

用于诊断流行性乙型脑炎几种补体 结合试验抗原的比较*

吴 安 然

(中国协和医学院细菌免疫学系)

以补体结合试验诊断神经系统病毒疾病所用的抗原其制备方法很多,在国内用于诊断流行性乙型脑炎大都采用 Casals 氏^[1]的醋酐乙醚法制备之。汪氏等^[2]鉴于国内一般化验室缺乏高速沉淀器的设备,将其中高速沉淀的步骤改用每分钟 3000 转的普通沉淀速度代替,所制备的抗原敏感性很高。本化验室亦曾重复了同样的试验得到相同的結果。此外为了提高抗原的敏感性,我們^[3]曾將 Casals 氏的方法加以改进制出效价較高的抗原,但用于诊断脑炎的阳性率仍是很低。Espana 氏^[4]报告苯浸抗原有較高之敏感性和特异性。張氏等^[5]在比較苯浸抗原与醋酐乙醚抗原用于诊断流行性乙型脑炎时,发现苯浸抗原比較敏感。所检查的 288 例中,与苯浸抗原呈阳性反应的有 124 例 (43.05%),而与醋酐乙醚抗原呈阳性反应的只有 55 例 (19.1%)。自本室真空干燥设备添置后即着手制备苯浸抗原,企图与改进之醋酐乙醚抗原作一比較,但鉴于苯浸抗原須經較長時間的(6—8 小时)真空干燥后始能用苯浸漬,是以先用醋酐或乙醚將組織中水份除去后再干燥較為节省時間。因之同时也制备了一些先用醋酐或乙醚处理后再用苯浸漬的抗原。此外 Ильенко 氏^[6]报导了一种簡單的制备抗原方法 (1954 年天壇生物制品研究所發出的流乙腦炎诊断抗原,即按此法制备的)。因此就将上述 4 种方法制备的抗原作了系統的比較**。

材料及方法

(一) 病毒: 流乙腦炎病毒 (京衛研 1 株) 系 1953 年由中央衛生研究院撥来为制备补体結合抗原用者,在本科通过小白鼠腦內傳代保存。本实验所用系第 55—59 代病毒。

* 1956 年 6 月 14 日收到。

** 按 Ильенко 氏法制备的抗原,系由天壇生物制品研究所贈与的,特此致謝。

(二) 小白鼠：系由本院动物室在有防蚊設備的条件下喂養者。

(三) 醋酮、乙醚和苯均为北京新华化学试剂研究所出品，但本实验所用之醋酮及乙醚，系于53年制备腦炎补体結合抗原后再度由本科工作人員蒸餾回收者。

(四) 抗原制备：

1. 醋酮乙醚抗原：方法与我們前所介紹者同^[3]。

2. 苯浸抗原：基本上与 Espana 和 Hammon 二氏所报告者同^[4]。于5克感染之鼠腦組織中加入25毫升無菌蒸餾水，攪拌后制成20%悬液，傾于250毫升沉淀瓶內，置5°C，8—4小时后于低温酒精中（-30°C）迅速旋轉冰冻3分鐘，悬液即可沿管壁冻结，取出后进行真空干燥。如当时不能进行干燥可置于-25°C低温冰箱中保存。干燥过程需时4—6小时。于干燥之腦組織中加入苯50毫升，浸漬1小时，在浸漬过程中应不断振蕩之。1小时后用玻璃濾器將苯濾去，于浸漬过之腦組織中再以50毫升苯浸漬半小时，以同法除去苯后，再以苯同样处理一次。最后將腦組織經漏斗傾入沉淀瓶內（在接种罩內进行），使組織中剩余的苯在真空中使之揮發除去（抗原可在此状态下保存）。于干燥的腦組織中我們加入25毫升0.004M 枸橼酸鹼性磷酸鈉緩冲液 pH 7.2 代替生理鹽水，置5°C过夜后我們以每分鐘10000轉的离心速度沉淀1小时代替15分鐘，取出上清加入硫抑汞（最后濃度为1:10000）即可使用。按原著者此抗原于5°C至少可保存6月抗原性不变，剛制就的抗原仍有感染力，于5°C保存2—3周后感染力消失。如此制就之抗原最好先用紫外綫灭活之^[5]。

