

鏈球菌溶血素“O”(SLO)的稳定性及 血清类脂对抗 SLO 試驗的影响

舒 凌 陈維玲 李連臣

(卫生部生物制品研究所, 北京)

抗 SLO 試驗中,血清效价随结合时间延长时常上升的现象,是草间等^[1,2]提出的,他们认为 SLO 的抗体结合抗原的速度很不相同。即抗体有不同的亲和力。1961年 Gooder^[3]又提出蛋白分解酶说,认为 SLO 中有链球菌的这种代谢产物,本身就不稳定。血清效价不稳定能影响诊断指标,造成误诊,需要探求原因,寻找合理的检验方法与条件。但是我们作的試驗不能支持上述任何一种假说。得出的结果是血清类脂抑制 SLO 的作用,经过脱脂或控制结合时间与条件可以排除这种效价变动的现象,茲报告如下:

材料与 方法

(1) SLO 使用 Richard D 58 株 (Lancefield A 羣 3 型); Todd-Hewitt 二氏肉湯; 37°C 培育 12—16 小时。除菌后,加硫酸銨至 0.57 饱和和沉出 SLO, 冻干制成试剂。主要用 2 批; #62-1 与 62-2。在考查 SLO 本身的稳定性試驗中,还曾使用多批原液以及用地方菌株阜外医院株与友谊医院株制备 SLO 如后述。

(2) 抗血清 由临床得来的阳性血清,加 0.01% 硫柳汞防腐保存备用。

(3) 抗 SLO 試驗 SLO 中加 0.2M 硫乙醇酸钠液室温还原 15 分,稀释至每毫升两个结合力单位 (ASU) 测血清效价,或稀释至更高度测 50% 溶血剂量 (MHD₅₀)。SLO 与血清结合时间除特殊指明外均为 37°C, 水浴 15 分,然后加 5% 兔红血球, 37°C 放置 45 分 (在第 15 分时振荡均匀 1 次) 后读结果。

(4) 蛋白分解酶测定法 用 Elliott 氏^[4]牛乳凝固法; 检查酶原用 Elliott 氏^[5]胰酶转化法。蛋白定量用 Folin 氏酚试剂。

(5) 血清脱脂法 用 McFarlane 氏^[6]低温乙醚提取法。

試驗与 結果

一、SLO 的稳定性

Gooder 认为 SLO 中有一种蛋白分解酶,造成 SLO 的不稳定即部分破坏现象。根据 Elliott^[4], 此酶发挥作用的条件是还原状态,在有氧条件下失效。以下試驗均在还原后进行。

1. SLO 放置不同时间的效价

(1) SLO 还原后稀释并放置 15 分、30 分、45 分及 60 分,检查与不放置立即加血球

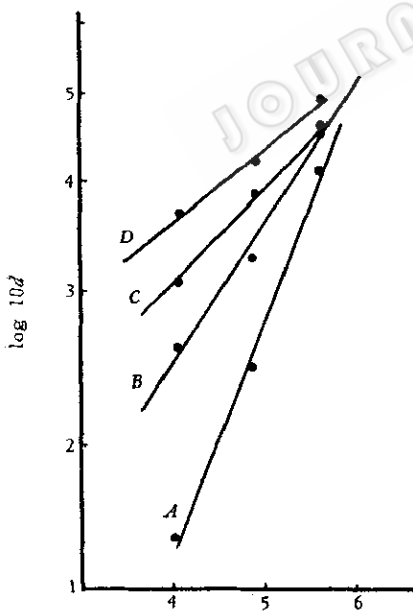
表 1 SLO 还原后稀释放置对 MHD₅₀ 的影响

放置时间 (分)	SLO	R-D 保 2 40×		R-D 猩 2 40×		阜 外 传 代 10×		阜 外 1 10×		友 谊 10×		
		MHD ₅₀	MHD ₅₀	%	MHD ₅₀	%	MHD ₅₀	%	MHD ₅₀	%	MHD ₅₀	%
0		<0.16 毫升	0.20	100	0.195	100	0.19	100	0.14	100		
10		0.16	0.222	111	0.238	122	0.24	126	0.175	125		
20		0.18	0.25	125	0.26	133	0.242	127	0.182	130		
30		0.20	0.265	133	0.27	138	0.255	134	0.21	150		
60		0.23	>0.28	>140	0.268	137	>0.30	>157	0.26	180		

