

反向血凝用于“流脑”A群菌 带菌调查的实验探讨

湘潭市卫生防疫站 涂楚国

关于流脑A群菌反向血凝快速诊断的问题,近几年来国内外已有不少报导,从77年来我们经过了一次较全面的探讨和对流脑患者标本的多次检测,建立了一个特异性强、灵敏度高、重复性较好的流脑A群菌反向血凝的快速诊断方法。用于冬春季节的带菌调查,做了大量的标本考核,结果缩短了检测时间,节约了大批培养基,并及时地向流行病学工作提供了防治依据。

材料与方 法

一、材料:

1.缓冲液:

①0.11M pH7.2 PB; ②0.1M 乙酸缓冲液 pH5; ③0.1% APB, 1克牛血白蛋白溶解在1,000毫升0.11M PB缓冲液中。

2.双醛血球: 双醛血球的固定方法: 取新鲜人“O”血球加进含有等量的阿氏液的三角烧瓶中摇匀,置4°C 16~24小时,以10~20倍量的0.11M pH7.2 PB洗5次,每次以2000转/分离心20分钟,压积血球以上述PB配成8%血球悬液,滴加等量3%丙酮醛(PB稀释),在电磁搅拌器上搅拌4小时,此单醛血球以PB洗五次,再配成8%血球悬液,滴加等量3%甲醛搅拌17小时,双醛血球以PB洗3次,加防腐剂(含量为0.25%福尔马林)配成10%双醛血球悬液置4°C。

3.A群流脑提纯多糖抗原: 7710(流脑菌苗)PB稀释。

4.流脑A群抗血清: 武汉A791效价1:6400。

二、采样: 同时使用两支无菌棉试子,采鼻咽分泌物,一支接EPV平板做培养,另

一支浸在盛有0.5毫升溶液试管中,置56°C 30分钟灭活,试验时对倍稀释。

三、以双醛血球为载体致敏流脑A群抗血清的方法:

1.血球致敏方法:

①取10%双醛血球1毫升,离心去上清,然后用PB洗三次,积压血球用pH5醋酸缓冲液9毫升稀释。②抗体用醋酸缓冲液稀释成1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000各0.1毫升放66°C水浴激活30分钟。③经激活的稀释血清各管加入上述(1)稀释血球0.9毫升混匀放37°C 1小时,经常轻轻摇动,不使血球下沉。④离心一次测上清应为pH5左右,积压血球用PB洗2~3次,以0.1% APB配成0.75%的致敏血球。

2.滴板:

①测定排8×12孔“V”板,每孔用PB稀释的可溶性抗原 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} …… 10^{-11} 一滴(0.025毫升),然后加入敏化血球一滴,置37°C中30~60分钟看结果。

②对照排:

i、纵行末孔为PB+正常血球;
ii、抗原稀释液+正常血球;
iii、正常兔血清(灭活吸收方法同于A抗血清)+敏化血球。

3.抗体效价滴度结果: 见表1。

以上结果表明致敏抗体稀释度以1:400最合适,而高于或低于合适剂量的抗体蛋白致敏均使血凝的敏感下降。

四、流脑A群反向血凝特异性的测定:

1.特异性试验采用血凝抑制试验,在血凝板上 10^{-4} …… 10^{-11} 稀释抗原,按逐孔各滴加0.025毫升后,再逐孔滴加经过吸收后1:100

表1 以A群稀释抗血清与相应抗原凝集结果

| 致敏抗体稀释 | 可溶性A群抗原稀释度 | | | | | | | | | | | PB 对照 | |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------|---|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹¹ | | |
| 1:100 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| 1:200 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | ± |
| 1:400 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 1:800 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 1:1000 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 1:100兔血清对 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 照正常血清对照 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

正常兔血清0.025毫升各做一排。振荡一分钟 0.75% 1:400抗体敏化血球，振荡1分钟后置在37°C温箱中放置30分钟，然后再逐孔滴上述 37°C 1小时再观察结果。

表2 流脑A群反向血凝抑制试验结果

| 抑制血清种类 | 可溶性A群抗原稀释度 | | | | | | | | | | | PB 对照 | |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------|---|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹¹ | | |
| 1:100流脑A群抗血清 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:200流脑A群抗血清 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:400流脑A群抗血清 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 1:100正常兔血清 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |

从表2可见1:100和1:200流脑A群抗血清抑制后反向血凝即成阴性，为节省抗血清，我们选用1:200流脑A群抗血清做抑制试验，抑制试验证明“武A”791稀释成1:400抗体敏化血球做反向血凝，特异性和敏感性较为理想，选为正式试验用。

2.测定本试验与其它呼吸道病菌有否交叉反应。

我们收集了咽拭子培养出来的流脑A群菌与流脑B群菌，链球菌，葡萄球菌，卡他球菌，四联球菌，大肠杆菌稀释到一定同一浓度与流脑A群抗体致敏血球作凝集反应比较，结果其他呼吸道病菌不出现阳性凝集，仅在20份B群菌中有一份低滴度的交叉凝集反应。

