

用冻干致敏血球间接血凝法诊断伤寒的研究

刘华实¹ 苏瑞云¹ 杨赞元¹ 林敏西² 桂希恩³

肥达氏反应已应用近90年,目前仍为国内广泛使用的方法,其阳性反应大多出现在第二周以后,第三、四周阳性检出率最高;但有少数病人其凝集效价始终不高,部分患者始终为阴性^[1]。朴昌国^[2](1980)报告应用间接血凝试验诊断伤寒,谓敏感性比肥达氏反应高2倍以上。就此,我们自1981年3月起,对181名健康人,26名伤寒预防接种者、80例非伤寒患者及121例伤寒患者,同时进行微量间接血凝试验和肥达氏反应的比较研究,效果满意。

材料与方法

一、“O”抗原的提取:伤寒杆菌O₉₀₁株(系湖南医学院微生物学教研组保存菌种),接种于普通肉汤培养基,置37℃温箱孵育6小时后,转种于普通肉汤琼脂平板,置37℃温箱18~24小时,挑取边缘整齐光滑集落接种于普通斜面琼脂培养基,传代2次;再经生化试验性状典型,与O₉因子血清凝集,与Vi和H:d因子血清不凝集,然后转种于普通琼脂克氏烧瓶内,37℃培养18小时,加入生理盐水6毫升制成菌液,并滴入等量的0.075N NaOH溶液,边加边摇,使其作用均匀(加入NaOH后的菌液立刻呈略透明具有粘稠性)。再加入4倍量的无水乙醇,摇匀,置4℃冰箱过夜。第二天摇匀后用3,000转/分离心沉淀30分钟,弃上清,加入原量的生理盐水6毫升,使沉淀物溶解,置室温1小时;再以3,000转/分离心沉淀30分钟,取上清即为提取的伤寒“O”抗原。

二、致敏步骤:

1.戊二醛固定人“O”型红细胞,按我们制备冻干血吸虫病诊断血球方法制备^[3]。

2.以醛化血球一份(用pH7.2 PBS配成2%红细胞悬液)与等容积的最适量O抗原(1:25~1:50)混合。

3.37℃水浴1小时(不断摇动),2,000转/分离心10分钟。

4.弃上清,生理盐水反复洗涤3次,最后用含1%正常兔血清的PBS(pH7.2 PBS配制)洗涤一次。

5.加入保护剂(10%蔗糖及1~2%灭能的兔血清用pH7.2 PBS配制),配成4%的血球悬液,经效价测定合格后,以每安瓿0.5毫升分装,冷冻干燥封口,4℃冰箱保存备用。

三、试验方法:

1.间接血凝试验(IHA):①安瓿内加入蒸馏水2毫升(使混悬血球浓度为1%),待血球完全融化后,即可使用。②取毛细吸管,吸取无菌生理盐水4滴(25微升/滴)滴入锥形微量血凝反应板的第一孔内,以下每孔一滴;③待检血清1滴(相当于25微升)加入第一孔中,混匀后弃去3滴,余下1滴加入第二孔,混匀后吸出1滴加入第三孔内,余此类推,最后一孔混匀后弃去1滴。此时血清稀释度依次为1:5、1:10...1:640;④用同一毛细吸管吸取致敏血球悬液于每孔中各加1滴(25微升),立即旋转振摇反应板2分钟,静置室温30分钟后观察结果。⑤每次试验均同时加阳性血清及盐水作对照;⑥结果判断:阴性反应即红细胞全部下沉在孔底,形成一周围整齐清晰的圆点,状如

1 中国人民解放军第163医院

2 湖南医学院第一附属医院

3 湖北医学院第二附属医院

小纽扣。阳性反应：强阳性卅~卅卅：红细胞呈明显的颗粒凝集。弱阳性十~++：孔底可见明显的红团块，且红团周围有一部分血球被凝集。

2. 肥达氏反应：按常规方法(抗原系武汉生物制品研究所产品，批号821-8)。

四、被检血清：121例伤寒患者血清(湖南医学院、武汉医学院、湖北医学院、武汉市传染病院提供)。伤寒菌苗接种者26人(解放军战士)。非伤寒患者血清80人(湖南医学院提供)。健康人群血清181人(工人和解放军战士)。

结果与讨论

一、抗原最适浓度的测定：“O”抗原提取后，采用方阵法，将抗原用0.01M pH7.2

PBS配成1:25、1:50、1:100及1:200四种浓度，然后分别致敏于戊二醛化的红细胞，再与伤寒诊断血清作间接血凝反应。我们测得的结果以1:25的抗原浓度效果最佳。

二、血球浓度的比较：将1:25抗原致敏血球分别配成0.5%、1%、1.5%、2%四种血球浓度，分别与伤寒诊断血清、伤寒患者血清及正常人血清行间接血凝试验，结果以1%血球浓度效价高且终点清晰。

三、血清灭能与不灭能的比较：共计比较17份血清，灭能与不灭能结果基本相同。

四、健康人检测结果：181名健康人血凝效价均<1:80，仅2.21%达1:40，几何平均滴度为2.523。

五、伤寒菌苗预防注射前后血凝滴度观察：见表1。

表 1 伤寒菌苗注射前后间接血凝试验滴度变化

时 间	IHA滴度(1:)					160	阴性	合计	几何平均滴 度
	5	10	20	40	80				
注射前	4						22	26	1.28
注射后 1个月	1	3	1	3	15	2	1	26	44.15
2个月	10	6	4	1	0		5	26	5.284
3个月	4	8	1				13	26	2.919

预防注射伤寒菌苗一个月后，体内“O”抗体较注射前明显升高(t=3.0871, P<0.01)。注射后3个月“O”抗体血凝滴度恢复正常人水平(t=0.5632, P>0.5)。

