

## 关于双醛化被动血凝法若干问题的探讨

首都医院基础组

(北 京)

本文报道了探讨双醛化被动血凝法一些影响因素的结果,认为固定方法,致敏时的 pH,致敏物的浓度,以及致敏红细胞的浓度,均对血凝滴度有影响。用纯化的乙型肝炎抗体致敏双醛化羊红细胞,作反向被动血凝试验,可以测出每毫升含 3.73 毫微克的乙型肝炎抗原。用纯化的乙型肝炎抗原致敏双醛化羊红细胞,作被动血凝法可检测,乙型肝炎抗体;在 4℃ 保存的致敏红细胞,其滴度至少在 4 个半月内无明显变化。

比较了对流免疫电泳、放射对流免疫电泳和反向被动血凝三种方法,用于检测病人血清中乙型肝炎抗原的敏感性和特异性。三种方法的相对敏感度相应为 1:20:600。用这三种方法检测 407 例患者血清样品的阳性率,相应为 2.2%、11.3% 和 13.3%,反向被动血凝法敏感性最高,但特异性差;放射对流免疫法敏感度虽稍差,但特异性高。如果与抑制试验结合应用,反向被动血凝法是一种可以推广的简便检查方法。

自 Blumberg 等<sup>[1]</sup> 1965 年发现澳大利亚抗原,并在 1967 年<sup>[2]</sup> 认为该抗原与肝炎有关后,乙型肝炎的诊断有了一个突破。近来检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg),所用的免疫学诊断方法很多,世界卫生组织 1975 年的技术报告综合各地的检查方法,认为反向被动血凝法和放射免疫测定法是目下检测 HBsAg 最敏感的方法<sup>[3]</sup>。我国在乙型肝炎的诊断方面,文化大革命以来有了不少发展。我们认为反向被动血凝法比较简便,适于农村及厂矿大规模应用,有利于贯彻执行毛主席关于把医疗卫生工作的重点放到农村去的指示,因此对被动血凝法的条件作了一些探索,并对反向被动血凝法的敏感度和特异性作了一些观察。

被动血凝法的敏感度和稳定性与红细胞固定的方法有密切关系。Boyden<sup>[4]</sup> 1951 年使用鞣酸处理红细胞以结合蛋白抗原后,鞣酸成为处理红细胞的常用方法。Lawlis<sup>[5]</sup> 1958 年用甲醛代替鞣酸,开始了用各种醛类处理红细胞作为被动血凝方法的研究。1968 年 Hirata 等<sup>[6]</sup> 用丙酮醛和甲醛连续固

定红细胞,并在 1973 年<sup>[7]</sup> 用以检测乙型肝炎抗原,效果很好。因此我们采用了 Hirata 等的双醛化方法固定红细胞,进行被动血凝试验,现将结果报告如下。

### 材料及方法

#### (一) 羊红细胞双醛化的方法

1. 由羊颈静脉取血与等量 Alsever 液充分混合,4℃ 放置 24 小时。用 0.11M pH7.2 磷酸盐缓冲液(以下简称 PB 液)洗 5 次。再用 PB 液配成 8% 红细胞悬液。

2. 置 8% 红细胞悬液的容器于电磁搅拌器上,边搅拌边滴入等量的用 PB 液配制的 3% 丙酮醛,在室温连续搅拌 17 小时。用 0.11M pH7.2 的 PB 液洗 5 次,再恢复成 8% 红细胞悬液,用尼龙纱或双层纱布过滤,除去可能出现的凝集红细胞。

3. 丙酮醛处理过的 8% 红细胞悬液,如上法再边搅拌边滴加等量用 0.11M pH7.2 的 PB 液配制的 3% 甲醛,在室温连续搅拌 17 小时,用 0.11M pH7.2 的 PB 液洗 5 次,用尼龙纱或双层纱布过滤。配成 10% 红细胞悬液,加 0.02% 叠氮钠,在

