

用免疫学方法检测脑脊液中抗原诊断隐球菌脑膜炎

首都医院检验科细菌血清室

(北 京)

1. 本文报道成功地用改良的对流免疫电泳及微量补体结合技术检测隐球菌脑膜炎病人脑脊液中多糖体抗原的方法。对流免疫电泳的改进要点是电泳凝胶板采用国产琼脂糖。由于琼脂糖电渗流很弱, 将凝胶板放在冰箱中 7 天后使用或在紧急待用时, 在琼脂糖中掺入 30% 普通琼脂就可以使抗体产生足够的负向移动。改良对流免疫电泳后敏感度提高 10 倍左右。

2. 本室制成的 1 号抗血清与本市所收集的 9 个菌株都能起凝集反应, 也能与 9 个菌株的多糖体抗原起免疫反应, 特异性和敏感性都是比较满意的。

3. 用多糖体对 1 号抗血清的吸收试验, 初步证明所有多糖体实际上都可移走 1 号抗血清的凝集活性, 但是用 5 号菌株吸收后, 残留有少量的对几个菌株的凝集素, 这可能是指它们存在有不能完全吸收的微量抗原。

4. 用这批抗血清检测了临床几年来收集的 16 份脑脊液标本和 11 份血清标本, 其中三例临床确诊为新型隐球菌脑膜炎, 我们的抗原测定也全部阳性, 其它疾病的 24 份标本抗原测定全部阴性。

5. 测定抗原的效价能反映出病情严重程度, 迁延和治疗效果。

从体液中检测微生物抗原诊断传染病有三大优点: 第一是快速, 如用对流免疫电泳及被动血凝技术一小时就可以得出结果; 第二是体液中测出抗原能肯定所感染的相应微生物是有致病性的; 第三是当病原体由于药物治疗和分离技术不当而分离培养不出, 或者无法分离病原菌时(如肝炎病毒), 抗原检测就成为诊断传染病的极重要的方法。近十多年来, 国外在这方面工作进展较快^[1-4]。

我国在诊断肝炎工作中, 由于采用了各种免疫学方法检测微量及超微量抗原, 检出率大大提高。对于脑膜炎、双球菌脑膜炎及伤寒病等疾病, 也正在开展脑脊液及血清的抗原检测研究。

本文初步介绍用对流免疫技术及微量补体结合试验检测脑脊液中新型隐球菌荚膜多糖体抗原, 该菌菌型较少, 目前见报道

的只有四型^[5], 各型之间又有不同程度交叉。而且由于该菌在病人脑脊液中产生很厚的荚膜, 在患病过程中该菌荚膜多糖体不断脱落, 用免疫学方法检测抗原是很方便的。

关于体液中隐球菌抗原检测的国外动态, 在 Snow 及 Kaufman 的文章中已有介绍^[4, 11]。我们希望, 在脑脊液中隐球菌抗原的微量测定方法取得成功后, 再进一步建立检测血清及脑脊液中其他致病菌的微量抗原技术, 以填补临床传染病诊断方面的不足。

材料及方法

(一) 抗隐球菌免疫血清

抗血清制备方法仿 Kozel 的方法进行^[6, 7]。

菌苗制备: 将隐球菌接种于赛保罗氏培养基

本文于 1976 年 11 月 2 日收到。

上, 28℃ 培养 48 小时, 用 1% 福尔马林生理盐水洗下, 4℃ 冰箱中过夜, 然后用 0.5% 福尔马林生理盐水洗三次, 无菌试验合格后, 用红血球计数板计数。菌苗冰箱保存。家兔免疫全程用一次培养的菌苗。

免疫动物用家兔, 免疫途径为耳静脉。

免疫剂量与程序: 1 号菌株: 家兔第 1、2 天各注射 1.25×10^{10} 个菌。由于该家兔不能耐受, 延至第 5 天注射同样菌量, 仍不能耐受, 延至第 8、9、10、11 天各注射 6.3×10^9 个菌, 第 14 天在该兔病危(凝集效价为 1:1024)时放血。用 1 号隐球菌菌株制备的兔抗血清简称 1 号抗血清。

