

钩端螺旋体炭凝集试验的研究

III. 钩端螺旋体炭抗原制备方法

鲍行豪 顾全明

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

本文对钩端螺旋体炭抗原制备方法作了初步研究。试验证明, 制备炭抗原的钩端螺旋体以浓缩 50 倍并用超声波击碎为好, 吸附方法以超声波处理、温度在 20℃ 以上作用 15 分钟吸附 1 次为佳。

浓缩抗原制备时, 用生理盐水洗去培养基中兔血清极为重要, 少量兔血清可影响活性炭对抗原吸附。而吸附完成后必须加入正常兔血清来消除活性炭自凝。

钩端螺旋体炭抗原中以波摩那群波摩那型(罗株)敏感性较高, 除与相应免疫血清呈高滴度凝集外, 尚能与 12 群 13 型免疫血清发生交叉凝集反应, 故具有属特异性。对 1:100 以下滴度显微镜凝集试验抗体的人血清, 亦起明显凝集反应。

炭抗原的抗原性是稳定的, 冰箱(4℃)保存 8 个月, 室温(28℃ 以下)保存 90 天, 抗原性没有改变。

前已报道^[1,2]用钩端螺旋体免疫炭血清作菌株快速鉴定。是否可用钩端螺旋体炭抗原作炭凝集试验来测定病人血清中抗体, 有必要作进一步探索。

钩端螺旋体炭抗原的炭凝集试验, 是将经处理的钩端螺旋体抗原吸附于活性炭微粒上, 用此种带有抗原物质的活性炭微粒与相应抗体作用, 观察活性炭微粒的凝集, 来判定检材中的抗体存在。本文通过对钩端螺旋体炭抗原制备方法的研究, 探索炭抗原制备的条件。

材料与方 法

一、菌株

黄疸出血群沃尔登型(赖株)、波摩那群波摩那型(罗株)系本站实验室保存的国内标准菌株。Patoc I 菌株系中国医学科学院流行病学防治研究所赠给。

二、免疫血清

系用国内标准 13 群 14 型钩端螺旋体菌株和 Patoc I 菌株免疫家兔获得, 其滴度均在 1:6400 以上。

三、活性炭

上海化学纯活性炭(新中国化学厂出品, 批号 642), 使用前 100℃ 干烤 8 小时。

四、CSF-1A 超声波清洗机

上海超声波仪器厂出品, 最大输出功率 250 瓦。

五、钩端螺旋体炭抗原制备

1、抗原制备 将钩端螺旋体标准菌株接种于 8% 正常兔血清磷酸盐培养基或不含兔血清的半综合培养基中, 28℃ 培养 5—7 天, 400 倍暗视野显微镜检查, 每视野不少于 80 条。培养物中加入最终浓度 0.2% 福马林杀菌, 并以每分钟 7000 转离心 30 分钟集菌(也可用 0.2 当量盐酸调节等电点沉淀法集菌), 沉淀菌用生理盐水洗二次, 并用生理盐水作成 50 倍浓缩菌悬液。将此菌悬液置小三角瓶中, 在超声波清洗槽内隔

本文 1974 年 2 月 20 日收到。

水击碎 15 分钟(最大输出功率 250 瓦,清洗槽内水深 3 公分,调节频率至毫安表上 320—340 毫安),取出,采样在暗视野显微镜下检查有无完整菌体,如已全部击碎,取出,每分钟 1000 转离心 5 分钟,除去沉淀,上层液即为抗原。如未全部击碎,可继续击碎 5 分钟。

