

# 一种志贺氏菌属分群分型试剂—SPA的试制 和临床应用效果的初步观察

成都生物制品研究所 周惠民 张国芬 李桂梅  
遵义医学院 张颖悟 董阳达 崔丕业

金黄色葡萄球菌细胞壁A蛋白(简称SPA)能与许多哺乳动物血清中IgG的FC段相结合,结合后IgG的Fab段暴露于外,并保持其正常的抗体活性和特异性,当与特异抗原相遇时,抗原则与IgG Fab段结合,而使已经抗体致敏的SPA相互联结形成协同凝集反应。此种凝集反应在细菌学上的应用,如肺炎球菌分型<sup>[1]</sup>、脑膜炎球菌分群<sup>[2]</sup>、痢疾杆菌<sup>[3]</sup>、沙门氏菌分型<sup>[4]</sup>、钩端螺旋体定群<sup>[5]</sup>、链球菌分群(组)<sup>[6]</sup>的鉴定等国内外已有报导,但大多属于实验室方面的研究,于临床上实际应用,除链球菌分群试剂外尚未见有新报导,作者等<sup>[2]</sup>用自选含A蛋白金黄色葡萄球菌No.1800株,由成都生物制品研究所试产一批新的痢疾杆菌分型试剂,并应用此试剂对从临床病人新分离的272株志贺氏菌属进行了观察,获得了满意的效果,可为今后诊断用品的改革提供新的途径,现报告如下。

## 材料和方法

### 一、材料:

1.SPA菌株:金黄色葡萄球菌No.1800株,能产生大量A蛋白,用于制备SPA稳定液及本实验的分型试剂。

2.志贺氏菌属诊断血清:用于致敏SPA稳定液的痢疾杆菌特异诊断血清为成都生物制品研究所及遵义医学院共同制备,其中包括四群志贺氏菌属多价、志贺氏群、什密次氏菌、宋内氏菌、福氏菌群多价、福氏菌型特异性因子1~6、群因子3、4、6、7及鲍氏菌群多价血清I、II、III共17种。血清凝集效价在1:320~1:5,120之间。

3.粪便标本:302医院住院处疑似细菌性痢疾病人的新鲜粪便。

### 二、方法:

1.SPA稳定液的制备<sup>[7]</sup>:金黄色葡萄球菌No.1800株,于克氏瓶琼脂培养基(pH7.8)上培养18~24小时,用PBS(0.15M NaCl, 0.01M磷酸盐 pH7.4)洗下菌体,经4,000转/分离心后洗2次,以含0.5%甲醛的PBS制成10%(V/V)悬液,室温下作用3小时后加热80°C,15分钟,迅速冷却,再用PBS洗三次。如于4°C下贮存,其结合IgG的能力能维持数月之久。

2.SPA志贺氏菌分群分型诊断试剂的制备:特异性志贺氏菌属诊断血清致敏SPA稳定液的方法见文献<sup>(2)</sup>略加改进制成17种SPA志贺氏菌分群分型诊断试剂。用实验室保存的志贺氏菌属标准菌株及部分地方株作玻片凝集试验,诊断试剂与各相应菌株在数秒~2分钟内呈现明显的特异性反应,而与不含有相应抗原的菌株不出现凝集。诊断试剂保存半年其特异性及敏感性均无改变。

3.SPA志贺氏菌属分群分型诊断试剂的临床考核:

①志贺氏菌属的分离和鉴定:疑似细菌性痢疾病人粪便,于S.S.平板作分离培养,按常规方法做生化反应和玻片凝集反应诊断菌型。

②志贺氏菌属SPA分型诊断试剂协同凝集反应:在做血清分型玻片凝集反应同时,取同一双糖培养基上的菌苔与SPA分型诊断试剂作协同凝集反应,比较两者的结果。

协同凝集反应的方法:先取四群志贺氏菌属多价、鲍氏菌群多价I、II、III SPA分型



试剂各一滴分别滴于1~4格中(后因本实验地区今年流行的鲍氏菌均为4型,故先用鲍氏菌多价I SPA试剂,如阴性再用鲍氏菌多价I、II、III),然后以接种环沾取双糖培养基上的菌苔少许分别与各格中的SPA分型试剂混合,阳性结果在数秒至2分钟内出现,以卅、卅、卅、卅表示。

