

康氏抗原的製造与滴定的改善

李在連

(山东医学院微生物学教研组)

梅毒血清学診斷, 包括沉澱反应与補体結合反应兩大類, 在一般的實驗室中, 受了設備及技術上的限制, 大部分僅採用沉澱反应。許多种的沉澱反应中, 尤其是以標準康氏試驗应用得最廣泛, 但是由於抗原製備手續的不統一, 方法上有所差異, 操作的細節也不尽一致, 所以製造成品的規格、滴度, 特別是抗原的結合力(敏感性与特異性)等方面, 都存在着某些程度的懸殊。最常出現者多半是各試驗室所製備抗原的敏感性与特異性有一定程度的分歧, 因而造成不少不应有的紛擾。例如, 同一標本, 在某實驗室檢驗的結果為陽性反应, 而另一實驗室檢驗的結果是陰性的情况也經常發生的。这种現象, 是必須、並且应儘量避免的。除了提高技術水平与讀取結果的精確性外, 还得从抗原的製造与滴定的質量的改善上加以克服。

就總的方面來說, 一种好的抗原必須具備有高度的特異性和敏感性, 並要避免特異性好而敏感性不足的缺點。爲了梅毒血清反应本身就不是特異性的試驗, 爲了目前還沒有一種敏感性与特異性兩者得兼的抗原, 生物性假陽性反应还是常常的出現, 我們更当慎重从事, 使抗原的製造及滴定方法首先趨於合理与合格。

康氏抗原和其他牛心抗原一樣, 其製造的成果是否滿意, 主要是決定於牛心粉質量的好壞, 最常見者如牛心肌乾燥的時間要是過長, 則抗原的滴度, 結合力等都要受到影響。此外, 用乙醚處理的過程, 胆脂素加入量的準確性, 及最後所採用的滴定法和滴度的規定等各個環節, 均有一定的關係, 其中尤其是以牛心粉製造過程中的牛心肌乾燥速度最爲重要。這方面至少有兩種表現: 一則因爲乾燥的時間過長, 所得的結果就表現在抗原滴度的增高而趨於過敏。一則因爲在玻板上擱置過久, 引起心肌抗原性的變質, 特別是抗原結合力的降低。至於康氏抗原效價的滴定, 也是極其重要的, 一般採取抗原在鹽水中溶化性試驗及結合力單位的滴定等兩種方法, 但往往着重於溶化性單位的滴定而忽略了結合力單位的滴定, 因而對於一批抗原的抗原性的好壞就無法掌握, 這是一個極大的缺憾。關於這方面的工作, 作者幾年來曾加以注意,

現將製造與滴定方法介紹如下，並加以討論。

(一) 標準康氏試驗抗原的製造

1. 牛心粉的製備

(1) 取新鮮牛心 3—4 個 (或 2—3 個)，洗去血塊，用乾淨的紗布擦乾，以小刀剝除結締組織、脂肪、血管及瓣膜等，保留純牛心肌。

(2) 將純的牛心肌切成小塊，置絞肉機中絞成細末，然後薄薄的攤於玻璃板上，用電扇煽至表面上完全顯得乾燥為止 (約持續吹 6 小時)。此時心肌貼近玻璃的一面尚未完全乾燥，但仍用刀全部刮下，收集於鋪有潔淨紙張的鉄絲筐中，置 37°C 孵箱內过夜，使其徹底乾燥，次日便可研磨，過篩後貯褐色瓶中備用。

2. 康氏抗原的製造

取乾牛心粉 25 克置三角燒瓶中，加 100 毫升的乙醚，不斷搖動約 20 分鐘，過濾，棄濾液。將牛心粉收集於原瓶中，加 75 毫升乙醚再搖 20 分鐘，過濾；如法再操作二次，末次須延長搖盪時間 (約搖 30 分鐘)，過濾。將牛心粉攤於瓷盤上，使乙醚揮發。收集已處理的牛心粉，秤其重量，每克加無水酒精 5 毫升，貯一潔淨帶玻塞的磨口瓶中，靜置室溫或 22°C 孵箱內 3 天後過濾，棄濾渣。量取濾液的總量，每毫升加 6 毫克純膽脂素，放在 37°C 水浴箱或孵箱中过夜待膽脂素完全溶解後過濾即為康氏抗原。