本文于 1977 年 5 月 21 日收到。

4℃保存备用。

## (二) 双醛化羊红细胞致敏方法<sup>1)</sup>

1. 用乙型肝炎抗体致敏的方法: 取 4℃ 保存的 10% 双醛化羊红细胞悬液 1 毫升, 用 0.11 M pH7.2 的 PB 液洗 2 次, 去上清液。加入 10 毫升含有 300 微克纯化乙型肝炎抗体的 0.1 M pH4.0 的醋酸盐缓冲液, 混合均匀, 置 37℃ 水浴中致敏 45 分钟, 每 5 分钟轻轻振摇一次。然后用 0.11 M pH7.2 的 PB 液洗 2 次, 配成 1% 红细胞悬液, 加 0.02% 叠氮钠, 4℃ 保存备用。

2. 用乙型肝炎抗原致敏的方法: 除在 10 毫升 1% 红细胞悬液(pH 4.0)中加 200 微克纯化乙型肝炎抗原, 在 25℃ 致敏 5 分钟外, 其余均与用抗体致敏条件相同。

## (三) 样品的测定与结果的判断

1. 在“V”形微量血凝板上, 每孔加 0.11 M pH7.2 的 PB 液配制的 2% 正常兔血清液(即稀释液) 25 微升。

2. 用 25 微升的稀释棒蘸取被检血清, 顺序作倍比稀释, 最后一孔留为对照孔。

3. 在血凝板的每孔加入 1% (或 0.5%) 致敏红细胞悬液 25 微升。置振荡器上振荡 1 分钟。置室温 2 小时后观察结果。

4. 判断结果以完全凝集为阳性结果, 计算其阳性滴度。但滴度在 2<sup>4</sup> 以下的阳性样品需要进一步作抑制试验加以证实。

## (四) 抑制试验

1. 每份血清用两排孔。第一排孔作为对照组, 第二排孔为抑制试验组。

2. 抑制试验组的第一孔加纯化的乙型肝炎抗体(对流电泳法滴度为 1:16) 25 微升, 其余各孔加稀释液 25 微升。对照组各孔均加稀释液 25 微升。

3. 两组均以稀释棒各蘸取血凝滴度在 2<sup>4</sup> 以下的阳性血清 25 微升, 顺序以稀释棒作倍比稀释, 置 37℃ 作用 1 小时。

4. 由 37℃ 温箱取出血凝板, 每孔加 1% (或 0.5%) 致敏红细胞 25 微升, 振荡 1 分钟, 置室温 2 小时后观察结果。凡抑制试验组比对照组滴度低 2 个稀释度以上者, 即可判断为阳性。

## (五) 对流免疫电泳法

与一般对流免疫电泳法相同。孔径与孔距均为 3 毫米。每孔加血清或抗体 10 微升。端电压为 50 伏, 电泳 1 小时后观察结果。

## (六) 放射对流免疫电泳法(以下简称放射免疫法)

与对流免疫电泳法相同, 仅将抗体更换为 <sup>131</sup>I 或 <sup>125</sup>I 标记的抗体(浓度为 100 微克/毫升), 放射比度为 0.258—0.360 微居里/微克。电泳 1 小时后, 用 0.85% 盐水冲洗 24 小时, 再用自来水冲洗 4 小时, 吹干, 用 X 光底片作放射自显影, 曝光, 冲洗后观察结果。

# 试验结果

## (一) 影响被动血凝法的一些因素

1. 羊红细胞固定方法对血凝滴度的影响: 用不同的醛类及鞣酸处理羊红细胞后, 用 <sup>131</sup>I (由中国科学院原子能研究所供应) 标记的乙型肝炎抗体致敏, 每 10 毫升 1% 红细胞悬液中标记抗体 300 微克, 用 pH7.2 的 PB 液洗 5 次后, 检测不同方法处理的红细胞结合乙型肝炎抗体的数量(以脉冲数计算), 结果见表 1。

表 1 不同方法处理的红细胞吸附标记乙型肝炎抗体的数量

处 理 方 法	脉 冲 数/分
戊二醛	8694—8876
戊二醛+鞣化	12650—13044
丙酮醛+甲醛	10214—10236
丙酮醛+甲醛+鞣化	17728—18200

由表 1 可以看出, 用丙酮醛、甲醛、戊二醛和鞣酸处理红细胞后, 均有吸附乙型肝炎抗体的能力。增加醛化的次数与鞣化均能提高吸附抗体总量的能力。为了探讨处理后的红细胞吸附抗体量的多少与反向被动血凝滴度是否平行, 我们用经不同方

