

# 反向血凝试验在流脑快速诊断上的应用

卫生部生物制品研究所

袁承德 董春明 连文远 苏万年 张国华 张玉刚 王际璋

自1956年Синицын用抗毒素致敏红血球检测细菌外毒素以来,迄今反向间接血球凝集(简称反向血凝)试验已广泛用于检测细菌、病毒、激素、肿瘤等抗原<sup>[1~4]</sup>,均证明是一种敏感、特异的微量抗原检测方法,它在流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)诊断上的应用,国外未见报导,国内自1975年以来有用抗血清或IgG致敏人“O”型红血球,检测流脑病例和带菌调查的报告<sup>[5, 6, 10, 11]</sup>。由于抗体致敏血球的制备在稳定性和敏感性方面还存在问题,至今未获得满意的解决。

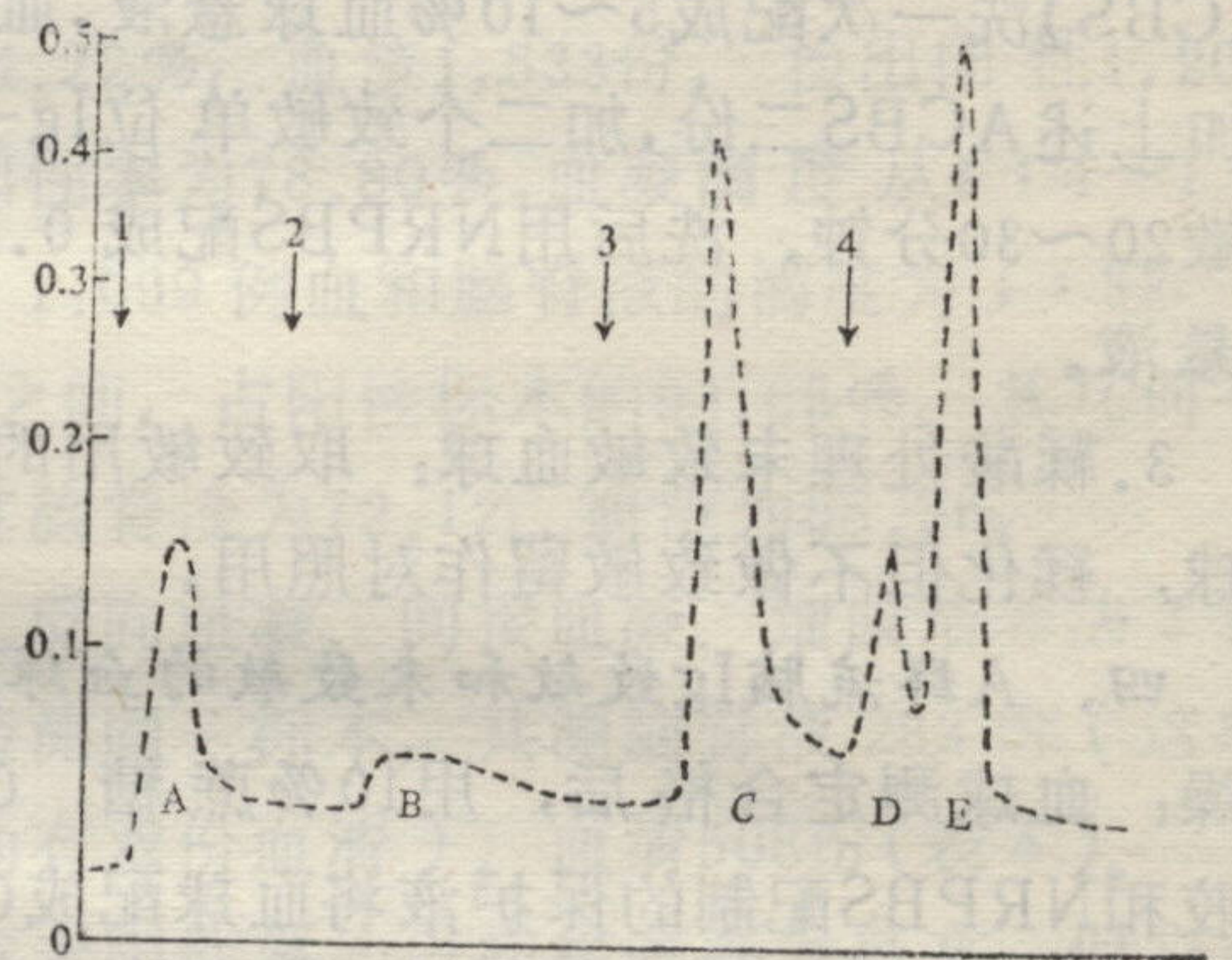
我们自1975年6月起用反向血凝试验检测A群流脑菌和可溶性抗原,经过5年来的研究和现场使用,证明本方法致敏的血球,在敏感性、特异性、稳定性方面均获得满意的结果。