表 2 在放置时间影响下溶血程度的减弱

稀 释 液 稀 释 度 × 剂 量	SLO	R-D 保 2	友 谊 3	友 谊 4	友 谊 2		阜 外 2	
		B	B	B	B	AB	B	AB
放置时间 (分)		40×0.2	10×0.14	10×0.14	20×0.16	20×0.16	10×0.09	10×0.09
0		50	50	50	55	40	52	48
10		10	30	35	0	0	20	15
20		0	20	20	0	0	0	0
30		0	15	13	0	0	0	0
60		0	0	10	0	0	0	0

注 B = 缓冲液 (pH6.5); AB = 0.1% 白蛋白缓冲液。



普 罗 比

图 1 放置时间对 MHD₅₀ 的影响

- A. 即刻 $d = 0.0191$ 毫升;
- B. 10分 $d = 0.0220$ 毫升;
- C. 20分 $d = 0.0245$ 毫升;
- D. 30分 $d = 0.0271$ 毫升。

者比较,随放置时间长, SLO 显著减弱,回归线坡度亦有改变(表 1, 图 1)。如从一个 MHD₅₀ 观查其影响,更为明显(表 2)。由表 2 还可看到,缓冲液中加 0.1% 白蛋白对稳定性并无影响。

(2) SLO 还原后不予稀释即放置,在做 MHD₅₀ 试验当时稀释,立即加红血球,结果效价虽有一些波动,但均在实验误差范围之内,而且没有下降趋势

表 3 SLO 还原后不稀释放置的 MHD₅₀

放置时间 (分)	SLO	R-D 保 2	R-D 猩 2	R-D-1	友 谊 3	R-D-7
0		0.00344	0.00500	0.0106	0.0115	0.00526
10		0.00369	0.00486	0.0115	0.0103	0.00526
20		0.00364	0.00500	0.0100	0.0119	0.00500
30		0.00351	0.00465	0.0100	0.0100	0.00512
60		0.00353	0.00520	0.0106	0.0100	0.00550

(表 3), 表明 SLO 在这种条件下是相当稳定的。

(3) 取 SLO 还原并放置 3 小时后,流水透析一夜,次晨又加还原剂,观查各步之 MHD₅₀(表 4)。由于第二次加还原剂时又加入 1/4 量的硫乙醇酸钠

液,故原液效价未见变化(98:74),而稀释者完全破坏,两者稳定性显然不同。

表4 透析对 SLO 原液与稀释液的影响

SLO	还原前	还原后	透 析	透 析 后	再 还 原
R-D-1	<10*	98	原 液	<10	74
R-D-1	<10	89	10×稀释液	<10	<10

* MHD₅₀/毫升。

2. 蛋白分解酶的检查

(1) 蛋白定量 Folin 氏酚试剂在还原状态下失效,故取样品还原并放置不同时间后,立即投入-10°C之冷乙醇槽中,停止酶的活动。加5倍量95%冷乙醇,沉出蛋白。溶于适量盐水中检查,结果见表5。

表5 SLO 还原后不同时间的蛋白定量

还原后(分)	R-D 62-1		R-D 62-2		R-D 63-14	R-D 63-23
	15	81*	77	80	72.5	94.3
30	82.5	79.5	81.5	76	95.5	95
60	84.1	81.2	82	74	92.5	91.1