3. 乙醚抗原^[6]：于感染鼠腦組織中加入2%正常豚鼠灭活血清鹽水，攪拌后使成10%悬液，置4°C 18—24小时后取出以每分鐘2000轉的速度离心沉淀10分鐘，吸取上層清液加入等量之化学純乙醚，振蕩后置4°C 1½—2小时后再以每分鐘2000轉的速度沉淀10分鐘此时分为3層：上層为乙醚，中層为膠狀物，下層为抗原。用吸管小心吸取下層抗原，置瓶中真空抽气15—30分鐘除去其中乙醚，存放于4°C备用，可保存4—6月，用前無須滴定也不稀釋。無感染性抗原的制备系于10%病毒悬液中加入福尔馬林(0.2%)^[6]。經接种小白鼠証明無感染性后再加乙醚按同法处理之。按原著者以乙醚抗原作补体結合試驗时，系采用不同單位的补体用量(1.2, 1.5, 1.7, 2.0, 和 2.5 單位5种)而將病人血清濃度固定。本实验仍按一般方法操作之。

4. 醋酮苯浸抗原或乙醚苯浸抗原：制法基本上与苯浸抗原同，因鑒于用蒸餾水作成20%悬液后，除去其中水份頗为費时，所以就按照 Casals 氏的方法，先用20倍量的醋酮(或乙醚)作成悬液后立即以每分鐘2000轉的速度离心沉淀5分鐘后，傾去上層醋酮(或乙醚)，再在真空干燥器中將腦組織抽干(約須30分鐘)。所获得的干燥腦組織即按

苯浸抗原制备法用苯浸 3 次后作成抗原备用。

上述抗原制就后均保存于 4°C 冰箱中。

(五) 免疫血清: 本實驗室以前采用 Hammon 氏^[3] 方法用豚鼠制备高价免疫血清, 后因此法易于造成动物死亡, 因而改用腹腔免疫 3 次后 (第 1 針 10^{-2} , 2 毫升, 第 2 第 3 針, 均为 10^{-1} , 2 毫升) 再由顱腔免疫 1 針剂量为 10^{-1} , 0.15 毫升, 間隔均为 1 周。于最后 1 次免疫后兩周取血。为减少因腹腔免疫而造成血清中非特异性反应的出現, 將免疫用之病毒悬液以每分鐘 10000 轉之速度离心沉淀 30 分鐘。

(六) 补体結合試驗: 应用 Casals 氏^[3] 的小量法, 唯所用羊血球悬液的濃度为 1.25%。

結 果

(一) 乙醚苯浸抗原与醋酮苯浸抗原的选择: 先制备少量的苯浸抗原, 乙醚苯浸抗原和醋酮苯浸抗原比較其效价, 結果列于表 1,

表 1 三种不同方法制备之苯浸抗原效价的比較

抗 原 种 类	苯 浸 抗 原				醋 酮 苯 浸 抗 原				乙 醚 苯 浸 抗 原				血 清 对 照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:4	1:8	1:16	1:32	1:4	1:8	1:16	1:32	
免 疫 血 清													
1:4	4	4	4	0	4	4	4	0	4	4	±	0	0
1:8	4	4	4	1	4	4	4	0	4	4	1	0	0
1:16	4	4	4	±	4	4	4	0	4	4	±	0	0
1:32	4	4	4	±	4	4	4	0	4	4	±	0	0
1:64	4	4	4	±	4	4	4	0	4	4	0	0	0
1:128	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
抗 原 对 照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

結果之解釋: 完全溶血……………0;

不完全溶血……………按程度分为 3, 2, 1, ±, 四等;

完全不溶血……………4。

由表 1 的結果看出苯浸抗原与醋酮苯浸抗原效价相似, 而乙醚苯浸抗原效价稍低, 因之在以后的試驗中, 未再采用乙醚苯浸抗原。

(二) 三种抗原滴度的确定: 为了提高抗原的效价, 曾將菌种連續通过小白鼠后, 再感染小白鼠一批制备了 3 种抗原, 滴定結果列于表 2。

按表 2 滴定的結果, 將抗原滴度作如下的确定, 醋酮乙醚抗原和醋酮苯浸抗原于試驗时均采用 4 个單位 (免疫血清以 1:64 为标准) 即按 1:8 稀釋, 而苯浸抗原应按 1:16

稀釋使用(4个單位)而我們实际使用的稀釋度为 1:12 (約为 6个單位)。

表2 三种抗原滴度之确定

抗原种类 稀釋度 免疫血清	苯 浸 抗 原							醋 酐 苯 浸 抗 原							醋 酐 乙 醚 抗 原							血清对照
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
1:4	4	4	4	4	4	4	±	4	4	4	4	4	±	0	4	4	4	4	4	3	0	0
1:8	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	0	0	4	4	4	4	4	2	0	0
1:16	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	±	0	4	4	4	4	4	2	0	0
1:32	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	0	0	4	4	4	4	4	2	0	0
1:64	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	0	0	4	4	4	4	4	2	0	0
1:128	4	4	4	4	4	4	0	0	2	4	4	4	0	0	4	4	4	0	0	1	0	0
1:256	4	4	4	4	4	0	0	±	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
1:512	4	4	4	4	4	±	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0	0	0
1:1024	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0	0	0
抗原对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
滴 度	1:12							1:8							1:8							

