

简报

## 钩端螺旋体炭凝集试验的研究

### V. 炭凝集试验应用于钩端螺旋体病的血清学诊断\*

鲍行豪 顾全明

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

我们曾用钩端螺旋体炭抗原的炭凝集试验作钩端螺旋体病人血清抗体的测定, 证明与显微镜凝集试验有较高的符合率<sup>[1]</sup>。近两年来, 我们又对不同地区收集的血清标本作进一步验证, 通过较大量标本的检查, 认为炭凝集试验对钩端螺旋体病的血清学诊断有一定的实用价值。

#### 材料与 方法

##### (一) 材料

1. 血清标本来源: 两年来, 收集各地临床诊断为钩端螺旋体病人的双相血清 752 对 (急性期血清多在发病一周内采取, 恢复期血清多在 3—4 周内采取, 但其中有少数标本的采血时间略有推迟), 其他病人和正常人群对照血清 917 份。

2. 钩端螺旋体炭抗原: 采用黄疸出血群沃尔登型(浦 1 株)炭抗原。

3. 试验玻板: 系 8×15 公分普通玻璃板, 用瓷漆(蓝或白色)制成孔径为 15 毫米的 4×8 孔瓷漆孔试验玻板。

##### (二) 方法

1. 钩端螺旋体炭抗原制备方法: 黄疸出血群沃尔登型(浦 1 株)钩端螺旋体, 由上海生物制品研究所以“简 30”半综合培养基<sup>[2]</sup>培养生长良好的原苗(130 条左右/视野×400)。用 0.5% 福尔马林杀菌及酸沉淀法集菌, 使成浓缩 100 倍以上的菌液, 然后在 CSF-1A 超声波清洗机的清洗槽内隔水击碎 15—20 分钟所制成的超声波抗原。先用少量作致敏稀释度测定: 即取浓缩的超声波击碎抗原, 用生理盐水作 1:2、1:4 倍稀释后, 以 20:1 (毫升:克)与活性炭(上海化学纯活性炭, 用前经

100℃干烤 8 小时)混合, 在超声波清洗槽内隔水作用 15 分钟, 于 37℃温箱放置 2 小时后, 按前法<sup>[1]</sup>所制备的炭抗原与相应免疫血清作滴度测定, 如稀释 1:2 抗原所致敏的炭抗原能与 1:200—1:400 的显微镜凝集抗体出现明显凝集者(即 2<sup>+</sup>凝集)即为此批抗原的致敏稀释度。

在大量制备炭抗原时, 先将抗原按所需致敏稀释度稀释后, 照前法<sup>[1]</sup>进行制备、回收及鉴定。

2. 炭凝集试验方法: 用微量吸管取灭活被检血清, 用 1% 正常兔血清生理盐水自 1:2 开始在塑料凹孔板上作倍量稀释, 取各稀释度血清一滴(0.05 毫升)依次置于试验玻板瓷漆孔的下半部, 用细口滴管吸取充分混匀的炭抗原, 分别加一小滴于瓷漆孔上半部(滴管切勿与血清接触), 然后用小圆头棒自高稀释度孔至低稀释度孔将炭抗原与不同稀释度血清轻轻磨匀(炭抗原量需适当, 以加入混合后呈灰色为好), 并来回摇动玻板至见不到有炭粒沉淀为止(一般可摇 1—2 分钟), 于室温(22℃以上)静置 10 分钟(为防止蒸发, 可将玻板放在潮湿盒内), 然后取出, 在日光灯上方或强光白色背景下, 轻轻向一个方向摇动玻板, 使炭粒慢慢聚集于液滴中央观察结果。结果判定按前法<sup>[1]</sup>进行。炭凝集以“2<sup>+</sup>”为标准, 急性期血清滴度在 1:4 以上或恢复期血清滴度较急性期升高 4 倍以上者判为阳性。如两次血清炭凝集滴度增长不足 4 倍或固定不变者, 其滴度在 1:16 以上同样判为

本文于 1976 年 8 月 20 日收到。

\* 戚玉明、邓馨若、谢强华、赵倍玲同志参加部分工作。

阳性。

部份病例在急性期采血同时作直接培养分离病原体。所有标本均作显微镜凝集试验，以兹比较。

## 结 果

### (一)血培养阳性钩端螺旋体病人的双相血清炭凝集试验与显微镜凝集试验的检出率与符合率

表 1 钩端螺旋体培养阳性双相血清炭凝集试验与显微镜凝集试验结果

病例数	炭凝集试验		显微镜凝集试验		两者符合数		两者不符合数	
	+	-	+	-	+	-	炭凝+ 显凝-	炭凝- 显凝+
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
254	244 (96.06)	10 (3.94)	233 (87.79)	31 (12.21)	216 (85.04)	3 (1.18)	28 (11.02)	7 (2.76)
计	254(100%)		254(100%)		219(86.22%)		35(13.78%)	

