

# 用反向血凝技术检测脑脊液中抗原诊断隐球菌脑膜炎

首都医院检验科细菌血清室

(北京)

本室曾报道过<sup>[1]</sup>用微量补体结合反应及对流免疫电泳技术检测脑脊液中新型隐球菌抗原。这两种免疫学方法的敏感性还不够理想,而且敏感性较好的补体结合反应方法又比较烦琐,因而我们继续研究应用反向间接血凝技术检测隐球菌抗原,此方法的优点是敏感性、特异性及重复性均很好,并操作简单,容易掌握,出结果快。现将结果报道如下:

## 材料及方法

### 一、醛化羊红血球

将脱纤维羊血 20 毫升,用生理盐水洗三次( $\times 800g$ , 15 分钟),然后将积压血球 10 毫升一滴一滴地滴入盛有 1,000 毫升 0.15% 戊二醛的磷酸缓冲盐水(PBS, pH 7.13, 0.01M)的三角瓶中,边滴边振荡约 1 小时内完成,然后放 4℃ 冰箱中 1 小时,每隔 10 分钟摇动一次。醛化完毕立即用生理盐水洗 7 次,每次生理盐水量为血球体积的 20 倍。最后加 PBS 100 毫升,将血球配成 10% 浓度,显微镜计数板计数约为 54 亿个/毫升,加  $NaN_3$  至 0.1% 浓度,分装小瓶,4℃ 冰箱保存备用,半年内不失效。

### 二、免疫球蛋白 G(IgG)的提取

1. 抗隐球菌免疫血清的制备见我们过去的报道<sup>[1]</sup>。全菌凝集效价为 1:1280。

2. 硫酸铵盐析抗血清:取 8 毫升血清共盐析三次,第一次 50% 饱和度盐析,后两次均 33% 饱和度盐析。三次盐析后将沉淀物用 2—3 毫升生理盐水溶化后,装透析袋,放流水中透析一天,用生理盐水在 4℃ 下再透析一天,除去硫酸铵,最后用磷酸缓冲液(PB, pH 6.3, 0.0175M)

平衡 6 小时,准备过柱。

3. 过 DEAE-纤维素柱:将用 PB 平衡好的粗提  $\gamma$ -球蛋白上 DEAE-纤维素柱( $2 \times 30$  厘米),用 pH 6.3, 0.0175M PB 洗脱,流速 3 毫升/10 分钟分部收集,将含 IgG 的管合并,共 20 毫升。用紫外分光光度计在 280 毫微米波长时测收集液的光密度,其蛋白浓度为 1.64 毫克/毫升。经醋酸纤维薄膜电泳鉴定,纯度合格。IgG 全菌凝集效价为 1:160,分装小瓶-10℃ 下保存。

用同一方法制备了一批兔正常血清 IgG,保存浓度为 1:51 毫克/毫升。

### 三、致敏羊血球

1. 取 10% 醛化羊血球 1 毫升,去上清液,用生理盐水洗两次( $\times 500g$ , 5 分钟),将此积压红血球用生理盐水稀释至 2 毫升备用。

2. 将抗隐球菌 IgG 用 0.075M pH 5.0 的醋酸缓冲液稀释至所需要浓度(例如 55 微克/毫升),1 毫升加 1/2 万的氯化铬(用无离子水配制)0.5 毫升,37℃ 水浴中 10 分钟;立即加入洗净的 5% 的醛化血球 0.3 毫升及 1/4 万鞣酸溶液(生理盐水配制)0.5 毫升,37℃ 水浴中 15 分钟;离心去上清,用 PBS 洗一次,再用含 2% 兔血清的 PBS 洗一次;用保存液(含 2% 兔血清,10% 蔗糖,0.1%  $NaN_3$  的 pH 7.2 0.01M PBS 稀释成 0.5% 悬液备用(含致敏羊血球约 3 亿个/毫升)。

用同样方法致敏兔正常 IgG 作为对照。

### 四、9 株隐球菌多糖体的制备

制备方法见 1977 年的报告<sup>[1]</sup>。

## 五、血凝的测定

1. 72 孔“V”形血凝板每孔加入稀释液 1 滴 (0.025 毫升), 每份样品一排孔。

2. 用稀释棒取被检样品 0.025 毫升, 插入第一行孔中顺序倍比稀释。

3. 往每孔中加入 0.5% 致敏红血球 1 滴, 在微型振荡器上混匀 1 分钟, 置室温 1—2 小时, 观察结果。

4. 结果是以出现“+++”号凝集的最高稀释倍数为血凝效价。阳性标本要用正常兔 IgG 致敏血球及抗隐球菌 IgG 致敏血球同时重测一次, 如果二排孔同等效价则可判为阴性。

## 实验结果

### 一、致敏时抗隐球菌 IgG 浓度的选择

经过几次试探性试验找到合适浓度的大致范围后, 我们将 1,640 微克/毫升的 IgG 用 PBS 稀释成 85、70、55、40、25、10 微克/毫升, 按上述方法致敏一批红血球, 然后用 1 号多糖体 (1000 单位/毫升) 测血凝效价, 结果见表 1。

