

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°C 保存,麻疹组织抗原片

放 4°C 保存,钩体抗原片放 -40°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}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,用磷酸缓冲液(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°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°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°C 孵育2小时,吸掉孔内液体,用PBST洗5次。

4.每孔加入20万 Cpm^{125}I 标记的马抗人免疫球蛋白(^{125}I -IgG) $100\mu\text{l}$, 37°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 γ 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

划出标准曲线，用每份标本双孔计数的平均值，在标准曲线上查出相应的抗毒素IU/ml。

7. 间接血凝试验按常规实验操作。

四、结果：

1. SPRIA有关参数的确定：

①抗原包被浓度：用不同浓度纯化的白喉类毒素和不同滴度阳性血清做方阵滴定，以5~50 μg/ml为最佳包被浓度，选用5 μg/ml做为正式试验的包被浓度。

②抗体和第二抗体最佳条件的确定：在37°C分别孵育1、2、4小时和4°C过夜，其结合率(%)比值分别为2.9、4.3、4.7和4.0，除1小时的以外，其他时间比值均较高，但为节省时间，选用2小时较为合适。

③标记物浓度的选择：按方阵滴定法以20万Cpm/孔为最佳浓度。

④洗涤次数的确定：实验结果以洗5次较为理想。

2. 试验的灵敏度和重复性：经试验获得最低分析量为 3.9×10^{-4} IU。

重复性：同一样品一次做双份，39份样品，平均值0.067 IU/ml，SD为±0.007；同一样品二次测定(4°C保存间隔一周)间的重复性：45份样品，平均值0.179 IU/ml，SD为±0.077，重复性尚好。

(标准差 $SD = \sqrt{\frac{ea^2}{2N}}$ ，a为同一样品两次测定结果之差数，N为例数)。

3. SPRIA与IHA比较试验：为验证本试验方法，选用46份样品与IHA相比较，结果表明，两法的总符合率为60.87%，而总不符合率为39.13%，说明SPRIA法的灵敏性与特异性都较好。

另从两种方法的阳性率来看，SPRIA的阳性率(84.78%)比IHA(45.65%)高。

(本文经中国预防医学科学院流研所 陈贤辉大夫审阅，特致谢意)

高湖纤恙螨经卵传递恙虫病立克次体的研究

南京部队军事医学研究所

徐毛华 吴光华 刘玉 鲍明荣 姜志宽 沈建中 赵学忠 孟鹤雁

通过现场调查和实验研究，证明高湖纤恙螨 [*Leptotrombidium (L.) kaohuense*] 能自然感染恙虫病立克次体，流行病学资料亦支持其为恙虫病的传播媒介。恙螨一生仅幼虫叮刺吸食，一般只吸食一次，因此能否经卵传递病原体是确定该螨能否作为媒介的重要依据。为弄清这一问题，我们于1984年进行了实验观察，现将结果报告如下。

材料和方法

恙螨来源：1984年6月在浙江丽水山岩寺捕捉社鼠，从鼠耳采集高湖纤恙螨饱食幼虫，饲养至子代幼虫供试验用。

小白鼠：津白品系，体重20~25g左右。

毒株：C₁₁，由福建省卫生防疫站提供，系从福建省长乐县黄毛鼠分离。

OX_k、OX₁₀、OX₂菌液：上海生物制品研究所制品。

经卵传递病原体方法：以20~40只左右子一代未进食幼虫为一批，挑入1只健康小白鼠的耳窝内叮咬3~5天。然后观察鼠的发病情况，定期解剖观察病变，涂片镜检立克次体，并取腹水及脏器(肝、脾、肾)传代。三周内仍未发病的鼠同上法处理，再盲传两代。

以上在鼠耳叮咬后回收的螨均继续饲养观察经卵传递病原体代数。

经卵传递病原体指标：对被螨叮咬的小白鼠应同时具有：1. 典型症状；2. 明显病变；3. 涂片镜检阳性。

毒株鉴定：1. 保护试验；2. 外斐氏反应；均按常规方法进行。

结 果

一、经卵传递病原体情况：以子代未进食恙螨幼虫叮咬健康小白鼠9批，获阳性5批。其中：子一