

钩端螺旋体(三宝垄群巴托型)耐热、耐碱性 红血球致敏物质用于血凝试验的研究

邢念义

(中国人民解放军济字二四九部队, 济南)

我们从钩端螺旋体(三宝垄群巴托型)中提出一种耐热性、耐碱性红血球致敏物质(FSS), 并进行了血凝试验的研究。初步发现这种物质可使绵羊红血球致敏。致敏后的红血球能与相应的免疫血清发生血凝反应。

三宝垄群巴托型钩端螺旋体血清与其它型红血球致敏物质抗原的血凝试验, 具有较高的敏感性和一定的型特异性, 除与钩端螺旋体的独立群独立型和澳洲群巴力科型有一定的凝集价外, 与其它8个群钩端螺旋体代表型均不产生凝集。由此提供了用这种抗原物质作钩端螺旋体抗原型鉴定的可能性。

钩端螺旋体红血球致敏物质血凝试验受温度、红血球浓度及红血球致敏时间等因素的影响而使血凝增强或减弱。

目前, 在实验室中对钩端螺旋体病进行诊断尚有一定困难, 为建立一种较好的实验室诊断方法我们进行了一些研究。

1953年张氏(Chang)等^[1-3]首先用碱经过加热处理, 从斑疹伤寒普氏立克次氏体卵黄囊培养物及落机山斑疹热的培养物中提出一种耐热性、耐碱性多糖物质。这种物质能使人的“O”型血球及绵羊红血球致敏, 致敏后的红血球和相应的免疫血清及病人血清产生血凝反应。我国李在连从普氏立克次氏体鼠肺疫苗中提取红血球致敏物质, 应用到斑疹伤寒病人的临床诊断上^[4], 朱锡华和吴开宇等分别从乙型脑炎病毒^[5]和痢疾杆菌^[6]制备抗原, 并进行了血球凝集实验, 结果说明有高度的特异性及敏感性。在血清学诊断上效果是令人满意的。

本文报道钩端螺旋体含有的一种耐热、耐碱性多糖物质, 用于红血球凝集试验, 其特异性和敏感性较高。

材料和方法

一、菌株: 犬、沃尔登、蔡弄尼、流感伤寒、秋季、巴力科、波蒙那、七日热、巴托、独立和巴达维亚等11个群11个代表型, 均系中国医学科学院流行病学防治研究所赠。所有菌株于切尔斯基(Терский)培养基中加入0.2%琼脂制成半固体保存。

二、免疫血清: 在切尔斯基培养基内培养后制成免疫原给家兔作免疫注射。所制造之血清用凝集溶解方法测定效价为1:51200, 然后加1:10000硫柳汞灭能, 于4℃下保存。

三、抗原: 将11个代表型钩端螺旋体菌株, 分别接种于切尔斯基培养基内, 放28℃孵育7—10天, 每高倍镜视野(450倍)含100条以上时进行离心沉淀(4500RPM, 30分钟)。弃去上清液, 将沉淀物按原量浓缩10倍, 加入0.25%福尔马林磷酸盐缓冲液(含0.9%氯化钠), pH 7.2, 摇匀放37℃1小时, 置冰箱保存。

四、红血球致敏物质的提取: 取浓缩抗原,

本文1973年3月27日收到。

按 9:1 比例加入 2N NaOH, 放 100°C 下加热 60 分钟, 然后装入玻璃纸袋中, 于 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中透析 16 小时。取出将固体物离心除掉, 取上清液。

五、绵羊红血球: 取脱去纤维蛋白红血球, 以生理盐水离心(2,000 RPM, 5 分钟)沉淀洗涤 3 次。

六、方法: 红血球致敏是取钩端螺旋体多糖质抗原按 1:20 (抗原 19 份, 红血球 1 份) 加入压, 积红血球, 置 37°C 水浴中 2 小时, 每 20 分钟摇荡 1 次。离心沉淀(2,000 RPM), 弃去上清液, 再以磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 配成 1% 之红血球悬液。血凝试验操作方法是取清洁康氏试管 8 支, 血清自 1:20 至 1:1280 全部用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液

作倍比稀释, 每管余 0.5 毫升稀释的血清, 加入致敏红血球 0.05 毫升, 摇荡数分钟, 置 37°C 水浴中 2 小时, 取出观察血凝反应。

试验结果

一、影响血凝试验的因素

红血球致敏时间、红血球浓度及温度对钩端螺旋体血凝试验有一定影响(表 1)。红血球致敏时间太短, 致敏不完全, 太长会延长血凝试验的观察时间。从试验结果看出, 1 小时内红血球未能完全致敏, 2 小时即完全致敏, 时间再延长则与 2 小时的致敏结果没有区别。