* 透光度(58-I型光电比色计)。

在4批不稳定的SLO中,均未看到蛋白分解引起的量的差别。根据Elliott^[7]的报告,链球菌蛋白分解酶作用范围相当广泛,可以认为这4批中没有此酶的存在。

(2) 用Elliott^[4]检定蛋白分解酶的牛乳凝固法,取样品与牛乳先经还原,再等量混合,37°C放置18小时,结果3个菌株20批SLO中均未发现酶的作用——乳酪蛋白凝固现象。又按Elliott^[5]报告,用5%胰酶浸液处理样品再作同样检查,结果亦为阴性,即不存在能转化为此酶的前体——酶原。

(3) Elliott氏^[4]证明通过小鼠可使链球菌产生蛋白分解酶的能力减弱至消失。试验用前述3个菌株连续通过小鼠7代。由心血至肉汤,一夜培育后,不经培养基传代,即刻接种小鼠。结果传代后菌株产生的SLO,在稳定性方面并无明显改变,依然随时间减弱。同时,未看到蛋白分解酶减少或消失时应有的产毒提高现象(表6)。

表6 小鼠传代前后的 SLO

SLO 还原后放 置(分)	Richard D58		友 谊		阜 外	
	原 株	传7代	原 株	传7代	原 株	传7代
0	0.0095*	0.007	0.014	0.014	0.0195	0.0195
10	0.0097(15分)	0.008	0.017	0.016	0.024	0.023
20		0.008	0.019	0.018	0.025	0.025
30	0.011	0.0085	0.023	0.021	0.026	0.027
60	0.013	0.0082	0.025	0.026	0.033	0.027

* MHD₅₀; 空白为未检查。

根据上述,用一株国际常用菌株和两株地方菌株制备的多批 SLO 中,不能证明有蛋白分解酶。而且原液还原后也相当稳定,这些都与 Gooder 假说不符。

二、血清结合力(血清效价与结合时间)

1. 实际检验工作不用高稀释度的 MHD₅₀,使用低倍稀释的结合力单位,即在 1 个单位抗血清存在下尚能引起 50% 溶血的剂量 (ASC₅₀), 滴定病人血清的效价。抗血清与 SLO 结合条件通常皆为 37°C 15 分。试验把结合时间延长,则血清效价大多上升(表 7)。临床检验多数标本时,这种因素很可能影响诊断。表 7 的对照部分是不延长结合时间,仅将 SLO 低倍稀释至实用浓度(2 单位/毫升),单独放置,结果血清效价并无明显改变。即与前述 1(2) 项相同。故效价波动不能用 Gooder 的假说加以解释。

表 7 抗 SLO 试验中结合时间与效价

血清号 SLO 还原 后	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(1) 立即结合15分	225	233	694	752	235	70	439	645	137	89	650
(2) 立即结合45分	250	312	800	>1600	317	200	632	776	194	213	806
(2):(1)%	111	134	115	>212	134	285	144	120	141	283	124
(3) 放置30分后结合15分	220	281	662	786	253	70	461	574	127	190	662
(3):(1)%	98	120	95	104	107	100	105	89	93	112	102

2. 用 0.33, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 单位的 SLO 作同样试验,结果见表 8。用 0.33 个单位时,结合时间稍予延长,如 30 分,血清效价即显著改变,15 例中 5 例超过 125%, 3 例超过 150%, 等于在双倍稀释的临床检验法中效价提高 1 倍。而在用 4 单位时,血清效价相当稳定,即使结合 45 分亦无变化,仅在 60 分的 6 例中有 1 例改变。使用 0.5, 1.0 及 2.0 单位的结果在上述两者中间。表明血清结合力的不同与 SLO 的用量有关,在 37°C 结合条件下,用量愈大愈稳定。

表 8 抗原变量与抗 SLO 试验的稳定性

SLO 用量	4 单位		2 单位		1 单位		0.5 单位		0.33 单位	
	>125%	>150%	>125%	>150%	>125%	>150%	>125%	>150%	>125%	>150%
结合 30 分	0/6*	0/6	0/12	0/12	0/21	0/21	2/8	0/8	5/15	3/15
结合 45 分	0/6	0/6	1/12	1/12	7/21	6/21	3/8	1/8	11/15	4/15
结合 60 分	1/6	1/6	3/9	3/9	8/13	8/13	6/7	2/7	10/14	7/14