31 例 (12.21%)。

### (二)临床诊断为钩端螺旋体病人的双相血清两法的检出率及符合率

对临床诊断为钩端螺旋体病人的 752 对双相血清标本，分别用炭凝集试验和显微镜凝集试验

对 254 例血培养阳性的钩端螺旋体病人的双相血清标本用炭凝集试验作了诊断，并与显微镜凝集试验作了比较。结果 (表 1) 表明，炭凝集试验的阳性检出率 (96.06%) 略高于显微镜凝集试验 (87.79%)，两者符合率为 86.22%，其中炭凝集试验阳性而显微镜凝集试验阴性为 28 例 (11.02%)，相反者 7 例 (2.76%)，因炭凝集试验漏检者 10 例 (3.94%)，而显微镜凝集试验漏检者

作检查，表 2 结果表明，检出率仍以炭凝集试验较高 (炭凝集 75%，显微镜凝集 69.16%)。其符合率为 84.31%，不符合率为 15.69%，炭凝集试验阳性而显微镜凝集试验阴性者占 10.90%，而相反者占 4.79%。与培养阳性标本结果基本一致。

表 2 临床诊断为钩端螺旋体病的双相血清炭凝集试验及显微镜凝集试验结果

病例数	炭凝集试验		显微镜凝集试验		两者符合数		两者不符合数	
	+	-	+	-	+	-	炭凝+ 显凝-	炭凝- 显凝+
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
752	564 (75.00)	188 (25.00)	517 (69.16)	235 (30.84)	482 (64.09)	153 (20.22)	82 (10.90)	35 (4.79)
计	752(100%)		752(100%)		635(84.31%)		117(15.69%)	

如以显微镜凝集试验阳性的双相血清统计，炭凝集试验的检出率为 93.23% (482/517)；而培养阳性中显微镜凝集试验确诊的双相血清炭凝集试验检出率为 96.86% (216/223)。

从上述结果看来，炭凝集试验检出钩端螺旋体病人血清中抗体的敏感性不比显微镜凝集试验低。

### (三)炭凝集试验和显微镜凝集试验的检出率与病程的关系

统计 488 份确诊的钩端螺旋体病人急性期血清炭凝集试验和显微镜凝集试验阳性检出率与病程关系见表 3。

结果表明，两种方法的阳性反应率因病程增

表 3 炭凝集试验和显微镜凝集试验的检出率与病程的关系

病 程 (日)	1—4	5—7	8—11
检 验 份 数	302	147	39
炭凝集试验阳性数 (阳性率%)	127 (42.05)	99 (67.35)	36 (92.31)
显微镜凝集试验阳性 数(阳性率%)	31 (10.27)	37 (25.17)	28 (71.53)

$$\chi^2 = 12.35 \quad n = 2, \quad P < 0.01$$

长而增高，而炭凝集试验阳性出现时间要较显微镜凝集试验为早，阳性反应率亦以前者为高。

### (四)炭凝集试验对不同血清群抗体的敏感性使用黄疸出血群沃尔登型 (浦 1 株) 炭抗原，

对 824 份显微镜凝集试验到达诊断标准(1:400 以上)的不同群(型)抗体的血清标本作炭凝集试验。发现(表 4)除对澳洲群抗体敏感性稍差外(检出率为 61.54%),其他群(型)抗体则 85% 以上能被检出。

表 4 浦 1 株炭抗原对不同血清群抗体的敏感性

血清群	检验份数	阳性数	检出率%
黄疸出血	277	266	96.03
爪哇	23	21	91.30
犬热	99	94	94.95
拜伦	2	2	
致热	7	6	85.71
秋季热	112	103	91.96
澳洲	39	24	61.54
波摩那	91	83	91.21
流感伤寒	83	79	95.18
七日热	57	51	89.47
巴达维亚	32	29	90.63
豕群	1	1	
蛮耗	1	1	
计	824	760	92.23

### (五)炭凝集试验的特异性

对 917 份非钩端螺旋体病人及正常人群血清用炭凝集试验与显微镜凝集试验作平行检查, 结果发现炭凝集试验出现阳性与标本中显微镜凝集抗体存在有密切关系。以炭凝集试验滴度 1:4 以上、显微镜凝集试验抗体滴度 1:100 以上为基准, 则两者检出抗体的频度基本一致(炭凝集试验为 18.4%, 显微镜凝集试验为 17.8%)。如将含有 1:100 以上显微镜凝集抗体标本 118 份除外, 则

表 5 不同炭凝集试验诊断滴度对非钩端螺旋体病人血清的交叉反应

血清种类	检验份数	炭凝集试验诊断滴度			
		1:4 以上		1:8 以上	
		炭凝阳性数	“假阳性”率(%)	炭凝阳性数	“假阳性”率(%)
疫区正常人	109	17	15.59	10	9.17
非疫区正常人	49	1	2.04	0	0
发热期疟疾病人	68	6	8.82	1	1.47
乙脑病人	108	6	5.55	3	2.77
肝炎病人	114	2	1.75	1	0.87
谷丙转氨酶正常值人	351	11	3.13	3	0.85
计	799	43	5.38	18	2.25