表 1 红血球致敏时间、红血球浓度及温度对血凝试验的影响

项 目	血 凝 反 应 滴 度							对 照	
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280		
红血球致敏时间 (小时)	1	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
	1.5	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	2.5	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	3	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
红血球浓度 (%)	0.125	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	0.25	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	0.5	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
	1.0	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
温 度 (°C)	28	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
	37	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	45	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-

“-” 血凝反应阴性, “+++” 血凝反应强。

巴托型钩端螺旋体免疫血清和其抗原在同一条件下进行试验, 比较了 4 种不同绵羊红血球浓度对血凝试验的影响, 发现浓度在 0.125% 时血凝反应结果不易判定, 在 0.5% 及 1% 时则降低血凝滴度易出现阴性结果, 0.25% 左右浓度较为适宜。

观察了 28、37 及 45°C 三种不同温度对钩端螺旋体血凝试验的影响, 发现在 37°C 温度作用下血凝试验结果较好。同样在 37°C, 用水浴试验较孵箱内的结果更好。

如果再置 4°C 放 2 小时, 其结果更易观察。

二、钩端螺旋体血凝试验的敏感性

将提取之各型钩端螺旋体红血球致敏抗原从原液开始继 1:2—1:128 作倍比稀释分别致敏绵羊红血球, 然后与巴托型钩端螺旋体免疫血清作血凝试验(表 2)。从表 2 看出, 该红血球致敏抗原的血凝试验敏感性较强, 从原液至 1:8 稀释度完全相同, 1:16 之后随抗原稀释度的增加而血凝试验的敏感性减弱。实际血凝试验时用 4

表 2 钩端螺旋体红血球致敏物质抗原血凝敏感性

抗原稀释度	血 凝 反 应 滴 度							对 照
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
原液	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
1:2	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
1:4	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
1:8	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
1:16	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
1:32	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
1:64	+++	+++	++	++	+	-	-	-
1:128	+++	++	++	±	-	-	-	-

个血凝单位,正式试验时作 1:8 稀释。

三、红血球致敏物质的特异性

应用 ESS 抗原做血凝试验,研究钩端螺旋体之间的抗原关系,对于钩端螺旋体的实验室诊断以及菌株的群、型鉴定问题是非常重要的。将巴托型钩端螺旋体血清与其它型红血球致敏物质抗原做血凝交叉试验,从结果(表 3)很明显地看出,巴托型钩端螺旋体的血凝反应有一定的型特异性。除了与独立群独立型(1:40++)和澳洲群巴力科型(1:20+)有较低血凝反应外,与其他 8 个群的代表型(自 1:20—1:1280 稀释度)均无交叉血凝反应。

四、红血球致敏物质的属特异性

钩端螺旋体血凝试验与其他菌属细菌有无交叉血凝反应,在实验室诊断上也是非常重要的。用巴托型钩端螺旋体红血球致敏物质抗原致敏红血球与肠道中主要几种致病菌免疫血清做了属的特异性血凝试验。从结果得知,伤寒沙门氏菌“O”、“H”,副伤寒沙门氏菌甲、乙、丙及痢疾多价免疫血清(包括痢疾志贺氏菌 1、2 型,福氏痢疾多价及宋内氏菌),与巴托型钩端螺旋体红血球致敏物质抗原的血凝试验在 1:20—1:640 均为阴性反应。由此说明巴托型钩端螺旋体红血球致敏物质和伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌甲、乙、丙及痢疾菌属菌没有抗原关系,证明有高度的属特异性。

表 3 钩端螺旋体巴托型免疫血清和其它型红血球致敏物质抗原的血凝反应

抗 原			血 凝 反 应 滴 度							对 照
菌 群	菌 型	其它	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
犬	犬		-	-	-	-	-	-	-	-
黄疸出血	沃尔登		-	-	-	-	-	-	-	-
致热	蔡弄尼		-	-	-	-	-	-	-	-
流感伤寒	流感伤寒		-	-	-	-	-	-	-	-
秋季	秋季		-	-	-	-	-	-	-	-
澳洲	巴力科		+	-	-	-	-	-	-	-
波蒙那	波蒙那		-	-	-	-	-	-	-	-
七日热	七日热		-	-	-	-	-	-	-	-
三宝垄	巴托	水生	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
独立	独立	水生	+++	++	-	-	-	-	-	-
巴达维亚	巴达维亚		-	-	-	-	-	-	-	-

