

病毒微量补体結合試驗方法的改进*

宋 干 任广宏 張永和 杜信令

(中国医学科学院病毒学系)

通常补体結合試驗多采用小量法^[1]在試管中进行,因需血清量較多,必須由靜脉取血才能进行試驗。因此,不仅不适于进行广泛的血清学調查,即在医院和門診所檢驗診斷中,由幼兒采取靜脉血檢查也有困难。近几年来,微量血清学試驗法的研究及应用,已为解决此种困难提供了可能条件。

自 Nartsisov 氏等^[2]建議采用塑料板进行血清学試驗后,許多学者利用塑料板进行补体結合及血凝抑制等試驗^[3-7],其中尤以 Takatsy 氏^[6]創用的螺旋圈-塑料板法比較滿意。1957年我們仿照 Takatsy 氏法制出了一批試驗器材,并根据其特点,設計和改进了微量补体結合試驗方法。現在这种方法已应用于不同病毒性疾病的血清学診斷、流行病学調查及實驗研究中。本文报告所建立的微量补体結合試驗方法及其改进后的試驗結果。

实验条件建立及方法的改进

(一) 器材

1. 螺旋圈 用500W电炉絲制成。先以鋼質金属棍制成螺旋圈的模子(图1b),将电炉絲捲曲于模子螺旋上制成螺旋圈,安装于鋁制的金属柄上。螺旋圈的吸液量为0.025毫升(用分析天平以蒸餾水校正)(图1a)。

2. 滴管头 用有机玻璃制成一个套管,使其一端能与普通的吸管相接。另一端插入16号針头,将針头斜面切断即成。每滴的液量应校正为0.025毫升。校正的方法是以小鋼錐改变針头的口径。滴大,减小外口径,滴小,则扩大其内口径。

3. 塑料板 用有机玻璃(聚甲基丙烯酸甲酯)制成。其大小为130×68×12(毫米)。板上鑲有柱状圓底凹孔72个(6×12)。每凹孔的直径为6毫米,深度9毫米(图1d)。

(二) 操作方法

1. 用滴管加試剂 用吸管吸入試剂,再套上滴管头,先驅尽管內的气泡,再将試剂滴入塑料板的凹孔內(图2)。

2. 螺旋圈取液 将螺旋圈放在酒精灯火焰上徐徐燒紅,以除去圈上附着的油脂及有机物等,俟其冷却后,放入装有試剂的試管內,使圈的側緣輕触液面,即可吸滿液体。随即輕輕取出,放于已滴加稀释剂的凹孔內进行稀释。

3. 稀释 稀释时,将一排吸滿試剂的螺旋圈插入第一列已滴加稀释剂的凹孔內(一次可同时进行6列稀释),捻轉螺旋圈(3—4轉即可),待混合均匀后取出,并移入第二列。

* 本文1962年1月11日收到。

3. 补体、溶血素及綿羊紅血球以及稀释剂等的准备 参考小量法^[1]。

(四) 試驗方法

1. 溶血素的滴定 塑料板 3 排, 每排 6 个凹孔, 于每个凹孔內各滴加稀释剂一滴。再取試管 3 支, 分別加入稀释剂 0.3、0.4、0.5 毫升及 1:100 的溶血素各 0.1 毫升, 此时各管溶血素的稀释度为 1:400, 1:500, 1:600。用 3 支螺旋圈将上述 3 个浓度的溶血素吸出, 在指定的凹孔內进行双倍稀释。然后于每个凹孔內加入稀释剂及补体(1:20)及 2% 的綿羊紅血球悬液各一滴。对照凹孔內加羊血球一滴和稀释剂三滴, 混合均匀, 放 37℃ 温箱內 30 分钟後观察結果。以能引起完全溶血的最高稀释度作为一个溶血单位。

2. 补体的滴定 先将 6 支試管排列于試管架上, 分別加入稀释剂 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 毫升再于其中各加 1:10 稀释的补体 0.1 毫升, 使其稀释度为 1:60、1:70、1:80、1:90、1:100、1:110、1:120、1:130。滴定时, 先于各凹孔內加稀释剂, 在第一列凹孔內加試驗抗原, 第二列凹孔內加对照抗原, 第三列加稀释剂各一滴。于三列凹孔內, 分別加入不同浓度的补体各一滴。放 37℃ 温箱內。于 15 分钟後加致敏羊血球(4 个单位的溶血素加等量 4% 的羊血球), 混合均匀, 放 37℃ 30 分钟後观察結果。以能引起完全溶血的补体最高稀释度作为一个确实单位。

