

# 酶联免疫吸附试验用于流行性乙型脑炎 抗体测定的探讨

辽宁省卫生防疫站 傅百川 孙英杰 刘来兴

近年来,酶联免疫吸附试验(简称ELISA)已成功用来测定多种抗病毒抗体<sup>[1]</sup>,本法不但敏感、特异,而且操作简便,适用于大批样品的检测。本文探讨了应用ELISA测定流行性乙型脑炎(简称乙脑)抗体,证明比血抑(HI)和补结(CF)敏感,可用于乙脑病人的血清学诊断和乙脑的流行病学调查。

## 材料和方法

**病毒和抗原制备:**乙脑病毒(高顺生株)由中国医科院病毒所供给,经鼠脑传代,保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

**抗原制备**参照文献<sup>[2]</sup>,将病毒感染的乳鼠脑组织,用pH9.0硼酸盐溶液(BBS)制成20%悬液; $4^{\circ}\text{C}$ 一万转离心30分钟,取上清加2.5%硫酸鱼精蛋白,使最终浓度为0.25%; $4^{\circ}\text{C}$ 30分钟后,经一万转离心30分钟,上清 $4^{\circ}\text{C}$ 四万转离心2小时;弃上清,沉淀用pH9.0 BBS制成悬液并恢复到原量;最后 $4^{\circ}\text{C}$ 一万转离心30分钟,上清即为病毒抗原。同时,以同样方法制备正常鼠脑组织悬液做为对照抗原。抗原均放 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。病毒抗原蛋白浓度A280毫微米为0.31,血凝滴度为1:2560;对照抗原蛋白浓度A280毫微米为0.08。

**血清:**乙脑疫区正常人血清采自大连市新金县和朝阳地区,乙脑非疫区正常人血清由青海省卫生防疫站赠给。乙脑病人血清由沈阳市和朝阳地区传染病院供给。对照用的阳性血清效价HI1:1280,CF1:64;阴性血清HI<1:20。血清均放 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

**HI和CF试验方法:**按常规进行<sup>[3,4]</sup>。血凝素用高顺生株自制。CF抗原系长春生物制品研究所制品。

**ELISA操作方法:**辣根过氧化物酶为西德产品;马抗人IgG血清(北京生物制品研究所制品),经盐析法和DEAE-纤维素离子层析法提取IgG;再用过碘酸钠法制成酶标记抗体(简称结合物)。

ELISA间接法用微量塑料板(上海塑料三厂产品)进行。具体方法<sup>[6]</sup>是将抗原用0.1M pH9.5碳酸盐缓冲液稀释至适当浓度,在塑料板相应孔中加入200微升, $4^{\circ}\text{C}$ 过夜后弃去抗原溶液,加入含有0.05% Tween20的pH7.4 0.02M磷酸盐缓冲液(简称PBS-T),室温( $25^{\circ}\text{C}$ )3分钟,弃去。如此反复冲洗3次(简称3'×3)。血清用含0.1%白明胶的PBS-T稀释适当浓度,加入包被抗原的孔中,室温2小时,冲洗3'×3。再加入用含0.1%白明胶的PBS-T稀释的结合物200微升,室温2小时,冲洗3'×3。加入含0.15%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的0.04%邻苯二胺(O.P.D),室温15分钟,加入2M硫酸终止反应。然后用肉眼观察呈色反应。用72型分光光度计在492毫微米下测定A值。每份被检血清与病毒抗原反应的同时,设有与正常鼠脑的对照抗原对照。每次试验设有阳性血清、阴性血清和PBS-T的对照。被检标本和各对照组各自均为四个孔。最后将同列四个孔的液体合并一起测定其A值(因该仪器的比色杯最小容积为1毫升)。被检血清A值的计算方法是与病毒抗原反应的A值减去与对照抗原的A值后所得数值,再按下列公式进行校正。

$$\text{校正值} = \frac{1.0}{\text{阳性血清 A 值}} \times \text{未知血清 A 值}$$

## 结 果

### 一、ELISA的最适试验条件



1. 国产微量塑料板的鉴定：用人IgG(100毫微克/毫升)，包被于塑料板孔中(4×10)，用自制的结合物(1:400)进行试验。结果表明邻近两孔的A平均值在A总平均值±10%内(0.9~1.1)，说明国产塑料板是合格的。

2. 酶结合物的滴定：将自制的结合物制成1:100~1:51200的不同稀释液，经ELISA测定，结果见图1。以A值为1.0时，相应的结合物浓度为最适浓度，其滴度稍高于1:400。在正式试验时选用1:400。