1) 本试验所用 DEAE-纤维素及亲和层析提纯的乙型肝炎表面抗原和抗体均由北京生物制品研究所生化室提供。

法致敏的羊红细胞，测定同一阳性血清样品，观察滴度有无差异，结果见表 2。

表 2 增加醛化次数及鞣化，对反向被动血凝滴度的影响

处 理 方 法	反向被动血凝滴度
丙酮醛+甲醛	2 <sup>11</sup>
丙酮醛+甲醛+鞣化	2 <sup>10</sup>
丙酮醛+甲醛+鞣化+戊二醛	2 <sup>11</sup>

表 2 说明，双醛化以后，再增加鞣酸及戊二醛处理，血凝滴度不再增高，有时反而下降。因此，处理红细胞时，吸附抗体量要适当，单纯强调多次醛化，多吸附抗体并不能提高被动血凝的敏感度。

2. 致敏时 pH 的影响：用自制 DEAE 纤维素提纯的兔抗人胚肝内含物抗体致敏双醛化羊红细胞，观察不同 pH 对吸附抗体能力的影响。当 pH 为 4.0 时，被动血凝滴度为 2<sup>9</sup>，当 pH 为 5.0 时，抗体不被吸附于红细胞，血凝滴度为 0。乙型肝炎抗体及抗原均以 pH4.0 时致敏的羊红细胞效果最好。

3. 致敏时温度的影响：在室温（20℃ 左右）及 37℃ 水浴中，用 300 微克乙型肝炎抗体致敏双醛化红细胞 1 小时，洗后作反向被动血凝。37℃ 致敏者，滴度为 2<sup>12</sup>，室温为 2<sup>9</sup>。在 37℃ 水浴中致敏的效果较好。

4. 致敏物浓度的影响：在 10 毫升 1% 双醛化红细胞悬液中（pH 为 4.0），加入不同量的纯化乙型肝炎抗体进行致敏，然后观察血凝滴度，结果见表 3。

表 3 不同浓度的乙型肝炎抗体对致敏的影响

致敏物量(微克)	反向被动血凝滴度
200	2 <sup>11</sup>
300	2 <sup>11</sup>
400	2 <sup>9</sup>

表 3 说明，致敏物的浓度要适当，过高反而使反向被动血凝的滴度下降。

5. 红细胞浓度的影响：将纯化乙型肝炎抗体致敏的双醛化羊红细胞配成不同浓度，作反向被动血凝，测一份阳性血清样品。当红细胞浓度为 2.5% 时，滴度为 2<sup>10</sup>；当红细胞浓度为 1% 时，滴度为 2<sup>11</sup>；当浓度为 0.5% 时，滴度上升为 2<sup>12</sup>。说明红细胞浓度愈低，滴度相应提高。红细胞浓度如低于 0.5%，则观察时间延长，阴性结果时红细胞聚集点太小，不易观察。

6. 致敏羊红细胞的保存时间

(1) 用纯化乙型肝炎抗体致敏双醛化羊红细胞后，在 4℃ 保存，4 个半月内作反向被动血凝试验，滴度无大变化。部分红细胞在 2 个月后血凝清晰度稍差，结果见图 1。

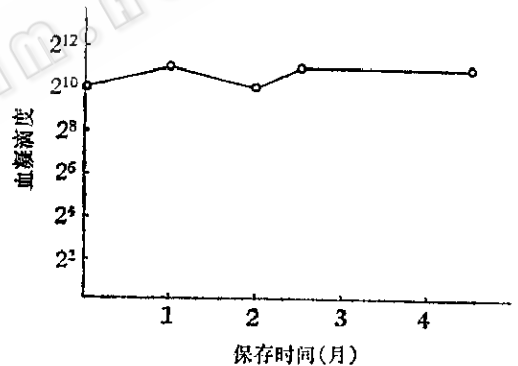


图 1 在 4℃ 保存不同时间后乙型肝炎抗体致敏羊红细胞的滴度

(2) 用提纯的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 致敏羊红细胞，在 4℃ 保存，于不同时间测定血凝滴度。在 1 个月内，下降 3—4 个滴度，以后不再下降，至少可以保存 4 个半月，(图 2)。经 DEAE 纤维素提纯的 HBsAg 与再经免疫吸附提纯的效果相似。

