

流行性乙型腦炎補體結合試驗方法的改進

周明先 汪 瑾 黃禎祥

(中國醫學科學院病毒學系)

補體結合反應在實驗病毒學中,尤其在嗜神經性病毒方面,由於抗原的製備有了初步的改善,已經成爲一個重要的實用工具。在流行性乙型腦炎方面,補體結合實驗診斷的可靠性一般認爲具有一定的價值^[1-4]。

然而在一般嗜神經病毒的補體結合試驗中,還存在着敏感性不夠高的現象。有些病例在臨床診斷爲流行性乙型腦炎而補體結合試驗則未能予以證實。黃禎祥氏^[5]曾報告:1952 年在全國範圍內進行的流行性乙型腦炎補體結合試驗結果,其陽性率普遍不高。這一方面可能是工作人員技術掌握不夠精熟,另一方面可能是由於現用的補體結合試驗的方法不夠完善,因而敏感性不夠高。因此有必要提高流行性乙型腦炎補體結合試驗的敏感性,從而增加陽性率。某些學者^[6-8]曾對抗原抗體和補體在 5°C 下不同結合時間(1、2、3、7 和 20 小時)對補體結合反應的影響,比較和研究,結果發現其效價與結合時間有一定的關係:採用較長的結合時間可以得到較高的效價。因此一般補體結合試驗中所採用結合的時間爲 16—18 小時(置 4—8°C 冰箱內)。我們考慮到在保持補體效能不降低的情況下,如果將結合時間再予以延長,可能進一步提高反應的效價,增加敏感性;因而作了一系列的研究,並且應用改進了的方法來檢查疑似流行性乙型腦炎患者血清。現將實驗結果報告如下。

材 料 與 方 法

1. 抗原:按 Casals 氏^[9]醋酐乙醚浸漬法製出,毒種爲流行性乙型腦炎病毒京衛研株^[10]。
2. 補體:正常雄性豚鼠血清,保存於 -30°C 低溫冰箱中備用,使用時間不超過一個月。
3. 溶血素:按 Darter 氏^[11]方法製出,效價 1:16,000—1:20,000。
4. 免疫血清:根據 Hammon 氏^[12]法製出,免疫毒種爲京衛研株病毒。爲了得到一些低效價的免疫血清,先用普通生理鹽水稀釋小量病毒(10^{-3} 與 10^{-5}),然後用這些病毒對部分豚鼠進行免疫。
5. 稀釋液:用以稀釋抗原、補體、血清和綿羊血球等的稀釋液全部採用 0.85% 氯化鈉溶液,將這種溶液用 15 磅高壓蒸氣滅菌後備用。
6. 疑似流行性乙型腦炎患者血清:由北京市傳染病醫院、北京市兒童醫院、北京市同仁醫院、北京醫院、中央直屬第一醫院、廣東華南醫學院等處供給。血清分出後置 -30°C 冰箱內保存備用。全部血清包括初診患者及部分患者僅有早期一份血清。
7. 流行性乙型腦炎補體結合試驗方法:參見文獻^[13]。

1957 年 2 月 25 日收到。

8. 改進法的操作：一般操作技術均與普通方法一樣，但全部操作過程均在冰浴中進行；抗原抗體與補體結合的時間及條件為 2—4°C 冰箱中放置 40—42 小時。

實 驗 結 果

(一) 延長結合時間對於補體的穩定性

為了延長補體結合反應的結合時間，增強補體的結合作用，必須首先了解在上述溫度條件下延長結合時間對補體穩定性的影響。

將補體一次稀釋，分成 5 組滴定補體效價。第一組立時測定，其餘 4 組分別在 18、42、66 及 90 小時測定。同時也以低價免疫血清做不同時間的補體結合試驗，經不同的放置時間後觀察抗原，抗體與補體結合反應。結果見表 1。

