

应用染色菌液微量法测百日咳抗体

邓化芳¹ 马尔瞻² 刘晓晖¹ 李 军¹ 星 炎¹

由于百日咳抗体的微量测定法在国内尚未见报道，而国外百日咳抗体的微量测定方法，如Maixnerova(1972)和Manclark(1976, 1981)的凝集方法^[1,2]，血清用量仍较大(0.05~0.1毫升)，且因细菌未染色，要借助放大镜判结果。我们参考郝庆功介绍的“微量简便的肥达氏反应法”^[3]，在百日咳凝集试验方面进行了摸索，采用细菌染色法，肉眼很易判定结果。

材 料

一、百日咳菌液：武汉生物制品研究所提供固体培养菌液，按国家比浊标准测定浓度。

二、百日咳杆菌I相诊断血清：卫生部药品生物制品检定所供应，批号84-7，效价12800×。

三、血清标本来源：湘潭、承德、嘉兴地区百白破三联免前和免后血清及成人体检血清。

四、其它：次甲基兰(0.2%水溶液)、U型微量血凝板(8×12孔)、微量振荡器、定量滴管(每滴0.025毫升)、定量稀释管、微量进样器、吸管(0.1、1、10毫升)等。

方 法

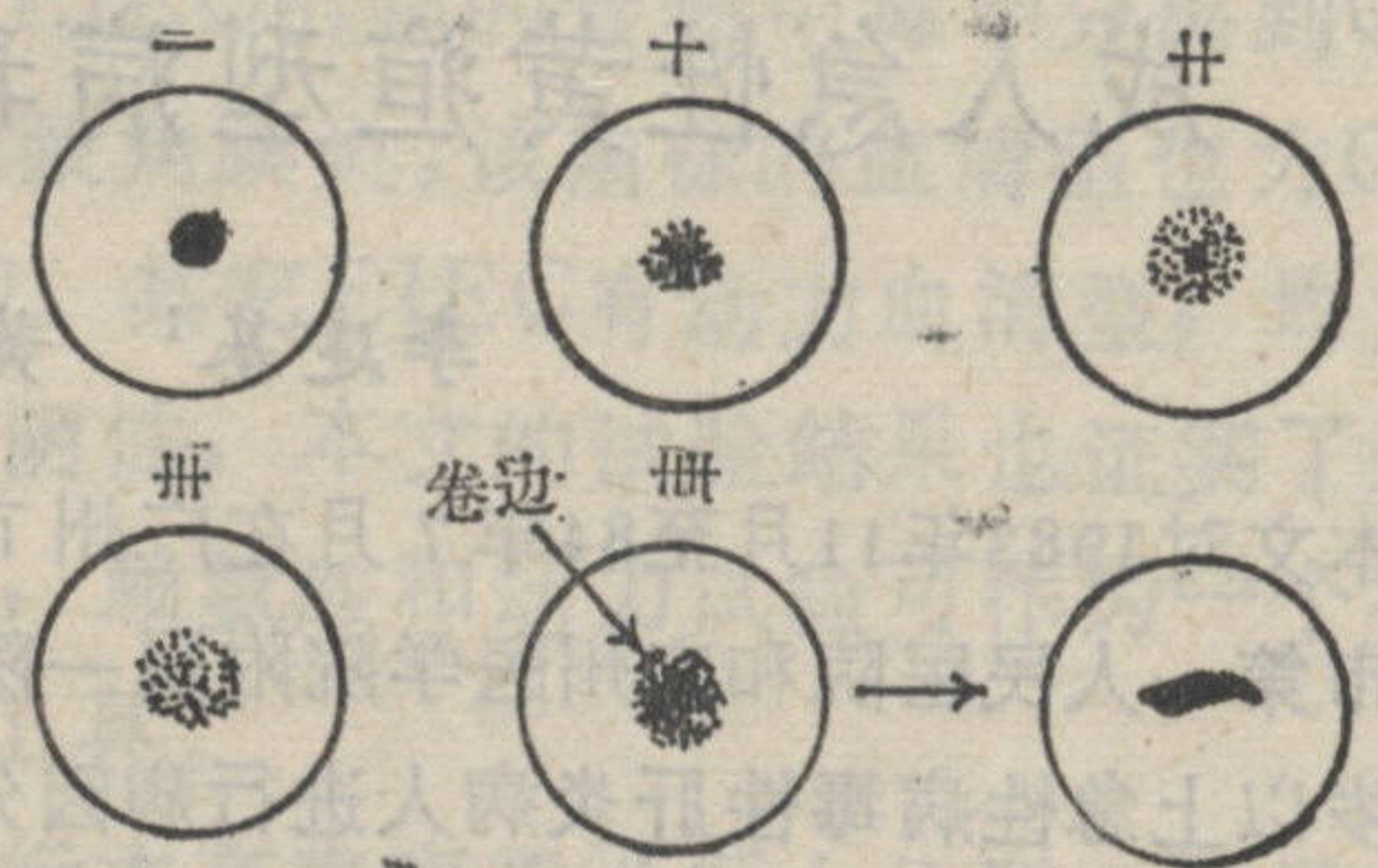
一、方法：配制每毫升40亿百日咳菌液(在以后的试验中发现每毫升30亿较每毫升40亿敏感)，并按菌液2毫升加染液0.1毫升使之着色。

