

改良 Citron 氏梅毒補體結合法

李在連

(山東醫學院細菌學科)

自從 Wassermann 氏 (1906) 首先應用補體結合反應作為梅毒血清學診斷試驗後對於梅毒的診斷與治療方面有了極大的幫助與貢獻；此後在抗原的製備上、各種材料的用量上、操作方法上，有了不斷的改進。常見的有：Citron, Eagle, Wyler, Browning, Hecht-Gradwohl, Kolmer, 等氏的方法，以及用純的心類脂質 (Cardio-Lipin) 製成抗原的方法，這些試法各有長處，也各具缺點，其中尤以柯氏 (Kolmer) 法採用最廣。

柯氏反應所用的抗原比較敏感，也是最早提倡用幾種稀釋的血清作試驗的，這樣就很容易的從血清的滴度方面找問題，對於臨床生物性假陽性反應的斷定，及梅毒病的治療上有所幫助。但因着抗原的敏感，假陽性反應相當的多；在許多情況下抗補體現象也比較常見。

Citron 氏補體結合反應，應用三種抗原，即含有胆脂素的牛心抗原，及不含胆脂素的牛心抗原 (B₁ 及 B₂)。這些抗原中，前者之敏感性強，後者的特殊性好；藉着各種抗原表現的各異，給臨床診斷上增加了一個有力的佐證。此外，可能因為補體濃度的關係，這種方法不易有抗補體的現象，並在血清的需用量與試驗總量方面都是比較小的，同時還能在當天得出結果。但是除了以上的長處之外，在原來的操作方法和步驟上尚存在不少的缺點，如血清量太少，不易掌握準確性，抗原多 (用三種抗原)，容易紛亂和沒有經常的採用定量法等缺點。這些缺點作者曾加以改良，並與謝少文教授改良的柯氏半量定量補體結合反應作了一些對照試驗，今將結果作初步報告，希望諸同道多多指正。

改良 Citron 氏補體結合反應

試劑的準備

1. 生理鹽水：配製 0.85% 緩衝生理食鹽水，滅菌後備用。

2. 羊血球：取無菌的脫纖維羊血，經洗滌三次後用緩衝鹽水配成 5% 懸液。
3. 溶血素：用無菌綿羊紅血球懸液，使家兔免疫後選取效價高者，取血分出血清，加化學純粹甘油經滴定後貯存冰箱中備用。
4. 補體：用無菌注射器自 3—6 隻，停食 4—5 小時未妊娠之荷蘭豬心臟，採取血液各 5—8 毫升，待凝成血塊後以玻棒切碎後置冰箱中析出血清後備用。
5. 抗原的製備：

(1) 用兩三個牛心，洗去血液，除去結締組織及脂肪，取心肌以絞肉機絞碎成細末，攤於玻板上以電扇吹乾後刮下，研磨成粉末。

(2) 秤取牛心粉 30 克置 250 毫升之三角燒瓶內，加無水醋酮 100 毫升，用塞塞緊，置室溫下經過 5 天，每天搖盪數次。

(3) 期滿後以濾紙過濾，棄去濾液，並將已脫脂之牛心粉涼乾。

(4) 將涼乾之牛心粉置一潔淨乾燥過之三角燒瓶內，加無水酒精 250 毫升，緊塞瓶口，置室溫或 22°C 孵箱中浸泡 10 天，每天搖盪數次。期滿後過濾，棄去牛心粉渣滓，收集牛心粉酒精浸漬液於一緊密之玻塞磨口瓶中，即為“牛心抗原”。

(5) 取上項製妥之“牛心抗原” 100 毫升，加純淨胆脂素 0.2 克，置 37°C 孵箱中過夜，待完全溶解後過濾備用，即為“胆脂素抗原”。本試驗的舊法製造抗原乃採用新鮮牛心肌酒精浸出液，方法雖然簡便，但所得之滴度往往較低 (1:10—1:20)。經過以上仿用柯氏法使用牛心粉加醋酮處理之後的酒精浸漬液，滴度則大為提高，敏感度亦大大增加。實際試驗時應用“牛心抗原”及“胆脂素抗原”兩種抗原製就後必須先經過滴定其結合力，以確定抗原的滴度。

