流行病学

LIUXINGBING XUE

续编

实验室方法在流行病学中的应用

耿贯一 主编

人民卫生出版社

R18
3
4a

流行病学

续编

实验室方法在流行病学中的应用

主编 耿贯一

编委 （以姓氏笔画为序）

于潜 于恩庶 王正伦 王慧垣
刘杏英 吴系科 何尚浦 钱宇平
连志浩 耿贯一 曹家琪 魏承毓

人民卫生出版社

流 行 病 学
（续 编）
实验室方法在流行病学中的应用
耿 贯 一 主编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
（北京市崇文区天坛西里10号）
北京顺义寺上印刷厂印刷
新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米 16开本 38½印张 4插页 906千字
1984年4月第1版 1984年4月第1版第1次印刷
印数：00,001—6,020
统一书号：14048·4416 定价：4.40元
〔科技新书目 59 — 73〕

作者名单

（按章节顺序先后排列）

耿贯一　天津医学院
于恩庶　福建省卫生防疫站
张彦博　青海省卫生厅
林学颜　福建省卫生防疫站
来则民　天津医学院
战师珍　天津医学院
吴皎如　福建省卫生防疫站
于　潜　国家计划生育委员会科学技术研究所
任铁生　天津医学院
苏诚钦　安徽省医学研究所
萧　俊　北京医学院
陈志慧　上海生物制品研究所
崔君兆　广西壮族自治区卫生防疫站
陈伯权　中国医学科学院病毒学研究所
刘瑞璋　哈尔滨医科大学
冯崇慧　新疆维吾尔自治区卫生防疫站
王慧垣　天津医学院
罗海波　浙江医科大学
鲍行豪　浙江省卫生防疫站
俞树荣　第三军医大学
范明远　中国医学科学院流行病学研究所
陈渊民　云南省流行病学防治研究所
何家龙　河南省卫生防疫站
刘杏英　武汉医学院
刘仁汉　福建省卫生防疫站
胡　真　中国医学科学院流行病学研究所
叶志雄　武汉医学院
黄朝南　河北医学院
方喜业　中国医学科学院流行病学研究所
王光明　中国医学科学院流行病学研究所
韩鸿霖　北京生物制品研究所
董树林　兰州生物制品研究所
连志浩　北京医学院
江苏皮肤病防治研究所
贾明和　中国医学科学院流行病学研究所
吕秀芝　中国医学科学院流行病学研究所
何浙生　浙江省卫生实验院
蒋建国　浙江省卫生实验院
柴曼君　浙江省卫生实验院
李允鹤　苏州医学院寄生虫学教研室
刘心机　福建省寄生虫病研究所
瞿靖琦　中国医学科学院上海寄生虫病研究所
管立人　中国医学科学院上海寄生虫病研究所
熊光华　中国医学科学院上海寄生虫病研究所
李中兴　中国医学科学院上海寄生虫病研究所
张本华　中国医学科学院上海寄生虫病研究所
曾宪荣　西藏自治区卫生防疫站
张衍文　安徽医学院
陈翠娥　湖南医学院
林金祥　福建省寄生虫病研究所
李友松　福建省寄生虫病研究所
刘　忠　白求恩医科大学
纪树立　中国医学科学院流行病学研究所
王敦清　福建医学院
王之梁　中国医学科学院儿科研究所
钱宇平　北京医学院
刘云鹏　中国医学科学院流行病学研究所

编者的话

流行病学发展到今天，更需要有专门为它服务的实验室工作。如同流行病学家要有实验室知识一样，为流行病学服务的广大实验工作者也要有流行病学知识。为此，在编写《流行病学》（上、中、下册）时，就在每种病后编写了研究该病所需要的实验方法。为了保持一般流行病学书籍的格式，我们特将这些部分另编成册，即成此书《流行病学续编》，专门论述流行病学的实验室方法。

本书有别于一般的实验室检验方法书籍，其内容侧重于流行病学所需要的。在大部分章节中，增加了实验室方法的选择、对方法的评价和其流行病学意义等内容，以便于流行病工作者及为流行病学服务的实验室工作人员应用。

流行病学进展很快，几乎涉及到各种各样的疾病，甚至于健康状况调查等。可以说，医学检验的所有项目流行病学都需要，但为了避免内容过于庞杂，本书只介绍研究传染病流行病学时所需要的实验室方法。

