

微量杀菌力试验用于流脑A群抗体测定

山东省潍坊市卫生防疫站

台学信 曹盛训 隋成秀 贺淑英 张乐臻

杀菌力试验是一种在补体参与下的免疫杀菌反应。杀菌抗体高低能较直接地衡量个体和人群的免疫水平。Gordon〔1〕1936年报告过血清对奈瑟氏菌的杀菌试验，Goldschneider〔2〕指出流脑病人发病前缺乏流行菌群的杀菌抗体。十几年来杀菌力试验已成为流脑病原学、流行病学及免疫学研究的重要手段之一。但国外限于B群和C群方面的报导较多，鉴于我国各地引起流行的菌群均为A群〔3〕，为此，建立简便易行的A群微量杀菌力试验，以适应大量人群血清抗体调查的要求和进一步为A群分型奠定基础将是十分必要的。现将试验方法与结果报告如下：

材料与方 法

一、菌株：流脑菌株“P”“S”“W”系南京市传染病院赠给的流脑患者A群菌株；流脑标准A群菌株(29018)来自卫生部生物制品检定所。流脑B群、C群菌株系从当地带菌者分离。上述各菌株均经明胶片法保存〔4〕，用前在血清肉汤中复活，卵黄双抗平板分离〔5〕后备用。

二、抗血清制备：参照Sippel法〔6〕，即以 5×10^8 /毫升A群流脑菌液，按下列方案注入已经予测无杀菌抗体($<1:10$)的家兔。第1、4天各静注死菌液(加入0.4~0.5%甲醛温箱中作用1~2小时，用PBS洗三次)0.5毫升。第8、11天各静注死菌液1毫升。第15、18、22、25天各静注活菌1毫升。末次注射后7~10天。经试血合格后放血，分离血清，分装小瓶冻结保存。用前融化 56°C 灭活30分钟备用。

三、流脑诊断血清：系自制A群、B群玻片凝集诊断血清。方法参照文献〔7〕。

四、流脑患者血清：系南京市传染病医院确诊为A群流脑患者的双份血清，在冰箱内已保存20个月，用前 56°C 30分钟灭活。

五、健康人群血清：来源于我市郊区健康人群各年龄组的耳垂血。血清密封于毛细管，冰箱保存，用前灭活。

六、补体：小于四周乳兔血清，经预测无自然杀菌抗体者混合，小量分装，冰盒内保存备用。为避免出现补体偏转现象，一般采用不加稀释的原血清。

七、稀释液：为Dulbecco氏PBS，简称“D”液，配制方法如下：

第一液：NaCl 8.0克，KCl 0.2克， Na_2HPO_4 1.15克， KH_2PO_4 0.2克， H_2O 800毫升。

第二液： CaCl_2 0.1克， H_2O 100毫升。

第三液： $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1克， H_2O 100毫升。

以上三液分别高压灭菌，冰箱保存。用时按上述比例混合。稀释菌液时加1%乳兔灭活血清。简称NRD液。

八、培养基：

1.血清肉汤：0.1%葡萄糖多胨牛肉汤，pH7.4，用前加1%灭活乳兔血清。

2.卵黄双抗琼脂：用前放孵箱烘干表面凝结水，以无菌玻片切割成四等份(或扇面)。

九、微孔有机玻板：以0.1%新洁尔灭浸泡30分钟，用无菌水洗净，再放入75%乙醇中浸泡30分钟，除去消毒酒精后，复以纯酒精脱水5分钟，倒掉酒精，放无菌容器内于 37°C 下烘干备用。

十、微型混和器：MM-1型，南通产品，供震荡培养用。

十一、流脑菌液制备：刮取平板过夜培养

物，接种于血清肉汤使呈微混，放CO₂袋中做震荡培养2~3小时。校正菌液浊度8亿/毫升，再以NRD作10⁻⁴~10⁻⁵稀释。即得5,000~10,000菌/毫升菌液。