## 材料和方法

一、流脑A群免疫血清的处理: 卫生部生物制品研究所(简称生研所)生产市售的9批A群流脑诊断血清及自己用几种方法制备的6批A群流脑抗血清。

按文献<sup>[3]</sup>: 硫酸铵提取免疫球蛋白方法,第一次改用50%饱和硫酸铵,第二次用46%饱和硫酸铵。硫酸铵二次提取的Ig,透析至沉淀溶解,用pH8.0 0.003M磷酸盐缓冲溶液(PB)平衡,参考Raynaeed法<sup>[7]</sup>将平衡好的Ig离心,取上清加到预先用同一PB平衡好的 $\phi 1.5 \times 47$ 厘米DEAE—纤维素层析柱中,用同一PB液流洗,流速为25~45毫升/小时,自动收集器收集,如附图。当在空体积中出现A峰,为第一梯度;换以pH8.0 0.005M的PB液流洗,出现第二梯度B峰;第三梯度,换含有0.02M NaCl pH4.4 0.05M的PBS流洗为

C峰;第四梯度换含0.5M NaCl pH4.0 0.1M的PBS流洗,出现D峰和E峰,有个别批号免疫血清还出现F和G峰( $\phi 1.5 \times 47$ 厘米层析柱,样品10毫升含蛋白质0.2克,箭头加缓冲液处)。



附图 A群流脑兔血清DEAE—纤维素层析柱流洗图

将各管流洗液分别用间接血凝<sup>[8]</sup>测定抗体滴度,A峰为1:32~1:64; B峰为1:16; C峰为1:32; D峰为1:2或<2; E峰可达1:256; 致敏戊二醛鞣酸化或双醛化血球,以A、B、C峰洗液为佳,E峰通常不易致敏上述血球,最后A、B、C峰合并和浓缩,加硫柳汞至1/万4°C保存备用。

在致敏血球时,将A、B、C峰洗液用60~65°C水浴加热激活30分钟,则大大提高致敏血球的敏感度。

二、致敏红血球的选择与处理: 筛选了人“O”型、绵羊、家兔和猴红血球,以绵羊红血球为最好,本文选用绵羊红血球处理步骤如下:

1. 戊二醛固定红血球的方法: 参考文献<sup>[4, 5]</sup>改用1%戊二醛PBS将压积血球配成5%血球悬液,于4~10°C作用50分钟。

2. 戊二醛-甲醛固定红血球(简称双醛化血球),其制备同文献报告方法<sup>[9]</sup>。



### 三、A群流脑Ig致敏红血球:

1. 按文献<sup>[6]</sup>方法改用pH7.2和6.4 0.006 M PBS鞣酸为1/3万。含0.5%正常兔血清(灭活吸收)的PBS(简称NRPBS),致敏中按1份2%鞣酸化血球加2~4份pH6.4 PBS,加1份2个致敏单位(蛋白质质量为0.1~0.5毫克/毫升)的Ig,致敏90~120分钟,致敏后用NRPBS配成0.5%的血球悬液。

2. A群流脑Ig致敏双醛化血球:参考文献<sup>[9]</sup>方法,取保存血球改用0.006M pH7.2 PBS洗三次再用0.05M pH4.0醋酸盐缓冲液(ACBS)洗一次配成5~10%血球悬液,血球一份加上述ACBS二份,加二个致敏单位Ig一份,致敏20~30分钟,洗后用NRPBS配成0.5%血球悬液。

3. 鞣酸处理未致敏血球:取致敏用的同批血球,鞣化但不做致敏留作对照用。

四、A群流脑Ig致敏和未致敏的血球冷冻干燥:血球测定合格后,用10%蔗糖,0.2%明胶和NRPBS配制的保护液将血球配成0.5~2%悬液,分装安瓶冷冻干燥(上述血球冻干后分别简称为干敏血球、未敏血球)。

