

应用抗白蛋白单价免疫血清作对流免疫电泳 鉴定蚊胃血血源*

中国预防医学中心寄生虫病研究所**

黄文洲 罗曼珍 潘嘉云

判定蚊媒食性，是虫媒疾病流行病学调查研究的重要内容之一。蚊虫胃血鉴定，通常采用环状沉淀试验^[1~6]。1981~82年我们曾试用抗白蛋白单价免疫血清鉴定蚊胃血，其敏感性不低于环状沉淀试验。

材料与方法

一、抗血清的制备：选体重2.5~4.0kg健康家兔为免疫动物，分别取人、牛、马、羊、猪的新鲜血清100ml，在搅拌下滴加78%饱和硫酸铵100ml，4℃冰箱中过夜，取其上层清液，在搅拌下每100ml加入21克硫酸铵，4℃冰箱中过夜。用单层尼龙纱(260孔/吋)加双层滤纸抽滤，将沉淀物洗下装入透析袋内，先经流水透析1次，以后用生理盐水透析，每2小时换液1次，至除去硫酸根或铵离子时止。以电扇轻吹浓缩至约10ml，冰冻干燥后即成血清白蛋白冻干物，重量约1克。分别取上述动物血清白蛋白25mg或全血清0.25ml，pH7.4磷酸盐缓冲液2.5或2.25ml，各加入福氏全佐剂或半佐剂2.5ml，搅拌成乳状。按如下二法制备抗白蛋白血清及抗全血清血清。

1. 腹壁后腿法：第1周以含福氏全佐剂-白蛋白或全佐剂-全血清每兔1ml分10点(腹壁4点、两后腿外侧各2点及两后足垫各1点)皮下注射，以后每周每兔以含福氏半佐剂-白蛋白或半佐剂-全血清1ml分8点(腹壁4点及两后腿外侧各2点)皮下注射1次。

2. 足垫法：第1周用全佐剂-白蛋白或全佐剂-全血清每兔1ml分6点(腹壁4点及两后足垫各1点)注射，以后每周半佐剂-白蛋白或

半佐剂-全血清每兔1ml分2点(两后足垫各1点)注射1次。

上述5种动物血清白蛋白或全血清抗原均以以上二法各免疫家兔1只，免疫开始后每周抽血用环状沉淀试验测定抗体效价，至效价达 $\geq 1:32$ (抗原为1:5000)时放血分离血清^[7]，经测定证明无交叉反应后使用。

二、试验抗原：1. 同种动物血清；2. 实验室饲养的中华按蚊离体刺吸已知动物血的胃血滤纸标本；3. 现场采集于江苏省邳县岱山公社吸饱血的中华按蚊胃血滤纸标本。

试验时，剪下胃血滤纸标本浸泡于生理盐水1或2ml中1小时后进行鉴定，估算抗原稀释度分别为1:1000及1:2000^[7]。

三、对流免疫电泳：按琼脂板宽度每cm 4mA电流强度电泳1.5小时后记录初步结果，置室温24小时后再次记录结果。以抗原与抗体两孔间出现乳白色沉淀线为阳性反应。电泳仪为可控硅半导体Dy-1型，上海注射针二厂出品。

四、环状沉淀试验：按常用的发酵管法，使用1:16稀释度的抗全血清血清，加样后于37℃恒温箱中反应1小时后观察结果^[8]。

结果

一、两种制备抗血清方法的效果

两类抗原福氏佐剂腹壁后腿注射法与足垫

*本研究得到联合国开发计划署/世界银行署/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持。

**世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心

注射法各免疫家兔10只，全部兔的抗体效价均于第5次免疫注射后达到常规试验所需的 $\geq 1:32$ (抗原为 $1:5000$)，需时35天，两法效果相似。

二、两种抗血清检测效果的对比

以抗体效价相同的抗羊白蛋白血清及抗羊全血清血清进行对流免疫电泳，对比检测各种浓度的羊血清抗原。

1. 抗血清稀释度 抗原为 $1:500$ 及 $1:1000$ ，检出全数抗原标本所需的抗血清稀释度，抗白蛋白血清为 $1:64$ ，抗全血清血清为 $1:4$ ，相差4个倍比稀释度，前者的反应敏感性较后者高16倍(表1)。抗原为 $1:2000\sim 1:4000$ ，前者仍为 $1:64$ ，后者需 $1:2$ 才能检出全数抗原标本，相差5个倍比稀释度；抗原为 $1:8000$ ，前者以 $1:4$ 可检出全数抗原标本，后者不稀释亦未能检出全数标本。