溶血素之滴定：大致按照柯氏法，但溶血素祇用 0.1 毫升量，補體 2 單位也含在 0.1 毫升中，羊血球為 5% 的 1.0 毫升，並以鹽水 0.2 毫升補足總量使每管為 0.5 毫升。

補體的滴定：大致也和柯氏法相同，用 1:20 (或 1:10) 荷蘭豬血清 0.04—0.12 毫升加於第 1—8 試管中，以後每管各加溶血素 (2 單位) 0.1 毫升及 5% 羊血球 0.1 毫升。並加生理鹽水於各管中使總量成 0.5 毫升，搖勻，置 37°C 水浴箱中 1 小時後就觀察結果。凡能徹底溶解血球之最小補體量為一確定單位，實際試驗時用 2 單位含於 0.1 毫升中。

抗原的滴定：

1. 抗原溶血試驗及抗補體試驗：大致和柯氏法相仿。

2. 抗原力測定法：可採用定性法與定量法兩種，現介紹定量法於後：

(1) 按表 1 準備試管 6 個，於第 1 管先加生理鹽水 3.9 毫升，徐徐加入抗原 0.1 毫升使成 1:40 的稀釋度，然後繼續稀釋成 1:80, 1:120, 1:160, 1:240, 1:320 等濃度。

表 1 抗 原 的 稀 釋

試 管		1	2	3	4	5	6
抗 原	稀 釋 度	純	1:40	1:40	1:80	1:120	1:160
	量 (毫 升)	0.1	2	1	2	1	1
生 理 鹽 水		3.9	2	2	2	1	1
最 後 稀 釋 度		1:40	1:80	1:120	1:160	1:240	1:320

(2) 按表 2 稀釋 6 種濃度的血清，血清須選擇強陽性者。在每一個血清稀釋度中，加 6 種抗原，共 36 管。

表 2 血 清 稀 釋 法

試 管		1	2	3	4	5	6
血 清	稀 釋 度	純	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
	量 (毫 升)	0.3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
生 理 鹽 水		2.7	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
最 後 稀 釋 度		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
0.2 毫升內含有的梅毒血清		0.02	0.01	0.005	0.0025	0.00125	0.0006

(3) 另用兩個試管：一個僅加 0.2 毫升血清，不加抗原為血清對照。另一個不含血清及抗原，為溶血組對照管。

(4) 於以上 38 管中各加補體 (2 單位) 0.1 毫升。置冰箱 4 小時後取出，每管加羊血球及溶血素各 0.1 毫升，搖勻，置 37°C 水箱中水浴 15—30 分鐘後觀察結果，並記錄如下表：

表 3 抗原滴定法——反應結果及滴度之確定

稀 釋 血 清 (0.2 毫 升)	0.05 毫 升 抗 原					
	1:40	1:80	1:120	1:160	1:240	1:320
0.02	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.01	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.005	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0025	+	+	+++	++++	++++	±
0.00125	—	—	—	+	±	—
0.0006	—	—	—	—	—	—

(5) 能與最小量血清呈++++最強陽性反應的稀釋度的抗原，為最適宜的滴度，如有兩種稀釋度同得++++的結果，則採用其平均數。如上表所舉的例子該抗原的最適宜滴度為 1:160。

(6) 無論牛心抗原或胆脂素抗原均可採用以上的方法檢定抗原的最適宜滴度或單位。一般胆脂素抗原的滴度比牛心抗原滴度高。

本試驗舊法應用胆脂素抗原(C)，及牛心抗原(B₁, B₂)三種，因為牛心抗原(B₁, B₂)的反應結果是一致的，故只採取其一。在抗原製造方面，過去是用新鮮牛心肌浸漬液，滴度甚低，經過仿用柯氏法以醋酮處理後，滴度則大為提高；仿用柯氏法之原則改良抗原的滴定法，結果相當的滿意，準確性也易於掌握。抗原結合力的滴定尤以定量法更為合用。一般的滴度都相當高，故抗原溶血試驗及抗補體試驗可以省去。

