

# 应用葡萄球菌A蛋白-酶-抗体结合物 诊断流脑的初步研究

白求恩医科大学微生物教研室 李俊植

1981年Yolken<sup>[1]</sup>等首次报告了应用葡萄球菌A蛋白-酶-抗体结合物(SpA-Enz-IgG)检测感染轮状病毒和b型流感杆菌病人临床标本中的抗原。我们参考该氏方法,对诊断流脑做了初步探讨,结果较为满意,现报告如下:

## 材料及方法

一、菌株: 1.金黄色葡萄球菌 Cowan I株。2.脑膜炎双球菌:(1)A群:批号29018,长春生物制品研究所提供。(2)B群:29022,卫生部北京生物制品研究所提供。

二、流脑A群及B群多糖抗原:参照文献方法<sup>[2]</sup>——冻融法乙醇提取。多糖含量测定:蒽酮反应<sup>[3]</sup>。此批提取的A群多糖含量为456微克/毫升, B群多糖含量为276微克/毫升。

三、兔抗流脑A群、B群血清及其IgG:兔抗流脑A群、B群血清由长春生物制品研究所提供。抗流脑A群、B群IgG参考文献方法<sup>[4]</sup>提取。紫外光吸收法测定蛋白含量。

四、SpA的提取及鉴定:参考Jensen<sup>[5]</sup>和Grosv<sup>[6]</sup>等方法粗提SpA。并参考Hjelm<sup>[7]</sup>等方法亲和层析提纯SpA,测定蛋白含量(Lowry's法)。用岛津UV-210A型紫外仪扫描SpA,其扫描谱同文献<sup>[8]</sup>所载。聚丙烯酰胺凝胶电泳出现区带较宽、界限不甚清的两条带,经聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳证实,这两条带均系SpA。

五、辣根过氧化物酶酶联A蛋白(HRP-SpA)

HRP: Sigma VI,酶活性300单位/毫克, RZ=3.2。HRP-SpA参考Dubois-Dalcq<sup>[9]</sup>及Thoen<sup>[10]</sup>等过碘酸钠氧化法加以制备。HRP-SpA中SpA含量为0.2毫克/毫升。

六、SpA-Enz-IgG的制备

将0.2毫克HRP-SpA与0.5毫克抗流脑A群(或B群)IgG混合,37℃温育1小时后置4℃冰箱过夜。将此混合物过Sephadex G200柱(1.5×60厘米),用0.02M pH7.4PB平衡洗脱,流速6毫升/小时,1毫升/管收集。分别于280毫微米及403毫微米测定光密度。作ELISA,合并酶免疫测定(EIA)活性高的收集液,置-40℃冰箱保存备用。

七、ELISA检测流脑多糖抗原

应用SpA-Enz-IgG结合物ELISA检测流脑多糖抗原,其步骤及方法与“双抗体夹心法”类同。现简述如下:①包被抗血清:将兔抗流脑A群(或B群)血清用包被缓冲液(0.05 M pH9.6碳酸盐缓冲液)适当稀释后包被聚苯乙烯微量平板,置4℃14小时。并包被同样稀释度之正常兔血清作对照。②洗涤5次,每次3分钟。洗涤液:0.02M pH7.4PBS(含0.05% Tween20)。③加稀释抗原(或脑脊液)置37℃2小时。稀释液:PBS-Tween20含0.05%小牛血清。④洗涤:重复②。⑤加稀释的SpA-Enz-IgG置37℃2小时,稀释液同上。⑥洗涤:重复②。⑦加酶底物(邻苯二胺)置37℃30分钟。⑧加0.05毫升2MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。⑨分光光度计测定或肉眼观察判定结果。本实验经棋盘滴定,选择反应物最适稀释浓度。抗流脑A群血清包被稀释度为1:5,000,抗流脑B群血清包被稀释度为1:1,000。脑脊液标本均稀释4倍,SpA-Enz-IgG(A群和B群)均稀释1倍。ELISA反应系统中的反应物容积均用0.2毫升。

EIA活性及阳性结果判定标准: EIA活性=平均OD<sub>492</sub>毫微米(测定)-平均OD<sub>492</sub>毫微米(对照);若EIA活性>平均OD

