

间接荧光免疫法和艳蓝染色法在细菌性痢疾快速诊断上的应用*

李 焱 全

(襄樊市铁路分局卫生防疫站,湖北)

为了解荧光免疫法(以下简称荧光法)和艳蓝染色法(以下简称艳蓝法)在临床上的使用价值,我们在当地细菌性痢疾(简称菌痢)流行高峰时,对腹泻病人粪便试用这两种方法检查,并以常规培养法为对照,其结果汇报如下。

材 料 与 方 法

一、间接荧光法

1. 羊抗兔荧光抗体: 批号 7901, 上海生物制品研究所生产。

2. 福氏志贺氏菌多价与宋内氏志贺氏菌诊断血清: 武汉生物制品研究所生产。

3. 实验菌株: 福氏志贺氏菌 1b、2a 型。标本为菌痢患者脓血粘液便。

4. 0.01M 磷酸盐缓冲液(PBS)及 pH8 缓冲甘油。

5. 方法: 在载玻片上用蜡笔画两个圆圈

($\phi 1.5$ cm) 为涂抹区, 将标本在涂抹区作直接涂片或用 GN 肉汤增菌后, 取沉淀涂片。火焰固定, 分别加福氏志贺氏菌多价诊断血清及宋内氏志贺氏菌诊断血清盖满标本。置密闭潮湿小盒中, 放 37℃ 30 分钟, 取出用 0.01M pH 8 PBS 洗 3—4 次, 稍干加稀释荧光抗体, 37℃ 30 分钟, 再用 0.01 M pH PBS 冲洗无荧光止。玻片干后加 pH8 缓冲甘油, 荧光显微镜检。同时作常规培养对照。

二、艳蓝染色法

1. 无菌 0.3% 甲醛盐水固定液: 置冰箱保存。

2. 0.1% 鞣酸水溶液: 用前 10 倍稀释, 冰箱保存(稀释液不得超过一周)。

* 参加本项工作的还有周如英、于敏、周玉梅。襄樊市卫生防疫站王海革主任指导此工作, 特此致谢。

3. 1:20 杆菌肽: 无菌水配制, 冰箱保存。
 4. 志贺氏菌属诊断血清: 由空军第四研究所供给。

5. 1% 酸性艳蓝-5GM 染液。
 6. 方法: 制片同荧光法, 甲醛盐水固定, 自然干燥, 分别加 1:20 杆菌肽约 0.015ml 和 1:8 稀释抗血清约 0.025 ml, 混匀后放湿盒, 37℃30 分钟, 加鞣酸约 0.025ml, 作用 5 分钟, 用流水洗片, 干后滴加 1% 艳蓝-5GM 盖满标本, 染色 5 分钟, 流水洗片, 干后高倍镜检查。

三、常规培养法

用国产 S.S 琼脂培养基及伊红美蓝培养基。检验程序按常规法。

试 验 结 果

一、用荧光法和艳蓝法处理后菌的镜检特征 (表 1)

二、荧光法和艳蓝法检出阳性比较

用荧光法和艳蓝法, 将标本直接涂片或经 GN 肉汤 8—10 小时增菌后取沉淀涂片, 检出结果见表 2。

表 2 说明荧光法增菌后涂片优于直接涂片 $P<0.05$ 。而艳蓝法直接涂片与增菌后涂片无显著差异 $P>0.05$ 。

三、荧光法和艳蓝法与常规培养法的检出阳性比较(表 3)

表 3 说明 106 份标本用三种方法检查, 尽管临床诊断不同, 其菌痢检出率均较高。为了比较三种方法是否有显著性差异, 表 4 结果经数理分析, 荧光法与培养法比较有极显著差异 $P<0.01$, 荧光法优于培养法。艳蓝法与培养法比较 $P<0.01$, 艳蓝法优于培养法。

四、荧光法、艳蓝法与培养法检出结果符合情况

表 5 说明, 荧光法符合率为 60.3%, 不符合者 42 例, 其中 32 例荧光法阳性而培养法阴性。艳蓝法与培养法符合率为 61.7%, 不符合者 41 例, 其中艳蓝法阳性 35 例而培养法则阴性。

五、培养法、荧光法和艳蓝法检出菌型情况

106 份标本经常规培养法分离出 63 株痢疾杆菌, 其中鲍氏志贺氏菌占 17.5%, 宋内氏志贺

表 1 痢疾杆菌的镜检特征

方 法	未标记抗体	大 小	排列方式	色 调 及 形 态
荧光法	福氏多价及宋内氏诊断血清	2.7×1.8μ 或 3.9×2.64μ	单个或多个排列	菌体清晰, 椭圆、菌体周围呈黄绿色光亮、菌体中心稍暗。
艳蓝法	福氏多价及宋内氏诊断血清	2.4×3.6μ 或 4.2×12.5μ	单个排列	菌体两侧细胞壁较薄, 呈鼓形膨起艳蓝色, 菌体呈椭圆形, 菌体两端呈圆头, 不尖、不成方形。

表 2 荧光法和艳蓝法的增菌、前后涂片比较

荧 光 法		增菌后涂片		合计	艳 蓝 法		增菌后涂片		合计
		阳性	阴性				阳性	阴性	
直接涂片	阳性	57	7	64	直接涂片	阳性	40	22	62
	阴性	20	22	42		阴性	17	27	44
合 计		77	29	106	合 计		57	49	106
显著性测定		$\chi^2 = 5.3, \chi^2_{0.05}(1) = 3.84, p < 0.05$					$\chi^2 = 0.41, \chi^2_{0.05}(1) = 3.84, p > 0.05$		

