

酶联免疫吸附试验检查脑膜炎球菌A群抗原

河南省卫生防疫站 杨天英 周用直 张 锦 朱宝兰 李明寅

酶联免疫吸附试验(简称ELISA)是七十年代发展起来的一种新的检测技术。我们最近应用这一技术检测脑膜炎球菌A群特异抗原已取得了成功经验。此方法比反向血凝、对流免疫电泳均敏感,与最近国外报导^[1]相似,但国内尚未见到报导,现将我们的结果整理如下:

材料和方法

一、提取抗流脑A群IgG:按文献^[2]方法,用武汉生物制品研究所出品之批号80-1流脑A群诊断血清提取。提纯物的蛋白含量5.9毫克/毫升。

二、酶结合物制备:按戊二醛二步法^[3]结合,每10毫克辣根过氧化物酶(德国产RZ=2.4)结合5毫克流脑A群抗体IgG。

三、应用ELISA检测流脑A群抗原的方法:将上述提取的流脑A群抗体IgG,用包被缓冲液稀释至30微克/毫升包被在聚苯乙烯板孔内(上塑三厂出品,4×10孔),每孔0.1毫升,4℃冰箱过夜。第二天取出后用洗涤液洗三次,然后加待检标本。从1:5开始倍比稀释,每孔0.1毫升,置37℃恒温箱内一小时。取出后再洗三次,加酶抗体结合物(1:1000稀释)每孔0.1毫升,置37℃1小时,取出后再洗五次,然后加底物(联大茴香胺)每孔0.1毫升,置室温暗盒内30分钟肉眼观察结果。每板均设有阳性抗原和阴性血清对照,依其显色深浅分别记以#、卅、廿、十、一。以十以上者为阳性。

四、反向血凝试验(RPHA):按文献^[2]方法于1980年1月制成的双醛法致敏的抗体血球,和对照血球的冻干制剂。效价1:1280000。

五、对流免疫电泳(CIE):按常规法进行。

六、A群抗原:冻干流脑提纯多糖菌苗(北京生物制品研究所出品,批号7918-2)每支加蒸馏水0.5毫升溶解为原液,内含抗原1000微克。

七、标本:

1.模拟标本:在已知的阴性标本中加入A群抗原。取阴性血清4份,阴性浓缩尿4份,各加入抗原1份为实验的第一孔。血清或尿稀释度均为1:5。抗原稀释度为1:20万。

2.流脑病人标本:于80年2~3月在郑州市传染病医院和部分县医院,从临床诊断为流脑患者中采取早期血62份,尿75份。尿按文献^[2]方法浓缩10倍,所有血清标本均56℃30分钟灭活备用。

3.其他病人标本:共50份,作为对照。

结 果

一、ELISA与其他方法敏感性与特异性的比较:

1.敏感性:

①三种方法检测已知抗原的比较:ELISA、RPHA和CIE三种方法检测已知的A群抗原的实验结果说明了ELISA最敏感。它比反向血凝高1.5倍或以上,比对流免疫电泳高约300倍(表1)。

表1 三种方法检测已知抗原的比较

方 法	最高阳性稀释度	检出抗原的最低浓度
ELISA	1:320万	0.63毫微克/毫升
RPHA	1:128万	1.56毫微克/毫升
CIE	1:10240	195.3毫微克/毫升

②三种方法检测阳性病人和模拟标本的比较(表2)。

表2说明仍以ELISA最敏感,对流免疫电泳敏感性最差。

表2 三种方法检测模拟的和病人阳性标本的比较

	份数	ELISA		RPHA		CIE	
		阳性数	GMT	阳性数	GMT	阳性数	
模拟标本	血清	4	4	1:40	2	1:3.76	0
	尿	4	4	1:40	4	1:33.6	0
病人阳性标本	血清	5	5	1:52.8	4	1:8	1
	尿	5	5	1:69.6	5	1:9.2	0