2 号菌株: 家兔每天注射 2.4×10^9 个菌, 连续 10 天, 第 15 天取血, 凝集效价为 1:640, 以后再取血时, 加强一针后的第五天取血。开始我们用 1、2、3 号菌株共免疫 7 只家兔, 5 只由于不能耐受所给免疫剂量, 均相继死亡。

(二) 凝集反应用菌液

菌液制法同菌苗, 配成 1×10^8 个/毫升的浓度, 冰箱保存备用。

(三) 荚膜多糖体的制备

仿 Kozel 方法进行^[6]。具体步骤是将赛保罗氏斜面上 48 小时的菌种培养物接种于赛保罗氏液体培养基中, 28℃ 震荡培养 72 小时, 停止震荡后放置 48 小时, 向菌液中加入三甲酚至 1% 浓度, 离心, 取上清液, 提取荚膜多糖体。按 100 毫升上清液计算, 加入醋酸钠 10 克, 冰醋酸 1 毫升, 混合溶化后, 加入 95% 酒精 200 毫升充分震荡, 然后离心($\times 500$ g, 30 分)。将沉淀物溶解于 10 毫升蒸馏水中, 再加入氯仿 2 毫升, 正丁醇 0.4 毫升, 充分震荡后弃去乳白层蛋白, 留取上清液。此上清液再加醋酸钠 1 克和冰醋酸 0.1 毫升, 溶化后加 95% 乙醇 20 毫升充分震荡离心($\times 500$ g, 50 分钟), 留取沉淀物。最后将沉淀物溶解于 10 毫升蒸馏水中, 加叠氮钠至 0.1% 浓度, 分装安瓿, 冰箱保存。

我们用从北京各医院收集的 9 个菌株制成 9 批多糖体, 还制了一批白色念珠菌的多糖体及绿脓杆菌甲型脂多糖, 后者是按 Whistler 法^[7]制成。

多糖体纯度及量的测定: 我们用紫外分光光度计测初步提纯的多糖体的吸收光谱为单一峰,

然后选用本仪器允许范围的最敏感的波长 220 毫微米, 对各批多糖体定量。首先假定 1 号多糖体制品为每毫升 1,000 单位, 因为用对流免疫电泳技术测 1 号多糖体, 将它稀释 1000 倍与 1 号抗血清反应出现沉淀线。用蒸馏水稀释 1 号多糖体至每毫升含 10、20、30、40、50 单位, 在 220 毫微米波长下测出它们的光密度, 作成标准曲线。然后将其他各批多糖体作适当稀释后, 均测出光密度, 从 1 号多糖体标准曲线上推算出它们的浓度单位, 在进行免疫学试验时, 所有 11 批制品所用浓度都是 1000 单位。

(四) 葡萄球菌类毒素

由黑龙江省应用微生物研究所制备。

(五) 菌种的来源

由北京市各医院在 1974 至 1976 年从病人脑脊液中分离得到(见表 1)。

表 1 新型隐球菌菌种来源

菌种编号	提供单位
1	北京医学院附属医院
2	中医研究院附属医院
3	本院
4	北京医学院
5	中国人民解放军某医院
6	北京医院
8	中国人民解放军某医院
9	北京医院
10	北京医院

(六) 临床标本的收集

从 1974 年起收集了 30 份各种疾病的脑脊液, 其中包括确诊或疑似隐球菌脑膜炎的脑脊液。收集后分装在小安瓿内, 保存 -20℃ 或 4℃ 冰箱内。

(七) 凝集反应

采用两种方法, 其一是在特制的带格镜片上进行, 即用磷酸缓冲液将免疫血清作对倍稀释(用量为 0.025 毫升), 各格中加 0.025 毫升凝集用菌液, 用手翻动玻片混匀, 20 分钟后读数; 其二是用微滴凝集法, 具体操作详见 Courath^[8]所作介绍。血清吸收定型试验采用微滴凝集法。

