

麻疹被动血球凝集试验方法的建立及初步应用的研究

张荣珍¹ 王佩珠² 武士珍¹ 李忠亮² 张淑琼² 张兰香¹ 张东¹

提要 在建立麻疹被动血球凝集试验方法中,对抗原制备的条件、致敏血球的稳定性、敏感性及特异性等方面进行了研究。实验证明,单纯超声处理未浓缩抗原,产量高,在4℃条件下保存6个月效价不变;制备的致敏血球效价稳定,批间差异小、敏感性好、特异性强,冻干致敏血球能长期保存。经与血球凝集抑制试验法同时测定354人份健康儿童血清,其麻疹抗体GMT分别为26.20和13.92,两法相关系数为0.81,具有高度相关性。

关键词 麻疹 被动血球凝集试验 抗原制备

麻疹抗体的测定,目前广泛使用的血球凝集抑制试验(HI)方法虽具有特异性强、敏感性较好的优点,但由于试验中必须采用猴血球,因而给推广使用造成了困难。为了建立便于基层推广应用的方法,我们进行了麻疹被动血球凝集试验方法的研究。

被动血球凝集试验(PHA)已广泛应用于微生物学及免疫学领域^[1],证明它是一种简便、敏感、特异的方法。1977年戴斌等^[2]及1985年周曾敏等^[3]曾作过该法的研究,虽取得了较好的结果,但因某种原因均没能推广使用。我们采用超声不浓缩抗原致敏鞣化醛化的绵羊血球,并制成冻干制品,经初步应用,效果良好,现报道如下。

材料及方法

一、细胞与毒株:细胞采用vero传代细胞,毒株为L₁麻疹标准株,中国药品生物制品检定所提供。

二、阳性对照血清:收集麻疹恢复期病人血清,经醛化血球吸收后,又经数次测定,标定出PHA效价,分装安瓶,每支0.2毫升,冻干后保存(4℃),作为正式试验时的阳性血清对照。

三、待检血清:系从四川各地收集的各年龄组健康儿童血清及麻疹免前儿童血清。

四、抗原的制备:

1.浓缩抗原的制备:将L₁麻疹毒种适量接种在长成单层的vero细胞中,两天后换细胞维持液继续培养(此维持液不含牛血清),待细胞病变达Ⅲ~Ⅳ时,用灭菌生理盐水洗涤3次,再加入1毫升生理盐水,在-30℃冻融3次,离心除去细胞碎片后,经频率20KHZ、振幅10微米,超声15分钟,加入NaN₃,最终浓度为1%,放4℃备用。

2.未浓缩抗原的制备:基本方法同上,待细胞病变达“Ⅲ”时继续培养,直至约有50%细胞脱落时,收获、冻融、离心及超声处理,4℃保存备用。

用同样方法制备正常细胞抗原。

五、致敏血球制备:

1.血球醛化:采集的新鲜绵羊血球,按参考资料^[4]的方法计算血球容积,算出血球量,用生理盐水洗4次,以0.15M pH7.2PBS配成4%羊血球悬液,按最终浓度为0.4%逐滴加入预冷的2.5%戊二醛液,室温下搅拌1小

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

2 四川省卫生防疫站

时,生理盐水洗4次,蒸馏水洗一次,最后用生理盐水配成10%的血球悬液,加1%NaN₃,放4℃备用;

2.醛化血球鞣化及致敏冻干:取一定量醛化血球用生理盐水洗2~3次,配成2%血球,加入等量1/2万鞣酸,使血球鞣化。1份鞣化血球加入1份抗原,再加入3份pH6.4的PBS,混匀后,放37℃ 30分钟后,用生理盐水洗2次,再用1%兔血清盐水洗1次,用血球保护液(5%兔血清,10%蔗糖盐水)配成5%致敏血球,分装安瓶,在-60℃预冻后,真空抽干,放4℃备用。试验时每安瓶加入1%兔血清盐水5毫升,即为1%致敏血球悬液。

六、正式试验:将待检血清56℃ 30分钟灭活,按原倍血清加等量10%醛化血球,放4℃过夜或37℃ 1小时,上清即为吸收过的1:2倍稀释的血清。然后在微量凝集板上(V型)作倍比稀释,稀释从1:2到1:1024,每孔内含0.025毫升稀释血清再加1%致敏血球0.025毫升,充分振荡后,37℃ 1小时判定结果。血球下沉集中呈一光滑圆点者为阴性“-”;全部血球形成薄层分布于孔底,中央无圆盘状痕迹者为“+++”;血球形成薄层、边缘呈锯齿状者为“++”;呈清晰更薄的一层沿孔边向上延伸,部分血球集中于孔底中央呈圆盘状者为“+”;血球形成致密的圆盘状偶而见到片状凝集血球为“+”。结果的判定以“++”定为终点滴度。