2. 特异性:

①抑制试验: 将抗流脑A群抗体IgG(蛋白含量5.9毫克/毫升)自1:2倍比稀释到1:1024, 每管0.1毫升, 共两排。分别加入1:80万和1:160万稀释的A群抗原, 每管0.1毫升混匀, 于37°C作用2小时后取出, 按上述ELISA方法检测抗原, 以不加抗体者为对照。结果表明, 抗体对抗原显示了特异性的显色抑制反应(表3)。

表3 抗体对抗原特异显色反应的抑制

抗原稀释度	抗体稀释度										不加抗体对照	
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
1:160万	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	卅
1:80万	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	—	卅

②检查下列非流脑患者和其他病人的血清: 伤寒27份, 钩体5份, 乙脑5份, 肺炎双球菌脑膜炎1份, 结核性脑膜炎1份, 麻疹合并肺炎1份以及正常人尿10份所得的ELISA的实验结果全为阴性。

表4 二种方法检查血和尿的比较

方法	血				尿			
	份数	阳性数	阳性率(%)	GMT	份数	阳性数	阳性率(%)	GMT
ELISA	62	36	58.1	4.35	75	62	82.7	13.54
RPHA	62	14	22.6	1.34	75	25	33	2.13

$\chi^2 = 16.96 \quad P < 0.01 \quad \chi^2 = 31.84 \quad P < 0.01$

二、ELISA和RPHA二种方法的比较: 对流脑病人的血清62份和尿75份的检查结果见表4。由表4可见, ELISA查病人血清或尿

的阳性率和几何平均滴度均较RPHA为高, 而且差别显著。

讨 论

用ELISA和RPHA同时测定脑膜炎球菌A群抗原, ELISA滴度为1:3200000, RPHA滴度为1:1280000, 前种方法灵敏度高1.5倍以上。所测抗原最低浓度为0.63毫微克/毫升, 与Beuvery氏报导^[1]相似。

酶标记抗流脑IgG的免疫活性和酶的活性好是提高ELISA灵敏度的关键之一。我们采用戊二醛二步法制备酶结合物的效果较好, 使用稀释度是1:1000, 经-45°C保存半年, 效价未降低。

我们发现聚苯乙烯板质量不同(如不同批号或同批号不同板)对显色反应有一定影响, 故每批反应板应先行预试。

我们认为, ELISA检查流脑A群抗原的敏感性和特异性均较满意。比现有的检查流脑抗原的血清学方法敏感, 而且结果稳定, 实验操作简单, 实验条件不复杂, 报告结果快, 一般只需4小时。因此该方法作为流脑早期快速诊断的辅助方法是有价值的。

由于检查病人尿比查血得到了更高的阳性率, 我们觉得今后应加强对尿液的检查, 这不仅取材容易, 而且增加了病人确诊的机会。

小 结

1. ELISA检查脑膜炎球菌A群抗原的滴度为1:3200000, 比RPHA高1.5倍, 比CIE高300倍。

2. ELISA检查临床诊断为流脑病人的血清62份, 其阳性率为58.1%, 比RPHA高1.5倍; 检查75份病人尿的阳性率为82.7%, 也较RPHA敏感。检查非流脑病人的血清40份和尿10份, ELISA皆为阴性反应。

(本工作承胡真副研究员及李羽、付炳南同志给予指导, 特此致谢)

参 考 文 献

1. Beuvery EC et al: Lancet, (1): 208, 1979.
2. 中国医学科学院流研所流脑组等: 以反向被动血凝检查流脑A、B、C群抗原, 内部资料, 1979.
3. Avrameas S et al: Immunochem, 8: 1175, 1971.

