DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.010
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
428 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0428-02

单克隆抗体池免疫荧光法快速检测感染灶中脆弱类杆菌的初步研究

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

提 要:目的 对感染灶中的脆弱类杆菌进行快速检测。方法 首次使用抗脆弱类杆菌单克隆抗体池作为诊断试剂,采用免疫荧光法直接检测感染灶中的脆弱类杆菌。结果 对临床82份感染标本的检测,用厌氧培养法检测阳性者,此法检测均为阳性,其一致性85.7%。厌氧培养法阳性率为48.7%,此法阳性率为57.3%,统计学处理二者差异显著($P<0.05$)。结论 此法特异性强,敏感性高,快速简便,避免了因细菌表面抗原变异而致单一单克隆抗体效价降低甚至"失效"的问题。且标本中细菌的存活状态对本法无影响。

关键词:单克隆抗体池;脆弱类杆菌;免疫荧光法
中图法分类号:R378.99;R446.5 文献标识码:A

Preliminary study of rapid diagnosis of Bacteroides fragilis infection with indirect immunofluorescent assay in clinical speciments

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

Abstract: Objective To evaluate the method of rapid diagnosis of Bacteroides fragilis infection in clinical specimens. Methods Bacteroides fragilis infection of clinical speciments was examined with immunofluorescent assay using monoclonal antibody pool angainst B. fragilis as the diagnostic agent. Results Examination of 82 clinical specimens revealed that the positive rate for monoclonal antibody pool immunofluorescent assay was 57.3% and that for anaerobic culture was 48.7% ($P<0.05$). The consistent rate between the 2 methods was 85.7%. Conclusion Monoclonal antibody pool immunofluorescent assay is specific, sensitive and easy to perform. In addition, this method will not be affected by the decrease or loss of the efficiency of one kind of monoclonal antibodies and the survival conditions of B. fragilis cannot interfere with the normal operation of this method.

Key words: monoclonal antibody pool; Bacteroides fragilis; immunofluorescent assay

免疫荧光法快速检测脆弱类杆菌的报道较多,但所使用的抗体均为多克隆抗体(PcAb),由于PcAb的特异性较差,常与其它病原菌发生交叉反应,影响实验结果。单克隆抗体作为针对菌体表面单一抗原决定簇的抗体,可排除相关细菌的干扰。为了避免细菌表面抗原变异而致单一单抗"失效"影响检测结果,我们选择脆弱类杆菌的标准株制成并用2~3株作用于不同表位的McAb混合成单抗池,在不影响其特异性的情况下,明显提高了其敏感性及其在临床诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 单克隆抗体制备

用脆弱类杆菌的标准株免疫BALB/C小鼠,以其脾细胞与SP2/0细胞用50%PEG进行常规融合,间接ELISA法检测培养上清,有限稀释法进行克隆至100%孔阳性,选择了3株效价高之杂交瘤细胞株,经小鼠(已腹腔注射降植烷1周以上)腹腔注射收获腹水,经饱和硫酸胺法粗提McAb,透析除盐。-20°C冰箱保存备用,PcAb为免疫小鼠血清。羊抗鼠免疫萤光抗体由第三军医大学微生物学教研室提供。

1.2 抗原决定簇分析

采用竞争抑制试验测定相加指数,相加指数大于40%,则表明抗体作用于不同的抗原决定簇。

1.3 腹水效价与单克隆抗体池

先以间接ELISA法分别测3株McAb腹水效价,再以1:1的比例将2株McAb混合一起,同法测其效价。

基金项目:全军"九五"攻关课题资助项目(96L042)

作者简介:甘 露(1960—),男,山东省荷泽市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事厌氧菌方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65319280

收稿日期:1999-11-30;修回日期:2000-03-20

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

1.4　临床标本来源

感染灶标本由我院普外、烧伤、胸外及呼吸科等提供, 其中阑尾炎 42 例、腹盆腔脓肿 18 例、脓胸 7 例, 大面积烧伤 5 例, 电击伤 2 例, 结直肠癌 8 例。

1.5　厌氧分离培养法

标本接种于厌氧平皿, 置入厌氧罐在厌氧装置上进行抽换气 3 次, 37℃ 培养。有菌生长的再进行厌氧分离培养、生化鉴定及药敏。

1.6　间接免疫荧光法

将待检标本涂片待干, 火焰固定, 分别加入单抗, 湿盒中作用 30 min, 冲洗后加入羊抗鼠 Ig 免疫荧光抗体 30 min, 再冲洗待干, 荧光显微镜观察结果。设阳性与阴性对照结果判定以显微镜下可见清晰亮度较强的脆弱类杆菌菌体为阳性, 菌体荧光强度以+ ~ 卌计。