(3) 提纯的 HBsAg 在 4℃ 保存一定时间后，用以致敏羊红细胞，观察被动血凝滴度，与上项测定结果作比较，结果见图 3。

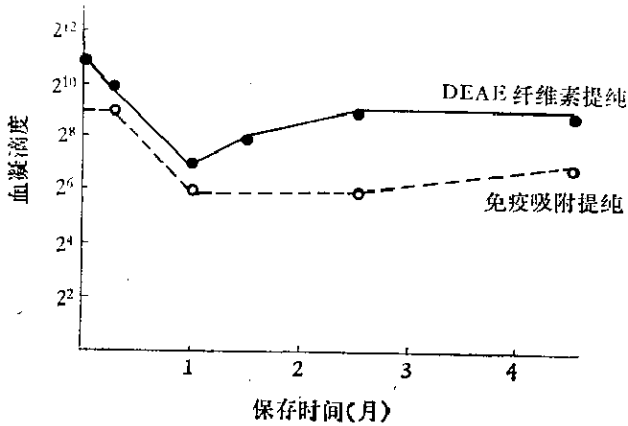


图2 在4°C保存不同时间后乙型肝炎表面抗原致敏羊红细胞的滴度

提纯的 HBsAg 在 4°C 保存 7 天后效价下降,以后稳定约 1 个半月,效果再下降至不能致敏醛化红细胞(第 75 天)。比较图 2 与图 3 可以看出,HBsAg 致敏双醛化羊红细胞的保存时间比单纯保存 HBsAg 的时间长。两种提纯方法尚看不出有明显差异。

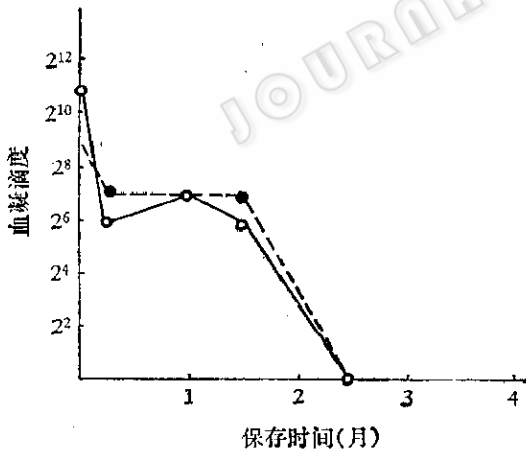


图3 在4°C保存不同时间后的乙型肝炎表面抗原致敏的羊红细胞的滴度

○——○DEAE 纤维素提纯;  
●·····●免疫吸附提纯。

(二) 用对流免疫电泳法,放射对流免疫电泳法和反向被动血凝法检测乙型肝炎表面抗原的比较

用三种方法,同时检查 407 份门诊送测转氨酶的血清样品,来比较了它们的敏感度和特异性。放射免疫法及反向被动血凝法阳性者,用抑制试验加以验证。

### 1. 三种方法敏感度的比较

(1) 用倍比稀释法测定三种方法的敏感度:对混合阳性血清(1 号阳性血清)和一份滴度较高的血清样品,用三种方法进行了定量测定,结果见表 4。

由表 4 看出,放射免疫法比对流免疫电泳法高 16—32 倍,反向被动血凝法比对流免疫电泳法高 256—1024 倍。其相对敏感度是:对流免疫电泳:放射免疫:反向被动血凝 = 1:20:600。

表4 用三种方法检测阳性血清样品滴度的比较

标本	对流电泳法滴度	放射免疫法滴度	反向被动血凝法滴度	三种方法的相对敏感度
1 号阳性血清	1:16	1:512	1:4096	1:32:256
病人血清	1:64	1:1024	1:65536	1:16:1024

用自制的双醛化羊红细胞,测定倍比稀释的纯化 HBsAg,测得反向被动血凝法的绝对敏感度为 3.73 毫微克/毫升。

(2) 在阳性血清中,三种方法阳性率的比较:经抑制试验证实的 HBsAg 阳性血清共 54 份,用三种方法的检出率如表 5。

表5 用三种方法检测证实为阳性样品(54 份)的阳性率比较

	反向被动血凝法	放射免疫法	对流免疫电泳法
阳性数	54	46	9
阳性率(%)	100	85.2	16.7

反向被动血凝法检出的阳性率为 100%,放射免疫法为 85.2%,对流免疫电泳法只能查出 16.7%。

### 2. 三种方法特异性的比较

以反向被动血凝法的滴度为基础，比较用三种方法测定 407 份血清样品中所得之阳性样品，假阳性样品及假阴性样品的份数，列于表 6。反向被动血凝法及放射免疫法阳性的血清样品，均作抑制试

