

# 以微量杀菌试验测定流脑抗体初步报告

中国医学科学院流研所流脑研究室

目前国内普遍采用间接血凝试验测定病人、菌苗免疫前后以及正常人的流脑抗体水平,但该试验不能完全反映机体的免疫状况<sup>[3,4]</sup>,尤其健康人及菌苗接种后时间较久的人,间接血凝试验往往只能证明一部份人有低度的抗体存在,因此很需要更敏感的、完全地反映机体免疫状态的抗体测定方法。

杀菌抗体与相应的抗原(活菌)结合后,激活补体系统,导致细胞溶解、活菌死亡。这种反应比较符合机体对侵入的流脑菌的实际免疫状况,因此过去有人采用了杀菌试验,但由于方法繁琐,结果不太稳定,限制了它的广泛应用。我们采用微量法杀菌试验<sup>[5,6]</sup>,测定了一部份正常人及病人的抗体水平,探索了影响试验的一些主要因素,取得了较好的结果,现报告如下。

## 材料和方法

一、菌种:流脑A群菌(编号79146),自病人脑脊液分离,作为试验的靶菌。据对20多株A群菌比较,同一免疫血清对各菌的杀菌滴度是相似的。B群菌(29022)和C群菌(29025)系检定所分发的标准菌株。

二、稀释液:0.01M的磷酸盐缓冲盐水,pH7.2,高压灭菌后每100毫升加灭能家兔血清1毫升、万古霉素500微克、硫酸抗敌素2.5毫克,4°C冰箱保存,使用一周左右。此液可防止血清标本中和操作中污染杂菌的生长。

三、补体:用3~4周龄至2~3月龄的家兔血清。先采每只兔子耳静脉血约1毫升,测其原血清的自然杀菌活性及补体活性,方法与正式试验中的阳性血清对照、补体对照和细菌对照相同。次日将无自然杀菌活性及有良好补体活性(阳性血清达到原有杀菌滴度)的兔子采心血或放血分离血清,混合后小量分装,

-20°C以下冻存,至少可用20天。

四、滴定板:用做血凝试验的有机微滴板,面上加一块同样大小的普通玻璃作盖板,放烤箱80°C 2小时后备用。试验完毕时可用约80°C热水泡一小时(以不用消毒剂泡为妥),洗净烤干后再用。

五、试验菌液的准备:挑取巧克力培养基上生长12~16小时的2~3个菌落,密涂于另一巧克力平皿约1/4区内,37°C烛缸培养5~6小时,刮取少量菌苔混悬于约3毫升稀释液中,使呈轻度均匀混浊,取约2毫升于72型分光光度计测其OD值(波长540毫微米,0.5厘米比色杯)。要求菌液的OD值在0.10~0.50之间。根据菌液OD值与活菌数呈正比关系,将菌液稀释成OD值0.10,然后再作50,000倍稀释,即为供试菌液,每毫升活菌数约为7,000个。制备时,菌液管及稀释管均应置冰水中,以防室温较高时活菌迅速减少。

六、杀菌抗体测定:于微滴板每孔加1滴稀释液(每滴为0.025毫升,下同),每排第一孔加1滴待检血清,用灭菌稀释棒自第一孔起作连续倍比稀释。然后自低温冰箱取出补体,于37°C水浴中摇动速溶,每孔加1滴。再于每孔加1滴稀释好的菌液(含100~200个活菌),置微型振荡器上,放入37°C温箱低速振荡30分钟,取出,每孔加2滴已溶化冷至45°C左右的肉汤琼脂(pH7.4,琼脂量为1%)。临用前加氯化三苯四氮唑水溶液使其在肉汤琼脂中的量为0.01%)。37°C烛缸培养15~20小时观察结果。每次试验需同时做一、二排已知滴度的阳性血清对照(阳性血清不得有防腐剂);数孔补体对照(稀释液、补体、菌液各1滴,复查补体有无杀菌作用)和细菌对照(稀释液、灭能兔血清、菌液各1滴,细菌应能良好生长)。判断结果时,补体和细菌对照孔均应有相似的较多

红色点状小菌落，阳性血清对照达到原有的滴度，说明试验正常，即可记录各排的结果。以无菌生长或菌落比补体对照少70%以上为杀菌阳性，这样的最大一个稀释度为终点。

七、间接血凝试验：按常规进行。致敏血球系北京生研所供应，批号801。所有做间接血凝试验的血清标本均同时做杀菌试验，以资比较。

## 结 果

一、杀菌试验的敏感性：表1、2、3说明，杀菌试验比间接血凝试验敏感得多。间接血凝

试验证明学龄前小儿约只有40%的人有低度的抗体，中小学生和成人也只有60~70%的人有抗体，而杀菌抗体则分别为70%、85%和100%。再从两个试验的比较来看(表2)，杀菌试验阳性，间接血凝试验阴性或杀菌抗体滴度比间接血凝滴度高四倍以上的占76%，而杀菌滴度比间接血凝低或两者相等的均很少，不超过2%。