表 1 在 2—4°C 下補體結合時間對於補體的穩定性試驗

結合時間 (在 2—4°C)	抗 原	補 體 滴 定			抗原抗補體對照				補 體 結 合 試 驗						結 果
		(1:60 稀釋)			補 體 單 位				73 號豚鼠免疫血清						
		0.05	0.08	0.1	2	1.5	1	0.5	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
立 時	特異性抗原	3	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	1:8
	正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	2	—	—	—	—	—	
	生 理 鹽 水	4	±	—	—	—	—	4	2	—	—	—	—	—	
18 小 時	特異性抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	4	—	—	—	1:32
	正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	2	—	—	—	—	—	
	生 理 鹽 水	4	±	—	—	—	—	4	2	—	—	—	—	—	
42 小 時	特異性抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	2	—	1:64
	正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	—	—	—	—	—	
	生 理 鹽 水	4	2	—	—	—	—	4	3	—	—	—	—	—	
66 小 時	特異性抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	3	3	抗補體
	正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	3	—	—	—	
	生 理 鹽 水	4	2	—	—	—	—	4	4	2	—	—	—	—	
90 小 時	特異性抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	4	4	抗補體
	正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	4	4	
	生 理 鹽 水	4	4	—	—	—	—	4	4	4	4	—	—	—	

從表 1 可以看到，補體在加有抗原的條件下在 2—4°C 冰箱放置 90 小時以內，效價沒有下降的表現。在沒有抗原的幾組中，雖在 42 小時後有下降的趨勢，但並不顯著。各不同單位的補體也無下降的現象。在加有低價免疫血清的補體結合試驗中，隨着結合時間的延長，補體結合反應效價也隨之升高。結合 42 小時的效價比 18 小時增高 4 倍。在結合 66 至 90 小時的效價雖比 18 小時的效價增高 8 倍以上，可是抗補體現象也顯著增加。在這一試驗中補體置 2—4°C 冰箱中不超過 90 小時者未見效價降低現象。如果適當的延長補體結合反應的結合時間有可能增加補體結合反應的敏感度。重覆試驗的結果同樣說明補體在 90 小時內無明顯的損失。

(二) 不同結合的時間與補體結合效價的關係

為了進一步證實表 1 中延長結合時間能提高補體結合反應敏感度現象，本試驗中選

用了 3 份不同強度的豚鼠免疫血清作不同結合時間的比較試驗。

試驗結果說明，第 66、73 號兩份豚鼠血清用改進法(42 小時)的效價均比普通法(18 小時)的效價高 4 倍，第 3 號豚鼠血清 42 小時的效價則為 18 小時的 2 倍，而各種對照(包括抗原、血清、溶血系統等)均正常。爲了了解結合時間在 42 小時前後抗補體的情況，又作了 38、42、44、48 與 18 小時的比較試驗。

試驗結果指出，38、42、44 小時的效價無甚差異，可是在 48 小時的時候正常鼠腦抗原有抗補體現象發生。從這試驗上可以看出結合時間應在 38 小時到 44 小時之間，但不宜超過 44 小時。

(三)不同結合時間與抗原效價的關係

延長補體結合的時間能加強補體結合反應的效價，既已初步確定，那末延長結合時間是否也可以減少抗原的用量呢？本試驗中採用兩批抗原作了不同結合時間的原效價比較滴定，滴定結果如表 2 所示。

表 2 兩種不同時間(18, 42 小時)補體結合試驗抗原滴定之比較

抗 原 稀釋度	18 小 時										42 小 時									
	3 號豚鼠免疫血清稀釋度								正常血清 1:4	生理鹽水	3 號豚鼠免疫血清稀釋度								正常血清 1:4	生理鹽水
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256		
1:2	4	4	4	4	4	2	—	—	—	—	4	4	4	4	4	4	4	2	—	—
1:4	4	4	4	4	±	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	4	3	2	—	—
1:8	4	4	4	2	—	—	—	—	—	—	4	4	4	4	4	2	—	—	—	—
1:16	4	4	3	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	4	2	—	—	—	—	—
1:32	4	2	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	2	—	—	—	—	—	—
1:64	4	±	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	3	±	—	—	—	—	—	—
1:128	3	±	—	—	—	—	—	—	—	—	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—
正常鼠腦 抗原 1:4	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
生理鹽水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