製造牛心粉，是抗原製造中的關鍵問題，如果按照上述方法操作，能保證在 12—24 小時內使牛心肌完全乾燥，爭取於 24 小時左右進行磨粉，這樣足以保證抗原不至於變質。五年來我們實行此法收到了良好的效果，廿餘批的大量製造過程，從未有發生相反的結果。其滴度無過高現象，敏感度及特異性亦極為滿意，無論寒暑或潮濕的季候皆未有任何影響。在製造牛心粉時不应当把牛心肌切好後再用水浸泡或洗滌，絞碎後在玻板上要攤得比較薄，而且不必等待所謂在玻板上徹底的乾燥，因為很難使得表面以及深層貼於玻板的一面的牛心肌均完全乾乾。

製造牛心粉除了迅速脫水之外，還得防止潮解，故必須爭取迅速乾燥。斷斷續續的長時間在玻板上煽吹，在濕度較大的地區往往造成乾燥後又重新潮解的因素。是以許多人在思想上總認為，要在短時間內吹乾心肌是不容易辦到的，至少也得 3—4 天，而且事先還得挑個好的天氣、適當的季節等等，事實上這不過是方法上的問題。經過磨粉後更應嚴密的貯存於褐色玻瓶中，瓶口加蠟封固以防潮解。牛心粉在室溫中保存的時間約為半年，超過半年，往往抗原性發生改變，通常為抗原滴度的增高，呈過敏的傾向。如果保存於冰箱中則更需嚴密封口，因為冰箱的濕度更大。最好認為

該批牛心粉比較滿意後即陸續把牛心粉浸出，保存備用，保存浸出液更勝於保存牛心粉。抗原浸出液加胆脂素最好在完全溶解後 3—4 天再行過濾滴定，如溶解後即行過濾滴定，多半不穩定，結果不佳。

(二) 康氏抗原的滴定

抗原的滴定，一般採用鹽水溶化試驗及結合力試驗，先確定抗原的溶化單位後，再按照所確定的效價進行結合力試驗，以測定抗原的敏感度與特異性，並和標準的抗原作比較。如此不僅手續比較繁複，而且在溶化試驗時效價每難判定，因為溶化滴度與結合力不尽一致。為了精簡手續和便於判斷結果，作者改用了以下的滴定方法：

1. 抗原的稀釋

(1) 取平底康氏抗原稀釋管(55×15 毫米) 12 個，分列二排，按表 1 於第一排管中各加抗原 1 毫升，並於第二排依次加鹽水 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 及 1.5 毫升。

(2) 將第二排之鹽水管分別注於第一排之抗原管中，並反覆迅速傾注 10 次，最後仍集中於第一排之各管中，分別以包錫紙之軟木塞塞緊，靜置 30 分鐘，使抗原乳液成熟。

表 1 抗原的稀釋

稀 釋 次 序	一	二	三	四	五	六
抗 原 (毫升)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
鹽 水 (毫升)	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
抗原與鹽水的比例	1:1.0	1:1.1	1:1.2	1:1.3	1:1.4	1:1.5

2. 滴定操作步驟

(1) 取康氏試管 54 個於試管架上分成三排 18 列，每三列(9 個管)為一組。如表 2 所示：於第一組的第一列各加 1:1.0 的稀釋抗原 0.05 毫升，第二列加 0.025 毫升，第三列加 0.0125 毫升；如法於第二組中加 1:1.1 抗原；第三組加 1:1.2 抗原；至第六組加 1:1.5 抗原。

