

流行性乙型腦炎补体結合試驗与 血球凝集抑制試驗的比較*

I. 豚鼠免疫血清的結果

吳安然

(中国协和医学院細菌免疫学系)

目前國內进行的腦炎补体結合試驗时,大部采用 Casals^[1]氏法所制备的抗原,根据國內的报导^[2-4],此种抗原是有一定的特异性,但敏感性是不够高的。按上述兩文献中以累积和法統計患者發病各期,所取血清陽性率出現数字看来,仍不能达到早期診斷的要求。以1950年的結果为例,在發病后2周內出現的陽性率为12.8%,1951年較高为40.4%。同时补体結合抗体在患者血中出現的时期,早晚并不一致,早者發病后4日即可在血內察見补体結合抗体,而迟者可延至發病5周后始有陽性反应^[2]。因之采用他种診斷方法来代替或輔助此方法,实屬必要。

Sabin 氏^[5]对几种嗜神經病毒,包括流行性乙型腦炎病毒,聖路易型腦炎病毒,西尼罗河腦炎病毒,苏联春夏型腦炎病毒,馬腦脊髓炎病毒和脊髓前灰白質炎病毒血凝素的性質,以及如何除去血清中非特异性抑制物作了研究。Casals 氏用醋酐乙醚浸漬法,由感染乳鼠腦制备了数种嗜神經病毒的血凝抗原。朱氏^[6]在流行性乙型腦炎病毒方面重复并証实了 Casals 氏^[1]的試驗。在以后的报告中^[7]除对影响血球凝集試驗的某些因素作了进一步的探討外,并对血球凝集抑制試驗作为流行性乙型腦炎血清診斷法的可能性作了推論。基于此种可能性的存在及补体結合試驗敏感性不够高的缺点,以及血球凝集抑制試驗操作較为簡單的优点,我們企圖能达到以血球凝集抑制試驗代替补体結合試驗作为診斷流行性乙型腦炎的方法,至少亦可作为輔助診斷的参考。鑒于临床标本較少,尤其是双份血清获得困难,是以首先采用豚鼠免疫血清,进行上述兩种試驗的比較。

* 1956年6月14日收到。

材料和方法

(一) 补体結合試驗:应用 Casals 氏^[9]的小量法,总量为 0.6 毫升,抗原采用改良之醋酮乙醚浸漬法制备^[9]。

(二) 血球凝集抑制試驗

1. 抗原:按 Casals 氏^[9]方法以鼠龄为 2—5 日的乳鼠,經由顱腔感染中山株流乙腦炎病毒(浓度为 10^{-1} , 剂量为 0.02 毫升),于濒死前放出心血,取鼠腦,置低温冰箱 (-25°C — -30°C) 保存。冰冻鼠腦經醋酮及乙醚处理后,將腦組織进行真空干燥,于干燥組織中,加入适量生理鹽水(1 克鼠腦加 2 毫升生理鹽水)。置 $4-8^{\circ}\text{C}$ 冰箱內振荡 20—24 小时,經每分鐘 10000 轉的速度离心沉淀 1 小时,取留上清,置 4°C 保存备用。

2. 血球:使用萊克亨鷄血球,收集在 Alsever 氏溶液內(葡萄糖 2.05 克,枸橼酸鈉 0.8 克,氯化鈉 0.42 克,双蒸水 100 毫升,以上藥品混合后加热溶化,過濾后分裝小瓶,以 8 磅/20 分鐘消毒灭菌,存 4°C 备用)。使用前將鷄血球以生理鹽水洗滌 3 次,最后一次应以每分鐘 2000 轉的速度,离心沉淀 5 分鐘,弃去上清,吸取沉淀的血球配成 0.25% 的悬液,存 4°C 备用。經洗滌而未稀釋之血球可在 4°C 保存 1 周,已稀釋之血球限于当天使用。

3. 稀釋液:0.01M 磷酸緩冲鹽水, pH 6.4—6.6。

4. 免疫血清中非特异性抑制物的处理:將血清稀釋成 1:2 或 1:4,經 56°C 、20 分鐘灭活后,取 0.2 毫升或 0.4 毫升已稀釋之血清,加 3 毫升醋酮,搖动后置室温片刻,进行低速离心沉淀。以后弃去上層醋酮,置真空抽气机中除去残余之醋酮,于干燥之沉淀中加入生理鹽水 1 毫升,使成 1:10 稀釋之血清。有些标本之沉淀物未能全部溶解。血清处理,一般在試驗之前一日进行,也有个别情况在配成 1:10 血清后存放于 4°C , 10 日后才进行試驗的。