(八) 对流免疫电泳

按 Tripodi 等^[9] 1974 年的方法进行。要点是电泳板用 0.06M、pH 8.6 的巴比妥缓冲液溶化

国产琼脂糖(浓度为1%),冷却至60℃倒板,厚度1.5毫米,电泳板放置冰箱中一周后使用。电泳板孔径为5毫米,每对孔间距为2毫米。泳动条件:电泳槽内盛满巴比妥缓冲液(0.06 M, pH 8.6),用棉布条连接电泳板与正负极,板上泳动电压为4伏/厘米,泳动时间25—30分钟。然后放在室温1—2小时后,即可初步读取结果。

(九) 漂洗与染色

用pH 8.6的生理盐水漂洗18—24小时,用多层滤纸吸干水份,热风吹干,用氨基黑染色液染15分,醋酸酒精洗脱液漂洗2分钟,自来水洗后吹干,即可判定结果。经过染色,沉淀线的效价可增高一个稀释度。

(十) 微量补体结合反应

按吴安然的方法^[10],并参考了 Courath 的方法^[9]。这一方法的要点是加液工具为定量滴管,96孔的微孔板上每孔加液总量为0.125毫升(共5滴),全部操作过程中,微孔板都放在冰盘内进行,以使补体不受破坏。微量补体结合时抗体效价滴度为1:128。

结 果

(一) 方法的探索

1. 制备高效价的特异性抗血清是本工作的关键。比较了近年来各种抗隐球菌血清制备方法,他们都大同小异。这些方法的相同之处是用静脉途径连续多次注射法,每次注射菌量多在数亿菌,在—批免疫的家兔中,常常只得到1—2只效价较好的家兔。我们免疫二批家兔,第一批是静脉连续多次注射法,菌量比他们高10—100倍,7只兔有5只因耐受不了所给予的剂量而死亡,存活的2只,凝集效价分别为1:1024及1:640;对第二批家兔,我们另采用了二种方法,一是按常规抗羊血球溶血素制备法——即多次皮下加二次静脉途径注射的方法,一是用活卡介苗高浓度脚掌注射,激活淋巴系统,然后在腋窝处向稍肿大的淋巴结内注射菌苗,结果采用前一方法时,家兔抗体效价最高,凝集效价达1:1280,对流

免疫电泳效价(稀释抗体)1:4;采用后—方法,凝集效价仅1:40。如何改进免疫方法,提高抗血清效价,是今后改进诊断方法,提高敏感性与特异性的重要工作之一。

表 2 不同方法免疫兔的抗血清效价

免疫方法			取血时间	最高效价
注射途径	每次注射菌量	次数/时间(天)	(天)	
静脉	1×10^{10} — 6×10^9	7/11	14	1:1024
静脉	2.5×10^9	10/10	17	1:640
皮内+静脉	2.5×10^9 — 1×10^{10}	7/15	18	1:1280
淋巴结+皮下	1×10^{10}	2/14	21	1:40

2. 对流免疫电泳的确定。许多人认为该技术敏感性不高而拒绝使用。我们开始用普通琼脂制作电泳板时,对流电泳出现的沉淀线模糊、粗糙,而且敏感性差,以后改用国产琼脂糖,虽然沉淀线是明确了,但由于琼脂糖电渗极弱,抗体的负向移动几乎停止,因而沉淀线靠近抗体孔侧呈弧形,当抗原浓度太大时,甚至将沉淀线冲至抗体孔中,无法辨认,易与非特异性的线条相混。

以后我们参考 El-refaie 等^[3]及 Tripodi 的^[6]方法,作了改进。一是缓冲液改用pH 6.6巴比妥醋酸液,二是制成琼脂糖板后放在冰箱中一周后使用,三是在琼脂糖中混入不同量的普通琼脂制板,立即使用三种改进的目的都是为了增加抗体的负向移动。表3是这三种条件进行对流电泳的结果比较。结果表明,用冰箱保存7天的琼脂糖板效果最好,敏感度最高,1单位/毫升多糖体即可出现清晰沉淀线,位于正中。在紧急情况下没有保存的琼脂糖板可用时,也可在琼脂糖中掺入30%的琼脂制板立即使用;降低电泳槽中缓冲液pH至6.6没有得到良好效果。

