DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.02.005

荧光抗体法及厌氧菌培养法检出类杆菌与梭状杆菌的质量控制

王德旺 张雅萍 秦孝健

（第一附属医院 烧伤中心）

提 要 本文为1983年1月至1984年7月374例次临床标本的脆弱类杆菌、产黑类杆菌与核粒梭状杆菌的荧光抗体法（IFA）与厌氧菌培养法的对比，并对二法的质量控制如符合率、敏感性、特异性、预示值、抗血清的保存期限作了比较。说明二法符合率良好(88.5～95.99%)。IFA有快速诊断的优点外，并有下列的特点：

1．IFA可检查厌氧菌培养法的质量，经对比，证明我们现用厌氧菌培养法宜于分离产黑类杆菌、核粒梭状杆菌，不宜于分离脆弱类杆菌，对后一种厌氧菌培养法有待改进。

2．国外已有厌氧菌专用荧光抗体试剂出售，国内并无此项专用试剂，但可自制厌氧菌抗血清，向北京或上海生物制品研究所购买羊抗兔免疫球蛋白荧光抗体，可作IFA的间接法快速诊断之用。

3．经三年来（1982～1983年102例次，1983～1984年的374例次）三种厌氧菌的IFA与厌氧菌培养法对比，都证明IFA可提高阳性检出率。

并对二法存在的问题略加讨论。

关键词 类杆菌与梭状杆菌；厌氧菌培养荧光抗体法；质量控制

我们自1982年3～5月开展脆弱类杆菌、产黑类杆菌的荧光抗体法(IFA)以来，对其快速性、敏感性、特异性已有初步报道[1]。为了扩大厌氧菌感染的检测范围，从类杆菌延伸至常见的核粒梭状杆菌，本文为1983年1月至1984年7月，同时用上述三种厌氧菌的IFA与培养法的对比，共374例次，作远期观察，以便对二法的质量控制；抗血清质量与保存期限作一探讨。

材料与方法

1．标本来源 我室收检的厌氧菌培养标本，同时作IFA法，选其资料完整者374例次，如表1。

2．厌氧菌培养法 标本含量较多者，用注射器抽取，针尖插灭菌橡皮塞送检；若标本含量不多者，均以CO_2瓶送检。其分离，培养，鉴定均按前法[2]进行。

3．间接荧光抗体染色法

表1 374例次的标本来源

呼吸道烧伤实验狗血液培养液	175	呼吸道烧伤实验狗肺组织	11
烧伤病人创面	54	脓液	9
病人血液培养液	36	肝或胆囊抽出液	7
痰或气管内分泌物	34	脑内穿刺液	6
宫颈分泌物	13	胃肠内容物	3
腹腔穿刺液	12	其他	6
胸腔〃〃〃	8		

（1）抗血清的制备：

脆弱类杆菌、产黑类杆菌的抗血清即前文当时制作，加1/万硫柳汞防腐，冰箱保存，至今已2年。1982年上述二菌抗血清的染色效价为1/40，1983年1月重测为1/20，至今仍用1/20。

核粒梭状杆菌为正常人口腔分离所得的菌株，1983年1月免疫家兔制成抗血清，其效价为1/40。

（2）临床标本荧光抗体染色法：

将一张玻片分为三格，每一标本涂三格内，自然待干，甲醇固定，PBS冲洗后，以脆弱类杆菌、

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

产黑类杆菌、核粒梭状杆菌的抗血清分别加于一格内，下述染色方法，按[1]法进行。每次染色时，均用阳性菌种涂片对照，在荧光显微镜的油镜下观察。阳性者，荧光强度应在卅以上，边缘荧光清晰，黑心菌体，脆弱类杆菌为长短不一的杆菌；产黑类杆菌为球杆状，大小均匀；核粒梭状杆菌为端尖的梭形长杆菌，并记录每视野的菌数。