柴达木盆地蚊虫调查

青海省卫生防疫站虫媒传染病组

柴达木盆地草原蚊虫数量多, 活动猖獗, 有的农场不得不缩短工作时间, 有的工人用泥土涂抹皮肤防蚊, 严重影响工作和休息。1956~58年为有效地开展盆地灭蚊, 我们首先对大柴旦等13个工作点进行了蚊虫种类及生态习性的调查, 现将结果简述如下:

一、蚊虫种类: 初步鉴定有以下三属六种:

1. 背点伊蚊 *Aedes (O.) dorsalis* Meigen.

2. *Aedes* sp: 据形态、地理分布和生态, 认为隶属伊蚊属 (*Ochlerotatus* 亚属。其形态既象背点伊蚊又类似里海伊蚊 (*Aedes (O.) Caspius Caspius (pallas)* Edw.) 待进一步鉴别定名。依成蚊体色, 我们暂称其为新黄色伊蚊。

3. 屑皮(碎岩)伊蚊 *Aedes (O.) detritus* Haliday.

4. 黄色伊蚊 *Aedes (O.) flavescens* Muller.

5. 阿拉斯加脉毛蚊 *Culiseta alaskaensis*.

6. 凶小(谦逊)库蚊 *Culex (B) modestus* Ficalbi.

二、幼虫孳生地及其消长调查: 依孳生地积水性质和咸淡分三类:

1. 湖边芦苇和盐碱滩积水: 积水中含氯量为5.7~45.9克/升, pH8.2~8.4。孳生蚊种为屑岩伊蚊及黄色伊蚊。四月下旬发现幼虫, 五月末六月初积水面积最广, 幼虫密度平均为35只/勺(400毫升)。六月下旬积水开始减少, 七月中旬渐干或干涸, 因此第二、三代幼虫通常在羽化为成蚊之前死亡。

2. 泛浆地带积水: 含氯0.7~13.9克/升, pH7.6~8.4主要有背点伊蚊孳生, 在与盐碱地相近的地方常有屑岩伊蚊。当泛浆地带晚春解冻时积水连绵

不断, 四月下旬发现1~3龄幼虫, 五月中旬积水面广, 普遍成为孳生地, 每勺平均50~100只, 最多一勺1,085只, 下旬化蛹, 大量幼虫羽化为成虫后(六月下旬), 幼虫密度下降, 新生幼虫, 七月孳生地减少, 甚至变为零。在这三个月期间可繁殖2~3代; 最后一代因水干而死亡。

3. 沼泽地和积水坑: 含氯量为0.1~0.4克/升, pH为7.4~8.0。属永久性积水、水清透明温度低。棕色伊蚊四月下旬出现, 五月孳生地增多, 六月上旬见蛹, 羽化后未见新生幼虫, 繁殖一代。六月中旬发现阿拉赛蚊卵块和新生幼虫, 七月中旬蛹化, 羽化后不见新生幼虫, 也繁殖一代。七月见谦逊库蚊幼虫, 八月下旬见蛹。

三、成蚊栖息场所及其活动: 成蚊活动季节为四月中旬到九月下旬, 第一个高峰在五月末六月初, 由阿拉赛蚊(雌)形成, 第二高峰为七月中旬, 由屑岩伊蚊、背点伊蚊形成, 有的地区黄色伊蚊也是主要蚊种。成蚊栖息场所多不离开幼虫孳生地及附近居民区, 柽柳林和水草丰富地方成蚊密度最大。上述蚊种均为野栖性, 故室内密度很低。关于成蚊的昼夜活动规律, 我们也做了些观察, 七月中旬8:30~10:00, 18:00~21:00密度最大, 对人的侵扰最严重, 此时的温度范围在15~20°C之间。侵扰居民区主要蚊种为屑岩、背点伊蚊, 其次为黄色伊蚊及阿拉赛蚊。未发现与蚊虫有关的疾病, 虽有疟疾病例报告, 但未发现按蚊, 经调查非在盆地感染。

(孙永德 整理)

(这次调查蒙中国医学科学院寄生虫病研究所协助蚊虫鉴定和命名, 深表感谢)