对流免疫电泳的敏感度比微量补体结合反应要低10倍左右。

表 3 1 号多糖体与 1 号抗血清对流免疫电泳不同条件结果比较

试 验 条 件				结 果		
一 号 抗 血 清 原 液	琼脂糖中含琼脂 (%)	缓 冲 液 pH	电泳板保存时间 (天)	出沉淀线的 最小单位	沉淀线位置	沉淀线清晰度*
	0	8.6	7	1.5	正中	++++*直
	30	8.6	1	3.1	正中	++++直
	60	8.6	1	6.2	正中	++直
	100	8.6	1	5.0	正中	+直
	0	8.6	1	1.5	贴边	++++弧形
	0	6.6	1	1.5	贴边	++++弧形

* “+”-“++++”表示清晰程度,“+”愈多愈清晰。

(二) 凝集反应

1 号抗血清与分离的 9 个菌株的凝集反应结果见表 4。也用 2 号抗血清同样与 9 个菌株进行了凝集试验,结果类似,只不过效价比 1 号抗血清略低一些。

国外将新型隐球菌分四型,在人群感染中主要是 A 型, D 型极少。我们收集的 9 个菌株都来自北京或北京附近地区。从凝集反应看,似乎 5 号菌株效价较低,而用对流免疫电泳及补体结合法, 5 号多糖体

效价又无显著差别; 9 号菌株与 5 号正相反。为此,我们用全部 9 个菌株的浓多糖体以 20:1 的体积对原倍 1 号抗血清原液分别进行了吸收, 37℃ 2 小时后冰箱放置 2 天,然后测吸收后血清对 9 个菌株的凝集效价,结果见表 4。结果表明,所有多糖体实际上都可移走 1 号抗血清的凝集活性,但是用 5 号菌株吸收后,残留有少量的对几个菌株的凝集素,这可能是由于它们存在有不能完全吸收的微量抗原。

表 4 1 号血清用 9 种多糖体吸收后的凝集效价

凝集用菌株号	1 号 抗 血 清 吸 收 后 效 价									不 吸 收 (对照)
	1—1	1—2	1—3	1—4	1—5	1—6	1—8	1—9	1—10	
1	—*	—	—	—	1:80	—	1:20	1:20	1:20	640
2	—	—	—	—	1:40	—	1:20	1:20	1:20	640
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	320
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	320
5	—	—	1:20	—	—	—	—	—	—	40
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160
8	—	—	—	—	1:40	—	—	—	—	640
9	—	—	—	—	1:40	—	—	—	—	640
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	640

* “—”指 1:20 抗血清不发生凝集。

(三) 分离菌株的多糖体分析

本文目的是用特异性抗血清检测病人脑脊液中隐球菌荚膜多糖体抗原,所以我们首先用菌体免疫家兔所得的抗血清测试了 9 个菌株经人工培养基培养后提取的荚膜多糖体,观察是否存在特异性反应,结果

见表 5。试验证明, 9 个菌株的多糖体都与 1 号菌株呈特异性免疫学反应,效价都相当高。

我们又用金黄色葡萄球菌类毒素,绿脓杆菌脂多糖及白色念珠菌多糖体与 1 号隐球菌抗血清进行交叉反应。结果表明,

表 5 1 号抗血清的特异性及敏感性检定

试验株	免 疫 反 应 效 价			
	对流电泳		补体结合	
	效价	最小反应单位	效价	最小反应单位
1	1000	1	4000	0.25
2	2000	0.5	2000	0.5
3	1000	1	16000	0.06
4	2000	0.5	8000	0.12
5	500	2	4000	0.25
6	2000	0.5	16000	0.06
8	1000	1	4000	0.25
9	200	5	2000	0.5
10	1000	1	8000	0.12

