

痢疾桿菌O抗原的血凝試驗*

吳開宇 鄭國槐

(福建省流行病研究所)

自1948年Keogh等氏提出細菌多醣類抗原吸附紅血球報告后^[1],紅血球凝集反應在傳染病研究中的应用,逐漸被醫學界所重視。近年來在鼠疫^[4]、傷寒^[5]、土拉菌病^[6],以及大腸菌屬^{[7][8]}等抗原所致敏赤血球的血球凝集反應與血凝抑制試驗,已有不少文獻報導,但有關痢疾桿菌O抗原的血凝與血凝抑制試驗的報導尚少。我們曾用福氏及宋內氏型的痢疾桿菌,制成粗制O抗原,進行血凝及血凝抑制試驗;觀察其特异性與敏感性,以作尋找痢疾快速診斷方法的基础。經一系列試驗結果,初步發現痢疾菌煮沸粗制O抗原致敏的紅血球凝集試驗,其特异性與敏感性均很高,不次于細菌凝集反應;且方法簡便。

材 料

(一) 菌株:

- (1) 本所菌種室保存;包括福氏、宋內氏痢疾桿菌及副傷寒甲、乙、丙與大腸桿菌等。
- (2) 自病人分離的福氏及宋內氏痢疾桿菌。

(二) 抗原: 其制备方法如下:

將各型痢疾桿菌或副傷寒各型桿菌的18—24小時瓊脂上的培養物,用生理鹽水洗下,使每毫升含20億濃度;然後加熱煮沸2小時。離心,於沉淀中加入原量生理鹽水;洗滌3次^[9],最後一次棄上清液加入等量pH6.4緩沖鹽水搖勻備用作血凝試驗抗原。

(三) 紅血球: 以無菌手續抽取“O”、“A”、“B”、“AB”等型人的血球;及雞、兔、豚鼠的血液,加入於1:2倍容積血球保存液中^[9]。應用時先將紅血球用pH6.4緩沖鹽水洗滌3次,每次離心速度為每分鐘1,000—1,500轉,離心3—5分鐘,然後將緊壓的血球加入緩沖鹽水中配制成血球懸浮液。

(四) 血清:

1. 診斷血清系用上海生物制品所製,因子血清系用大連生物制品所製。
2. 免疫血清: 系用捷克標準福氏型痢疾菌株免疫家兔製成。
3. 正常血清: 兔血清,經檢查不含有天然痢疾或沙門氏菌屬的抗体者。

以上血清試驗前,經56°C加熱半小時后用pH6.4磷酸鹽緩沖鹽水稀釋成各種不同濃度。

(五) 稀釋液: 制备抗原,洗滌紅血球及配制紅血球懸液均系採用磷酸鹽系統不同pH值的緩沖生理鹽水。系按表1制配緩沖液,加食鹽以高壓蒸汽滅菌。

* 1958年1月22日收到。

表 1 不同 pH 值的緩冲溶液配法

pH	6.0	6.4	6.8	7.2	7.6	8.0
M/15 磷酸鈉溶液(毫升)	12.2	26.7	49.6	72.0	87.0	94.7
M/15 酸性磷酸鉀(毫升)	87.8	73.3	50.4	28.0	13.0	5.3

方 法

(一) 紅血球致敏法: 將緊壓血球加入于每毫升含有 20 億細菌的煮沸粗制抗原中, 使成 2.5% 血球懸液混勻置 37°C 溫箱中 2 小時, 并經常振動, 然后离心, 离心速度为每分鐘 500—1,000 轉, 3—5 分鐘, 弃上清液, 于沉淀血球中加原量 pH6.4 緩冲鹽水再洗滌 3 次, 最后加入原量稀釋液使成 2.5% 血球懸浮液。