抗B、C群菌免疫血清对A群菌的杀菌滴度分别为1:32和1:16，抗A群菌免疫血清对B、C群菌的杀菌滴度均为1:4，表明杀菌试验的特异性也是比较好的。

表1 北京地区人群对A群流脑菌的抗体水平①

	24天~5岁		5+~10岁		10+~15岁		16岁以上		合 计						
	例数	阳性② 率%	GMT③	例数	阳性率 %	GMT	例数	阳性率 %	GMT	例数	阳性率 %	GMT			
间接血凝试验	57	42.11	1.69	117	58.97	2.05	57	57.89	2.00	35	71.43	2.59	266	56.77	2.04
杀 菌 试 验	57	70.18	5.04	117	86.32	8.90	57	85.96	10.21	35	100	18.75	266	84.57	8.95

①血清标本来源为健康者及非流脑患者，并统一以血清稀释度计算抗体滴度。下同。②血清稀释度1:2及以上阳性者定为阳性。③GMT为几何平均滴度。

表2 266份血清的杀菌试验与间接血凝试验敏感性比较

杀 菌 试 验	+	-	+	-	滴度	杀 菌	杀 菌	杀 菌
间接血凝试验	+	-	-	+	相等	高二倍	高四倍	杀菌 高八倍 及以上
例 数	147	37	78	4	4	20	51	72
%	55.26	13.91	29.32	1.50	1.50	7.52	19.17	27.07

杀菌试验测定病人抗体的结果和间接血凝结果比较一致。都能证明病后抗体明显上升，只是杀菌抗体的滴度更高(表3)。这次检查的

急性期病人血清标本中，有一部份的抗体滴度较高，可能与发病日期不能确切掌握，有的病人发病可能已超过三天有关。

表3 流脑病人的抗体滴度分布

病期	试 验	例数	抗 体 滴 度 (倒数)												GMT	
			<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		4096
急性期*	间接血凝试验	71	24	3	22	14	5	2	1	0	0	0	0	0	0	3.39
	杀 菌 试 验	71	27	4	4	1	6	13	4	5	5	1	0	1	0	8.82
恢复期	间接血凝试验	61	0	0	2	8	15	18	13	3	2	0	0	0	0	32.47
	杀 菌 试 验	61	0	0	0	0	1	2	5	1	7	16	12	11	6	607.15

\*根据主诉，发病三天内者列为急性期。

二、靶菌菌量和补体活性对杀菌试验的影响：表4、5说明，微量杀菌试验的结果与使用的菌量及补体活性关系很大，根据实验结

果，以使用每毫升约7,000个活菌的菌液和新鲜或-20°C冻存的补体，试验的灵敏度和重复性比较好。

表 4 杀菌抗体滴度与靶菌菌量的关系

每孔所加的 活菌数	家兔免疫血清		病人恢复 期血清		健康成人 血清	
	抗 A (29018)	抗 A (29019)	18号	26号	4号	3号
5,000~10,000	1600*	1600*	1280	640	32*	4
500~1,000	3200*	1600	1280	1280	64*	8
100~200	12800	3200	2560	2560	64	128
10~20	N	N	N	N	N	N

N: 菌落数太少, 不能判定结果。\*有前带现象, 免疫血清在1:400以前, 健康人血清在1:4以前。

## 讨 论

据国外报导, 对流脑的易感性与可检出的血清杀菌抗体缺少有关<sup>[1, 2]</sup>。北京地区人群的流脑抗体水平以杀菌抗体来看, 要比间接血凝的高得多(表 1), 而该地区的流脑发病率是比较低的, 因此杀菌抗体水平可能更好地反映了当地人群的实际免疫状况。

