

紅血球凝集反应在痢疾早期快速 诊断上应用的初步报告*

吳开宇 郑国樞

(福建省流行病学研究所)

不論急性慢性的細菌性痢疾,它的診斷根据唯以細菌学的培养为最可靠。但細菌培养需时較长;且須一定的設備与技术条件。目前虽有不少細菌学家在努力改进,但它的阳性率与時間性仍难滿足所有典型或非典型病例診斷上的期望。在痢疾早期快速診斷方面,苏联曾有快速凝集及半抗原沉淀反应等方法,但它在特异性上,亦有不同的見解^[1],因此另一种的早期快速診斷方法,有一定研究的价值。

紅血球凝集反应(以下簡称为 HA)在傳染病診斷上,是有不少的疾病可以应用^[2],但是否可以应用于痢疾早期診斷,尙未聞及报导。1956年 Neter 氏曾提出腸系細菌血球凝集及在診斷上应用可能性的报导^[3],这报导中主要还是利用 HA 来測定病人或免疫血清中的特异抗体^[3]。同年鈴木武夫氏只提到腸內細菌“O”抗原的赤血球凝集反应的方法^[4]。关于痢疾桿菌 O 抗原 HA 的敏感性与特异性問題,据作者实验結果,尙不次于細菌凝集反应,且方法較培养簡便^[5];但是否可以用早期病人大便培养物煮沸粗制 O 抗原致敏的紅血球作 HA 試驗来解决痢疾早期的輔助方法尙是一个沒有解決的問題。我們于 1957 年在細菌学检查急性痢疾病人大便的同时,再作 HA 試驗共 311 例;在这些病例中另选 100 例加作快速凝集,以比較三种不同方法的阳性率。此外对健康人大便中的大腸菌属細菌是否会影响本法的特异性問題,亦曾作了研究,茲将結果报导如下。

材 料 和 方 法

(一)細菌学检查 从病人肛內采取标本,每天或隔天一次,連續 3 次。标本采取后直接划于中国蓝,伊紅美藍等培养基上。經孵育 18—24 小时后,鈎取可疑菌落,接种于双糖鉄培养基。将分离得純培养,接种于各种糖酸酵管,連續观察三周,及半固体等。并作靛基质、硫化氢、M. R.、V. — P.、枸橼酸鈉利用、尿素分解等試驗。最后作試管凝集反应(診斷血清系上海生物制品所制)。

(二)快速凝集反应 系按苏联介紹的方法^[5]。

(三)紅血球凝集試驗:

1. 抗原的制备:在細菌培养的同时,将大便混匀,然后接种于 pH7.6 的普通琼脂斜面上,37℃ 孵育 16—24 小时。用生理盐水 3 毫升(或 pH6.4 的緩冲盐水)洗下培养物,然后加热煮沸 2 小时,离心沉淀,于沉淀中加生理盐水洗 3 次^[6],最后一次于沉淀中按原量

* 1958 年 1 月 22 日收到。

加入 pH6.4 緩冲盐水搖匀备用(亦可取上清液为抗原)。

2. 紅血球及抗血清, 稀釋液的具体方法見另文报告^[6]。

3. 紅血球致敏: 吸 0.0375 毫升的紧压血球加入于 1.5 毫升上述抗原中, 使成 2.5% 血球浓度(另作一管盐水对照)混匀后置 37℃, 2 小时, 时加振盪, 然后用 pH6.4 緩冲盐水以每分鐘 500—1,000 轉速度沉淀洗滌 3 次, 弃上清液, 按原量加入稀釋液, 使成 2.5% 血球悬液。

4. 紅血球凝集正式試驗: 将病人大便培养物粗制 O 抗原所致敏的紅血球分別吸取 0.05 毫升加入一系列不同稀釋度的福氏、宋內氏诊断血清及正常血清的各管中 (1:160 开始), 搖匀, 置 37℃ 中 2 小时。

5. 結果的判断: 凝集价在 1:320 以+++ 以上者为阳性。

結 果

在 311 例临床诊断为急性痢疾的病人大便細菌培养同时作了 HA 反应, 結果比較見表 1。

表 1 細菌培养与 HA 結果比較

方 法	細菌 培 养		HA 反 应	
	阳性的人数	%	阳性的人数	%
总例数				
311	136	43.7	164	52.7

由表 1 說明 HA 的阳性率在急性病例中比細菌培养要高 9—10%。在 311 例中細菌培养結果与 HA 結果完全符合者 74%, 不完全一致者 26%, 見表 2。

