

综述

葡萄球菌甲蛋白在传染病监测和流行病学调查中的应用

中国医学科学院流行病学微生物学研究所 李爱芳 李之桂

葡萄球菌甲蛋白(Staphylococcal protein A)是某些金黄色葡萄球菌菌株细胞壁上所具有的一种蛋白质成分,简称SpA。

SpA能与多种哺乳动物血清中的Ig-免疫球蛋白(主要是IgG)非特异地结合。此结合物仍具有该种Ig抗体活性的特异性。由于具有广谱的第二抗体功能,为应用第二抗体提供了方便。

SpA对病原微生物的分型、细胞的分离和分析、淋巴细胞表面结构的测定,以至免疫理论的研究是一个比较精确和便利的技术。SpA既可以其本身菌体为固相载体作为免疫试剂,又可提纯在多种新技术中应用(如进行荧光、酶、同位素等的标记)。这就为传染病的监测和流行病学调查提供了方便和敏感的手段。SpA的应用范围较广 本文仅就其在传染病监测和流行病学调查领域中的应用及可能应用情况作一综合性报道。

历史概况

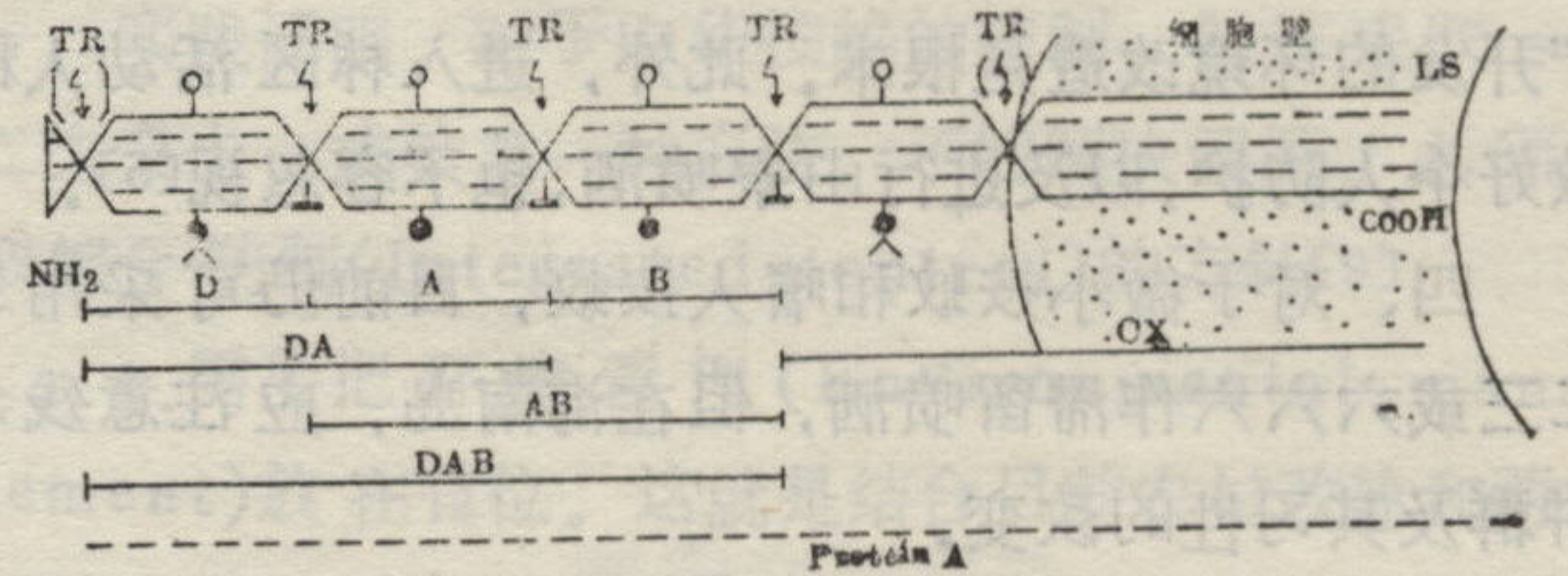
早在1940年Verwey对SpA就首先作了描述。1958年Jensen第一个报道了SpA能与血清起反应。随后Löfkvist(1962)又对SpA的成分进行了研究,确定其不是多糖而是蛋白质。1964年Groß对该抗原成分进行了系统的分析研究,并明确称之为A蛋白(Protein-A)。总之,国外对SpA已进行了广泛的研究,近年来特别是在免疫学应用上的报道更多。