2、炭抗原制备 取超声波击碎抗原 4 毫升,加研细活性炭 0.2 克,于 20℃ 以上的室温条件下,在超声波清洗槽中隔水作用 15 分钟(条件与抗原击碎时相同)。取出,以每分钟 3000 转离心 5 分钟(上清①液保存,作炭抗原回收用),沉淀炭粒中加 5 滴(0.25 毫升)正常兔血清,充分振荡,使自凝炭粒分散,再加 1% 正常兔血清生理盐水 10 毫升,充分混匀后,以每分钟 500 转离心 2 分钟(沉淀粗炭粒保存),吸出下层液(含有较细炭粒)于另一试管中,继以每分钟 3000 转离心 10 分钟(上清②液保存,作炭抗原回收用)。沉淀细炭粒用 1% 正常兔血清生理盐水洗涤二次,及 1% 硼酸 2%、正常兔血清生理盐水洗涤一次后,将炭粒悬浮于 2 毫升 1% 硼酸、2% 兔血清生理盐水中,即成炭抗原。

3、炭抗原回收 取上述每分钟 500 转离心 2 分钟的沉淀粗炭粒,置研钵中仔细研磨 10 分钟(研磨过程中可加 0.5—1.0 毫升上清①液)后,加入上清②液使炭粒悬浮,再每分钟 500 转离心 2 分钟(粗炭粒保存可继续回收),吸出上层液于另一试管中。经每分钟 3000 转离心 10 分钟(上清液可继续作炭抗原回收用),沉淀细炭粒经洗涤后悬浮于 1% 硼酸、2% 正常兔血清生理盐水中,即为第一次回收炭抗原,如此可将粗炭粒继续反复回收多次,经质量鉴定,合格者均可应用。

六、钩端螺旋体炭抗原的质量鉴定

取相应钩端螺旋体免疫血清,用 1% 正常兔血清生理盐水在塑料板孔内作倍量稀释,取各稀释度血清一滴于清洁载玻片上,最后一滴加 1% 正常兔血清生理盐水作对照,每滴中各加炭抗原一接种环(炭抗原量加入后以深灰色为好),轻轻磨匀,并充分摇动玻片至见不到炭粒沉淀为止。静置 5—7 分钟(盖上培养皿,内放湿棉球,防止干燥),取出,摇动玻片,在强光白色背景或日光灯上方观察结果。如在免疫血清稀释至含有 1:200—1:400 滴度出现“2+”凝集者为合格(例如 1:12800

滴度免疫血清稀释至 32—64 倍能出现“2+”凝集)。

七、炭凝集试验方法

采用玻片定量法,与炭抗原质量鉴定相同。

八、结果判断

“4+”炭粒呈片状凝集,摇动后凝块向液滴边缘扩散;“3+”炭粒明显凝集,液体透明;“2+”炭粒半数凝集,液体尚清;“1+”炭粒大部分散,仅少数凝集,液体不清;“-”炭粒均匀分散,不凝集,或摇动后不凝集炭粒聚集液滴中央,液体不清(见图)。

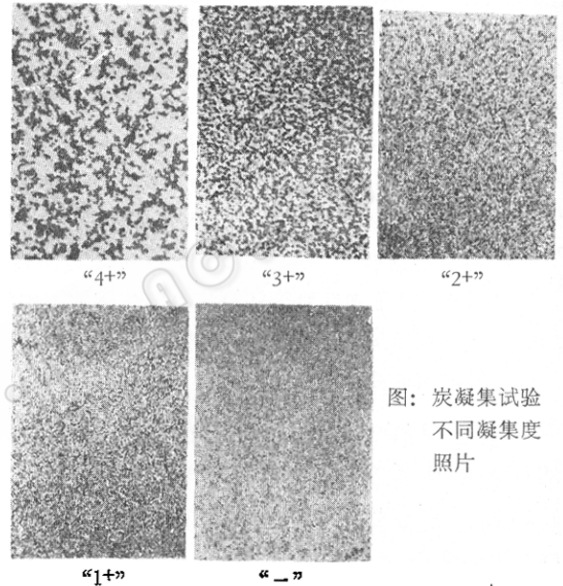


图:炭凝集试验不同凝集度照片

以“2+”凝集判为该血清的炭凝集终点滴度。

结 果

一、不同方法处理抗原对制备炭抗原效果比较

同一浓度黄疸出血群沃尔登型(赖株)抗原,经七种不同方法处理后制成炭抗原,与相应免疫血清作玻片炭凝集试验,结果(表 1)以超声波击碎法最好。

二、吸附方法的比较

取超声波击碎抗原,按相同比例与活性炭混合,在同一条件下用超声波、振荡、搅拌、研磨和静置五种方法吸附制成炭抗原,与相应免疫血清作玻片炭凝集试验,结果(表 2)以超声波处理法最佳。

