

酶联免疫吸附试验在流行性乙型脑炎血清学诊断上的应用

河南省卫生防疫站病毒室

汪 泽 王建丽 李自钊

流行性乙型脑炎(以下简称乙脑)是一种病死率较高的虫媒传染病,目前尚无特效疗法。因此,降低乙脑的病死率只能依靠早期诊断和及时治疗。但是常用的特异性诊断方法,如中和试验既不经济,又耗时太长;补体结合试验(CF)操作繁琐,且有抗补体现象发生;血凝抑制试验(HI)虽较敏感,但血清需预先处理,常影响其抗体滴度。可见,上述方法均不理想。近年来,酶联免疫吸附试验(ELISA法)已成功地应用于病毒性疾病的诊断;Voller等^[1]、顾方舟等^[2]并报告了应用ELISA法测定乙脑患者抗体的研究。我们也摸索了ELISA法的实验条件,并实际检测了225份临床疑似乙脑患者的血清(包括113份单份血清和56例双份血清),同时与CF法进行了比较,初步取得较满意的结果,现报告如下。

材料和方法

一、血清来源:225份临床疑似乙脑患者血清,收集自我省基层医疗单位,置-20℃保存待检。29份阴性对照血清系收集自西藏山南地区乙脑非疫区的其它患者血清。另外,还在本省采集1份乙型肝炎患者阳性血清和5份脊髓灰质炎患者阳性血清。

二、ELISA试验:

1.抗原:病毒抗原为冻干丙酮蔗糖乳鼠鼠脑抗原,血凝效价1:1280,福建省卫生防疫站供给(批号HA80-4)。试验前,抗原均经4℃10,000转离心1小时,吸取上清,再经4℃47,000转离心2小时,取沉淀物,用硼酸盐水(pH9.0)稀释到原体积,4℃保存备用。对

照抗原为同法制备的正常乳鼠鼠脑抗原亦经同样处理。试验时,病毒抗原与对照抗原经预备试验后选择1:100的稀释度。

2.酶结合物:系用辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG,北京生物制品研究所供给(批号804)。用时1:20稀释。

3.固相载体:4×10孔聚苯乙烯反应板,系上海塑料制品三厂生产。

4.溶液:

①pH9.6碳酸盐缓冲液:NaHCO₃ 2.94克,Na₂CO₃ 1.59克,加去离子水至500毫升。供包被抗原用。

②pH7.4 Tween-20缓冲液:甲液为0.2M Na₂HPO₄ 72毫升,乙液为0.2M NaH₂PO₄ 28毫升。甲、乙两液混匀后加NaCl 8.76克,再加去离子水至1,000毫升,最后加Tween-20 0.5毫升,供稀释和洗涤用。

③pH5.0磷酸柠檬酸盐缓冲液:甲液为0.1M柠檬酸液1,000毫升,乙液为0.2M Na₂HPO₄ 1000毫升,4℃保存备用。用前取甲液24.3毫升,乙液25.7毫升,混匀,加去离子水至100毫升,再加入40毫克邻苯二胺,待其完全溶解后;再加入H₂O₂ 0.15毫升。

5.试验方法:每份待测血清检测时,在反应板的一、二排加1:100的病毒抗原,三、四排加1:100的对照抗原(200μl/孔),放置湿盒中4℃包被过夜。翌日将板取出,用Tween-20缓冲液洗涤3次,每次3分钟,空干后加1:10稀释的待测血清(200μl/孔),置37℃2小时后取出,同前洗涤,再加酶结合物(200μl/孔),置37℃2小时后同前洗涤,然后加新配

制的磷酸柠檬酸盐缓冲液(200 μ l/孔),置室温暗处30分钟,然后取出,每孔加3%的硫酸1滴,终止反应。读取结果用“721”型分光光度计,取波长449 \AA 测定的消光值。