3. 病毒抗原的滴定：制成不同稀释度的病毒抗原(1:10~1:640)分别与阳性血清，阴性血清和PBS-T进行试验，同时设对照抗原列。结果见图2。以A值为1.0的相应抗原稀释度为抗原的最适稀释度时，稀释度接近1:20，正式试验时用1:20病毒抗原。

4. 血清最适稀释度的测定：将阳性血清和阴性血清做倍比稀释，从1:25~1:400，与病毒抗原、对照抗原进行ELISA。结果见表1。

从表1可以看出，血清稀释1:200时，阳性血清与病毒抗原的A值仍很高(1.20)，而阴性血清的相应A值低(0.32)，两者比值最大，约为3.8。并且血清与对照抗原的A值均在0.2以下。在正式试验时，血清采用1:200。

5. ELISA与HI、CF滴度的比较：选用3份

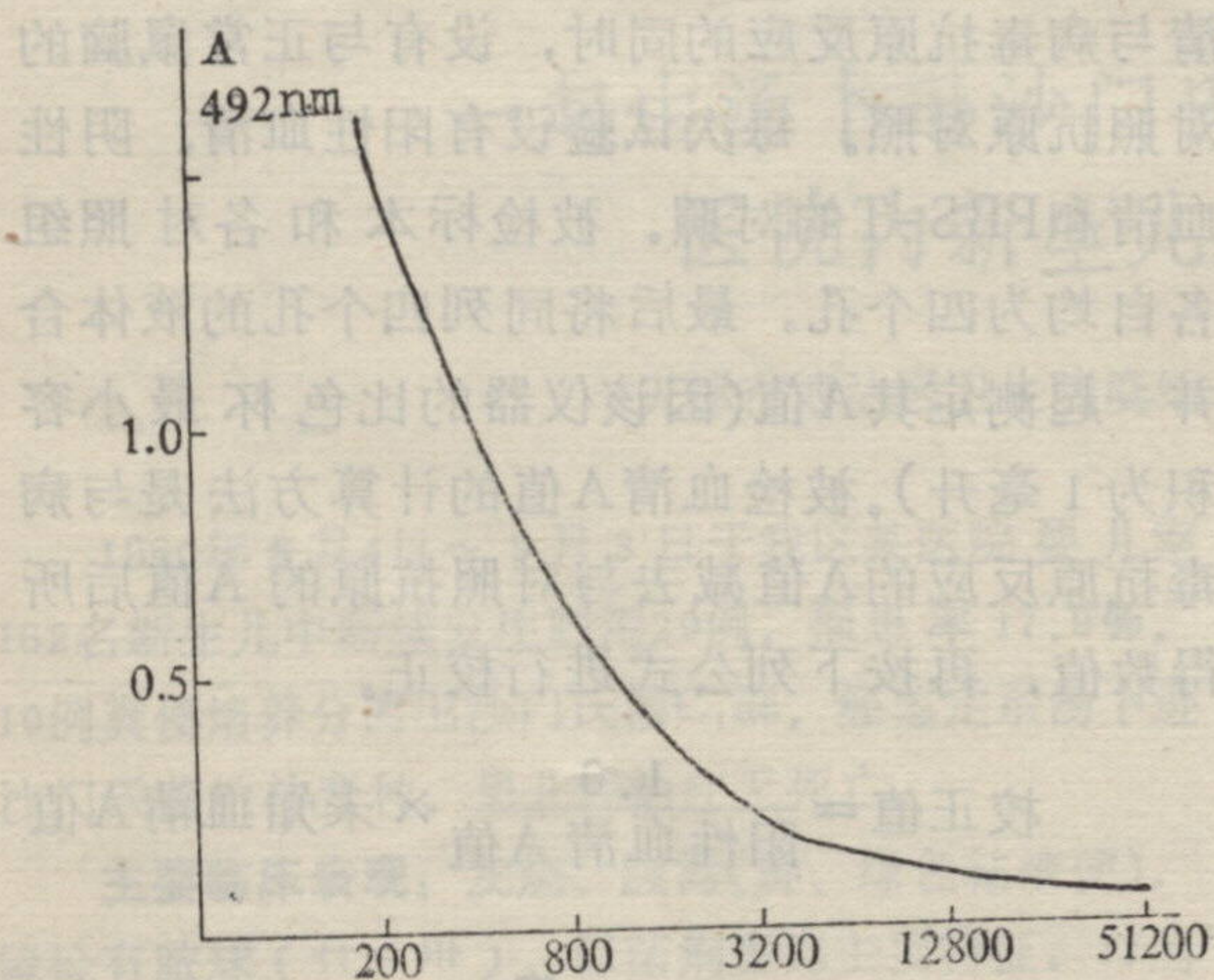