同时设下列对照:

1.致敏血球对照:稀释液0.025毫升加1%致敏血球0.025毫升,结果应不凝集;

2.阳性血清对照:用已知滴度的阳性血清,按PHA相同方法稀释血清,其阳性血清滴度不能相差±1个滴度;

3.待检血清对照:1:2待检血清0.025毫升加1%正常细胞抗原致敏的血球0.025毫升,结果应不凝集。

结 果

一、抗原制备条件的研究:

1.两种不同方法制备的抗原效价的比较:制备了浓缩抗原8批和未浓缩抗原8批,分别测定其效价。结果浓缩抗原平均滴度为1:94.70,未浓缩抗原平均为1:101.30。后者平均滴度略高于前者,且浓缩抗原稳定性差,保存数天后滴度迅速下降,甚至测不出效价。而未浓缩抗原至少可保存半年,同时产量比浓缩抗原高10倍。故全部试验均采用未浓缩抗原。

2.保存温度与时间对抗原效价的影响:用两个批号的抗原,每批抗原分装若干小试管后分别保存在4℃和-20℃,在不同时间即当天、30、90和180天各取出1支,测定其效价。结果在4℃保存的两批抗原效价保持不变。而保存在-20℃的抗原,一个月后效价则下降,到1个半月时基本测不出效价。

3.应用不同方法处理抗原效价的比较:采用三种不同方法处理两个批号的抗原,即单纯超声处理、Tween-Ether(简称T-E)处理及超声+Tween-Ether处理。结果以超声处理的抗原最好,不但效价高而且无非特异性凝集或不明显(表1),方法也简单。

表1 应用不同方法处理抗原效价的比较

处理方法	1号抗原		2号抗原	
	效价	非特异性	效价	非特异性
超声15分钟	1:112	(-)	>1:64	(±)
T-E	1:64	(±)	1:32	(+++)
超声+T-E	/	/	1:56	(+++)

4.抗原非特异性凝集的处理:用10%的醛化血球与等量抗原混合,放4℃过夜或37℃ 1小时,上清即为吸收过的1:2稀释抗原。然后将吸收前后的抗原分别测定其效价,结果经醛化血球吸收后的抗原效价略有下降(吸收前为>1:1024,吸收后为1:256),而非特异凝集现象却被消除了。

二、致敏血球的稳定性:

1. 同一批抗原不同时间致敏血球 PHA 效价的比较: 将同一批抗原保存在4℃, 在不同时间致敏醛化血球, 用同一份血清测定 PHA 效价, 结果不同时间即当天、15、30、60和 180 天致敏的血球, PHA 效价基本一致 (1 : 64~1 : 128)。

2. 不同批次抗原分别致敏血球 PHA 效价比较: 为了观察不同批次抗原致敏血球的稳定性, 制备了7批抗原, 分别致敏血球, 用同一份血清测定 PHA 效价, 结果制备的7批致敏血球, 效价均在1 : 64~1 : 128之间, 差别不大。

3. 致敏血球冻干前后效价的比较: 为了测定冻干致敏血球的稳定性及冻干对致敏血球有何影响, 共冻干6批致敏血球, 用2份麻疹阳性血清分别测定冻干前后 PHA 效价, 结果冻干前后效价基本相同, 波动不超过一个滴度。说明冻干对致敏血球无影响 (表2)。

表2 致敏血球冻干前后PHA滴度比较

冻干致敏 血球批号	阳 性 血清号	冻干前 PHA滴度 (1:)	冻干后 PHA滴度 (1:)
1	1	64	64
2	1	64	64
3	1	128	64
4	1	128	64
5	2	1024	2048
6	2	2048	2048

4. 冻干致敏血球保存时间观察: 把冻干致

表3 PHA 试 验 特 异 性 检 验

	阳 性 血 清 稀 释						
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
加入1 : 4 麻疹抗原	+++	++	±	—	—	—	—
加入1 : 40麻疹抗原	+++	+++	+++	++	—	—	—
未加麻疹抗原	+++	+++	+++	+++	++	—	—