6. ELISA法结果判定:我们参照Bidwell等^[3]对风疹的判定标准,当待测血清的正常对照抗原OD值 <0.2 时,病毒抗原的OD值 ≥ 0.2 ,即判定为阳性; <0.2 者为阴性。双份血清的判定,采用恢复期血清OD值减去急性期血清OD值,当结果 ≥ 0.2 ,则判为阳性。每次试验除每份血清同时有对照抗原外,并设有阳性血清和阴性血清的对照。

三、CF试验:参照《病毒实验室诊断手册》^[6]。

结 果

一、敏感性:在225份血清中,其中75份CF法阳性的血清,有67份(89.3%)ELISA法亦呈阳性反应;99份CF阴性血清,52份ELISA法则呈阳性反应(52.5%)。比较ELISA法与CF法总的阳性检出率(表1),经统计学分析,两者有非常显著差异($t=7.55, P<0.001$)。在113份单份血清中,ELISA法阳性者69份(61.1%),CF法阳性者30份(26.5%),其差异非常显著($t=5.31, P<0.001$)。在56例患者的双份血清中,ELISA法阳性者30例(53.6%);CF法阳性者18例(32.1%)(表2),亦有显著性差别($t=2.30, P<0.05$)。结果可见,前者较后者更为敏感。

表1 ELISA法与CF法检出率的比较

	ELISA		合计(%)
	阳性	阴性	
CF 阳性	67	8	75(33.3)
CF 阴性	52	47	99(44.0)
抗补	36	15	51(22.7)
合计(%)	155(68.9)	70(31.1)	225(100.0)

为比较血清抗体滴度,用两法检测了62份血清,结果ELISA法较CF敏感16~64倍,前者血清抗体的几何平均滴度为1:20.2,后者

仅为1:1.2。

表2 ELISA法与CF法阳性检出结果的比较

	单份血清(份数)			双份血清(例数)		
	检查数	阳性数	%	检查数	阳性数	%
ELISA	113	69	61.1	56	30	53.6
CF	113	30	26.5	56	18	32.1

从患者不同病程血清抗体的呈现来看,无论在病程的任何阶段,ELISA法的阳性率都高于CF法(表3)。

表3 ELISA法与CF法在不同病程阳性率的比较

发病天数	检查血清数	CF		ELISA	
		阳性数	%	阳性数	%
1~	67	23	34.3	44	65.7
8~	30	16	53.3	21	70.0
15~	20	15	75.0	19	95.0
22~	7	4	57.0	6	85.7
28~	13	7	53.8	9	69.2
合计	147	65	44.2	99	67.3

在CF法呈现抗补的51份血清中,ELISA法有36份亦呈阳性反应(表1)。

二、特异性:在包被乙脑病毒抗原和对照抗原的反应板上,分别加1:10稀释的乙脑CF法阳性血清、乙型肝炎反向间接血凝试验阳性血清和脊髓灰质炎中和试验阳性血清。从表4可以看出,除乙脑病毒抗原与乙脑CF法阳性血清发生特异性反应外,余者均呈阴性结果。此外,检测乙脑非疫区的29份其它患者血清,其OD值范围在0~0.095之间,平均为0.018,也为阴性结果。我们检测的其它疾病标本虽较少,但在一定程度上也反映出ELISA法有良好的特异性。

三、重复性:在同等条件下,随机抽两份血清进行5次ELISA法重复测定,结果基本一致。表5表明ELISA法具有一定的重复性。

讨 论

从试验结果来看,225份血清总的阳性率,

表 4 不同疾病患者血清与乙脑抗原 ELISA检测的结果

姓名	程×	李×	魏×	梁×	刘×	蔡×	王×
病种	乙脑	乙肝	灰质炎	灰质炎	灰质炎	灰质炎	灰质炎
病毒抗原 OD值	1.10	0.14	0.06	0.09	0.11	0.03	0.02
对照抗原 OD值	0.05	0.07	0.02	0.02	0.04	0.02	0.01

表 5 两份血清5次ELISA法测定的结果

	测定次数					平均值 ±SD
	1	2	3	4	5	
标本 I OD值	0.30	0.30	0.29	0.29	0.29	0.29±0.005
标本 II OD值	1.15	1.13	1.10	1.16	1.11	1.13±0.025

