

# 斑疹伤寒间接血凝试验

安清武

(成都生物制品研究所, 四川)

间接血凝试验(简称血凝试验)具有很高的敏感性和特异性,近年来已成为微生物学、免疫学以及血清流行病学调查工作中应用较广泛的血清学方法之一。本文就斑疹伤寒血凝试验方法的一些技术问题,尤其是影响血凝试验的各种因素,作一综合性介绍。

## 血凝抗原的制备

### 一、用普氏立克次体鸡胚培养物制备血凝抗原

Chang 等<sup>[1]</sup> 和 Мельников<sup>[2]</sup> 用斑疹伤寒普氏立克次体鸡胚培养物经差速离心、乙醚提纯后加碱煮沸,冷却透析提取血凝抗原(简称 ESS)。此物质致敏羊红细胞等,可与患者血清或抗血清产生红细胞凝集反应。抗原制好后进行滴定以确定血凝的实用效价、特异性和非特异性。一般效价为 1:40, 试验时通常使用 2 个单位(即 1:20 稀释)。但应指出,用立克次体鸡胚培养物制备血凝抗原,低倍稀释时常有溶血因子存在,加氯仿处理即可除去。

### 二、用普氏立克次体鼠肺疫苗提取血凝抗原

李在连等<sup>[3]</sup> 用斑疹伤寒鼠肺疫苗提取 ESS 成功后,我们又用过期的斑疹伤寒鼠肺疫苗原液制备 ESS,

结果更为理想,不但效价高,而且无溶血因子存在,现已推广使用。

## ESS 致敏红细胞

### 一、ESS 致敏新鲜红细胞

有些学者曾用 ESS 致敏新鲜的人“O”型红细胞作血凝试验。因人血清中不含有对这类细胞起作用的异种血凝集及冷凝集素,故检测患者血清时可不预先用同类的红细胞吸收。ESS 致敏的新鲜红细胞抗原的缺点是不能长期贮存,为此近来多采用醛化的红细胞致敏抗原。

### 二、ESS 致敏醛化红细胞

文献中有多种方法,但以 Danil 等<sup>[4]</sup> 简化的 Csizmas 法和 Лшенищов 等<sup>[5]</sup> 改良的 Feeley 等法最为常用。用 ESS 致敏醛化的红细胞,在 40℃ 下可保存半年。Ling<sup>[6]</sup> 曾研究五种醛类固定羊及人“O”型红细胞的稳定性,结果以甲醛和戊二醛固定的红细胞稳定性最好。戊二醛法较简便、快速,便于基层使用。

据 Лшенищов 等<sup>[5]</sup> 报道,按 Feeley 等方法制备的斑疹伤寒诊断液诊断斑疹伤寒时可缩短操作时间近

三分之一。

## 血凝试验方法

斑疹伤寒血凝试验基本分为试管法和血凝盘法两种。一般采用不同稀释度的血清 0.4ml 加 1% 致敏红细胞抗原 0.1 ml, 混匀后放 30℃ 水箱中过夜 (16—18 小时) 观察结果。但 Matossian 等<sup>[7]</sup> 则将待检血清稀释成不同倍数后, 取 0.25 ml 加其等体积的 0.5% 致敏红细胞抗原, 混匀后放室温 1 小时读取结果。

Golinevich 等<sup>[8]</sup> 和 Яблонская<sup>[9]</sup> 主张应用“快速血液”法, 即取患者指血或耳血 0.1ml 加入盛有 0.4ml 2% 柠檬酸钠的试管中, 再加 12ml 生理盐水, 0.1ml 洗过的沉积红细胞, 混匀后放室温 15—20 分钟, 再行离心沉淀, 上清液即为 1:250 稀释吸附过的血清, 经灭活后即可用于血凝试验。

## 影响血凝试验的因素

由于血凝试验不要求特殊的器材及醛化红细胞致敏抗原, 可在一般血清学实验室进行。对待检标本可在 3—4 小时内得出结果。虽然操作程序基本标准化了, 但还较繁杂, 影响因素较多。如果条件不适宜, 不但影响血凝试验的敏感性及特异性, 有时甚至 ESS 不能被红细胞所吸附, 因此也就不能与相应的抗体产生凝集反应。影响因素主要是:

1. ESS 致敏红细胞的 pH、温度和作用时间: 为了获得最高的敏感性和最稳定的试验结果, 在 ESS 吸附于红细胞的过程中需要稳定的 pH 溶液。因此在 ESS 致敏红细胞这一阶段, 通常采用磷酸盐缓冲液作为反应的环境。Chang 等<sup>[1]</sup> 用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液。Мельников 等<sup>[2]</sup> 采用 pH 7.0 生理盐水。因此认为在较大 pH 范围内致敏溶液的 pH 对血凝效价影响并不显著, 然而在偏酸 (pH 4.3 以下) 和偏碱的环境中致敏红细胞抗原较易发生自凝的倾向。虽然在不同的 pH 时红细胞吸附的抗原量有所不同, 但在 pH 6.8—7.4 范围内致敏红细胞抗原的血凝效价是相同的。因此, Мельников 认为血凝试验在中性 (pH 7.0) 和微酸性 (pH 6.0) 环境下不影响其特异性和敏感性。但 Herbert<sup>[10]</sup> 曾指出, 一种抗原只在一定的 pH 条件下致敏的红细胞才最敏感。

斑疹伤寒的 ESS 致敏红细胞的温度幅度也较广, 在室温和 30—37℃ 均有使用。但有些学者<sup>[1]</sup> 认为降低致敏温度及缩短孵育时间, 都会影响 ESS 吸附于红细胞的数目。当致敏红细胞温度高时, 红细胞吸附 ESS 量增多, 血凝效价也相应地有所提高。但温度过高又会影晌血凝效价, 甚至出现阴性结果, 温度过低易呈现非特异性凝集反应<sup>[1, 4]</sup>。

无论是使用新鲜红细胞还是采用醛化红细胞均能很快地吸附 ESS<sup>[10]</sup>。在 37℃ 致敏新鲜红细胞需要 1

小时, 而醛化的红细胞只需 30 分钟, 若延长致敏时间也不能提高其敏感性<sup>[4]</sup>。

2. ESS 的纯度与理化性质: Chang 等最初介绍血凝反应方法时就曾提出 ESS 需纯净时才有效。若 ESS 制品不纯时可能有非特异性的蛋白质分子阻碍血凝试验而达不到预期的结果。有些小分子物质对致敏红细胞有轻微的抑制作用, 但经纯化后会使 ESS 致敏红细胞的活性回升。由此可见, ESS 的纯度与致敏红细胞的效果有密切关系。抗原本身的理化特性不同, 有的不经任何处理即具有吸附于红细胞的能力, 另一些抗原需要改变某些理化性质才具有吸附于红细胞的能力。作者观察到, 有抗补体的斑疹伤寒鼠肺疫苗原液及染菌的稀释液致敏红细胞时, 亦能阻止 ESS 吸附于红细胞的能力。Walberg 等<sup>[11]</sup> 曾指出聚合或变性的蛋白质分子更容易被红细胞所吸附, 其机理尚不清楚。

Mergenbagen 等<sup>[12]</sup> 也指出, 用于检测早期抗体和晚期抗体产生最高血凝效价的致敏红细胞抗原剂量亦不相同。对早期抗体应用较大剂量的抗原致敏红细胞, 才能呈现最高的效价; 对晚期抗体则需小剂量的抗原。这种差异与免疫球蛋白的种类及其结构有关。

都知道, 机体受抗原刺激后, 最早产生的抗体是 IgM, 随后才产生 IgG。早期抗体主要是 IgM, 因此需要大剂量的 ESS 致敏红细胞, 才能获得最高的血凝效价。而晚期抗体主要是 IgG, 因分子量小, 所以需要小剂量的 ESS 致敏红细胞即可产生最高的血凝效价。

3. 致敏红细胞的 ESS 浓度: 正常红细胞的相互吸附与多醣体有关, 经鞣酸处理的红细胞吸附与蛋白质有关<sup>[13]</sup>。斑疹伤寒的 ESS 系多醣体半抗原, 因此不需要鞣酸处理即可与患者血清产生红细胞凝集反应。致敏红细胞的 ESS 浓度与血凝试验的敏感性及特异性有明显的关系。血凝反应效价与致敏红细胞的 ESS 浓度在一定范围内呈正比关系<sup>[3]</sup>。最适的 ESS 浓度能够检出较高的血凝效价, 并使致敏的红细胞不产生自凝现象。用高于适当剂量的 ESS 致敏红细胞亦不提高血凝效价, 有时反而会降低血凝的敏感性, 甚至产生致敏红细胞的轻度自家凝集。当然红细胞吸附 ESS 量的比例, 由于抗原浓度的增加而减少。实际上, 致敏红细胞从 ESS 液中吸附的 ESS 量是很少的。