3. 主体試驗

(1) 塑料板上先标明血清号碼, 并于每凹孔內加稀释剂一滴。

(2) 試驗血清先經 58℃ 灭活 25—30 分钟。每份血清以 3 个螺旋圈吸取, 于指定的凹孔內进行双倍稀释。

(3) 按上述稀释血清并分別加入試驗抗原、正常組織抗原及稀释剂各一滴。

(4) 于每个凹孔內加补体一滴(含 2 个单位)。

(5) 将上述試剂混合均匀放 4℃ 冰箱內 18—20 小时, 然后放 37℃ 温箱內 15 分钟, 加致敏羊血球, 混勻後再放 37℃ 30 分钟, 观察結果。

(6) 結果的判定与小量法相同, 以++++、+++、++、+、-表示結合程度, 取++为終点。

(五) 方法的改进

1. 改进微量补体結合試驗法与原設計方法試驗結果的比較 按上述方法进行微量补体結合試驗, 常出現抗补体反应。經我們研究改进后, 基本克服了这一缺点。改进法主要采取了以下措施: (1) 用 10—15% 鸡蛋清盐水作稀释剂; (2) 塑料板于使用前先放 4℃ 冰箱內冷却; (3) 冷結合过程中将塑料板放于密閉的铁盒內(內放浸透蒸餾水的棉球, 使其中維持較高的湿度); (4) 各个試剂混合后加强振蕩使其混勻。在用改进法及原法同时进行的 33 份血清的比較試驗中, 用改进法检查者有 10 份阳性, 21 份阴性, 2 份抗补体; 而用原法检查者有 1 份阳性, 11 份阴性, 其余 21 份均呈抗补体(表 1)。

2. 血球浓度 用 3% 和 4% 的血球悬液, 比較检查了 12 份血清, 結果有 10 份血清均呈現 1:4 以上的阳性反应。惟用 4% 血球悬液时, 有 2 份血清滴度較 3% 者高一个稀释度。另以 4% 和 5% 的血球悬液比較检查了 12 份血清, 結果亦有 10 份均呈現阳性反应。但采用 5% 血球悬液时, 有 1 份出現抗补体反应。

3. 溶血素浓度 用 2、3 及 4 个单位的溶血素比較检查了 14 份血清, 三者检查結果基本一致。惟用 3 个单位时, 其中有 8 份血清滴度較 2 或 4 个单位者低一个稀释度。用

表 1 微量补体結合試驗改进法与原法检查結果的比較

血 清	检查份数	原 法			改 进 法		
		> 1:4	阴 性	抗补体	> 1:4	阴 性	抗补体
人	23	0	11	12	4	19	0
猪	10	1	0	9	6	2	2
共 計	33	1	11	21	10	21	2

2 个单位时有 4 份血清呈現不同程度的抗补体反应, 而用 3 或 4 个单位时有 2 份血清均呈現抗补体反应。

表 2 采用不同單位溶血素檢查結果的比較

血 清 号	溶 血 素 单 位		
	2 个	3 个	4 个
1	1:2	1:2	1:4
2	1:16	1:8	1:8
3	1:8*	1:8	1:8
4	1:4*	1:2	1:4
5	1:4	1:2	1:2
6	1:64	1:32	1:64
7	1:8	1:4	1:4
8	1:64	1:32	1:64
9	1:16*	1:16*	1:16*
10	1:8*	1:16*	1:16*
11	1:4	1:4	1:4
12	1:4	—	—
13	1:32	1:8	1:16
14	1:16	1:16	1:16

* 除去抗补体反应后的滴度

4. 补体的浓度 用 2 和 1.5 个确实单位的补体比較检查了 18 份血清。用 2 个单位的补体检查时, 有 15 份血清呈現阳性反应, 2 份阴性, 1 份抗补体; 用 1.5 个单位时, 仅有 3 份呈現阳性反应, 2 份阴性, 其余 13 份均抗补体。