實際試驗

(1) 將應試驗之病人血清放置 56°C 水箱中滅活半小時。

(2) 根據標本數量計算羊血球、溶血素、抗原、補體等需用量，妥為準備。

(一) 定量試驗

1. 血清稀釋法

(1) 沉澱反應陽性之血清須用試管 9 個，作定量試驗。將試管分成兩排，每排 4 個，其餘一個為對照管。

(2) 第 1 排之第 1 管加鹽水 0.9 毫升，第 2, 3, 4 管各加鹽水 0.4 毫升。

(3) 加血清 0.1 毫升於第 1 管，使成 1:10 之稀釋度，混和後取出 0.4 毫升加於第 2 管；0.2 毫升加於對照管，0.2 毫升加於第 2 排之第 1 管。

(4) 從第 1 排之第 2 管混和後取出 0.4 毫升加於第 3 管，並取出 0.2 毫升加於第 2 排之第 2 管。

(5) 再從第 1 排之第 3 管混和後取出 0.4 毫升加於第 4 管，並取出 0.2 毫升加於第 2 排之第 3 管。最後在第 1 排之第 4 管混和後取出 0.2 毫升加於第 2 排之第 4 管，並棄去 0.4 毫升。

(6) 稀釋結果每管均為 0.2 毫升，第 1 管含血清 0.02，第 2 管 0.01，第 3 管 0.005，第 4 管 0.0025，對照管含血清 0.02；第 2 排各管所含血清與第一排同。

2. 血清稀釋完畢，於第 1 排之各管加胆脂素抗原（最適宜滴度量）0.05 毫升；第 2 排之各管加牛心抗原（最適宜滴度量）0.05 毫升、對照管不加抗原。

3. 每管各加補體(2單位)0.1毫升。置冰箱中4小時,後取出加5%羊血球及溶血素各0.1毫升,搖勻,置37°C水浴箱中15-30分鐘後觀察結果。

表4 Citron 氏定量補體結合實際試驗表

試管 第1排	管 第2排	0.2毫升稀釋血清 (病人血清量)	抗 原		補 體 (2單位)	放 置	溶血素 (2單位)	羊血球 5%	37°C 水 浴 15-30 分 鐘 觀 察
			第1排 胆脂素抗原	第2排 牛心抗原					
1	1	0.02	0.05	0.05	0.1	冰 箱 內 4 小 時	0.1	0.1	
2	2	0.01	0.05	0.05	0.1		0.1	0.1	
3	3	0.005	0.05	0.05	0.1		0.1	0.1	
4	4	0.0025	0.05	0.05	0.1		0.1	0.1	
5(對照)	—	0.02	0	—	0.1		0.1	0.1	

(二) 定性試驗

1. 陰性血清除必要者外,只需作定性試驗,每份標本用試管3個,於第1管加入鹽水0.54毫升,血清0.06毫升,混和後吸出0.2毫升稀釋液加於第2管;再吸出0.2毫升加於第3管;使每管均含血清0.02毫升。

2. 於第1管加入胆脂素抗原(最適宜滴度量)0.05毫升,第2管加入牛心抗原(最適宜滴度量)0.05毫升,第3管不加抗原為對照。

3. 每管各加補體(2單位)0.1毫升,置冰箱內4小時後各加入羊血球0.1毫升,溶血素0.1毫升,搖勻,37°C水浴15-30分鐘後觀察結果。

表5 Citron 氏定性補體結合試驗表

試 管	0.2毫升稀釋血清 (病人血清量)	抗 原		補 體 (2單位)	置 冰 箱 4 小 時	溶血素 (2單位)	羊血球 5%	置 分 37°C 鐘	
		胆脂素抗原	牛心抗原						
1	0.02	0.05	—	0.1	小 時	0.1	0.1	水 後	
2	0.02	—	0.05	0.1		箱 觀	0.1	0.1	
3	0.02	0	—	0.1		15-30 察	0.1	0.1	

(三) 腦脊液定量試驗

1. 取試管11個,分兩排,每排5個,其他一個為對照管。

2. 第1排之第1管不加鹽水,第2管加鹽水0.4毫升,第3,4,5管各加0.6毫升;對照管及第2排各管均不加鹽水。

3. 取經過離心沉澱之腦脊液 0.3 毫升加於第 1, 2 排之第 1 管及對照管, 再取 0.8 毫升, 加於第 1 排之第 2 管。

4. 從第 1 排之第 2 管稀釋後取出 0.3 毫升加於第 2 排之第 2 管, 並取出 0.6 毫升加於第 1 排之第 3 管, 依次稀釋至第 5 管後棄去 0.6 毫升。

