

钩端螺旋体不完全抗体检查法的建立和应用

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

张荣珍 王宏英

许多报告证明^[5~7], 不完全抗体不仅比19S抗体多, 且在机体内持续时间长, 甚至有的个体只产生不完全抗体。近年来, 布鲁氏菌血凝不完全抗体方法^[1]和鼠疫F1抗原的不完全抗体方法^[2~3]已相继建立, 并应用于实际工作。有关钩端螺旋体(简称钩体)的不完全抗体, 尚未见诸文献报告。在实际工作中, 我们曾发现血培养阳性、血清学检查阴性的钩体病人。于恩庶^[4]曾提出: 此现象的产生, 除与菌株抗原性和个体感受性不同有关外, 可能有不完整抗体的存在。对此, 我们进行了探讨, 现将结果报告如下。

材料和方法

一、材料:

1. 抗人球蛋白血清的制备: 取若干份人“O”型血清, 混合, 56°C 30分钟灭活后, 用饱和(NH₄)₂SO₄盐析3次, 10,000转/分(MSE离心机)离心10分钟, 去上清, 沉淀物即为丙种球蛋白, 冻干, 放冰箱保存备用。称取50毫克球蛋白加2毫升福氏(Freund's)不完全佐剂, 脚掌注射健康家兔, 间隔2周, 同量背部皮下多点注射, 第二次注射1周后放血, 以一般环状沉淀反应测定球蛋白血清的效价。1:4000为合格。然后: ①用Alserver氏液保存的人A、B、O三型血球吸收, 以排除非特异性凝集。方法系将三型血球分别离心沉淀, 倾去上清, 用生理盐水洗涤8次后, 将三型血球等量混合, 用生理盐水配成30%和10%的血球悬液。把抗人球蛋白血清用生理盐水稀释至1:2、1:4、1:8、……1:128等, 取各稀释度的

血清1滴置清洁的玻璃片上, 加入1滴30%的上述血球, 混匀, 室温下1~3分钟内即观察结果。如果1:32稀释度有肉眼可见的凝集颗粒, 再用10%的血球悬液和等量的抗人球蛋白血清混合, 放冰箱(0~4°C)24小时吸收其非特异凝集素, 于翌日取出, 离心沉淀, 再用上述方法测定, 如无凝集即可。②抗人球蛋白血清和钩体抗原非特异凝集的排除: 钩体抗原致敏的绵羊红血球19毫升, 加1毫升抗人球蛋白血清, 放4°C冰箱24小时左右, 中间摇动几次, 利于充分吸收, 然后用MSE离心机离心, 上清即为吸收后的抗人球蛋白血清。吸收要求与钩体抗原不发生非特异凝集为止。

2. 间接血凝试验: 参照浙江省卫生防疫站编《钩体微生物学与实验技术》一书。钩体抗原系上海生研所供给的100倍浓缩之黄疸出血群赖型70091株抗原, 用超声波击碎, 测定其血凝效价。

3. 经病原学或血清学证实的钩体病人血清95份。

4. 北京市输血站健康人血清10份。

5. 本所门诊室采集的其它病人血清5份。

二、方法:

1. 受检血清56°C 30分钟灭活, 吸取0.1毫升, 加入2.5%正常绵羊血球0.4毫升, 混合后再置37°C水浴箱中1小时, 每隔10分钟振动一次, 以吸收正常人抗绵羊血球凝集素。

2. 排列口径一致的小试管(或康氏管)12支, 第1管加0.6毫升pH7.2 0.15M PBS, 从第2管开始每管加0.4毫升PBS。取上述已处理的1:5受检血清0.2毫升加入第1管中, 混合

后吸出0.4毫升加入第2管,如此稀释至末管,最后弃去0.4毫升。第1管为正常血球对照。从第2管开始(1:40)每管加入0.05毫升(约1滴)2.5%致敏血球,混匀后置37°C水浴中90分钟,观察结果。每次试验均设抗原、抗人球蛋白血清对照。

3.对血凝反应可疑或阴性管(共6管)注明血清号及稀释度,用毛细滴管自高倍稀释开始,将管中的上清吸出弃去,将保留管底的血球轻轻振起,然后每管加入2~3毫升生理盐水,充分振荡后,置冰箱(0~4°C)过夜(此阶段为洗涤处理过程,如急需观察结果,可采用离心沉淀法,需反复洗涤3次),翌日取出,弃去上清,分别加入以生理盐水1:80稀释的抗人球蛋白血清(原效价1:4000),每管0.4毫升,混匀,置37°C水浴箱中2~4小时,观察结果。

结 果

1.用间接血凝反应和血凝Coombs试验两种方法对钩体病人血清做了不完全抗体检查,结果证明钩体病人血清中确实存在不完全抗体,而且血凝Coombs试验有较高的敏感性和特异性。结果见附表。两种方法的结果经统计学处理,有极显著的差别($P < 0.01$)。

附表 钩体病人血清两种检查方法的结果

血清号	间接血凝滴度1:	Coombs试验滴度1:	血清号	间接血凝滴度1:	Coombs试验滴度1:
1	—	320	29	—	160
2	—	320	30	40	160
3	—	320	31	1280	1280
4	—	640	32	—	160
5	—	320	33	40	640
6	—	640	34	—	320
7	—	640	35	—	640
8	640	1280	36	—	640
9	—	80	37	160	320
10	1280	5120	38	40	640
11	80	320	39	—	160
12	—	320	40	—	640
13	—	160	41	—	320
14	—	1280	42	—	320