(三) 特异性与敏感性試驗：將上述 3 种抗原与天壇生物制品研究所贈与的乙醚抗原作了下述的比較。

1. 30 份陽性血清用 4 种不同抗原檢查結果的比較(表 3)，該批血清系本市傳染病院 1953 年腦炎患者之陽性血清，冰冻保存于普通冰箱之冰匣內(約 -10℃ 左右)直至 1954 年 8 月撥給本室*。該批血清原来之陽性滴度系傳染病院化驗室用本科所發出之醋酐乙醚抗原檢查的結果。此次檢查时血清从 1:4 开始稀釋，陽性結果讀至++作为終点。

表3 四种不同抗原檢查 30 份陽性血清結果的比較

血 清 編 号	原 来 滴 度*	乙 醚 抗 原 (未稀釋)	苯 浸 抗 原 (1:12)	醋 酐 乙 醚 抗 原 (1:8)	醋 酐 苯 浸 抗 原 (1:8)
1	1:8	1:64	1:64	1:16	—
2	1:8	1:16	1:8	—	—
3	1:16	1:16	1:8	—	—
4	1:16	1:8	1:8	—	—
5	1:16	1:32	1:32	1:4	—
6	1:16	1:64+	1:64+	1:16	1:16
7	1:16	1:64+	1:64+	1:16	1:4
8	1:8	1:64	1:32	1:8	1:8
9	1:8	1:8	1:8	—	—
10	1:8	—	—	—	—

* 对于傳染病院給予的帮助表示謝意。

11	1:16	1:32	1:16	—	—
12	1:16	1:32	1:8	1:4	—
13	1:16	1:4	—	—	—
14	1:4	—	—	—	—
15	1:64	1:64+	1:32	1:4	—
16	1:16	1:16	1:4	—	—
17	1:16	1:8	1:4	—	—
18	1:8	1:64	1:16	1:4	1:4
19	1:8	1:32	1:16	1:4	?
20	1:8	1:64+	1:32	1:4	—
21	1:16	1:4	1:4	—	—
22	1:8	1:64+	1:64+	1:32	1:32
23	1:16	1:64	1:16	1:8	1:8
24	1:16	1:64+	1:32	1:32	1:16
25	1:8	1:8	1:4	—	—
26	1:8	—	—	—	—
27	1:16	1:64+	1:32	—	—
28	1:16	1:64+	1:32	1:8	1:4
29	1:8	1:16	1:8	—	—
30	1:8	1:64+	1:32	1:16	1:8
陽 性 總 數	30份	27份	26份	15份	9份
陽 性 百 分 數	100%	90%	86.6%	50%	30%

附注: * 此滴度为 1953 年傳染病院用本室所制备之醋酐乙醚抗原檢查的結果;

—代表滴度低于 1:4 或为陰性結果;

? 其中 1:4 血清的試管破碎無法讀出結果, 較高之稀釋度均为陰性, 在計算陽性总数时算作陰性。

由表 3 的結果看出 30 份陽性血清用乙醚抗原檢查有 27 份 (90%) 血清的滴度高于 1:4 而且其中有 19 份血清的滴度較原来陽性滴度高 (其他 8 份血清, 4 份相等, 4 份較低), 用苯浸抗原檢查有 26 份 (86.6%) 血清呈陽性反应, 其中也有一半的血清 (13 份) 較原滴度为高。但用醋酐乙醚抗原檢查只有 50% 的血清出現陽性。醋酐苯浸抗原的陽性率更低只有 30%。所以乙醚抗原和苯浸抗原是比較敏感的, 其中尤以乙醚抗原更为敏感。在 27 份陽性血清中, 只有 8 份血清用兩种抗原檢查所得的結果滴度相同外, 其他 19 份血清, 用乙醚抗原檢查的結果滴度較用苯浸抗原高。

2. 为了进一步檢查乙醚抗原与苯浸抗原的特异性, 我們將上述几种抗原以及用醋酐乙醚法制备的聖路易腦炎病毒, 西方馬腦脊髓炎病毒和鼠腦脊髓炎病毒 (FA 株) 的抗原与各型免疫血清, 进行了交互补体結合試驗。結果列于表 4。