用定量滴管于板内第一孔加盐水4滴，以后每孔一滴。取血清0.025(或0.01)毫升，从1:5起倍比稀释后，每孔加入等量百日咳菌液，旋转式摇动2~3分钟或微量振荡器振动1~2分

钟，加盖；放37℃过夜，次日室温放2小时判结果(血凝板底部垫以白纸)。

二、设对照：本试验与试管法平行操作，并设标准阳性血清、阴性人血清、菌液+染液、血清+染液、菌液+盐水等对照。

三、结果判断标准：见附图。



- 注：- 蓝色颗粒集中一点，色深
- + 大部分蓝色颗粒沉积于孔底形成一小圆点，边缘模糊，四周有微量凝集，色较淡(与阴性结果作比较)
- ++ 凝集的蓝色颗粒均匀铺于孔底，但中心有不太明显的蓝色点
- # 基本同上，孔底中心无集中之蓝色颗粒
- # 蓝色颗粒片状凝集，周边可有卷边或继而形成不规则的小凝团

结 果

血凝板微量法与常规试管法用同一份血清经两人平行操作，且重复做两次；其三次比较试验结果见附表。经24批比较，两者符合率为95%，各种对照组均成立。

标准血清原效价为1:12800×，用血凝板微量法两次检测得相同效价。将伤寒“O”菌液代替百日咳菌液再检测，则未见凝集现象。用效价为1:32的健康成人血清重复此试验得相同结果。另再将此成人血清加百日咳浓菌液，放37℃结合过夜，沉淀，取上清与未经上述处

1 卫生部武汉生物制品研究所
2 卫生部长春生物制品研究所

附表 染色菌液微量血凝板法与常规试管法比较

试验次数	方 法	血清份数	百日咳凝集终点效价		符合率 (%)
			一致	不一致	
一	血凝板试管	14	14	-	95.83
二	血凝板试管	5	5	-	95.83
三	血凝板试管	5	4	1*	95.83
合 计		24	23	1	95.83

注：*血凝板微量法较试管法高一个稀释度。在每次试验同时设下列对照：

- 1.血清对照：百日咳杆菌I相诊断血清，阴性人血清
- 2.菌液对照：菌液+盐水，菌液+染液
- 3.染液对照：染液+菌液，染液+血清

以上对照组除标准阳性血清凝集效价为12800×外，其余对照组均未见凝集现象

理的此成人血清同时检测，则血清效价由1:32降为1:2，以上试验说明百日咳阳性血清只能和相应的菌液发生凝集反应，其效价的下降是因被百日咳菌液吸收所致。

讨 论

由于血凝板微量法待检血清量少，操作过程中稍有疏忽则易造成误差，因此，除要求工作细致，血凝板处理、判定结果标准一致外，我们对菌液浓度、染料、37℃结合不同时间等进行了探索。

一、百日咳菌液使用浓度选择：比试结果，每毫升20亿以下和每毫升50亿以上不宜用于微量法。经中南区计划免疫监测班检测51份血清，比较每毫升30亿和每毫升40亿菌液浓度，两者凝集效价一致者占29.4%，每毫升30亿较每毫升40亿凝集效价高一个稀释度占70.6%，故确定使用浓度以每毫升30亿为宜。

二、染料的选择：对此我们注意到3点，首先染液本身不会使百日咳菌产生自凝。其次不影响抗原抗体反应（将不同配方的染液分别使菌液着色，检测同一份标准血清）。此外操作后血凝板容易冲洗干净。

三、37℃结合不同时间对百日咳凝集效价的影响：在其他条件不变的情况下，将37℃结合时间缩短为2、4、6小时。另一组与试管法一致。经28批血清样品比试结果，与试管法符合率分别为54%、61%、78%、95%。说明37℃结合时间不宜缩短。

因而我们认为染色菌液微量血凝板法较试管法用量少、结果易判断、重复性好和简便易行。

摘 要

本文介绍用染色菌液微量法与常规试管法比较检测百日咳抗体，得到相同的滴度，显示出微量法有如下优点：①仅需用少量待检血清（0.025或0.01毫升）便可检测百日咳抗体，解决了白百破制剂免疫监测中血清量不足的问题；②百日咳菌液经染色后结果较试管法容易判断；③此法重复性好；④简便易行，节约人力物力与时间。

The Microtiter Agglutination Test for Detection of Pertussis Antibody by Using Stained Bacterial Suspension Deng HuaFang, et al. Wuhan Institute of Biological Products Ministry of Public Health, Wuhan

This paper described a microtechnique for determination of pertussis agglutinin. Comparison of microtechnique with tube agglutination method, identical titres were obtained. This microtechnique showed many advantages, it required only a small amount of test serum (0.025 or 0.01ml). Bacterial suspension was stained with methylene blue, which ensured that read the titres easily. This method was reproducible well and it could be processed, large numbers of samples with minimum requirements on glassware and material, time and labour were saved. These suggested that the improved microtechnique could be used as a tool for epidemiological, immunological surveillance of whooping cough.