492毫微米(对照)+2S.D. (或3S.D.)(11)时可判定为阳性。OD492毫微米值用改良72型光电分光光度计(北京第三分析仪器厂产)测定。

八、脑脊液标本: 在81年3~4月期间由本校第一临床医院及长春市儿童医院收集。本实验仅对26份A群流脑脑脊液和20份非流脑脑脊液做了EIA特异性活性比较。

### 结 果

一、制备SpA-Enz-IgG的最适反应剂量将0.2毫克HRP-SpA与四个不同剂量抗流脑A群IgG(0.5、1.0、2.0、4.0毫克)分别混合,37℃水浴1小时,取出后置4℃冰箱过夜。次日将此四个样品分别过同等规格的Sephadex G200,柱过柱条件同前所述。分别测定OD280毫微米及OD403毫微米,并绘制洗脱曲线(图1)。

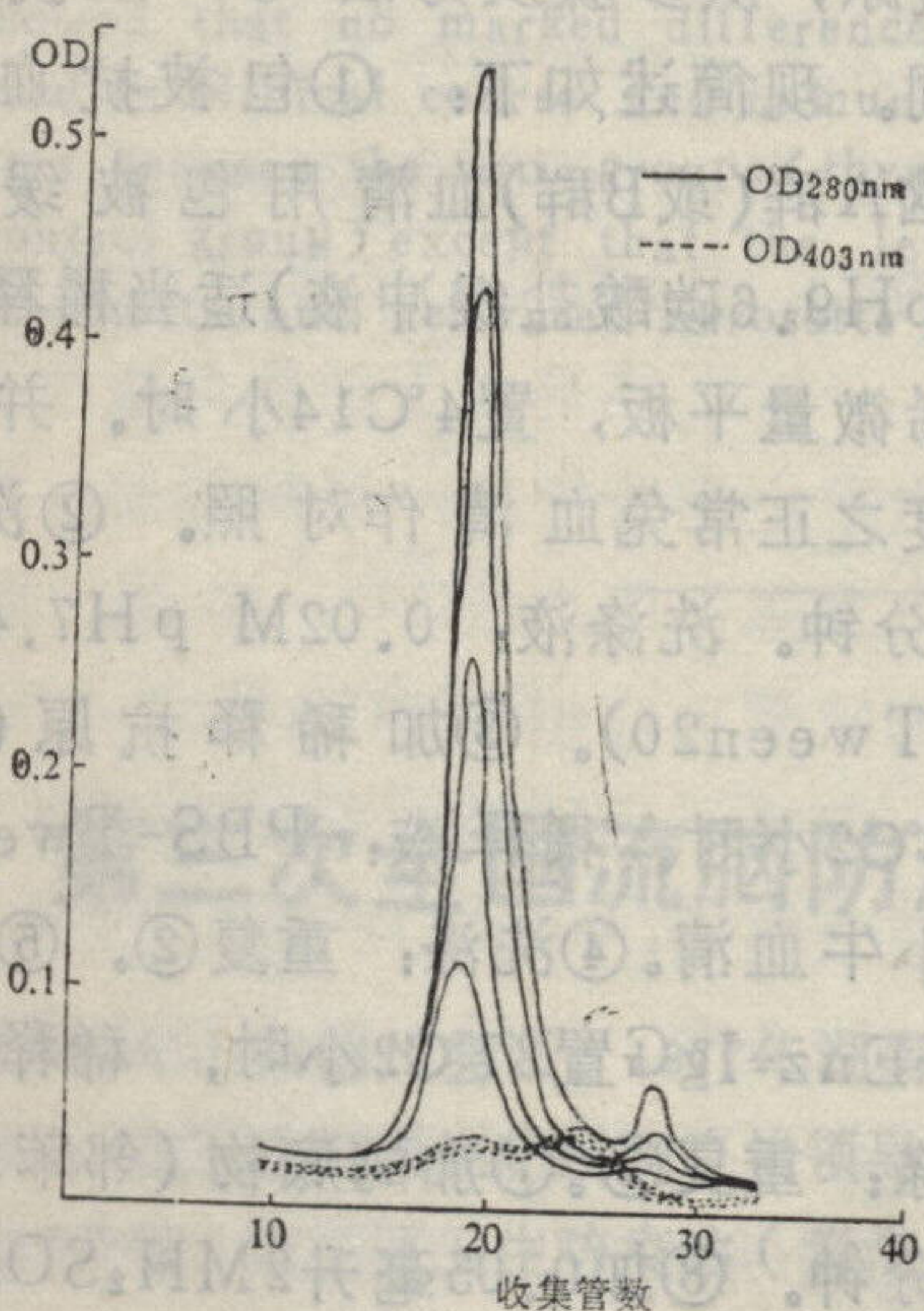


图1 Sephadex G200凝胶过滤4个不同剂量抗流脑A群IgG与SpA-Enz结合物之洗脱曲线

分别合并洗脱流出液(16~20管; 21~25管)作ELISA。肉眼判定ELISA结果,在半对数坐标纸上绘制剂量反应曲线(图2)。

从图2可见,16~20管洗脱流出液的EIA活性较21~25管高。选择0.5毫克抗流脑A群IgG与0.2毫克HRP-SpA结合的反应剂量最为适宜。据此,本实验在测定B群流脑多糖抗

