

胶乳凝集试验应用于布鲁氏菌病诊断的研究

鲁齐发¹ 尚德秋¹ 崔春槐¹ 郭 骏² 吕绳凯² 王大勇³ 赵仁久⁴ 王书义⁴

提要 首次应用布鲁氏菌抗原致敏的免疫胶乳, 分别对46例布鲁氏菌病患者及52头布鲁氏菌感染乳牛的血清进行了检查, 其阳性率分别为60.87%和90.38%。本试验与其他5种血清学试验的比较结果表明, 它与试管凝集试验的符合率最高可达100%, 是一种特异、敏感、快速和简便的血清学试验, 尤适宜于基层应用。

关键词 胶乳凝集试验 布鲁氏菌病 抗原 抗体

自1956年Singer首次以胶乳粒子为载体进行风湿性疾病的血清学诊断检查以来^[1], 对于不少疾病, 国内外均有应用胶乳凝集试验或胶乳凝集抑制试验进行其特异性抗体或抗原检测的报道^[2~4]。Tramont应用胶乳凝集试验(LAT)对流脑患者及带菌者血清中抗体检查的结果表明, 其敏感性及特异性与间接血凝试验检查的结果一致^[3]。但对布鲁氏菌病(简称布病), 尚未见用LAT检测血清中抗体诊断人畜布病的报道。

从1987年底开始, 我们就布鲁氏菌抗原的胶乳制剂制备、LAT试验条件及应用于人畜布病的检查, 进行了较系统的研究。现报道如下。

材料与方 法

一、抗原制备: 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(简称流研所)按常规制备羊种布鲁氏菌16M脂多糖(LPS)及超声波破碎抗原^[5]。

二、胶乳载体的合成: 由上海市临床检验中心按下述乳液聚合方法制备^[6]: 烧瓶中盛1600毫升蒸馏水并加热至85~87℃, 在搅拌条件下加入0.1%十二烷基苯磺酸钠1毫升, $K_2S_2O_8$ 1.8克, $Na_5P_3O_{10}$ 1.8克和苯乙烯220毫升。然后保持在85~87℃和搅拌条件下, 通氮反应6小时后将胶乳过滤, 这样得到胶乳的

固体量约为10%左右, 颗粒直径约0.8微米。

三、免疫胶乳的制备: 由上海市临床检验中心按下述方法制备: 取上述10%胶乳, 用0.1MpH8.4甘氨酸缓冲液(GBS)按1:4稀释, 然后将一定浓度的抗原(抗原与胶乳的体积比例为1:10), 在37℃条件预温1小时, 将抗原与胶乳混合后, 于37℃搅拌致敏2小时, 置室温过夜, 次日用GBS液离心洗涤, 最后用同样缓冲液恢复胶乳浓度至1%固体量, 以0.1%NaN₃防腐, 保存于4℃冰箱中备用胶乳试剂切勿冰冻。

四、LAT操作方法: 准备一块玻板, 背面涂以黑漆, 正面用红漆分为若干2.5×2.5cm的方格(或购买胶乳凝集试验玻板)。试验时先用GBS液将被检血清做1:8稀释, 然后滴1滴(大约50μl), 连续摇动6分钟后, 在强光下观察结果, 出现清晰的、均一的凝集颗粒者为阳性, 未见凝集者为阴性。

五、其他血清学试验: 包括虎红平板凝集试验(RBPT)、试管凝集试验(SAT)、半胱氨酸凝集试验(CAT)、补体结合试验(CFT)及酶联免疫吸附试验(ELISA)。

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

2 上海市临床检验中心

3 黑龙江省国营农场总局

4 河北省地方病防治所

这些试验所用的抗原及其它制剂，均由流研所制备并按常规操作和判定结果^[5, 7]。

结 果

一、LAT特异性及交叉反应：

1. 对正常人及几种动物血清的检查结果：

用免疫胶乳对正常人血清(北京市输血站供给)5份、牛血清(经多种血清学试验检查为阴性)20份及正常健康家兔血清5份、豚鼠血清10份、小白鼠血清5份和犬血清3份的检查结果均为阴性。

2. 对几种小肠结肠炎耶氏菌(简称耶氏菌)不同血清型抗血清的检查结果：经用LAT对流研所诊断室提供的耶氏菌各血清型抗血清：0:3、0:4、0:5、0:6、0:7、0:8、0:9、0:14、0:15、0:17和0:41的检查结果，除0:9为强阳性，0:3为弱阳性反应外，其余的均为阴性反应。

3. 对几种布氏菌免疫或感染实验动物血清的检查结果：在预备实验中，我们对几种已知布氏菌免疫或感染的实验动物血清进行了检查(表1)，从结果不难看出，布氏菌16M的免疫胶乳对布氏菌光滑型菌免疫或感染的实验动物血清，检查结果均为阳性反应，而对2种粗糙型布氏菌的免疫血清均为阴性反应。

