

應用國產舊結核菌素作 結核病血凝試驗

倪 斌 宋正行

(江蘇醫學院微生物學教研組)

自 1948 年 Middlebrook 和 Dubos 二氏^[1]應用結核桿菌之抽出物使綿羊紅血球致敏後作為抗原，來和結核病血清進行血球凝集試驗以後，在結核病的血清診斷上曾引起許多學者的研究興趣。但是結核菌抽出物的抽取方法，手續上頗為繁複，非一般實驗室所易於製備。其後，Smith 和 Scott 二氏^[2]更發現應用舊結核菌素作為致敏羊血球的抗原，也得到了同樣滿意的結果。舊結核菌素可自市上購得，操作簡易，解決了技術上的困難。因此，Rothbard^[3]、Generz-Rieux 和 Tacquet^[4]、Hilson 和 Elek^[5]、Adcock^[6]以及 Hentel^[7]諸氏曾先後進行結核病血清之試驗，以觀察其對於臨床診斷上的意義。1952 年張學德^[9]曾創用結核菌的純蛋白衍化物 (P. P. D.) 作為羊血球致敏的抗原，亦得到與舊結核菌素相同結果。但是這種血凝試驗，在結核病的臨床診斷上的價值，據各家統計之結果，頗不一致。有些學者認為在診斷上的價值頗大，而另有些學者則認為用來作為活動性結核病的診斷，尚有斟酌的必要。如 Rothbard 氏及張學德的結論，以血清滴定度在 1:8 以上者為陽性時，則活動性肺結核所佔陽性率在 90% 以上，而靜止性肺結核及正常人血清之滴定度都在 1:8 以下。但據 Adcock 氏之報告，活動性肺結核的陽性率僅為 54.5%，正常人血清的陽性率也達到 17.1% 之多。在 Hentel 氏的報告中，以 1:16 以上為陽性時，活動性肺結核病人所佔陽性率為 45.5%。另如 Smith 和 Scott 二氏的結果，以血清的滴定度為 1:2 即認為陽性時，活動性肺結核所佔陽性率為 80%，而正常人血清的陽性率亦在 50.7% 之多。

在另一方面，各家用來使紅血球致敏之舊結核菌素，都是“Lederle”藥廠製品，據稱其效力大於一般舊結核菌素 4 倍，且不含甘油。張學德所用的結核菌純蛋白衍化物 (P. P. D.)，也是 Park-Davis 藥廠出品。這些材料均須購自國外，不能普遍供應我

們的實驗。張氏曾採用普通市售的舊結核菌素來進行綿羊血球致敏，結果當這種致敏了的綿羊血球再懸於生理鹽水中時，迅即發生溶血現象，張氏臆斷可能是由於普通舊結核菌素中含有甘油的緣故。我們也曾分別以甘油及國產舊結核菌素作對照試驗，證實了確係由於甘油作用紅血球後，而引起溶血的後果。

根據前面許多作者的研究，我們認為結核病的血凝試驗，究竟可否應用於結核病的臨床血清診斷，尚有待於再進一步的研究，但是要大量展開實驗工作，首先就須解決抗原問題。我們通過了多次實驗，曾應用國產舊結核菌素，以乙醇沉澱法去掉了甘油，獲得了可以使羊血球致敏的抗原物質。並應用此種抗原作了一部分實驗動物及病例血清的血球凝集試驗，茲將試驗方法和結果分述如次。

材 料 與 方 法

(一) 舊結核菌素的乙醇沉澱物(抗原)製備法

試驗所用的舊結核菌素，係上海生物製品研究所出品，失效期 1956 年 12 月 1 日。我們參攷 Pound 氏^[8]以乙醇分析結核桿菌菌體抽出物的方法，曾從舊結核菌素中製出下列三種抗原：

1. 全沉澱物：即以舊結核菌素 1 毫升，徐徐加入無水乙醇，且加且搖，至不再發生沉澱為止，計需乙醇 9 毫升(含乙醇濃度為 90%)，然後以每分鐘速率 2,000 轉遠心沉澱 5 分鐘，乃棄去上清液，管底黃褐色帶粘稠性的沉澱物，先用數毫升之乙醇洗滌 1 次，次用丙酮洗滌 1 次，乃將沉澱管倒斜置於孵箱(37°C)中數分鐘，以待丙酮揮發乾淨，最後用 3 毫升之磷酸鹽緩衝生理鹽水溶化之，此即舊結核菌素之全部沉澱物(簡稱全沉澱)。

