

微量间接血凝试验用于斑疹伤寒诊断

孙柱臣 陈文贤 李健凤

(卫生部兰州生物制品研究所, 兰州)

用鼠肺培养的普氏立克次体提取的 ESS (Erythrocytes Sensitizing Substance) 可溶性抗原致敏 6 种经醛固鞣化的红血球, 结果证明人“O”型、绵羊、家兔红血球较敏感; 在 37℃ 或 4℃ 条件下用 2.5% 戊二醛、1:20,000 鞣酸各处理 15 分钟所致敏的血球抗原血凝滴度高; 以 2.5% 浓度醛固鞣化血球加入等量 ESS 可溶性抗原致敏为宜。此法制备的血球抗原可冻干保存。血凝反应比补体结合、外斐氏试验敏感性高, 特异性强, 没有非特异性交叉反应。可用微量塑料板法, 便于基层流行病学及临床早期诊断用, 亦可用作间接血凝抑制试验检查抗原。

多年来一直采用从普氏立克次体提取可溶性抗原致敏新鲜红血球诊断斑疹伤寒, 在实验诊断中具有敏感、特异、快速和简便的特性。但致敏的红血球易溶血, 难保存, 不便于基层诊断防病使用, 为此我们采用醛固鞣化法制成冻干血球抗原。本文对醛固鞣化血球抗原的制备、敏感性、特异性及微量塑料板法与其他血清学方法作了实验性比较。

材料和 方法

(一) 材料

1. ESS 抗原: 按常规法^[1] 由本实验室生产的普氏立克次体鼠肺抗原(含氮量为 0.075mg/ml) 中提取的。

2. 血清: 斑疹伤寒和其他传染病患者血清。试验前先用红血球吸附。

3. 红血球: 试验前取 Alsever's 液保存的人“O”型、绵羊、家兔、猴、豚鼠、鸡的红血球, 用 0.15M, pH6.8 PBS 液(2,500 转/分, 10 分钟, 约 600—800 × g) 洗沉 3—4 次, 制成积压血球待用。

4. 戊二醛(含量 25%, 西德 E. Merck): 用前用 0.15M, pH 7.2 PBS 稀释成 2.5%。

5. 鞣酸(西德 E. Merck): 用前用灭菌蒸馏水配成 1:20,000 溶液。

(二) 血球致敏法和组别

1. 新鲜红血球致敏抗原组: 取上述 6 种经洗涂过的积压血球用 pH6.8 PBS 配成 2.5% 浓度加等量 ESS 抗原, 37℃ 水浴结合 1 小时, 并不断摇荡, 然后用 pH6.8PBS 洗沉 3—4 次, 最后用含有 1% 灭活健康兔血清生理盐水配成 10% 血球悬液, 4℃ 冰箱保存备用。

2. 醛固血球致敏抗原组: 取已洗过的上述 6 种积压血球配成 1% 血球悬液, 按 100ml 加入 4ml 2.5% 戊二醛, 分别在 37℃ 水浴或 4℃ 冰浴中醛固 15 分钟, 并不断摇荡, 然后用 pH 6.8PBS 和蒸馏水交叉洗沉 3—4 次, 致敏 ESS 抗原, 方法同(二) 1。

3. 醛固鞣化血球抗原组: 取已醛固的积压血球, 用 pH 6.8 PBS 配成 2.5% 血球悬液, 加等量新配制的 1:20,000 的鞣酸, 放 37℃ 水浴或 4℃ 冰浴中分别作用 15、30、60 分钟以资比较, 取出后分别用 pH 6.8 PBS 洗沉 2 次后致敏 ESS 抗原, 方法同(二) 1。

(三) 微量间接血凝试验

用 0.025ml 微量塑料板法测抗体滴度。以 50% 血球凝集为滴度终点。

1. 用微量滴管取含有 1% 正常兔血清生理盐水滴在 V 型塑料盘孔内, 每孔 0.025ml, 然后用定量吸管取待检血清 0.025ml 滴于第 1 孔内, 或用 0.025ml 的定量稀释棒直接蘸取待检血清从第 1