金黄色葡萄球菌类毒素与 1 号抗血清不论对流电泳或补体结合试验都不存在交叉反应；绿脓杆菌脂多糖与白色念珠菌多糖体以 1,000 单位的高浓度与 1 号抗血清反应时,对流电泳试验不存在交叉反应,但补体结合试验出现低效价交叉,分别为 1:32 及 1:4,其最小反应单位分别为 31.2 及 250;白色念珠菌多糖体比隐球菌的抗原与各株的最小反应单位要大 125—520 倍,绿脓杆菌脂多糖比隐球菌的抗原与各株的最小反应单位大 2,000—16,600 倍,而绿脓杆菌脂多糖以 1,000 单位量时,自己的特异性抗体反应,对流免疫的效价为 1,000,补体结合试验效价为 4000,可以认为交叉反应是很低的。

(四) 收集脑脊液的检定

三年来收集了 16 份脑脊液标本。这

些病人大多数曾一度被怀疑是新型隐球菌脑膜炎,其中三例经霉菌培养和墨汁染色检出阳性后确诊,它们就是 1、2、3 号菌株的来源。我们用对流免疫电泳及微量补体结合法从这三例脑脊液标本中都检出了特异性多糖体抗原,并且各具有不同的效价。有六例曾怀疑是隐球菌感染,但最后确诊为结核性脑膜炎,我们用免疫学方法检查也都呈阴性。急性脑膜炎两例、及各种脑脊髓疾病病人 7 例,脑脊液检测也都呈阴性。还抽测了 11 份其他病人血清,均得阴性结果,详细结果见表 6。

表 6 用 1 号抗血清检测临床标本结果

临床诊断	病例数	试验阳性数	
		对流电泳法	补体结合法
新型隐球菌脑膜炎	3	3	3
结核性脑膜炎	6	0	0
脑膜炎双球菌脑膜炎	1	0	0
病毒性脑膜炎	1	0	0
急淋白血病合并脑膜白血病	1	0	0
肿瘤转移所致上腔静脉梗阻综合征	1	0	0
右硬膜外血肿术后	1	0	0
脊髓瘤	1	0	0
四肢软瘫	1	0	0
非隐球菌病的其他病人血清	11	0	0

初步证实用免疫学方法——对流免疫电泳与微量补体结合技术检测脑脊液中隐

表 7 对流电泳与微量补体结合法测脑脊液中隐球菌抗原滴度

标本号	病人姓	方 法	效 价									
			原倍	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	罗××	对 流 补体结合	2+	1+	—	—	—	—	—	—	—	—
			4+	4+	4+	4+	4+	—	—	—	—	—
2	房××	对 流 补体结合	4+	4+	3+	2+	1+	±	—	—	—	—
			4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	—
3	孙××	对 流 补体结合	4+	3+	2+	2+	1+	1+	—	—	—	—
			4+	4+	4+	4+	4+	4+	1+	—	—	—

球菌多糖体抗原与临床诊断是符合的，与霉菌培养、墨汁染色结果完全一致。

用这两种免疫学方法测出的阳性脑脊液抗原滴度结果见表 7。病人房××的脑脊液经墨汁染色(集菌法),可找到大量隐球菌,取标本后病人当夜死亡,我们测其免疫学效价也最高,补体结合效价为 1:256,对流免疫电泳效价 1:16—32。罗××的脑脊液抗原效价分别为 1:2 和 1:16,孙××的脑脊液抗原效价分别为 1:32 和 1:64。

我们还对仅有的一例病人进行了脑脊液中隐球菌抗原动态观察,病例介绍如下:

孙××:男,20岁,病历号C—104418,因发烧,头疼,呕吐,15天后在脑脊液中找到新型隐球菌,于1974年10月22日入院。该病人曾于1974年8月因缩窄性心包炎进行过心包部分切除术,术后9月16日发烧头疼呕吐,当日腰穿刺取脑脊液作生物化学检定,用墨汁染色方法未找到隐球菌,初步诊断为结核性脑膜炎而转入当地结核病院,但按结核病治疗无效,病情加剧,终于在第五次腰穿刺时,从脑脊液中找到了隐球菌。1974年10月22日转来我院治疗。现将入院后开始用两性霉素B治疗