五、干敏血球测定流脑抗原和病人标本的反向血凝法:试验用“U”型有机玻璃血凝板(6×12孔)和微量定量玻璃滴管(每滴0.025毫升)进行。

1. 干敏血球测定A群流脑多糖抗原或菌液抗原为生研所生产的多糖菌苗200~600微克/毫升,菌液为培养18小时的纯菌120亿/毫升。抗原或菌液用NRPBS作连续10倍稀释至 $10^{-15}$ ,顺序将各稀释度抗原或菌液,移入血凝板的各孔内,每孔0.025毫升,最后留2孔以NRPBS代替抗原或菌液作为对照。每孔各加0.5%干敏血球0.025毫升,混匀后置 $37^{\circ}\text{C}$ 1小时判定结果。

2. 病人标本的测定:标本来源于生研所1976~80年在8省市14个观察点对多糖菌苗流行病学效果考核的现场收集到的临床疑似或确诊流脑病人发病初期血液和脑脊液标本。新鲜脑脊液可不作处理,血液需分离血清, $56^{\circ}\text{C}$ 30分钟灭活及同批等量50%血球吸收或不作吸收。每一不吸收标本均以NRPBS倍比稀释二排“U”型孔,最后留一孔以NRPBS作对照,一排为试验组,每孔加入0.5%浓度干敏血球0.025毫升;第二排为对照组每孔加入0.5%浓度未致敏血球,放置 $37^{\circ}\text{C}$ 温箱1小时观察结果,以试验排滴度等于或高于对照排4倍为阳性。

## 结 果

### 一、实验室结果:

1. DEAE—纤维素层析加温处理15批A群流脑免疫血清致敏戊二醛和双醛化绵羊红血球

表1 DEAE-纤维素层析加温法处理流脑A群免疫血清所致敏的二种血球血凝滴度

	抗原稀 释 倍 数 的 倒 数															对 照
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	$10^{-14}$	$10^{-15}$	
戊二醛 固定血球	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±	—	—	—	—
双醛化 血 球	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±	—	—	—	—

球敏感性比较理想,结果如表1。

### 2. 干敏血球的特异性:

(1)干敏血球与其它群流脑菌的反向血凝:用纯培养的A、B、C、D群菌液与干敏血球作反向血凝试验结果,除A群呈阳性外,其它群

均为阴性。

(2)干敏血球与其它群流脑抗血清的反向血凝抑制试验:试验中应用灭活吸收的A、B、C、D群抗血清及正常兔血清;抗原为791-1批200微克/毫升,与干敏血球的试验结果见表2。



表 2

几种血清对干敏血球反向血凝滴度的抑制效果

血清种类	A群流脑多糖抗原稀释度之倒数												对	照	
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-12</sup>			
1:50 A群流脑免疫血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1:10 A群流脑免疫血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:10 B群流脑免疫血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1:10 C群流脑免疫血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1:10 D群流脑免疫血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1:10 正常兔血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
A群流脑菌液120亿/毫升	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
A群流脑多糖抗原200微克/毫升	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

(3)干敏血球与其它菌液的反向血凝试验:我们对肺炎双球菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、变形杆菌、流感杆菌、甲、乙型链球菌、其它奈氏菌和结核杆菌等纯培养菌液与干敏血球做反向血凝试验,结果为除与A群流脑菌呈阳性反应外,对上述可能引起细菌性脑膜炎的细菌均未呈现凝集。

3.干敏血球的敏感性:是以干敏血球测定A群流脑菌液和多糖抗原计算,其结果如表2所示,可检测到菌体30~300个/25微升,多糖抗原在0.005~0.0005微微克/25微升。

表 3 1975~79年干敏血球凝集滴度的稳定性

批号	保存不同时间的血球滴度					
	冻干前	冻干后	一年	二年	三年	四年
751025	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	/
76 <sup>-1</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>
7602	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>
771 <sup>-1</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	/
771 <sup>-2</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>	/
772 <sup>-1</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	/
772 <sup>-2</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	/
773 <sup>-1</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	/
773 <sup>-2</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	/
775 <sup>-1</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	/
781125	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	/	/

4.干敏血球保存试验:

如表3所示,该干敏血球在4°C条件下保存2年,其血凝滴度不变,保存3年略有降低。

二、现场使用结果:

1.5年来共检测流脑病人(临床确诊和疑

似病人)脑脊液623份,检出阳性587例,阳性率为94.22%;血液1,533份,检出阳性1,208份,阳性率为78.80%。血凝滴度从1:4~1:1024;1,099例血和脑脊液的滴度为1:32~1:256之间,占阳性标本的94.65%,其几何平均滴度脑脊液为72.12;血液为58.96。