有人指出<sup>[14]</sup>, 红细胞吸附抗原的量仅仅是抗原总量的 0.1—1%, 因此在致敏后离心出来的上清液至少可再使用一次, 但有时会降低测定抗体效价的敏感性。而红细胞经连续吸附抗原时, 反而使血凝效价逐渐下降。其原因可能是抗原与抗体结合须有一定比例的关系。

4. 致敏红细胞的浓度: 在一定范围内致敏红细胞的浓度和血凝效价呈直线对数关系。当致敏红细胞浓度减半时血凝反应效价倍增。因此, 致敏红细胞浓度

的标准化是个极其重要的问题。斑疹伤寒血凝试验的致敏红细胞浓度通常规定为1%，但也有使用0.5%的浓度<sup>[1]</sup>。

5. 待检血清的灭活与吸收：待检血清的灭活问题，多数学者主张灭活后再行试验。但有的则主张用糜化红细胞及加抗凝剂者可省去灭活的步骤，对结果无明显影响<sup>[9]</sup>。鉴于一般待检血清中含有非特异性血凝素，特别是人血清含有嗜羊红细胞的凝集素。因此，每次试验时均须先用羊红细胞吸收是进行血凝试验的必要条件<sup>[10]</sup>。以家畜及啮齿类血清作血凝试验时，可不预先进行灭活和羊红细胞吸收，但这适用于大量标本的初筛工作。若有假阳性时须进行灭活，并用红细胞吸收。狗及人血清中的非特异性血凝素是嗜羊红细胞凝集素，并非由于感染其它立克次体性疾所引起交叉反应。

因人“O”型红细胞不含血凝素和冷凝素，故检测人血清时不必先用红细胞吸收。

6. 其它试验条件的影响：血凝试验是个微量量的血清学反应，因此用小试管或血凝盘均可。试管大小无明显影响，但管底的形状则有一定的影响。如血凝盘的敏感性比试管高<sup>[11]</sup>，V型盘比U型盘有更典型的血凝沉降模型<sup>[12]</sup>。由此可见，血凝模型的性质在很大程度上取决于所用血凝盘的类型。为了加速血凝反应的完成，Woodhead等<sup>[13]</sup>建议将待检血清和致敏红细胞加入血凝盘凹孔内，混匀后放在70rpm旋转10分钟就可判定结果。用国产微量振荡器混匀液体，比手摇的效果更为理想。

此外，不同个体的羊红细胞对血凝的敏感性和稳定性亦有一定的影响。如Taylor-Robinson等<sup>[14]</sup>用支原体抗原致敏羊红细胞时，发现13只绵羊的个体红细胞对血凝试验有影响。其中少数的羊红细胞用抗原致敏后稳定性及敏感性都较好，但有些敏感性差，有的很不稳定。抗原对照常有不同程度的自凝，这表明血凝反应的敏感性在一定程度上取决于所用羊红细胞表面的特性。

## 血凝试验的应用

自Chang<sup>[15]</sup>成功地由斑疹伤寒立克次体提取ESS以来，迄今已积累了大量资料，证实血凝试验对斑疹伤寒的疫情检索是行之有效的办法，它比分离病原有更高的阳性率。在病原分离阴性的情况下，应用该法可检测出对斑疹伤寒的血凝抗体，因而证明该地区有过斑疹伤寒的发生或流行。该法可用于以下几个方面：

1. 测定斑疹伤寒患者的抗体水平：血凝反应与补体结合试验一样，既能诊断典型患者又能确诊非典型病例(包括无症状型)。适用于斑疹伤寒和蜱媒斑点热组的血清学诊断。它具有组的特异性，但不能判定型别。本反应的特点是只有在感染的活动期血凝抗体

才能检查出来，而病后6—8个月很快消失。说明血凝抗体主要是IgM，因此不适于作追溯性血清流行病学调查。但可与补体结合试验并用对鉴别现症病人和既往患者具有重要的意义。