讨 论

我们依照张氏^[1,2]的方法对钩端螺旋体作了红血球凝集试验研究,结果证明,从钩端螺旋体中提取的这种红血球致敏物质(ESS),在钩端螺旋体抗原抗体免疫反应上具有较高的敏感性和一定特异性,从而为钩端螺旋体快速诊断提出一种新的可能的方法。

经我们提取的红血球致敏物质,纯度高、抗原含量高,可以干燥保存,在一般实验室条件下应用较方便,也比其他钩端螺旋体血清学诊断方法操作简单,而且时间快4—5倍,可能适用于临床诊断和流行病学调查。由于此抗原物质具有一定的型特异性,因而提供了用此种抗原作巴托型钩端螺旋体鉴定的可能性。但巴托型钩端螺旋体为水生菌,仅与独立型钩端螺旋体(水生菌)有一定的抗原关系,与巴力科型有很微量(1:20+)抗原关系,与其他各型钩端螺旋体(1:20—1:1280)则无抗原关系(表3)。因此,水生钩端螺旋体是否属于一个独立的抗原菌群?而其他钩端螺旋体则属于另外的一个抗原菌群?所以,关于钩端螺旋体血凝抗原的各型特异性及其之间的抗原关系问题,需要作深入细致地研究,这对于解决该菌的菌型鉴定问题有着重要的意义。

血凝试验取决于抗原物质的好坏,采

取那种方法提取最好的抗原物质,对于解决实验室诊断问题甚为重要。考克斯(Cox)^[7]及麦克姆(McComb)^[8]以酒精或酒精加牛胆酸钠提出一种能使红血球致敏的物质,用于钩端螺旋体血凝试验或溶血试验。近年今村(Imamura)^[9]用钩端螺旋体抗原,作了间接血凝实验研究。博格-彼得森(Borg-Petersen)^[10]在黄疸型钩端螺旋体内发现一种不稳定的热性抗原。我们从巴托型钩端螺旋体中提出一种耐热性、耐碱性物质,这种物质可使红血球致敏与相应的免疫血清发生血凝反应,并且具有较高敏感性和一定的型特异性,结果是比较满意的。

参 考 资 料

- [1] Chang Shin-man: *J. Immunol.*, 70:212—214, 1953.
- [2] Chang Shin-man, Snyder, J. C. and Marray, E. S.: *J. Immunol.*, 70:215—221, 1953.
- [3] Chang Shin-man, Marray, E. S., and Snyder, J. C.: *J. Immunol.*, 73:8—15, 1954.
- [4] 李在连: *微生物学报*, 9:71—75, 1963.
- [5] 朱锡华: *微生物学报*, 3:63—75, 1955.
- [6] 吴开宇,郑国槐: *微生物学报*, 7:82—87, 1959.
- [7] Cox, C. D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90:610—615, 1955.
- [8] McComb, D. E.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 6:9—100, 1957.
- [9] Imamura, S. et. al.: *Jap. J. Hyg.*, 25:360, 1970.
- [10] Borg-Petersen, C.: *Trop. Geogr. Med.*, 23:282, 1971.

APPLICATION OF AN ERYTHROCYTE SENSITIZING AND HEAT AND ALKALI STABLE SUBSTANCE OF *LEPTOSPIRA* OF SEROGROUP *SEMARANG*, SEROTYPE *PATIC* TO THE HEMAGGLUTINATION TEST

HSING NIAN-I

(No. 249 Unit under the Tsinan Command of the Chinese People's Liberation Army)

From *Leptospira* of Serogroup *Semarang*, Serotype *Patic*, the author has extracted an erythrocyte sensitizing substance (ESS) which is stable to both heat and to alkali to be used in the hemagglutination test (HT). It has been found that this ESS could sensitize the red blood cells of the sheep and that the sensitized cells are capable of reacting with the corresponding immune sera, resulting in agglutination.

High sensitivity and some definite type specificity were demonstrated in the hemagglutination test performed with sera of *Leptospira* of Serogroup *Semarang*, Serotype *Patic*. This ESS was

found to have some antigenic relationship with *Leptospira* of *Independent* type (to a titre of 1:40) and type *Ballico* (1:20—1:1280), but no relationship with the other eight kinds of *Leptospira*. Hence it suggests the possible use of this antigenic substance in the type identification for *Leptospira*.

It is to be noted that a variety of factors, such as temperature, the concentration of red blood cells and the time taken to sensitize the cells exert definite enhancing or inhibiting influence on hemagglutination reaction herewith described.