

伤寒沙门氏菌及其抗原检测方法的近年进展

王 礼 文

(江苏省洪泽县卫生防疫站)

伤寒病的诊断,来自病原学的证据最为可靠。检测伤寒特异性抗体,对诊断有重要的参考价值,但特异抗原刺激机体产生有关抗体,有一定的时间过程,而且受各种因素影响。在一些免疫功能紊乱或缺陷的患者中,检测抗体往往易产生假阳性或假阴性反应,而检测抗原则可更早、更准确地作出诊断。为此,如何提高病原菌的分离效果及检测伤寒抗原的方法应运而生,现就其应用情况和价值综述如下。

(一) 病原菌的分离培养

1. 标本的选择:骨髓培养有较高的阳性分离率,且不受病程影响。Guerra^[1]对60例伤寒患者作骨髓和血培养比较,骨髓培养阳性率高达95%,而血培养仅为43.3%。沙门氏菌常存在于患者胆汁中,为获取胆汁标本,现有人设计出一种线囊装置^[2]。取标本时,将尼龙线的一端固定在患者面部,另一端于胶囊内,令患

者吞入,6小时后取出,选择有胆汁染迹线端20cm接种于亚硝酸盐肉汤作培养。判断线端是否进入十二指肠,根据胆汁染迹和线端pH值确定。该法和多次血培养结合运用,阳性率可达92%^[3]。用线囊装置,获取患者胆汁作培养有较高的阳性分离率,可与骨髓培养相当,避免骨髓培养手续烦琐和损伤性较大的不足。

2. 培养方法:血液通常含菌量很少,培养的血量与其结果至关重要,应提倡多次重复培养,方可获取较高的阳性分离率。为避免血液中抗菌物质的干扰,血液必须经增菌培养液的充分稀释,或用血块培养。增菌液中加入胆汁、链激酶,可促进伤寒菌生长,加速血块分解,提高阳性分离率。Watson^[4]观察210例伤寒病人,于15ml胆盐肉汤中加入100单位的链激酶,可使原胆盐肉汤阳性检出率由64%提高到92%。Escamilia^[5]用胰蛋白酶大豆肉汤,加入

聚茴香脑磺酸钠 (SPS) 对伤寒患者进行血液培养,培养 24 小时和 3 天的阳性检出率分别为 51.6% 和 59%,而未加 SPS 的阳性率则为 25.3% 和 45.3%,两者差异显著,表明 SPS 有促进伤寒杆菌生长的能力。并提出伤寒杆菌一周内阴性培养物继续培养 14—21 天仍可出现 19—34% 的阳性检出率。

(二) 可溶性抗原的检测方法

1. 对流电泳 (CIE)^[6,7]: 伤寒杆菌多糖抗原在弱碱性环境下,带有负电荷,在 pH8.2 左右的琼脂糖中可与相应抗体形成沉淀线。Gupta 用 CIE 法检查 26 例确诊为急性期伤寒患者血清中可溶性抗原,阳性 24 例,阳性率达 92%,而 Sivadasan^[8] 报告用 CIE 法检测伤寒急性期患者血清中可溶性抗原,结果大相径庭。此外,有报告用 CIE 法从正常输血员作对照血清时亦检出伤寒抗原^[9]。可见,该法用于检测伤寒可溶性抗原,其敏感性和特异性均不甚理想。

2. SPA 协同凝集: 利用金黄色葡萄球菌 A 蛋白能与人和多种哺乳动物血清 IgG 分子 F₂ 段结合的特性,将其作为标记特异性 IgGF(ab')₂ 的载体,当与相应抗原作用时,便呈凝集现象。John^[10] 用此法检查 33 份经血培养证实为伤寒患者的血清,抗原阳性 32 份,阳性率达 97%。Rockhill^[11] 用此法检查 61 例伤寒患者尿液,59 例阳性,阳性率达 97%。尚有作者用 SPA 协同凝集法从伤寒患者唾液中检出可溶性抗原,阳性率为 75%,而健康对照无一例阳性。SPA 协同凝集比 CIE 法敏感^[8],但体液中许多干扰因素可影响其特异性,实际应用情况表明,SPA 协同凝集法检测体液中特异抗原诊断伤寒的阳性率尚达不到上述水平。Barrett^[14] 检查 50 份正常人体中伤寒 Vi 抗原,协同凝集 6 份假阳性。有些正常人对尿尿虽经未致敏 SPA 的菌体吸收,仍产生非特异性凝集^[16]。因此,消除 SPA 协同凝集非特异性凝集反应,是该法能否经受实践考验的关键。笔者认为,被检标本的前处理十分重要。血培养增菌液经碱化乙醇后加热提取伤寒可溶性抗原;尿液标本需