自1979年张颖悟和董阳达等作了SpA的介绍后,引起国内有关方面的重视,应用研究进展很快。

SpA的结构及其性质

1972年Sjoquist等报告(1), A蛋白是金黄色葡萄球菌细胞壁肽多糖上的共价结合体,并均匀分布于整个细胞;其分子量为42,000;完整的A蛋白分子的氨基酸残基是395个,共分五段即D、A、B、C、X,前四段是高度同源段,各由58~62个氨基酸残基组成,每段都有可结合IgG的活性点,但就整个SpA分子而言,则只能与两个分子的IgG结合。1977年Sjödal

指出, SpA分子是单一的多肽链(2)(附图)。



注: ○ Fc受体
▲ A蛋白与免疫球蛋白Fc结合点
△ A蛋白与免疫球蛋白多价片段结合点
TR 肽聚糖的作用部位
(○) 葡萄球菌细胞壁和A蛋白结合的位置,此点不被水解
LS 溶葡萄球菌素(Lysozyme)的作用部位
(□) A蛋白的N端

附图 SpA结构的模式图

1969年Sjoquist等(3)指出SpA与人和多种哺乳类动物的IgG Fc段结合而不影响其Fab段的活性;激活补体。Varro更进一步指出SpA与IgG的结合是一种疏水性的作用。

1978年Ghetie(4)介绍了用溴化氰将SpA交联到Sepharose上的方法,其结合IgG的能力很强,每毫升凝胶可结合4毫克狗的IgG,这比Johansson报告的1毫升凝胶SpA菌可结合的IgG要高4倍。Field(1980)(5)比较了SpA菌和SpA-Sepharose的吸附性,认为后者吸附IgG更为完全,而对IgM的吸附则较前者少。因此,SpA结合IgG的能力与对其处理的方法有关。此外关于SpA的其他免疫特性、生物学作用、以及对热和变性剂处理的稳定性等,在此从略。

SpA作为第二抗体应用上的优缺点

由于SpA的广谱“免疫反应”的特性,决定了凡是与其有“反应”的属种动物血清,它都能代之作为第二抗体。根据现有的资料,检测过“免疫反应”的动物琼脂扩散反应阳性的有:人,豚鼠,小白鼠,狗,猪,猴,水貂,北极熊,旱獭,黑线姬鼠,长爪沙土鼠、黄鼠,兔(有报道有时可形成弱阳性的反应)。阴性的有:牛,马,山羊,绵羊,大白鼠,母鸡,刺猬 由于测定SpA“免疫反应”方法的不同,尚需注

意对某些属种动物所出现的反应滴度上的差异(表1)。

表1 HRP—SpA和SpA与不同鼠种动物血清的免疫反应

A ^[26]		B ^[27]	
动物名称	鉴定滴度	动物名称	琼扩反应程度
猪	150,000	猪	卅
狗	70,000	旱獭	卅
兔	27,000	人	卅
人	24,000	豚鼠	卅
猴	19,000	黄鼠	卅
豚鼠	12,000	黑线姬鼠	十
小白鼠	500	长爪沙土鼠	十
牛	230	兔	十
牛犊	—		
绵羊	—		
山羊	—		
大白鼠	—		
马	—		

注A:HRP-SpA与不同种属动物IgG的亲合力

B:SpA与不同种动物血清的琼脂扩散反应

SpA与IgG的结合力很强,无论在0°C、37°C、44°C以及56°C,均能立即结合[5],结合后对免疫球蛋白的抗体活性也不影响,同时SpA与IgG的结合是可逆的。SpA易被¹²⁵I、荧光素、辣根过氧化物酶等标记。因此可与多种技术相结合。此外,由于SpA分子高度均一,不与Fc受体结合,所以有较高抗IgG的特异性,免疫沉淀试验时不需调等价带,亦能完全沉淀。

然而,SpA代替第二抗体也存在不足之处。据最近的报道,SpA除与血清中IgG发生“免疫反应”、少部分的IgA发生“免疫反应”外,SpA还能结合一部分IgM,这是人们早已知道的。

