

钩端螺旋体炭凝集试验的研究

II. 玻片炭凝集试验用于钩端螺旋体菌群的快速鉴定*

鲍行豪 顾全明

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

1. 本文使用钩端螺旋体免疫炭血清, 对 13 群 14 型国内标准钩端螺旋体菌株及 522 株不同群(型)地方株, 进行了玻片炭凝集试验定群鉴定, 同时用显微镜凝集试验作比较, 结果相符。

2. 炭凝集试验所用钩端螺旋体抗原浓度以 50 条左右/视野(400 倍)为宜, 或采用培养管对光观察, 能见到云烟状轻微乳光的培养物亦可。培养时间较长, 大部分菌体呈现溶解或有较多凝块培养物, 对炭凝集试验定群亦无影响。

3. 鉴定步骤, 先与当地主要流行菌群相应免疫炭血清初试, 如发现有不起凝集或“1+”凝集者, 再用全套(13 群 14 型)免疫炭血清复试, 以确定群别。

4. 用炭凝集试验鉴定钩端螺旋体菌群, 具有较高的敏感性及良好的特异性。并且操作简便, 反应出现迅速, 结果判断容易等优点。

以往, 钩端螺旋体菌株的定群鉴定, 一直使用显微镜凝集试验^[1,2]。此法操作技术比较复杂, 又需一定的设备, 而对结果判断一时难以掌握。

本文使用钩端螺旋体免疫炭血清对 14 株国内标准钩端螺旋体菌株, 及 522 株不同群的地方菌株进行了玻片炭凝集试验的定群鉴定, 获得了与显微镜凝集试验相同的结果。

用炭凝集试验作定群鉴定, 操作简便, 反应出现迅速, 结果易于判断, 因而适用于钩端螺旋体菌株的鉴定。

材料与方法

一、材料

1. 菌株 国内标准 13 群 14 型钩端螺旋体菌株, 及 522 株不同群地方菌株。

2. 钩端螺旋体免疫血清 系用国内 13 群 14 型标准钩端螺旋体菌株免疫家兔获得, 其滴度在

1:12,800—1:51,200 之间(显微镜凝集试验^[2])。

3. 活性炭 上海化学纯活性炭(新中国化学厂出品, 批号 642), 使用前在 80—100℃ 烤箱烤 8 小时, 置密闭玻璃瓶中备用。

4. 正常兔血清^[3]。

二、方法

1. 钩端螺旋体培养物制备 与显微镜凝集试验相同, 400 倍暗视野显微镜检查, 每视野有 50 条左右即可; 或将培养管对着光观察能见到云烟状轻微乳光。培养时间较长(1 个月以上)有溶菌及凝块的培养物亦可。

2. 免疫炭血清制备^[3]。

3. 免疫炭血清质量鉴定 每制备一种免疫炭血清, 必须与相应钩端螺旋体进行质量鉴定。其方法是, 取标准钩端螺旋体菌株培养物(50 条左右/视野, 400 倍)2 滴, 分别滴于清洁玻片的第一、第二处; 再取含 1% 正常兔血清磷酸盐缓冲

* 本文承罗海波同志审阅, 特此致谢。

本文 1973 年 9 月 18 日收到。

液 1 滴于同一玻片第三处,第一、第三处各加与菌株相应的免疫炭血清 1 接种环,第二处加正常炭血清 1 接种环,充分摇动玻片 2—3 分钟,初步观察一下,静置 5—7 分钟后(盖上培养皿,内加湿棉球,防止干燥)取出,在白色背景下观察最后结果。如第一处出现明显凝集,第二、第三处不出现凝集,则所制备免疫炭血清合格。如第一处不出现凝集,则免疫炭血清不合格,可取吸附过的同份免疫血清用活性炭重复吸附 2—3 次,以制备出合格的免疫炭血清。

4. 炭凝集试验鉴定菌株的方法 取清洁玻片四张,编 1—15 号,依次每号加被检菌液 1 滴,挑取 1—14 群(型)免疫炭血清各 1 接种环于 1—14 号菌液中,第 15 号菌液加正常炭血清 1 接种环作对照(所加炭血清要适量以深灰色为好),轻轻磨匀,充分摇动玻片 2—3 分钟,至炭粒均匀分布为止,静置 5—7 分钟(盖上培养皿,内放湿

