

鼠和双抢期间的排水收割等综合性措施不能忽视。

为节省菌苗，减少接种反应，1979年采用常规全量法与半剂量法对钩体菌苗进行了效果观察，结果免

疫学观察两组阳转率无显著差异。流行病学观察两组发病率亦无显著差异。初步摸索到在疫区使用半剂量接种可达预期效果，值得在流行年进一步证实。

## 酶标葡萄球菌A蛋白用于钩端螺旋体病诊断的研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 张荣珍 王宝旺 王宏英

金黄色葡萄球菌蛋白A (简称SpA)能与多种哺乳动物的IgG的Fc段发生特异性结合，结合后的抗体仍具有特异性。因此，从七十年代起SpA已被广泛用于免疫诊断等方面的研究中。利用该法诊断肾综合征出血热及测定麻疹IgG抗体已有报道，但利用该法作细菌性疾病的诊断还未见报告。我们将该法用于钩端病血清学诊断，现将初步结果总结于下：

### 材料和方法

**一、抗原片：**将钩体标准参考菌株(13群15型)5~7天培养物，用生理盐水洗3次，并恢复原1/2量，用毛吸管将菌液滴加在荧光片上的圆孔内，待干后，用冷丙酮(事先将丙酮放在4°C冰箱内)固定5~7分钟，冲洗后，吹干，放-40°C冰箱内保存备用。

**二、血清：**1.钩体病人血清：1984年四川省明山县采集；2.非钩体病人血清：采自某职工医院；3.免疫动物血清：用钩体标准参考菌株免疫金地鼠获得；4.健康人血清：北京输血站采集。

**三、辣根过氧化物酶标记SpA (HRP—SpA)：**将HRP用过碘酸盐改良法标记SpA，工作滴度1:300，使用时作1:4稀释。

**四、显色液：**底物3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐5毫克溶于0.05M Tris-HCl pH7.6缓冲液10毫升中，临用前加30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10μl。

**五、染色方法：**从冰箱中取出抗原片，吹干，加上第一抗体(待检病人血清，阳性对照用免疫血清)，放37°C湿盒中保温45分钟，用流水冲洗，然后用0.02M PBS(pH7.2)和蒸馏水各振荡洗涤2~3次，每次3~5分钟，吹干，加上第二抗体(HRP—SpA)放37°C湿盒中作用45分钟，用PBS和蒸馏水再振荡洗涤，方法同前，吹干，加显色液，在37°C下作用20分钟，用蒸馏水洗，吹干，加1:4000伊文思蓝复染10分钟，用蒸馏水洗，吹干，用普通显微镜观察，钩体

呈黄褐色，形态典型。

### 结 果

**一、病人血清检查结果：**用HRP—SpA组化法和钩体显微镜凝集试验(MAT)检查10份钩体病人第二份血清，结果证明两种方法结果基本相同，符合率为80%。

**二、标准菌株免疫地鼠血清检查结果：**用标准菌株5~7天培养物，56°C30分钟杀死，皮下注射，第一次0.5毫升/只，间隔5天，再注射1毫升/只，免疫后14天心脏采血，收集血清。用HRP—SpA组化法及AMT检测抗体滴度，结果12份鼠血清基本相符，符合率为90%。

**三、健康人和非钩体病人血清检查：**用HRP—SpA组化法检查健康人血清20份及非钩体病人血清10份(肾炎2份，高血压2份，肺心病3份，风湿病3份)结果均为阴性，说明该法有较高的特异性。

**四、对照组：**每批试验均设阳性对照和阴性对照。阳性对照为免疫兔血清，阴性对照为健康兔血清。结果在阳性对照时，可染出具有典型形态的钩体，而阴性对照则否。

### 讨 论

显微镜凝集试验是钩体病诊断中最常使用的方法，但它要求试验室保存一套标准钩体参考菌株，要用活菌作抗原，易造成试验感染，同时，检查结果时要有一台性能较好的暗视野显微镜，判定结果要求工作人员有一定实际工作经验。而HRP—SpA组化法，检查结果与显凝结果基本相同，但它只要事先作好抗原片，放在冰箱保存，用时发到使用单位，马上就可作试验，检查结果用普通光学显微镜即可，所以该法是适合基层使用的。判断结果也较容易。