5. 稀釋結果, 每排之第 1 管含腦脊液 0.3 毫升, 第 2 管 0.2 毫升, 第 3 管 0.1 毫升, 第 4 管 0.05 毫升, 第 5 管 0.025 毫升, 第 6 管 0.3 毫升為對照。

6. 第 1 排之各管各加胆脂素抗原 0.05 毫升; 第 2 排各管加牛心抗原 0.05 毫升, 對照管不加抗原。

7. 每管加補體 0.1 毫升, 搖勻, 置冰箱內 4 小時後加溶血素 0.1 毫升及羊血球 (5%) 0.1 毫升, 置 37°C 水浴箱中 15—30 分鐘後觀察結果。

表 6 腦脊液定量試驗

試管	腦脊液		抗 原		補 體 (2單位)	置 冰 箱 中 4 小 時	溶血素 (2單位)	羊血球 5%	置 37°C 水 浴 箱 15—30 分 鐘
	第 1 排	第 2 排	第 1 排 胆脂素抗原	第 2 排 牛心抗原					
1	1	0.3	0.3	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	15—30 分 鐘
2	2	0.2	0.2	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	
3	3	0.1	0.1	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	
4	4	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	
5	5	0.025	0.025	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	
	0	0.3	0	—	0	0.1	0.1	0.1	

Citron 氏舊法之定量試驗比較煩雜, 一般均做定性試驗, 而且每一份標本使用 7 個管, 不甚合理, 也比較浪費材料與時間, 並在血清加入量上較難準確; 經過以上的改良之後採用 9 個管作為定量試驗, 3 個管作為定性試驗, 均用稀釋法, 這樣不僅節省材料及試管數, 使操作過程簡化, 並能顯著的看出陽性滴度的變化。此外, 腦脊液定量試驗方面亦用稀釋法結果也滿意。

(四) 結果判定

試驗結果依照溶血情形判定陰性或陽性程度, 補體全部結合毫未溶化血球者為++++; 補體毫無結合; 羊血球完全溶解者為陰性。對照管應徹底溶解, 如不溶解者即為“抗補體”, 不能判定結果, 應重做。詳細判定如下表:

表7 結 果 的 判 定 表

反應號	抗原	血 清				對 照	結 果
		第 1 管	第 2 管	第 3 管	第 4 管		
1	C	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	++++ ++++ +++	—	最 強 陽 性
	B	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	++++ ++++ +++	++++ +++ ++	—	
2	C	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	++++ +++ ++	+++ +	—	強 陽 性
	B	++++ +++ +++	+++ ++ ++	+++ ++ +	— — —	—	
3	C	+++ +++ ++	+++ ++ ++	+	— — —	—	中 等 陽 性
	B	+++ ++ ++	++ ++ +	— — —	— — —	—	
4	C	++ ++ +	++ ++ +	+	— — —	—	弱 陽 性
	B	++ ++ +	++ ++ ±	— — —	— — —	—	
5	C	+++ ++ +	++ +	+	— — —	—	疑 似 反 應
	B	± ± —	— — —	— — —	— — —	—	
6	C	—	—	—	—	—	陰 性
	B	—	—	—	—	—	

C=胆脂素抗原 B=牛心抗原

改良華氏反應 Citron 氏法與柯氏法之比較

改良 Citron 氏法，我們做了一些比較試驗；在 1045 份標本中，陽性陰性結果與柯氏法無何抵觸與不符之處。對於可以發生物性假陽性的某些病例，則較遲鈍，不易有假陽性結果，像這一類的標本，往往胆脂素抗原反應強，而牛心抗原反應弱或完全陰性。因着胆脂素抗原製造及胆脂素含量與柯氏有許多相同的地