表1 LAT对几种布氏菌免疫或感染动物血清的检查结果

血清来源	份数	阳性数
牛种菌104M免疫的家兔血清(1个月)	5	5
羊种菌16M感染的小鼠血清(1个月)	3	3
羊种菌16M感染的豚鼠血清(2.5个月)	8	8
猪种菌S12感染的豚鼠血清(1个月)	2	2
犬种菌RM6/66免疫的小鼠血清(2个月)	3	0
绵羊副睾种菌ovis免疫的家兔血清(1个月)	2	0

二、对布病患者的检查结果：从近年来发生的人间布病爆发地区收集的46份血清，其中包括男性31名、女性15名，年龄为8~69岁，病程在1~2年者占一半以上，有临床表现的占

70%左右。经用LAT对这46份血清进行检查，结果(表2)表明，LAT的阳性检出率介于SAT和RBPT之间，略高于SAT，而略低于RBPT。

表2 三种血清学试验对46名布病患者的检查结果

血清学试验	例数	阳性数	%
LAT	46	28	60.87
SAT	46	25	54.35
RBPT	46	32	69.57

三、对布氏菌感染乳牛的检查结果：对已证实为牛种布氏菌生物3型菌引起爆发性流产的一群乳牛中的52头，用几种血清学试验进行检查，结果(表3)表明，用LAT检查所得的阳性率(90.38%)仅低于SAT(92.31%)而高于其他4种血清学试验。应用布氏菌感染牛血清比较LAT与其他5种血清学试验检查结果时不难看出，LAT与这5种常用的血清学试验结果的符合率是较好的，阳性符合率均在82.98%以上，总符合率在84.31%以上，尤其与SAT的阳性及总符合率均为100%(表4)。

表3 应用几种血清学试验对52头乳牛的检查结果

血清学试验	血清份数	阳性数	%
LAT	52	47	90.38
PBPT	52	45	86.54
ELISA(IgG)	52	43	82.69
CFT	51	39	76.47
CAT	50	41	82.00
SAT	52	48	92.31

讨 论

一、用以制备免疫胶乳的布氏菌抗原制剂的选择：在制备免疫胶乳过程中，我们曾分别用布氏菌脂多糖抗原及超声波破碎抗原与羧化胶乳进行致敏或化学交联。据多次结果表明，对超声波破碎抗原，仅在少数情况下化学交联可获得成功。但即使如此，其稳定性也较差。而用布氏菌脂多糖抗原不仅易于致敏上，而且

表4

LAT与5种血清学试验结果的相关性比较

LAT	RBPT		ELISA		CFT		CAT		SAT	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
+	46	3	45	3	39	8	41	4	48	0
-	0	3	0	4	0	4	0	4	0	4
阳性符合率%	93.87		93.75		82.98		91.11		100.00	
总符合率%	94.23		94.23		84.37		91.84		100.00	

制成的免疫胶乳，经用于人畜布病检查，其特异性、敏感性均较好，也较稳定。关于对各种型布氏菌抗原的比较研究，尚在进一步试验中。

二、影响LAT特异性及敏感性的一些因素：如上述，除抗原制剂的选择对制备免疫胶乳进而对LAT的检查结果有明显的影响外，下述两点也不可忽视。

1. LAT的稀释剂：Singer用LAT对风湿性疾病进行检查，在选用稀释剂上进行了比较，用蒸馏水时，即使在阳性血清中也不出现凝集反应，单独用0.1MpH8.2的硼酸缓冲液效果也不理想，但用含0.85%氯化钠的硼酸缓冲液时则收到了明显的效果⁽¹⁾。在本次研究中，我们曾分别用生理盐水及0.1MpH8.4的GBS稀释待检血清进行检查，结果表明，用前者并不能提高阳性检出率，而且在阴性标本中可出现可疑反应；用GBS则不仅结果易于判定而且较稳定。

2. 对待检血清的适宜稀释度：关于此点较为重要，因为如果用未稀释或稀释度过低的血清进行检查，易出现非特异性反应，但若稀释度过高，则又可能影响敏感度而出现假阴性反应。据我们试验待检血清以1:8稀释为较好。

三、关于LAT检测抗体的免疫球蛋白类型：从表1结果不难看出，应用LAT对已知布氏菌免疫或感染1~2.5个月的几种实验动物的血清进行检测，均可出现阳性反应。很明显在这免疫或感染阶段，这些动物血清中的抗体应主要是IgM型抗体，自然也有IgG型抗体。

另外，从几种血清学试验对布氏菌感染乳牛的对比检查结果中，也清楚地看到，LAT更接近于SAT的检查结果，这两种试验的阳性及总符合率均达到100%（表3）。因此，我们初步认为，LAT与SAT相同，既可检测特异性IgM抗体，又可检测IgG型抗体，而对于检测的更为具体的免疫球蛋白种类和亚型，尚有待进一步研究。

A Study on Latex Agglutination for Serological Diagnosis of Brucellosis Lu Qifa, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine Beijing

A latex agglutination test was first used for the serological diagnosis of Brucellosis. Results of tested sera obtained from patients with a clinical diagnosis of Brucellosis and cows infected with Brucella showed that this test was specific and sensitive. Meantime the procedure of this test was easily and rapidly to perform.