若与四群志贺氏菌属多价凝集而与鲍氏菌多价I、II、III不凝集的菌株,再用福氏菌多价、宋内氏菌、什密次氏菌及志贺氏菌分型试剂作协同凝集反应,若与后四分群分型试剂凝集即可判定痢疾菌群、菌型。与福氏菌多价出现阳性反应的菌株,则定为福氏志贺氏菌,然后再以福氏菌型特异性因子和群因子SPA分型诊断试剂作协同凝集反应,以进一步定出福氏志贺氏菌的型别及亚型。

### 试验结果

用成都生物制品研究所和遵义医学院试制的一批SPA志贺氏菌属17种分型试剂对临床分离培养的痢疾菌做玻片协同凝集反应,将分群分型结果与常规法诊断血清玻片凝集反应比较,两种方法所鉴定的菌型和各株凝集反应的强度完全一致,SPA法出现的凝集颗粒大,结果迅速,便于观察。

一、菌群鉴定结果:272株阳性培养菌,两种方法鉴定结果一致,计志贺氏菌1株、什密次氏菌8株、福氏菌103株、宋内氏菌88株、鲍氏菌72株。

二、福氏菌群及鲍氏菌群的分型结果:将福氏菌群103株和鲍氏菌群72株用SPA分型试剂进行鉴定与常规法血清分型玻片凝集反应比较,结果完全符合(附表)。

### 讨论与小结

志贺氏菌属血清学分群分型鉴定,在细菌性痢疾的诊断和流行病学调查上,实验室的辅助是不可缺少的。我国菌痢发生地区广,而痢疾杆菌分型诊断血清不易制备,产量受到限制,特异志贺氏菌抗体致敏的SPA作为试剂鉴定痢

附表 福氏及鲍氏菌血清分型及SPA试剂分型结果

菌 群	型及亚型	株数	合计
福氏	1a	2	103
	1b	34	
	2a	26	
	2b	19	
	3a	11	
	4a	1	
	4	8	
	5	1	
	y	1	
鲍氏	鲍氏4型(血清), 鲍氏群多价I(1~6型, SPA试剂*)	72	72

\*目前生产试制SPA鲍氏菌分型诊断试剂多价I、II、III,未生产单因子试剂

疾杆菌的可能性,虽经实验室证明效果好,实际考核尚未见有报告。本文报告成都生物制品研究所在作者等用葡萄球菌Z<sub>5</sub>株协同凝集反应证明在肠道病原菌的鉴定分型获得好效的基础上,试制了一批SPA志贺氏菌属分群分型试剂,经用于临床分离的272株痢疾杆菌的分型鉴定,证明此试剂的敏感性和特异性与常规血清法的结果完全一致。而且结果明晰,反应迅速。

国外用于SPA协同凝集的金黄色葡萄球菌为Cowan I株,国内曾选出含A蛋白的Z<sub>5</sub>及1800株,经实验室比较证明,Cowan I株稳定液及分型试剂有时有自凝现象而Z<sub>5</sub>株经两年多使用后证明在A蛋白含量及用它制备的抗体致敏菌,其特异性与敏感性均不及No.1800株。

文献报导获取SPA要用CCY培养基[8],我们自己制备的SPA培养基,成份简单,价格便宜,配制方便,两年来我们和国内有关单位在实验室使用证明,产量丰富,菌体结合抗体能力强,协同凝集反应出现快,颗粒大,且能大量生产。

SPA分型试剂的最大特点是用血清量少,如用0.1毫升的特异诊断血清可制备出SPA试剂10~20毫升。这样可将家兔免疫诊断血清的使用价值扩大100~200倍。因此,它可大大减少血清用量,降低生产成本。

文献中分型试剂所用SPA的最终浓度为



1%(V/V), 最初我们制备的SPA试剂亦为1%(V/V), 发现菌体较多, 反应不易观察, 经用PBS稀释成0.5%(V/V)后, 观察结果较清晰, 这可能与我们在洗菌体时所用离心速度为4,000转/分从而压积的菌数较多有关。