2　结果

竞争抑制试验表明 3 株 McAb 分别作用于不同的表位, 其腹水效价分别为 1∶6 000、1∶6 000 和 1∶12 000。将其中任意两株单抗混合成单克隆抗体池后, 其效价提高了 2~4 倍, 效价为 1∶24 000。

厌氧菌培养与单克隆抗体池免疫荧光检测结果: 82 例临床感染标本厌氧分离培养法发现脆弱类杆菌 40 例, 阳性率 48.7%, 多为混合感染, 其中主要为阑尾炎病灶。而单克隆抗体池免疫荧光法检测结果明显高于厌氧分离培养法($P < 0.05$), 见表 1。

表 1　厌氧分离培养与 McAb 池间接免疫荧光法检测结果比较

Tab 1　Results of anaerobic plants test and the pool of McAb immunofluorescent assay

Classic	*n*	APT	Pool of McAb-IFA
Appendicitis	42	35(83.3)	36(85.7)
Abscess of abdomen	18	4(22.2)	8(44.4)
Pyothorax	7	0	2(28.6)
Burns	5	0	0
Electric burns	2	0	0
Colo-rectal carcinoma	8	1(12.5)	1(12.5)
Total	82	40(48.7)	47(57.3)

3　讨论

脆弱类杆菌是临床最常见的致病性较强的无芽胞厌氧菌, 由于其 98%产生 β-内酰胺酶[1], 对许多头孢类抗生素不敏感, 对氨基甙类抗生素天然耐药, 并参与全身各处脓肿的形成, 是临床最重要也是最常见的厌氧菌[2]。但目前大多数诊断方法往往滞后于临床的需要, 用药中就难免带有盲目性。甘露等[3] 采用杂交瘤技术生产的高效价和高特异性单克隆抗体为本实验建立一种快速、准确又简便易行的检测方法提供了可靠的手段。

以单克隆抗体免疫荧光法检测细菌国内已有报道[4]。但用单克隆抗体池免疫荧光检测细菌则未见详细报道。国外有用 DNA 探针及 PCR 检测脆弱类杆菌的报道[5,6], 前者特异性虽高, 但敏感性不尽人意, 后者的特异性及敏感性都高, 但存在操作技术十分严格, 设备较贵, 以及假阳性较高等情况, 不易推广。我们采用单克隆抗体池免疫荧光法检测, 不但不影响其特异性, 敏感性也较单一单克隆抗体提高了数倍, 用时少, 操作简便。当然其先决条件必须是作用于不同表位的单克隆抗体的混合才有意义。我们建议选用 2~3 株效价高且作用与细菌表面不同抗原决定簇的单克隆抗体混合较适宜。但到底选用多少株单克隆抗体混合为最好尚需做进一步的实验。

在临床检测中, 发现脓肿尤其是胸腔脓肿厌氧培养的检出率很低, 而用 McAb 池免疫荧光法仍能检出不少阳性标本, 但仍然低于上野一惠等[1] 的报道。我们认为这与多数脓液尤胸腔脓液标本送检时患者已用了数日抗生素以及送检培养过程中的差错有关。总之, 由于此法特异性强, 敏感性高, 操作易行且不受细菌存活状态的影响, 不失为一种快速、准确、简便易行的检测方法, 并且为建立系统诊断试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

[1] 上野一惠. 厌氧菌的分离频度与分离菌种[J]. 临床科学, 1986, 22(2): 322—323.

[2] Tsarev V N, Iastrebova N E, Vaneevz N P, *et al*. The use of immnoenzyme analysis for diagnosis of an anaerobic infection of the maxillofacial area[J]. Stomatologiia Mosk, 1995, 74(1): 38—40.

[3] 甘　露, 张雅萍, 肖光夏. 抗脆弱类杆菌单克隆抗体的研制与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(7): 485—486.

[4] 聂青和, 黄　策, 张开瑞. 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.

[5] Yanmashita Y, Kohno S, Koga H, *et al*. Detection of bacteroids fraglils in clinical specimens by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(2): 679—683.

[6] Kuritza A P, Getty C E, Shaughenessy P, *et al*. DNA probe for identification ofclinically important baceroides species[J]. J Clin Microbiol, 1986, 23(3): 343—349.

（编辑　王　红）

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