表 1 不同方法处理抗原对制备炭抗原效果比较

抗原处理方法 ^[3-7]	免疫血清稀释度								对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
超声波击碎 15 分钟	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—
50% 乙醇溶解 90% 乙醇沉淀 ^[3]	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
90% 酚溶解丙酮沉淀 ^[4]	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—	—
0.3% 酚溶解乙醇沉淀 ^[5]	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
胆盐溶解乙醇沉淀 ^[6]	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
十二烷基硫酸钠溶解乙醇沉淀 ^[7]	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
未经处理	3+	2+	1+	—	—	—	—	—	—

注: 免疫血清滴度 1:51200

表 2 活性炭吸附方法比较

吸附方法	免疫血清稀释度								对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
超 声 波	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—
水 浴 中 振 荡	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
电 磁 搅 拌	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
研 钵 研 磨	3+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
静 置	3+	2+	1+	—	—	—	—	—	—

三、吸附时间比较

用超声波击碎抗原,按相同比例与活性炭混合,在同一条件下,以超声波处理法吸附 5、10、15、20 及 30 分钟,不同时间所制备的炭抗原与相应免疫血清作玻片炭凝集试验,结果(表 3)以 15—30 分钟作用,效果相同。

四、吸附时温度的比较

以超声波击碎抗原,用超声波处理法吸附,时间为 15 分钟,比较在 4℃、20℃、28℃、37℃ 和 56℃ 不同温度下制成炭抗原,与相应免疫血清作玻片炭凝集试验,结

果(表 4)吸附温度在 20℃ 以上,效果相同。

五、吸附次数比较

以同份超声波击碎抗原,按 20:1 比例(即 2 毫升抗原加 0.1 克活性炭),在同一条件下用活性炭作 1、2、3、4 和 5 次吸附制备炭抗原,比较各次吸附效果,结果(表 5)表明,50 倍浓缩抗原吸附一次效果最好,吸附次数增加,滴度显著下降。

六、抗原浓度

以 100 倍浓缩超声波击碎抗原,经倍量稀释后(1:2—1:16)制成炭抗原,与相应

表 3 吸 附 时 间 比 较

免疫血清稀释度	吸附时间(分)								对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
5	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
10	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
15	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
20	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
30	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—

表 4 吸 附 时 温 度 比 较

免疫血清稀释度 吸附温度(°C)	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	对 照
4	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—
20	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
28	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
37	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
56	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—

表 5 吸 附 次 数 比 较

免疫血清稀释度 吸 附 次 数	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	对 照
1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—
2	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
3	3+	2+	1+	—	—	—	—	—	—
4	2+	1+	—	—	—	—	—	—	—
5	1+	—	—	—	—	—	—	—	—

表 6 不 同 浓 度 抗 原 对 制 备 炭 抗 原 效 果 比 较

免疫血清稀释度 100倍浓缩抗原	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	对 照
未 稀 释	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
1:2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—
1:4	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
1:8	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—
1:16	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—

免疫血清作玻片炭凝集试验,结果(表6)以稀释2倍效果最好,而用高于或低于50倍浓缩抗原,效果明显下降。

七、炭抗原特异性试验

用三种[黄疸出血群沃尔登型(赖株)、波摩那群波摩那型(罗株)及 Patoc I]钩端螺旋体炭抗原与13群14型和 Patoc I 不同稀释度钩端螺旋体免疫血清及痢疾杆菌、伤寒杆菌、致病性大肠杆菌、脑膜炎双球菌、霍乱弧菌等免疫血清作玻片定量交叉凝集试验,结果见表7。