单份血清阳性率、双份血清阳性率之间的差异都有显著的意义，两种试验方法的结果呈正相关关系($r=0.56$, $P<0.001$)。

根据我们应用ELISA法对照常用的CF法实际检测225份疑似乙脑患者的血清结果来看，无论是单份血清的阳性率或者是急性期和恢复期双份血清的检测结果，ELISA法不仅阳性率高，更为敏感，而且还具有早期诊断的价值。如在双份血清中，急性期血清经CF法检测为阴性的29份血清，其中12份(约41%的病例)ELISA法检测却为阳性；在不同病程阶段，ELISA法的阳性率都规律性地高于CF法。若进一步采用IgM的检测，则可作为早期诊断的工具。

乙脑抗原的选择是ELISA法试验成功的关键。我们预备试验中，通过对高顺生毒株冻干丙酮蔗糖乳鼠脑抗原、P₃毒株地鼠肾组织培养抗原以及经超声粉碎处理后的抗原的摸索试验，认为第一种抗原较为理想，特异性强，非特异性反应微弱。如经进一步高速离心纯化后，则可基本消除ELISA法的非特异性反应。在正式试验中，每次检测的阳性和阴性血清的对照，每份血清的病毒抗原和正常抗原的对照以及疫区和非疫区其它患者血清的对照，其结果都表明该抗原具有一定的特异性。

以肉眼观察即可判定结果；如用分光光度计可更为精确。在检测血清中，除有特异性病毒抗原外，一定要设正常抗原对照。如果正常抗原的OD值 ≥ 0.2 ，则采用病毒抗原OD值减去正常抗原OD值 ≥ 0.2 ，也可判为阳性。本次试验结果表明，上述判定方法较为合理。

Denyel等[4]认为，在ELISA法检测单纯疱疹病毒抗体时，血清污染和溶血现象会影响结果的判定。但在我们的试验中，溶血和抗补的血清对判定结果影响不大；Castellano等[5]在检测巨细胞病毒时，也报告溶血的血清不影响ELISA法的结果。但我们在检测严重污染的血清时发现，其正常抗原的OD值却超过0.2，在这种情况下，读取结果就要求同份血清的病毒抗原与正常抗原的OD值之差必须 ≥ 0.2 ，方可判为阳性。

另有文献[3,4]报道，包被风疹或单纯疱疹抗原的反应板，在低温下至少可保存数周而不影响结果。从我们有限的试验来看，包被乙脑抗原的反应板也可4℃保存15~20天不影响试验结果。因此，使用预先包被好抗原的反应板到现场进行流行病学调查，有一定实用价值。

摘 要

用ELISA法检测225份临床疑似乙脑患者血清抗体并将该法与CF进行了比较。ELISA法阳性155份，阳性率为68.9%；CF阳性75份，阳性率为33.3%。ELISA法几何平均滴度为1:20.2；CF为1:1.2。两种检测方法的结果呈正相关($r=0.56$, $P<0.001$)。此外还检测了乙型肝炎、脊髓灰质炎患者的阳性血清和乙脑非疫区的其他患者血清，均未发现阳性反应。结果表明ELISA法敏感、特异、简便，只需少量试剂，结果读取客观，且所用试剂、器材都容易获得。因此这一技术可用于实验室诊断，且适于乙脑的流行病学调查研究。

ABSTRACT

An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was developed for detecting antibody to Japanese B encephalitis virus, and the results were compared with complement fixation(CF). A total of

225 sera were tested. 75 out of these were positive (33.3%) by CF, whereas 155 sera were positive (68.9%) by ELISA. Geometric mean titer was 1:20.2 by ELISA but it was 1:1.2 by CF. There was a positive correlation between ELISA and CF ($r=0.56$ $p<0.001$). We have examined sera of patients of other diseases including hepatitis B, poliomyelitis and in area without Japanese B encephalitis. All of these sera showed negative result. The above results suggest that the ELISA have been proven to be sensitive, specific and simple to perform. Therefore, this technique is suitable for laboratory diagnosis and serum-epidemiological study of Japanese B encephalitis.