*超过例数/总检查例数。

3. 将结合温度改为 4°C, SLO 用量为 1 单位。结合时间与效价的关系是 2 小时以前结合不够完全,表现为血清效价低。2 小时以后,直到 24 小时, SLO 结合值 (ASC₅₀) 不变,即血清效价稳定。对照以 1 单位作 37°C 15 分结合,数据与 4°C 结合趋于完全者一致(图 2)。表 9 试验结果与此相同,4°C 结合 2½ 小时与 37°C 15 分的结合值一致,37°C 5 分结合不完全,37°C 结合时间过长则结合值增大即血清效价上升,这与 4°C 的充分结合值不同,显然不是抗体结合速度不同所致。

表 9 37°C 与 4°C 结合值的比较

SLO 1 单位	R-D-3-1	友谊 3	卓外传代
37°C 结合 5 分	89*	76	76
37°C 结合 15 分	100	100	100
37°C 结合 30 分	102	111	90
37°C 结合 60 分	190	163	162
4°C 结合 150 分	102	100	107

* 以 37°C 结合 15 分为 100 计算。

4. Ipsen^[8] 研究细菌性溶血素的动力学, 提出剂量与时间的关系公式: $k = \Delta \log HD_{50} / \Delta \log T$, 即 $k = SP(\log T \cdot \log D_{50}) / SS(\log T)^{11}$ 。草间氏^[2]认为这个公式也适用于抗 SLO 试验的抗体效价与结合时间的关系, 并给出在双对数表上呈直线关系的例图。试将上述用 0.33 单位 SLO 检验得出效价上升的血清作图 3, 可以看到不存在这种关系。统计也并不相关。应另有原因。

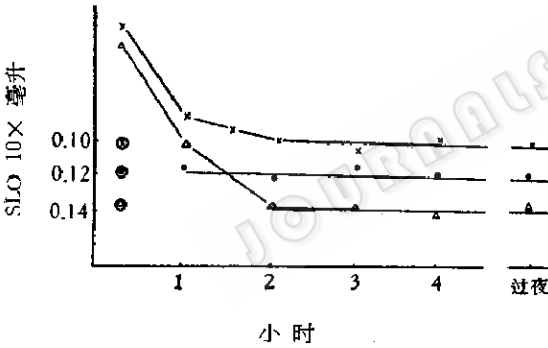


图 2 4°C 结合下时间与效价的关系
⊗ ⊙ ⊚ 分别代表 × ● △ 的 37°C 结合值

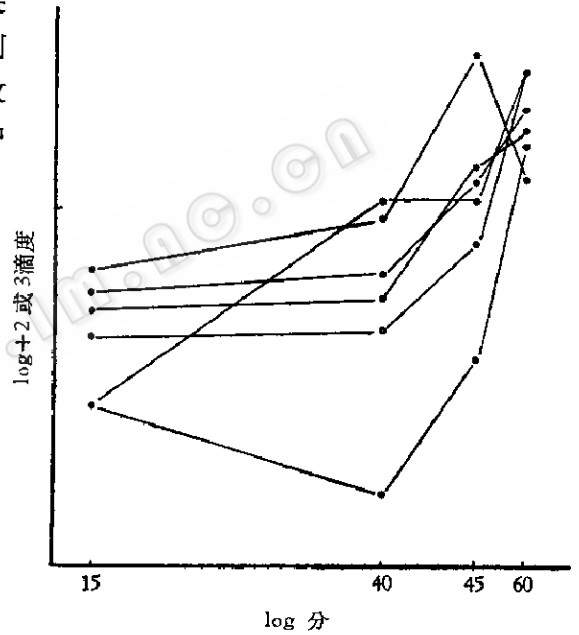


图 3 抗 SLO 试验中结合时间与滴度的关系 (SLO 0.33u. 滴度波动之 6 例)