从表7可以看出,黄疸出血群沃尔登型(赖株)炭抗原与拜伦、澳洲、豕及蛮耗四群和他属细菌免疫血清未呈交叉外,和其

他7群8型钩端螺旋体免疫血清均呈交叉反应;波摩那群波摩那型(罗株)炭抗原,能与13群14型钩端螺旋体免疫血清凝集,但和霍乱弧菌多价血清呈1:8交叉反应;Patoc I 菌株的炭抗原除与相应免疫血清有高滴度凝集,与13群14型钩端螺旋体免疫血清仅有少数低滴度交叉外,与其他五种非钩端螺旋体免疫血清均未现交叉凝集。

八、钩端螺旋体炭抗原的敏感性

使用钩端螺旋体炭抗原与相应免疫血清作玻片炭凝集试验,当血清显微凝集试验滴度在1:200—1:400时,即能出现明显凝集反应。但与人血清作试验时,能测

表7 三群钩端螺旋体炭抗原与各种免疫血清交叉试验结果

免疫血清种类	免疫血清清滴度	与炭抗原凝集滴度		
		黄疸出血群沃登型(赖株)	波摩那群波摩那型(罗株)	Patoc I
黄疸出血群	1:51200	1:256	1:128	1:1
爪哇群	1:25600	1:128	1:16	—
犬群	1:51200	1:128	1:128	—
拜伦群	1:51200	—	1:16	—
致热群	1:12800	1:128	1:128	1:4
秋季热群	1:25600	1:32	1:64	—
澳洲群	1:51200	—	1:128	—
波摩那群	1:25600	1:32	1:256	—
流感伤寒群	1:12800	1:16	1:128	—
七日热群	1:51200	1:32	1:64	1:1
七日热群(裘利斯型)	1:6400	1:64	1:64	1:1
巴达维亚群	1:51200	1:32	1:32	—
豕群	1:25600	—	1:16	1:1
蛮耗群	1:6400	—	1:32	1:1
Patoc I	1:25600	—	—	1:256
伤寒 A—F	1:1280	—	—	—
痢疾多价	1:1280	—	—	—
致病性大肠杆菌	1:320	—	—	—
脑膜炎双球菌	1:640	—	—	—
霍乱多价	1:800	—	1:8	—

出 1:100—1:25 之间抗体,敏感性高。

九、炭抗原稳定性

将制备好的炭抗原保存于冰箱及室温(28℃),间隔不同时间测其与相应免疫血清炭凝集滴度。从制备时起,冰箱(4℃)保存 8 个月,而室温保存 90 天,其抗原性未见下降。现在仍在进一步观察中。

讨 论

试验表明,不同方法处理抗原对制备炭抗原效果有明显影响,以超声波击碎炭抗原效果最好(表 1)。其原因可能是经超声波击碎使抗原表面积增大,易与炭粒充分接触,此外因超声波击碎系物理作用,不影响钩端螺旋体的抗原性,因此,所制备的炭抗原效果较好。而用化学药物处理,虽可提纯抗原,但部分地受到破坏和损耗,致使

相同浓度抗原效果下降。

在比较吸附方法时表明(表 2),以超声波处理法为佳。并发现活性炭吸附抗原时,由于液体中缺乏稳定剂,炭粒极易出现自凝。用振荡、搅拌和研磨等方法,虽可使抗原和炭粒接触,但自凝炭粒中心不易受到抗原作用。而超声波处理法既可将自凝炭粒击碎,致使抗原和炭粒有充分碰撞机会,又可增加液体的剧烈振动,有助于抗原的充分吸附。应该指出,在吸附过程中,不能事先加稳定剂来消除自凝。否则稳定剂可先吸附,而抑制了抗原的吸附作用,造成炭抗原滴度降低。只有当吸附完成后加入正常兔血清来消除炭粒自凝才是适宜的。