5. 方法:于試驗之当日先滴定抗原效价,于等待血凝試驗結果出現的同时,进行血清的稀釋,使每管中含有 0.25 毫升不同稀釋度的血清(1:10—1:640 或 1:40—1:5120),以后于每管中加入 0.25 毫升的抗原(内含 4 个單位的抗原)振荡之。于 20 分鐘后加入 0.25% 鷄血球悬液 0.5 毫升(与滴定血凝抗原时所用之鷄血球悬液同),振荡后置室温 ($26-29^{\circ}\text{C}$) 中,于 2 小时后观察并记录結果。每次試驗包括下列对照管:血清对照管,血球对照管,血凝素單位对照管(即指在作血凝抑制試驗的同时,將已稀釋每 0.25 毫升含有 4 單位的抗原再作一次滴定)。

(三) 免疫血清的制备:按 Ильенко 氏^[10]法用豚鼠制备,其方法如下:

	病毒濃度	劑量
第 1 針	10^{-2}	2 毫升
第 2 針	10^{-2}	4 毫升
第 3 針	10^{-1}	2 毫升
第 4—7 針	10^{-1}	4 毫升

抗原均經腹腔注入，每針之間隔為 7 天。免疫用之病毒懸液，于每次免疫前制成，以每分鐘 2000 的速度沉淀 10 分鐘后，再將其上清，以每分鐘 10000 轉的速度沉淀 1 小時，上清即可用于免疫豚鼠之用。本試驗共採用豚鼠 25 只，于免疫前先由心臟取血作為對照，以后每 1 豚鼠在第 1 針免疫后 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 18 及 22 周各由心臟取血一次，以無菌手續分出血清，保存于低溫冰箱（ -25°C — -30°C ），集中檢查。

結果和討論

开始时，總計免疫了豚鼠 25 只，在整个實驗过程中，每只豚鼠應取血 13 次。由于取血的次數較多，尤其是前兩個月，在 8 周的時間內共由心臟取血 9 次，因之在實驗过程中有部份豚鼠死亡，未能在所有的豚鼠中均取得全部的血清。这样取得 13 份血清的豚鼠有 8 只，取得 12 份，11 份，和 9 份血清的豚鼠各 2 只，由 3 只豚鼠取得 10 份血清。由其他 7 只豚鼠所取得的血清均少于 9 份。

在實驗中，採用了能取得 9 份血清以上的各支豚鼠的血清進行了比較。但在能取得 9 份血清的兩只豚鼠中，有 1 只（14 号）由于第 1 次補體結合試驗的結果，抗補體的血清較多，且血清量又少無法重復，故未將結果列入，是以本實驗的材料只包括 16 只豚鼠的 189 份血清結果。

免疫血清取得后，存放在低溫冰箱，待將血清集齊后，集中進行試驗。每一豚鼠的各份血清均在同一次試驗中進行，这样所得的結果應比較有規律。現將 189 份血清的補體結合試驗與血球凝集抑制試驗的結果的平均滴度以曲綫表示之（圖 1）。

由圖 1 可察見補體結合試驗的滴度，在第 1 針免疫后第 4 周達最高峰（次高峰在第 7 周）。而血球凝集抑制試驗的最高滴度，在第 1 針免疫后第 6 周出現（次高峰在第 4 周）。說明此兩種血清反應在最高峰的表現上有些參差不齊，但由整個的趨勢看來，此兩種反應的出現，上升與下降的情況大致符合。血球凝集抑制試驗抗体似出現較早，且與補體結合抗体一樣，能維持較長的時間。