2. 部分沉澱物：由上法製出之全沉澱物，先以 3 毫升的蒸餾水溶解之，再加入無水乙醇 3 毫升(含乙醇濃度為 50%)，復見混濁沉澱，經離心沉澱 5 分鐘後，將黃色上清液移入另一試管，管底之白色沉澱以丙酮洗滌 1 次，在孵箱中揮發數分鐘後，同樣以 3 毫升之磷酸鹽緩衝生理鹽水溶化之，是為“舊結核菌素之第一種部分沉澱物”(簡稱沉澱 I)。再將黃色上清液繼續加入乙醇 15 毫升(含乙醇之濃度為 84%)，又行離心沉澱 5 分鐘，拋棄上清液，管底再得黃色沉澱，同樣以丙酮洗滌 1 次，置孵箱中乾燥數分鐘，加入 3 毫升的磷酸鹽緩衝生理鹽水溶化後，是為“舊結核菌素的第二種部分沉澱物”(簡稱沉澱 II)。

上述之 3 種乙醇沉澱物，曾進行 Molisch 氏試驗及雙脲 (Biuret) 試驗，以檢查

其醣及蛋白質反應，檢驗所得結果如下表：

表 1 舊結核菌素的各種乙醇沉澱物性狀

	顏 色	Molisch 氏 試 驗	雙脲 (Biuret) 試驗
全 沉 澱 物	黑 褐	++++	++
第一種部分沉澱物	白 色	+	—
第二種部分沉澱物	黃 褐	++++	+

(二) 血球的致敏法

此次實驗所用的血球，計有兩種，用人血清作試驗時，爲了避免吸收血清中嗜異性抗體的手續，乃依照 Adcock 氏法，應用 O 型人血球來致敏。但用豚鼠血清作試驗時，仍採用綿羊血球。將上述三種舊結核菌素的乙醇沉澱物，溶解於 3 毫升的緩衝生理鹽水中後，隨即分別加入洗滌過而沉澱後的血球（O 型人血球或綿羊血球）0.25 毫升，混合之，置 37°C 水溫箱中加溫，每隔 15—20 分鐘搖動一次，待抗原（舊結核菌素之乙醇沉澱物）作用於血球經過兩小時後，乃遠心沉澱 3—5 分鐘。拋棄上清液，再以生理鹽水洗滌管底已致敏之血球 2 次。末次遠心沉澱後，吸去上清液，乃將沉澱於管底之血球，懸於 50 毫升的緩衝生理鹽水中，即成爲 0.5% 致敏血球懸液。

(三) 被檢血清的處理

人血清或豚鼠血清，在試驗前，概須經 56°C 加溫 30 分鐘以滅活。豚鼠血清則應於滅活後，事先以正常羊血球兩次吸收其嗜異性抗體，方法即以洗滌過的壓積的正常羊血球 1 滴，加於約 0.5—1.0 毫升的豚鼠血清中，混合後，放置室溫中 20—30 分鐘，然後遠心沉澱，拋去管底血球。上層之血清液，同法再以羊血球吸收 1 次，這種吸收過的豚鼠血清，即可供血凝試驗之用。

(四) 試驗技術

係採用試管法，將被檢血清，以緩衝生理鹽水行倍量稀釋，每管 0.3 毫升，然後加入 0.5% 致敏血球懸液 0.3 毫升，使被檢血清的最終稀釋度爲 1:4、1:8...1:512。最後一管，則另含 1:2 倍之被檢血清 0.3 毫升，另加 0.5% 正常羊血球 0.3 毫升作對照試驗。

加入血球懸液後，稍加振盪混合之，在 37°C 水箱中加溫 2 小時，再置於冰箱中一夜，翌晨觀察結果，根據血球凝集現象程度之不同，記以 +++++、++++、+++、++、+ 等符號。凡血清的最大稀釋度，而仍發現明顯的血凝現象“+”號者，即爲被檢血清的滴定度（效價）。根據我們的經驗，在 37°C 水溫箱中加溫兩小時之直後觀察結果