十二、杀菌抗体测定：以D液用稀释棒在微孔板内对倍稀释。一般抗血清宜从1:100开始稀释，恢复期病人血清从1:10或1:20开始稀释，其他急性期和健康人群血清可加原血清于第一凹，从第二凹起作对倍稀释。使每孔含血清0.025毫升，依次加入一份稀释液，一份补体和一份菌液。同时做阳性、阴性对照和补体对照(补体一份、稀释液2份、菌液一份)。放37°C震荡30分钟。从每凹分别取样0.025毫升，滴加在1/4平板扇面内。均匀铺碟。每个稀释度铺碟两份。补体对照，阴性对照，每次均作两孔。共滴加四个扇面，放36°C CO₂环境下培养18~24小时，计数菌落求其平均数。

十三、结果判定：被检血清菌落数与补体对照比较，减少50%，则视为杀菌力试验阳性。显示杀菌力的血清最大稀释度即为该血清的杀菌滴度。

试验结果

一、微量杀菌力试验的敏感性：为观察杀菌力试验方法的敏感性，以三株A群流脑菌进行玻片凝集，试管凝集，间接血凝和微量杀菌力试验，分别测定了四份免疫血清的抗体滴度(表1)。

从表1可以看出微量杀菌力试验非常敏感，几何平均值约为间接血凝的37.4倍。

二、微量杀菌力试验的特异性：为观察微量杀菌力试验的特异性，以No.7抗血清，标准A诊断血清及B群诊断血清〔7〕，与6株A群、1株B群和1株C群菌株，作了交叉杀菌力试验，以观察其特异性(表2)。

从表2可知No.7抗血清对标准A群菌株(29018)，对患者A群菌株(P、S、W和孙株)和带菌者A群(腾株)，都是很敏感的。同时对于B群、C群菌株无群间交叉现象，说明是很特异的。常法制备的A群多醣体诊断血清和B群幼龄菌诊断血清，虽经保存近两年，结果仍显示具

表1 微量杀菌力试验敏感性比较

抗血清号	菌株	试验方法			
		玻片凝集	试管凝集	间接血凝	杀菌力试验
1	P	80*	160	400	12800**
	S	40	160	400	25600
	W	40	160	400	51200
2	P	80	320	800	25600
	S	80	320	1600	12800
	W	40	160	800	>51200
5	P	40	320	800	25600
	S	40	320	800	25600
	W	80	320	400	25600
7	P	80	640	3200	25600
	S	80	640	800	>51200
	W	80	640	800	51200
GMT		59.57	301.9	769.6	28732

*为血清滴度的倒数。 **杀菌抗体滴度计算，是以血清占反应混合物总量比例的倒数，乘以该血清的稀释倍数。

表2 杀菌力试验特异性

菌株	抗血清		
	No.7抗血清	标准A抗血清	B ₆ 抗血清
P(A)	25600	NT	NT
S(A)	>51200	3200	<20
W(A)	51200	NT	NT
29018(A)	25600	6400	<20
孙株(A)	25600	NT	NT
腾株(A)	25600	3200	<20
B群	<40	<40	640
C群	<40	<40	<20

“NT”表示未做

一定水平的群特异性杀菌抗体。说明了A群多醣体和B群幼龄菌都是能产生杀菌抗体的免疫原。这对于进一步开展流脑血清学和免疫学的研究具有实际意义。

三、流脑患者杀菌抗体水平调查：被检标本来自临床诊断为流脑病人的双份血清。首份血清一般于发病后1~5天采集，末份血清于发病后7~14天采集。血清保存冰箱20个月后作流脑A群微量杀菌力试验。

