DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.049
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
224 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0224-03

抗脆弱类杆菌和产气荚膜杆菌McAb池在外科感染快速诊断中的应用

张雅萍,甘 露,常 山 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 制备抗脆弱类杆菌和抗产气荚膜杆菌单克隆抗体池,并用于快速诊断及时指导临床治疗。方法 采用间接免疫荧光抗体染色法(IFA)和免疫酶标抗体染色法(ELA)对我院1998~1999年191例外科感染患者的标本进行细菌学检测,并与常规培养法进行比较。结果 3种方法从191份标本中分别检出脆弱类杆菌53株(27.7%)和55株(28.8%)以及25株(13.1%);检出产气荚膜杆菌12株(6.3%)和11株(5.8%)以及6株(3.1%)。IFA和ELA法2种厌氧菌检出率明显高于CM法。但IFA和ELA法之间检出率差异无显著性。结论 自制抗脆弱类杆菌和抗产气荚膜杆菌的McAb池,检测平时常见的脆弱类杆菌和战时常见的产气荚膜杆菌,敏感性高,特异性强,简便,快速,便于推广。

关键词:脆弱类杆菌;产气荚膜杆菌;单克隆抗体
中图法分类号:R392.11;R630.4 文献标识码:A

Application of monoclonal antibody pool against *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens* in rapid diagnosis in surgical infection

ZHANG Ya-ping, GAN Lu, CHANG Shan (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare monoclonal antibody (McAb) pool against *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens* and evaluated its effect in rapid diagnosis in surgical infection. Methods After the preparation of monoclonal antibodies against *B. fragilis* and *C. perfringens*, 191 specimens collected from infectious patients was detected with indirect immunofluorescent antibody (IFA) and enzyme labeled antibody (ELA). The results were compared with routine cultural method (CM). Results Among the 191 specimens, 53 (27.7%), 55 (28.8%) and 25 (13.1%) strains of *B. fragilis* were detected with IFA, ELA and CM respectively, and for *C. perfringens*, 12(6.3%), 11(5.8%), and 6 (3.1%) strains were found. The detectable rate of anaerobic bacteria by IFA and ELA was higher than by CM, but no difference was found between these 2. Conclusion The self-made McAb pool against *B. fagilis* and *C. perfringens* might be a rapid, specific, sensitive and simple McAb pool for detecting *B. fragilis* in surgical infection and *C. perfringens* in wartime.

Key words: *Bacteroides fragilis*; *Clostridium perfiingens*; monoclonal antibody

厌氧菌感染在临床各科广泛存在,特别是创伤外科厌氧菌感染的发病率更高。脆弱类杆菌(*Bacteroides fragilis*, *B.f*)是平时常见的无芽胞厌氧菌,在临床70%以上的表现为脓肿。而产气荚膜杆菌(*Clostridium perfringens*, *C.P*)是战创伤时导致气性坏疽的致病性厌氧菌,其致病性强,所引起的气性坏疽治疗困难,预后差。加之厌氧菌培养技术复杂、困难,鉴定时间需1周以上,迄今开展厌氧培养的单位仍有限。目前国内尚缺少一种快速简便、准确可靠,特异性和敏感性都高的检测方法,本实验制备了上述两种菌的单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb)池,采用间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescent antibody, IFA)和酶标抗体染色法(Enzyme labeled antibody, ELA)技术,达到快速诊断及指导用药的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

脆弱类杆菌(*B.f*),产气荚膜杆菌(*C.P*)标准株:购自美国CDC。

抗*B.f*和*C.P*的制备:通过单克隆抗体技术,分别建立了抗*B.f*和*C.P*的杂交瘤细胞株及高效价高特异性的单克隆抗体(McAb)和McAb池。抗*B.f*的杂交瘤细胞株命名为IG_{10}, $3H_9$和$3G_9$;抗*C.P*的杂交瘤细胞株命名为$3E_3$, $2A_3$, $3B_1$和$3H_5$。同时对McAb的效价、特异性、敏感性和抗原决定簇进行了分析鉴定。

猪抗鼠IgG酶标抗体:由第三军医大学微生物学教研室提供。羊抗鼠IgG荧光抗体:购自华美生物制品公司。厌氧菌培养基:自行配制。牛血清白蛋白:上海生物制品公司。荧光显微镜:Olympus BH.自动照像。光学显微镜:Olympus BH.自动照像。邻苯二胺(OPD):上海化学品厂生产。