和室溫中放置一夜觀察結果，兩者的差異很大，故血凝滴定度的判斷，必須待到翌日始可作出最後決定。

試 驗 結 果

一. 抗原滴定試驗

(一) 舊結核菌素的各種乙醇沉澱物與健康人及結核病人血凝滴定度之比較

我們製出之三種舊結核菌素乙醇沉澱物，究竟那一種最適用於結核病血凝試驗，我們初步以兩組人血清來進行試驗，第一組健康人係我院附屬醫院輸血團員和化驗室的工作同志。各位志願者，都經最近健康檢查，X 射綫透視，證明無結核病的。第二組結核病人，係附屬醫院門診及住院的病例。兩組試驗所得結果如下表：

表 2 肺結核病人及健康人血清對舊結核菌素之各種乙醇沉澱物血凝反應滴定度

組別	總人數	舊結核菌素乙醇沉澱物	血 凝 滴 定 度 (人 數)								以 1:32 為陽性時所佔之百分率
			<1:4	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
健康人	31	全 沉 澱	9	7	7	4	3	1	0	0	12.9%
		沉 澱 I	16	9	5	1	0	0	0	0	0%
		沉 澱 II	8	9	6	5	3	0	0	0	9.7%
結核病人	40	全 沉 澱	0	3	3	12	6	7	3	6	55%
		沉 澱 I	17	5	5	6	4	1	2	0	17.5%
		沉 澱 II	0	1	3	4	14	10	4	4	80%

從表 2 我們可以看出：健康人組對於舊結核菌素的各種沉澱物之血凝滴定度大多數集中於 1:32 以下，而結核病人組對於沉澱 II 的血凝滴定度，則多在 1:32 以上，且有高達 1:256 者。我們假定以 1:32 為陽性反應的滴定度，則在健康人組全沉澱物陽性率為 12.9%；第一種部分沉澱物陽性率為 0%；第二種部分沉澱物陽性率為 9.7%。而在結核病人組含沉澱物的陽性率為 55%；第一種部分沉澱物的陽性率為 17.5%；第二種部分沉澱物的陽性率為 80%。這些結果顯示出第二種部分沉澱物對於結核病人血清之敏感性較高，因此，我們決定以第二種部分沉澱物作為結核病血凝試驗的抗原，其有診斷意義的滴定度暫定為 1:32。

(二) 感染動物對於第二種沉澱物的血凝試驗

在試驗一中，健康人血清，對於第二種部分沉澱物的滴定度，以 1:32 為有診斷意

義的效價時，陽性率仍佔 9.7%。但這種所謂健康人，均係成年人，不能觀察其對本實驗之有無特殊性，而我們在進行試驗時，又不容易得到既未感染過結核病，也未曾接種過卡介苗的健康兒童血清，以與結核病人血清作對照試驗。故初步藉感染動物的血清，來進行試驗^[11]。選擇體重在 500 克左右的健康豚鼠 18 隻，試驗前各豚鼠均進行舊結核菌素皮內試驗，(10% 舊結核菌素生理鹽水稀釋液 0.2 毫升。)，並採取其血清和舊結核菌素之第二種部分沉澱物所致敏的羊血球行血凝試驗，兩種試驗都證明為陰性反應。然後將豚鼠分為 3 組，每組 6 隻，第一組每鼠接種在 Trudeau 蛋黃甘油馬鈴芋培養基上生長 6 週的人型結核桿菌 H₃₇ RV 菌株 0.5 毫克於鼠蹊部皮下；第二組每鼠接種上海生物製品研究所出品的新鮮卡介苗 2 毫克；第三組則不接種細菌，以觀