六、伤寒患者间接血凝试验与肥达氏反应结果比较：见表2。

表 2 121例伤寒病患者间接血凝试验与肥达氏反应阳性比较

方 法	阳性人数	阳性(%)
间接血凝试验	119	98.35
肥达氏反应		
TH	87	71.9
TO	96	79.34

从表2可以看出，间接血凝试验阳性检出率远较肥达氏反应高。其中51例病原菌培养阳

性伤寒病患者间接血凝和肥达氏反应的阳性符合率分别为94.12%(48/51)及68.63%(35/51)，(TO)有非常显著的差异($\chi^2=12.0761$, P<0.001)。

七、非伤寒病患者间接血凝试验与肥达氏反应结果：80例非伤寒病患者间接血凝试验有4例阳性，假阳性率为5%(4/80)；肥达氏反应则有33例阳性，假阳性率为29.9%(23/80)，两者有非常显著差异($\chi^2=16.0847$, P<0.001)。

间接血凝试验能测出每毫升血清中0.001毫微克抗体^[4]，而肥达氏反应属于凝集试验，它只能测出每毫升血清中0.1毫微克抗体，因而其敏感度较间接血凝试验低约100倍。伤寒早期抗体升高是IgM^[5]，而间接血凝试验法系检测IgM，故有早期诊断的价值。从我们对121

例伤寒病患者检测结果看，间接血凝试验的阳性检出率明显高于肥达氏反应，其敏感性也远较肥达氏反应强。

为了尽可能排除假阳性，我们认为判断阳性的标准以 $\geq 1:80$ 为宜。但血凝滴度在 $1:40$ 出现阳性时，应继续观察血凝滴度是否升高，以免漏诊。

摘 要

作者应用间接血凝试验诊断伤寒，经过3年多的调查研究，证实该法具有微量、快速、敏感性高、特异性强等优点，并有早期诊断价值。检测121例伤寒患者血清，阳性检出率高达98.35% (119/121)，而肥达氏反应阳性检出率仅为79.34% (TO)。血球致敏冻干后，冰箱保存有效期可达一年以上，携带外出和邮寄，均无需冷藏，为推广应用提供了方便条件。

ABSTRACT

We sensitized human O red blood cell by an extract antigen O from *Sal. typhi* strain O₀₀₁. The sensitized RBC was then freeze-dried in protective medium. A survey of 181 healthy normal persons by indirect hemagglutination for typhoid O antibody showed a result presenting 114 negative and the remainder $1:5 \sim 1:40$. Therefore, the titre $1:80$ is deno-

ted to be a starting point of positive.

Examination of 26 soldiers in a vaccine process revealed only 4 (1:5) positive before vaccination and all became positive 1 month after vaccination. The serum titre reduced 2 months later and returned to normal in 3 months.

121 cases of typhoid fever were studied and their serum hemagglutination test showed a high percentage of positive, 98.35% (119/121 cases). Meanwhile the widel test showed 79.34% positive (T.O.).

The indirect hemagglutination test had been put into practice for 3 years. It has the advantages such as simple, rapid, minute amount, sensitive, specific and good for early diagnosis. An expiration date is provided for the lyophilized RBC as one year in cold.

参 考 文 献

1. 王季午主编：传染病学第二版，p88，上海科学技术出版社，上海，1979
2. 朴昌国等：流行病学杂志，1(3):167, 1980
3. 杨赞元：应用致敏冻干血球作间接血凝试验对诊断血吸虫病的研究，内部资料，1980
4. 宗庭益：安徽医学院学报，16(3):76, 1981
5. 汪美先：免疫学基础，第69页，陕西科学技术出版社，1979

(本试验由湖南医学院第一附属医院、第二附属医院、武汉医学院第一附属医院、武汉市传染病院等单位提供血清，特此致谢)

大型厌氧菌培养箱研制成功

大型厌氧菌培养箱(又称手套箱)是培养菌的大型精密仪器。它能使厌氧菌培养的一系列步骤全部都在严格的无氧环境中进行，避免某些厌氧菌可能在操作过程中接触氧而死亡，从而能更多更快地培养出它们，为工农医及其它科研服务。该箱在国外六十年代后期已出现，国内尚无产品。少数单位由于科研需要进口该箱，需申请1万美元以上的外汇，购得后等待万里运输。由于零件的缺乏，安装不及时或途中损坏等，常需等待多日无法使用。因此许多人提出：“我们自己造一架！”但该箱的技术和材料要求很高，敢不敢做、能不能做，是我们面临的两个挑战。我曾在1984年1月份写信给上海医疗器械研究所，他们见后，表示愿意与我们合作，但他们一年的任务已满，愿将我们介绍给上海跃进医疗器械一厂，与他们合作。

从此，签合同，进行广泛的调研，包括到北京等

地进行少数进口样机的考察，文献查阅，提出设计原理和技术要求，反复讨论，机样做出后又反复修改，最后定型，共花一年七个月的时间。其全部机械性能经上海医疗研究所进行全性能测试，完全符合设计要求。其生物学性能由上医厌氧菌组用厌氧菌纯菌种和临床标本经半年反复试验并与目前常规的厌氧缸法比较，发现其确能提高厌氧菌的培养速度与检出率。该箱最重要的特点是它的独创性，不但有进口样机所没有的部件，能增加安全性与实用性，而且能结合我国的具体条件进行设计，避免了进口样机由于不符合我国实际情况而出现的种种弊端。此外，与进口样机相比，还有价格低廉(价格仅国外的 $1/5 \sim 1/4$)，不用外汇、节省运费和维修方便等特点，受到与会专家的一致赞扬，顺利通过鉴定。

(上海第一医学院 陈聪敏 供稿)