方，試驗結果我們初步證明這種抗原的反應結果與柯氏法是一致的。此外，我們發現柯氏法抗補體現象較多，這種結果是否基於補體方面的問題，尚待研究。

表8 改良 Citron 氏法與柯氏法之比較

項 目	標本總數 試驗方法 反應結果	1045		
		柯 氏 法	改良 Citron 氏法	
			胆脂素抗原	牛心抗原
梅毒血清	強 陽 性	94	94	94
梅毒治療後	中 等 陽 性	26	26	26
	弱 陽 性	5	5	4
正 常 血 清	陰 性	900	900	900
非梅毒血清	弱陽性或疑似	20	20	0
抗補體情況比較	抗 補 體	29	8	8

總 結

1. 本文乃初步報告對於華氏反應 Citron 氏法進行改良的結果，並介紹本試驗的操作步驟與方法。

2. 華氏反應 Citron 氏法，本來應用三種抗原，即胆脂素抗原(C)，及牛心抗原(B₁, B₂)。因為兩種牛心抗原(B₁, B₂)的反應結果是相同的，故僅採取其一。

3. 過去本試驗的抗原製造是用沒有脫脂的新鮮牛心肌的酒精浸出液，所得的滴度很低，敏感性也差。經過改用牛心粉並以醋酮處理後的酒精浸漬液，不僅增加了滴度，也提高了敏感性。實際試驗時則採用加胆脂素的牛心抗原及不加胆脂素的牛心抗原兩種。

4. 在抗原滴定方面，舊法太簡，用量不當，而且僅為定性法。經過仿照柯氏法的原則改良後，後果極佳。

5. Citron 氏法的血清量極小，操作不熟練者易出錯誤，並且一般僅做定性試驗，基於這個缺點，加以改進為定量法，同時把定性法從7個管改為3個管，使操作簡化，材料省略。

6. 此外，在腦脊液的定量法，溶血素及補體的滴定法上都加以改良，使操作易於掌握，並提高準確性。

7. 本試法每管總量為 0.5 毫升，無論血清量及其他材料都用得比較省，能在 4 小時內得出兩種抗原的試驗結果。從 1045 份的標本與柯氏法比較試驗的結果證明，本試驗與柯氏法的反應結果相符，而且牛心抗原的特殊性較高，不易出假陽性反應。本試法也不容易產生抗補體現象。但是因為各種材料使用量較小的緣故，對於初次學習操作者是會有難處的，只要能細心和多次練習，這個困難是可以克服的。

8. 在梅毒血清試驗上，用兩種方法比僅用一種方法好，故在一種試法中採用兩種抗原，對於診斷的幫助可能是更大的。本試法之定量反應，對於經過治療之梅毒病者可以顯著的觀察到滴度的改變。除了先將與柯氏法比較結果作初步報告外，將繼續在病案分析方面，作更進一步研究，希諸同道指正。

本文承謝少文、黃翠芬、于復新教授的指正，特致敬意。

參 考 文 獻

- [1] 于復新：實驗診斷學。第 182—199 頁，1952。
- [2] John A. Kolmer, Approved Laboratory Technic, 2 ed. p. 669-698.
- [3] Gradwohl, Clinical Laboratory methods and diagnosis, Vol. II, p. 1794-1798.
- [4] 關孝：梅毒血清診斷操作法。防治醫學 1(6) 1951。
- [5] 謝少文、周輯五：林氏細菌學檢查法，1951。
- [6] 謝少文、林霞：免疫學在診斷上的應用。免疫學叢刊第二卷第一冊 1953。
- [7] 顧德鴻：實用臨床血清學檢驗法，P. 100—146，1952。
- [8] 朱德生：梅毒血清假陽性反應。免疫學叢刊，第八冊 1953。

A MODIFICATION OF CITRON COMPLEMENT FIXATION TEST FOR SYPHILIS

LI TSAI-LIEN

Department of Bacteriology, Shantung Medical College, Tsinan.

Citron complement fixation test for the diagnosis of syphilis has a wide application in actual practice. However, it possesses certain disadvantages: it employs a multiple of antigens, its antigenic titrations are far from exact, and the amount of serum used in each test is less than that can be handled with ease. Attempts have been made in the present modification to remedy these shortcomings, and a preliminary comparative study has been made with Kolmer complement fixation test in series. The results have been found satisfactory. It is hoped with further improvements and modification, this method may eventually be found of greater usefulness in routine laboratory practice.