参加本书编写及审阅的有高等医学院校、科学研究机构及卫生防疫单位的数十名教学、科研人员及专门从事实验室工作的同志，其中不少是具有较高理论水平及丰富实践经验的同志。

初稿完成后经过反复征求意见与修改，经编委讨论，并由编委根据本书的要求特点作了若干修订。凡由编委修订处有与作者原意不符之处，概由编委和主编负责。

有许多同志协助绘图、抄稿，付出辛勤劳动，尤其是天津医学院流行病学教研室的同志们，为本书作了许多工作。我们向这些同志表示衷心感谢。

部分章节因完稿时间较早，有些方面可能没有把最新内容写进去。由于我们经验不足，本书的缺点和错误，在所难免，敬请广大读者指正，以便再版时更正。

编　者

1982年8月

续编目录

实验室方法在流行病学中的应用 …… 1
第一篇 流行病学应用的一般实验室方法 …… 5
第一章 感染或免疫机体血清中 IgM 和 IgG 两类抗体的区分方法及其意义 …… 5
一、两类抗体的鉴别方法 …… 5
二、两类抗体的鉴别意义 …… 9
第二章 补体结合试验及病毒中和试验 ……17
第一节 补体结合试验 ……17
一、材料 ……17
二、试验方法 ……18
三、应用和评价 ……26
第二节 病毒中和试验 ……26
一、血清稀释的中和试验 ……27
二、病毒稀释的中和试验 ……28
三、代谢阻止试验(颜色变化试验) ……28
四、抗体琼脂内扩散法 ……28
五、组织培养琼脂盖片法 ……28
六、荧光抗体法 ……29
七、应用和评价 ……29
第三章 血凝试验 ……30
一、直接血凝试验 ……30
二、间接血凝试验 ……32
三、反向间接血凝试验 ……34
四、免疫粘附血凝试验(IAHA) ……34
五、应用和评价 ……35
第四章 免疫酶试验 ……37
一、原理 ……37
二、酶标记的方法 ……38
三、实验方法 ……40
四、结果的判断 ……43
五、方法的评价及其在流行病学上的意义 ……43
第五章 溶血(溶菌)空斑试验 ……45
一、原理 ……45
二、各种方法操作简介 ……45
三、方法的评价及其意义 ……48
第六章 免疫电泳技术 ……52
一、原理 ……52
二、材料 ……52
三、方法 ……53
四、结果记录 ……56
五、结果分析 ……57
第七章 免疫荧光技术 ……59
一、原理 ……59
二、材料与方法 ……60
三、免疫荧光的应用 ……63
第八章 放射免疫诊断技术 ……66
一、放射免疫测定法 ……66
二、放射免疫自显影 ……75
第九章 金黄色葡萄球菌甲蛋白在免疫反应中的几种试验方法 ……77
一、含有丰富A蛋白菌株的筛选 ……77
二、抗体标记SPA菌凝集试验 ……78
三、SPA菌吸附试验 ……78
四、血清中 IgM 抗体的测定 ……78
五、应用与评价 ……79
第十章 血清学方法的评价问题 ……80
一、阳性标准和诊断标准 ……80
二、双份血清的重要意义 ……80
三、抗体效价 4 倍增长的问题 ……80
四、统计方法问题 ……81
五、对试验结果的分析 ……81
第十一章 细胞免疫检测方法 ……83
第一节 体内法 ……83

一、皮内反应 ……83
二、皮肤以外的局部反应方法 ……84
三、全身反应方法 ……85
四、被动转移试验 ……85
第二节 体外法 ……87
一、巨噬细胞移动抑制试验 ……88
二、白细胞粘附抑制试验 ……89
三、白细胞吞噬指数试验 ……90
四、淋巴细胞检测方法 ……90
五、应用与评价 ……98
第十二章 水中沙门氏菌和病毒的流行病学实验室检查方法 …… 100
第一节 污水中沙门氏菌的检验方法 …… 100
一、污水样品的来源 …… 100
二、检验方法 …… 100
第二节 水中病毒的检验方法 …… 103
一、水中病毒检验步骤 …… 104
二、水中病毒含量的估计方法 …… 110
第十三章 噬菌体、质粒及细菌素的检查方法 …… 112
一、噬菌体的实验方法 …… 112
二、质粒 …… 117
三、噬菌体分型的原理和应用 …… 121
四、细菌素产生性质粒 …… 124
第十四章 环境致癌物质筛检方法 …… 126
一、环境污染物的分类及其对机体的危害 …… 126
二、实验室方法的选择 …… 128
三、实验室方法 …… 128
第二篇 病毒性疾病实验室方法 …… 143
第十五章 病毒性肝炎流行病学实验室方法 …… 143
一、各种检测方法在肝炎流行病学上的应用 …… 143
二、甲型肝炎检测方法 …… 144
三、乙型肝炎检测方法 …… 147
第十六章 肠道病毒疾病流行病学实验室方法 …… 159
第十七章 流行性感冒流行病学实验室方法 …… 178
第十八章 麻疹流行病学实验室方法 …… 193
第十九章 天花流行病学实验室方法 …… 200
第二十章 疱疹病毒流行病学实验室方法 …… 212
第二十一章 水痘-带状疱疹病毒流行病学实验室方法 …… 219
第二十二章 呼吸道合胞病毒感染流行病学实验室方法 …… 222
第二十三章 病毒性脑炎 …… 227
第一节 流行性乙型脑炎流行病学实验室方法 …… 227
第二节 森林脑炎流行病学实验室方法 …… 237
第二十四章 新疆出血热流行病学实验室方法 …… 245
第二十五章 登革热及登革出血热流行病学实验室方法 …… 251
第二十六章 黄热流行病学实验室方法 …… 258
第二十七章 狂犬病流行病学实验室方法 …… 260
第二十八章 其他病毒病 …… 268
第一节 传染性单核细胞增多症流行病学实验室方法 …… 268
第二节 口蹄疫的流行病学实验室方法 …… 273
第三节 淋巴细胞脉络丛脑膜炎流行病学实验室方法 …… 281
第四节 巨细胞包涵体病流行病学实验室方法 …… 287
第三篇 立克次体、衣原体及支原体实验室方法 …… 295
第二十九章 立克次体病流行病学实验室方法 …… 295
第一节 立克次体病一般实验室方法 …… 295