In addition, preparation of immuno-latex, the procedure of this test and some factors which affected the result of this test were also described in the paper.

Key words Latex agglutination test
Brucellosis Antigen Antibody

参考文献

1. Singer JM, Plotz CM. The latex Fixation test I Application to the serological diagnosis of Rheumatoid Arthritis. Am J Med. 1956; 21(6): 888.

2. Fritz RB, Rivers SL. Hepatitis-Associated Antigen Detection by Antibody-sensitized latex particles. *J immunology* 1972; 108(1):108.

3. Tramont EC, et al. Latex Agglutination Test for Measurement of Antibodies to Meningococcal polysaccharides. *Infect and Immun* 1972; 5(3): 346.

4. 中国医学科学院流行病学防治研究所流脑组等. 以乳胶凝集试

验诊断流行性脑脊髓膜炎的初步报告. *流行病学防治研究* 1975; 4:259.

5. 姜顺求主编. 布鲁氏菌病防治手册. 人民卫生出版社, 1984.

6. 吕绳凯, 等. 一种敏感的羧化胶乳妊娠凝集抑制试验. *中华医学检验杂志* 1981; 4(1):9.

7. 鲁齐发, 等. 以布氏菌免疫及感染豚鼠其血清抗体研究. *中国地方病学杂志* 1987; 6(5):278.

抗生素相关性腹泻的诊断方法

南京铁道医学院微生物教研室

史俊华 王思一 张雪萍 范子文 张建琼 陆全 指导 刘功云

难辨梭菌 (*Clostridium difficile* CD) 是抗生素相关性腹泻 (antibiotic associated diarrhea, AAD) 的病原菌。抗生素在我国应用非常普遍, 但临床报道却不多, 主要是尚未建立一种有效的对CD菌培养及毒素的测定方法, 另外临床医师也尚未对AAD有足够的认识。最近我们建立了一种用SpA标记CD菌产生的毒素的抗体来检测标本中的毒素 (SpA-CoA法) 及一种简便的厌氧菌培养方法——Cs速效型除氧剂培养CD菌, 可以使诊断达到简便、快速、敏感及特异。适宜在基层单位应用。

首先用金黄色葡萄球菌1800株制备10% SpA稳定液与CD菌的抗毒素标记成1%悬液待用。标本为临床内、外科应用抗生素后引起腹泻的病人粪便, 经处理 (离心及过超滤膜) 后待测。取干净玻璃片一张分别滴上SpA标记CD抗毒素试剂及处理过的标本各一滴, 混匀摇2~5分钟, 若见凝集颗粒且周围液体澄清者为阳性。共检测标本115例, 用SpA协同凝集法检测出58例阳性, 阳性率为54.34%, 而其它肠道病人均为阴性, 正常人对照也为阴性 ($P < 0.001$)。用本法检测大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、破伤风杆菌及霍乱弧菌的毒素均为阴性。

另外我们对粪便标本中CD菌进行了培养, 用CCFA培养基分区划线后置含80%氮气、10%氢气及10%二氧化碳混合气体的厌氧箱内培养48小时, 另外取约1g粪便加入70% 1.5ml乙醇, 置室温10分钟后再接种在厌氧培养基上, 迅速放入无毒复合塑料薄膜袋内, 并放一包200型Cs速效型除氧剂把袋口用熨铁封严, 37℃培养48小时。结果经重复多次CCFA培养基选择结果不满意, 而后者无论菌落、镜下形态及生化反应均可以得到满意结果。故本试验均使用后种方法分离CD菌。

本试验用SpA协同凝集与厌氧培养方法比较, 检查了115例AAC患者标本, 前者阳性率为54.34%, 明显高于培养法的阳性率 (33.92%)。而且SpA协同凝集试验简单、不需特殊仪器、特异性高、敏感性高, 适宜推广。

索氏梭菌 (Cs) 与CD菌毒素间有共同抗原成分, 故用Cs抗毒素标记SpA检测时阳性率亦可达77.5% (CD抗毒素标记可达98.27%) 我们认为必要时可用Cs抗毒素标记以代替较难获取的CD抗毒素。