表 2 細菌培养与 HA 結果比較

相 符 合 情 况				不 相 符 合 情 况			
細菌学方法	HA 方法	例数	%	細菌学方法	HA 方法	例数	%
培养阴性	HA 阴性	120	38.7	培养阴性	HA 阳性:	49:	15.8
培养阳性:	HA 阳性:	106:	34.0		1. 福氏型	24	
1. 福氏型	1. 福氏型	77			2. 宋內氏型	25	
2. 宋內氏型	2. 宋內氏型	29		培养阴性	HA: 福氏及宋內氏均阳性	4	1.3
培养阳性:	HA: 福氏	4:	1.3	培养阳性:	HA 阴性:	22:	7.0
1. 福氏型	及宋內氏型	2		1. 福氏型		19	
2. 宋內氏型	阳性	2		2. 宋內氏型		3	
				培养为福氏型	HA 为宋內氏型	5	1.6
				培养为宋內氏型	HA 为福氏型	1	
总 共		230	74.0%			81	26%

从表 2 可知, 在 311 例中結果相符合者有 230 例 (74%), 不符合者有 81 例 (26%), 在不符合中, 以培养阴性而 HA 阳性者占半数以上 (15.8%), 这些病例在临床诊断, 均系急性痢疾。相反, 培养阳性而 HA 为阴性者只占 7.0%。

关于大便培养物煮沸粗制 O 抗原致敏的紅血球凝集反应的敏感度, 茲就培养阳性,

HA 亦阳性的 106 例中加以分析见表 3。

表 3 大便培养物粗制 O 抗原 HA 反应的敏感性

血清	福氏血清							宋内氏血清						
	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	共計	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	共計
例数	9	13	25	17	11	2	77	2	2	3	10	8	4	29
%	11.6	16.8	33.8	22	14.2	2.6	100	6.9	6.9	10.4	34.5	27.5	13.8	100
88.3%								93.1%						

从表 3 可看出,当細菌培养出福氏痢菌,而 HA 反应对福氏型血清亦呈阳性反应的 77 例中,有 88.3%,它的凝集度是在 1:640—10240 之間。在培养出宋内氏痢菌同时对宋内氏诊断血清的 HA 反应亦阳性的 29 例中,有 93.1% 亦呈高价凝集 (1:640—10240),在这些病例中同时对福氏或宋内氏有低浓度 (1:160 以下) 有交叉凝集者仅占 6.8%—14.2%。

进一步我們又按照急性痢疾病人病程的发展相当于疾病的日期来研究实验室检查的结果。从表 4 可看出大便培养物的 HA 反应和細菌培养的最高阳性率均是出现在发病的 1—3 天。

表 4 不同病程的細菌培养与 HA 阳性率比較

发病日	病人数	細菌检查阳性者		HA 阳性者	
		绝对数	%	绝对数	%
1—3日	125	67	53.6	85	68.0
4—5日	43	14	30.2	18	41.9
6—10日	12	3	25	4	33.3
10日以上	7	1	12.5	1	12.5

为了比較 HA 反应和快速凝集反应的敏感性和特异性,在細菌培养的同时,选 100 例临床诊断为急性痢疾患者,作了三种不同方法比較,结果见表 5。

表 5 100 例痢疾病人三种不同方法阳性率比較

诊断	病例数	細菌培养阳性			快速凝集阳性			HA 反应阳性		
		福氏型	宋内氏型	%	福氏型	宋内氏型	%	福氏型	宋内氏型	%
急性痢疾	100	32	4	36	30	6	36	40	16	56

从表 5 看来,大便培养物的粗制抗原 HA 反应的阳性率要比細菌培养、快速凝集等方法所得的阳性率高約 1.5 倍。这三种方法所得结果并非完全符合。在細菌培养出福氏痢疾桿菌的 32 例中,结果完全相符合者 HA 有 24 例 (75%),而快速凝集仅有 16 例 (50%); 不符合者 HA 有 8 例 (25%),而快速凝集有 16 例 (50%); 其中有 2 例 (6.3%) 培养是福氏型,快速凝集是宋内氏型。这种完全相反结果的现象虽在本文 311 例中也占 1.6% 但不如快速凝集反应之高。同样在細菌培养出宋内氏痢菌的 4 例中,HA 结果是完全符合,但快速反应只一例符合 (25%)。相反在快速反应阳性的另外 5 例中,細菌培养均为阴性,HA 亦为阴性。从这些结果的分析,更明显地可看出快速凝集反应是不如 HA 的特异性高。