一、标本采集与处理 …… 296
二、病原学检查法 …… 297
三、血清学试验 …… 310
四、实验室方法的评价 …… 315
第二节 恙虫病流行病学实验室方法 …… 317
第三十章 鹦鹉热及鸟疫流行病学实验室方法 …… 325
第三十一章 支原体肺炎流行病学实验室方法 …… 329
一、实验室方法的选择 …… 329
二、肺炎支原体的分离和鉴定方法 …… 329
三、测定患者血清中肺炎支原体抗体的血清学方法 …… 332
四、方法的评价及其在流行病学上的意义 …… 334
附 1：戴氏染色液的配制及用法 …… 335
附 2：肺炎支原体培养基的配制法 …… 335
附 3：培养鉴定肺炎支原体的几种辅助物的制备方法 …… 336
附 4：支原体免疫血清的制备方法 …… 337
第四篇 细菌性疾病及螺旋体病实验室方法 …… 339
第三十二章 伤寒、副伤寒实验室方法 …… 339
第三十三章 细菌性痢疾流行病学实验室方法 …… 346
第三十四章 霍乱流行病学实验室方法 …… 353
第三十五章 耶氏菌小肠结肠炎的流行病学实验室方法 …… 368
第三十六章 葡萄球菌食物中毒的流行病学实验室方法 …… 375
第三十七章 副溶血性弧菌流行病学实验室方法 …… 381
第三十八章 流行性脑脊髓膜炎流行病学实验室方法 …… 389
第三十九章 白喉流行病学实验室方法 …… 403
第四十章 百日咳流行病学实验室方法 …… 415
第四十一章 鼠疫流行病学实验室方法 …… 421
第四十二章 破伤风流行病学实验室方法 …… 436
第四十三章 炭疽的流行病学实验室方法 …… 439
第四十四章 麻风流行病学实验室方法 …… 448
第四十五章 土拉菌病流行病学实验室方法 …… 452
第四十六章 布鲁氏菌病流行病学实验室方法 …… 461
第四十七章 钩端螺旋体病流行病学实验室方法 …… 468
第五篇 寄生虫病实验室方法 …… 479
第四十八章 寄生虫病流行病学实验室检查方法概述 …… 479
第一节 病原诊断方法 …… 479
一、粪便检查 …… 479
二、血液检查 …… 481
三、排泄物、分泌物检查 …… 481
四、组织检查 …… 481
第二节 免疫诊断方法 …… 482
一、抗原 …… 482
二、皮内反应 …… 482
三、沉淀反应 …… 483
四、补体结合试验 …… 483
五、间接血球凝集试验 …… 483
第四十九章 疟疾流行病学实验室方法 …… 485
第五十章 黑热病的流行病学实验室方法 …… 495
第五十一章 弓形体病流行病学实验室方法 …… 504
第五十二章 丝虫病的流行病学实验室方法 …… 517
一、实验室检查方法的选择 …… 517
二、血液中微丝蚴检查方法 …… 517

三、乳糜尿检查微丝蚴法 …… 521
四、微丝蚴虫种鉴别 …… 521
五、免疫诊断方法 …… 522
六、药物反应诊断法 …… 524
七、丝虫成虫活体组织检查法 …… 524
八、丝虫病蚊媒标本的收集与保存方法 …… 525
九、丝虫病媒介蚊虫的解剖与幼丝虫的鉴别 …… 525
十、实验室检查方法的评价及其流行病学意义 …… 526
第五十三章 旋毛虫病流行病学实验室方法 …… 529
第五十四章 钩虫病流行病学实验室方法 …… 534
第五十五章 血吸虫病流行病学实验室方法 …… 543
一、实验室方法的选择 …… 543
二、病原诊断方法 …… 543
三、免疫诊断方法 …… 546
四、综合查病 …… 553
五、方法的评价及其在流行病学上的意义 …… 554
六、钉螺调查 …… 554
第五十六章 肺吸虫病流行病学实验室方法 …… 556
一、人群调查常采用的免疫学检查 …… 556
二、动物宿主的调查和人工感染 …… 558
三、标本的制作与保存 …… 559
四、中间宿主的调查 …… 560
五、中间宿主的人工感染 …… 561
第五十七章 稻田皮炎流行病学实验室方法 …… 563
一、椎实螺感染血吸虫尾蚴的调查 …… 563
二、畜、禽感染血吸虫的调查 …… 563
三、感染动物 …… 564
第五十八章 棘球蚴病流行病学实验室方法 …… 565
第六篇 啮齿动物及蚤、蜱、螨 …… 573
第五十九章 啮齿动物的采集、保存和初步鉴定 …… 573
一、啮齿动物标本采集 …… 573
二、啮齿动物标本的制作方法 …… 573
三、啮齿动物的鉴定 …… 577
啮齿目分科检索表 …… 578
第六十章 蚤、螨、蜱的采集和鉴定 … 585
第一节 蚤的采集、制片和鉴定 …… 585
一、寄主体上蚤的采集 …… 585
二、寄主窝巢内蚤类的采集 …… 585
三、游离蚤的采集 …… 586
四、蚤类玻片标本的制法 …… 586
中国蚤类分科分属检索表 …… 586
第二节 恙螨的采集、保存和制片 … 595
一、寄主体上恙螨的采集 …… 595
二、野外恙螨幼虫的收集 …… 596
三、恙螨幼虫标本的制作 …… 596
恙螨分科、亚科、族检索表 …… 596
第三节 革螨的采集、保存及制片 … 601
一、革螨的采集和保存 …… 602
二、革螨标本的制作 …… 602
三、革螨的鉴定 …… 603
革螨检索表 …… 603
第四节 蜱的采集、保存和标本制作 …… 609
一、蜱的采集 …… 609
二、蜱的保存 …… 609
三、蜱类标本的制作 …… 609
蜱分科分属检索表 …… 610