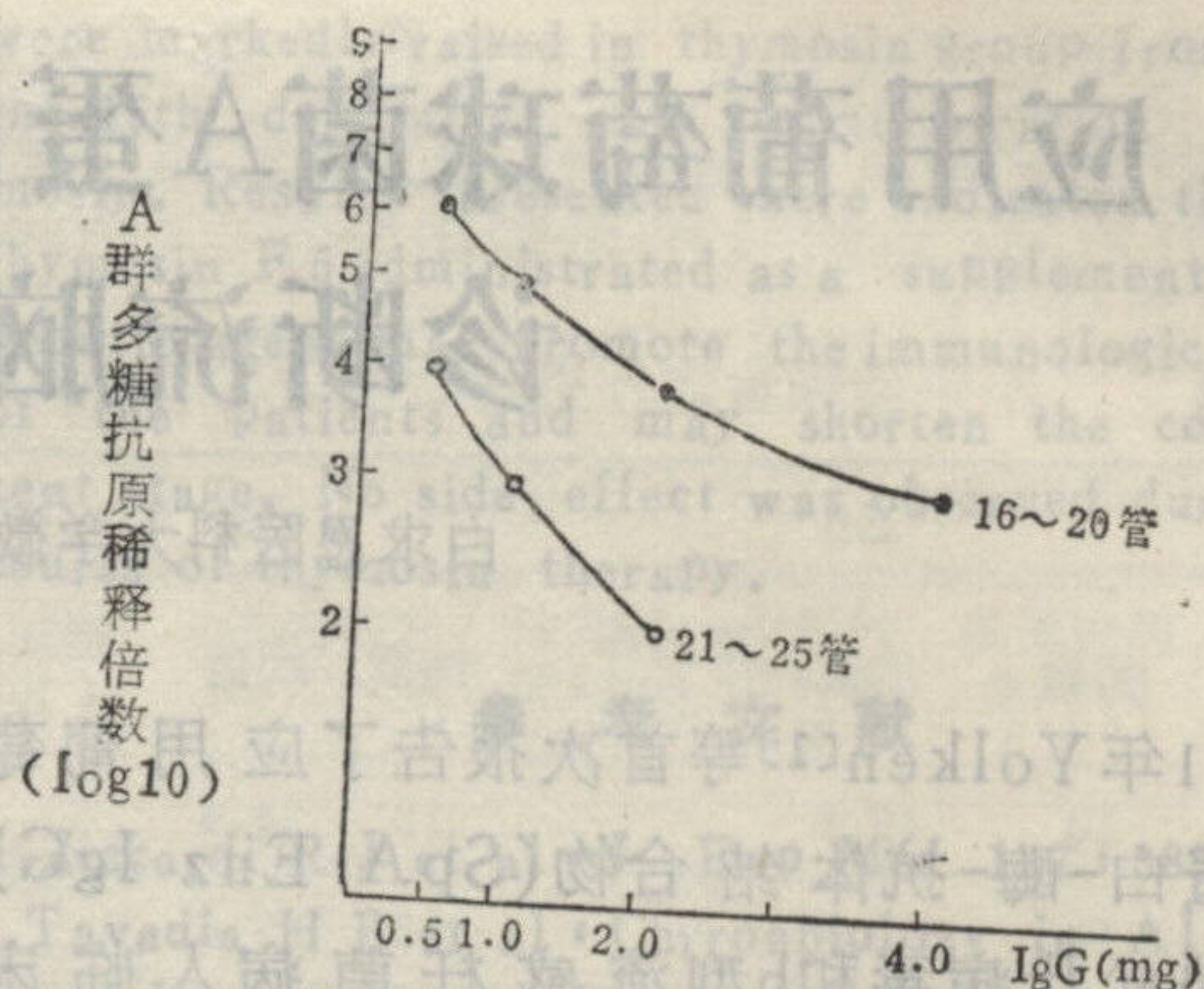


图2 SpA-Enz-IgG剂量反应曲线

原敏感性时,亦选择0.5毫克抗流脑B群IgG与0.2毫克HRP-SpA相结合的反应剂量。

### 二、敏感性测定

应用SpA-Enz-IgG(A群或B群)结合物ELISA检测A群或B群流脑多糖抗原,其敏感性分别为0.45毫微克/毫升(图3)和27.6毫微克/毫升(图4)。

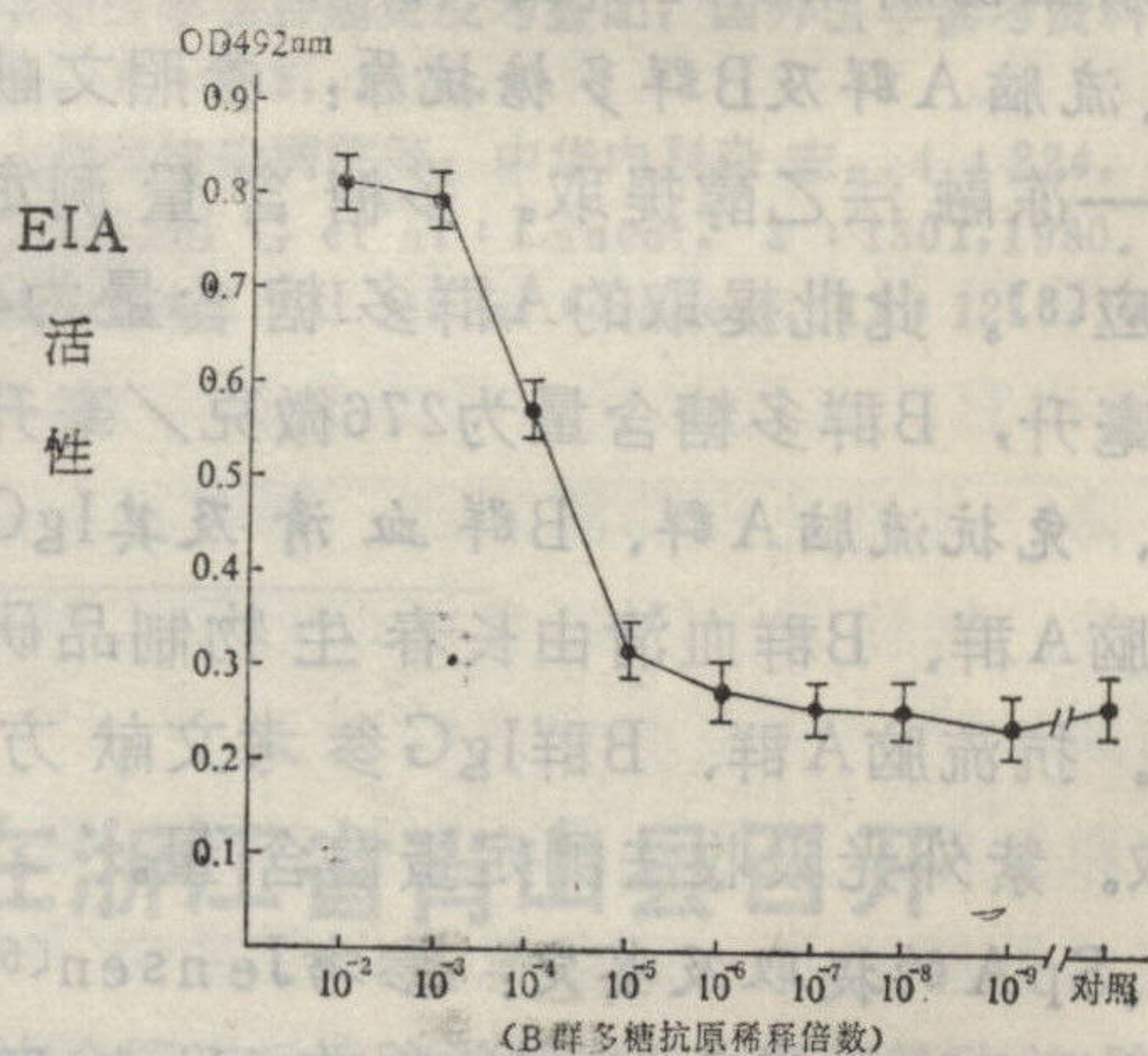


图3 SpA-Enz-IgG(A群)结合物检测A群流脑多糖抗原的敏感性

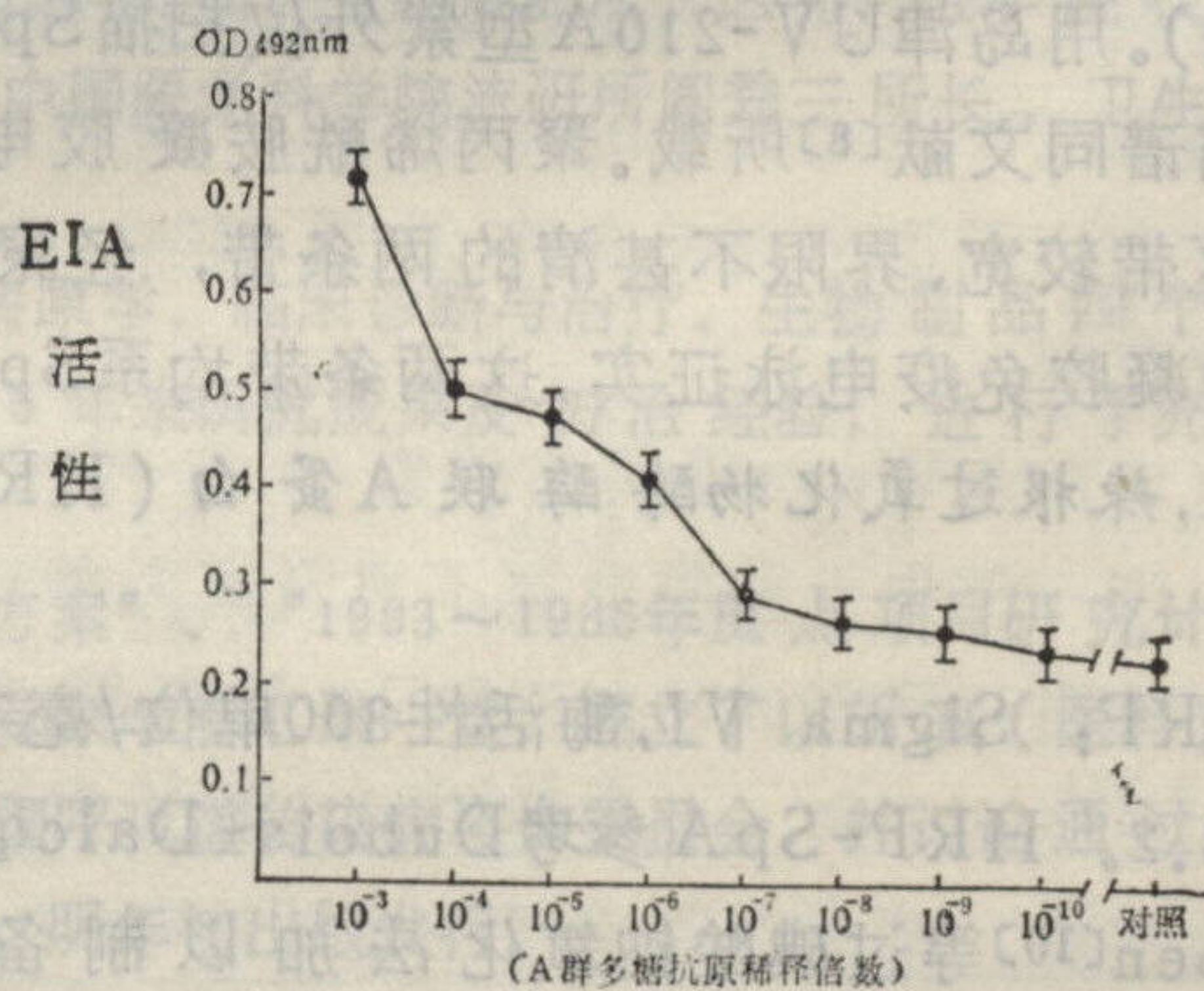


图4 SpA-Enz-IgG(B群)结合物检测B群流脑多糖抗原的敏感性