其中用乙醚法和苯浸法制备的正常鼠腦組織抗原都和聖路易型免疫血清和 FA 株免疫血清有一定程度的非特异性反应。醋酐乙醚抗原和醋酐苯浸抗原虽与同型的血清滴度較低, 但与其他免疫血清無交叉現象, 特异性比較高。

表4 与各型免疫血清的交互补体結合試驗

免 疫 原	乙醚抗原		苯浸抗原		醋酮乙醚抗 原		醋酮苯浸 抗原		西方 抗原	聖路易 抗 原	FA 抗原	鹽水
	流乙 (濃)	正常 鼠腦 (濃)	流乙 1:12	正常 鼠腦 1:12	流乙 1:8	正常 鼠腦 1:8	流乙 1:8	正常 鼠腦 1:8	1:8	1:2	1:8	
流乙腦炎病毒	1:64	—	1:64	1:4	1:8	—	1:8	—	—	1:8	—	—
馬腦脊髓炎病毒 (西方)	—	—	—	—	—	—	—	—	1:8	—	—	—
聖路易型 腦炎病毒	1:4	1:4	1:4	1:4	—	—	—	—	—	1:16	—	—
鼠腦脊髓炎病毒 (FA株)	1:8	1:4	1:16	1:16	—	—	—	—	—	—	1:64	—

3. 75 份瓦氏反应陰性血清的檢查;用乙醚抗原有 29 份血清 (38.8%), 苯浸抗原有 17 份血清 (22.7%), 醋酮乙醚抗原有 2 份血清 (2.67%) 的結果在 1:4 以上。用醋酮苯浸抗原檢查的結果均为陰性,說明乙醚抗原和苯浸抗原是比較敏感的,同时用此兩種方法制备的正常鼠腦抗原与所檢查的 75 份血清未出現非特异性反应。茲將 3 种 抗 原 檢 查 的陽性結果分析于表 5:

表 5

血 清 滴 度	乙 醚 抗 原 (濃)	苯 浸 抗 原 (1:12)	醋 酮 乙 醚 抗 原 (1:8)
1:4	12份	9 份	2 份
1:8	7 份	6 份	0
1:8以上	10份	2 份	0
总 計	29份	17份	2 份
陽 性 百 分 率	38.3%	22.7%	2.67%

用乙醚抗原測定的陽性率高达 38.8%,而且滴度亦較苯浸抗原所測者為高,在同為陽性的 17 份血清中有 12 份血清的滴度較苯浸抗原高(另 5 份滴度相等)。且有 2 份血清的滴度高达 1:32。其所以有如此高之滴度及陽性率,應考慮到此 75 份血清是在 9 月份取得的。

4. 乙醚抗原經滴定后使用与其他抗原之比較;有鑒于乙醚抗原之高度敏感性,为了节省抗原計是否也可經滴定后稀釋使用,于是又进行了进一步的比較。因前所制备之抗原已用尽,于是又重新制备了 3 种抗原(此次未制备醋酮苯浸抗原),經滴定后檢查另外 96 份瓦氏反应陰性血清結果的陽性百分率为乙醚抗原 20%, 苯浸抗原 16.8%, 醋酮乙醚抗原 2.1%。

其中有 2 份血清經乙醚抗原測出为陰性者,而用苯浸抗原測定的結果为 1:4。但总

的說來乙醚抗原經稀釋后使用其敏感性仍較苯浸抗原為高。

討 論

用于診斷腦炎的補體結合試驗，由于患者血清中抗體出現較晚，因之對於臨床診斷幫助不大，同時根據近年來各地的報告說明即使是已經確診為腦炎患者的血清，其補體結合試驗的陽性率亦不高。為了提高補體結合試驗的敏感性，可由兩方面着手改進；一方面可將補體結合試驗方法的本身加以改進，使之更敏感一些，另一方面可找出一個敏感性較高的抗原，也就是本實驗所探求的。由檢查 30 份陽性血清的結果中，很明顯地看出醋酮乙醚抗原的敏感性遠不如乙醚抗原和苯浸抗原。用此兩種抗原檢查出來的滴度較之 1953 年用醋酮乙醚抗原所得的滴度還要高。更說明了此兩種抗原的敏感性。但此次用醋酮乙醚抗原檢查同樣的血清陽性率僅及 1953 年的一半，當然血清在保存過程中滴度會有一定的降低，但我們同時也考慮到此次用于製備抗原之醋酮和乙醚系用過后，再度由本科工作人員蒸餾回收者，不若新購者純，對結果也有一定的影響。因在 1955 年又用原裝之醋酮乙醚製備的流乙腦炎抗原檢查了 8 月份及 10 月份所收集的瓦氏反應陰性血清各 100 份，腦炎補體結合試驗的陽性率 8 月份為 23%，10 月份為 14%，較 54 年 9 月份用蒸餾過之醋酮乙醚製備的抗原，所檢查 75 份血清的陽性率高出甚多。