结果与分析

1. 374 例次厌氧菌培养法与荧光抗体法的结果，如表 2 。

表2 厌氧菌培养法与IFA的结果

厌氧菌培养法	IFA 脆弱类杆菌 +	脆弱类杆菌 −	产黑类杆菌 +	产黑类杆菌 −	核粒梭状杆菌 +	核粒梭状杆菌 −
+	4	5	35	11	11	5
−	38	327	27	301	10	348
共 计	42	332	62	312	21	353
符合率(%)	88.50		89.84		95.99	

2. 二法性能的比较

自1980年至今，我们所用厌氧菌培养法是相同的，为了说明其性能，将所得结果，以符合率（见表 2 ）、敏感性、特异性、阳性预示值、阴性预示值的五项质量控制指标列于表 3 。其计算方法[3]如下：

二法符合率(%) = (二法都阳性次数 + 二法都阴性次数) / 总次数 × 100

敏感性（%）= 荧光阳性而培养也阳性次数／培养阳性总次数×100

特异性（%）= 荧光阴性而培养阴性次数／培养阴性总次数×100

阳性预示值（%）= 荧光阳性而培养阳性次数／荧光阳性总次数×100

阴性预示值（%）= 荧光阴性而培养阴性次数/荧光阴性总次数×100

由表 2 可见符合率在 88.5～95.99% 之间，说明二法符合率良好。因 IFA有快速之效，有诊断价值。其详细二法性能与质量控制，容下文讨论。

表3 IFA与厌氧菌培养法性能的比较（%, *374*例次）

	脆弱类杆菌	产黑类杆菌	核粒梭状杆菌
敏感性	44.40	76.09	68.75
特异性	89.59	91.77	97.20
阳性预示值	9.52	56.45	52.38
阴性预示值	98.49	96.47	98.86

论　论

IFA 法与气相色谱法是克服厌氧菌培养鉴定时间过长（约一周以上）的二种快速诊断法。气相色谱法用于标本厌氧菌代谢产物有机酸的测定，以决定其感染存在的诊断价值，仍有争论；用于菌株分纯后的鉴定，但还要配合其他鉴定法如形态学，生化反应，抗菌谱而进行。IFA 法是建立在厌氧菌抗原性上的检查法，具有高度的特异性，而每种厌氧菌需要一种相应抗血清，此为本法使用范围受到限制的原因。根据三年来我们开展 IFA 法与厌氧菌培养法对比，除有快速诊断优点外，并有下列优点：

1. IFA法可检查厌氧菌培养法的质量

由于厌氧菌对氧的敏感性与复杂的营养要求，其培养法的阳性率受许多因素的影响[1]。在培养基方面：当初步分离时，就有许

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多不同选择培养基，使用这些选择培养基的目的是抑制需氧菌，便于分离厌氧菌。至目前为止，尚无理想的培养基，有的实验室主张一份标本至少接种5种以上不同厌氧平板[4]，这一工作量是很大的。以卡那霉素、万古霉素平板为例，虽抑制大部份的需氧菌，也抑制一部份厌氧菌，卡那霉素就有抑制梭状杆菌的作用，万古霉素有抑制厌氧性球菌的作用。为此，我们采用厌氧平板上不加抑制剂，仅在密集接种区贴上丁胺卡那霉素（10μg）及灭滴灵（10μg）纸片各一张，前者以便抑制需氧菌，可在抑菌区内挑取厌氧菌菌落；后者有抑制厌氧菌的作用，使厌氧菌与需氧菌落易于识别。并把孵育时间延至7天，这样使产黑类杆菌的黑色菌落易于观察。从表3的三种厌氧菌的阳性预示值看，以产黑类杆菌为最高（56.45%），核粒梭状杆菌次之（52.38%），脆弱类杆菌最低（仅9.52%），这说明我们所用培养法，宜于分离产黑类杆菌与核粒梭状杆菌，不宜于分离脆弱类杆菌。阳性预示值低，可能是培养基未加选择抑菌剂，使脆弱类杆菌为需氧菌掩盖的可能性更大。是否应加用其他选择培养基，如类杆菌胆汁七叶树苷庆大霉素培养基[4]，以便分离脆弱类杆菌是有考虑必要的。而IFA的阴性预示值较高（96.47～98.86%），说明IFA阴性更为可靠，与Will报告阴性预示值（75～92%）二种抗血清质量比较[6]，说明我们所用IFA抗血清的质量是不差的。