### 三、特异性检验

1.交叉试验: 分别将ELISA反应系统中的抗A群(B群)流脑血清、A群(B群)多糖抗原、SpA-Enz-IgG(A群或B群)相互交叉进行酶免疫测定,并设阳性对照及阴性对照。结果表明,群间无交叉反应。

2.空白试验: 用PBS-Tween分别代替反应系统中的抗原、底物、SpA-Enz-IgG及抗血清,分别作为抗血清对照、SpA-Enz-IgG对照、底物对照及抗原对照。结果均呈阴性。

3.取代试验: 以HRP-SpA取代SpA-Enz-IgG作ELISA,结果亦呈阴性。

### 四、流脑脑脊液中流脑多糖抗原的检测

经反向血凝试验鉴定的26份A群流脑脑脊液标本用SpA-Enz-IgG(A群)结合物作ELISA,25份呈阳性结果,阳性(符合)率为96%。以20份非流脑脑脊液作对照,均呈阴性结果。每份标本在一次试验中均设4份测定及4份对照组。阳性结果以EIA活性 $>$ 平均OD<sub>492</sub>毫微米(对照) $+3S.D.$ 为准。脑脊液标本的酶免疫测定特异性活性结果如图5所示。差异显著( $t=9.05, P<0.001$ )。