据文献<sup>[20]</sup>报道，既往患者及接种灭活疫苗者均不产生血凝抗体，但接种“E”株活疫苗及亚单位疫苗时都能产生血凝抗体<sup>[11]</sup>。而国内资料则相反，不但既往患者能检出血凝抗体，而且接种斑疹伤寒鼠肺灭活疫苗亦能产生血凝抗体<sup>[22]</sup>。绝大多数斑疹伤寒患者都呈阳性反应，但有时补体结合试验阳性而血凝试验为阴性。

Matossian等<sup>[17]</sup>用血凝试验对黎巴嫩居民进行血清学调查，结果，1—9岁60名均为阴性；10—29岁153名，阳性4名，占2.6%；30—49岁125名，阳性12名，占9.6%；50—80岁116名，阳性21名，占18.1%，总阳性率为8.15%。

2. 用以鉴别原发性与复发性斑疹伤寒：原发性与复发性斑疹伤寒(又称为Brill-Zinsser氏病)的关系问题，自1934年以来对其临床特征、流行病学及病原血清学等作了一系列研究，现已证实这两种斑疹伤寒的病原均为普氏立克次体。

Murray等<sup>[23]</sup>和Voronoval<sup>[24]</sup>都证明，原发性斑疹伤寒患者血清中主要含有IgM(即19S抗体)，复发性斑疹伤寒患者血清中主要是IgG(即7S抗体)。因IgM和IgG两种免疫球蛋白具有不同的理化性质，故用各种方法都可鉴别。最简便的方法是使用巯基乙醇(2-ME)及半胱氨酸盐处理法。其理论根据为2-ME含有巯基(SH)，可破坏含有双硫键(S-S)的大分子IgM抗体，但不能破坏小分子的IgG抗体。根据对2-ME的敏感或抵抗程度，确定为IgM或IgG抗体。半胱氨酸盐亦是巯基化合物，含有SH化学基团。因与2-ME有相同的活性，故可完全取代2-ME。对半胱氨酸敏感者属IgM抗体，有耐性者为IgG抗体。

Лшенищев等<sup>[25]</sup>报道，用0.2M半胱氨酸盐处理发病后7—20天的患者血清，然后用血凝试验检查，发现原发性患者血清经处理血凝效价迅速下降8—16倍，而复发性患者血清经处理则不受影响。

Cernyševa等<sup>[26]</sup>亦证实，若患者血清中含有IgG抗体，经半胱氨酸盐处理后，血凝滴度不变或下降也不超过一个滴度。若患者血清中同时含有IgM和IgG两种抗体，经处理后滴定可下降2或2个以上滴度。如果血清中只含有IgM抗体，经处理血凝则呈阴性。

3. 对疫区家畜及野生动物的血清学调查：用血凝试验对疫区家畜和野生动物作血清流行病学调查，目前报道较少。吴家驹曾对六种动物26份血清作血凝试验，均为阴性。1979年4月我们对四川省叙永、古蔺两县作了血清流行病学调查，以补体结合试验为

对照,共采血 172 份,结果既往患者占 79.4%,健康人群中血凝阳性占 44.6%,山羊占 41.7%,而啮齿动物均为阴性。根据上述资料,我们认为若啮齿类的血凝反应阳性率与该地人类血凝阳性率相平行,而家畜动物则为阴性,证明本地区的斑疹伤寒属于地方性;反之,家畜动物血凝阳性率与人类血凝阳性率相平行,而啮齿类血凝反应为阴性时则证明该地区的斑疹伤寒为流行性。

## 讨 论

1. 斑疹伤寒血凝试验是一种敏感、特异和快速的血清学方法,但其可重复性尚不够理想。其原因可能是由于不同来源的个体动物红细胞或致敏红细胞悬液染菌以及使用不同批号的 ESS 所致。若采用新鲜红细胞则需要不溶血的试剂。为解决此问题可使用醛化红细胞或统一制备的大批致敏红细胞诊断液。每次试验时应有标准血清对照,以验证新制备的致敏红细胞的敏感性和特异性。致敏的醛化红细胞比新鲜红细胞的效价要低些。