棉球,防止干燥)后,取出玻片在白色背景下观察结果。如均未见明显凝集,可再次充分摇动玻片,使炭粒均匀后,再静置 5—7 分钟观察最后结果。

5. 结果判断 “3+”炭粒明显凝集,液体完全透明;“2+”炭粒大部凝集,液体透明;“1+”炭粒凝集细小,但与对照有差别,液体稍透明;“—”炭粒均匀分散,不凝集,液体不透明,或摇动后不凝集之细小炭粒聚集液滴中央。

炭凝集在“2+”以上为判断标准。

结 果

一、对 13 群 14 型国内标准钩端螺旋体菌株的玻片交叉凝集试验结果

使用 13 群 14 型钩端螺旋体免疫炭血清与 13 群 14 型国内标准钩端螺旋体菌株作玻片交叉凝集试验,结果见表 1。

表 1 13 群 14 型钩端螺旋体免疫炭血清对 13 群 14 型国内标准钩端螺旋体菌株交叉凝集结果

免 疫 炭 血 清	黄 疸 出 血 群	爪 哇 群	犬 犬 群	拜 拜 伦 群	致 致 热 群	秋 季 热 群	澳 州 群	波 摩 那 群	流 感 伤 寒 群	七 日 热 群	七 日 热 群	巴 达 维 亚 群	豕 耗 群	蜜 耗 群	1% 免 血 清 盐 水 对 照
黄 疸 出 血 群	3+	1+	1+	—	—	—	—	1+	—	—	—	—	—	—	—
爪 哇 群	1+	3+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
犬 犬 群	1+	—	3+	—	—	1+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
拜 拜 伦 群	—	—	—	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
致 致 热 群	—	—	—	—	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
秋 季 热 群	1+	—	—	—	1+	3+	—	—	1+	—	—	—	—	—	—
澳 州 群	—	—	—	—	—	—	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—
波 摩 那 群	1+	—	—	—	—	—	—	3+	—	—	—	—	—	—	—
流 感 伤 寒 群	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	1+	—	—	—	—	—
七 日 热 群、七 日 热 型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	2+	—	—	—	—
七 日 热 群(裘 利 斯 型)	1+	—	1+	—	—	—	—	—	—	3+	3+	—	—	—	—
巴 达 维 亚 群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1+	—	3+	—	—	—
豕 耗 群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	—	—
蜜 耗 群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	—
健康 炭 血 清(对 照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

从表 1 可以看出,13 群 14 型钩端螺旋体免疫炭血清与相应钩端螺旋体菌株凝集最好,而对其它群少数菌株仅有“1+”交叉反应。但七日热群七日热型与七日热群裘利斯型两者凝集程度几乎相同。

二、菌量对炭凝集强度的影响

使用黄疸出血群及爪哇群两个菌株的不同含菌量悬液与相应免疫炭血清作玻片凝集试验,观察不同菌量对炭凝集强度的影响,结果(表 2)表明,每视野含 50—25 条

表 2 不同含菌量对炭凝集强度关系

条数/视野 (400×) 试 验 菌	100±	50±	25±	13±	7±	菌原液加 正常炭血 清 对 照
黄疽出血群沃尔登不完全型	3+	3+	2+	1+	1+	—
爪 哇 群 爪 哇 型	3+	3+	2+	2+	1+	—

左右钩端螺旋体,可出现明显凝集反应;少于 25 条则反应减弱。我们又以培养管对着光观察,见有云烟状轻微乳光的培养物作玻片炭凝集试验,凝集效果明显。

三、对标准菌株及地方菌株的鉴定结果

用 13 群 14 型钩端螺旋体免疫炭血清

对 14 株国内标准菌株,及 522 株不同群地方株,进行玻片炭凝集定群鉴定试验(其中 94 株黄疽出血群、49 株波摩那群及 84 株爪哇群菌株,用筛选法定群)。结果指出,玻片炭凝集试验与显微镜凝集试验的鉴定结果完全相同(表 3)。免疫炭血清与相应菌炭凝集强度均在“2+”以上。