表1 两种抗血清用于对流免疫电泳检测结果

稀释度	抗血清种类	抗 原			
		1:500		1:1000	
		标本数	阳性数 %	标本数	阳性数 %
0	全血清	31	31 100	31	31 100
	白蛋白	33	33 100	33	33 100
1:2	全血清	51	51 100	51	51 100
	白蛋白	51	51 100	51	51 100
1:4	全血清	51	51 100	51	51 100
	白蛋白	51	51 100	51	51 100
1:8	全血清	51	30 58.8	51	26 51.0
	白蛋白	51	51 100	51	51 100
1:16	全血清	52	7 13.5	52	4 7.7
	白蛋白	48	48 100	48	48 100
1:32	全血清	54	0 0	54	0 0
	白蛋白	54	54 100	54	54 100
1:64	全血清	64	0 0	64	0 0
	白蛋白	58	58 100	58	58 100
1:128	全血清	54	0 0	54	0 0
	白蛋白	54	53 98.1	54	53 98.1

2. 抗原稀释度：抗血清为 $\leq 1:2$ ，抗白蛋白血清与抗全血清血清检出全数标本的最低抗原浓度分别为 $1:8000$ 与 $1:4000$ ；抗血清为 $1:4$ ，分别为 $1:8000$ 及 $1:1000$ ；抗血清为

$1:8\sim 1:16$ ，前者为 $1:4000$ ，后者已不能全数检出任何浓度的抗原标本；抗血清为 $1:32\sim 1:64$ ，前者仍为 $1:4000$ ，后者不能检出任何浓度抗原标本。

3. 反应强度 以抗原与抗体间出现的白色沉淀线细而清晰可见者为 $+$ ，粗大者为 $++$ ，粗大浓厚者为 $+++$ ，分别记录结果。抗白蛋白血清各种稀释度都出现为数较多 $++$ ，尚见少数 $+++$ ；抗全血清血清各种稀释度反应大多数为 $+$ ，少数为 $++$ ，未见 $+++$ 反应。如以 $1:2$ 抗血清检测相同的51份 $1:500$ 抗原标本， $+\sim +++$ 前者分别为7.8、80.4及11.8%，后者为96.1、3.9及0%。

三、两种鉴定方法检测效果的对比

(一) 已知血清抗原的检测 以环状沉淀试验与对流免疫电泳分别使用上述两种抗血清对比检测各种浓度羊血清标本。抗原为 $\leq 1:2000$ ，检查33~58份标本，检出全数抗原标本的最低抗血清稀释度环状沉淀试验为 $1:16$ ，对流免疫电泳为 $1:64$ ；抗原为 $1:4000$ ，两者分别为 $1:4$ 及 $1:64$ 。两者相差2和4个倍比稀释度，表明以抗白蛋白血清作对流免疫电泳的敏感性较环状沉淀试验为高。

(二) 蚊胃血滤纸标本鉴定

1. 中华按蚊离体刺吸羊血的胃血标本，冰箱干燥保存7个月，以环状沉淀试验(按常规法用 $1:16$ 抗全血清血清)与对流免疫电泳(用 $1:32$ 抗白蛋白血清)对比检测。胃血稀释度约 $1:1000$ 及 $1:2000$ 各276份标本，两种稀释度的羊血反应阳性率两法均为100%。对流免疫电泳1小时、1.5小时及电泳1.5小时后再置室温下24小时，3种时间记录的结果完全一致，表明以抗白蛋白血清作对流免疫电泳检测，电泳1~1.5小时即可。