试验中还发现抗原浓缩时,用生理盐水洗去培养基中兔血清是重要的一环。用洗涤和不洗涤的同一浓度超声波击碎炭抗原,其滴度相差较大,是因未经洗涤炭抗原中含有一定量兔血清,它们可先吸附于活性炭微粒上,从而抑制了抗原物质充分吸附,致使炭抗原滴度降低。

在制备炭抗原时,抗原浓度以 50 倍浓缩最为适宜,浓度过高反而使炭抗原滴度下降。这一现象可能是由于活性炭吸附呈饱和状态,而在液体中尚存大量游离抗原,虽经水洗,但不能完全除去。因此,在作试验时,游离抗原可先与免疫血清作用,从而影响了炭凝集试验的滴度。

据资料报道,Patoc I 菌株具有广谱抗原性^[6,7],但此处用于制备炭抗原时,对相应免疫血清出现高滴度凝集,而与 13 群 14 型钩端螺旋体免疫血清仅有少数低交叉反应。再用此种炭抗原与钩端螺旋体病人血清(显微镜凝集试验滴度 1:1600—1:3200)作试验,其炭凝集滴度很低或不出现。看来用 Patoc I 炭抗原来作诊断制品是不适宜的。然而用波摩那群波摩那型(罗株)和黄疸出血群沃登型(赖株)炭抗原,除与

相应免疫血清有高滴度凝集外,还对其他 12 群 13 型钩端螺旋体血清呈现全部或大部交叉反应(表 7),因此具有属的特异性。而与不同型钩端螺旋体感染的病人 1:100 以下显微镜凝集抗体的血清,亦能出现凝集反应,故有较高的敏感性。因此可以认为,采用具有属特异性的波摩那群波摩那型(罗株)炭抗原,作为标准炭抗原是适当的。如当地不是以拜伦、澳洲、豕、蛮耗群为主要流行菌群,亦可将黄疸出血群沃尔登型(赖株)炭抗原作为标准炭抗原使用。

参 考 资 料

- [1] 鲍行豪: 微生物学报, 14(1):112—119, 1974.
- [2] 鲍行豪等: 微生物学报, 14(1):120—123, 1974.
- [3] Chang, S. M. et al.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 13:481, 1954.
- [4] 聂第楷等: 中华医学会内科学会、钩端螺旋体病学术会议资料汇编, 336 页, 1964.
- [5] Shinagawa, M. et al.: *Infect. Immunity*, 5(1):12, 1972.
- [6] Alvares, M. O. et al.: *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 12(4):284, 1970.
- [7] Abdussalam, M. et al.: *Bull. W. H. O.*, 47(1):113, 1972.

STUDIES ON CARBON AGGLUTINATION TEST FOR LEPTOSPIRA

III. PREPARATION OF THE LEPTOSPIRAL CARBON ANTIGEN

PAO HSING-HAO AND GUO QUAN-MING

(*Hygienic and Anti-infectious Disease Station of Chekiang Province, Hangchow*)

The antigen used in the carbon agglutination test (CAT) was extracted from *L. Pomona-pomona-Luo*, *L. icterohaemorrhagiae Verdum Lan* and *L. patoc I*. The following conditions were necessary for a good leptospiral carbon antigen. (1) The antigen should be concentrated 50-fold before use. (2) Extraction of the antigen is best made by supersonic treatment. (3) The optimal temperature for adsorption is above 20°C for 15—20 minutes.

The rabbit serum contained in the medium must be removed by washing with saline as small amount of the serum would interfere with the adsorption of the antigen. However, after adsorption, normal

rabbit serum must be added.

The leptospiral carbon antigen prepared from *L. pomona* group showed high sensitivity. It could react not only with homologous types of immune serum, but also with heterologous types (all 12 groups and 13 types) It is therefore a species specific antigen. Furthermore, the test employing the antigen prepared above is more sensitive than the microscopic agglutination test, as the former can give a positive reaction with specimens given a low titre by the latter method.

The antigen retained its activity when stored in the refrigerator for 4 months and at room temperature (28°C) for 90 days.