40例急性期血清中的37例(92.5%)杀菌抗体滴度<1:4(几何平均滴度<1:1)，即仅有7.5%杀菌滴度在1:4以上，此点与Gold-

schneider报导〔2〕的C群病人基线血清杀菌力滴度在1:4以上为5.6%很接近。在38例恢复期血清中的36例(94.7%)杀菌抗体呈四倍以上增长。杀菌抗体几何平均滴度为1:1240.8。而20个月前病人双份血清间接血凝的几何平均滴度依次为1:2.63, 和1:119.9。可见急性期血清杀菌抗体低于间接血凝, 而恢复期血清杀菌抗体则高于间接血凝10倍以上。如能以新鲜血清检测杀菌抗体, 显然还要超过这一数值。综上所述说明杀菌试验的敏感性优于间接血凝。

四、正常人群杀菌抗体调查: Goldschneider报导〔2〕, 人群的易感性与缺乏群特异杀菌抗体有关。为此调查正常人群杀菌抗体水平并比较其消长情况, 对流脑流行的预测将大有助益。我们采集252例郊区健康人群血清, 调查了流脑A群菌杀菌抗体(表3)。

表3 252例健康人群血清杀菌抗体水平

年龄组 (岁)	标本数	杀 菌 力		杀菌抗体 几何平均滴度
		阳性数	%	
2	18	4	22.2	1:1.4
3~4	25	8	32.0	1:1.5
5~6	99	26	26.3	1:1.62
7~8	36	10	27.8	1:1.88
9~10	16	11	68.8	1:3.14
11~12	19	9	47.4	1:3.45
>12	39	36	92.3	1:8.59

讨论与结语

一、免疫溶菌或杀菌可由下述方法完成〔8〕: 菌落计数法; 染色玻片上原生质球形成; 反应混合物浊度测定; 测压计检测细菌消耗的O₂; 计数标志细菌释放的³²P; 检测细菌释放出的酶, 以及 Muchel 的生物光度计测定法。但能直接反映出活菌数变化的首推菌落计数法。后者又以微量法经济方便, 适于大规模抗体调查, 易为基层接受。杀菌力抗血清含有“群”“型”两种杀菌抗体, 吸收掉群杀菌因子可供分型之用。七十年代已成功地运用到C群〔9〕、B群菌株分型〔10〕工作方面。在A群菌株方面的分型工作尚待开展。微量杀菌力试验,

是一种敏感而特异的方法, 尽管与间接血凝试验比较似乎略嫌麻烦, 但如能筛选好补体并严格按照程序操作, 结果的重复性是可以预期的。相信此法对于流脑菌株分型检定和从事简化杀菌力试验的研究将提供一个有用的基础。

二、从检测流脑患者双份血清结果可见, 流脑病人急性期血清缺乏杀菌抗体。恢复期血清杀菌抗体94.7%呈四倍以上增长。显然流脑患者发病前缺乏流脑A群特异性杀菌抗体, 发病后由于血清中杀菌抗体上升增强了免疫力, 这与文献报导相似〔2〕。

Goldschneider报导〔2〕新生婴儿血清50%以上杀菌抗体为1:4或超过1:4, 出生后不久血清效价迅速下降, 6个月至24个月达到最低水平。从24个月到12岁血清杀菌抗体百分率呈直线增长。12岁前, 血清流脑杀菌力与流脑发病率成反比关系。我们的结果也证实这一与年龄相关的免疫。正常人群各年龄组血清对流脑菌的杀菌力百分率与抗体几何平均滴度都随年龄增长而升高。这与文献〔2〕报导相似。成人组血清对流脑A群菌杀菌抗体滴度92.31%在1:4以上, 略高于文献〔2〕报导。按我市连续三年流脑发病率均维持在5/10万以下低水平, 可能与一般居民大年龄组有一定免疫水平有关。人群免疫力的消长决定了流脑发病与流行的可能性, 而人群易感性的积累为流脑发病与流行准备了先决条件。为此, 逐年检测本地区各年龄组对流脑流行菌群的杀菌抗体水平, 采取提高人群免疫力的措施, 将对控制流脑流行和减少发病有重要的意义。

(本文承胡真副教授审阅, 特此致谢)

参 考 文 献

1. Gordon J et al: J Path Bact, 43: 537, 1936.
2. Goldschneider I et al: J Exp Med, 129: 1307, 1969.
3. 耿贯一主编: 流行病学, 中册, 439~451, 人卫, 北京, 1979.
4. 潍坊市卫生防疫站: 中华医学检验杂志, 1(1): 9, 1978.
5. 潍坊市卫生防疫站: 脑膜炎球菌卵黄抗菌素培养基介绍, 内部资料, 1973.