結合 42 小時的抗原滴定中一般地都增加了補體結合反應的強度，還未看到抗原效價的最適反應峯的出現。這說明目前的抗原製備法還不够理想。

(四)補體結合試驗改進法與普通補體結合試驗在實際應用上的比較

根據上列實驗結果，將補體結合試驗的結合時間延長至 42 小時可以提高補體結合反應的敏感性，同時也不致受到抗補體現象的阻礙。

1955 年夏秋兩季，我們用結合 18 小時和結合 42 小時兩種方法檢驗了疑似流行性乙型腦炎患者的血清共 397 份。在這些血清中只有單份血清的有 142 人，具有雙份或 3 份血清的有 117 人(血清 225 份)。現將全部試驗結果列於表 3。

由表 3 中可以看出補體結合 42 小時的陽性率在各個不同患病時期中均顯著而普遍的提高了。此外值得注意的是有 2 例患病 0—4 天內的初期血清在 18 小時檢查爲陰性而 42 小時檢查爲陽性(一例是患病的第二日，另一例是患病第三日，兩例血清中和試驗均爲陽性結果，而且在恢復期血清的補體結合反應亦爲陽性，其效價增加 4 倍)，能於發病的第

表 3 疑似腦炎患者全部血清的補體結合試驗

(按患病日數及反應種類計算)

患病日期	血清總數	陽 性				陰 性				抗 補 體			
		18 小 時		42 小 時		18 小 時		42 小 時		18 小 時		42 小 時	
		例數	%	例數	%	例數	%	例數	%	例數	%	例數	%
0—4	118	0	0	2	1.7	112	94.9	110	93.2	4	3.4	6	5.1
5—7	83	5	6.0	8	9.6	75	90.4	72	86.8	2	2.4	3	3.6
8—14	70	13	18.6	25	35.7	55	78.6	43	61.4	2	2.9	2	2.9
15—21	38	10	26.3	18	47.4	24	63.2	16	42.1	3	7.9	4	10.5
22—28	24	14	58.3	15	62.5	12	41.7	9	37.5	0	0	0	0
29 及以上	64	33	51.6	44	68.8	30	46.9	17	26.6	3	47.0	3	4.7
總 數	397	75	18.9	112	28.2	308	77.1	267	67.2	14	3.5	18	4.5

二、這樣早期的血清中測出陽性結果，這可能與試驗本身敏感度的增高有一定的關係。

在全部 397 份試驗中補體結合 18 小時者有 14 份，得到抗補體結果，結合 42 小時者有 18 份得到抗補體結果。兩者差異的機率大於 0.05，無顯著意義。

在陽性例數中，兩種試驗方法血清的補體結合效價的比較如表 4 所示。

表 4 兩種不同補體結合時間的陽性結果之比較

	陽性血清總數	42 小時 (+)	18 小時 (+)	18 小時(-) 42 小時(+)	42 小時比 18 小時增高倍數					
					到 2 倍以上	到 4 倍以上	0	2	4	> 4
陽性例數	112	112	75	37	109	66	3	43	46	20
百 分 率		100	67	33	97.4	59	2.6	38.4	41.1	17.9

由表 4 中可以看出陽性血清總數為 112 例，42 小時的結合全部為陽性(100%)；結合 18 小時者，出現陽性血清的總數為 75 例，佔總數 67%；18 小時的結合為陰性而 42 小時的結合結果為陽性者 37 例，佔總數 33%。在陽性血清效價方面，42 小時的結合比 18 小時結果上升 2 倍以上者 109 例，佔陽性血清總數 97.4%；升高 4 倍以上者 66 例，佔陽性總數 59%，只有極少數血清(3 例)效價相同，佔 2.6%。