2.反向血凝、间接血凝、细菌培养法3种方法检测同一标本,共测脑脊液283份(这些病人均有双份血清),血清508份(表4)。

三者阳性率均以间接血凝为最高,但它必需双份血清作比较,只能作追溯诊断,而反向血凝能作快速诊断,而且比细菌培养阳性要高,脑脊液的T值为8.84, P<0.01;血液的

表 4 三种方法检测同一病人标本的比较

	脑脊液	血液
	阳性份数(%)	阳性份数(%)
间接血凝	280(98.9)	504(99.2)
反向血凝	267(94.4)	396(78.6)
细菌培养	189(66.8)	232(45.7)
合计	283	508

T值为11.49, P<0.01;三者的符合情况,在细菌培养阳性的421份标本中2例反向血凝阴性,符合率为99.53%,二者均阳性的419份中,间接血凝3份阴性。其中2份脑脊液和血液同为一个人的,均为6个月内婴儿,其符合率为99.28%。

3.采样时间对反向血凝阳性率的影响:从



2156份血清和/或脑脊液中，选择发病和采样日期登记清楚和确切的1170例作统计列于表5。

表5 病人发病后采样时间对反向血凝阳性率的影响

标本类型	第一天		第二天		第三天		第四天	
	检查份数	阳性份数 %	检查份数	阳性份数 %	检查份数	阳性份数 %	检查份数	阳性份数 %
脑脊液	151	146 96.69	132	123 93.18	88	77 87.50	36	25 69.44
血液	362	287 79.28	203	151 74.38	135	93 68.89	63	25 39.68

发病3天内共检测脑脊液371份，阳性346例。阳性率为93.26%，与发病4天以上的阳性率比较T值3.06 P<0.01。检测700份血液，阳性531例，阳性率为75.86%，与发病后4天以上的比较T值5.68 P<0.01。

4. 正常人血清的反向血凝：

(1)对414份正常人血清试验，同一份血清用灭活吸收和不吸收处理，分别以干敏血球，未敏血球及兔敏血球（兔Ig致敏绵羊红血球）测定，灭活吸收后三者均为阴性，灭活不吸收者，有部分血清出现低滴度的非特异凝集。但比较干敏血球与后两种对照血球对同一份血清凝集滴度，差数均未超过4倍，所以全为阴性。它们的凝集发生率，分别为43.48%、42.03%和28.99%。几何平均滴度为1:2.33、1:2.22及1:1.77。三者的符合情况见表6。

表6 三种冻干血球检查414份正常人血清凝集滴度的符合情况

	①②③	①②	①③	②③	①②③
①A群致敏血球	相符	相符	相符	相符	均不相符
②未致敏血球					
③正常兔IgG致敏血球					
阳性份数	189	194	16	4	11
%	45.65	48.86	3.87	0.97	2.66

①②滴度一致的383份，符合率为92.51%；①③一致的205份，符合率为49.52%，其T值为15.33，P<0.01；①与③发生率或几何平均滴度相比，T值为4.39和4.97 P<0.01；结论是①②比①③近似，所以用未敏血球作为对照血球。

5.对反向血凝阳性的121份脑脊液及207份血清，用762批Ig做反向血凝抑制试验，结果被试的328份标本均被2个血凝单位的Ig所抑制，证实确为A群流脑病人。

6.对其他脑膜炎病人标本的反向血凝：对临床确诊和实验室证实的其他脑膜炎病人的血液或脑脊液标本与干敏血球的反向血凝试验，结果如表7，所检测的15例其他脑膜炎或脑炎病人标本全部为阴性。

表7 干敏血球检测其它脑膜炎病人标本的结果

病例	临床诊断	细菌培养	反向血凝	备注
丁××	化脑	凝固酶阴性白色葡萄球菌	—	
王××	化脑	凝固酶阳性白色葡萄球菌	—	
卢××	肺脑	肺炎双球菌	—	
刘××	化脑	"	—	
罗××	" "	流感嗜血杆菌	—	
陶××	" "	"	—	
张××	" "	奇异性变形杆菌	—	
周××	" "	"	—	
岳××	" "	大肠杆菌	—	
刘××	" "	"	—	
张××	结脑	结核杆菌	—	
徐×	" "	"	—	
孙××	乙脑		—	双份血清
李×	" "		—	补体结合
王×	" "		—	试验阳性