ostaphin处理富含SpA的金黄色葡萄球菌后纯化而得。本实验经“加热法”及亲和层析步骤获得了同样高纯度的SpA,但系异质性SpA。不过,从活性及纯度角度来看,进行酶交联等一系列试验,实验结果证实是完全可用的。

迄今文献报告<sup>[12,13]</sup>ELISA测定流脑多糖抗原均需进行对每一群多糖抗原相应的单一的特异抗体的酶标记。此等酶标记过程易发生抗体的聚合或降解而降低抗体的活性。酶标记SpA则可避免此一不足。只要标好一次HRP-SpA,即可通过简便的温育及凝胶过滤方法获得敏感而特异的SpA-Enz-IgG结合物。

本实验试用SephadexG200(Fine,瑞典产)代替SephacrylS200来分离SpA-Enz-IgG结合物和游离的IgG、HRP-SpA。虽然分离效果不太理想,只要控制好实验条件,就不难获得敏感而特异的SpA-Enz-IgG结合物。

应用SpA-Enz-IgG结合物检测流脑多糖抗原,经交叉试验、空白试验及取代试验证实是一种特异性的反应。其敏感性与国内报道的ELISA检查A群抗原敏感性(0.63毫微克/毫升)相近<sup>[13]</sup>。

SpA具有与正常人和许多哺乳动物IgG分子的Fc段结合的特性。利用这一特性,近年来国内外将它作为一种免疫学试剂,应用于免疫学和血清学的研究中,取得了广泛的进展。可以预料,以SpA-Enz-IgG结合物作诊断试剂检测临床标本中的微量抗原方面的研究工作,将会出现新的发展和提高。

### 摘要

应用SpA-Enz-IgG(A群和B群)结合物ELISA检测A群及B群流脑多糖抗原,其敏感性分别为0.45毫微克/毫升及27.6毫微克/毫升,经交叉、空白、取代试验证实是一种特异性反应。

