应用炭凝集试验测定血清中伤寒凝集素

贵州省安顺地区卫生防疫站　肖黔林

炭凝集试验（以下简称炭凝）具有操作简便、敏感性及特异性良好，获得结果迅速等优点。我们试用炭凝测定血清中伤寒凝集素，并与肥达氏反应相比较，结果较满意。现简介如下：

材料和方法

一、材料：

1.菌株：伤寒杆菌O_{901}株。

2.活性炭：上海化学纯活性炭，新中国化学厂出品。

3.CSF-IA超声波清洗机：上海超声波仪器厂出品，最大输出功率250瓦。

4.血清来源：收集我区安顺市、安顺县、镇宁县、关岭县健康人，地区医院及安顺市收容所疑似伤寒病人、"肝炎"病人血清共444份。

5.缓冲生理盐水：pH7.2，卫生部生物制品研究所出品。

6.正常兔血清：56°C30分钟灭活。

7.肥达氏抗原：成都生物制品研究所出品，批号810303。

二、方法：

1.伤寒杆菌"O"抗原提取物的制备[1]：伤寒杆菌O_{901}株在普通琼脂培养基上传代，经生化鉴定性状典型，与O_9因子血清凝集，与Vi和Hd因子血清不凝集。接种在含有葡萄糖、磷酸盐及酵母浸膏的琼脂斜面上，37°C培养24小时，加入2 ml生理盐水作成浓厚菌悬液，逐滴加入等量的0.075N氢氧化钠溶液，使作用均匀，再加入4倍量的无水乙醇，混匀，放4°C冰箱过夜，取出后以每分钟3000转离心30分钟，弃上清，沉淀物用生理盐水溶解，静置室温一小时，再3000转/分离心30分钟，弃沉淀。上清液再以无水乙醇重复提取一次，其沉淀用生理盐水溶解即为伤寒杆菌"O"抗原粗提取物。

2.炭抗原的制作：仿照鲍行豪等钩端螺旋体炭抗原制备方法[2]。活性炭先仔细研磨，过200目或180目分样筛，用前100°C烘烤6～8小时。取"O"提取物溶液4 ml，加活性炭约0.2克，于20°C左右室温条件下，在超声波清洗槽中隔水作用15～30分钟，取出，以每分3000转离心5分钟(上清①保存，作炭抗原回收用)，沉淀炭粒加5滴(约0.25ml)56°C灭活正常兔血清，用吸管反复吹吸混匀，使炭粒分散，再加1%正常兔血清缓冲盐水5～10ml，混匀，以每分钟500转离心2分钟(沉淀粗炭粒保存)，吸取上层液(含较细炭粒)于另一试管中，继以每分钟3000转离心10分钟(上清②保存)，沉淀细炭粒加2～4 ml 2%正常兔血清缓冲生理盐水使炭粒悬浮，加1%硫柳汞1～2滴即成炭抗原。

3.炭抗原的回收参照文献[2]进行。

4.伤寒杆菌"O"抗原提取物制备炭抗原的质量鉴定：取沙门氏菌因子血清O_{-9}，用1%正常兔血清缓冲生理盐水在有机玻璃凹孔板内作倍量稀释，取各稀释度血清一滴于清洁漆圈玻璃板上，最后一滴加1%正常兔血清缓冲盐水作对照，每滴血清中各加炭抗原一小滴，(炭抗原加入量以混匀后呈深灰色为宜)。用火柴梗自对照、高稀释度孔起依次轻轻研磨混匀，并充分摇动玻璃板至见不到炭粒沉淀，放湿盒中，置室温(18°C以上)一小时，取出倾斜玻璃板，在日光灯或强光白色背景上观察结果。在O_{-9}因子血清稀释至1：80滴度出现卄凝集为合格（例如滴度为1：2560的因子血

清稀释32倍能出现＋＋凝集)。

5.炭凝试验方法：在漆圈玻璃板上进行，方法与炭抗原质量鉴定同。

6.肥达氏试验：按常规操作方法减为半量进行。

结果与讨论

采取的病人、疑似病人、健康人及“肝炎”病人血清，同时进行炭凝和肥达氏试验。结果见表1。

表1 炭凝与肥达氏反应结果比较

血清来源	检查数	炭凝		肥达氏反应			
		阳性数	%	O阳性数	%	H阳性数	%
疑似患者	118	85	72.0①	63	53.4②	67	56.8③
病原分离阳性患者	36	36	100.0④	21	58.3⑤	27	75.0⑥
健康人	258	39	15.1	3	1.2	3	1.2
“肝炎”患者	32	1	3.1	0	0	0	0

①② $\chi^2=8.77$ $P<0.01$ ①③ $\chi^2=5.98$ $P<0.05$ ④⑤ $P<0.01$ ④⑥ $P<0.01$

从表1结果可看出，疑似伤寒患者血清炭凝效价在血清稀释1：8以上“++”判为阳性，阳性率为72％，肥达氏反应O凝集价在1：80以上阳性率为53.4％；H凝集价在1：160以上其阳性率为56.8％。经细菌学培养证实为伤寒病患者的36份血清炭凝全部为阳性，而肥达氏反应O及H阳性率分别为58.3％和75％。经数理统计处理，二者有非常显著差异。

健康人组及“肝炎”组血清炭凝阳性率均高于肥达氏反应，其原因：①两种试验方法敏感性不同；②当地伤寒发病率较高，人群存在隐性感染的可能[3]；③群众经常用中草药治疗疾病，而某些中草药可能存在微生物抗原，能使机体产生抗伤寒杆菌菌体抗体[4]；④其它原因引起的非特异性反应或假阳性反应。