6. Sippel JE et al: Infect Immun, 16: 623, 1977.
 7. 昌潍流脑协作组: 流脑免疫血清制备小结, 内部资料, 1978。
 8. Kwapinski JBG; Research in Immunochemistry and

Immunobiology, vol 1, p178-179, University Park Press Baltimore, 1972.
 9. Frasch CE et al: Infect Immun, 5(1): 98, 1972.
 10. Gola R et al: Infect Immun, 1(5): 479, 1970.

卵黄盐水保菌增菌对分离脑膜炎双球菌的观察

杨更发* 俞年生** 方国辉** 刘慧娟# 毛明旺#

近年来, 许多实验证明, 流脑菌对寒冷具有一定的抵抗力。1979年3月我们应用卵黄盐水保菌, 送检样品不保温, 进行两次重复培养检查流脑菌, 效果较满意, 现将结果报告如下:

材料与方 法

1. 卵黄盐水保菌液: 取新鲜鸡蛋用温水洗净外壳, 擦干后浸入75%乙醇中30分钟, 取出以无菌操作在鸡蛋两端各打一孔, 去蛋清, 将卵黄流入含有玻璃珠的无菌三角烧瓶中, 加入等量无菌生理盐水, 用力振摇, 打碎卵黄, 再加入双抗(使每毫升卵黄盐水含多粘菌素B25单位, 万古霉素3微克), 分装无菌试管, 每管1毫升, 置4°C冰箱保存备用。

2. 分离用培养基: 猪血水双抗培养基。

3. 采样及分离培养: 将蘸有无菌生理盐水的无菌棉拭子在受检者鼻咽腔涂擦两圈, 然后将棉拭浸入卵黄盐水保菌液, 送实验室, 用猪血水双抗培养基作分离培养, 5~10%CO₂环境18~24小时后观察菌落, 生化反应, 血清定群。棉拭子在第一次涂布平皿后, 仍插入卵黄盐水保菌液中, 在室温(12~15°C)中放置16~24小时后, 再按上法作第2次分离、鉴定。分别观察流脑菌的阳性检出率。

结 果

180份标本经两次分离、鉴定, 总阳检率为55%;

第一次阳检率为36.7%; 第二次阳检率为45%, 两者相比差异有显著性($X^2=3.843 P<0.05$)。

讨 论

一、近年来, 许多资料证明, 流脑菌自人体分离的菌株或实验室内保存菌株, 在有或无营养的条件下, 对寒冷均具有一定的耐受性。我们这次实验采用卵黄盐水不保温送检标本, 结果是满意的。因此, 我们认为: 对偏僻地区进行流脑菌分离时, 在标本当天不能进行分离培养的情况下, 可采用卵黄盐水保菌送检。

二、在流脑带菌调查中, 一般沿用直接在培养基上分离培养, 而采用卵黄盐水保菌16~24小时后再作分离培养的报导不多。本次实验用同一份标本当即分离后在12~15°C保存16~24小时, 再作分离比较; 直接分离阳检率为36.7%, 在气温12~15°C下, 卵黄盐水保存16~24小时阳性率为45%, 比直接分离培养的阳性率高8.3%。究其原因, 可能是保菌液中加入双抗, 具有杀死或抑制标本中杂菌生长的作用, 同时随放置时间的延长, 流脑菌生长繁殖, 提高了阳性检出的机会。

*浙江省卫生防疫站

**常山县卫生防疫站

#金华地区卫生防疫站