应用SpA-Enz-IgG(A群)结合物ELISA检查

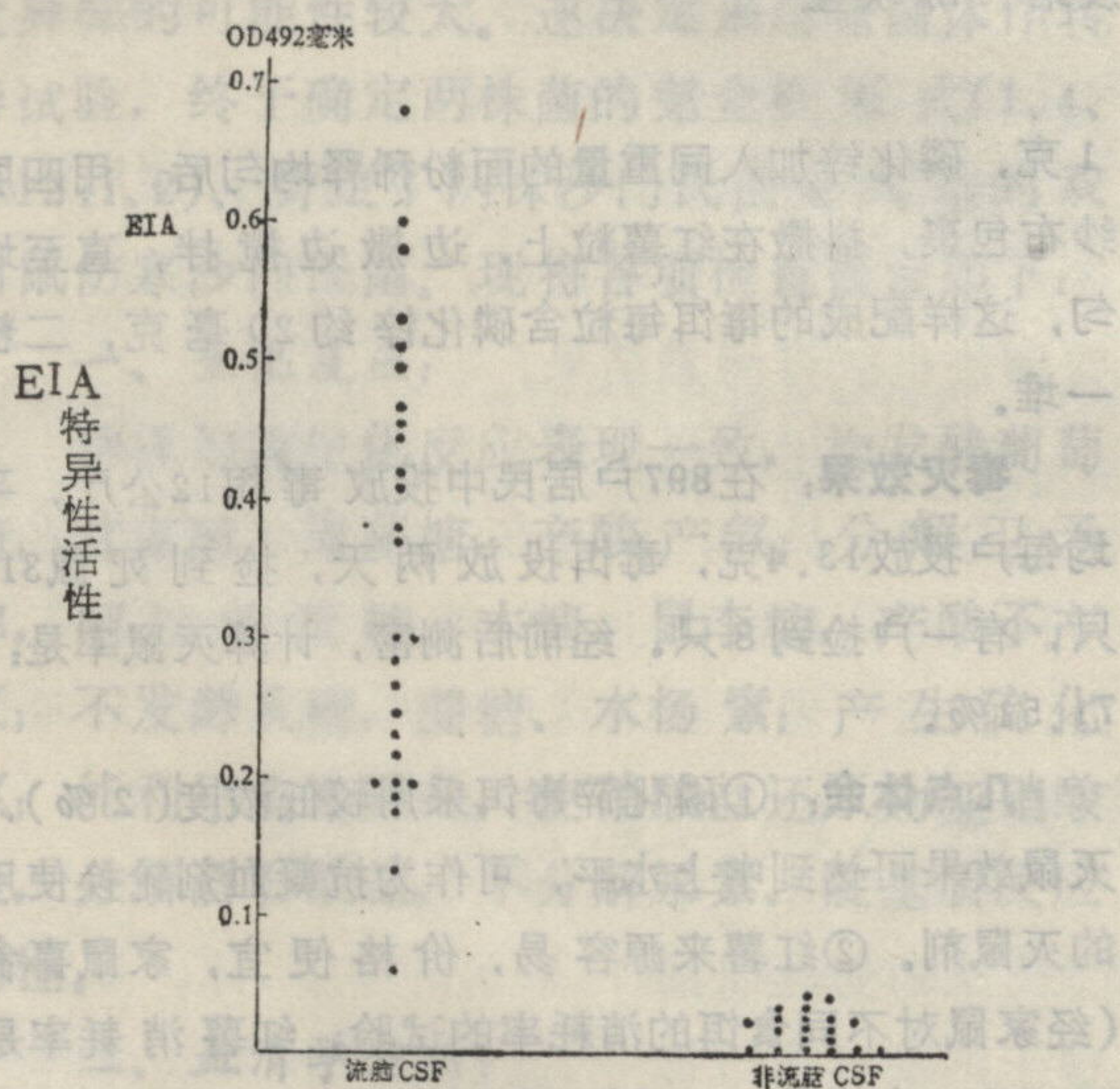


图5 脑脊液标本EIA特异性活性结果

### 讨论

目前,国内外提取SpA纯品多半用Lys-

26份A群流脑脑脊液，阳性数25份，其阳性(符合)率为96%。20份非流脑脑脊液均呈阴性结果。统计学处理差异非常显著。

ABSTRACT

ELISA with SpA-Enz-IgG was applied to the detection of polysaccharide antigens of groups A and B of meningococci. The result showed its sensitivity of 0.456ng/ml and 27.6ng/ml. The cross test, blank control and substitute test also indicated its specificity. 26 samples of CSF, collected from Patients suffering from meningitis of group A were examined with such a ELISA. 25 samples turned out to be positive (96%). Another 20 samples of CSF from non-meningitis were all negative. Accordingly, there was a statistically significant difference between the two sets of samples mentioned above.