图1 结合物滴定

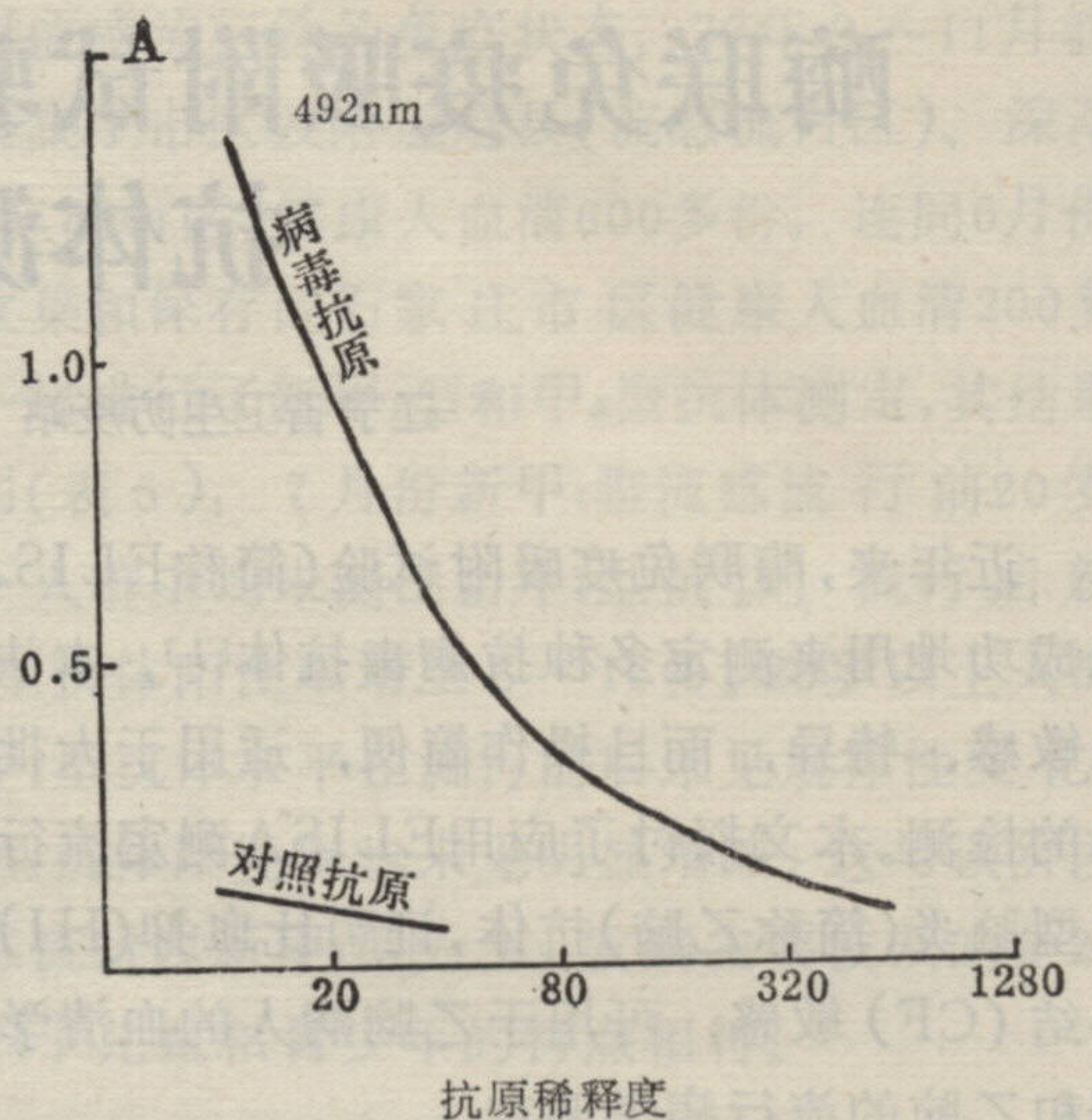


图2 病毒抗原滴定

表1 血清最适稀释度测定

血清	抗原	血清稀释倍数				
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
阳性	病毒	1.72	1.50	1.25	1.20	1.0
	对照	0.35	0.24	0.18	0.13	0.09
阴性	病毒	0.70	0.56	0.39	0.32	
	对照	0.45	0.30	0.26	0.19	

阳性血清用连续稀释法进行ELISA、HI和CF试验，判定血清效价。暂定与病毒抗原的A值减去对照抗原A值后>0.2的最大稀释度为该血清的ELISA终点，结果见表2。