实验室方法在流行病学中的应用

流行病学的研究对象是人群中疾病的变动过程及影响其变动的各种因素。它的研究涉及到生物性致病因子(病原体、媒介昆虫、病兽等)，非生物性致病因子，各种类型的患者(有明显临床症状的患者、隐型患者、病原携带者等)，影响疾病流行的自然因素、社会因素以及彼此之间的相互联系、相互作用的关系，而这些关系是极为错综复杂的。因此，流行病学研究方法也就比较复杂。流行病学要有进行研究的人群现场(人群实验室)，这也可看作是流行病学研究的“大实验室”。在这样的实验室里进行研究一般使用的方法就是流行病学调查、分析的方法(详见本书上册有关章节)。除此之外，流行病学工作还要有为其服务的一般概念的实验室，也可叫“小实验室”。这些实验室必须为现场研究(人群研究)服务。它与医院的实验室不同之处在于其所涉及的方面及范围比临床所涉及的要广。

流行病学实验室的另一工作特点：它不仅仅是诊断个别病例，而且要为研究人群服务；它要进行有计划的调查研究，进行比较大量(相对于临床实验室而言)标本的检验。流行病学实验室还要经常做好准备，一旦发生爆发流行，应该能够立即快速进行大量标本的检验，还要便于携带到现场工作。

流行病学研究的病种非常广泛，所以它所使用的实验室技术方法也非常之多。本书将侧重介绍一些生物性致病因子引起的疾病的流行病学工作中所使用的实验室技术。另外，本书主要论及流行病学实验室方法，可能有某些与临床实验不相同。

由于单单实验室检查不一定能做出最后诊断或决定，所以流行病学家、临床学家及实验室工作者应该互相配合，紧密合作。要做好流行病学工作，流行病学家必须具备实验室观点，会正确使用实验室。而流行病学实验室工作者(微生物学家、病毒学家等等)要配合好流行病学工作又必须具备流行病学观点，他们应该熟悉所研究的每种疾病的流行病学特点，如传染病的传染源、传播途径等等。

一、流行病学研究中实验室的用途[1~5]

(一) 确定诊断　流行病学的研究既要注意有典型临床症状的病例，又要注意那些不典型和轻型病例，甚至于隐性感染及病原携带者。所以实验室检查方法就显得必要和重要。在这方面可以应用病原体的分离培养法及各种血清学方法等来确定诊断。在确定诊断时，要注意单单依据实验室检查的阳性结果，不一定就能做出最后确诊，常常需要与临床学家、流行病学家合作，才能做出正确诊断。

(二) 检查传染源　包括患者、携带者及患病动物。在没有流行或爆发时，在日常诊断中即应积累资料。爆发或散发时进行检查，阳性结果为可疑的传染源，因为它既可能是本次爆发或散发病例的传染源，也可能是本次的受染者。检查结果还要根据临床及流行病学调查来解释。

对某些疾病或对某些行业的职工可以有计划地、系统地进行传染源(轻型或携带者)的检查(有人叫做“查源”)。这些工作应根据该病的流行病学特点及该地区具体情况安排。

在一次流行或爆发中，传染源和被感染者的病原体特性常常一致。可用血清学分型、噬菌体分型、杆菌素分型、抗药性等等方法

检查由病人或可疑传染源分离出的病原体。如果二者的这些特性都相同，则支持传染关系的确定。

（三）检查传播因素　从被怀疑的传播因素查到病原体，对于判断它在传播上的作用是很有价值的。如从水中分离病毒、细菌或检查大肠菌值来判断水被粪便污染的程度；应用荧光抗体法、噬菌体分离或增殖反应等来判断外界物品是否存在有病原体。有时尚可应用化学的检验方法。对于血液组传染病还需作昆虫媒介调查及从其体内分离病原体等。当从传播因素检查病原体时还必须注意阴性结果不能排除其传播作用。例如，一次伤寒水型爆发，当达发病高峰时距离水被污染一般已有半个多月，此时再去检查水往往查不到伤寒菌。当从外界物品上查到病原体时，还需要根据流行病学调查、分析的结果来判断该传播因素在整个流行过程中所起的传播作用。不能仅根据分离到病原体即认为该外界物品是引起一次流行或爆发的主要传播因素。

定期定点检查环境物品（如定期检查水中肠道致病菌，医院内定期检查空气、设备、物品等的病原体），可作为监测的内容之一。

（四）确定人群易感性　可应用各种血清学方法及皮肤试验等来测定。可用阳性率、几何平均效价等来表示。

（五）爆发调查　短期发生患者人数多的爆发易被查知。如果病例少而分散，症状不一，则不易确定。此时对患者的微生物学检查将更为可信。

检查早期病例所分离的病原体很重要。实验室在平时应短期保留分离物，一旦有爆发时，可用以分型，并同时收集流行病学资料。

在确定疫源地是否被消灭时，实验室主要作用为查明已被感染的人是否已不带病原体，以及检查环境物品带病原体情况。

（六）疾病监测　在疾病监测中应系统收集资料并及时通知有关人员。应该包括实验室结果、临床资料以及继续对患者进行微生物学检查。对某些部门的患者要继续检查，以便及时发现病原体。分离出的菌在可能情况下应该分型。没有分型设备的地方，可测定其对抗菌剂的敏感性等。

（七）医院内感染的检查　在医院日常工作中检查个别病人，确定病原体后可提出适宜的治疗。在预防领域中其活动必须延伸到许多方面，如判断临床感染的频率，确定病原体的重要性及对抗菌剂的抗药性，确定传染源、传播途径，查明外界物品染菌情况及污染范围等。

（八）其他　包括评价预防接种效果及安全性。分离新株病原体如流感病毒。应该及时查知新株流感病原体，以便尽早将新株加入疫苗制备中。此外，对于一些可能是新发生或新发现的疾病的病原学应加以探讨等。