验，凡抑制试验为阳性者定为阳性样品，抑制试验阴性者定为该方法的假阳性。凡三种方法中任何一种或两种测定为阳性（经抑制试验证实）而其他方法为阴性时，定为该方法的假阴性。

表 6 三种方法特异性的比较 (407 份血清样品的检查结果)

被动血凝法 凝集终点血 清稀释度	反向被动血凝法			放 射 免 疫 法			对流免疫电泳法		
	阳 性	假阳性	假阴性	阳 性	假阳性	假阴性	阳 性	假阳性	假阴性
2 <sup>2</sup> —2 <sup>3</sup>	9	37	0	3	0	6	0	0	9
2 <sup>4</sup> —2 <sup>6</sup>	21	2	0	19	0	2	0	0	21
2 <sup>7</sup> 以上	24	0	0	24	0	0	9	0	15
总 计	54(13.3%)	39(9.6%)	0	46(11.3%)	0	8(1.9%)	9(2.2%)	0	45(11.5%)

表 6 说明对流免疫电泳法及放射免疫法没有假阳性，但有假阴性，即血清中 HBsAg 滴度低时，二种方法均检测不出。放射免疫法在用反向被动血凝法测得滴度为 2<sup>7</sup>以下时，会出现部分假阴性；用对流免疫电泳法，则在 2<sup>9</sup>以下常出现假阴性，说明三种方法的敏感度不同。反向被动血凝法的阳性率最高，但假阳性率也相当高(9.6%)，说明该法虽然敏感度高，但特异性比其他两种方法差。反向被动血凝法的假阳性与血清的稀释度有关，大部分的假阳性都在滴度 2<sup>3</sup>以下，滴度为 2<sup>3</sup>时有 14 个假阳性，滴度为 2<sup>2</sup>时有 23 个假阳性，即血凝滴度愈低，假阳性愈高。

讨 论

1. 处理后红细胞吸附蛋白量的测定方法：以前没有直接测定处理红细胞吸附蛋白量的方法。我们在测定经不同方法处理的羊红细胞吸附抗体的数量时，用<sup>131</sup>I 标记的乙型肝炎抗体作为致敏物；致敏后充分洗净，再测定红细胞的 γ 射线脉冲数，可较准确而快速地测量吸附量，从而可以比较几种方法的优缺点。我们认为，在一定限

度内，吸附致敏物的量与被动血凝的敏感度成正比，但吸附致敏物过多，血凝滴度反而下降，可能与致敏物过多，占据空间，妨碍特异性抗原与抗体的结合有关。

2. 几种常用测定 HBsAg 方法的比较：许健音等<sup>[8]</sup>及天津卫生防疫站肝炎组<sup>[9]</sup>曾对检测 HBsAg 的几种方法作了比较，证明反向被动血凝法的相对敏感度比对流免疫电泳法高，各为 64—512 倍及 32—256 倍。本文报告的是 256—1024 倍。他们判定阳性是以凝集为准，我们是以完全凝集为阳性，所以本文报告的反向被动血凝法的相对敏感度比较高。对肝炎病人血清样品的检查结果表明，他们用反向被动血凝法比对流免疫电泳法测得的阳性率高 2—4 倍，而我们的结果高 6 倍。我们方法的敏感度稍高的原因可能有二。首先，我们用丙酮醛和甲醛处理红细胞，他们则是用戊二醛和鞣酸；其次，我们利用抑制试验排除了非特异性凝集，使第 3 孔以下的阳性血清可明确地被检出，提高了检出率，而他们则不把第 3 孔以下的结果计算在内。例如本文中用反向被动血凝法检测的 54 份阳性血清样品中，有 9 份的滴度在 2<sup>3</sup>以下。