五、正式试验:

1.每份标本在“V”板作两排，一排为测定排，一排为对照排，每孔滴入不同稀释浓度的标本。

2.测定排孔中各滴入一滴APB，对照排孔中各滴入一滴1:200(试验前用血球吸收)与被

检抗原群别相同的诊断血清，混匀置37°C30分钟。

3.各孔滴入一滴相应群别抗血清敏化血球，振荡，混匀后置37°C30~60分钟判断结果，以出现“卅”凝集的最高稀释度为反应滴度。

结 果

去冬今春，我们检测了本市5个区的学校及幼儿园的不同年龄组，共计采鼻咽分泌物2,045份，作反向血凝和流脑细菌培养对照，用A群反向血凝检出阳性120例，阳性率为总人数的5.86%。EPV培养76例，阳性率为总人数的3.71%。两种方法的结果比较如下表。

讨论与结语

1.对于在防治工作中用鼻咽分泌物作流脑传染源的依据，当前有不同的争论，就目前国内外调查资料来看，A群菌仍然是主要的流行菌群，因此了解本地区流脑流行菌群及其变动情况，对掌握流脑流行规律和发展趋势具

表3 2045份鼻咽分泌物两种方法检查的比较

| 反向血凝 | 培养 | 例数 | 百分率(%) |
|------|-------------|------|--------|
| + | + | 76 | 3.71 |
| + | - | 40 | 1.95 |
| - | + | 8 | 0.39 |
| - | B | 222 | 10.86 |
| + | B | 4 | 0.2 |
| - | 新群多 价 II | 4 | 0.2 |
| - | C | 1 | 0.05 |
| - | - | 1690 | 82.64 |
| 合 计 | | 2045 | 100 |

表4 流脑患者和非流脑患者血清反向血凝测定

| 标 本 | 例数 | 反向血凝 阳 性 | 反向血凝 阴 性 |
|----------|----|-------------|-------------|
| 确诊流脑 血 清 | 20 | 18(90%) | 2(10%) |
| 脑 脊 液 | 5 | 5 | |
| 非流脑 血 清 | 6 | | 6 |
| 脑 脊 液 | 1 | | 1 |

有重要意义。有人认为A群流脑带菌率高是构成流脑流行的主要因素。另一种意见则认为，健康带菌者增多已经是流行的现象，但我市不属流行区，经调查结果流脑的总阳性率为17.36%，以“B”群为主，A群培养为3.71%，B群为10.86%，其他群极少。A群由于用了反向

血凝检测出阳性率有所提高为5.86%。

2. 在2,045份鼻咽分泌物中共计检查出A群阳性120例，两种方法的比较(表3)，符合率63.3%，反向血凝阳性率比培养高于36.7%，培养是阳性而反向血凝是阴性的有8株，可能是由于采样用的2支棉拭子同时进入鼻咽部，不一定2支都能采到流脑A群病菌而形成的。A群反向血凝阳性(凝集滴度低1:2~1:4)而培养是B群的有4例，占总人数0.2%，其原因B群中存在有低滴度的A群交叉凝集，另一方面带菌者也可能同时有A群和B群菌存在，在培养挑菌落时忽视了A群或者由于其他杂菌太多的干扰而掩盖了A群菌所致。

3. A群反向血凝用于临床标本的检测，我们是采用进院病人及时采样，阳性率符合临床诊断，滴度在1:32以上，表4中已确诊为流脑患者有2例为阴性，经了解是由于进院已用了3天以上的药物治疗，所以检测临床流脑病人，应在用药之前采样或在发病3天以内采样，刚发病采样更好。

(该法在摸索、考核及实验探讨中承中国医学科学院流行病学微生物学研究所胡真、范明远、胡绪敬大夫的热心帮助指导，特此致谢)

爆发型伤寒一例报告

郑州市郊区卫生防疫站 张景星

80年2月6日本市郊区毕河村发生一例爆发型伤寒，因抢救无效死亡。为了探索病因，我们对该村及病者家族进行了流行病学调查。该村78年发生两例伤寒病人，与患者有接触史。其父患胃癌而死，母亲和兄弟健在。患者75年患有肾炎治愈，79年患胆囊炎曾用庆大霉素和阿托品，当时病症与这次发病的症状相同，分析原因可能患者是一伤寒带菌者，病菌寄生于胆囊，并生长繁殖致胆囊炎，造成肝功受损，大量病菌及毒素随胆汁反流入而成急性毒血症，引起全身中

毒症状，以致发病后40小时出现休克，由于抢救过程中未能仔细分析休克的原因，又忽视了伤寒的体征，如持续高烧、肝大、皮疹、神志淡漠以至谵妄、昏迷、进尔并发败血症休克。另外白血球总数暂时增高(32000/立方毫米)，中性减少(58.0%)，酸性消失，单核增多(7%)，也符合伤寒血象。而且培养检出了伤寒菌(病死后七天报告)，由于没能针对病因治疗，所以症状有进无退，终因毒血症所致的败血症休克合并全身中毒和循环衰竭而死亡。