1.2 方法

标本来源:我院普通外科、烧伤科和新桥医院普外科感染的标本191份。标本分别作需、厌氧菌培养并分离与鉴定。

1.2.1 间接荧光法(IFA) 将1张玻片划成2格,1份标本分别涂在1张玻片的2个格子中,分别滴加*B.f* McAb和*C.P* McAb各1滴于玻片的2个格子中,行荧光抗体染色,于荧光显微镜下观察。

1.2.2 酶标抗体染色法(ELA) 染色方法同荧光法。普通光镜下观察。

1.3 统计学处理

各组数据采用χ^2检验和t检验。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L042)
作者简介:张雅萍(1938-),女,河北省昌黎县人,研究员,主要从事烧伤感染和临床微生物方面的研究,发表论文98篇。电话:(023)68754677
收稿日期:2000-07-03;修回日期:2000-10-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

191 份外科感染标本培养结果表明, 需氧菌阳性率为 87.9%, 厌氧菌为 57.6%, 其中阑尾炎标本厌氧菌阳性率最高(78.9%), 其次为脑脓肿(70%), 见表 1。

表 1　191 份临床标本培养结果

Tab 1　Results of 191 culture of clinical specimens

Source of specimen	*n*	Aerobic positive	Anaerobic positive
Electric burn	13	9(76.9%)	3(23.0%)
Burn ward	11	10(90.9%)	36(36.4%)
Appendicitis	71	69(97.2%)	56(78.9%)
Cholecystitis	10	8(80.0%)	3(30.0%)
Abdomen abscess	25	23(92.0%)	14(56.0%)
Stomach carcinoma	8	4(50.0%)	1(25.5%)
Gut carcinoma	10	9(90.0%)	5(50.0%)
Lung carcinoma	10	5(50.0%)	50(50.0%)
Pyothorax	10	10(100.0%)	7(70.0%)
Carcinoma of breast	5	4(80.0%)	0(0.0%)
Carcinoma of rectum	14	13(92.8%)	8(57.1%)
Bronchiectasis	4	4(100.0%)	1(25.0%)
Total	191	168(87.9%)	110(57.6%)

外科厌氧菌感染最常见的是类杆菌 119 株(70.4%), 其中产黑类杆菌 55 株(32.5%)和脆弱类杆菌 43 株(25.4%); 几种梭形杆菌也较常见共 23 株(13.6%); 3 种厌氧性球菌共为 18 株(10.7%)。169 株厌氧菌中, 无芽胞的厌氧菌 160 株(94.7%), 而有芽胞的厌氧菌仅 9 株(5.3%), 见表 2。

表 2　外科常见厌氧菌种(169 株)

Tab 2　Common anaerobia in surgical patients(169)

Organism	Strains
B. melaninogenicus	55(32.5%)
B. fragilis	43(25.4%)
Other bacteroides	21(12.4%)
F. mortiferum	11(6.5%)
F. necrophorum	4(2.4%)
F. nucleatum	2(1.2%)
Other fusobacterium	6(3.6%)
Clostridium	9(5.3%)
Peptococcus	11(6.5%)
Peptostreptococcus	5(3.0%)
Veillonella	2(1.2%)

在 191 例临床标本的检测中, McAb 池 IFA 和 ELA 染色分别检出脆弱类杆菌 53 株(27.7%)和 55 株(28.9%); 检出产气荚膜杆菌 12 株(6.3%)和 11 株(5.8%), 其结果与厌氧培养法比较差异存在显著性($P<0.05$), 见表 3。