为了解两法的特异性，又同时对比鉴定离体刺吸羊血或猪血的中华按蚊胃血标本各48份，羊血或猪血阳性率两法均为100%。但以环状沉淀试验检查的羊血与猪血各48份标本中分别有4份及2份同时出现牛血或人血阳性反

应, 合计其他血阳性率为6.3%, 而对流免疫电泳未见此种现象。

2. 现场蚊胃血标本, 冰箱内保存8个月后以两法对比鉴定, 对流免疫电泳以1:16或1:32

抗白蛋白血清鉴定1:1000及1:2000胃血标本与环状沉淀试验以1:16抗全血清血清鉴定的结果相似; 但两法均使用1:32抗血清时, 则阳性的检出率前法明显高于后法(表2)。

表 2 现场中华按蚊胃血标本对比鉴定结果

编号	试验方法	抗血清		胃血 稀释度	试验 标本 数	阳性反应					阴性反应			
		种	类			稀释度	人	牛	猪	人 牛	人 猪	合计	%	标本 数
1	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:16	1:1000	1145	22	371	131	1	1	526	45.9	619	54.1
	环状沉淀	抗全血清	1:16			22	370	130	2	2	526	45.9	619	54.1
	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:16	1:2000	1145	22	368	131	0	1	522	45.6	623	54.4
	环状沉淀	抗全血清	1:16			22	367	130	0	2	521	45.5	624	54.5
2	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:32	1:1000	1329	121	0	1083	0	1	1205	90.7	124	9.3
	环状沉淀	抗全血清	1:16			121	0	1083	0	1	1205	90.7	124	9.3
	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:32	1:2000	1329	122	0	1083	0	0	1205	90.7	124	9.3
	环状沉淀	抗全血清	1:16			122	0	1083	0	0	1205	90.7	124	9.3
3	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:32	1:1000	540	36	0	451	0	0	487	90.2	53	9.8
	环状沉淀	抗全血清	1:32			36	0	325	0	0	361	66.9	179	33.1
	对流免疫电泳	抗白蛋白	1:32	1:2000	540	36	0	450	0	0	486	90.0	54	10.0
	环状沉淀	抗全血清	1:32			36	0	303	0	0	339	62.8	201	37.2

讨 论

对流免疫电泳以抗白蛋白血清及抗全血清血清平行对比检查, 血清抗原为1:500~1:4000, 检出全数抗原标本所需抗血清的最低浓度, 前者较后者低4~5个倍比稀释度; 抗血清同为 $\leq 1:4$, 检出的最低抗原浓度前者较后者低1~3个倍比稀释度, 且阳性反应强度前者明显强于后者。表明以抗白蛋白血清作对流免疫电泳检测血源, 反应敏感度比使用抗全血清血清有显著的提高。其可能的原因, 为白蛋白是血清中的主要成分, 约占血清总蛋白量的50%; 对流免疫电泳时血清白蛋白分子相对较小, 其等电点与电泳所用溶液的pH8.6相距较其他血清蛋白成分远, 带电荷较多, 电泳时迁移的速度较快而位于各种血清蛋白成分的最前列, 成为对流免疫电泳参与免疫反应的主要抗原成分。制备抗白蛋白单价免疫血清代替通常使用的抗全血清免疫血清作对流免疫电泳正是针对这一特点, 目的在于改变抗血清中参与免

疫反应的主要抗体成分, 即以单价抗白蛋白的抗体代替抗全血清血清中的抗多种血清蛋白抗体, 增加参与反应的抗体量从而提高免疫反应的敏感性。这一设想, 通过上述的实验得到了初步的证实。

用于现场采集的蚊胃血标本的鉴定, 亦证实检测效果与环状沉淀试验一致, 其敏感性及特异性均不低于环状沉淀试验。此外, 此法抗原抗体用量省, 反应的标本经氨基黑染色后可长期保存。但此法需用电泳仪、槽等设备, 在广泛使用上尚可能受到一定的限制。