SpA在传染病的监测和流行病学调查中的应用

一、微生物的分群、分型的检定:微生物的分群、分型检定是传染监测和流行病学调查中的重要一环,国内外用标记特异群、型血清的SpA菌液做分型(群)检定,均获得成功;实验者们一致认为此法敏感性高,可靠性强、快速、简便、省材。分型(群)鉴定的方法步骤如下:

1. SpA菌液的制备:18~24小时培养斜面,用生理盐水洗下,4000转/分×20分洗离两次,用0.5%福尔马林PBS(pH7.4, 0.01M)制成10%(V/V)菌悬液,室温下作用3小时,加热56°C30分钟,速冷至4°C,再用PBS(pH7.4, 0.01M)洗离3次,转速时间同上,用含0.05%NaN₃的PBS制成10%(V/V)菌液,4°C冰箱保存备用,此即稳定液。

2. 标记特异型(群)血清的SpA菌液的制备:取1毫升上述SpA菌稳定液,用生理盐水洗离一次,然后加生理盐水使成原量,加型(群)特异血清0.1毫升,在室温或37°C下作用30分钟,并不断摇动,用PBS洗离两次之后,用含0.05%NaN₃的PBS配成1%菌悬液,此即标记特异型血清的SpA菌液,4°C冰箱保存备用。

3. 协同凝集试验(Coagglutination):在载玻片上划成小方格,将不同型(群)血清标记的1%SpA菌液依次放方格中一滴,同时做未标记的和正常人血清标记的1%SpA菌液作对照,用接种环将待检菌取少许于各方格中,轻轻摇动,2分钟记结果。

应用情况见表2。

表2 应用SpA分型(群)的部分情况

生物名	结果
肺炎球菌,腺病毒	较满意的用于分型 ^[7]
链球菌	较满意的用于分型 ^[8]
分枝杆菌	较满意的用于分型 ^[9]
志贺氏痢疾杆菌	经1119株菌的分群分型鉴定完全成功 ^[12]
脑膜炎球菌	经265株菌的定群鉴定较为满意 ^[10]
绿脓杆菌	较满意的用于分型 ^[28]
钩端螺旋体	较满意的定群和部分分型 ^[11]

注:〔〕号中的数字为参考文献序号

二、SpA在快速检查抗原方面的应用:用SpA进行快速检查抗原的方法主要有两种。一是用特异抗体标记的SpA菌,可检定分离其相应的抗原;1976年Zalan等鉴定分离了流感病毒^[13],同年Edward、Miyata将此法用于肠道菌分离菌落的直接检定^[14,15]。国内工作者也鉴定分离成功了脑膜炎球菌、链球菌、猪丹毒杆菌、猪霍乱沙门氏菌、猪链球菌和钩端螺旋体^[28];近年来国内用特异抗体标记的SpA菌,直接粪检相应抗原进行了大量工作,但非特异反应很高,尤其是对痢疾杆菌的诊断。1981年第三军医大学潘绍武等,检查了100份正常人的粪便,发现90%以上出现非特异凝集反应。作者认为可能由于交叉抗

体、植物凝集素和分泌抗体的存在所致。同年山东省卫生防疫站李云圃等，也发现上述非特异凝集反应问题，并将大便悬液直接火焰加热至沸，冷却后再进行协同凝集试验，排除了非特异凝集反应。二是用SpA菌放射免疫分析法，1974年Figenchon首先用此法成功地检查了乙型肝炎抗原[16]，1978年Brown用同样原理检查了鼠白血病毒[17]。此外，Goding提出应用SpA-Sepharose柱层析分离提纯病毒抗原的可能性。

三、SpA在检查抗体上的应用：检查抗体常用标记的SpA，代替不同属种动物的第二抗体，其应用方法及情况见表3。

表3 应用SpA检测抗体的部分情况

方法类别	方法原理	已应用的效果及范围
固相放射免疫技术	已知抗原包被于微量孔中，然后加入被检血清和 ¹²⁵ I-SpA，洗去未结合的部分，测放射性	快速、敏感、非特异，重复性好，已用于检测淋球菌，破伤风，肺炎支原体，梅毒螺旋体等的抗体[18]
酶标免疫技术	已知抗原包被于微量孔中，洗后加入待检血清，37°C 2小时，再加酶标SpA和邻苯二胺最后加入硫酸终止，测OD	快速，敏感，简便，稳定，重复性好，已用于乙型肝炎，炭疽，猪囊虫，乙脑等抗体的检测[19]
协同凝集抑制试验	利用待检血清中的特异抗体，能抑制该抗体致敏的SpA与其相应抗原凝集	快速，可靠，已用于登革热等抗体的检测[20]
放射免疫抑制技术	利用抗体之间互相竞争夺取 ¹²⁵ I标记的SpA，检测有否特异抗体的存在	快速，敏感，非特异，重复性好[21]