健康人组肥达氏反应O及H项各有三人为阳性，其中一人O与H均为阳性，炭凝亦阳性；O单项阳性二人，其中一人炭凝阴性(O为1：80，炭凝为1：8＋，处于阴性和阳性之间)；H单项阳性二人，其中一人炭凝阳性。有资料报道[3,5]经细菌学培养证实为伤寒病患者的恢复期血清，肥达氏反应O为阴性而H呈阳性反应。上述健康人出现的阳性结果，多为隐性感染所致。

如若血清中伤寒凝集素含量较高时，炭凝往往数分钟即可出现阳性结果。为不至遗漏血清中凝集素含量较低者，观察时间延迟至一小时，则结果已趋于稳定。根据所作炭凝试验，以血清稀释1：8时能出现“++”凝集判为阳性最为适宜，其可信限达99％。

36份培养阳性患者血清炭凝与肥达氏反应阳性率比较，见表2：

表2 36份伤寒杆菌分离阳性患者炭凝与肥达氏反应阳性率比较

试验项目	总数	阳性数	阳性％	阴性数	阴性％
炭凝	36	36	100.0	0	0
肥达氏反应	36	28	77.8	8	22.2

36例确诊病人均在取血培养时，留取少量血清同时作炭凝与肥达氏反应，结果显示炭凝阳性率明显高于肥达氏反应($P<0.01$)，结合表1更可看出炭凝检测病人血清中早期产生的“O”抗体较肥达氏反应敏感。

将炭抗原与痢疾志贺氏多价血清、钩端螺旋体诊断血清黄疸出血群、波摩那群做炭凝试验，结果均不出现凝集现象，说明炭抗原具有良好的特异性。

摘　要

1.用活性炭吸附伤寒杆菌“O”提取物制备炭抗原，与118例疑似伤寒患者和36例经细菌学培养证实为伤寒病患者的血清作炭凝试验，其阳性率分别为

72%和100%；肥达氏反应阳性率分别为62.7%和77.8%。

2.炭凝试验操作简便，易于掌握，不受设备和条件限制，所得结果迅速，适宜基层使用。

ABSTRACT

The O-antigen was extracted from Sal.Typhi and adsorbed by activated carbon as carbon-antigen. The agglutination test was carried out with such an antigen to examine 154 samples of sera, including 118 from suspected cases. The remaining 36 samples were from bacteriologically confirmed typhoid patients. The positive rates were 72% and 100% respectively, while the Widal positive reaction gave only 62.7% and 77.8%. Not only is the charcoal agglutination test easily manipulated but also time-saving. Thus it can be widely adopted by primary health centers.

参 考 文 献

1.朴昌国等：流行病学杂志，1（3）：167，1980。
2.鲍行豪等：微生物学报，14（2）：203，1974。
3.王仲琪：安顺地区伤寒流行特点及当前防治对策的初步探讨，内部资料，1981。
4.汪秀明：中华医学杂志，58（4）：233，1978。
5.沈耕荣译：国外医学参考资料流行病学、传染病学分册，5（1）：39，1978。

（李湖录、刘大西、刘海芬、王仲琪、吴 魏、汪俭碧等同志协助此项工作，谨致谢意）。

用ELISA法检测钩体病患者血清中IgM抗体的阴性界限

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所　侯林浦* 郭长生 王枢群

采用16份钩体病早期患者血清（发病1～10日内采血)、24份恢复期钩体病人（发病11～39日后采血）及103份非钩体病人（即健康人）血清作阴性对照，用ELISA法测定血清中IgM抗体，比较了四种不同的判定阳性标准：①OD≥2.1×阴性标本平均值，阴性上限为0.36；②OD≥阴性标本中最高值，阴性上限为0.32；③OD≥阴性标本平均值＋2SD，阴性上限为0.31；④OD≥阴性标本平均值＋3SD，阴性上限为0.39。检查结果表明，四种方法无论是检出率还是假阳性均无明显差异。

我们认为从一批已证明为阴性ELISA反应的标本中取其中最高OD值作阴性上限是不易做到的，因与所选标本的地区、性质和数量有关。如选一组阴性标本的OD平均值加二个SD作阴性上限，检出率略高但假阳性可能存在。故我们认为采用一组阴性标本的OD平均值并以此为基础加上三个SD或用ELISA的阳性/阴性比率大于2.1的OD值作为阴性上限，高于此值的定为阳性，这样判定结果比较合适。

* 已调中日友好医院。

快速鉴定斑疹伤寒立克次体的实验研究

济南军区军事医学研究所　林台城 邢念义 孙长柱

斑疹伤寒立克次体的鉴定一般采用颗粒性抗原作补体结合试验，亦可应用毒素中和试验作为组内立克次体种别的鉴定。这些方法的操作比较复杂。本文介绍简便的SPA协同凝集试验快速鉴定斑疹伤寒立克次体的实验研究结果。所用抗体为流行性（和地方性）斑疹伤寒诊断血清，所用抗原为流行性（和地方性）斑疹伤寒诊断抗原。均为兰州生物制品研究所产品。用0.2毫升诊断血清致敏1毫升金黄色葡萄球菌Cowan Ⅰ菌株18小时培养的菌悬液（菌浓度10%）即成斑疹伤寒立克次体的鉴定试剂。然后将此鉴定试剂稀释液（菌浓度2%）与待鉴定的抗原作协同玻片凝集试验，并用诊断血清直接与待鉴定的抗原作普通玻片凝集，以比较两法的检测敏感度。结果表明，在普通玻片凝集试验中立克次体不能与相应抗体形成肉眼可见的集凝颗粒，而在协同玻片凝集试验中可形成清晰可见的凝集颗粒，检测敏感度为1～2×10^8颗粒/毫升。因此，SPA协同玻片凝集试验可用于鉴定斑疹伤寒立克次体。