的一年多时间中脑脊液培养、墨汁染色与多糖体抗原测定情况作图说明(见图1)。

患者在疾病严重阶段入院,处于昏迷状态,霉菌培养阴性。但用墨汁染色法可找到新型隐球菌,此时测出了多糖体抗原,补体结合效价为 1:64,对流免疫电泳效价为 1:32。当年10月23日开始用两性霉素B治疗,由于发生脑疝,在此后4个月内停止作腰穿刺取脑脊液,至75年3月以后病情略有反复,随后逐渐痊愈,75年3月21日获得唯一的一次霉菌培养阳性结果,一直到5月12日墨汁染色均为阳性,但最后两次找到的霉菌已很不典型。75年3月以后,多糖体抗原浓度逐渐下降,补体结合法最后一次阳性结果在4月22日得到,对流电泳法最后一次阳性结果在3月21日得到,病人出院时及出院后两次腰穿刺取样复查,细菌学及免疫学检定均为阴性。

仅有的这一病例初步证明,用免疫学方法定期检测脑脊液中多糖体抗原物质,能反映疾病的治疗,病情迁延和恢复的过程。

讨 论

1.我国自1948年报道第一例隐球菌病以来至今已报告的有40例,但实际数字远远超过此数。我院1958—1976年共确诊14例新型隐球菌性脑膜炎,其中8例死亡,死亡率高的原因之一是入院较晚、误诊或延诊。通常采用的墨汁染色及霉菌培养法,据文献报道,阳性率只有50%左右,特别是无法作到早期诊断。我们根据本试验室已用的常规方法,选用了电泳及补体结合技术来进行检测,方法试验成功后,又测定了一批临床标本和由临床分离到的菌株的多糖体,效果较满意。我们认为,效果较好的主

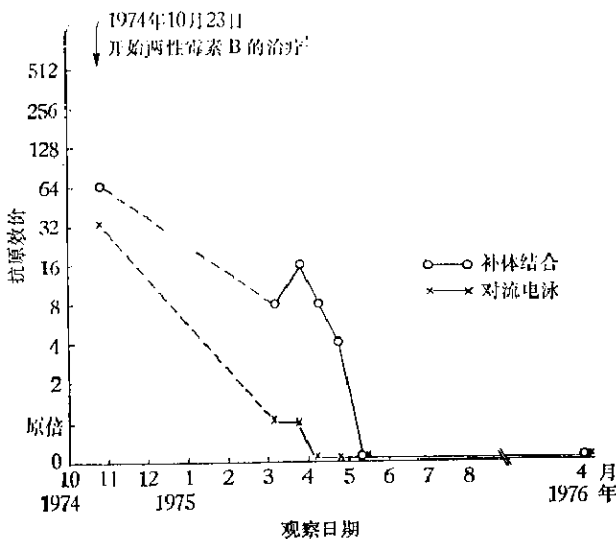


图1 用两性霉素B治疗后脑脊液中隐球菌抗原的变化

要原因是补体结合法采用了微量法, 敏感度比试管法高 1—2 个稀释度; 对电泳采用的琼脂糖电泳板, 比琼脂电泳板敏感度高 10 倍左右。改良后的这二种技术并不复杂, 一般医院常规检验时完全可以采用。本室正研究用反向间接血凝技术测隐球菌抗原以进一步提高敏感性, 并使操作简化。

2. 对仅有的一例病人脑脊液中抗原作了动态观察, 观察结果证明与病程相符, 能反映出治疗、迁延、痊愈的动态。但是最后一次墨汁染色法检测阳性时, 抗原检测阴性。其原因可能是镜下所见到的隐球菌已临近死亡, 因为形态是不完整的。对于脑膜炎病人, 要检测抗原时, 可以检测血清标本, 也可以检测脑脊液标本, 但脑脊液标本最合适, 它最能反映疾病当时的情形。因为隐球菌多糖体抗原在脑脊液中停留时间为两天左右, 然后迅速排出至血液中, 血液中多糖体抗原却可以停留 5—8 周, 其浓度则大大低于脑脊液中的。当然, 对于隐球菌肺炎, 则一定要取血清标本及痰标本检测。