四、SpA用于检查和分离循环免疫复合物(CIC)：多年来的研究说明，细菌，病毒等传染病，均有检出CIC的报道，如肝炎、梅毒、麻风等。因此检测CIC也同样是对该类病监测、治疗和控制其流行的重要一环。Hallgren(1976)、Natali(1980)先后应用SpA检测了CIC[22,23]。方法之一就是将SpA菌稳定液与被检标本相混合，然后用适量洗脱剂将复合物(IC)中的抗原自SpA菌体表面游离出来。此法既可分离又可检定IC的性质，既不需要补体的存在，也不受可能存在于被检血清中RF因子的干扰；但SpA菌稳定液除能结合IC外，也能结合单体IgG，尤其当标本中IC

含量少时，这种影响就更大，因为单体IgG与IC间有高度竞争；解决此问题，可用聚乙二醇沉淀IC，或通过凝胶过滤除去单体IgG。此外，尚有用SpA-Sepharose分离IC和用C₁q与¹²⁵I-SpA菌检测IC。

五、SpA在分离技术方面的应用：SpA在分离技术方面的应用是极其广泛的，在此仅略谈与传染病有关的几个方面。

1. IgG及其亚类的分离——常用SpA-Sepharose 4B珠从血清或人脐带血清中提取；一般人脐带血清每毫升能提取多于8毫克的IgG纯晶，而用DEAE纤维素柱则量少且不纯，同时用人脐带血清提取IgG，还可排除IgM、IgA同SpA反应而带来的干扰。所以用SpA-Sepharose 4B珠从脐带血提取纯的人IgG，是一种较好的方法[27]。亦有用SpA-Sepharose 4B珠亲和层析柱，从感染风疹病毒恢复期患者的血清中，分离抗风疹IgM抗体。

2. 分离抗原——是将含抗原的标本，与其相应抗血清混合，使形成IC，然后与SpA菌稳定液相混合，使IC吸附到SpA菌体上，再用洗脱剂将抗原解析下来[24,25]。

3. 做相关免疫吸附剂——用于带有相关膜抗原、膜受体和膜Ig的分离，尤其是用于这类活细胞的研究。1978年Ghetie等用SpA-Sepharose吸附分离了带表面Ig的细胞[26]

参 考 文 献

1. Sjoquist J et al: Eur J Biochem, 29: 572, 1972.
2. Sjodal J et al: Eur J Biochem 73: 343, 1977.
3. Sjoquist J et al: J Immunol, 103: 467, 1969.
4. Ghetie VJ: Immunol Method, 21: 133, 1978.
5. Field PR: Ibid, 32: 59, 1980.
6. Kronvall GJ: Immunol, 104: 273, 1970.
7. Kronvall GJ: Med Microbiol, 6: 187, 1973.
8. Christen Sen P et al: Infect Immunol, 7: 881, 1973.
9. Juhlin I et al: Acta Path Microbiol Scand Sect B, 81: 179, 1973.
10. 张颖悟等: 流行病学杂志, 1(2): 111, 1980.
11. 张颖悟等: 遵义医学院学报, 2(8): 18, 1980.
12. 周惠民等: 流行病学杂志, 2(2): 128, 1981.
13. Zalan E et al: Canad Med Ass J, 115(10): 1002, 1976.
14. Edmard EA et al: J Clin Microbiol, 3: 339, 1976.
15. Miyata Y: Kansenshogaka Zasshi, 51: 540, 1977.
16. Figenchan KT: Acta Path Microbiol Scand Sect B, 82: 422, 1974.
17. Brown JP: J Immunol Methods, 21: 23, 1978.