本文于 1980 年 9 月 25 日收到。

孔倍比稀释至适宜稀释度。

2. 用定量吸管取 0.5% 血球抗原, 每孔 0.025ml。

3. 并按上法同时做已知阳性、阴性、血球抗原对照。

4. 将 V 型塑料盘放微型振荡器上振荡 3 分钟, 再放 37℃ 水浴箱内作用 30 分钟, 取出室温静置 2 小时后判读结果。

(四) 微量间接血凝抑制试验

测知病原体或抗原滴度。以 100% 完全抑制不凝集为滴度终点。用 0.025ml 定量稀释棒倍比稀释待检抗原后各加入等量已知 2 个单位的斑疹伤寒阳性血清抑制, 经充分振荡, 放 37℃ 水浴箱作用 30 分钟, 然后各孔内加入 0.025ml 0.5% 血球抗原, 充分振荡后再置 37℃ 水浴箱作用 30 分钟, 室温静置 2 小时后判读结果。同时设阳性血清、血球对照。

实验结果

(一) 醛固鞣化血球抗原和新鲜血球抗原血凝滴度比较

通过下述六种红血球试验, 证明醛固鞣化血球抗原和新鲜血球抗原测定同一斑疹伤寒患者血清, 其血凝滴度无显著差异, 也没有非特异性交叉凝集现象。但前者可冻干长期保存, 使用方便, 优于后者。六种血球中以人、绵羊、家兔三种血球抗原敏感性较好。(见表 1)。

(二) 制备醛固鞣化血凝抗原有关因素的探讨

1. 鞣酸的影响

六种血球醛固后分为两组: 一组用鞣

表 1 六种醛固鞣化和新鲜血球抗原血凝滴度比较

Table 1 Comparison of the Haemagglutination Titers between Six Kinds of Formalized and Tanned Red Cells and Fresh Red Cells Sensitized by Antigens

血球抗原 Red Cell Antigens 血球抗原处理方法 Methods of treatment	10 例斑疹伤寒患者恢复期血清血凝滴度(几何平均值) The Haemagglutination titers of 10 Typhus patient's Convalescent Sera (Geometric mean)					
	人 "O" Human "O"	绵羊 Sheep	家兔 Rabbit	猴 Monkey	豚鼠 Guinea pig	鸡 Fowl
醛固鞣化血球抗原 Formalized and Tanned Red Cells Sensitized by Antigens	68.59	90.51	119.43	55.72	39.40	22.63
新鲜血球抗原 Fresh Red Cells Sensitized by Antigens	73.52	119.43	194.01	84.45	84.45	84.45

表 2 醛固血球抗原和醛固鞣化血球抗原血凝滴度比较

Table 2 Comparison of the Haemagglutination Titers between Formalized Red Cells and Formalized and Tanned Red Cells Sensitized by Antigens

红血球抗原 Red Cell Antigens 醛固血球 Formalized Red Cells	10 例斑疹伤寒患者恢复期血清血凝滴度(几何平均值) The Haemagglutination titers of 10 Typhus patient's Convalescent Sera (Geometric mean)					
	人 "O" Human "O"	绵羊 Sheep	家兔 Rabbit	猴 Monkey	豚鼠 Guinea pig	鸡 Fowl
用鞣酸处理 Activated with tannic acid	78.79	78.79	128.00	45.25	39.40	22.63
未用鞣酸处理 Not activated with tannic acid	32.00	48.51	78.79	11.31	8	8