一般的诊断血清如经高倍稀释后, 效价迅速下降, 而这批用于痢疾杆菌分型诊断SPA试剂已保存半年仍保持其对相应抗原的敏感性和特异性, 说明抗体IgG通过其FC段结合葡萄球菌细胞壁表面A蛋白上相当牢固, 虽经PBS多次洗涤, 不被洗脱, 故在4°C下能保持其结合抗原能力, 如能进一步制成冻干粉剂则有可能长期保存。

这种SPA痢疾杆菌分型试剂的试产经临床考核满意, 为今后其他诊断用品的剂型改革可提供参考。其他几种细菌的SPA诊断试剂我们正在试产中, 将于另文报导。

(本文中痢疾病人的标本分离及常规血清学菌型鉴定是302医院化验科黄上媛、张世兰技师完成的, 特此致谢)

### 参 考 文 献

1. Kronvall G: J Med Microbiol, 6: 187, 1973.
2. 张颖悟等: 流行病学杂志, 1(2): 111, 1980.
3. 张颖悟等: 遵义医学院学报, 3(2): 24, 1980.
4. Edwards EA et al: J Clin Microbiol, 3(3): 339, 1976.
5. 张颖悟等: 遵义医学院学报, 3(2): 18, 1980.
6. Christensen P et al: Infect Immunol, 7: 881, 1973.
7. 张颖悟等: 遵义医学院学报, 3(2): 73, 1980.
8. Arvidson S et al: Acta Path Microbiol Scand, B 79: 399, 1971.

## 冻干流脑A群多糖体菌苗免疫人群效果观察简报

湖北省流脑多糖体菌苗效果考核协作组

过去, 由于流脑吸附菌体菌苗和流脑提纯菌苗效果不够理想或质量不纯, 已行止生产使用。1979年冬至1980年春, 我省组织了5个县(市)对武汉生物制品研究所生产的流脑多糖体菌苗在疫区进行观察, 初步认为免疫效果及人体反应较好, 现简报如下:

**一、免疫效果:** 观察对象为7~15岁在校学生, 以班为单位随机取样, 单号为菌苗免疫组, 每人注射0.5毫升, 内含30微克多糖体, 双号为对照组, 采用空白对照, 或注射盐水, 或口服小儿麻痹糖丸。接种后半个月统计病例。免疫组共51,366人, 发病12人, 发病率23.3/10万; 对照组47,621人, 发病82人, 发病率172.2/10万。效果指数1: 7.39, 保护率86.46%  $t=7.58$ ,  $P<0.01$ , 差异显著。

**二、人体反应观察:** 全身反应标准(腋下体温)为: 无反应(37°C以下); 弱反应(37.1~37.5°C); 中反应(37.6~38.5°C); 强反应(38.6°C以上)。菌苗接种组共观察500人, 接种后体温增高以6~8小时达高峰, 中反应13人, 中反应率2.6%。24小时中反应12人, 为2.4%。盐水注射组观察346人, 6~8小时中反

应1人, 中反应率0.3%, 24小时中反应2人, 反应率0.6%。两组48小时以后均无中强反应。

局部反应标准(测量接种部位红晕大小)为: 无反应(无红晕); 弱反应(2.5厘米以下); 中反应(2.5~5.0厘米); 强反应(5.1厘米以上)。

菌苗接种组共观察500人, 6~8小时中反应2人, 中反应率0.4%, 24小时中反应33人, 反应率6.6%, 强反应1人, 反应率0.2%。盐水注射组观察346人, 未出现中强反应。

异常反应: 共观察94,381人, 未发现严重异常反应。

**三、血清学效价:** 用流脑多糖体致敏醛化绵羊红血球, 测定两组接种前后血凝抗体效价变化。菌苗接种组81人, 免疫前抗体几何平均效价为2.94, 免疫后一个月抗体效价为53.02。为免疫前的18.04倍。其中抗体效价增长4倍以上者77人(95%)。对照组76人, 免疫前抗体几何平均效价为1.45, 间歇一个月后, 抗体效价为1.57。自然抗体效价增长不显著。

(王泽民 整理)