将 pH 调至中性再经高浓度未致敏的 SPA 菌体 37℃ 吸收半小时后,置 4℃ 冰箱过夜;血清标本用煮沸使其凝固后离心提取伤寒可溶性抗原方法较好。阳性凝集标本应经抑制试验确证后方能作出诊断报告。标记 SPA 菌体的诊断血清,应含高浓度的 IgG 抗体。为获得足量的 IgG 抗体,免疫动物日程应延长至 40 天以上,如此可增强标记的效果。SPA 协同凝集法简易、快速,并具有一定的敏感性和特异性,抗体标记的试剂稳定,易于保存,若应用得当,将有助于伤寒病的早期诊断。

3. 胶乳凝集试验: 用胶乳作为载体吸附伤寒抗体,检测伤寒抗原。王岱明^[12] 用玻片胶乳试验检测 13 份伤寒患儿尿液,伤寒抗原的检出均为阳性,而对照则为阴性。Pakleonglim^[13] 报告用沙门氏 0—9 单克隆 IgM 抗体标记胶乳颗粒,并改用试管法,结果发现试管法比玻片法敏感 4 倍,至少可检出伤寒脂多糖抗原 50ng/ml,并认为可将此法用于检测伤寒患者体液中的可溶性抗原,特别是用尿液。

4. ELISA: ELISA 检测抗原常用双抗体夹心法,其基本程序为: 用纯化的伤寒 IgG 抗体包被聚苯乙烯反应板,加待测标本(抗原),再加酶标记的伤寒 IgG 抗体,加底物→显色。Barret^[14] 用 ELISA 双抗体夹心法检测 6 份粪培养阳性伤寒病人尿液中 Vi 抗原,ELISA 阳性 4 例,而 SPA 协同凝集法仅一例阳性。10 份正常人对照和 40 份非接触人群尿液结果均为阴性,而 SPA 协同凝集阳性反应结果分别为 0/10 和 6/40。作者证实 ELISA 检测 Vi 抗原,其敏感性比 SPA 协同凝集高 100 倍。前者抗原临界检出量为 1 ng/ml,而后者为 100ng/ml。Appassakij^[15] 用巴比妥缓冲液(pH8.4)提取丙酮干燥伤寒菌体表面蛋白抗原,经三氯醋酸沉淀纯化抗原物后免疫家兔,获取伤寒杆菌蛋白抗体。用 ELISA 双抗体夹心法测定伤寒患者血清中存在的伤寒杆菌蛋白抗原,阳性结果如下: 确诊的伤寒患者 52/62; 临床诊断的伤寒患者 10/30; 疑似伤寒的患者 8/21; 非伤寒发热患者 2/17; 正常人 5/160。其敏感性

$[a/(a+c)] \times 100$, 特异性 $[d/(a+b)] \times 100$, 准确度 $[(a+d)/(a+b+c+d)] \times 100$, 阳性预测值 $[a/(a+b)] \times 100$, 阴性预测值 $[d/(c+d)] \times 100$, 分别为 83.87%, 89.04%, 87.93%, 67.53% 和 95.31% (注: a: 确诊阳性数; b: 假阳性数; c: 假阴性数; d: 确诊阴性数)。笔者^[16]用 ELISA 双抗体夹心法检测伤寒患者尿液中菌体多糖抗原进行伤寒病试验, 其敏感性和特异性均比 SPA 协同凝集要强, 检测伤寒杆菌多糖抗原, 其最低限量可达 1.2—2ng/ml。36 例血培养阳性伤寒患者中, 34 例其尿液中检出伤寒杆菌多糖抗原, 阳性率达 94.4%。疑似伤寒患者的阳性率为 83.2% (149/179), 非伤寒发热病人和健康人群对照均为阴性 (0/18, 0/134)。