(二) 血凝試驗: 先将 12 × 75 毫米試管經清潔液洗洁烤干备用。用不同稀釋度的診斷血清或免疫血清与煮沸粗制“O”抗原致敏的紅血球作血凝試驗。血清稀釋度从 1:160 开始, 共十管, 連續倍量稀釋之。每管中順序加入血清 0.5 毫升, 2.5% 抗原致敏的血球 0.05 毫升, 使每管血球浓度成 0.25%, 混勻后, 放入 37°C 溫箱中 2 小時, 观察結果; 以含最高稀釋度血清的試管中有完全血凝現象者为該血清的血凝滴定度。

(三) 細菌凝集反应: 同一般方法。

試 驗 結 果

(一) 不同紅血球的血凝試驗: 將痢疾桿菌 O 抗原致敏的人类“O”、“AB”、“A”、及“B”型血球, 及鷄等动物的血球; 与福氏診斷血清作血凝反应, 結果以人及鷄的血球較好。見表 2。

表 2 福氏痢疾菌“O”抗原致敏的不同血球与福氏血清的血凝反应

血清稀釋度 血球		1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:40960	对照
		人	“O”型	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
血 球	“A”型	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	—	—
	“B”型	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	—	—
	“AB”型	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	—	—
鷄		4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	—	—
兔		4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	±	—	—
豚鼠		4+	4+	3+	3+	3+	2+	—	—	—	—

註: 4, 3, 2, 1 为不同凝集程度。

(二) 不同 pH 对痢疾桿菌 O 抗原的血凝影响: 我們比較了 pH6.8—8.0 各种不同 pH 的緩冲鹽水作稀釋液, 所作的血凝反应結果, 認為以 pH6.4 为最好, pH7.2—7.8 次之, pH6.0 以下及 8.0 会降低血凝价。因此决定用 pH6.4。

(三) 致敏与正式試驗中所用紅血球懸浮液的不同浓度試驗: 血球懸液浓度太高时, 試驗結果的敏感度下降; 太低时則結果不易观察, 在痢疾血凝試驗上那种浓度較为适合, 特作了比較, 結果認為以 0.25% 为最好, 詳見表 3。

表 3 福氏痢疾抗原致敏的不同浓度血球与福氏血清的血凝反应

血清稀浓度 红血球浓度	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:40960	对照
0.25%	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	—	—
0.5%	4+	4+	4+	4+	4+	2+	—	—	—	—
1.0%	4+	4+	4+	4+	1+	—	—	—	—	—
2.0%	4+	4+	4+	±	—	—	—	—	—	—

(四) 红血球致敏不同时间的比较: 我们比较了在 37°C 致敏 1、2、3 小时的结果, 认为致敏 2 小时为最好。因此我们试验均用 2 小时。

(五) 全抗原(煮沸 2 小时未加离心的细菌悬液), 沉淀抗原与上清液抗原致敏的血凝试验比较: 我们用加热煮沸 2 小时不加离心的粗制抗原, 及加以离心的上清液部分与沉淀部分抗原所致敏血球作血凝试验以比较其结果:

全抗原不如沉淀或上清液抗原; 而上清液与沉淀部分抗原的血凝试验结果无显著差别。

(六) 血凝试验的特异性: 用若干痢疾与沙门氏免疫血清与以粗制痢疾(福氏与宋内氏型) O 抗原致敏的红血球做血凝试验, 同时用福氏及宋内氏型痢疾杆菌的煮沸抗原与上述免疫血清作细菌凝集试验; 比较结果见表 4。

表 4 福氏与宋内氏痢菌“O”抗原的血凝试验与细菌凝集试验特异性的比较

不同免疫血清	各种免疫血清对本菌的原始凝集度	各种免疫血清对痢疾抗原致敏的红血球的凝集度	
		福氏	宋内氏
福氏痢疾	1:640	1:10240	1:80
宋内氏痢疾	1:640	<1:40	1:5120
付伤寒甲	1:640	<1:40	1:40
付伤寒乙	1:1280	<1:40	1:40

由表 4 可知痢疾的血凝试验有很高的特异性且比细菌凝集敏感 (8—16 倍)。

(七) 血凝试验的敏感性: 用不同稀释度抗原之致敏血球与不同稀释度的抗体作血凝试验; 各管中加入痢疾诊断血清 0.5 毫升, 2.5% 抗原致敏的血球 0.05 毫升, 使每管浓度成 0.25%, 结果见表 5。