表 3 522 株钩端螺旋体地方菌株炭凝集、显微镜凝集定群结果

鉴定方法 鉴定菌株数	黄疽出血群	爪哇群	犬群	致热群	秋季热群	澳洲群	波摩那群	流感伤寒群	七日热群	巴达维亚群	豕群	合计
炭凝集试验	182	176	8	5	2	11	125	1	7	4	1	522
显微镜凝集试验	182	176	8	5	2	11	125	1	7	4	1	522

讨 论

用炭凝集试验鉴定菌种,在鼠疫及野兔热杆菌等方面已有报道^[3,4]。钩端螺旋体菌株的定群鉴定,一直使用显微镜凝集试验^[1,2],此法操作较繁,并要有暗视野显微镜等设备,而对结果判断,需要有一定经验,因此,钩端螺旋体流行区的基层单位,尚难普遍应用。

本文使用钩端螺旋体免疫炭血清的炭凝集试验,鉴定了国内 14 株标准钩端螺旋体菌株及 522 株不同群的地方株,同时用显微镜凝集试验对照鉴定,结果相符,从而证明炭凝集试验定群具有良好的特异性。

在标准菌株交叉试验和菌种鉴定过程中所出现的个别的“1+”交叉反应,和相应

菌株凝集是有明显差别的。因此,不影响炭凝集试验的定群鉴定。但七日热群的两个型,其炭凝集程度相同,这也与显微镜凝集试验定群是一致的。

本文对大部分菌株鉴定中,培养物选择是以对光观察能见到云烟状轻微乳光者,结果均能出现明显炭凝集反应。不仅如此,用培养时间较长(3 个月),大部分菌体呈现溶解或有较多凝块的培养物,同样能得到明显的结果。这是因为炭凝集试验本身不受抗原限制,对溶解性抗原更具有敏感性^[5]。

炭凝集试验还有操作简便,反应出现迅速,判断结果容易等优点,适合于钩端螺旋体菌株的定群鉴定。至于是否可将钩端螺旋体型血清吸附于活性炭微粒上,用于

钩端螺旋体菌株的定型鉴定，有必要作进一步研究。

参 考 资 料

[1] Schüffner, W. et al., *Zbl. Bakt., Labt. Orig.*,

101: 405—431, 1927.

[2] Gochenour, W. S. et al.: *Amer. J. Publ. Health*, 43: 405—410, 1953.

[3] 白常乐等：流行病学杂志, 3(1): 20—25, 1965.

[4] Яфаев, Р. X.: *Ж. Микробиол. Эпидер. Иммунобиол.* 9: 93, 1963.

[5] 鲍行豪：微生物学报, 14(1): 1974.

STUDIES ON CARBON AGGLUTINATION TEST FOR *LEPTOSPIRA*

II. RAPID IDENTIFICATION OF LEPTOSPIRAL STRAINS

PAO HSING-HAO AND GUO QUAN-MING

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

1. This paper reports a Slide Carbon Agglutination Test (SCAT) for the identification of national standard *Leptospira* strains (13 groups with 14 type-strains) and 522 local strains by means of the various type antisera adsorbed on to carbon particles. Complete agreement was observed between the SCAT and the Microscopic Agglutination Test (MAT).

2. The reported data showed that appropriate concentration of *Leptospira* for SCAT was about 50 per each microscopic field (400×), or with the appearance of a faint opalescence in liquid cultures, but that the reaction was not rela-

ted to the lysis or clumping of *Leptospira*.

3. It is suggested that screening test could be carried out by means of the anti-sera adsorbed on to carbon particles which were produced against the chief local strains. Only in case of negative or one plus reaction, a further test with 13 groups, 14 type sera adsorbed to carbon particles should be carried out.

4. SCAT was found to be simple and rapid to perform, and the results easy to read, specific as well as sensitive, so the test might be suitable for identification of *Leptospira* strains.