（九）在非传染病流行病学方面，实验室检查方法大概有如下几方面：(1)作为确定病因的一种方法；(2)确定外界环境污染情况；(3)了解隐性疾病（如做糖耐量试验以查出隐性糖尿病，测定胆固醇以查出易患动脉硬化者等等）以及人群易感程度；(4)评价预防措施效果等。

（十）促进学科发展　目前应用实验室方法以研究流行病学问题，逐步形成了分支，如血清流行病学、代谢流行病学、遗传流行病学等等。

二、流行病学实验室方法的特点

流行病学所应用的实验室检验技术与临床所应用的有相同的地方，也有不同的地方。如在确定诊断方面，流行病学除了确诊患者外，还要对周围人进行诊断，还要检查健康携带者等。流行病学需要做外界物品检查。为了研究一次流行或爆发所需要进行检验的数量要比临床检验数量大得多，还要能够立

即投入检验。此外，流行病学常常要在现场进行检验。这些特点就要求流行病学所应用的实验室检查方法向微量、快速、简易和高效的方向发展，向自动化方向发展；经常做好准备；并且尽量应用各种新方法和新技术。

在选择具体方法时取决于许多因素[1~3]，诸如：方法的灵敏性、可靠性，所需费用，某特殊检验方法的可应用性、该实验室应用这些技术的水平，以及该方法用于处理应检标本数量时的能力等等。一次具体检验，按主要要求不同而应选取不同的具体方法，例如要求侧重于其灵敏性还是简易快速等。

要注意质量控制：由于标本数量多，操作者可能不止一人，甚至不在一个实验室工作。因此，应该力求方法统一、标准化，要求几个实验室或操作者对同一份标本的检查结果一致。所以，试剂、仪器、方法都应力求一致，操作者技术应该熟练并且非常认真、仔细、负责。

三、应用实验室的注意事项

（一）应用实验室的流行病学家必须具备一定的实验室训练，了解解决某种疾病某个方面的问题需要哪些实验室检查项目，应该知道检验什么项目时送什么标本以及如何采集和送检这些标本，了解检查结果的意义等。

（二）送检标本必须有一定的目的，要仔细选择，以必要的为限。因为，许多检验方法用费都比较贵。

（三）为了使实验室能正确选择检验方法和正确解释结果，在送检标本时必须供给实验室以足够的资料[2]。应有以下各项：(1)被检查者姓名(如需要时指明家长及/或病历号)；(2)地址；(3)年龄；(4)性别；(5)临床诊断；(6)主要临床发现(如需要时详填)；(7)发病日期(或近似期限)；(8)临近有几名相似疾病的患者；(9)病史，包括用抗菌素治疗史；(10)预防接种的详细情况；(11)采取标本的日期、时间及地点；(12)诊断疾病的临床医生的姓名、地址；(13)送检者(如与上述临床医生不同时)的姓名、地址。

必要时还应填明患者在国内、外旅行史，职业，与传染病患者的接触，与动物接触，以及是否怀孕等。

（四）正确地采集和运送标本[2,3]

1．标本的采集

(1) 注意采集时间：如查病原体应在疾病早期，在给抗菌素治疗前；查抗体则应采双份血清，一份应在疾病早期，一份在10～14天后。

(2) 注意采集方法：有的标本要注意无菌操作，防止污染容器外面，注意容器、采样器的干燥等。采取可疑有传染性标本(包括血液标本，因其中可能有HBsAg)时，往容器内注入时要防止形成有害的气溶胶。

(3) 选取合适的容器：容器一定要坚固，有盖，不含消毒剂(如作病原体分离的标本)。薄壁玻璃管易破碎，应该用厚壁玻璃容器。血块易粘附在塑料上，不易分离出血清，所以做血清学检验的血标本不应放在塑料管或塑料瓶盖的瓶内。容器以用内有无毒橡皮的螺旋盖较好，特别是装有传染性或有毒害标本，因为用塞子塞容器，在拔开时可能形成有害的气溶胶。

2．标本的运送　根据标本的性质，有的可耐常温，有的需冷藏，有的可久存，有的必需快送。后者可在现场接种。标本容器上应贴牢明确、清晰而不含糊的标签。在运送时多个标本应分别包装，以减少运送时破碎的机会。送标本时应附有详细的送检单，内容见(三)。但不要放入容器内。运送有传染性、放射性标本时应标明标记。

四、实验室间标本的交换[2]

在国内或各国之间的实验室有时需要交换标本。交换标本的可能情况为：(1)鉴定

病原体；(2)鉴定新株；(3)寄送标准菌株或血清；(4)鉴定特殊抗体；(5)为了比较各实验室结果，进行质量控制。此时应特别注意避免运送时损坏或影响其效价；(6)实验室之间互相寄赠等。

交换的标本都是经过选择的，比一般标本价值更高，运送时要特别注意防止丢失和损坏。包装时应注意：(1)保持标本存活；(2)防止溢出包装外；(3)防止交互污染。一般包装应有三层：最内为容器，应该不漏水，如寄送含有挥发性物质时还应不漏气；第二层为不漏水的包装，内装吸水物，以备容器渗漏时吸水，最外层为保护其内两层的包装。在包装内应附有清单或其他说明。在包装上应粘贴标签，写明：(1)收件人姓名、地址；(2)寄件人姓名、地址；(3)向海关申报证(必要时)；(4)寄送传染性或放射性标本时，应贴上有关的标签。世界卫生组织规定有统一的格式。此外，还应该有其他必要的标志。