酸处理致敏抗原，另一组不用鞣酸处理直接致敏抗原。结果用鞣酸处理的血球抗原血凝滴度均较高。其中以人、绵羊、家兔三种为高(见表 2)。

2. 温度的影响

二种血球分别在 37℃、4℃ 条件下用戊二醛醛固 15 分钟，再用鞣酸处理，致敏抗原，二者血凝滴度无显著差异(见表 3)。

3. 时间的影响

取 37℃ 醛固 15 分钟的红血球，再在 37℃ 温度下分别用鞣酸处理 15、30、60 分钟，结果以鞣化 15 分钟的血凝滴度高(见表 4)。另将同批醛固血球在 4℃ 条件下

鞣化 15 分钟与 37℃ 鞣化 15 分钟的相比，结果无显著差异。

4. 醛固鞣化血球浓度的影响

取 Alsever's 液中保存的红血球经 37℃ 醛固 15 分钟，37℃ 鞣化 15 分钟，然后将处理过的血球配制成 2.5%、5%、10% 的血球悬液，各取同量血球悬液，按前法分别加入等量的 ESS 抗原致敏，结果 2.5% 浓度的醛固鞣化血球致敏抗原后血凝滴度较高。血球浓度越高，血凝滴度相应降低，说明血凝滴度与血球表面吸附抗原量多少有直接关系。提示致敏血球时，必须有足量抗原(见表 5)。

表 3 不同温度下醛固的血球抗原血凝滴度比较

Table 3 Comparison of the Haemagglutination Titers of Formalized Red Cells at Different Incubating Temperatures

新鲜红血球醛固方法 Methods of treatment	13 例斑疹伤寒患者恢复期血清血凝滴度(几何平均值) The Haemagglutination titers of 13 Typhus patient's Convalescent Sera (Geometric mean)	
	绵羊 Sheep	家兔 Rabbit
37℃ 醛固 15 分钟 Fresh Red Cells Treated with Glutaraldehyde for 15 minutes under 37℃	75.10	121.35
4℃ 醛固 15 分钟 Fresh Red Cells Treated with Glutaraldehyde for 15 minutes under 4℃	92.96	115.05

表 4 鞣酸处理不同时间血凝滴度比较

Table 4 Comparison of the Haemagglutination Titers of Formalized Red Cells Treated with Tannic Acid at Different Times

斑疹伤寒患者恢复期血清 Typhus patient's Convalescent Sera		绵羊醛固红血球* Sheep's Formalized Red Cells		
		15min	30min	60min
患者	Patient 1	1,024	256	128
"	" 2	256	64	64
"	" 3	32	16	16
"	" 4	64	64	32
"	" 5	1,024	512	256
几何平均值 Geometric mean		222.86	97.00	64.00

* 均为 37℃ 鞣酸处理 Treated with Tannic Acid under 37℃

表 5 不同浓度醛固鞣化血球血凝滴度比较

Table 5 Comparison of the Haemagglutination Titers of Formalized and Tanned Red Cells Sensitized by Equal Amount of Antigen with Different Concentrations

致敏等量抗原的醛固鞣化血球 Formalized and Tanned Red Cells Sensitized by Equal Amount of Antigen	斑疹伤寒患者恢复期血清 Typhus Patient's Convalescent Sera							
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2.5%	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
5%	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-
10%	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-

表 6 不同浓度血球抗原血凝滴度比较

Table 6 Comparison of the Haemagglutination Titers of Formalized and Tanned Red Cells with Different Concentrations

斑疹伤寒患者恢复期血清 Typhus Patient's Convalescent Sera			血 球 抗 原 Red Cell Antigens			
			0.5%	1%	1.5%	2.0%
患者	Patient	1	256	64	64	64
患者	Patient	2	2,048	2,048	1,024	512
患者	Patient	3	128	256	256	128
患者	Patient	4	128	64	64	64
患者	Patient	5	128	64	64	64
患者	Patient	6	128	64	64	64
患者	Patient	7	128	64	64	64
患者	Patient	8	1,024	512	512	512
患者	Patient	9	512	256	256	256
患者	Patient	10	256	64	64	32
患者	Patient	11	512	256	256	64
患者	Patient	12	512	256	256	128
几何平均值 Geometric mean			304.44	161.27	152.22	107.63