表 3 接種人型結核桿菌 H₃₇ RV 及接種卡介苗的豚鼠血清的血凝反應滴定度

組別	豚鼠號數	接種之細菌	接種前試驗		接種後的血凝反應滴定度						
			O.T.	血凝	第1週	第4週	第6週	第8週	第10週	第12週	第14週
第一組	1	人型結核桿菌 H ₃₇ RV 0.5 毫克	—	—	—	1:8	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
	2		—	—	—	1:4	1:32	1:32	1:256	1:128	1:256
	3		—	—	—	1:32	1:32	1:32	1:64	1:32	1:16
	4		—	—	—	1:32	1:32	1:64	1:64	1:128	1:64
	5		—	—	—	1:8	1:8	1:16	1:16	1:8	1:64
	6		—	—	—	1:8	1:8	1:32	1:256	死亡	0
第二組	7	卡介苗 2.0 毫克	—	—	—	1:4	1:8	1:16	1:8	1:8	1:8
	8		—	—	—	1:16	1:8	1:16	1:8	1:8	1:16
	9		—	—	—	—	1:4	1:16	1:8	1:4	1:16
	10		—	—	—	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8	1:16
	11		—	—	—	1:4	—	1:8	1:4	1:4	1:4
	12		—	—	—	—	1:4	1:16	1:4	1:4	1:4
第三組	13	不接種細菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	14		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	16		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	17		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	18		—	—	—	—	—	—	—	—	—

察試驗前所進行的一次舊結核菌素皮內試驗,是否引起抗體產生,俾便與第一第二兩組作對照試驗,其所得結果如表 3。

從表 3 結果可以指出:(1)國產舊結核菌素的第二種部分沉澱物所致敏的羊血球,對於正常豚鼠血清都是陰性反應,對於接種人型結核桿菌 $H_{37}RV$ 菌株或接種卡介苗後的豚鼠血清,在第二週以後,均出現陽性反應。(2)如果第一組和第二組的血凝滴定度比較,則見接種有毒人型結核桿菌 $H_{37}RV$ 菌株之第一組豚鼠血清滴定度,高於接種卡介苗之第二組。第一組的滴定度最高效價為 1:256,第二組的最高效價為 1:16。(3)不接種結核菌,僅經過一次舊結核菌素皮內試驗的第三組豚鼠,則血清中都不發生可以見及的血凝滴定度。

(三) 抗原(沉澱 II)致敏血球時所需的適當濃度試驗

從舊結核菌素 1 毫升所製出之第二種部分沉澱物,溶解於 3 毫升的緩衝生理鹽水中後,當作 100% 的原液,然後以 3 毫升的生理鹽水倍量稀釋法作成系列稀釋使成為 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 等稀釋度,此時每管容量雖保持 3 毫升,而其中所含之結核菌素量則自 100% 遞減為 50%、25%、12.5%、6.25%、3.125% 及 1.56%。然後分別加入 O 型壓積血球 0.25 毫升,在 37°C 水溫箱中致敏 2 小時後,乃用已知陽性血清以滴定其效價,得到如下表所列的結果。

表 4 抗原(沉澱 II)致敏血球時所需的適當濃度試驗

抗 原		陽 性 血 清 的 滴 定 度							
稀 釋 度	含 量	1:2	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	對 照
1:1	100%	++++	++++	+++	++	++	+	—	—
1:2	50%	++++	++++	+++	++	++	+	—	—
1:4	25%	++++	+++	+++	+	+	—	—	—
1:8	12.5%	+++	++	+	—	—	—	—	—
1:16	6.25%	+++	++	+	—	—	—	—	—
1:32	3.125%	+	—	—	—	—	—	—	—
1:64	1.56%	—	—	—	—	—	—	—	—

從表 4 可以觀察到舊結核菌素第二種沉澱物 100%、50% 的兩種濃度致敏血球後,與陽性血清所發生的血凝滴定度相等,以後其滴定度則隨稀釋倍數而遞減。茲假定抗原(沉澱 II)的最小濃度能與陽性血清出現最高滴定度者為致敏血球的恰定濃度,則此次試驗結果,是 3 毫升溶液中含第二種沉澱物 50% 的一管為測得的恰定濃