三、血清类脂的影响

1. 血清脱脂的影响

Hewitt 与 Todd^[9] 报告胆固醇能抑制 SLO 的溶血作用。Packaléne^[10] 指出 SLO 结合并破坏血球表膜的亲类脂基团 (Sterolaffine), 能被血清类脂阻塞。试验选用 4 份血清, 按 McFarlane 氏法^[6], 加 1/2 量乙醚, 在 -30°C 以下震荡冻结, 融解后吸出血清, 减压挥发残余乙醚。检查其胆固醇含量和效价。胆固醇含量显著减低, 血清效价在脱脂前, 随结合时间延长而上升的现象显著, 脱脂后则稳定不动(表 10)。对照用 4 份肝炎血清, 已知因类脂影响具有假阳性, 脱脂后效价亦显著减低(表 11)。表明脱脂不但能除去抗 SLO 试验中之假阳性, 也能除去因延长结合时间而致的效价上升。

1) SP = 离均差和; SS = 方差和。

表 10 血清脱脂前后的效价与胆固醇含量

血清号	1		2		3		4	
	前	后	前	后	前	后	前	后
脱脂								
37°C 结合 15 分	171	150	300	280	150	160	200	185
37°C 结合 30 分	200	170	369	285	175	156	210	181
37°C 结合 45 分	200	170	585	290	226	151	242	176
37°C 结合 60 分	282	151	645	300	271	160	315	200
60 分/15 分 %	155	100	215	106	180	100	158	108
胆固醇含量毫克/100 毫升	220	<5	160	<5	200	20	200	<5

表 11 肝炎(假阳性)血清脱脂前后的抗 SLO 效价

血清号	1		2		3		4	
	前	后	前	后	前	后	前	后
脱脂								
效价	1200	176	300	171	394	95	800	91

2. 胆固醇对 SLO 的影响

正常血清胆固醇含量一般为 140—250 毫克/100 毫升, 均处于紧密或疏松的结合状态。在短暂的几十分钟结合时间内, 难于设想脂蛋白改变或破坏以致类脂明显解离。试验用含有微量游离胆固醇的缓冲液检查 SLO 效价, 表明仅有百万分之一毫克也能明显抑制溶血作用(表 12), 而这样微量的胆固醇解离则是可能在短暂时间内发生的。

表 12 游离胆固醇对 SLO 的抑制作用

胆固醇毫克/缓冲液毫升	0/1	1/10 万	1/50 万	1/1 百万
SLO 62-2 MHD ₈₀	0.00317 毫升	>0.01667	0.01207	0.0052

讨 论

关于抗 SLO 试验不稳定的原因, 文献中有两种解释: Gooder 认为 SLO 中存在着蛋白分解酶, 在还原状态下破坏一部分 SLO; 草间认为抗体结合速度不同, 以致结合时间延长血清效价上升。在我们的试验中, 这两种解释均未得到支持。

关于蛋白分解酶说, 由于: ①蛋白定量, 小鼠传代与牛乳凝固, 胰酶转化等试验皆不能证明这种酶的存在; ②酶不能只作用于稀释液, 而不作用于原液; ③如有此酶, 在培养中 SLO 应遭到破坏, 如产酶时 M—抗原不能出现^[4], 可以认为并不是抗 SLO 试验不稳定的原因。当然上述理由并不否定链球菌能产生此酶, 只是需要充分条件, 如有前体存在^[11], 培养时间较长^[5]等等。但这些条件在我们制备 SLO 时并不具备。

抗体结合速度不同说是以不同血清在延长结合时间后效价上升情况差别很大为依据提出的。由于增加 SLO 用量能使效价稳定(如前述)。草间建议将 SLO 用量由通用的 1 单位增大为 3.2 单位。并把结合时间改为 37°C 60 分。但是, 根据低温结合试验的结

果可以证明 37°C 结合 15 分是合理的, 60 分的高效价不是正确结果, 加大 SLO 用量能导致标准差增大, 敏感度降低。在我们看来, 影响效价的原因不是 SLO 本身, 常规使用的剂量 (1 个结合力单位) 与时间 (37°C 15 分) 没有改变的必要。