我們進一步為了闡明本法的特异性，特選無痢疾病史健康人大便 53 例的培養物作 HA 試驗（這些兒童同時作細菌培養均為陰性）。結果凝集度在 1:160 者福氏血清有 2 例，宋內氏血清有 3 例，而在 1:320 以上者共有 2 例（3.7%）。其中 1 例是對宋內氏血清，它的凝集度為 1:320；另 1 例是對福氏血清呈陽性反應，它的凝集度為 1:640。其他標本均未發現有交叉凝集現象。此外，我們又曾將這些大便進行分離培養，將所分離得大腸桿菌，副大腸菌等共 107 株，分別製成煮沸 O 抗原，對福氏及宋內氏血清作 HA 反應。結果僅有部分菌株，有低濃度的交叉凝集；在宋內氏血清 1:320 者有 6 株（5.6%），1:640 者 1 株（0.9%），其餘均無交叉凝集。在福氏血清 1:320 以上者，所有大腸菌株，均未發現對之有交叉凝集現象。但本文 311 例 HA 陽性的凝集度，在福氏血清者，88.3% 是在 1:640—1:10240，在宋內氏血清者 93.1% 是在 1:640—10240。從這些凝集度與大腸菌等交叉的凝集度相比，懸殊極大。因此我們認為健康人大便中的大腸菌或副大腸菌，雖在 HA 反應，對痢疾血清能有低濃度交叉凝集現象，但百分率低，未超過 3.7—7%。交叉凝集度絕大多數是在 1:320 以下，而我們的結果，陽性的判斷在 1:320 以上（+++）者，對本法的特异性與結果的判斷不至影響。

討 論

一種特异性及敏感性較高且手續方法較簡便的痢疾早期快速診斷方法的研究，不論在臨床學或流行病學上，均具有重要的意義。從 1940 年以後，蘇聯先後已有不少有關半抗原沉淀法及凝集反應，噬菌體等診斷方法的報告^[9]，關於它們的特异性問題，尤其半抗原沉淀法，許多學者的意見並非是一致的^[1,9,10]。血球凝集在檢查抗體上是比細菌凝集法為敏感，這是公認的，但應用痢疾病人早期大便培養物的煮沸粗制“O”抗原致敏的血球對已知免疫血清作 HA 反應，在作者手邊的國內外文獻上尚未聞及報導。據本文 311 例的材料和結果，我們認為本法比細菌學檢查，和快速凝集的陽性率要高（10% 左右）；在細菌培養陽性的 128 例中，本法 HA 陽性者有 106 例（83%）；且在細菌培養陰性的 169 例中，HA 陽性者有 49 例（29%）。從痢疾桿菌不同型的特异性上看，在培養出福氏型痢疾桿菌的 96 例中，HA 反應是福氏型者占 86%，在培養出宋內氏痢疾桿菌的 32 例中，HA 反應 96.8% 亦為宋內氏型。從血凝陽性反應所呈現的凝集度，在本文病例中，有 88.3—93.1% 都是在 1:640—10240 之間。從不同發病的病程中的陽性率來看；本法均比相應情況，或同時的細菌培養的陽性率均高約為 1.3 倍。據這些材料，我們認為本法方法簡單不須特殊設備；且具有相當高的敏感性与特异性，在急性痢疾早期輔助診斷上，是可以應用，尤其在廣大鄉村山區缺乏細菌培養條件的地區。這是本法主要優點。但本法的缺點：（1）如當大便中病原菌少時，這時很可能培養是陽性而 HA 是陰性，這一點在本文中細菌培養陽性但 HA 為陰性的 6.8% 病例，可能即緣於此因。（2）腸道細菌的抗原構造相互交叉者很多，如對照用整個培養而不是選幾個大腸菌時，這樣交叉反應可能會多些。

從本法整個實驗過程所需的時間看，僅 20—30 小時即可報告，比其他痢疾診斷方法^[8]均快 2.4—3.2 倍。從具體工作中，我們在部分病例中又加作上清液抗原致敏血球的 HA 反應，與沉淀部分抗原相比較，結果發現二者的敏感性与特异性，無何顯著差別；陽性的凝集度是相近的，與我們實驗室結果^[6]是完全一致的。由於上清液抗原在本法上不遜於沉

淀抗原,因此在本法具体操作过程中要比沉淀抗原少洗滌 3 次,这样更簡化了本法手續与縮短了报告時間。

血凝反应,一般学者多用健康“O”型的血球或綿羊血球,但本法由于不是用来測定病人血清中的特异抗体,因此可以不拘血型,只要健康人的血球即可,这样更提供了实际上无綿羊,或不能检查血型地方的方便条件,与广泛采用的可能性。