从表 5 可知, 血球凝集的敏感度要比细菌高, 当细菌凝集价 1:640 时, 这血清的血凝度即达 1:5120。另一方面, 抗原致敏度福氏型痢菌为 1:256, 宋内氏型痢菌为 1:128。

(八) 血凝试验对福氏型及亚型的特异性试验: 以福氏 II₂ 型及宋内氏型的免疫血清对各型痢疾菌株“O”抗原致敏的红血球作凝集反应, 结果见表 6。

从表 6 说明了血凝反应对痢疾菌型有一定的特异性, 福氏 II₂ 免疫血清对福氏 I—IV 型抗原致敏的红血球均现不同高度凝集, 尤其对 II 型, 而对宋内氏抗原致敏血球在 1:160 以上无交叉凝集现象。同样在宋内氏免疫血清组中, 对本菌抗原致敏血球亦呈高价凝集, 而对福氏各型抗原仅呈 1:160—320 间低浓度, 中等度凝集的现象。

(九) 多价抗原在血凝反应上是否仍保持它原有特异性的问题, Neter 氏在 1956 年

表 5 粗制福氏型及宋内氏型痢菌 O 抗原的血凝試驗敏感度

相应致敏抗原精释度	1:160		1:320		1:640		1:1280		1:2560		1:5120		1:10240		1:20480		1:40960		对照	
	血清种类		血清种类		血清种类		血清种类		血清种类		血清种类		血清种类		血清种类		血清种类			
	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S		
未精释*	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:8	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:16	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:32	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:64	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:128	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:256	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
1:512	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
細菌凝集	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—

註：F: 福氏型。 S: 宋内氏型。 * 未精释抗原为一斜面培养基用 5 毫升盐水洗下的菌液浓度。

表 6 痢疾血凝試驗对型的特异性試驗

紅血球致敏抗原种类	福氏 II _a 型 免 疫 血 清												宋内氏型 免 疫 血 清												
	紅血球凝集反应						細菌凝集反应						紅血球凝集反应						細菌凝集反应						
	1	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	80	160	320	640	1280
福氏 I _a	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
I _b	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
II _a	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
II _b	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
III	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
IV	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
V	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
VI	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
X	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Y	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
宋内氏	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
盐 水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

已經肯定了这問題^[12]。作者同样按本文方法将福氏型、宋內氏型痢菌，副伤寒乙菌及 O₁₁₁ 大腸桿菌的抗原各吸 1.5 毫升混勻后，加入血球致敏，同时将以上抗原各吸 1.5 毫升分別加入盐水 4.5 毫升作为单价对照；二者結果在敏感度上无明显差别，且仍保持了原有的特异性，这样也更有力的說明了应用大便培养物粗制 O 抗原对各型痢疾血清作血凝反应在診斷上应用的可能性。

討 論

据以上試驗結果，痢疾桿菌煮沸粗制 O 抗原同样是可以吸附于紅血球表面，这种紅血球对各型痢疾的抗体；均可产生特有的紅血球凝集現象。

HA 試驗所用的紅血球；大多是用 O 型健康人或綿羊的血球，据本文試驗結果；如不是用来測定病人血清中特异抗体；而是用已知診斷血清与大便培养物粗制 O 抗原致敏紅血球的 HA 則任何型人的血球均可应用，这样便提出在实际操作上更加方便的条件。

关于血凝試驗所用紅血球悬液的浓度；有 0.5%^[2,4,9]、1%^[5,7,10]等不同方法，但据本文試驗結果，我們认为以 0.25% 为最佳；如浓度增加，它的敏感度反而下降。

