

微量间接血凝法(单醛固定)及其诊断 弓形体病的实验观察

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

陈永祥 王光明 方喜业

目前,国内应用间接血凝法(IHA)诊断人、畜弓形体病时多采用双醛法,此种方法费时,并且滴度偏低。我们改用单醛法固定红细胞,无论是以微量法还是试管法都取得了较好的结果,现报告如下:

材料和方法

一、虫株:上海CN株。

二、戊二醛:上海化学试剂采购供应站分装E. Merck厂产品。

三、鞣酸(分析纯):遵义市第二化工厂。

四、被检血清:首都医院检验科提供非弓形体病人血清。

五、抗原:以CN株感染BALB/c小鼠,3天后杀死小鼠,抽取腹水,以玻瓶壁沉附细胞法,除掉腹水中的细胞。用生物显微镜检查弓形体数量和纯度后以3000转/分离心30分钟收集虫体,弃上清,沉淀物用pH7.0的磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,向沉淀物中加入10倍原腹水量的灭菌双蒸水,混合后置-30℃冰箱反复冻融5次,使虫体完全破裂。将裂解液置13,000转低温离心40分钟,吸取上清液加等量灭菌1.7% NaCl液,即为可溶性冻融弓形体抗原。贮存于-20℃,此抗原的蛋白含量为0.9毫克/毫升,用于致敏红细胞之前作抗原最适浓度测定。

六、血凝诊断液的制备程序:

1. 戊二醛固定绵羊红细胞:采用本所动物室饲养的健康绵羊血,按1:2的容积比加入到Alsever's液中混均,置4℃冰箱过夜。以离

心法沉淀红细胞,再用0.11M pH7.2 PBS洗该细胞3次,再用上述PBS配成5%的红细胞悬液,以5:1的比例加入2.5%戊二醛液(加戊二醛液时,以滴管一滴一滴加,并且边加边摇动红细胞悬液)。加完后继续震荡固定1小时,然后离心沉淀血细胞,弃上清。再以0.11M pH7.2的PBS洗3~5次。再用该PBS配成10%戊二醛固定绵羊红细胞悬液,加入0.1%叠氮钠,置4℃冰箱备用。

2. 鞣化红细胞及抗原致敏:将10%固定红细胞用pH7.2的PBS洗一次,再用同样的溶液配成2.5%红细胞悬液,加入等容积1:20,000的鞣酸液,充分混均,置37℃水浴15分钟,然后以离心法沉淀红细胞,用pH7.2的PBS洗2次,再用pH4.8醋酸缓冲液洗一次。将鞣化红细胞配成10%的悬液,加入最适致敏浓度的弓形体抗原(此批测定为每毫升鞣化红细胞加0.25毫升抗原)。混均后再加入1份醋酸缓冲液,置37℃水浴中致敏30~60分钟(其间摇动容器数次)。然后用含1%正常兔血清的pH7.2 PBS洗5次,再用该液配成10%的致敏红细胞悬液加入0.1%叠氮钠,即为弓形体病血凝诊断液,置37℃冰箱备用。

七、被检血清的处理:将所有的被检血清置56℃水浴中30分钟灭活后备用。

八、间接血凝试验操作程序:微量法采用聚苯乙烯“V”字型微量滴定板(96孔),试管法采用0.8厘米口径的小试管,血清最低稀释倍数是从10倍开始,做倍比稀释至第10管(孔)。然后加入1%(微量法)或2%(试管法)的弓形体

血凝诊断液1滴，摇动混合均匀后，置37℃温箱2小时观察结果，实验同时设阳性血清和1%兔血清PBS各1管作为对照。

九、血凝抑制试验：为排除血凝试验中非特异性凝集反应，将试验中出现阳性的血清再做一次血凝抑制试验。被检血清的稀释方法同血凝试验，向稀释好的血清中加入1滴(0.05毫升)已知抗原，在37℃下孵育1小时后再向各管(孔)加入1滴血凝诊断液，然后置37℃下作用2小时观察结果。

血凝抑制试验阳性即抑制2管以上者为特异性凝集。

实验结果

我们对北京市某医院的571份普通门诊病人血清作了间接血凝试验，以1:80为阳性标准，其中有57份血清阳性，最高滴度达1:640，总阳性率为9.98%，同时对每份阳性血清都作了血凝抑制试验。

在571份血清中，有病例可查的191份(其余为门诊病人，只有随身携带的病历卡)，其中有35份阳性，方差检验结果，年龄组和职业组均无显著性差异，只有性别组的阳性率有差别。男性93例，阳性24人，阳性率为25.8%；女性98例，阳性11人，阳性率为11.2%，两者 $\chi^2=6.79$ ， $P<0.01$ 。

讨论

一、我们同时采用双醛法(丙酮醛、甲醛)和单醛法(戊二醛)固定绵羊红细胞，经鞣酸处理和抗原致敏等相同步骤制备血凝诊断液，作间接血凝试验，所得结果基本相同，但双醛法固定血细胞程序较单醛法多、时间长。单醛法不仅省时间，而且操作简便。我们曾用单醛法测定2只人工感染弓形体前后的家兔血清的血凝抗

体，感染前两只家兔的弓形体血凝抗体均为阴性，感染后1个月两只家兔的血凝抗体滴度都达到了1:1280。此次用单醛法检测北京市人群弓形体病的感染情况，对阳性血清都作了血凝抑制试验。证明其特异性是可靠的。

二、我们曾用同样程序进行了微量法和试管法的比较，结果两种方法在出现结果上略有差别，微量法较试管法平均低1~2管，但特异性上没有差别。我们认为微量法使用血清量、血凝液量较少，操作简便。试管法的优点是操作准确、结果可靠。

摘要

本文应用单醛法固定绵羊红细胞，经鞣酸鞣化和抗原敏化后做弓形体间接血凝调查人群弓形体抗体。同时与常用的双醛法作比较，结果相同。以此法对北京市人群血清作弓形体病血清学调查时，在571份血清中检出57份阳性，阳性率为9.98%，其中有病历可查的191份中有35份阳性。在这些阳性者中，经过卡方检验，只有性别组有显著性差异(男高于女)。其他各组均无差异。

ABSTRACT

An indirect hemagglutination micro test was applied to detect the presence of antibodies against toxoplasma in human sera by means of sensitized sheep erythrocyte after glutaric dialdehyde fixation and tannic acid treatment.

This procedure has been compared with that of methyl glyoxal and formaldehyde method and was found to yield similar results and quite reliable.

The survey was undertaken in certain regions of Beijing. Among 571 samples of tested sera, 57 were found to be positive with a rate of 9.98%. Among selected 191 sera obtained from different kinds of patients revealed 35 positive. The statistical analysis showed that only sex group presented remarkable difference, i.e. positive rate in male was higher than in female. There is no correlation between positive rates to ages and obviously farmers and workers are those possessing higher positive rates.

作者更正

本刊1984年第4期插图第4页，《产肠毒素大肠艾希氏菌引致食物中毒一例》一文末尾的培养结果，作者笔误为“培养出致病性大肠艾希氏菌……”，实际应为“培养出产肠毒素大肠艾希氏菌……”，特此更正。