度，實際試驗時，我們決定用其倍量，即在 3 毫升生理鹽液內含沉澱 II 100% 的一管，來作為致敏血球之用。

二、臨床病例初步統計

供試驗用的抗原，仍採用舊結核菌素的第二種乙醇部分沉澱物來使 O 型人血球致敏。

共計檢查 160 例，依病例情况不同，分成下列各組：

(一) 活動性肺結核組：計 77 人，在診斷上凡具有下列條件者，均歸入本組：

(1) X 射線檢查所見，係具有浸潤成份的病變即處於“浸潤或進展期”的病變。

處於“溶解或播散期”的病變。

處於“吸收或好轉期”但病灶周圍炎症尚未完全吸收，病灶邊緣境界仍不甚明晰的病變。

(2) 痰中可以找到結核菌者。

(3) 用高度稀釋的結核菌素液 (1:10,000 以上) 施行結核菌素試驗呈陽性者。

(4) 病灶部位聽診發現比較恆定的濕性囉音者。

(5) 伴有較顯著的中毒症狀者。

表 5 臨床病例的血凝反應滴定度

組 別	總 人 數	滴 定 度 (人 數)										
		陰 性					陽 性					
		<1:4	1:4	1:8	1:16	%	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	%
活 動 性 肺 結 核 組	77	0	0	3	8	14.2%	18	23	16	7	2	85.8%
非活動性肺 結 核 組	27	2	2	10	10	88.8%	3	0	0	0	0	11.2%
結核性滲出 性胸膜炎	5	0	2	1	1	80%	1	0	0	0	0	20%
非 結 核 性 肺 疾 患	3	0	1	2	0	100%	0	0	0	0	0	0%
麻 風 (類結核型)	5	0	0	1	0	20%	0	2	0	2	0	80%
健 康 人	43	13	13	7	7	90.7%	4	0	0	0	0	9.3%

(二) 非活動性肺結核組：計 27 人，診斷上具備下列條件者，歸入本組。

(1) X 射線檢查所見，沒有空洞，病變已經纖維化或鈣化，進入硬結期，或病灶陰影較硬，較長時間（6 個月以上）呈穩定狀態者。

(2) 反覆用各種細菌學方法檢查痰或胃液，均屬陰性者。

(三) 健康人組：計 43 人，長期自覺健康，X 射綫檢查證明無活動性病變發現者，其中 5 例為初生兒臍帶血液。

根據各例血凝的滴定度，加以統計，所得結果如表 5。

若以被檢血清的滴定度 1:32 為陽性時，則可從表 5 看出活動性肺結核病例組之陽性率為 85.8%，非活動性肺結核組所佔的陽性率為 11.2%，而健康人組的陽性率為 9.3%，其中 5 例初生兒臍帶血概為陰性（在 1:4 的血清稀釋倍數，也不出現凝集反應）。

此外，我們更檢查了 5 例結核性胸膜炎，其中僅 1 例為 1:32，陽性率 20%。在 3 例非結核性肺疾患中（包括肺膿瘍 1 例、枝氣管擴張症 1 例及原發性異型肺炎 1 例），其滴定度均在 1:8 以下。同時也附帶檢查了 5 例類結核型麻風（臨床症狀、病理切片檢查證實者），結果 1 例的滴定度為 1:8，兩例的滴定度為 1:64，另兩例的滴定度為 1:256，陽性率為 80%。

我們再根據蘇聯的肺結核分類法，在表 5 所列的肺結核 104 例（活動性肺結核 77 例，非活動性肺結核 27 例）中，按照期別歸類，再加以統計分析，結果在浸潤期、溶解播散期及好轉吸收期之病例，其血凝反應陽性率，均在 80% 以上，而病灶進入硬結期時，則陽性率低至 13%。各期病例血凝滴定度，詳細統計如下表：

表 6 各期肺結核病例血清的血凝滴定度

期 別	總 人 數	血 凝 滴 定 度 (人 數)										
		陰 性					陽 性					
		<1:4	1:4	1:8	1:16	%	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	%
浸潤或進 展	23	0	0	1	3	17.4%	2	11	3	2	1	82.6%
溶解或播 散	11	0	0	0	2	18.1%	3	1	2	3	0	81.9%
好轉吸收期	47	0	0	4	5	19.1%	13	11	10	3	1	80.9%
硬 結 期	23	2	2	8	8	87%	3	0	0	0	0	13%

總 結

1. 應用乙醇沉澱法，從國產舊結核菌素中提出了不引起溶血而可使血球致敏的“全沉澱”、“沉澱 I”及“沉澱 II”三種抗原物質。這三種抗原物質都可與結核病人血清發生血球凝集反應，其中以“沉澱 II”的敏感性最高。並由健康人及結核病人的對照試驗，初步決定具有診斷意義的滴定度為 1:32。

2. 由“沉澱 II”所致敏的羊血球與接種人型結核桿菌 H₃₇RV 及接種卡介苗之豚鼠分別進行血凝試驗。各實驗動物，在未接種前，血凝試驗均呈陰性，在接種後第四週則都出現陽性反應，且接種有毒的人型結核桿菌 (H₃₇RV) 之第一組動物之血凝滴定度高於接種卡介苗的第二組。