(2) 然後於第一排之各管，加入已滅活的強陽性梅毒血清 0.15 毫升；第二排各管加正常人(陰性)血清各 0.15 毫升；第三排加鹽水 0.15 毫升。

(3) 迅速振盪 3 分鐘(每分鐘約 280 次)，置 37℃ 水浴箱中 10 分鐘後取出，於每組之第一列各管加入鹽水 1 毫升；第二，三列各管加鹽水 0.5 毫升。搖勻後觀察結果，將陽性、陰性血清與抗原的反應情形，抗原在鹽水中的溶化情形分別記錄如表 2。

表2 抗原的滴定及結果的紀錄

試劑	組別 稀釋比例及加入量			一			二			三			四			五			六		
	1:1.0			1:1.1			1:1.2			1:1.3			1:1.4			1:1.5			1:1.5		
	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125
陽性血清 (每管0.15毫升)	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	3+	3+	4+			
正常血清 (每管0.15毫升)	±	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鹽水 (每管0.15毫升)	不溶化	不溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化

3. 滴度的判定

如上表所列, 1:1.2 的抗原稀釋液与陽性梅毒血清呈强陽性反应, 与正常(陰性)血清無沉澱出現, 而鹽水管亦完全清澈的溶化無沉澱顆粒, 則可確定該抗原的滴度為 1:1.2, 与標準抗原对照的結果若相符合則可应用。如前所述, 此种滴定方法不僅手續較為簡單, 而且在各組互相对比之下, 能以正確的判定抗原的鹽水溶化性与結合力。如果有足够的材料, 用各种反应强度的梅毒血清配合於各組滴定, 對於抗原的評價, 則更精確。如無强陽性的梅毒血清或血清量不足, 亦可用中等陽性的血清或混合的陽性血清, 此对結果的判定亦無何影响。

(三) 抗原滴定的一例

这种滴定方法, 幾年來已作為我們滴定抗原的常例試驗, 亦常有其他單位委託測定者。一年以前徐州某化驗室曾送檢一份抗原, 滴定的結果如表 3。

表3 抗原滴定之一例

試劑	組別 稀釋比例及加入量			一			二			三			四			五			六		
	1:1.0			1:1.1			1:1.2			1:1.3			1:1.4			1:1.5			1:1.5		
	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125	0.05	0.025	0.0125
陽性血清* (每管0.15毫升)	3+	3+	3+	2+	2+	3+	2+	2+	2+	±	+	+	-	±	±	-	-	-			
正常血清 (每管0.15毫升)	2+	2+	2+	2+	2+	2+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鹽水 (每管0.15毫升)	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化	溶化

* 該陽性梅毒血清本為“4+”之强陽性者。

从以上的实例看出, 該抗原的鹽水溶化單位与結合力單位表現得極不一致, 也就

是在被確定的抗原溶化性滴度中，其結合力（敏感性与特異性）已完全無有，像這種的抗原絕對不能使用於實驗。追查其原因是在製備過程中由於該批抗原的結合能力太低，而在其中多加一些膽脂素，以增進抗原的敏感性，結果因過多的膽脂素使得抗原的溶化單位增高，對於敏感性的提高則一無改善。從以上的例子中還可以看出該抗原與陽性血清結合時的陽性強度也是遠遠不夠的，這更說明了這主要是抗原本身的抗原性不足的問題。抗原性低的抗原，敏感性必然是不夠的，如果把膽脂素強加於其中，祇有造成這種不良的後果。康氏抗原中加膽脂素，固然可以增高抗原的敏感性，但膽脂素不可能使抗原性提高，而且它的含量必須有一定的比例，故加入量要極其準確。