试验的成败在很大程度上取决于HRP—SpA的质



量,在试验中我们发现不同批号的HRP-SpA结果也有差异,所以试验前必须检查HRP-SpA的工作滴度。

制成的抗原片放在冰箱保存的温度问题,HRP-SpA组化法检查HFRS(肾综合征出血热)抗体时,制成的细胞抗原片放 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存,麻疹组织抗原片

放 $4^{\circ}\text{C}$ 保存,钩体抗原片放 $-40^{\circ}\text{C}$ 保存,看来抗原片放在何种温度下保存不是那么严格的,可根据各试验室的条件而定。

(工作中得到纪绍忠、李爱芳同志的大力协助,特此致谢)

## 固相放射免疫法检测白喉抗体的探讨

北京市防疫站 刘玉兰 陈仁声 和京果

白喉是一种急性呼吸道传染病。为了控制该病的流行,国内外广泛推行白喉的预防接种,使其发病率、死亡率都显著下降。为更合理的使用疫苗及开展白喉的监测、预测工作,需有可靠的检测抗体水平的方法。

白喉抗体检测方法有古典的动物毒素中和试验和锡克氏试验、微量细胞培养法、间接血凝试验和ELISA等方法。动物法需用大量动物、时间长,锡克氏试验只能定性检测,间接血凝被国内广泛应用于白喉抗体定量测定,虽然敏感性高,但重复性差。从五十年代起,放射免疫分析已广泛应用于生物学和医学科学研究。它具有高度的敏感性和特异性,重复性好,能精密地测量很多疾病的抗原和抗体。但该种方法用于白喉抗体水平检测,国内尚未见报道。我们于1985年建立了固相放射免疫分析法(SPRIA),并用于白喉抗体水平的检查。结果表明本法有高度敏感性和特异性,重复性好,可以定量,而且操作简便、省时、不受血浆样品中抗凝剂的干扰,适于大规模样品的快速检验。

**一、基本原理:** SPRIA是应用双抗体法,以纯化的白喉类毒素吸附到固相载体上,加入特异性抗血清,载体上形成抗原-抗体复合物。然后再加入标有同位素的第二抗体,就形成抗原-抗体-抗抗体复合物。通过测定标记的第二抗体的放射性就可确定相应抗体的含量。

### 二、材料和方法:

1.血清标本来源:被检血清来自东单三条儿童医院。

2.精制白喉类毒素(北京生研所供给)进一步纯化,经Sephadex G-200过滤,测其浓度。

3.抗血清(标准品):20份健康儿童血清经间接血凝测定其效价在1:64以上者混合血清,由卫生部检

定所白喉组做标化试验,每毫升含2国际单位(IU)。用此品作标准曲线。

4.第二抗体及标记法:以马抗人IgG(经纯化)作为第二抗体,参照格林伍德(Gree Wood)和亨特(Hunter)的高比度标记法进行放射碘化标记获得的 $^{125}\text{I}$ -马抗人IgG。

5.固相载体:“U”型聚氯乙烯软塑料板(天津无机玻璃制品厂产品)。

6.缓冲液及填充液:

①缓冲液:PBST。即含0.05%吐温20的0.01M pH7.4磷酸缓冲盐水;

②稀释液:PBST-BSA,即在缓冲液中加入0.5%的牛血清白蛋白。

③填充液:PBS-BSA,即在稀释液中减去吐温20。

### 三、操作方法:

1.包被抗原,用碳酸缓冲液(pH9.6)将精制白喉类毒素稀释成 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ,加入聚氯乙烯板各孔 $100\mu\text{l}$ ,置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

2.将抗原溶液甩净,用PBST洗5次,每次静置1分钟左右,每孔加满填充液,将板放入湿盒内, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时,通过水泵将填充液吸净。

3.每孔加入用PBST-BSA 1:20稀释的血清标本 $100\mu\text{l}$ (做双份), $37^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时,吸掉孔内液体,用PBST洗5次。

4.每孔加入20万 $\text{Cpm}^{125}\text{I}$ 标记的马抗人免疫球蛋白( $^{125}\text{I}$ -IgG) $100\mu\text{l}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 保温2小时,吸掉后用PBST洗5次吸净、待干。

5.用剪刀将聚氯乙烯软塑料板上的各孔剪下来,进行 $\gamma$ 放射性测量,每孔计数1分钟。

6.以不同稀释度的标准品所得结果在座标纸上