用直接涂片和用胰胆盐麸酸钠增菌培养液\*进行玻片增菌 3 小时和试管增菌 8 小时后涂片, 自然干燥后进行荧光抗体染色。并同时分离培养。

1. 荧光抗体法与分离培养法的比较: 荧光抗体法阳性 76 例, 检出率为 61.29% (三种涂片荧光抗体法中有两种以上为阳性者即为标准), 分离培养法阳性 59 例, 检出率为 47.58%, 二者的符合率为 84.67% (见表 1)。表 1 结果说明, 荧光抗体法特异性较高, 敏感性也较强。

2. 比较标本增菌后荧光抗体法的检出率和分离培养法的符合率: 结果直接涂片法阳性例数 73, 检出率 58.87%, 符合率 82.25%; 玻片增菌法阳性例数 74, 检出率 59.68%, 符合率 84.68%; 试管增菌法阳性例数 75, 检出率 60.48%, 符合率 85.48% (见表 2)。

表 1 荧光抗体法与培养法的比较

粪便标本(例)	荧光抗体阳性率		培养法阳性率		符 合						不 符 合					
					阳性		阴性		合计		荧光法(+) 培养法(-)		荧光法(-) 培养法(+)		合计	
	例数	%	例数	%												
					例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
124	76	61.29	59	47.58	58	46.77	47	37.90	105	84.67	18	14.52	1	0.81	19	15.32

表 2 荧光抗体的三种涂片法与培养法的比较

方法	荧光抗体法		培养法		符 合						不 符 合					
					阳性		阴性		合计		荧光抗体(+) 培养法(-)		荧光抗体(-) 培养法(+)		合计	
	阳性例数	%	阳性例数	%												
					例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
直接涂片法	73	58.87	59	47.58	55	44.35	47	37.90	102	82.25	18	14.52	4	3.23	22	17.74
玻片增菌法	74	59.68	59	47.58	57	45.97	48	38.71	105	84.68	17	13.71	2	1.61	19	15.32
试管增菌法	75	60.48	59	47.58	58	46.77	48	38.71	106	85.48	17	13.71	1	0.81	18	14.52

从表 2 结果看, 标本经玻片增菌和试管增菌以后, 再进行荧光抗体染色, 即延长了检查时间, 又不能提高检出率和符合率, 因此意义不大。

讨 论

1. 用混合离心法提取抗 IgG 和用漏斗过滤法去除过量标记的抗体蛋白, 比层析法简单快速, 效果满意。

2. 羊抗兔免疫荧光抗体经 F/P 值的测定, IgG 纯度及微生物学的鉴定, 结果是可靠的, 用于快速诊断痢疾志贺氏菌是可行的。通过对照

和特异性实验, 亦证明该批荧光抗体血清应用于实际也是可行的。

3. 从 124 份标本的检验结果看, 荧光抗体法检出率 61.29%, 分离培养法检出率 47.58%,  $t = 2.2, p < 0.05$ , 说明二者有显著差异。二者的符合率为 84.68%。说明免疫荧光抗体法检出率高, 故二者的符合率也较高。荧光抗体法比分离培养法敏感可靠, 简单快速, 结果较准确, 有助于临床的早期诊断。因此在诊断技术

\* 胰胆盐麸酸钠增菌培养液配方(克): 胰胆(英国) 2, 氯化钠 0.5, 柠檬酸钠 0.5, 葡萄糖 0.1, 甘露醇 0.2, 麸酸钠 0.1, 蒸馏水 100 毫升, pH 7.4—7.6。

上是值得推广的。

4. 两种方法存在的不符合情况，荧光抗体法阳性，分离培养法阴性，主要原因是荧光抗体法对活菌死菌均能检出，而分离培养法要受到标本中活菌数量的多少，菌体抗原性的变异等

因素影响。另外，中间血清也可能存在着交叉抗体，致使非特异性荧光产生。至于出现荧光抗体法阴性，分离培养法阳性的结果，其原因可能与标本涂抹厚薄不匀，固定是否牢靠等因素有关。