表2提示，ELISA滴度较CF、HI为高，比CF敏感200倍以上，比HI敏感10倍以上。

表2 血清ELISA、CF、HI效价比较

血清号	ELISA	CF	HI
5	1:12800	1:16	1:160
7	1:3200	1:16	1:160
17	1:3200	1:16	1:320

二、ELISA用于抗乙脑血清的测定：根据上述试验确定：乙脑病毒抗原1:20，结合物1:400，被检血清1:200，对乙脑疫区、非疫区和乙脑病人血清进行了ELISA测定(单一稀释法)，并与HI和CF对比。

在乙脑疫区(新金县和朝阳地区)29份血清



中, HI $\geq$ 1:10的共10份, A值在0.54~0.94; 而HI<1:10的19份中, 有16份A值<0.2, 3份A值为0.2~0.3之间, 说明ELISA与HI测定的结果是符合的。

非疫区(青海省)的12份血清HI均<1:10, ELISA的A值也都<0.2。由此看出, ELISA与HI测定的结果也一致。用两种方法对乙脑疫区和非疫区的血清测得结果均有明显不同(表3)。

两例病人双份血清的A值, 恢复期明显高于急性期, 两者之比约为4。7份单份血清的

表3 乙脑病人血清ELISA测定结果

病人姓名	血清号	病日	HI	CF	ELISA
谢 ×	15-1	6	<1:20	<1:4	0.18
	15-2	38	1:80	1:14	0.75
杨 ×	18-1	4	<1:20	<1:4	0.25
	18-2	12	>1:1280	1:16	1.00
	2	11	1:80	1:16	0.70
	5	25	1:160	1:16	1.14
	7	18	1:160	1:16	0.87
	14	28	1:320	1:16	1.13
	17-1	9	>1:640	>1:128	1.20
17-2	16	>1:640	1:64	1.29	

CF、HI效价均为阳性, 其ELISA的A值都很高。ELISA与HI、CF的结果吻合。

### 讨 论

Voller等(1976)报道了用ELISA测定7例乙脑病人双份血清抗体, 目前关于这方面的资料很少。本次试验, 通过对ELISA法检测乙脑抗体的各种最适条件的探讨和用本法对小样本血清的实际测定, 表明国产塑料板经过冲洗后用于ELISA获得比较稳定的结果。用硫酸鱼精蛋白沉淀后超速离心法提取的乙脑病毒抗原具有较高的特异性, 而对照抗原的非特异反应较弱, 在多数情况下其A值为<0.2; 但与强阳性血清(A很高)反应, 有时出现较弱的呈色反应, A值在0.2~0.3之间。但此时该血清与病

毒抗原反应的A值很高, 两者之间差别明显, 并不影响判定结果。

用ELISA对小样本血清检测, 并与HI和CF比较, 结果是非常吻合的。HI>1:10, CF>1:4的血清, ELISA的A值均在0.4以上。两例乙脑病人双份血清测得的结果, 恢复期A值明显高于急性期, 与HI、CF的结果符合, 与Voller氏的报道一致。说明ELISA适用于乙脑病人的血清学诊断和乙脑的流行病学调查。

ELISA比HI、CF分别敏感十、百倍以上, 血清用量少, 不需要特殊处理, 包被抗原的塑料板经冲洗干燥保存, 则能在一般实验室中测定大批标本。如有能测定微量的分光光度计, 尚可简化。

本次试验用的结合物是马抗人IgG与酶的标记物, 它适用于抗乙脑IgG抗体的检出, 而不适于IgM抗体的测定。

在乙脑疫区的被检血清中, 有数例HI<1:10, ELISA的A值在0.4以下, 其中是否含有乙脑中和抗体, 有待进一步查明。此外, 因本次检测血清标本数有限, 尚难肯定抗乙脑血清的阳性A值标准。

(本次试验标本由青海省卫生防疫站, 沈阳市和朝阳地区传染病院和大连市新金县卫生防疫站、县医院等单位的支援, 一并致谢)

### 参 考 文 献

1. 中国医学科学院基础医学研究所: 医学参考资料, 38, 1979。
2. 东升、石田名香雄: 新ウイルス学II, 195页, 株式会社朝仓书店, 东京都, 昭和47年(1972)。
3. 北方八省(区)乙脑协作组检验小组: 流行性乙脑病毒的血凝试验和血凝抑制试验方法, 内部资料, 1977。
4. 上海市卫生防疫站: 病毒检验, 133~144页, 1977。
5. 北京市神经外科研究所免疫室: 免疫酶技术实验手册, 18, 22~23页, 1979。
6. 中国医学科学院基础医学研究所: ELISA间接法测定抗体, 内部资料, 4页, 1978。
7. Voller A et al: Bull WHO: 53: 55, 1976。