3. 虽然用分光光度计对 9 批多糖体抗原进行了浓度测定, 在试验中采用了统一单位, 但没有测过干重, 所以对本文中免疫学方法的确切敏感程度未下结论。

4. 关于白色念珠菌及绿脓杆菌的抗原与隐球菌的抗血清在补体结合试验中出现交叉反应的现象, 我们认为, 因为他们的最小反应单位分别比隐球菌抗原的特异性反应至少低 125 倍及 2000 倍, 这种交叉反应在临床上是没有意义的。如绿脓杆菌与绿

脓杆菌抗血清的特异性反应高达 1:4000, 而与隐球菌抗血清低至 1:4, 二者差别 1000 倍。事实上临床病人脑脊液中绝不可能有如此高浓度的该菌抗原存在。正由于实际脑脊液抗原浓度都是微量的, 所以在补体结合试验中就很少会出现交叉反应。

5. 诊断隐球菌病, 不仅要检测抗原, 也应同时检测抗体, 这种病的恢复期或迁延型有时有低效价抗体。检测抗体最好的方法是间接免疫荧光法, 血凝技术或补体结合法, 简单的方法则可以用全菌凝集反应。我们没有保存血清标本, 所以这一批试验中未能检测抗体。

参 考 资 料

- [1] Editorial: Microbial-Antigen Detection *Lancet*, 2 (7873): 138—139, 1974.
- [2] Whittle, H. C. et al.: *Amer. J. Med.*, 58: 823—828, 1975.
- [3] El-retai, M and Dulake, C.: *J. Clin. Pathol.*, 28 (10): 801—806, 1975.
- [4] Snow, R. M. et al.: *Arch. Intern. Med.*, 135 (9): 1155—1157, 1975.
- [5] Wilson, D. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 821—823, 1968.
- [6] Kozel, T. R.: *Infect. Immunol.*, 3: 287, 1971.
- [7] Whistler, R. L. et al.: *Methods of Carbohydrate Chemistry*, Vol. 6, Academic Press, New York, 1972.
- [8] Courath, B. T. (ed.): *Handbook of Microtiter Procedures*, Ch. 2, 9, Cambridge Mass, Dynatech Corporation, 1972.
- [9] Tripodi, D. et al.: *J. Immunol. Meth.*, 4: 1—10, 1974.
- [10] 北京协和医院检验科: 病毒实验诊断手册, 第 96—106 页, 人民卫生出版社, 北京, 1961.
- [11] Kaufman, L. et al.: *Appl. Microbiol.*, 23 (3): 620, 1974.

ANTIGEN DETECTION BY SEROLOGICAL TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF CRYPTOCOCCAL MENINGITIS

Serological Laboratory, Division of Clinical Diagnosis, Capital Hospital
(*Beijing*)

In the present paper, the methods and results for the application of counterimmunoelectrophoresis (CIE) and microcomplement fixation test (CF) in the detection of cryptococcal polysaccharide antigen in the spinal fluid from suspected cases were reported. In the CIE technique, agarose was either used alone in the preparation of the gel plate, which is to be stored in the refrigerator for a week, or if necessary, agarose with the addition of 30% of agar can be used immediately after preparation. By this means, the sensitivity of the test can be increased 10 folds.

A rabbit immune serum prepared against cryptococcus strain No. 1 was found to agglutinate all of the 9 strains which were collected from local hospitals between 1974 and 1976. This serum was

found to give specific reaction in the two serological tests. By this antiserum, after its being absorbed by the polysaccharides of all strains available, all the agglutinating activity was practically removed. However, after having been absorbed by strain No. 5, some residual agglutinins were left for a few strains, which suggested the presence of minor antigens not completely absorbed.

This antiserum was applied to the study of 16 specimens of spinal fluid and of 11 sera from patients suspected of cryptococcal meningitis, 3 gave positive reaction by the spinal fluids. All 3 were also confirmed to be active cases by bacteriological examination. Furthermore, by sequential assays, the titre of the antigen was found to reflect the effect of treatments given.