与标本一同寄送的资料应包括下列各项：(1)实验室编号及/或患者姓名、地址。(2)来源：① 临床标本的分离物，注明采样部位、日期、地点；② 标准株等，注明从何实验室得到，最初日期及鉴定号，必要时附传代记录。(3)临床资料：① 患者年龄、性别、发病日期、简要的症状、体征；② 有关的化验结果；③ 与附近其他同样病例接触的详情；④ 患者职业；⑤ 有关的预防接种。(4)实验室详情：① 传代史；② 分离物的鉴定，如应用的方法、分型血清来源等；③ 其他有关的血清学观察；④ 其他资料。(5)流行病学资料。

实验室之间充分交换标本与资料，可以对于某些疾病的分布描述出一个完整的分布图象，并使每个实验室感到其工作不是孤立的，而是整个工作的一部分。

五、注意安全[2]

传染病流行病学实验室工作所接触的标本很多是有传染性的，所以从标本的采集、包装、运送、检验以及标本的保存，都应严格遵守操作规程，既要防止感染工作人员，又要防止病原体扩散感染其他人员。

(耿贯一　编)

参考资料

1. WHO (1975): Guide to the Laboratory Diagnosis of Trachoma. Geneva
2. Madeley, C. R. (1977): Guide to the Collection and Transport of Virological Specimens. WHO, Geneva
3. Parker, M. T. (1978): Hospital Acquired Infections: Guidelines to Laboratory Methods. WHO, Regional Office for Europe, Copenhagen
4. WHO (1980): Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory. Geneva
5. WHO Bacterial Disease Unit (1974): Guidelines for the Laboratory Diagnosis of Cholera. WHO, Geneva
6. Alton, G. G. et al. (1975): Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd ed. WHO, Geneva

第一篇　流行病学应用的一般实验室方法

第一章　感染或免疫机体血清中IgM和IgG两类抗体的区分方法及其意义

免疫球蛋白是具有抗体活性的物质，可以分为特异性和非特异性两种。一般所说血清中的免疫球蛋白，系指一般的抗体而言，而对某一种特定的抗原起反应的免疫球蛋白，属于特异性抗体。前者称为IgG、IgM、IgA、IgD、IgE，后者则应称为某IgG抗体、某IgM抗体、某IgA抗体等，以示区别。机体受一种抗原感染后，经过一定潜伏期后，血清中产生该抗原的抗体，主要是IgM抗体和IgG抗体，其他免疫球蛋白抗体很少。

一、两类抗体的鉴别方法

抗体的分离纯化，大体上可分为特异性和非特异性两种方法[1]。所谓非特异性方法，是指从抗血清中把含有抗体部分与其他部分分开的方法。因为抗体为免疫球蛋白的蛋白，故可利用蛋白质的特性，进行分离纯化。但血清球蛋白中有与某种特定抗原无反应的所谓正常球蛋白，故单用物理、化学方法，不能提取出比较纯的特异性抗体。特异性方法系指应用抗原-抗体反应的高度特异性，把抗原加入含有抗体的材料中，形成抗原-抗体复合物提取出来，再从中把抗体游离出来。此法可以提取相当纯的抗体，但在物理、化学上，仍含有性状完全不同的成分在内。所以，要提取物理、化学和特异性均一的纯抗体，必须同时采用上述两种方法。一般常用的方法有：

（一）超速离心法　利用两类抗体的分子量不同的特点，用超速离心的方法可以分为快沉淀和慢沉淀两类抗体。IgM分子量大(900,000)，沉淀快；IgG分子量小(160,000)沉淀慢，把沉淀快的和沉淀慢的分别收集起来，可以区分出IgM和IgG两类抗体。

本法操作简单，回收率高，可达100%。但IgG、IgA和IgD的沉淀系数均在7S附近，不易分开。

（二）密度梯度超速离心法　为防止离心中的液体对流，通常用蔗糖密度梯度离心法。即在前法的基础上，血清在10～40%浓度的蔗糖溶液中超速离心，平均每分钟32,000～35,000转，可分为10部分，用自动收集器或注射器分别收集，第10部分为管底沉淀，用PBS悬浮。各部分同时检查抗体活性。大分子巨球蛋白的IgM抗体沉淀于管底，小分子球蛋白的IgG抗体，在梯度中间部分检出。具体方法是蔗糖梯度按10%、25%和40%蔗糖溶液1.3毫升分别加入1.3×50毫米硝酸纤维管内，然后于4℃平衡8～24小时，加入0.6毫升标本，立刻在4℃下32,000转/分离心18～24小时，每个离心管分成9个部分，分别收集，每部分0.5毫升，第10部分为管底沉淀，用0.5毫升PBS悬浮。

亦可把蔗糖用生理盐水配成10%和40%两种浓度，制成全量5毫升的蔗糖密度梯度。血清用生理盐水稀释3～4倍，取

0.1～0.5毫升加于蔗糖密度梯度上，在水平离心机，4°C下离心 35,000 转/分 18 小时，19 S (IgM) 沉于管底，IgG 和 IgA 在中间部分，上层为白蛋白。

(三) 层析法　在层析法中分离提纯免疫球蛋白最常用的方法有凝胶过滤层析法和离子交换层析法。

1. 凝胶过滤层析法(又称凝胶层析，分子筛层析)　利用分子量的大小和性状，分离蛋白质和其他物质的方法，特别适于 IgM和 IgG 的分离。免疫球蛋白的分离多用葡聚糖凝胶 (Sephadex G-200)，最近也常用丙烯醛酰凝胶。葡聚糖凝胶，吸水后就成为多孔胶粒，当血清加入凝胶柱内，大分子蛋白质不能穿过凝胶孔进入胶粒内，它们在胶粒间隙的溶液中，洗脱快，随洗脱液最先流出。小分子蛋白质可以穿过凝胶孔，进入胶粒内而受阻留，向下移动较慢，洗脱亦慢。这样根据蛋白质分子大小不同，依次洗脱出来而得到分离。例如人血清经过葡聚糖凝胶G-200 过滤，第一个洗脱出来的蛋白峰为 IgM 抗体，第二个蛋白峰为 IgD 和 IgA 抗体，第三个蛋白峰为 IgG 抗体。