一個好的抗原，其鹽水溶化性与結合力的滴度泰半是一致的，比較滿意者滴度在1:1.1—1:1.4範圍內。若抗原稀釋為1:1.2時結合能力最強，溶化性最好，無論正常血清或鹽水管中均無沉澱顆粒出現，這樣的抗原縱使稀釋度在1:1.3, 1:1.4時其結合能力仍然是很好，反應仍然會極強的。假如抗原在1:1.2時結合能力最強，而在1:1.3時則反應極弱，這樣僅相差0.1毫升的鹽水稀釋液中，就有如此巨大的反應強度驟減的情況，也是必須注意的，這種情況同樣意味着該抗原的抗原性是有問題的。事實上抗原的敏感性應隨着稀釋度的增高而漸次下降，不應該驟然下降。

（四） 抗原的保存

抗原應貯存於乾燥的磨口褐色玻璃瓶中，避免用橡皮塞或軟木塞，如用軟木塞則應包以錫紙。經滴定後的抗原，貼好註明製造日期及滴定日期和滴度的瓶標，保存於比較穩定的室溫中，如存放於22°C 孵箱中則更好。室溫的變遷，特別是寒冷對抗原會有很大的影響的，溫度過低可使膽脂素析出，應加溫使膽脂素的結晶溶化後才可使用。但必須指出，時常有結晶出現，時常加溫溶化的抗原，至終會有大量的膽脂素結晶過剩不能溶解，同時也可由於時常加溫使得抗原變質而失去效能。此外，吸抗原的吸管應當乾燥（經乾烤過的）。每經一定時期後應再滴定，觀察抗原性有否改變。

總結及討論

（1）康氏沉澱試驗乃最廣泛應用作為梅毒血清學診斷法之一，但康氏抗原的供應尚未完全統一，許多地區的化驗室自行製造，因而成品大有懸殊，常常造成試驗結果上的分歧。除了希望將來能統一供應外，特將數年來淺陋的製造經驗提出，以期能得到先進工作者的批評和指正，而有助於技術和理論的提高。

（2）康氏抗原質量的好壞，決定於牛心粉的質量，從實踐中觀察到牛心肌乾燥越

慢, 抗原的性質越易改變。數年前我們一般都經電扇吹 3—4 天後方才磨粉, 多半抗原滴度过高 (1:1.7—1:1.9), 結合力也差。經縮短牛心粉製造時間, 爭取在 24 小時內製出後, 得到大大的改善, 五年來經二十餘批的大量製造均獲良果。無論牛心肌脫水時間過長或無論牛心粉保存過久, 都會引起抗原性的改變。

(3) 抗原滴度的確定, 也是一個極其重要的環節, 一般均採取抗原沉澱溶化性單位的確定及結合力測定等兩種方法, 並有忽視結合力的測定者 (一般檢查法中均比較詳細的提及溶化性單位滴定法), 使工作者對於滴度的確定感覺困難。作者改用了綜合滴定法, 同時把反應強度、敏感性、溶化性等互相比較, 能以精確地得到結論。此種滴定法應用於實際工作上, 將更有助於對抗原性質的識別。

(4) 本文並舉例說明抗原滴定的結果判斷問題, 說明了好的抗原的溶化性與結合力 (敏感性及特異性) 恒相一致, 但並非所有的抗原的兩者滴度均相一致, 故單注重溶化性的滴定是無法解決主要的問題的。抗原性差, 結合力低的抗原乃牛心粉本質的問題, 多加胆脂素不能改善其敏感度。抗原的敏感性隨稀釋度的增高而漸次下降, 不應有驟然減弱的現象。此外, 本文並提出抗原的保存方法和應注意點。

本文承于復新教授、荊永謨主任的指正, 特此致謝。

參 考 文 獻

- [1] 謝少文、周輯五: 林氏細菌學檢查法。1951。
- [2] 于復新: 實驗診斷學。1953。
- [3] Овчинников, Н. М. Серологические исследования при сифилисе и гонорее. 1953.
- [4] 顧德鴻: 實用臨床血清學檢查法。1953。
- [5] Kahn, R. L. Serum diagnosis of syphilis by precipitation. 1925.