表3 临床上用三种方法的检出阳性比较

临床诊断	例数	荧光法 阳性 (%)	艳蓝法 阳性 (%)	培养法 阳性 (%)
痢疾	91	72 (79.1)	70 (76.9)	56 (61.5)
急性肠炎	11	10 (90.9)	7 (63.6)	7 (63.6)
消化不良	4	2 (50)	2 (50)	
合计	106	84 (79.2)	79 (74.5)	63 (59.4)

表4 三种方法检出阳性的比较

方 法		荧光法		合 计	艳蓝法		合 计
		阳性	阴性		阳性	阴性	
培养法	阳性	54	9	63	55	7	62
	阴性	32	11	43	31	13	44
合 计		86	20	106	86	20	106
显著性测定		$X^2 = 16.7, X_{0.01(1)}^2 = 6.63, p < 0.01$			$X^2 = 13.9, X_{0.01(1)}^2 = 6.63, p < 0.01$		

表5 三种方法检出结果的符合情况

		符 合				不 符 合			
		荧光法(+)	荧光法(-)	艳蓝法(+)	艳蓝法(-)	荧光法(+)	荧光法(-)	艳蓝法(+)	艳蓝法(-)
		培养法(+)	培养法(-)	培养法(+)	培养法(-)	培养法(-)	培养法(+)	培养法(-)	培养法(+)
例数		53	11	57	8	32	10	35	6
百分率(%)		50	10.3	54.2	7.5	30.2	9.4	33	5.7
合计	例数	64		65		42		41	
	%	60.3		61.7		39.6		38.7	

注：以两者均阳性和均阴性例数之和为符合率。

氏菌占 3.2%，福氏志贺氏菌 1a 型占 3.2%、1b 型占 34.9%、2a 型占 25.4%、2b 型占 3.2%、3 型占 4.8%，福氏未定型者占 7.9%。在上述菌型中，用荧光法检查，鲍氏有 3 株未检出，福氏 1b 型 2 株、2a 型 1 株、3 型 1 株均未检出。用艳蓝法检查，除 6 株鲍氏志贺氏菌未检出外，其它菌型均检出。

讨 论

1. 荧光法、艳蓝法对菌痢早期诊断的价值：
由于菌痢临床表现多样化及部分患者症状

不典型给诊断带来一定困难。从表 3 结果看出，临床诊断肠炎 11 例标本用荧光法检出菌痢阳性占 90.9%，艳蓝法与培养法各检出阳性占 63.6%。说明单靠临床某些症状诊断将会有漏诊，若用荧光法及艳蓝法可为早期诊断提供参考。106 份标本的试验证明，荧光法和艳蓝法均有简单、快速、敏感、不需特殊设备等优点，适于一般实验室使用。

2. 三种方法符合情况的分析：

(1) 从表 5 看，荧光法和艳蓝法检出阳性各占 32 及 35 例，而培养法则为阴性。前两种

方法比培养法阳性率高。明显说明有假阳性问题存在。其原因：① 由于荧光法和艳蓝法是用特异已知抗血清与未知细菌反应，比培养法敏感所以阳性率高。② 从形态学检查涂片看，只要是痢疾杆菌，不管是否灭活，只要抗原性强，就可与抗体结合，染色后即可镜检出。③ 培养法只有活菌存在时才能获得阳性结果，加之培养基种类不同，差异悬殊，有的痢疾杆菌生长易受抑制，典型菌落不易挑到等，故有漏检的可能。但仍不能排除假阳性，因两法最大缺点是容易引起非特异交叉反应，对有共同抗原的肠道杆菌，由于经验不足有可能误判为志贺氏菌而出现假阳性结果。

(2) 若以培养法阳性数 100% 分析另一种方法的符合率，从本实验看，经培养法分离出痢疾杆菌 63 株，荧光法同时检出 53 株符合率 84%，艳蓝法同时检出 57 株符合率达 91%。荧光法除 10 例未检出外，还有 4 株福氏菌未检出。说明出现了少量假阴性结果，其原因：① 粪便中病菌分布不匀，涂片时未采到菌。② 抗

血清对某些亚型效价不高以致形态不典型。

(3) 制片过厚或寻找时间不足等。

3. 排除假阳性提高检出率的措施：

(1) 在予试验中诊断血清和荧光抗体工作液的浓度要选择适当，过浓会出现交叉假阳性；过稀亮度不够或染色不典型而误为阴性。制片不宜过厚。

(2) 荧光法阳性判定标准应符合三个特点：菌体短小，周围光亮、中心稍暗。虽交叉反应的一些杂菌菌体也有光亮但比较弱。一些杂质可发亮但中心不暗，故均可鉴别。

(3) 判定艳蓝法阳性时，应掌握菌体膨胀特点，勿认为菌体大小。

(4) 使用荧光法和艳蓝法时，我们提倡标本直接涂片与 GN 增菌后涂片同时进行。当标本接种 GN 培养基 37℃ 6 小时后，大肠杆菌、变形杆菌及假单胞杆菌属中的细菌生长均迟缓或受到抑制，而志贺氏菌属的细菌则生长较快。