從改進法比普通法在補體結合效價升高的倍數與普通法原有效價的關係中可以看出全部陽性血清在 18 小時補體結合的抗體效價為 0—1:4 者，42 小時的結合升高 0—2 倍為 17 份，佔 25%；升高 4 倍以上者為 51 份，佔 75%，在 18 小時補體結合的抗體效價為 1:8 以上者，42 小時的結合升高 0—2 倍為 25 份，佔 61.4%；升高 4 倍以上者 17 份，佔 38.6%。由此可知在 18 小時補體結合試驗中，抗體滴度愈低則 42 小時抗體滴度增加的倍數愈高。

(五)關於補體結合試驗改進法中陽性反應的特異性問題

用補體結合試驗改進法，患者血清效價有普遍增高的現象，至於改進法中所有升高的陽性效價的特異性問題，可以從兩方面來觀察：

1. 從雙份或 3 份血清標本中效價升高的情形來觀察特異性 此次送驗的血清共 397

份,計有患者 259 人,有 117 人送有雙份或 3 份血清,其中經檢查為陽性病例者 68 人。僅將一部分早期血清為陰性或弱陽性而恢復期血清有顯著升高的病例 11 人,列於表 5 (限於篇幅未將全部列出)。

表 5 腦炎患者兩份以上血清的補體結合試驗(18 及 42 小時)的觀察

患 者 號	患病日期	補體結合試驗結果	
		18 小時	42 小時
415	4	—	—
	16	—	1:8
	30	1:8	1:16
447	3	—	1:4
	13	1:8	1:16
158	2	—	—
	14	—	1:8
	19	1:8	1:32
191	14	—	1:2
	24	1:4	1:8
54	4	—	—
	15	1:2	1:8
	17	1:4	1:16
105	3	—	—
	20	—	1:4
	39	—	1:8
196	5	—	—
	13	—	1:2
	32	1:4	1:16
134	4	—	—
	14	—	1:4
	30	1:2	1:16
99	10	—	—
	15	—	—
	37	1:4	1:16
418	4	—	—
	13	1:8	1:16
	28	1:16	1:32
50	6	—	—
	23	1:16	1:64
	26	1:32	>1:64

低弱陽性結果也是特異性的。

另外我們又採取有雙份或 3 份血清的病例 25 人共血清 55 份作中和試驗,觀察其抗

根據雙份血清的試驗結果可以看到,初期血清用普通法未能表現出陽性結果而在改進法的試驗中可以出現弱陽性或陽性結果了。而這些陽性效價的真實性在恢復期血清用兩種不同結合時間的試驗中,效價有規律的上升,這一事實上加以肯定。

2. 應用中和試驗檢查補體結合試驗改進法的特異性 一般認為檢查人羣中流行性乙型腦炎患者血清中和抗體是比較可靠的方法。我們隨意抽取 70 份血清(內有雙份或 3 份以上者)作中和試驗,結果見表 6。

表 6 疑似腦炎患者血清 42 小時補體結合試驗結果與中和試驗結果之比較

補體結合試驗結果		中和試驗結果		
		陰 性	可 疑	陽 性
陰 性	42 份	23	11	8
可 疑	3 份	0	2	1
陽 性	25 份	0	4	21

從表 6 中可以看出,改進法補體結合試驗與中和試驗結果基本上是一致的,至於有 8 例補體結合試驗為陰性而中和試驗為陽性,可能是由於曾感染過(包括隱性感) [14],也可能是還不如中和試驗的敏感。

爲了進一步證明補體結合試驗改進法的特異性,我們在全部血清中選出 13 份,在 18 小時補體結合試驗結果為陰性而 42 小時結果表現弱陽性或陽性而效價較低的血清,作了中和試驗,結果列於表 7。

由於表 7 中補體結合試驗改進法的結果與中和試驗結果的一致性,我們可以相信改進法中的

表 7 疑似腦炎患者血清補體結合試驗(18 小時爲陰性而 42 小時爲陽性)與中和試驗結果之比較

血清號	患病日數	補體結合試驗結果		中和試驗結果		血清號	患病日數	補體結合試驗結果		中和試驗結果	
		18小時(-) 42小時(+)	解釋	中和指數	解釋			18小時(-) 42小時(+)	解釋	中和指數	解釋
41	9	1:4	+	83.2	+	191	14	1:2	±	<45.7	±
100	9	1:4	+	235	+	233	14	1:8	+	2011	+
135	12	1:4	+	4220	+	242	14	1:8	+	1585	+
149	14	1:4	+	2334	+	276	3	1:4	+	19060	+
162	14	1:2	±	34.3	±	133	33	1:8	+	45.8	±
178	5	1:8	+	1514	+	329	35	1:8	+	4220	+
185	13	1:2	±	61	+						