表 3　191 份厌氧菌培养与 McAb 池 IFA 和 ELA 检测结果

Tab 3　Resalts of 191 anaerobic culture and IFA、ELA detection

Source of specimen	*n*	Anaerobic culture		McAb pool IFA		McAb pool ELA	
		B.f	*C.P*	*B.f*	*C.P*	*B.f*	*C.P*
Electric burn	13	0	3(23.0%)	0	4(30.8%)	0	4(30.8%)
Burn ward	11	0	0	0	0	0	0
Appendicitis	71	9(12.7%)	1(1.4%)	30(42.3%) **	6(8.5%)	31(43.7%) **	5(7.0%)
Cholecystitis	10	4(40.0%)	0	4(40.0%)	0	4(40.0%)	0
Abdomen abscess	25	7(8.0%)	0	9(36.0%)	0	10(40.0%)	0
Stomach carcinoma	8	0	0	0	0	0	0
Gut carcinoma	10	2(20.0%)	1(10.0%)	3(30.0%)	1(10.0%)	3(30.0%)	1(10.0%)
Lung carcinoma	10	0	0	0	0	0	0
Pyothorax	10	1(10.0%)	0	3(30.0%)	3(30.0%)	3(30.0%)	3(30.0%)
Carcinoma of breast	5	0	0	0	0	0	0
Carcinoma rectum	14	2(14.3%)	1(1.1%)	4(28.6%)	1(7.1%)	4(28.6%)	1(7.1%)
Bronchiectasis	4	0	0	0	0	0	0
Total	191	25(13.1%)	6(3.1%)	53(27.7%) *	12(6.3%)	55(28.8%) *	11(5.8%)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* anaerobic culture

3　讨论

长期以来, 临床医务工作者对厌氧菌认识只限于破伤风、气性坏疽等有芽胞的厌氧菌。随着真空技术的发展, 解决了厌氧菌培养技术中一些难题。对临床厌氧菌感染有了进一步的认识。本组资料表明, 外科临床厌氧菌感染的特点多是与需氧菌或兼性厌氧菌混合感染(62.8%)(单纯厌氧菌感染仅占 7.8%)。混合感染中最常见的是厌氧的脆弱类杆菌或产黑类杆菌与需氧的大肠杆菌混合感染。需氧菌的生长消耗了局部环境中的氧气, 从而有利于专性厌氧菌的生长。在 191 份外科感染的标本中, 检出专性厌氧菌 169 株, 其中 160 株为无芽胞厌氧菌(占 94.7%), 而有芽胞厌氧菌只有 9 株(5.3%), 从而改变了人们以往对厌氧菌感染认识的旧观念。

厌氧培养法至今仍然是诊断厌氧菌感染常用的方法。由于厌氧菌培养需要特殊的设备和技术, 对营养要求较高; 标本的采集、送检, 接种和分离鉴定等每个环节都可影响厌氧菌的检出, 因此检出率并不高, 且需 5～10 d 报告结果。依靠实验室培养法提供细菌学依据来指导临床治疗显然不够理想。近年来国内外学者, 在厌氧感染快速诊断方面作了大量工作, 例如采用 DNA 探针、PCR、rRNA 特异性寡核苷酸探针以及多克隆抗体 IFA 和 ELA 法染色等技术都取得了比较满意

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的效果，但仍都有不足之处。我们曾用多抗 IFA 和 ELA 染色法检测临床标本敏感性虽高，但非特异性也强，DNA 探针虽然特异性高，但敏感性差，PCR 法技术特异性强、敏感性高，但设备昂贵，技术操作十分严格，不易推广。目前国内尚无理想的快速、准确、简便易行，敏感性和特异性都很高的快速诊断方法可以采用并推广。在此，本实验探索 McAb 池 IFA 和 McAb 池 ELA 法快速检测脆弱类杆菌和产所荚膜杆菌。是国内首次使用抗脆弱类杆菌或/和抗产气荚膜杆菌的单克隆抗体池进行了快速检测这两种厌氧菌，并取得了满意的效果。目前国内外已有用单克隆抗体 IFA 法和 ELA 法检测细菌的报道。聂青和等[5]利用单克隆抗体 IFA 法快速检测粪例中的痢疾杆菌获得理想效果，并认为敏感性高于培养法。而对单克隆抗体 ELA 法则看法不一。Morris 等[6]认为此法特异性虽高，但敏感性却降低了。而以 McAb 池的形式检测细菌则未见报道。用 McAb 池检测外科临床标本 191 份结果显示，其阳性检出率明显高于厌氧菌培养法，此法既解决了多克隆抗体特异性差的问题，又克服了单一单克隆抗体敏感性较差的矛盾。

检测结果发现，不论是多克隆抗体，还是 McAb 池 IFA 和 ELA 法二法之间阳性检出率差异没有显著性（$P>0.05$）。用上述方法检测临床标本，一般认为是不受细菌死活的影响。在本研究中用此法对脆弱类杆菌和产气荚膜杆菌的检出率均显著高于厌氧菌培养法。本实验 McAb 池特异性强、敏感性高，且操作简便，是一种快速、准确、简便易行的诊断方法，易于推广。

参考文献：

[1] 张雅萍，肖光夏，秦孝健. 外科感染中的厌氧菌及其快速诊断[J]. 中华外科杂志，1999，37(12)：765.