(下转367页)

效果,与浅坑式相比,颇多优点。辽宁在锦县小口、深坑、斜坡、暗道缸式厕所基础上改成诱蝇式灭蝇厕所,利用厕所排臭来诱杀成蝇,对控制家蝇等成蝇密度有一定价值。

二、蝇蛆人工养殖研究:近年来对大量存在的禽畜粪利用来养殖蝇蛆作为家禽、家畜、塘养鱼饲料之用,大多在农业、渔业部门进行。广西维容农场在室内试养结果,能迅速繁殖出大量无致病菌的家蝇蛆,喂了蛆的猪或鸡都增了产;利用干蛆粉做喂饲小猪、大猪增重的对比试验,分别提高70%、139%;鲜蛆喂小鸡,增重率提高67%,而且提前4个月产蛋;鲜蛆约含粗蛋白19%、粗脂肪6%,每斤成本0.12元;干蛆粉约含粗蛋白61%、粗脂肪23%,每斤成本0.4元,仅为鱼粉价的一半。如禽、畜粪得到充分利用,也杜绝蝇类孳生。这课题虽是农业部门完成的,但对灭蝇完全可结合,值得学习和推广。

城乡灭蝇措施

《灭蝇试点区和先进地区经验总结》:总结以往经验,写成《蝇类防制技术措施(草案)》,以指导各地灭蝇工作。灭蝇试点工作主要在山东烟台地区掖县进行,此外尚有鞍山市铁西区代表中等城市的居民区、大连附近的金县代表小城镇、锦县农村代表农村;他们都对孳生地作了调查,进行治理或控制,并大力消灭成虫幼虫,成蝇密度都不同程度地下降,下降20%~85%不等。可是这仅是一个指标。各地点主要措施和蝇密度下降程度如下表:

锦州对厕所边冬春挖蛹作了评价。

在工作中我们体会到:灭蝇应以控制孳生为主的综合防治作为方向。今后计划选题,应以近期大量应用和急需的作为重点,兼顾基本情况的调查研究和新

途径的探索,也就是要把控制孳生的研究和化学防治的研究以及围绕着它们的有关蝇类习性问题的深入了解作为科研重点。首先把这些课题抓好。鉴于家蝇在传播肠道传染病上的重要性,以蝇种论,家蝇应作为研究的重点。

地点	孳生地处理	消灭成虫、幼虫	成蝇密度下降程度
山东掖县	以人粪型滋生频率最高,顺次为畜粪、腐动物物质、腐植物物质和垃圾。主要措施为改厕所、勤掏取;对畜粪等采取高温堆肥。	用人粪敌百虫毒蝇点诱杀成蝇	平均下降20.9%
鞍山市铁西区	主要对酱油厂、豆制品厂、食品加工厂、酒厂四单位的孳生地进行治疗,改露天堆放为窖存或日产日清。	食品行业用粘蝇纸,其它多蝇场所和堆放过孳生物的场所用药杀、笼捕,大量杀灭成蝇。	下降85.3%
辽宁金县	大搞郊镇卫生基本建设,使城镇孳生地减少,镇容改观,每年投资40—50万元。修路和村路占当地道路的72%,改造的厕所和猪圈超过当地这些孳生场所的90%。	用于消灭成虫、幼虫的费用每年不下万元。使用的方法有笼诱、敌百虫毒蝇点,室内用粘蝇纸,室外多蝇处喷药,并结合“奖惩细则”的贯彻,实行卫生监督。	下降45.7%; 伤寒、痢疾、肝炎等肠道传染病得到了控制,发病率下降。
辽宁锦县农村	主要对人粪、畜粪、禽粪和饲料缸所谓“三粪”一缸进行控制	主要用改进的笼诱法诱捕成蝇。	平均下降40~70%

(上接384页)

18. Christensen KK et al: J Infect Dis, 134: 317, 1976.
 19. 张泳等: 临床免疫与实验免疫, 1(4): 16, 1980.
 20. Chenoy CY: Singapore Med J, 16: 194, 1975.
 21. 国外医学情报, 17, 1981.
 22. Hallgren R et al: Ann Rheum Dis, 35: 306, 1976.
 23. Natali PG et al: Clin Immunol & Immunopath, 15: 76, 1980.
 24. Dorval G et al: J Immunol Methods, 7(2-3)

: 237, 1975.
 25. Cullen SE et al: J Immunol, 117(1): 136, 1976.
 26. 薛采芳等: 第四军医大学, 大连正常菌群SpA会议资料, 1981.
 27. 李爱芳等: 医学科学院流行病学微生物学研究所, 大连正常菌群SpA会议资料, 1981.
 28. 魏曦: 医学科学院流行病学微生物学研究所, 大连正常菌群SpA会议资料, 1981.