参 考 文 献

1. Yolken RH et al : J Immunol Methods, 43 : 209,

1981.  
2. 北京药品生物制品检定所：流脑菌的抗原提纯及间接血凝试验方法，内部资料，1975。  
3. Diamond PS and Denman RF : Laboratory technique in chemistry and biochemistry, p 442, London Burtherwork, 1973.  
4. 北医微生物教研组：免疫学与免疫化学技术，143页，194页，1976。  
5. Jensen K : Acta Pathol Microbiol Scand, 44:421, 1958.  
6. Grov A et al : Ibid, 61 : 588, 1964.  
7. Hjelm H et al : FEBS Lett, 28 : 73, 1972.  
8. Sjöquist J et al : Ibid, 29 : 572, 1972.  
9. Dubois-Dalcq M et al : J Histochem Cytochem, 25 : 1201, 1977.  
10. Thoen CO et al : J Clin Microbiol, 11 : 499, 1980.  
11. Savigny D de and Voller A : in: Immunoenzymatic assay techniques, R. Malvano (ed.), Nijhoff Publishers, P116, 1980.  
12. Beuvery EC et al : Lancet, ( 1 ) : 208, 1979.  
13. 扬天英等：中华流行病学杂志, 2 ( 4 ) : 266, 1981.

低浓度磷化锌红薯灭家鼠简报

福建省卫生防疫站 詹绍琛 云霄县卫生防疫站 ( 吴良德  
龙溪地区卫生防疫站 陈坎生

磷化锌是一种老的急性灭鼠剂。它毒力中等，毒效较速，对大多数鼠种有效，使用简便，货源也较充足。但过去由于使用浓度过高(3~5%，甚至5%以上)引起适口性差，灭效下降和易引起家禽、家畜误食中毒等问题。如何合理使用磷化锌，发挥它在灭鼠中的作用是值得研究的一个问题。我们在1979年5月23日至28日在福建云霄县城关红星街道进行了低浓度磷化锌红薯灭家鼠的试验，今简报如下：

采用2%的浓度：根据磷化锌对黄胸鼠的半数致死量是27.6毫克/公斤，而对褐家鼠是40.5毫克/公斤，对小家鼠的全致死量是150~200毫克/公斤。按家鼠毒饵使用浓度=半数致死量×0.04公式计算(汪诚信：灭鼠概论)，以体重最大的褐家鼠为例：40.5×0.04=1.62，也就是1.62%浓度就已够。过高没有必要(经试验：1%浓度的毒饵比4%浓度的毒饵适口性明显较好，平均每只鼠吃毒饵量高2.2倍)。

毒饵配法：把红薯去皮切成小立方块，每粒重约

1克，磷化锌加入同重量的面粉稀释均匀后，用四层纱布包裹，抖撒在红薯粒上，边撒边搅拌，直至均匀，这样配成的毒饵每粒含磷化锌约20毫克，二粒一堆。

毒灭效果：在897户居民中投放毒饵12公斤，平均每户投放13.4克，毒饵投放两天，捡到死鼠311只，有一户捡到8只。经前后测密，计算灭鼠率是：71.51%。

几点体会：①磷化锌毒饵采用较低浓度(2%)，灭鼠效果可达到中上水平，可作为抗凝血剂轮换使用的灭鼠剂。②红薯来源容易，价格便宜，家鼠喜食(经家鼠对不同食饵的消耗率的试验，红薯消耗率是27.3%，大米是18.8%)，配制简便，不用食用油作粘作剂，可节约主粮和油类，易于推广。③由于浓度低，投毒后又加强管理，本次虽于城镇施毒，却未发生禽畜中毒事故。