五、HI与PHA测定健康人群血清中麻疹抗体结果比较: 收集354人份健康人群血清, 经56℃ 30分钟灭活, 并经10%醛化血球吸收后,

敏血球保存在4℃ 下, 不同时间即当天、30、90、180和210天取出, 用同一份血清测定效价, 连续观察7个月效价基本没有发生变化(均为1 : 512)。

5. 冻干致敏血球稀释后在4℃ 下保存时间的观察: 将冻干致敏血球用1%兔血清盐水稀释后, 放4℃ 保存, 分别在不同时间即当时、1、3、5和10天, 用2份血清测定PHA滴度, 结果保存至第7天时, PHA效价基本没有变化, 两份血清效价波动在1 : 32~1 : 64和1 : 512~1 : 1024之间。保存到第10天因血球悬液被污染, 出现自凝不能使用。上述结果说明稀释后的致敏血球, 在4℃ 条件下, 至少可保存7天。如果不污染可能更长。

三、PHA试验的特异性检验: 为了证明被动血凝反应为麻疹的抗原抗体特异性反应, 用被动血凝抑制试验作了验证。方法是先将麻疹阳性血清做倍比稀释, 然后分别加入1 : 4及1 : 40麻疹抗原, 放37℃ 作用30分钟, 同时与未加麻疹抗原的血清进行比较, 结果血清中PHA效价随着加入麻疹抗原浓度的增加而抑制凝集效价的倍数也增大, 其分别抑制凝集效价为8倍和2倍 (表3)。说明该反应是特异的。

四、PHA试验重复性检验: 用同批致敏血球, 前后两次分别与三份麻疹阳性血清进行试验, 每份血清平行做三排, 结果3份血清两次结果基本一致 (表4)。说明PHA试验重复性好。

分别用HI 和 PHA两法同时测定血清中麻疹抗体, 结果见表5。

从表5可见, PHA方法总的GMT比HI的G

表4 PHA试验重复性检验

血清号	第一次PHA滴度			第二次PHA滴度		
	1*	2	3	1	2	3
86	512	512	512	256	256	256
124	512	512	512	512	512	512
101	32	32	32	32	32	32

* 每份血清平行做三排(1, 2, 3)

表5

PHA与HI二种方法检测健康人血清结果比较

试验方法	血清份数	血清稀释(1:)										GMT
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
HI	354	81	23	13	11	36	64	85	39	2	0	13.92
PHA	354	65	18	9	20	28	43	62	38	32	39	26.20

 $r=0.82$ $P<0.001$

进一步证明PHA比HI敏感。

讨 论

被动血凝试验是一种快速、敏感的血清学方法,已广泛应用在微生物学及免疫学领域,但还存在不足之处。主要是不同批次制备的致敏血球,在敏感性和稳定性方面不能达到全部一致。其次是存在非特异性现象。因而影响了此方法在某些疾病中的应用。我们在建立麻疹被动血凝试验时,针对上述问题进行了摸索,并得到了较好结果。

制备高效价并具有相当纯度的麻疹抗原是解决致敏血球敏感度和非特异性一个重要问题,我们试验初期采用浓缩抗原的方法,在试验中发现,用此法制备的抗原性能极不稳定,效价在短期内迅速降低,甚至消失,而且非特异现象严重。这可能与抗原经10倍浓缩后,细胞成分增多,影响了抗原纯度有关。因此,改用不浓缩的方法制备抗原,不但产量提高了10倍,抗原中的细胞成分也相应减少,而且抗原性稳定,能够在4℃条件下长期保存。在4℃保存6个月的抗原,无论它自身的效价或用它

MT高近2倍。说明PHA比HI敏感。两种方法相关系数为0.82,经显著性测定, $P<0.001$,说明两法具有高度相关性,PHA方法可以代替HI。

在354份血清中,HI<1:2的81份,但PHA却尚有19份阳性,抗体滴度分别为1:2的6份,1:4的3份、1:8的4份、1:16的1份、1:32的3份及1:64的2份。说明HI阴性血清并不完全意味着体内无麻疹保护性抗体,同时也

致敏醛化血球后测定PHA效价,均无明显变化,且非特异性凝集极少出现。

抗原浓度是影响致敏血球敏感性和稳定性的重要因素。抗原浓度小,其致敏血球的凝集效价低,相反致敏血球的凝集效价高,只有用严格控制在一定浓度抗原致敏的血球才能保持稳定。因此,在每次正式致敏之前,要测定致敏用的最适抗原量。我们采用棋盘式滴定方法来确定致敏抗原浓度。采用1.5~2个单位抗原致敏血球,无论是同一批抗原分别在不同时间致敏或者不同批次抗原,分别致敏血球,用同一份麻疹阳性血清测定PHA效价差异均很小。同时在试验中,我们采用设阳性血清对照来检验每批试验中各份血清效价的准确性。这样使此方法更加稳定可靠。