(三) 不同浓度醛固鞣化血球抗原血凝敏感性

综合上述试验结果,我们以 37°C 或 4°C 醛固鞣化各 15 分钟,用 2.5% 处理血球在 37°C 条件下加等量的 ESS 抗原致敏 1 小时制成血球抗原,最后用含有 5% 蔗糖、0.5% 明胶的 1% 健康兔血清溶液配制成为 5% 浓度的血球悬液,分装安瓿制成冻干血球抗原。试验时稀释成 0.5%、1%、1.5%、2.0% 浓度进行血凝试验比较。以 0.5% 浓度的血凝滴度高(见表 6)。

(四) 微量间接血凝与补体结合、外斐氏试验比较

取临床确诊为斑疹伤寒的既往患者或现患者和其他传染病患者血清同时进行试验比较。结果微量间接血凝滴度阳性率比补体结合、外斐氏试验高,对其他传染病没有非特异性交叉反应,可用于流行病学调查(见表 7)。

(五) 微量间接血凝抑制试验与补体结合试验比较

取已知鼠型、流行性斑疹伤寒抗原,先

表 7 间接血凝、补体结合、外斐氏试验敏感性比较

Table 7 Comparison on the Sensitivity of Indirect Haemagglutination, Complement Fixation and Weil-Felix Test

待检血清 Sera		间接血凝试验 Indirect Haemagglutination Test	外斐氏试验 Weil-Felix Test	补体结合试验 Complement Fixation Test
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	1	512	80	128
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	2	1,024	320	128
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	3	128	320	128
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	4	128	640	128
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	5	1,024	1,280	512
斑疹伤寒现患者 Typhus Patient	6	256	640	256
斑疹伤寒既往患者 Person with typhus history	1	8	40	128
斑疹伤寒既往患者 Person with typhus history	2	8	80	128
斑疹伤寒既往患者 Person with typhus history	3	8	80	128
斑疹伤寒既往患者 Person with typhus history	4	8	80	128
慢性肝炎患者 Chronic Hepatitis Patient		—	—	—
急性黄疸性肝炎患者 Acute icteric hepatitis patient		—	—	—
伤寒患者 Typhoid Patient	1	—	—	—
伤寒患者 Typhoid Patient	2	—	—	—
伤寒患者 Typhoid Patient	3	—	—	—
大叶性肺炎患者 Lobar Pneumonia Patient		—	—	—
健康输血者 Healthy donor	1	—	—	—
健康输血者 Healthy donor	2	—	—	—
健康输血者 Healthy donor	3	—	—	—
健康输血者 Healthy donor	4	—	—	—
健康输血者 Healthy donor	5	—	—	—

表 8 用间接血凝抑制试验测定斑疹伤寒抗原滴度
Table 8 The Detection of Typhus Antigen Titers with Indirect Haemagglutination Inhibition Test

待检抗原(批号) Typhus Antigens (Lot)	间接血凝抑制试验 Indirect Haemagglutination Inhibition Test		补体结合试验 Complement Fixation Test	
	鼠型 Murine Antityphus Sera (2 unit)	流行性 Epidemic Antityphus Sera (2 unit)	鼠型 Murine Antityphus Sera (2 unit)	流行性 Epidemic Antityphus Sera (2 unit)
鼠型 Murine Typhus Antigens .2	32	32	32	8
流行性 Epidemic Typhus Antigens .3	32	32	32	64
鼠型 Murine Typhus Antigens .6	32	16	32	8
流行性 Epidemic Typhus Antigens .7	16	32	16	32
几何平均值 Geometric mean	26.90	26.90	26.90	19.02