在第 1 針免疫后 1 周，所取得的血清其補體結合試驗的結果均為陰性。同樣血清的血球凝集抑制試驗的滴度，却有 7 份血清其滴度有增高（5 份血清的滴度無改變，4

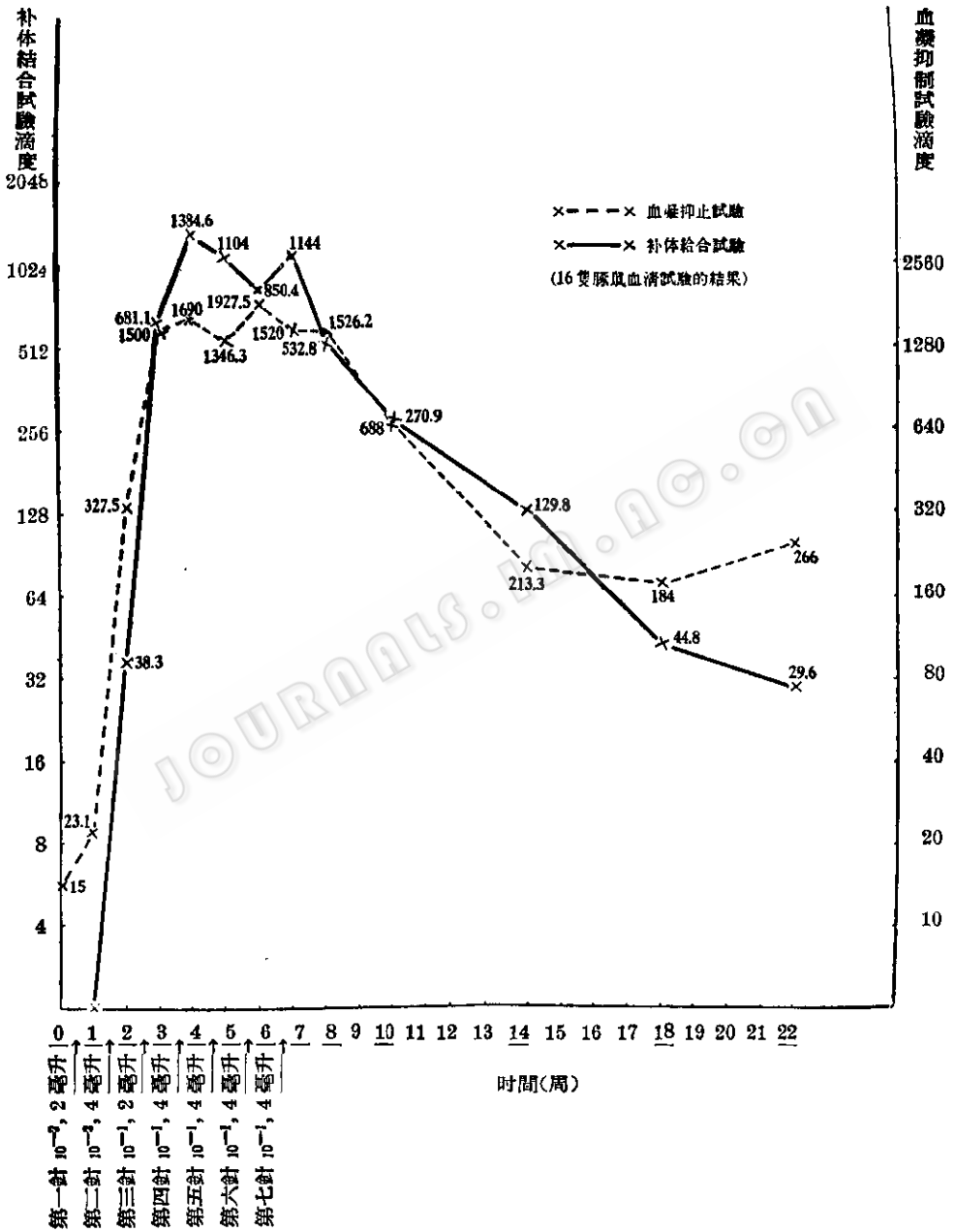


圖 1

說明：1. 時間下有橫綫者，表示于該周进行采血，当日分出血清冰冻保存。
2. 箭头指明免疫次数及免疫時間以及免疫剂量，均由腹腔注入。

份血清的滴度反較低), 其中有 1 份血清的滴度較免疫前升高 8 倍(10 号豚鼠)。如以血球凝集抑制滴度的絕對數字來作比較, 在免疫前所取得的各份血清中, 最高的非特异性抑制滴度為 1:40, 而免疫後已有兩只豚鼠(10 号和 20 号)血清的血球凝集抑制滴度達 1:80。血清中仍有非特异性抑制物的存在, 可能係由於採取了較少量的醋酮, 未能將全部的非特异性抑制物除去。按 Casals 氏的方法^[6] 係先將 0.1 毫升的血清稀釋成 1:10, 以 12 倍量醋酮處理 1 次後, 再以同量醋酮重複處理 1 次。朱氏^[7] 的報告中醋酮的用量已減半, 此次試驗中, 更減少了醋酮的用量, 僅及 Casals 氏用量的 $\frac{1}{8}$ 。由整個試驗結果看來, 此少量非特异性抑制物的存在, 對本試驗的結果並無影響。應該指出, 如以單份血清的結果作為臨床診斷的參考時, 此種處理血清的方法是令人不滿意的。

表 1 中比較了血球凝集抑制試驗與補體結合試驗抗體滴度的相互關係, 一般的趨勢是補體結合滴度高的血球凝集抑制滴度也高, 但也有例外情況存在, 如補體結合試驗為陰性的兩份血清中, 血球凝集抑制滴度竟高達 1:640 或以上。也有 1 份血清血球凝集抑制滴度為 1:40, 而補體結合試驗的滴度却高達 1:512。