表 1 IgG 浓度与血凝效价关系

ACN IgG 浓度(微克/毫升)	血凝效价
85	有血凝现象, 无终点
70	2 <sup>18</sup>
55	2 <sup>18</sup>
40	2 <sup>16</sup>
25	2 <sup>16</sup>
10	2 <sup>9</sup>

以 IgG 为 55—70 微克/毫升所致敏的血球血凝效价最高。当 IgG 为 85 微克/毫升时则出现自凝现象, 反应无终点; 低于 40 微克/毫升时血凝效价下降。

### 二、三种免疫学方法的敏感性比较

比较三种方法测各菌株纯化多糖体抗原的敏感性的结果见表 2。

表 2 结果非常清楚地表明: 反向血凝比补体结合法敏感 10—600 倍, 比对流免疫电泳敏感 25—1000 倍。

表 2 三种免疫学方法测多糖体

多糖体菌株来源	反向血凝		微量补体结合		对流免疫电泳	
	效价	最小反应单位	效价	最小反应单位	效价	最小反应单位
1	2 <sup>17</sup>	0.01	2 <sup>18</sup>	0.25	2 <sup>10</sup>	1.0
2	2 <sup>16</sup>	0.02	2 <sup>16</sup>	0.50	2 <sup>11</sup>	0.5
3	2 <sup>20</sup>	0.001	2 <sup>16</sup>	0.06	2 <sup>10</sup>	1.0
4	2 <sup>17</sup>	0.01	2 <sup>13</sup>	0.12	2 <sup>11</sup>	0.5
5	2 <sup>18</sup>	0.005	2 <sup>12</sup>	0.25	2 <sup>9</sup>	2.0
6	2 <sup>18</sup>	0.005	2 <sup>14</sup>	0.06	2 <sup>11</sup>	0.5
8	2 <sup>17</sup>	0.01	2 <sup>12</sup>	0.25	2 <sup>10</sup>	1.0
9	2 <sup>15</sup>	0.04	2 <sup>11</sup>	0.50	2 <sup>8</sup>	5.0
10	2 <sup>16</sup>	0.02	2 <sup>13</sup>	0.12	2 <sup>10</sup>	1.0

表 3 9 例脑脊液标本的抗原检测结果

病 例	临床确诊	培养及镜检	反向血凝	补体结合	对流电泳
罗××	隐球菌脑膜炎	+	2 <sup>13</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>1</sup>
孙××	隐球菌脑膜炎	+	2 <sup>7</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>0</sup> (原倍)
(767号标本)					
薛××	结核性脑膜炎	—	—	—	—
张××	结核性脑膜炎	—	—	—	—
徐××	结核性脑膜炎	—	—	—	—
史××	病毒性脑膜炎	—	—	—	—
王××	结核性脑膜炎	—	—	—	—
曹××	结核性脑膜炎	—	—	—	—
郭××	结核性脑膜炎	—	—	—	—

### 三、反向血凝的临床应用

我们用 55 微克 IgG/毫升致敏的血球测定了 9 例可疑隐球菌脑膜炎病人的脑脊液, 结果见表 3。

表 3 结果表明: 在检测表 3 中 9 例临床脑脊液标本时, 也证实了反向血凝比补体结合法及对流电泳法敏感, 而且特异性也是好的。由于能得到的可疑脑脊液标本太少, 本室收集了 260 份非隐球菌病(但患有其他各种疾病)的血清, 用隐球菌反向血凝诊断制品进行了试验, 以证明非特异性反应存在与否。在 260 份血清中有 6 例呈现 1:8 至 1:2 低效价凝集。对这 6 例再用正常兔 IgG 致敏血球进行试验, 鉴别真假阳性反应。结果证明这 6 例血清皆属假阳性反应, 因它们都与正常兔 IgG 致敏的血球发生了等效价的凝集, 所以全判为阴性反应。

## 讨 论

国内在诊断新型隐球菌病方面已开始采用免疫学方法,国外采用了两种免疫学方法来诊断本病:一是乳胶凝集试验<sup>[2]</sup>,另一种是间接血凝抑制试验<sup>[3]</sup>。乳胶凝集制品已有药箱在各国使用,它是用硫酸铵一次粗提 IgG 后致敏乳胶。据报道该种制剂的敏感性是好的,对其特异性说法不一,有的说只要用正常兔 IgG 致敏血球作对照,就可以排除假阳性;也有人认为假阳性很高,正常阈值在 1:8 以下。血凝抑制方法是用纯多糖体在 CrCl<sub>3</sub> 介导下致敏醛化血球,试验时采用抑制法反证脑脊液中有否抗原。

我们过去所采用的微滴补体结合及对流免疫电泳法不够敏感,而现报道的反向血凝敏感

性及特异性都比较满意,但由于本院能遇到的病例太少,仅有的几例又都是晚期病人,故目前还无法显示它比培养法及墨汁染色镜检法的检出率高多少,这一工作还待今后不断地积累资料。从与补体结合、对流免疫电泳法比较的结果来分析,反向血凝的敏感性高,而特异性又较满意,初步试验证明,该方法可望成为较理想的早期诊断方法。

## 参 考 文 献

- [1] 首都医院检验科细菌血清室:微生物学报, 17 (3): 239, 1977。
- [2] Kaufman, L. et al., *Appl Microbiol.*, 23: 620, 1974.
- [3] Kozel, T. R.: *Infection & Immunity*, 5: 35, 1972.