讨论与小结

本文介绍了用DEAE——纤维素层析提取A群流脑Ig66°C加热激活后致敏绵羊红血球冻干制剂，在临床上检测流脑疑似和确诊病人



血清标本1,523份,阳性率为78.80%;病人的脑脊液标本623份,阳性率为94.22%。

我们用过许多方法提取A群流脑免疫血清致敏红血球如:硫酸铵-胃蛋白酶消化加温法;免疫血清直接66°C加温激活法;硫酸铵粗提-DEAE纤维素层析-氯化铬法等;在其敏感性稳定性方面均不如DEAE——纤维素层析提取Ig66°C加热激活的方法。

用戊二醛固定绵羊红血球或戊二醛-甲醛固定绵羊红血球是一种比较理想固定血球方法,用A群流脑Ig致敏以上两种方法固定绵羊血球均能得到满意的结果。

本文测定414份正常人血清与绵羊红血球的非特异凝集。结果其凝集滴度低于1:16。有98.55%标本的滴度在1:8以下,而上述干敏血球阳性标本的滴度有94.65%在1:32~1:256;其影响不大可以设平衡对照或用干敏的同批血球吸收来排除。

干敏血球通过5年来保存试验,至少在4°C条件下保存2年,其敏感性与特异性不减,保存3、4年后滴度略有降低,但仍保持 $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$ 的水平。

应用这种干敏血球检测流脑菌和抗原,作

为临床实验室诊断的一种有效的辅助方法,由于干敏血球具有上述敏感、特异、稳定和重复性良好特点,以及保存期长,运输,使用方便,可以作制品生产供应,适合广大基层医疗防疫部门使用。

(本项实验工作承蒙我所米竹君、苏家媛等同志大力支持,特致谢意)

### 参 考 文 献

1. Сучков ЮГ: ЖМЭИ 8:63, 1965.
2. 祝龙彪等:丙酮醛、戊二醛处理的红血球用于鼠疫微量血凝试验方法介绍,内部资料,1974.
3. 北京生物制品研究所肿瘤组:北京肿瘤资料选编〈11〉, 1973.
4. 许健音等:微生物学报,16(2):148, 1976.
5. 医科院流研所流脑组等:快速诊断流行性脑脊髓膜炎的反向血凝试验,内部资料,1975.
6. 医科院流研所流脑组等:应用反向血凝诊断流行性脑脊髓膜炎的研究,内部资料,1975.
7. Raynaud M et al: Ann Linst past, 109:525, 1965.
8. Edwards EA: Proc Exp Biol Med, 126:876, 1967.
9. 北京生物制品研究所诊断用品室等:检测乙型肝炎表面抗原用反向被动血凝冻干血球的生产及临床应用,内部资料,1978.
10. 医科院流研所流脑组等:以反向被动血凝检查流脑A、B、C群抗原,内部资料,1979.
11. 济南市卫生防疫站:流脑(A群)反向血凝方法介绍,内部资料,1979.

## 重型松毛虫病与肾上腺皮质激素治疗

安庆地区人民医院内科 陈兆孝 胡志平

1979年秋,我省东至怀宁二县部分山区首次出现松毛虫病大批流行,当时曾有部分重症患者转至我院。我们试用了肾上腺皮质激素进行治疗,体会到应用肾上腺皮质激素治疗松毛虫病,对于减轻局部肿胀,缓解疼痛和改善症状效果显著。此后,我们在怀宁县大批集中治疗松毛虫病时,也再度证实激素有良好效果。在疼痛剧烈时,应用较大剂量的氢化考的松(100~200毫克/日)行静脉滴注,口服效果欠佳。俟疼痛减轻后,再以小剂量口服维持。待疼痛基本消失,即可停药。一般无不良反应,亦不影响肿块创口的愈合。经过将近一年的追访,尚未发现严重的后遗症。此外,我们观察到血沉与病情有密切的关系,局部肿

胀与疼痛剧烈时,血沉明显增快,而当肿胀减轻,疼痛缓解时血沉亦随之减慢,故血沉的动态观察可作一项衡量病情进展指标。激素的治疗维持到症状缓解,血沉基本恢复正常后,复发的可能性小。

当然,激素治疗不能否认综合治疗的重要性,葡萄糖液、葡萄糖酸钙及大剂量维生素C,对于排除毒素和改善症状可能都是必要的。给予蛋白合成激素(如苯丙酸诺龙等),以促进蛋白质的合成和增加蛋白结合钙在骨骼的沉积,也可能具有一定作用。至于抗菌素,一般认为并非必要。但对于高热、白细胞明显增多、或肿块破溃者,为预防继发感染,抗菌素的应用乃属必要。