表 1 補體結合試驗與血球凝集抑制試驗抗體滴度的相互關係

		血 球 凝 集 抑 制 試 驗 滴 度											總 計
		-	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	
補 體 結 合 試 驗 滴 度	-	8*	9	9	6	5	2		2				41
	1/4					1	1	1	1				4
	1/8				1		2	1					4
	1/16				2	1	2	1		1			7
	1/32					1	2	1					4
	1/64					2	4	4	2	1			13
	1/128					4	5	3	3	1	1		17
	1/256						3	4	7	3	3	3	23
	1/512				1		1	2	11	6	9	1	31
	1/1024								2	3	13	6	26
	1/2048									2	3	3	9
	1/4096										2	2	6
總 計	8	9	9	10	14	22	19	33	30	24	7	185	

* 血清份數

注: 其中有 4 份血清因抗補體或結果不規則未列入

根據表 1 中的數字, 如以 1:80 作為血球凝集抑制試驗陽性與陰性的人為分界線(因在免疫前所取各份血清中, 僅有兩份血清其非特异性抑制滴度達 1:40, 所以假定以 1:80 作為陽性滴度是合適的), 則 185 份血清中兩種反應均為陰性的有 32 份, 均為陽性

的有 140 份, 即有 92.97% 的血清其結果, 两种反应是一致的。两种反应不相符合者占 7.03%。亦可說明此两种反应基本上还是一致的。

本实验结束后, 进行总结时, 看到波多野基一氏^[11]的报告, 他比較了 107 份腦炎患者和 153 份免疫豚鼠的血清, 認為血球凝集抑制試驗和补体結合試驗的結果是一致的, 但認為血球凝集抑制試驗不若补体結合試驗敏感, 此点与我們的試驗結果稍有出入, 此种差別可能由于我們采用了多次免疫的方法所致, 或由于使用了不同的方法处理血清中的非特异性抑制物。波多野基一氏認為血球凝集抑制試驗只能作为輔助診斷的方法。但北岡正見氏等^[12]比較了 75 份人血清 (37 份流乙患者的血清, 28 份正常人血清, 10 份脊髓前灰白質炎患者血清) 的結果, 認為血球凝集抑制試驗較补体結合試驗敏感。說明各家对此点看法尚未一致, 拟在下一篇报导中再作进一步的討論。

結 論

应用补体結合試驗与血球凝集抑制試驗, 比較流乙免疫豚鼠血清反应的結果, 显示出此二反应的出現, 上升与下降的情况大致符合 (可能血球凝集抑制試驗还稍敏感一些, 此点与波多野基一氏的結果稍有出入)。此两种反应的抗体在所观察的 22 周内仍就存在, 至于能繼續保持多久, 未作深入的研究。根据血球凝集抑制試驗操作比較簡單的优点, 希望能以此方法作为临床診斷根据之一, 因之現正采用人血清进行同样的比較, 結果將于后文中报导。

本試驗由技術員刘鳳亭及馬連提協助, 特此志謝。

参 考 文 献

- [1] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70: 339-341, 1949.
- [2] 宋干等: 中华医学杂志, 37: 287-295, 1951.
- [3] 宋干等: 中华医学杂志, 38: 1033, 1952.
- [4] Sabin, A. B.: *Fed. Proc.* 10: 573, 1950.
- [5] Casals, J. and Brown, L. V.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 170-173, 1953.
- [6] 朱錫华: 中华医学杂志, 6: 444-445, 1954.
- [7] 朱錫华: 微生物学报, 3 (1): 64-75, 1955.
- [8] Horsefall, F. L.: *Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections* Columbia Uni. Press. New York 1949, 57-82.
- [9] 吳安然等: 微生物学报, 1 (2): 196, 1953.
- [10] Ильенко, В. И.: *Новости Медицины* 38: 56-63, 1953.
- [11] 波多野基一: *Virus* 2 (3): 194-202, 1952.
- [12] 北岡正見, 工藤佑三: *Virus* 2 (3): 183-186, 1952.

A COMPARATIVE STUDY OF ENCEPHALITIS COMPLEMENT-FIXATION AND HEMAGGLUTINATION- INHIBITION TESTS. I. GUINEA PIG IMMUNE SERA

WU AN-JAN

Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

At present, the currently employed complement fixation test with the acetone-ether antigen in the diagnosis of epidemic encephalitis has been found to be lacking in sensitivity although it shows a high degree of specificity. Its positive rate among clinically diagnosed cases was usually not so high, and it frequently first becomes positive only several weeks after the onset of the disease. As previous works from this laboratory have shown that the hemagglutination-inhibition test possesses possibility as a diagnostic tool, a comparative study has been undertaken with the complement fixation test with sera from guinea pigs before and at various intervals after artificial immunization. It was found that as a rule, both tests became positive at about the same time and ran a parallel course thereafter, although the hemagglutination-inhibition test usually showed a higher titre. As the latter also is a much simpler test, the practicability of its clinical application is now being explored and the results will be dealt with in a subsequent report.