续附表

血清号	间接血凝滴度1:	Coombs试验滴度1:	血清号	间接血凝滴度1:	Coombs试验滴度1:
15	—	160	43	—	1280
16	640	1280	44	—	320
17	—	80	45	—	320
18	—	40	46	—	320
19	640	1280	47	—	160
20	—	160	48	—	640
21	1280	—	49	—	640
22	—	320	50	—	160
23	320	1280	51	—	320
24	—	—	52	—	640
25	—	320	53	160	640
26	—	40	54	—	640
27	—	640	55	—	640
28	1280	1280	56	—	640
57	—	160	77	—	640
58	—	640	78	—	640
59	—	640	79	—	320
60	—	1280	80	1280	10240
61	—	160	81	—	1280
62	640	2560	82	—	1280
63	320	640	83	640	640
64	—	640	84	—	2560
65	80	640	85	1280	20480
66	—	60	86	160	5120
67	320	2560	87	5120	40960
68	5120	10240	88	2560	40960
69	640	2560	89	80	1280
70	640	2560	90	5120	40960
71	—	320	91	320	2560
72	—	160	92	320	1280
73	—	2560	93	—	5120
74	—	1280	94	—	5120
75	—	320	95	2560	2560
76	1280	20480			

注:间接血凝几何平均滴度8.646,95%可信限6.744~11.12,血凝Coombs试验几何平均滴度641.6,95%可信限546.9~752.8,df=188,t 0.01
(120) = 2.617, p < 0.01

2.对10份输血站健康人血清和5份其它疾病病人血清同时用上述两种方法检查,未获阳性结果,说明血凝Coombs试验是特异的。

讨 论

间接血凝试验是钩端螺旋体血清学诊断方法之一,有较高的敏感性和特异性,但不及显

凝试验敏感。不过显凝试验需要一套活菌做抗原，并且要有较好的暗视野显微镜，这样有的基层单位就无法进行。用血凝Coombs试验检测不完全抗体可弥补血凝试验不够敏感的问题，适合基层使用。抗人球蛋白血清非特异凝集的排除是非常重要的，否则这种凝集就会造成非特异反应。

进行本试验时，洗涤抗原是很重要的。我们在预试中用生理盐水离心洗3次，结果血球下沉较慢，判定结果需要时间较长，而且在洗涤过程中容易造成血球的损失，影响结果的判定。本文所报告的试验结果是采用较大量盐水洗一次的方法。先加入少量盐水，将血球摇起，然后加入2~3毫升盐水，充分混合均匀后放普通冰箱中过夜，这样洗涤较充分，血球损失较少，结果比较规律，也缩短了观察时间。

关于试验中所使用抗人球蛋白血清的量，其说不一。有的人认为效价不一定很高，1:200以上就可以使用，用时稀释成1:20~1:50。我们使用的球蛋白血清效价1:4000，用时稀释成1:80~1:100。有关抗人球蛋白血清使用的量需进一步研究。

摘 要

在本研究中，我们对两种方法即Coombs试验和间接血凝试验在诊断钩体病上的敏感性和特异性做了比较。共检查了110份血清。其中95份钩体病人血清、

10份健康人血清和5份其它病的病人血清。结果证明Coombs试验比间接血凝试验有更高的敏感性，经统计学处理二者有极显著差别($p < 0.01$)。非钩体病人血清Coombs试验均为阴性结果，这说明Coombs试验是特异的。此外，我们还对有关影响Coombs试验的一些因素做了简要讨论。

ABSTRACT

An attempt was made to compare sensitivity and specificity between the methods of Coombs test and the Indirect Haemagglutination test on leptospirosis diagnosis. 110 serum samples were tested with two tests. Among them 95 were obtained from the patients with leptospirosis, 10 were from healthy adults and 5 from patients with the other diseases. The results showed that Coombs' test was significantly more responsive than the Indirect Haemagglutination test ($P < 0.01$). Results showed that all the non-leptospirosis patients were negative, suggesting that Coombs test is specific in the diagnosis of leptospirosis. Some factors effecting Coombs test were also discussed.

参 考 文 献

1. 济南市卫生防疫站：布鲁氏菌病血凝不完全抗体检查方法的建立和初步应用，内部资料，1974~1975。
2. 纪树立等：鼠疫苗F1抗原的不完全抗体的研究，内部资料，1982。
3. 王淑纯等：鼠疫苗F1抗原的不完全抗体的研究，内部资料，1982。
4. 福建省卫生防疫站：钩体病快速诊断方法及其评价问题，内部资料，1977。
5. Cruickshank JC: J Hyg, 54(4): 562, 1956.
6. Пейсахис ЛА и др: Лав гело, (3): 162, 1973.
7. Беседнова НН и др: ЖМЭИ(8): 41, 1974.

A群脑膜炎奈瑟氏菌细菌素分型

浙江省卫生防疫站 杨更发

宁波地区防疫站 石优章

采用卫生部生物制品检定所提供的5株指示菌，对本省自1967~82年间收集的各种脑膜炎奈氏菌126株进行了细菌素分型。结果表明上述菌株只有两种型别：I型占79株(62.69%)，余为II型(37.31%)。在64株带菌菌株中，I型占49株(76.56%)，在25株病人菌株中II型占16株(64.0%)。1967年大流行时以II型为主，1982年未发生流行时以I型为主。从病人及周

围密切接触者中多半分离到同一型别的菌株。利用含与不含双抗的卵黄培养基进行这种分型似乎比10%羊血巧克力琼脂更好些。用1:1卵黄盐水增菌后或直接用菌苔进行此分型的效果相似。利用35株I型和14株II型菌重复进行7次分型试验，型别的符合率在71.43~100%之间，因此这种分型方法比较稳定。