與各型免疫血清作交互補體結合試驗的結果說明醋酮乙醚抗原的特異性較高，而用乙醚法或苯浸法製備的正常鼠腦抗原與聖路易和 FA 免疫血清出現非特異性反應，可能是由於免疫血清系採用腹腔免疫法製備所產生的結果，因用上述兩種抗原在檢查 75 份瓦氏反應陰性血清的試驗中，正常鼠腦組織抗原與血清並未出現非特異性反應。相反的乙醚抗原和苯浸抗原所測出的陽性率竟高達 38.8% 和 22.6%。是否系非特異性反應的表現呢！我們應該考慮到這 75 份血清是在 9 月份取得的，恰值腦炎流行的末期，在一般人群中是有相當大的隱性感染率，所以這樣結果的出現也可說明此兩種抗原是高度敏感的。用敏感性較高的抗原來作單份血清的檢查，確定診斷是比較困難的。因為陽性的出現不能說明當時患者所感染的就是腦炎，可能系因發燒或其他原因而引起之回憶反應的表現。但如用于雙份血清的檢查是比較適宜的，尤其是在以往所用抗原敏感性不夠高的情況下，採用敏感性較高的抗原如乙醚抗原是值得嘗試的。如為節省計也可將乙醚抗原滴定後使用之。（乙醚抗原，按原著者介紹，可保存 4—6 月，我們初步的經驗覺得不能保存如此之久，但無系統資料加以証實。）醋酮乙醚抗原因其特異性較高，敏感性較差於菌種之鑑定上仍有價值。

結 論

(一) 本實驗系統地比較了4種抗原的敏感性和特异性, 其中乙醚抗原和苯浸抗原的敏感性較高, 醋酮乙醚和醋酮苯浸抗原特异性較高。

(二) 由于乙醚抗原制法簡單, 敏感性較高, 且亦能稀釋后使用, 同时其非特异性反应只有在使用免疫血清的情況下表現得比較明显, 因此認為此抗原适用于双份血清的檢查, 比較抗体滴度有無增高, 采用敏感的抗原是合适的。

(三) 苯浸抗原也相当敏感, 只是在特异性方面不若原著者所介紹的那樣好。

(四) 醋酮乙醚抗原特异性較高, 适用于病毒之鑒定。

本實驗由技術員劉鳳亭同志協助, 特此致謝。

参 考 文 献

- [1] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 70: 339-341, 1949.
- [2] 汪美先等: 微生物学报, 1 (2): 191-195, 1953.
- [3] 吳安然等: 微生物学报, 1 (2): 196-201, 1953.
- [4] Espana, C. and Hammon, W. McD.: *J. Immunol.* 59: 31-44, 1948.
- [5] 張乃初等: 微生物学报, 2 (1): 49-54, 1954.
- [6] Ильенко, В. И.: *Новости медицины* 38: 56-63, 1953. 譯文刊于 微生物学譯报, 2 (3): 188, 1955.
- [7] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 501-504, 1942.
- [8] Hammon, W. McD. and Espana, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66: 113-115, 1947.
- [9] Horsfall, F. L.: *Diagnosis of viral and Rickettsial Infections*. Columbia University Press, New York, 1949, 57-82.

COMPARATIVE STUDY OF COMPLEMENT-FIXATION ANTIGENS PREPARED BY VARIOUS METHODS

WU AN-JAN

Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

For the preparation of the antigen employed in the complement fixation tests in the diagnosis of epidemic encephalitis, several methods are now available, including some modifications recently published in Soviet Russia and in this country. The present report deals with a comparison of their sensitivity and specificity by testing on known positive sera and on sera sent for routine serological diagnosis for syphilis. It was found that while the acetone-ether method of preparation, hitherto most commonly employed in this country, was the most specific, it suffered from a lack of sufficient sensitivity as compare to all other antigens tested. On the other hand, the ether extraction method advocated by Iliencko and the benzene extraction method were equally sensitive in giving the largest number of positive reactions, but the latter was a little less specific than the former. In view of the simplicity in preparation, especially in view of its greater sensitivity and sufficient specificity, it was concluded that ether-extracted antigen is most suitable for the routine diagnosis of epidemic encephalitis, while the acetone-ether extraction is suitable for preparing antigens in the identification of the virus.