稀释液所需的 pH 問題，6.4—7.8 均可，但以 6.4 为最佳。因此我們认为在有条件的实验室，pH 可用 6.4；在无条件时；一般盐水即可应用。

关于抗原不同部分或不同方法制备所致敏紅血球的 HA 試驗；方法各有主张，有的用煮沸后上清液部分^[5,12]，有的学者是用沉淀抗原^[5]，但据本文試驗結果，在痢疾方面；全抗原不如上清液或沉淀抗原；而上清液抗原与沉淀抗原的 HA 結果，无显著差别，但在 HAI 方面，上清液是要比沉淀抗原更为敏感；几乎大它 4 倍。因此 HAI 方面的試驗还是用上清液抗原較好，而 HA 則二种方法均可。

用血凝法检查抗体要比細菌凝集法敏感。同样的，从表 4 可說明了其他各型的痢疾血凝試驗，也同样是比较細菌凝集的敏感度大 8—16 倍。从表 5，可知当致敏抗原的稀释度超过一定程度时；免疫血清对它的凝集度即渐下降。当致敏抗原稀释至 1:64 至 1:256 时，对福氏或宋內氏血清的 HA 仍呈高价凝集，这点也可以进一步說明了血凝是比较細菌凝集更加敏感。表 6 又进一步証明了它对痢疾各属各型均有一定的特异性。

結 論

1. 本文报告福氏及宋內氏痢疾桿菌煮沸粗制 O 抗原的 HA 的試驗操作方法，并加以評述。

2. 痢疾 HA 試驗具有很高的敏感性与特异性，比細菌凝集大 8—16 倍，且尚具有一定属及型的特异性。

参 考 文 献

- [1] Keogh, E. V. etc.: *Natures*, 161: 687, 1948.
- [2] T. H. Chen: *J. Immunology* 69: 587, 1952.
- [3] Warburton, M. F. etc.: *Med. J. Aust.*, 1: 135, 1949.
- [4] George Heller, Abtaham S. J. etc.: *J. Immunology*, 69: 27 (No. 1), 1952.
- [5] 林飞卿等: 上海第一医学院学报, 3: 161—166, 1957.

- [6] Wright G. G. & Feinberg R. J.: *J. Immunology*, **68**: 65 1952.
[7] Floyd W. Denny, JR. & Lewis Thomas: *J. Clinic Invest.*, **32**: 1087, 1953.
[8] 鈴木武夫: 北里メヂカルニューズ月刊, **28**: 6 昭和 31 年 9 月。
[9] 陶义訓: 中华卫生生什誌, **4**: 296, 1955.
[10] Landy, M.: *Am. J. Pub. Health*, **44**: 1059, 1954.
[11] E. Neter etc.: 微生物学文摘, **1**: 12, 1957.
[12] Erwin Neter: *J. Immunology*, **20**: 175, 1956.

ON HEMAGGLUTINATION TEST WITH "O" ANTIGEN OF THE SHIGELLA GROUP

WU KAI-YU AND CHENG KUO-KUEI

(Provincial Research Institute for Epidemiological Diseases, Fukien, China.)

The sensitizing antigen was prepared from 18—24 hours growth on agar which was washed off with sterilized and buffered normal saline. The supernatant fluid and the sediment were separately collected to serve as the antigen. Original dilution of the sediment contains 2.0 billion bacteria per ml., and this dilution was maintained up to the actual test. Human or animal red cells were sensitized with serial dilution of the above antigen. On performing the actual tests, antibody dilution method was employed.

As a result of our experiments, HA test showed its superiority over ordinary agglutination reaction in being more sensitive and more specific. The sensitivity, in terms of titres of the immune sera, has been raised 8—16 folds, and type specificity as well as group specificity has been demonstrated.

Regarding the sensitizing ability, no material difference had been observed between the supernatant and the sediment. It was considered that at least a portion of the antigen is water soluble and all thermostable. Boiling of the antigens for two hours is essential.

All four groups of human erythrocytes can be employed instead of "O" group alone. However, if unknown sera are to be tested against known antigen, "O" cells should be used in order to avoid false positive reactions. Red blood corpuscles of rabbit, of guinea pig and of chicken have been found to serve our purpose. A final suspension of 0.25% of red blood cells is the optimum concentration.