3. 由舊結核菌素 1 毫升取得的“沉澱 II”，用來致敏血球時的適宜濃度，是以 3 毫升的緩衝生理鹽水溶解之後，加入洗滌過的壓積血球 0.25 毫升為合適。

4. 在 160 個臨床病例的統計中，肺結核病例的血凝試驗，活動性肺結核所佔陽性率為 85.8%；非活動性肺結核陽性率為 11.2%；健康人組的陽性率為 9.3%。全部肺結核病例，若依照蘇聯分類法以期別歸類來分析，則見浸潤期、溶解或播散期、好轉吸收期的病例，陽性率均在 80% 以上，而硬結期病例的陽性率，僅佔 13%。

本文承我科陳少伯教授、金錦仁教授暨全體教研組同仁指正，並承我院內科學系楊玉醫師代為分析病例，章谷生醫師及劉鳳萱同志在技術上的協助，謹此一一致謝。

參 考 文 獻

- [1] Middlebrook, G. and Dubos, Rene J. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 88: 521, 1948.
- [2] Scott, N. B. and Smith, D. T. A simple modification of the Middlebrook-Dubos hemagglutination test for serum antibodies to products of tubercle bacilli. *J. Lab. and Clin Med.* 35: 303, 1950.
- [3] Rothbard, S., Dooneiff, R.S. and Hite, K.E. Practical application of a hemagglutination reaction of tuberculosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 74: 72, 1950.
- [4] Gernez-Rieux and Tacquet, A. Reaction d'hémagglutination pratiquées comparativement avec l'antigène type Middlebrook et Dubos et avec la tuberculine précipitée. *Ann. Inst. Pasteur* 78: 550, 1950.
- [5] Hilson, C.R.F. and Elek, S. D. The hemagglutination reaction in tuberculosis. *J. Clin. Path.* 4: 158, 1951.
- [6] Adcock, J. The Middlebrook hemagglutination test for tuberculosis. *Te J. Lab. and Clin. Med.* 38: 736, 1951.

- [7] Hentel, W. and Guilbert, G. D. Results in the hemagglutination test for tuberculosis. *J. Lab. and Clin. Med.* **39**: 426, 1952.
- [8] Pound, Allan, W. Observations on the agglutination and hemolysis of red cells treated with extracts of *Mycobacterium tuberculosis*: An evaluation of method. *J. Path. and Bact.* **54**: 131, 1952.
- [9] 張學德、蔡如升、丘福禧：紅血球凝集試驗在結核病診斷方面之應用。中華結核病科雜誌，1953 年第二號第 99 頁。
- [10] 中央人民政府衛生部防癆醫師進修班編：防癆醫師進修講義。1953 年。
- [11] 陳少伯、倪斌、章谷生：結核桿菌感染的抗體產生和變態反應的關係。未發表。（所列動物試驗，大部分引自此實驗資料）。

USE OF ALCOHOL PRECIPITATED FRACTION OF OLD TUBERCULIN (OT) FOR TUBERCULOSIS HEMAGGLUTINATION REACTION

YI P. AND SUNG C. H.

Department of Microbiology, Kiangsu Medical College

1. By the use of alcohol precipitation method, OT was divided into three fractions: 90% fraction, from which two further precipitations were prepared—one, by 50% precipitation of the redissolved sediment, and the other, by 84% precipitation of the same. After these fractions have been used to sensitize red blood cells, either human or sheep, it was found that the 84% fraction showed the greatest specificity and sensitivity in reacting with sera from tuberculous patients, and with blood sera from guinea pigs artificially infected or vaccinated with BCG.

2. After various experimentation, it was found that 1 ml 84% secondary fraction dissolved in 3 ml of buffered saline is most suitable for the sensitization of 0.25 ml of packed erythrocytes.

4. This precipitated fraction of OT has been used as sensitizing agent for human group O cells and employed as antigen for tuberculous hemagglutination test on 160 specimens collected from various types of individuals. It was found that among 77 active pulmonary tuberculous patients, 85.8% of the sera gave positive reaction, among 27 inactive pulmonary tuberculous patients, 11.2%, and among 43 healthy individuals 9.3% gave positive reaction.