體上升的一致性，爲篇幅所限僅列少數 12 例患者，結果見表 8。

表 8 疑似腦炎患者血清(有兩份以上的)補體結合試驗與中和試驗結果之比較

患者號	患病日數	補體結合試驗結果			中和試驗結果	
		18 小時	42 小時	解釋	中和指數	解釋
33	7	—	—	+	<45	+
	14	1:8	1:16		210	
	36	1:8	1:32		1514	
45	9	—	—	+	62.4	+
	14	—	—		101.2	
	43	1:4	1:16		422	
50	6	—	—	+	<1	+
	23	1:16	1:64		609	
	26	1:32	>1:64		2120	
54	5	—	—	+	609	+
	15	1:2	1:8		3160	
	17	1:4	1:8		3160	
41	9	—	1:4	+	83.2	+
	16	1:4	1:8		387	
158	2	—	—	+	<45	+
	14	—	1:8		1585	
	29	1:8	1:32		4060	
126	5	—	—	±	4.5	±
	14	—	1:2		34.3	
93	2	—	—	+	2.3	+
	31	1:4	1:8		51	
36	3	—	—	+	<40.9	+
	35	1:8	1:16		139	
46	4	—	—	+	29.5	+
	9	—	1:4		235	
97	12	—	—	+	35.5	+
	46	1:8	1:8		1000	
152	5	—	—	+	13.4	±
	66	1:16	1:64		42.2	

表 8 中的結果指出,絕大部分病例,補體結合試驗與中和試驗的抗體上升情況都是互相符合的,只有一例補體結合試驗結果為陽性而中和指數 42.2 為可疑。

根據上列補體結合試驗結果與中和試驗結果的一致性以及雙份血清中抗體上升的規律性,我們有理由相信 42 小時結合的補體結合反應的低度陽性效價是特異性的。

討 論 與 結 論

病毒學的補體結合試驗目前在抗原方面還未能達到理想,因此改進操作技術,提高反應的敏感度是重要的。我們將全部操作放在冰浴中進行,以保證補體及其他材料不致因操作過程在室溫中失去效能,同時也使實驗條件一致,不受季節的影響。另一改進是將結合時間在 2—4°C 冰箱條件下延長至 40—42 小時,以加強抗原抗體對補體的結合作用,因而提高了試驗的敏感性。

在普通法的補體結合抗體效價愈低時而改進法增加的倍數愈高,這一方面提示抗原與抗體結合在量上的規律問題也是有實際價值的。另一方面患者一般在早期抗體滴度是不高的,普通法不易測出,用改進法則能測出抗體,由此而知改進法可作早期輔助診斷。例如在我們實驗中有 2 例,一例是患病後第二日,一例在患病後第三日在改進法中出現了陽性結果,從它的恢復期血清抗體上升的規律及中和試驗的證明,均確為陽性病例,能在這樣早期測出陽性結果,似乎是與試驗本身敏感性的提高有一定的關係,根據 Sabin 氏^[16]的檢驗結果最早出現陽性反應是發病後第四日,宋幹等氏^[13]的檢驗最早陽性反應是發病後第五日。

關於補體結合試驗改進法中單獨出現的弱陽性的結果的特異性問題,可根據雙份以上血清的抗體上升的規律性和一致性以及中和試驗的對照都表現出來基本相符合,說明改進法的陽性的特異性是很高的。

本文初步試驗中補體結合時間延長至 48 小時以後抗補體現象也逐漸增加,在 397 份患者血清檢查中 42 小時與 18 小時的結合的抗補體結果比例是 18:14,有微顯增加現象。雖然這樣的差別在統計學上機率計算不表示顯著的差異,但是,如果將抗原的製備再加改進,或可能使抗補體現象降低。