层析管可用 1.5～2.5×90 厘米，葡聚糖凝胶 G-200 用 0.1 M Tris 盐酸、0.2 M 食盐 (pH 8.0) 浸泡，使其充分吸水，上面浮游的细小微粒轻轻倒去。层析管先加缓冲液至半管，使慢慢流出，边流边加浸泡过的葡聚糖凝胶至 50～60 厘米高。为使凝胶安定，应继续流注缓冲液。用吸管加入检材，加入量以不超过层析管全容量的1.5%，检材的蛋白质浓度，不超过 5～6%。一般说，1.5 厘米层析管加入的蛋白溶液不超过 2 毫升；2.5 厘米层析管不超过 5 毫升。检材加入后，静静加入缓冲液，不要搅动凝胶面。流出速度每小时每平方厘米1～2毫升，按 35 滴 (2.25 毫升) 或 77 滴 (5.0 毫升) 分段收集。测定蛋白量和抗体量。

2. DEAE-纤维素层析分离法　先调节缓冲液，使离子交换体和蛋白持有不同的荷电，蛋白在离子交换体静电结合，然后改变缓冲液的盐浓度或 pH 强度，使蛋白洗脱出。这是由于缓冲液的改变，使蛋白质的荷电状态改变，蛋白质便从 DEAE 柱洗脱下来。由于不同蛋白质荷电状态不同，分子大小不同，与 DEAE 的结合力不同，因而在洗脱过程中，解吸先后不同，不同蛋白质遂即得到分离。采用 0.02 M (pH 7.6)，0.08 M (pH 8.0)，0.25 M (pH 8.0)的不同 pH 值，不同浓度磷酸缓冲液洗脱被层析血清，第一蛋白峰为 IgG 抗体，第二蛋白峰为 IgA 抗体，第三蛋白峰为 IgM 抗体[2]。

(1) DEAE-纤维素的活化：取 25 克 DEAE-纤维素，加入 0.1 N盐酸 500 毫升，置室温 30 分钟，搅拌后，吸引滤过。然后移入加有 0.1 N氢氧化钠 500 毫升的烧杯内，搅拌 10 分钟后吸引滤过。再用 0.1 N 氢氧化钠 500 毫升洗，然后加蒸馏水至滤液呈中性为止。最后再用层析管洗脱液，例如 0.01M 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗至滤液 pH 与洗脱液 pH 相同为止。加缓冲液混悬保存。

(2) 层析方法：取上述处理的 DEAE-纤维素混悬液，倾注入 2.5×50 厘米层析管内，加缓冲液平衡。被检血清先在缓冲液中透析 2 天 (低温)。本层析管可加血清 15 毫升。洗脱液可提高缓冲液离子强度，或降低 pH，或两者併用。例如磷酸缓冲液离子强度从 0.01 M增加至 0.3 M。洗出液的 OD (280 mμ)，边测定边收集，并与免疫球蛋白的特异性抗血清。用 Ouchterlong 扩散法测定各部分的免疫球蛋白量。本法所分离的各部分免疫球蛋白，含有血清的其他成分在内，需通过电泳法或其他法除去。

(四) 电泳分离法　本法是在适当 pH和离子强度的条件下，利用电荷的差异来分离蛋白的方法，也是物理化学最温和的方法。

琼脂免疫电泳系将抗原先在琼脂中电泳分离，再取已知抗体加入琼脂板的横槽中，进行双相扩散。当抗原与抗体比例合适时，即形成特异的白色沉淀弧。每一种抗原与相应抗体只出现一条沉淀弧。所以，应用本法可测定样品中抗原的组成，并可根据电泳迁移率作抗原抗体成分的鉴定。本法具有高度特异性，目前在免疫球蛋白的鉴定上，已被广泛应用。

1．用0.025 M，pH 8.6巴比妥缓冲液，配制1.2～2.0%琼脂（内含0.01%叠氮钠防腐），分装玻瓶内，用橡皮塞塞紧，4℃保存备用。

2．预先将玻璃板在火焰上微热，取上述琼脂（加热溶化），加于玻璃板夹层中，每块约6毫升，冷凝后移去夹子，使琼脂贴于玻璃板上。

3．打孔，加样：于玻璃板上打两个小孔，上孔加被检样品，下孔加对照抗原，所加液面应与琼脂平。

4．电泳：将琼脂板置电泳槽内，玻璃板两端用滤纸或纱布联接缓冲液。槽内为0.06 M，pH 8.6巴比妥缓冲液。电流强度为3 mA/cm，通电1.5小时。

5．电泳结束，取出琼脂板，用挖槽刀在两孔中间切一横槽，除去琼脂。于槽内加少量1%琼脂封底，待琼脂冷凝后，将免疫血清加入槽内，琼脂板置潮湿搪磁盘内室温24小时后观察结果。