发现(表 3)炭凝集试验有一定比例的“假阳性”反应。若炭凝集试验诊断滴度提高到 1:8, 则“假阳性”率可以降低。

## 讨 论

我们认为检出率高, 受送检血清组成的影响, 而符合率则与试验方法的敏感性和特异性有关。在本文中符合率略低于以前报道<sup>[1]</sup>, 其主要原因系前报显微镜凝集试验滴度以 1:200 作阳性统计, 而在本文的诊断中则以 1:400 为标准。其次因部份标本贮存较久, 显微镜凝集试验滴度稍有降低。病人早期用大量抗菌素治疗可抑制抗体形成<sup>[4]</sup>, 而试验抗原的质和量对显微镜凝集试验滴度亦有明显影响<sup>[5]</sup>。从培养阳性病人双相血清试验结果来看, 显微镜凝集试验阳性检出率为 87.79%, 而炭凝集试验则达 96.06%。表明用炭凝集试验测定钩端螺旋体抗体的敏感性要较显微镜凝集试验为高。

至于炭抗原炭凝集试验是否具有早期诊断意义, 从表 3 结果分析, 钩端螺旋体病人发病 1—4 天, 阳性反应率达 42.05%, 而相应的显微镜凝集试验仅为 10.27%, 5—7 天分别增至 67.35% 和 25.17%, 两法检出率在统计学上有非常显著差别 ( $P < 0.01$ ), 这就表明炭凝集试验在钩端螺旋体病的早期诊断上是具有一定价值的。

炭凝集试验的敏感性不仅与菌株的抗原性有关, 而且对各群抗体的反应性亦有差异。本文所使用的黄疸出血群沃尔登型(浦 1 株)炭抗原较过去使用的黄疸出血群沃尔登型(赖株)为优。赖株炭抗原与国内 13 群标准血清的四群(澳洲群、拜伦群、豕群、蛮耗群)不呈交叉反应<sup>[3]</sup>, 而在现场使用中亦检不出澳洲群抗体<sup>[1]</sup>。而同群同型的浦 1 株炭抗原, 除对澳洲群抗体敏感性稍差外, 对其他群(型)抗体则大多数能被检出。因此, 对制备炭抗原所用菌株的选择还是必要的。同时还发现同份血清标本中含有两群以上低滴度抗体时, 炭凝集滴度可起累积反应, 这一现象是否与炭抗原属特异性有关, 尚需作进一步研究。

试验证明炭凝集出现阳性反应与血清中显微镜凝集抗体的存在有密切关系。我们试将 1:100 以上滴度显微镜凝集抗体标本除外, 发现炭凝集试验有一定比例(5.4%)“假阳性”反应。其中以疫区正常人、发热期疟疾病人及乙脑病人的比例较高(表 5)。这些是否与隐性感染、双重感染、发

热引起回忆反应及炭凝集试验对多群微量显微镜凝集抗体有较高的敏感性抑或本身的非特异性反应所致，尚需作进一步探索。而对其他人血清（包括谷丙转氨酶正常值人群、肝炎病人、非疫区正常人）交叉很低。因此可以认为用炭凝集试验诊断钩端螺旋体病的特异性还是较强的。

关于炭凝集试验的诊断标准问题，我们试以提高一个炭凝集诊断滴度（即 1:8）来降低非特异性交叉反应，然后发现 824 份显微镜凝集试验阳性标本的漏检率也相应增加一倍（由 7.77% 增至 16.02%），同时 517 例确诊钩端螺旋体病人的急性期血清阳性检出率亦明显下降（由 53.19% 降至 35.49%）。因此，我们认为炭凝集试验诊断滴度一般宜以 1:4 以上作为急性期标本的初步诊断标准，并结合临床及流行病学资料全面考虑，看来

还是合适的。对某些免疫水平较高的地区，则可相应提高炭凝集试验诊断滴度。

炭凝集试验操作方法简便、快速、观察结果容易，又不需要特殊设备，易在基层推广应用。因此，对钩端螺旋体病的血清学诊断具有实用价值。

### 参 考 资 料

- [1] 鲍行豪等：微生物学报，15(1)：52—56, 1975。
- [2] 上海生物制品研究所：钩端螺旋体病防治研究技术资料汇编，第 1 集，123—128 页，1972。
- [3] 鲍行豪等：微生物学报，14 (2)：203—208, 1974。
- [4] W. H. O. Expert. Group on Current problems in Leptospirosis Res. W. H. O. Techn. Rep. Ser., No. 380, 1967.
- [5] Abdussalam, M. et al.: Bull. W. H. O., 47 (1): 113—122, 1972.