参 考 文 献

1. Maixnerova M, et al. Surveillance of whooping cough in Czechoslovakia. A Method of Microtitration of Antibodies to B. Pertussis by Means of Three Type Antigens. J Hyg Epid Microbiol Immunol 1972, 16(4):457.
2. Manclark CR. Serological Response to Bordetella

Pertussis, In, Manual of Clinical Immunology, Amer. Soc. Microbial, 1976; chapter 41:312~314 and In; Manual of Clinical Immunology. ed2. 1980:

Chapter 41:496~499.

3. 郝庆功. 一种微量简便的肥达氏反应方法. 中华流行病学杂志 1983;4(6):362.

苯甲酸指示管监测高压蒸气灭菌器效果的研究

哈尔滨市卫生防疫站

阎力军 王季任 刘卫翌 王德全* 鲁桂根* 燕平*

判定高压灭菌器的灭菌效果,过去我国主要用硫磺法监测,但由于其熔点低于高压灭菌需要的温度(仅111.3~119°C),不宜采用。为探索新的、效果好、简便易行的对高压灭菌器灭菌效果的监测方法,我们根据苯甲酸的特性,试制了苯甲酸监测管,试验证明,效果满意。

现将本指示管的试制与应用,报告如下:

材料来源:苯甲酸系绥化市化学试剂厂生产(分析纯);指示剂(伊红)由上海化学试剂厂生产;硫磺粉(升华硫);菌片,每片分别含蜡样杆菌芽胞(10^6 /片)、大肠杆菌(10^5 /片)。

监测管制作方法:取细玻璃管直径0.3cm,长3cm洗净烘干,一端封口后,取苯甲酸按0.1、0.2、0.3、0.4%比例加入色素,混匀,以每管0.25g分装封口备用。再用纯品苯甲酸,称取0.1、0.2、0.3、0.4g制成不同量不加指示剂的苯甲酸管备用;称取0.25g硫磺于玻璃管内制成硫磺测试管。

试验内容与方法:①对纯品苯甲酸熔点测试及加入不同量指示剂,加热后观察温度对苯甲酸熔点的影响:将含有指示剂与不含有指示剂各种苯甲酸管经加温至120、121、123°C时观察其熔解后变色状态。②观察苯甲酸管不同药量对熔点的影响:将不同含量的苯甲酸管,经加温后观察熔解状况。③苯甲酸管与硫磺管应用比较:将苯甲酸管与硫磺管同置于灭菌器的相同位置,经不同温度灭菌后取出,记录各管熔化情况。④在医院现场实际应用观察:将试制的苯甲酸管与菌片同时应用。

试验结果:经测试苯甲酸熔点为121°C,而硫磺熔点为110°C。当指示剂比例1%以内制成的苯甲酸管在加热至121°C以上时可100%熔化,其熔解温度与不加指示剂苯甲酸熔解温度一致,但加指示剂量大

于2%时,温度至120°C即熔化,比纯品熔解度低1°C。硫磺管与苯甲酸管同置于高压灭菌器内,温度达到113°C硫磺即熔化,而苯甲酸管则在温度达到121°C以上才能熔化。经在医疗单位的高压灭菌器,与菌片同时投放试用结果,凡灭菌温度达到121°C以上,维持30分钟,苯甲酸管均100%熔化,投放的菌片经培养均无菌生长,而温度未达到时均不熔化。医院应用中认为,该监测管使用方法简便、易于掌握、便于推广应用,效果可靠,以此方法又可及时发现灭菌器出现的温度失调,及时维修,以保证医疗器械的灭菌效果。

苯甲酸管在我市推广应用情况:为我市各级医院高压灭菌器的监测提供有效方法,目前除我市各医疗单位近500余高压灭菌器常规监测应用外,经推荐,佳木斯、牡丹江、齐齐哈尔及大庆等市各医疗单位也广泛采用,并认为这是行之有效的监测方法。

讨论与小结:随着消毒工作的进展,对高压蒸气灭菌器的效果监测方法也不断改进,快速简便的化学测试法仍是目前研究监测高压灭菌器的重要课题,为消毒工作者所重视。近年来,国外有关用化学法测试灭菌器方法很多,本试验结果表明,苯甲酸指示管用于测试高压灭菌器的可靠性优于硫磺试剂,这与顾德鸿教授调查30所医院后认为用硫磺判定高压灭菌效果是不可靠的结论是一致的。

将小管随灭菌物品放于灭菌器内,灭菌后取出观察熔解变色情况。也可放于被灭菌物品包装内或灭菌温度难达到的地方。

该监测管缺点是只能以苯甲酸熔点监测高压灭菌的温度效果,而不能判定高压灭菌的维持时间,有待今后研究改进。

* 哈医大实习生