PHA法另一优点是能制成冻干制品,经我们试验证明,冻干对致敏血球效价无影响,且能长期保存,便于运输,经初步应用,PHA法比HI法敏感,两法具有高度相关性。也就是说PHA可以代替HI方法。总之,我们认为PHA方法敏感、特异、简便,适合基层使用,有较高的推广使用价值。

Development of Passive Hemagglutination Assay of Measles and Utilization in Serological Diagnosis Zhang Rongzhen, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

The passive hemagglutination assay (PHA) was developed. Preparation of antigen and its stability, sensitivity and specificity was studied. The result showed that the yield of ultrasonic treated antigen is high and its titer has no any change in 4°C storage at least 1 month. The sensitized sheep erythrocyte with this antigen have a high specificity and sensitivity. The lysophilized blood cells could stored for a long time in 4°C. A comparison of PHA with hemagglutination inhibition test was carried out by examination of 354 samples of sera from heal-

thy children. The GMT of titer of antibodies of measles were 26.20 and 13.92 respectively. The result showed that the two methods were highly related.

Key words Measles Passive hemagglutination Preparation of antigen

参 考 文 献

1. 福建省卫生防疫站. 被动血球凝集试验用于钩端螺旋体病诊断研究. 卫生防疫资料汇编 1974: 491.
2. 戴斌, 等. 被动血球凝集试验测定麻疹抗体的应用. 药品与生物制品 1977; 2(2): 97.
3. 周曾歇, 等. 被动血球凝集试验用于麻疹抗体的检测. 生物制品资料选编 1985; (10): 24.
4. 韩澄源. 间接血凝技术. 北京: 科学出版社, 1977: 23~24.

(本文承戴斌教授具体指导, 特此致谢)

(1989年1月20日收稿, 同年4月30日修回)

呼吸道肺炎杆菌血清分型及其流行病学意义

第二军医大学长征医院 胡雪皎* 邓 琨 罗文侗 叶曜芬

我们对临床分离的主要源于呼吸道的肺炎杆菌用本实验室制备的32型标准抗血清以协同凝集试验方法进行分型, 并对其临床流行病学意义加以分析。

材料和方法 282株肺炎杆菌来自265例病人, 其中痰标本207份, 血12份, 尿40份, 余来自胆道等处。标本接种于麦康凯平板培养基, 36°C过夜培养, 挑3~5个典型菌落种于Worfel-Ferguson斜面, 室温培养36~48h, 用PBS稀释至含菌 $10^8 \sim 10^{12}/\text{ml}$ 。将包被于SPA上的各型抗体反应液滴至玻片, 取一环上述抗原与之混合, 2分钟以内出现凝集为阳性, 未见凝集为阴性。

结果与讨论: 282株细菌中195株可被分型, 分型率为69.1%。K₁和K₃₃最为常见, 分别占全部菌株的12.4%和9.5%。207株呼吸道来源的肺炎杆菌, 144株分出型别, 分型率为69.6%。32个血清型中共分到26个型, 6个未分到的型别为: K₁₁、K₁₂、K₁₇、K₂₂、

K₃₁和K₃₅。40份尿标本中, 23份分出型别, 分布在15个型之中。12份血标本全部分出型别, 分属8个型。胆汁等处来源的23株标本中, 16株可被分型, 见于9个型之中。呼吸道肺炎杆菌常见血清型分离菌株数及频率(%)分别为: K₁ 30株(14.5%), K₃₃ 19株(9.2%), K₁₆ 14株(6.8%), K₃ K₁₈ 12株(5.8%), K₃₂ 9株(4.3%), K₅ K₂ 6株(2.9%), K₂₇ 5株(2.4%), K₂₁ 4株(1.9%)。

结果表明K₁和K₃₃为上海地区呼吸道及泌尿道等部位感染最常见型别。本文未能证明某一型造成院内流行, 但观察到有局部区域交叉感染。肺外来源细菌型别与呼吸道常见型别相同, 提示其来源可能互为因果, K₁和K₃₃型明显多见可能系它们较其他型别更具有传染病人和传播的条件或因素。

* 现已调北京空军总医院内一科