[2] Tearev V N，Iastrobova N E，Vaneeva N P，*et al*. The use of immunoenzyme analysis for the diagnosis of an anaerobic infection of the maxillofacial area[J]. Stomatologiia Mosk，1995，74(1)：38－40.

[3] Yamashita Y，Kohno S，Koga H，*et al*. Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens by PCR[J]. J Clin Microbiol，1994，32(2)：679－683.

[4] Alvarez M. Diagnosis of anaerobic infection of the pleural fluid using gas-liquid chromatography[J]. Enferm Infect Microbiol Clin，1993，11(2)：84－89.

[5] 聂青和，黄 策，张开端. 单克隆抗体免疫荧光法快速检测粪便中痢疾杆菌的实验研究[J]. 中国实用内科杂志，1996，16(3)：147－148.

[6] Morris J A，Lvanyi J. Immunoassays of field isolated of Mycobacterium bovis and other mycobacteria by use of monoclonal antibodies[J]. J Med Microbiol，1985，19(3)：367－373.

（编辑 冯崇英）

（上接 223 页）

1.5 注意事项

取股薄肌时应避免损伤进入该肌的血管和神经束，以免该肌发生缺血坏死而导致失败。移植股薄肌松紧度应适当。术中测试新肛门口仅能容纳一食指节，否则术后发生肛门狭窄或失效。若会阴部造瘘口结肠外翻多或造口过大，最好先切去外翻的结肠，缩小造瘘口，再做股薄肌移植。

1.6 术后并发症

本组 2 例伤口感染肛周疤痕狭窄。经狭窄环切开、定期扩肛后好转，其余 40 例均一期愈合。

1.7 结果

按张庆荣“肛门术后机能标准评价”[1]，优良 20 例，好 18 例，较好 2 例，失败 2 例（伤口感染所致）。

2 讨论

2.1 正确评价肛门括约肌成形术

直肠下段肛管癌传统的手术方式为经腹会阴直肠肛管切除、结肠腹壁造口，该术需作人工肛门给病人带来诸多不便，精神上造成很大压力，故病人多不愿作此手术，失去了根治的机会。国外于 1985 年行首例腹会阴联合切除、会阴部造口移植股薄肌肛门成形术获得成功[2]。直肠下段癌、肛门癌挖除肛门后采用各种横纹肌的移植肛门括约肌的目的是使肛门经常处于收缩状态以纠正大便失禁。国内外研究表明[2,3]，腹会阴切除术后行会阴部股薄肌移植肛门成形术能有效地治疗直肠肛管的肿瘤，防止大便失禁。该术不影响因肿瘤行腹会阴切除术的效果，术后并发症少，无后遗症。肛门成形术可使 90％病例获得粪便自制，是目前较为理想的手术方式。从本组病例结果看股薄肌移植肛门成形术较单纯的会阴部造瘘的效果好，病人愿接受，术后能坚持正常工作和社交活动。

2.2 手术时机

直肠下段癌经腹会阴联合切除、会阴部造瘘的同时作股薄肌移植肛门成形术，由于手术创伤大，时间长，加上手术污染，股薄肌移植成形伤口易感染，影响术后肛门括约肌的效果，故主张二期作股薄肌移植肛门括约肌成形术为好。直肠癌根治术后 2 年内复发较多，如果术后短期内癌肿复发，一期股薄肌移植肛门括约肌成形就失去意义。故我们主张直肠癌根治 2 年后局部没有复发的情况下，二期股薄肌移植肛门成形较为理想，远期疗效亦好。

关键词：股薄肌；移植；肛门成形

中图法分类号：R657.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张庆荣. 实用肛门直肠外科学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1965. 214－215.

[2] 姜 辉，喻德洪. 肛管直肠癌切除术同时行会阴部股薄肌成形术结果[J]. 中国实用外科杂志，1996，16(11)：676.

[3] 田振国，吴 斌 主编. 肛肠病的诊断与治疗[M]. 沈阳：辽宁民族出版社，2000. 603－604.

（编辑 谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net