摘 要

以抗白蛋白单价免疫血清作对流免疫电泳试用于蚊胃血血源的鉴定, 以抗全血清免疫血清作对照。抗原为1:500~1:4000, 检出全数抗原标本所需最低抗血清的浓度前者为1:64, 后者为1:2~1:4。抗血清为 $\leq 1:4$, 检出最低的抗原浓度前者为1:8000, 后者为1:1000~1:4000。以1:16和1:32稀释度抗白蛋白血清作对流免疫电泳, 鉴定276份离体吸羊血及1,145和1,329份现场采集的中华按蚊胃血

标本,以1:16抗全血清免疫血清作环状沉淀试验同时对比。结果两种方法的阳性检出率离体吸羊血标本均为100%,现场标本分别为46%及91%。两法检测的结果相一致。证明以抗白蛋白单价免疫血清作对流免疫电泳是鉴定蚊胃血血源的又一有效方法。

ABSTRACT

Counterimmunoelectrophoresis (CIEP) with monospecific antiserum against serum albumin (MASA) was tried to identify the host source of mosquito blood meals. The antiserum against whole serum (AS) was used as control. The lowest concentration of MASA for the detection of antigens at 1:500-1:4,000 was 1:64, while that of AS was 1:2-1:4. with MASA at the dilution $\leq 1:4$, the lowest detectable concentration of antigen was found to be 1:8,000, while with AS, 1:1,000-1:4,000. 276 blood meal specimens from *Anopheles sinensis* fed fresh sheep blood through a membrane and two lots of specimens (1,145 and 1,329 samples respectively) collected from field were examined by CIEP with 1:16 and 1:32 diluted MASA and by precipitin ring test (PRT) with

1:16 AS at the same time. The positive rates of fed specimens were both 100% while that of two lots of field specimens were 46% and 91% respectively. The results of the two methods were in good agreement. Authors suggested CIEP with MASA was proved to be another effective method for identification of mosquito blood meals.

参 考 文 献

1. McKinney RM et al: Am J Trop Med Hyg, 21:999, 1972
2. Tempelis CH et al: Am J Trop Med Hyg, 21:238, 1972
3. Washino RK et al: Am J Trop Med Hyg, 21:120, 1972
4. Boorman J et al: Bull Entomol Res, 67:305, 1977
5. Burkot TR et al: Am J Trop Med Hyg, 30:1336, 1981
6. Edrissian GH et al: Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 76:54, 1982
7. 黄文洲等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 2:39, 1984
8. 中国医学科学院寄生虫病研究所: 实用疟疾学, 88~91页, 人民卫生出版社, 1978年

4,516例老年人住院患者疾病统计分析

锦州市第一医院 申德鑫 赵颖光 马孝珍

由于生活水平的不断提高,我国人民平均期望寿命普遍延长,因此老年保健日益受到重视。本文收集了我院1978年1月至1982年12月间住院的60岁以上老年患者的病历资料,以各科患者所患主要疾病作为统计病种(缺精神病和传染病)。15~59岁年龄组各科住院患者病例作为对照组。

一、老年人的常见病:发病率高的是:慢性支气管炎(11.4%)、高血压(8.8%)、各种肿瘤(8.1%)、胆道感染(7.1%)、冠心病(6.7%)、白内障(4.6%);其次为肺炎(3.3%)、阑尾炎(3.1%)、脑血栓形成(3.1%)、各种骨折(3.1%)、青光眼(2.8%)、疝(2.6%)、前列腺肥大(2.5%)、外伤(2.4%)等。

二、发病趋势与性别、年龄比:五年间共收治老年住院患者4,516例,占同期住院患者总数的14.5%,老年住院患者有逐年增加趋势。男女比例为1.35:1;年龄以60~79岁组为最多占95.2%,80岁以上者最少占4.8%。

三、老年人住院患者病死率:五年间60岁以上患者共死亡388例,病死率8.6%,是同期59岁以下住院患者(不包括儿科)的2.9倍,病死率有逐年下降趋势,各年度差异显著(P<0.01)。年龄和病死率成正比;以高血压(主要是脑出血)病死率最高,次为慢性支气管炎(主要是肺心病)、肿瘤、冠心病(主要是急性心肌梗塞)、肺炎等。80岁以上者无一例死于冠心病。