2．厌氧菌的IFA法

在国外间接法与直接法均有报告，并有直接法的商品匣出售，如Fluoretec F，M就可作脆弱类杆菌、产黑类杆菌的检出，也有质量控制的对比报告。国内目前尚无此等生物试剂出售，但上海，北京生物制品研究所均有羊抗兔免疫球蛋白荧光抗体出售，只要自制各种厌氧菌抗血清，即可供间接法应用，尤其各实验室可使用本地常见菌株制作抗血清。经我们使用三年来的远期观察，二法符合率在此三种厌氧菌在88.5～95.99%之间，特异性在89.59～97.20%之间，敏感性在44.4～76.09之间。Washington编著临床微生物学实验方法中[5]，已将脆弱类杆菌的IFA法列为常规检查法，这说明在标本直接涂片或菌株鉴定上都有使用价值。

在IFA特异性方面，有用已知菌株交叉染色，比较抗血清的质量[6]，我们在三年中发现非特异性荧光可出现于抗血清稀释度不高时，如染色效价为1/40或1/20，若用1/5时，则梭状芽胞杆菌与链球菌培养阳性的标本，也有交叉荧光，但这些非特异性荧光，可用稀释法或从形态学上与以上三种厌氧菌加以区别。

根据三年来的经验，自制抗血清4℃冰箱保存，染色效价自1/40降至1/20，敏感性与特异性稍有变化，但尚可使用。

3．二法总阳性率的比较

将三年来，我们所作厌氧菌培养法与IFA结果的阳性率比较，1982年培养法为10.7%（11/102），IFA为25.5%（26/102），$P<0.001$；1983年～1984年培养法为15.2%（57/374），IFA为20.85%（78/374），$P<0.05$，可见IFA的阳性率均高于培养法，说明IFA法可提高阳性检出率。

参考文献

1．王德旺，等。脆弱类杆菌、产黑类杆菌间接荧光抗体染色法与厌氧菌培养法的对比研究。中华微生物学和免疫学杂志 1984；4:(3)180

2．Wang Dewang, et al. Anaerobic infections of burns. Burns 1985; 11:192

3．Vechio TJ. Predictive value of single diagnostic test in unselected popula-

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tion. N Engl J Med 1966; 274:1171

4. Sutter, Citron & Finegold. Wadworth anaerobic bacteriology manual. 3rd ed. CV Mosby Company 1980; 28

5. Washington JA. Identification of anaerobic Gram-negative bacilli -Genus Bacteroides. Labratory procedures in clinical microbiology. Spingen-Verlag 198; 1340

6. Wills A, et al. Comparison on antisera in the fluorescent antibody test for detection of Bacteroides spp. in clinic specimens. J Clin Pathol 1982; 35:304

The Quality Control of Immunofluorescent Antibody Test and Anaerobic Culture in Study of Bacteroides and Fusobacterium

Wang Dewang, et al

(Burn Center, First Teaching Hospital, Third Military Medical College)

A comparative study between the indirect immunofluorescent antibody test and anaerobic culture in the study of Bacteroides fragilis, Bacteroides melaninogenicus, and Fusobacterium nucleatum in 374 clinical specimens was carried out. The data concerning the quality control of the two tests including the rate of correlation, the difference of the sensitivity and specificity, the predictive values, and the time of antiserum preservation were analyzed. It was found that immunofluorescent antibody test had a higher rate of detection than anaerobic culture. It can be cartain that if immunofluorescent antibody test is negtive, it is more likely that the anaerobic bacteria are abscent. The rate of correlation between the two tests was 88.5~95.99%. In addition, immunofluorescent antibody test can be used to verify the quality of anaerobic culture. It was found that our routine culture for B, fragilis was inperfect and waited for improvement.

Key words: Bacteroides & Fusobacterium; Anaerobic culture & IFA, Quality control.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net