参 考 文 献

1. Voller A et al: Bull WHO, 53(1): 55, 1976.
2. 顾方舟等: 北京医学, 3(1): 1, 1981.
3. Bidwell DE et al: J Infect Dis, 136: S274, 1977.
4. Denoyel GA et al: J Clin Microbiol, 11(2): 114, 1980.
5. Castellano GA et al: J Infect Dis, 136: S337, 1977.
6. 北京协和医院检验科, 病毒实验诊断手册, 人民卫生出版社, 96~106, 1960.

(此项工作承北京生物制品研究所黄文萱主任、米竹君大夫, 医科院基础医学研究所孙月英同志以及西藏山南地区防疫站尹致英大夫的帮助和支持, 谨致谢意!)

吸附白破二联制剂人体接种反应与血清学效果

武汉生物制品研究所 广西壮族自治区防疫站 柳州地区防疫站 象州县防疫站

为防止白喉、破伤风向大年龄组发展, 我们于1978年试制出一种供成人加强免疫用的白破二联制剂, 并在象州县进行了一千多人反应观察和三年的血清学效果调查。

1. 反应观察: 吸附白破二联制剂接种48小时, 青少年组观察755人, 全身反应中, 无反应者占59.2~78.0%, 轻反应占20.6~37.7%, 中反应占1.3~6.1%, 强反应仅0.1毫升免疫组中有1例(体温 38.6°C), 占0.7%; 成人组观察381人, 无全身反应者占92.3~96.3%, 轻反应占3.1~7.6%, 无中、强反应。局部反应中, 青少年组无反应者占93.8~100.0%, 轻反应占0~2.2%; 成年组无反应者占67.7~100.0%, 轻反应占0~32.0%。结果表明, 成人组全身反应低于青少年组。唯成年组足三里穴位注射出现局部中反应20多例, 其原因有待进一步探索。

2. 血清学效果:

破伤风血凝抗体: 接种前学生组(7~15岁)血凝抗体 $>0.016\text{HAu/毫升}$, 占51.8~67.0%, 几何均值为0.0075~0.0211; 免后一周 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 达100%, 仅0.2毫升组占95%, 平均0.2~0.8, 为免前27~39倍; 免后一月 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 在99%以上, 平均2~3, 为免前161.5~370.0倍; 免后一年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占92.9~100%, 平均0.17~0.4, 为免前10.8~64.0倍, 有下降趋势; 免后第三年 $<0.016\text{HAu/毫升}$ 占77~88%, 平均0.002~

0.004, 下降明显。成人组免前 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占16~43%, 平均0.002~0.009; 免后一月 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占89%以上, 平均0.18~0.6, 为免前22~118倍; 免后一年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占85.7~96%, 平均0.09~0.13, 为免疫前的9.6~50.7倍, 亦有下降; 免后第三年 $<0.016\text{HAu/毫升}$ 为85~100%, 平均0.0019~0.0055, 下降明显。

白喉血凝抗体: 免前学生组 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 者占53~76%, 平均0.01~0.08; 免后一周 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占79%, 平均0.2~0.5, 为免前5~24倍; 免后一月 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 在96%以上, 平均2~3, 为免前35.6~146.2倍; 免后一年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占96.7~99.3, 平均0.3~0.5, 为免前2.86~24.2倍; 免后第三年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 仅占58~69%, 平均0.02~0.05。成人组免前 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 者占60~70%, 平均0.02~0.04; 免后一月 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 为100%, 平均4~7, 为免前119~334倍。各组比较, 以0.2毫升足三里注射效果最好, 平均值达7.7%; 其中免后一年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占98.2~100%, 平均0.6~0.8, 为免前17~34倍; 免后第三年 $>0.016\text{HAu/毫升}$ 占80~98.2%, 平均值0.1~0.5, 为免前3.1~13.6倍。

综上所述, 该制剂反应轻微, 效果良好, 用于成人、青少年应急或加强免疫是可行的。