总之, 双醛化法提高了致敏红细胞的敏感度, 而利用抑制试验提高了方法的特异性, 使反向被动血凝法的检出率有所提高。

用放射对流免疫电泳法, 与国内其它单位<sup>[10-12]</sup>比较, 我们所得结果的阳性率比较低, 可能与我们所用的标记乙型肝炎抗体的放射比度低有关。

3. 如何使用反向被动血凝方法: 实验结果说明, 用反向被动血凝法检测血清中的 HBsAg, 敏感度较高, 但同时假阳性率也高。我们通过实践, 建议在检查病人血清样品时, 先用反向被动血凝法把阳性血清样品筛选出来, 再在重复对滴度 $2^6$ 以下的阳性血清样品进行血凝试验的同时, 用 DEAE 纤维素纯化的乙型肝炎抗体作抑制试验, 如抑制试验的血凝滴度比原血凝滴度低 2 个滴度, 即可定为阳性。这样可以把滴度在 $2^6$ 以下的假阳性去掉, 既保持血凝法的高敏感度的优点, 又避免了被动血凝法特异性差的缺点。

4. 双醛化固定红细胞方法的评价: 双醛化方法固定的红细胞容易吸附各种蛋白质。只要掌握致敏时的 pH, 致敏物的量,

致敏时避免强烈的振动, 一般致敏效果比较好。在 $4^{\circ}\text{C}$ 保存可以使用 2 个月以上。由于被动血凝法的操作方法及设备均较简单, 可以大规模使用, 是值得推广的一种简便检查方法。

### 参 考 资 料

- [1] Blumberg, B. S. et al.: *J. Amer. Med. Assoc.*, 191:541, 1965.
- [2] Blumberg, B. S. et al.: *Ann. Internal Med.*, 66:924, 1967.
- [3] Report of a WHO meeting: *WHO Tech. Report Series* No. 570, 1975.
- [4] Boyden, S. V.: *J. Exp. Med.*, 93:107, 1951.
- [5] Lawlis, J. F.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 98:300, 1958.
- [6] Hirata, A. A. et al.: *J. Immunol.*, 100: 641, 1968.
- [7] Hirata, A. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143:761, 1973.
- [8] 许健言等: *微生物学报*, 16: 148, 1976.
- [9] 天津市卫生防疫站肝炎小组: *天津医药*, 5:227, 1977.
- [10] 天津市卫生防疫站肝炎小组: *天津医药*, 3:858, 1975.
- [11] 天津市卫生防疫站肝炎小组: *放射免疫分析及其他放射体外测定方法*, 85 页, 原子能出版社, 1976.
- [12] 北京军区总医院肝炎病原组: 同上, 第 87 页。

## STUDY ON DOUBLE ALDEHYDE STABILIZED ERYTHROCYTES FOR PASSIVE HEMAGGLUTINATION TEST

Department of Basic Medical Science, The Capital Hospital

(Beijing)

Factors affecting the sensitivity of double aldehyde stabilized erythrocytes for passive hemagglutination test were investigated by means of isotope labelled antibody and microtiter hemagglutination method. The method of stabilization, pH at the time of erythrocyte coating, protein concentration of antigen or antibody to be coated, as well as the concentration of coated erythrocyte used in titration were found to be critical. Double aldehyde stabilized sheep erythrocytes coated with purified HBsAb can detect HBsAg in concentration as low as to 3.73 ng/ml by reverse passive hemagglutination. The coated erythrocytes can be stored at 4°C for more than 4½ months without obvious decrease in titre. Double aldehyde stabilized erythrocytes can also be coated with purified HBsAg and, if stored at 4°C, can be used to examine for HBsAb by passive hemagglutination for at least

4½ months.

The sensitivity and specificity of counterimmuno-electrophoresis, radio-counterimmunoelectrophoresis and reverse passive hemagglutination for detecting HBsAg were compared. The relative sensitivity of the 3 methods mentioned above was 1:20:600 respectively. In examination of 407 serum samples from outpatient clinic applying the 3 methods simultaneously, the percentage of positive cases was found to be 2.2%, 11.3% and 13.3% respectively. It was shown that the reverse passive hemagglutination is the most sensitive but less specific, while the radioimmunoassay is less sensitive but more specific. When combined with specific inhibition test, the reverse passive hemagglutination test is a simple, sensitive and recommendable method for large scale screening for HBsAg carriers.