1939 年 Hewitt 与 Todd 发现胆醇能抑制 SLO, 1948 年 Packaléne 发现血清脱脂可以除去假阳性; 1958 年 Wahl 等^[12]发现脂蛋白能抑制 SLO。这些试验结果均暗示血清与 SLO 之间的关系较抗原抗体关系远为复杂。前述试验表明血清脱脂能除假阳性和因延长结合时间而致的效价上升现象。百万分之一毫克的胆醇在游离状态下对 SLO 有抑制作用, 能较充分的成立脂蛋白能离出胆醇, 影响 SLO, 造成效价上升, 这也是一种假阳性的看法。

至于稀释的 SLO 逐渐自然减弱的现象, 1941 年 Herbert^[13]曾提出蛋白表面变性的说法。我们试用每秒钟 2—3 次的震荡, 结果发现震荡 10 秒钟效价下降一半, 30 秒钟只剩 1/4, 影响显著。似乎支持这一看法, 但是由于试验少, 仍不能充分证明。

结 论

1. SLO 与血清的结合时间长短影响效价。其原因可能是血清中脂蛋白解离出微量类脂所致。SLO 中有蛋白分解酶与抗体结合速度不同的两种解释, 在我们的实验中没有得到支持。

2. 37°C 结合 15 分是合理的, 用 1 单位 SLO 结合 30 分不影响双倍稀释法的结果。如再延长效价则将有上升, 影响诊断。这种上升可用控制结合时间与低温结合方法避免。除假阳性的血清脱脂法也可以除去这种现象。

参 考 文 献

- [1] 草间秀夫, 大桥诚, 岛崎尚, 福见秀雄: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **11**:347, 1958.
- [2] 草间秀夫: 日本细菌学杂志, **15**:822, 1960.
- [3] Gooder, H.: *Bull. W. H. O.*, **25**:173, 1961.
- [4] Elliott, S. D.: *J. Exp. Med.*, **81**:573, 1945.
- [5] Elliott, S. D.: *Ibid.*, **85**:305, 1947.
- [6] Mcforláne, A. S.: *Nature*, **149**:439, 1942.
- [7] Elliott, S. D.: *Streptococcal Diseases Baltimore*, 1954.
- [8] Ipsen, J.: *Contribution to the Theory of Biological Standardization*, Copenhagen, Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, 1941.
- [9] Hewitt, L. F. and E. W. Todd.: *J. Path. and Bact.*, **49**:45, 1939.
- [10] Packaléne, T.: *J. Bact.*, **56**:143, 1948.
- [11] 草间秀夫: 日本细菌学杂志, **14**:574, 1959.
- [12] Herbert, D.: *Bioch. J.*, **35**:1124, 1941.
- [13] Wahl, R., Perez, J. and Cabau, N.: *Ann. Inst. Pasteur*, **95**:129, 1958.

THE STABILITY OF STREPTOLYSIN “O” (SLO) AND THE INFLUENCE OF SERUM-LIPID ON THE REACTION

SHU CHUN, CHEN WEI-LING AND LI LEAN-CHENG

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

In the anti SLO test the serum titer tends to be augmented on prolonged combination with the antigen SLO. Various explanations have been offered for this phenomenon by different authors. The results of our present experiment, however, indicated that the free lipid liberated from the serum lipoprotein most probably exerted a nonspecific inhibitory effect in the lytic activity of SLO resembling in false positive reaction.

It has been found that combination of antigen and antibody at 37°C for 15 minutes is suitable for the routine test. Prolongation of the incubation to 30 minutes did not affect the results of 1 SLO unit in tests with 2 fold dilutions. Further prolongation would render the test over-sensitive and unsuitable for diagnostic purpose. However, if the combination was carried out in the refrigerator, it might be prolonged to 2—24 hours without unduly alteration of the final titre. Removal of the lipids from the serum would also free such sera from giving false positive reaction.