二、討論与結論

我們根据 Takatsy 氏創用的螺旋圈-塑料板法的原理, 設計了微量补体結合試驗方法。用此法試驗时, 由于塑料板凹孔較小、暴露面大、补体容易損失, 常因出現抗补体现象而影响試驗結果的分析。經进一步研究后, 采取了以 15% 鸡蛋清盐水作稀釋剂和冷結合过程中將塑料板放在有高湿度的密封鉄盒內等措施, 基本上消除了抗补体现象。

关于試驗中采用血球、溶血素及补体的浓度等, 比較試驗的初步結果表明: (1) 血球悬液以采用 4% 者結果較明确而易于观察; (2) 溶血素采用 4 个单位有助于减少抗补体反应; (3) 补体以 2 个确实单位为适宜。近年来我們接上述改进法检查血清, 所得到的結果与用小量法(試管法)检查者基本一致^[10]。

微量补体結合試驗法具有以下优点: (1) 節約試剂, 尤其是从末梢血管取血即可进行检查, 适于进行多抗原血清学检查及大量人羣血清学調查之用; (2) 操作簡便迅速, 以塑料板代替了試管及試管架, 以螺旋圈代替了吸管, 基本消除了洗刷試管、排列試管以及用吸管进行稀释等繁瑣工作, 不仅縮短了試驗操作过程, 也节省了人力; (3) 取液稀释比較准确, 用精密方法校正合格的螺旋圈、滴管头取液、稀释和滴加試剂比用普通吸管时所造成的誤差范围为小。由于具有以上各种优点, 此种血清学方法受到了实验工作者的广泛重視, 目前已在病毒性疾病血清学诊断及实验研究中逐渐推广应用^[10-13]。

微量法由于器材較精細, 所用的試剂量較少, 較易受到外界因素的影响, 故需有較稳定的条件和一定時間的技术訓練, 才能运用自如。

参 考 文 献

- [1] Casals, J., and Olitsky, P. K., *Diagnosis of viral and rickettsial infection*, N. Y. Columbia University Press, 1949, p. 57.
- [2] Nartsisov, N. V., *Am. Rev. Soviet. Med.*, 4: 405, 1947.
- [3] Salk, J. E., *Science*, 108: 1749, 1948.
- [4] Fulton, F. and Dumbell, K. R., *J. Gen. Microbiol.*, 3: 97, 1949.
- [5] Eckert, E. A. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 83: 113, 1953.
- [6] Takatsy, Gy., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, III (1—2): 191, 1955.
- [7] Okuno, T., et al., *Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 11: 259, 1958.
- [8] 任广宏等: 流行性乙型脑炎补体結合試驗方法的研究, 待发表。
- [9] 中国医学科学院病毒系脑炎組: 微量补体結合試驗操作方法, 載“病毒实验诊断手册”, 人民卫生出版社, 106 頁, 1960 年。
- [10] 任广宏等: 微量补体結合試驗在流行性乙型脑炎与脊髓灰白质炎诊断上的应用, 待发表。
- [11] 丘福康等: 流行性乙型脑炎鑑別诊断的研究, 待发表。
- [12] 任貴方等: 病毒性婴幼儿肺炎的研究, 待发表。
- [13] 宋干等: 北京市 1958—1959 年 流行性乙型脑炎不显性感染情况的血清学調查, 待发表。

AN IMPROVED MICRO-METHOD FOR VIRAL COMPLEMENT FIXATION TEST

SUNG KAN, JEN KWANG-HUNG, CHANG YUNG-HO, AND TU HSIN-LING

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

An improved micro-method for complement fixation test according to Takatsy's spiral loop technic is presented. The main points of improvement are: (1) Use 10—15% egg-white-saline solution as the diluent. (2) Keep the plastic plate cool in the refrigerator before use. (3) Put the plates in a tightly closed metal box with high humidity during overnight fixation. (4) Tap the plates well for assuring a through mixing after various components are added.

Basing on comparative studies, the quantities of the following components are considered to be suitable for practical use: sheep red blood cells, 4%; hemolysin, 4 units; complement, 2 exact units.

It is believed that this improved method may find a wide use in the diagnosis and serological survey in virus research.