微量杀菌试验不需要特殊的仪器设备和试剂, 不需要纯化的抗原, 不必对血清标本事先

表 5 补体稀释及不同保存条件与杀菌滴度的关系

	未稀释 补体	稀释补体			-20°C(天)			普通冰箱冻盒(天)				4°C冰箱(天)			
		1:2	1:3	1:4	1	2	20	1	2	3	4	1	2	3	4
A群菌免疫血清1	12800*	12800	3200	1600	12800	12800	12800	6400	6400	6400	1600	3200	3200	3200	1600
A群菌免疫血清2	1600	1600	400	400	1600	1600	1600	1600	800	800	400	800	400	400	200
健康成人血清1	16	16	2	—*	16	16	8	8	16	16	8	8	2	2	2
健康成人血清2	8	4	—	—	8	8	8	8	4	4	—	2	—	—	—
病人恢复期血清C17	1600	800	400	200	1600	1600	1600	1600	800	800	800	800	400	400	400
病人恢复期血清C11	800	800	200	<200	800	800	800	800	800	800	400	400	200	200	200

\*血清滴度的倒数; 一为1:2阴性。

作吸收等处理, 尤其是用细菌生长指示剂氯化三苯四氮唑的显色反应取代繁琐的菌落计数后, 操作大为简化, 节省人力物力和时间, 每天可以检查更多的标本, 因此这个试验具有敏感、特异和简便的优点。我们认为, 通过测定流脑杀菌抗体来了解人群免疫水平和菌苗免疫效果是国内目前流脑监察工作中较好的实验室手段。

微量杀菌试验与所用的活菌数和补体活性关系很大。细菌数量太大, 会使抗体滴度呈现下降; 而活菌数太少, 则难以判断结果(表4), 所以要固定操作方法, 把活菌数控制在一定的范围内, 这一点实际上不难做到。同时, 凡对流脑菌正常生长不利的因素如培养基pH不合适、微滴板沾染某些消毒剂(如新洁尔灭)等均需注意避免。另一方面, 补体质量是影响抗体滴度的关键因素。勉强使用带有一部份自然杀流脑菌活性的补体, 等于使用减少了菌量的试剂。而补体活性下降, 则会出现如同抗体滴度下降的情况。因此准备补体的过程中要快速、保冷、

容器清洁和不得反复冻融, 避免一切可能导致补体失活的因素。近来我们试验对没有自然杀菌活性的家兔单独喂养, 需用补体时临时采血分离, 不冻结, 当天使用, 补体活性很好。据每周抽耳血测定, 在20天内没有出现自然杀菌活性。

待检血清灭能与否, 对抗体的滴度影响不大。但如稀释液中不加双抗, 则不灭能的血清中可能因有的血清污染杂菌而出现假阴性结果, 因此还是以试验前灭能为好。如稀释液中加入有双抗, 一般不存在杂菌生长的问题, 所以可不灭能。

## 结 语

本文介绍了一个简化的微量杀菌抗体测定法。本法在抗体检出和抗体滴度方面都比间接血凝试验更为敏感。本法以细菌生长指示剂的显色反应取代菌落计数, 使操作简化; 通过控制菌量和补体活性, 使出现的结果相当稳定, 因而此方法可望在流脑监察及流行预测工作中

推广应用。

(陈策整理)

(本工作承刘秉阳教授及卫生部药品生物制品检定所丁绍卿主任指导帮助、山东潍坊市防疫站台学信技师介绍宝贵经验,于此一并致谢)

### 参 考 文 献

1. Goldschneider I et al; J Exp Med, 129: 1307, 1969.

2. WHO Technical Report Series, 588, 1976.

3. Monto AS et al; J Infect Dis, 127: 394, 1973.

4. Artenstein MS et al; J Infect Dis, 124: 277, 1971.

5. Ambrosch F et al; BWHO, 56: 787, 1978.

6. WHO Technical Report Series, 594: 72, 1976.

## 本刊重要启事

为适应我国科学技术发展的需要, 1980年全国流行病学学会在哈尔滨开会时提出创办《中华流行病学杂志》。其后, 中华医学会与中国医学科学院流行病学微生物学研究所协商, 并经双方同意, 拟自1981年起将《流行病学杂志》改名为《中华流行病学杂志》, 向国内外公开发行人。

在工作关系上采取由医学会委托流研所负责编辑出版《中华流行病学杂志》。

中华医学会以(80)会编字218号文报请卫生部, 卫生部于1980年12月17日以(80)卫宣字第25号文批复, 同意将流研所《流行病学杂志》转为中华医学会所属, 并改名为《中华流行病学杂志》, 向国内外公开发行人, 仍由流研所负责编辑出版。

因为时较晚, 北京报刊发行局来不及向全国邮局通知改变刊名, 故拟定1981年第1、2两期仍以原刊名发行, 从第3期起改为《中华流行病学杂志》。

特此敬告读者。

《流行病学杂志》编辑部

1981, 1, 10.