分别用 2、4、8、16 个单位普氏或莫氏立克次体阳性血清抑制待检抗原, 作间接血凝抑制试验, 试验证明用 2 个实用单位抑制血清时血凝抑制滴度高。所以均采用 2 个单位上述阳性血清同时进行间接血凝抑制试验和补体结合试验比较, 结果两法滴定的抗原滴度相近, 前法稍优于后法, 且稳定(见表 8)。

讨 论

1. 1953 年 Chang^[1,2]氏首先报道从普氏立克次体卵黄囊培养物中提出一种耐热耐碱的多糖体物质, 致敏红血球后可与斑疹伤寒患者血清发生血球凝集反应。1963 年李在连又从流行性斑疹伤寒鼠肺疫苗中提出 ESS, 其特异性与卵黄囊培养物中提取的 ESS 相同^[3,4]。两种来源的 ESS 血凝素致敏新鲜红血球均可用于斑疹伤寒早期和恢复期血清学诊断。临床证明血凝抗体出现早, 为 IgM^[5]。第 5—7 病日即出现阳性滴度, 血凝抗体滴度比外斐氏反应约高 10—640 倍^[3,4]; 病后一个月血凝抗体滴度比补

体结合反应约高 5 倍, 比外斐氏反应约高 42 倍以上; 病后 12 个月以上, 血凝抗体大幅度下降, 但仍比补体结合高 1 倍, 比外斐氏反应高 16 倍以上, 即便患病后 2 年也可查出血凝抗体^[6,7], 说明间接血凝敏感性高, 特异性强, 具有临床诊断使用价值。但既往均用 ESS 抗原致敏新鲜红血球, 此血球抗原不能保存, 不便于推广使用。我们改用醛固鞣化法致敏的血球抗原克服了上述缺点, 实验证明醛固鞣化血球抗原性和致敏的新鲜血球抗原相同, 可长期保存, 不受条件限制, 抗原性稳定, 便于基层应用。用此法可致敏多种血球, 其中人、绵羊、家兔血球抗原敏感性较高。ESS 血凝抗原为共同性抗原, 具有属(组)的特异性, 不能做种的鉴别诊断用。

2. 目前, 斑疹伤寒反相血凝实验尚未成功。用间接血凝抑制试验代替之可测出微量抗原, 也可用于早期诊断。

参 考 文 献

- [1] Chang, Shin-man: *J. Immunol.*, 70: 212, 1953.

- [2] Chang, Shin-man et al.: *J. Immunol.*, **70**: 215, 1953.
- [3] 李在连等: 微生物学报, **9**(1): 71, 1963。
- [4] 李在连等: 微生物学报, **11**(3): 444, 1965。
- [5] 范云儒等: 流行病学杂志, **3**: 186, 1979。
- [6] 李在连: 山东医学院学报, **2-3**: 27, 1963。
- [7] 陈渊民等: 流行病学杂志, **3**: 189, 1979。

MICRO-INDIRECT HEMAGGLUTINATION TEST ON TYPHUS

Sun Zhuchen Chen Wenxian Li Jianfeng

(Lanzhou Institute of Biological Products, Ministry of Health, Lanzhou)

Six kinds of formalized and tanned red cells have been sensitized by ESS soluble antigen extracted from mice lung cultivated *Rickettsia prowazekii*. The results have demonstrated that the red cells of human O, sheep and rabbit have been more sensible. In case of 37°C or 4°C, after treated with 2.5% glutar aldehyde and 1:20,000 diluted tannic acid and for 15 minutes respectively, the red cells sensitized with antigen have exhibited in high titers. Two point five percent of the above men-

tioned red cells have given better effect by adding equal amount of ESS soluble antigen. It may be preserved by lyophilization. The sensitivity of hemagglutination test is better than complement fixation test and Weil-Felix test. Its specificity is higher, too. It can be used with microplastic plate that will be suitable for early diagnosis of epidemiological and clinical finding. It may also be used in the indirect hemagglutination inhibition test to detect antigens.