5. DNA 探针技术^[17]: DNA 探针是根据只有两条具有互补碱基顺序的 DNA 链, 才能在一定的条件下重新组成一个双链结构的原理。将同位素标记于伤寒杆菌的 DNA 上, 去检测待检标本中与此结合的特异性 DNA 结构, 以达到快速诊断的目的。有毒伤寒菌株均有 Vi 抗原, Vi 抗原由 ViaA 和 ViaB 两部分组成, 其结构基因位于 ViaB。Rubin 等的实验研究表明, 能表达 Vi 抗原的最小重组克隆含有一个 18-kb DNA 的插入物, 用限制性核酸内切酶消化, 产生 EcoRI-A (8.6kb) 和 EcoRI-B (9.4kb) 的 DNA 片断, 此 EcoRI-A 片断对 ViaB 基因区域有高度特异性, 可作为良好的杂交探针。经 170 多株各种肠道菌杂交反应的研究, EcoRI-A 探针只与 Vi 阳性菌株反应, 并具有高度敏感性, 当标本细菌数在 100—500 个时, 即可呈阳性反应。

(三) 结语

近年来, 不典型伤寒病例增多, 误诊率高。伤寒病原菌的分离, 不但提供了明确的诊断, 而且可观察伤寒菌株耐药谱的变化, 对合理用药, 流行病学调查等均有益。因此, 临床医务工作者应重视病原菌的分离。在目前由于亚抑制量

抗生素的广泛使用, 血培养阳性率不高的情况下, 改进培养基制作, 选择适当标本如骨髓、胆汁等作培养, 对伤寒病的诊断尤为重要。检测伤寒杆菌可溶性抗原, 可作为病原菌分离阳性率不高的一种补充, 有助于伤寒病的诊断, 但方法应简单、快速、敏感且特异。就上述能应用于临床的各种方法中, 应首选 ELISA 法, 该法比 CIE、SPA 协同凝集和乳胶凝集敏感且特异。SPA 协同凝集和乳胶凝集由于方法简单, 对于一些基层实验室, 仍具有一定的实用价值。DNA 探针技术, 是目前检测病原菌最敏感的方法之一, 其主要缺点是同位素半衰期短。新近有人应用生物素标记, 其敏感性可与同位素标记相媲美, 并可弥补同位素半衰期短的不足。DNA 探针应用于伤寒病诊断, 目前尚处于实验阶段, 但可以预料, 随着该项技术的深入研究, 用于检测伤寒杆菌抗原的一种实用而又高效的 DNA 探针不久将会广泛应用于临床。

参 考 文 献

- [1] Guerra J et al.: Trans R Soc Trop Med Hyg, 73: 680, 1979.
- [2] Benavente L et al.: Trans R Soc Trop Med Hyg, 78:404, 1984.
- [3] Afrreolo A et al.: J Infect Dis, 153: 359, 1986.
- [4] Watson R C et al.: J Clin Microbiol, 7:122, 1978.
- [5] Escamilia J et al.: J Clin Microbiol, 18:380, 1983.
- [6] Gupta A K at al.: J Immunol Methods, 30:349, 1979.
- [7] Sundararaj T at al.: Trans R Soc Trop Med Hyg, 77: 143, 1983.
- [8] Sivadasan K at al.: Lancet, 1: 134, 1984.
- [9] 徐正英: 临床检验杂志, 4: 255, 1986.
- [10] John J T at al.: J clin Microbiol, 20:751, 1984.
- [11] Rockhill R C at al.: J clin Microbiol, 11: 213, 1980.
- [12] 王岱明等: 中华传染病杂志, 1: 76, 1983.
- [13] Pak-leonglim at al.: J Clin Microbiol 25:1165, 1987.
- [14] Barrett T J at al.: J Clin Microbiol 15:235, 1982.
- [15] Appassakij H at al.: J clin Microbiol, 25:273, 1987.
- [16] 王礼文等: 中华医学检验杂志, 11: 152, 1988.
- [17] Rubin A F at al.: J Clin Microbiol, 22:600, 1985.