在我們試驗病例中,細菌培养出福氏型或宋內氏型但 HA 的結果与之相反者亦占 1.9%,此外在实践中发现在 HA 阳性病例中尚有少数对福氏或宋內氏血清同时有不同凝集度交叉凝集者,这些現象目前尚难解释,有待今后进一步研究。

关于健康人大便中的大腸桿菌与副大腸菌是否在本法結果中也有副凝集現象呢?据文献上記載,在半抗原沉淀反应上是有这种現象,且在健康人中有 16.9% 是阳性^[1]。但从本文材料看来,健康人大便培养物只有 3.7% 对福氏或宋內氏血清的 HA 反应有低浓度交叉凝集;其凝集度絕大部分是在 1:320 以下,在 1:640 以上者仅福氏型 1 例(1.8%)。而本文 HA 阳性的 106 例的凝集度絕大多数是在 1:1280 以上,阳性結果的判定是以 1:320 以上(+++)者为阳性。因此我們认为本法大便培养物中,虽同时存在有大腸桿菌的抗原,但对痢疾桿菌的抗原特异性,是无何影响。

結 論

1. 本文报告在細菌培养同时用大便培养物粗制的煮沸“O”抗原致敏的血球,对已知痢疾各型的診斷血清的 HA 試驗检查了 311 例,其中 100 例同时加作快速凝集反应以資比較,結果 HA 的阳性率比細菌培养和快速凝集均高 10%。

2. 大便培养物粗制抗原的 HA 反应,在痢疾早期診斷上,是具有較高的敏感性与特异性,同样可以初步的决定是福氏型抑或宋內氏型等。阳性結果的判断,凝集度須在 1:320(+++)以上。至于大便培养物中虽含有相当数量的大腸菌,但对痢疾桿菌“O”抗原的特异性,并无影响。

3. 本法操作方法簡便,不需特殊設備及复杂的培养基,仅在 20—30 小时后即可报告,能在一般化驗室中进行,不但增扩了痢疾实验室的活动內容,且提供了广泛开展痢疾診斷的可能性。但不能完全代替了細菌培养。

参 考 文 献

- [1] Ю. И. Гусева: 微生物学譯报, 3:12, 1956.
- [2] 陶义訓: 中华卫生雜誌, 4:296—299, 1955.
- [3] E. Neter 等氏: 微生物学文摘, 1:12, 1957.
- [4] 鈴木武夫氏: 北里月刊, (28):6, 1956.
- [5] С. А. Ботвиник 等氏: 微生物学譯报, 2:104, 1955.
- [6] 吳开宇等: 痢疾桿菌“O”抗原的血凝試驗, (見前文).
- [7] 林飞卿氏: 上海第一医学院学报 3:161—166, 1957.
- [8] 郑振羣等: 微生物学譯报, 1:189, 1954.
- [9] З. А. Макарова: 微生物学譯报, 1:209, 1954.
- [10] О. С. Грлгина: 微生物学譯报, 3:42, 1956.

APPLICATION OF HEMAGGLUTINATION TEST IN THE DIAGNOSIS OF BACILLARY DYSENTERY

WU KAI-YU AND CHENG KUO-KUEI

(Provincial Research Institute for Epidemiological Diseases, Fukien, China)

The diagnosis of bacillary dysentery, acute or chronic, can hardly be said to be established until it is confirmed bacteriologically. However, the bacteriological procedure is expensive and time consuming. In recent years, direct rapid agglutination and precipitation tests have been tried by Soviet workers and found to be more sensitive but less specific.

In this laboratory, a series of experiments have been performed employing boiled saline extract from 18—24 hours whole stool culture as the sensitizing agent for human "O" group of erythrocytes to be agglutinated by known immune sera.

On the first experiment, conventional bacteriological culture method and the HA were carried simultaneously on 311 stool specimens collected from acute cases of dysentery. Later, direct rapid agglutination was made in addition of the above two tests on 100 stool cultures. The test has been found to be more sensitive and highly specific, as it gave 10—15% more positive reactions. The majority of the positive reactions occurred in high dilutions of immune sera with the titres of 1:640 and even 1:10240. The results of the HA and bacteriological method agreed in 74% of the 311 specimens tested and shown a discrepancy about 26%. Among the later group, 15.8% were negative by bacteriological culture method but positive by a HA and about 7% were on the reverse.

A few strains from 107 strains of colon and paracolon bacilli isolated from healthy children exhibited cross HA reaction toward Flexner and Sonne immune sera, but in lower titres.

From the above results, the HA test is found to be sensitive and specific and therefore it may serve as a supplementary test for the routine diagnosis of bacillary dysentery.