2. 血凝试验的非特异性机制问题至今不甚清楚。但都知道正常人血清中常含有对各种动物红细胞所凝集的异种血凝素,尤以嗜羊红细胞的血凝素含量最高。一般效价为 1:40—1:80,有时可高达 1:160,即使用 3—5% 红细胞吸收也不能完全排除,血清经灭活后亦不能彻底破坏这类抗体。因此判定结果时应加重慎重。

3. 斑疹伤寒血凝诊断标准问题,李在连等曾对 233 名正常人及非斑疹伤寒患者血清进行血凝效价的测定,提出 1:50 以上作为本病血凝的阳性标准,但未说明待检血清是否经过红细胞吸收问题。吴家驹报告,检查 338 份正常人及非斑疹伤寒患者血清的结果,当血清未用羊红细胞吸收时血凝效价 1:50 阳性者占 36.7%, 1:100 阳性者占 10.5%,血清用羊红细胞吸收后阳性率降低,1:50 阳性者平均为 4.3%, 1:100 为阴性,认为 1:200 以上作为阳性标准。陈渊民等<sup>[22]</sup>对 16 名既往患者及 131 名正常人血清检查结果,血凝效价在 1:200 以上者分别为 87.5% 及 10.7%。与上述结果相差较大,这可能在当地人群中存在着隐性感染所致。有些文献<sup>[3,9]</sup>主张以 1:250 血凝效价作为判定结果的最低效价,因此就可完全排除非特异性反应。如以单份血清作为诊断标准应以 1:1000 以上者为宜。

综上所述,血凝试验不仅对免疫学理论的研究,而且对解决微生物学、流行病学以及寄生虫病学等诊断问题亦有实用价值。由于醛化红细胞的应用,可将致敏红细胞制成冻干制品,既可缩短检验时间,又能长期贮存备用。用羊红细胞作为载体时,待检血清必须用羊红细胞吸收才能获得正确结果。

## 参 考 文 献

- [1] Chang Shin-Man: *J. Immunology*, 70: 212, 1953.
- [2] Мельников Л. А.: *Вопр. Вирусол.* 1: 17, 1957.
- [3] 李在连等: *微生物学报*, 9: 71, 1963.
- [4] Danill, T. M. et al.: *J. Immunology*, 4: 49, 1963.
- [5] Лешнянцев Р. А. и др: *ЖМЭИ*, 9: 62, 1967.
- [6] Ling, N. B.: *Brit. J. Haemat.*, 7: 299, 1961.
- [7] Matossian, R. M. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12(1): 104, 1962.
- [8] Golinevich, H. M. etc.: *Revue d'Immunol.* 33 (4—5): 229, 1969.
- [9] Яблонская В. А.: *ЖМЭИ*, 5: 111, 1959.
- [10] Herbert, W. J.: *Immunology*, 13: 459, 1967.
- [11] Walberg, G. et al.: *J. Immunology*, 105: 797, 1970.
- [12] Mergenbagen, S. E. et al.: *Immunology*, 73: 8, 1969.
- [13] Голяневич Е. М.: *ЖМЭИ*, 8: 58, 1981.
- [14] Kohei Shioira: *Japan, J. Exp. Med.* 34: 345, 1964.
- [15] 吴家驹: *中华内科杂志*, 13(1): 86, 1965.
- [16] Hirata, A. A. et al.: *Appl. Microbiol.* 17: 563, 1963.
- [17] Hirata, A. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103: 343, 1969.
- [18] Woodhead, B. G. et al.: *J. Clin. Path.* 24: 285, 1971.
- [19] Taylor-Robinson, B. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 1073, 1965.
- [20] Мельников Л. А.: *Вопр. Вирусол.* 4: 495, 1959.
- [21] Голяневич Е. М. и др: *ВЕСТНИК. АМН. СССР.* 10:63, 1969.
- [22] 陈渊民等: *微生物学通报*, 9(1): 21, 1982.
- [23] Murray, e. et al.: *J. Immunology*, 94: 734, 1965.
- [24] Voronova, Z. A.: *Acta Virol.* 12: 738, 1971.
- [25] Лешнянцев Р. А. и др: *Лаб. ДЕЛО.* 12:738, 1971.
- [26] Ceruyeva et al.: *Bull. WHO.*, 55(6): 669, 1977.
- [27] 陈渊民等: *流行病学杂志*, 3: 189, 1979.