6．结果分析：观察横槽边沉淀线的数量与位置，并将未知样品与已知抗原作对比分析。

（五）免疫吸附法　将可溶性抗原结合于不溶性载体。此抗原-载体结合物，即为一种不溶性抗原，它能吸着抗体。利用这个原理提纯抗体的方法，叫做免疫吸附法。

不溶性载体常用者有聚苯乙烯树脂、纤维素诱导体、琼脂凝胶蛋白质的不溶性聚合物。现将琼脂凝胶-抗原结合物的免疫吸附法介绍如下：

Sepharose 4 B或6 B、Chromagel凝胶20毫升加水20毫升，在磁石搅拌器搅拌，加入刚溶化的CNBr水溶液40毫升，立即用4 N氢氧化钠调整pH至11～11.3。因为反应液中的pH迅速偏酸，要不断加入少量4N氢氧化钠，以保持pH 11～11.3。8分钟后凝胶悬液用布氏滤器过滤。滤器上的凝胶用冰冷0.1 M碳酸钠缓冲液洗数次，所用缓冲液大约为凝胶的20倍，要尽量快洗。

洗完的凝胶立即把水吸去，移至冰水中的烧杯内，加入20毫升冷0.1 M碳酸钠缓冲液（pH 9.0），在搅拌器边搅拌边加入抗原液6毫升，持续搅拌1天。蛋白抗原作用3小时即可。凝胶1毫升加BCG 6毫克作用3小时有98～99%结合。

抗体的提纯：琼脂凝胶抗原结合物充填层析管，用pH 8.0缓冲盐水充分洗净后，加进抗血清或抗血清球蛋白（50%饱和沉淀）。随着抗体的吸附，凝胶上部不透明感觉慢慢增加，可以观察出凝胶吸附抗体的饱和情况。抗血清流完后，用pH 8.0缓冲盐水充分洗层析管。洗出液用OD 280 mu测定，洗至0.04以下为止，其次再加冰冷0.17 M甘氨酸盐酸缓冲液（pH 2.3）通过层析管，使抗体游离出来。洗出液分段采取。立即用冰冷的甘氨酸缓冲液（pH 11.5～12.0）中和，在pH 7.0～8.0缓冲盐水中透析。如有少量沉淀，离心后除去。

（六）巯基乙醇（2-ME）处理方法　2-ME含有硫氢基（HS），可以破坏含有双硫键（S—S）的大分子IgM抗体，裂解为无免疫活性的小球蛋白，但不能破坏小分子的IgG抗体。根据对2-ME敏感或抵抗程度，测定为IgM抗体或为IgG抗体。一般先把血清标本用盐水稀释为1:5，然后加等量0.2 M的2 ME盐水溶液，在37℃作用一定时

间后，检查其抗体活性，并以生理盐水和1:5血清等量混合，在同样温度、同样作用时间为对照。对2-ME敏感者为IgM抗体，对2-ME有耐性者为IgG抗体。关于2-ME区分两类抗体的可靠性问题，Crawford[3](1972)用其他分离方法进行了比较研究，他用钩端螺旋体感染豚鼠的早期（5～14天）混合血清，和晚期（23～214天）混合血清，前者对2-ME敏感，视为IgM抗体，后者对2-ME有耐性，视为IgG抗体。用这两份血清比较2-ME试验方法与其他方法所测定的血清中显凝抗体活性的分子种类。

1．在初期对2-ME敏感的显凝活性的免疫球蛋白的特征如下：

（1）在43%饱和硫酸铵发生沉淀；

（2）从葡聚糖凝胶层析洗脱，出现于第一峰；

（3）阴离子交换树脂层析，可为0.22M缓冲液（pH 8.0）洗脱；

（4）蔗糖密度梯度超速离心，局限于底部；

（5）免疫电泳在快gamma慢beta部位出现一条海鸥型沉淀线。这种对2-ME敏感的抗体活性免疫球蛋白，具有IgM分子的特征。

2．接种23天或以上，对2-ME有耐性的免疫球蛋白的特征如下：

（1）在50%饱和硫酸铵中沉淀；

（2）从葡聚糖凝胶层析洗脱，出现于第二峰；

（3）用0.01 M缓冲液（pH 8.0）不吸附于阴离子交换树脂，用大约0.06 M缓冲液（pH 8.0）可以洗脱下来；

（4）蔗糖密度梯度超速离心，位于中间部分；

（5）免疫电泳鉴定为慢γ球蛋白。

这种免疫球蛋白具有IgG分子的特征。

2-ME敏感性试验方法测定全血清中显凝活性的分子种类，与用分离法所得免疫球蛋白各部分的显凝活性分布是可比的。

表 1-1 对2-ME敏感和有耐性的抗体的特征比较

鉴别项目	2-ME敏感抗体（IgM抗体）	2-ME耐性抗体（IgG抗体）
总蛋白中	2.6%（7 mgN）	66%(18mgN)
总抗体中	63%(3.972单位)	73%(10.224单位)
葡聚糖凝胶层析	第一峰	第二峰
阴离子交换树脂	0.22M (pH8.0)可洗脱	0.01(pH8.0)可洗脱
每毫克蛋白氮的凝集抗体	567单位	568单位
蔗糖梯度高速离心抗体高峰	第7部分	第3第4部分
免疫电泳	β球蛋白部位有一条线	γ球蛋白部位有一条线

用2-ME区分两类抗体的方法简单，基层单位都可以做，故有很大实际意义。我们以钩端螺旋体病血清为对象，探讨了2-ME试验方法的若干影响因素，初步结果如下：

1）2-ME处理时间以37°C30分钟为宜。作用24小时可以影响早期和恢复期的IgG抗体，但对疾病极期的IgG抗体无害。

2）2-ME浓度用0.1 M和0.2 M处理血清，与作用时间有关，作用30分钟可有些差别，但作用60分钟以上无明显差别。

3）不同稀释度的血清，用2-ME处理，结果相同。

4）2-ME配成0.2 M浓度，在4°C保存一个月有效。

（七）半胱氨酸盐处理法 半胱氨酸盐亦为巯基化合物，含有HS化学基团。和2-