至於是否可以應用同樣的原理,延長補體結合的時間,進一步加強某些其他病毒的補體結合反應的敏感性是值得今後探索的問題。

根據實驗結果的優越性在操作法上簡便、易行、經濟,我們認為可以推廣到實際調查研究及臨床診斷上應用。

參 考 文 獻

- [1] Casals, J. and Olitsky P. K.: *Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections*. p. 57, 1947.
- [2] Sabin, A. B.: *J. A. M. A.*, **133**: 281, 1947.
- [3] Sabin, A. B., Schlesinger, R. W., Ginder, D. R. and Matsumoto, M.: *Am. J. Hyg.*, **46**: 356, 1947.
- [4] 宋幹、周明先、蔣世雄、黃禎祥: *中華醫學雜誌*, **38**: 1033, 1952.
- [5] 黃禎祥: *流行性乙型腦炎防治資料摘要彙編*, 79—87, 1953.
- [6] Bedson, S. P. and Bland, J. O. W.: *Brit. Jour. Exper. Path.*, **10**: 393, 1929.
- [7] Parker, R. F. and Muckenfuss, R. S.: *J. Infect. Dis.*, **53**: 43, 1933.

- [8] Thomson, R. Hazen, E. L. and Buchbinder: *J. Immunol.*, **22**: 189, 1932.
- [9] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**: 339, 1949.
- [10] 黃禎祥、王逸民: 中華醫學雜誌, **37**: 280, 1951.
- [11] Darter, L. Amy: *J. Lab. and Clin. Med.*, **41**: 653, 1953.
- [12] Hawmon, W. M. and Espaua, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **66**: 113, 1947.
- [13] 宋幹、周明先、沈中: 中華醫學雜誌, **37**: 287, 1951.
- [14] 宋幹、林毓純、周明先、鄭雲凱: 中國醫學科學院, 科學論文摘要, 2期, 81頁, 1956.
- [15] 周明先、宋幹、林毓純: 中國醫學科學院, 科學論文摘要, 2期, 75頁, 1956.
- [16] Sabin, A. B., Schlesinger, R. W. and Ginder, D. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **65**: 183, 1947.

AN IMPROVED METHOD OF COMPLEMENT-FIXATION TEST FOR JAPANESE B ENCEPHALITIS

CHOW, M. S., WONG, C. and HUANG, C. H.

An improved method of complement-fixation test for Japanese B encephalitis is carried out as follows. In order to avoid inactivation of both complement and antigen due to change of temperature, the entire experiment is performed in an ice-tray at 2—4°C to obtain a constant temperature condition. Besides, the duration of fixation in the ice-box is prolonged from 18—20 to 40—42 hours.

The method mentioned above had been applied to study sera obtained from 397 patients suspected of Japanese B encephalitis in the summer and autumn of 1955. The result of each specimen was simultaneously compared with that of the original method. The results obtained indicate that the sensitivity of the improved method is obviously greater than that of the original method. By the improved method, 112 specimens gave positive results, while only 75 specimens were positive by the original method. This means an increase of positive result by 49.3%. It was further found that 97.4% of the positive sera show two-fold increase in titer and 59% of them show four-fold increase. Serum antibody titer of low levels (below 1:4) in the 18 hours-fixation test show greater increase in sensitivity in the 42 hours-fixation test. Moreover, patients gave positive reactions earlier in the course of disease by the improved method. The regular increase in titer between the two (or three) successive sera from one patient together with the agreement with the results obtained from neutralization test indicate that the results are specific. These facts point out that the improved method may be used as a laboratory method for earlier diagnosis of Japanese B encephalitis.

It should be pointed out that in our preliminary investigation, when the duration of fixation was prolonged to 48 hours, the anticomplementary phenomenon was also increased. Out of serum specimens from 397 patients suspected of Japanese B encephalitis, 14 sera were anticomplementary by the original method compared with 18 by the improved method. But this slight increase in anticomplementary titer is not significant as calculated by statistic method.