

酶联免疫吸附试验检测森林脑炎 IgG抗体的研究

第三军医大学微生物学教研室

樊武舫 指导者 朱德钟

酶联免疫吸附试验(ELISA)用于虫媒病毒的血清学诊断,国内外均有报道^[1~3]。但在检测森林脑炎病毒(远东蜃传脑炎或苏联春夏季脑炎病毒)的特异抗体方面,迄今尚未有报道。本文初步建立了检测森脑病毒IgG抗体的ELISA方法,并与传统的补结试验(CFT)和血凝抑制试验(HIT)做了比较。现将结果报告如下:

材料与方法

一、病毒抗原的制备:以森脑病毒张株脑内接种2~3周龄健康小白鼠并连续传代。取第10代感染鼠脑(LD₅₀=8.2)磨成20%悬液,经鱼精蛋白沉淀、聚乙二醇-6,000浓缩及蔗糖密度梯度离心后,取血凝效价高的病毒组分,透析后4℃冰箱保存备用^[4,5]。

对照抗原以正常鼠脑组织同法制备。

二、试验用血清:共检测了48份临床诊断为森脑的病人血清,12份疫区正常人血清,49份非疫区正常人血清,总计109份。

1.阳性参考血清:(1)森脑豚鼠抗血清(购自长春生物制品研究所,CFT1:32,HIT1:80);(2)森脑病人阳性血清(CFT1:64,HIT1:160)。

2.阴性参考血清:(1)6只健康豚鼠混合血清;(2)10份非疫区正常人混合血清。阴性参考血清CFT<1:4,HIT<1:10。

三、酶结合物:辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗豚鼠IgG结合物,工作浓度1:800;HRP标记的山羊抗人IgG结合物,工作浓度1:3,200。均为本室制备。

四、ELISA操作程序:Voller's间接法略有改进^[6]。洗涤液为pH7.4PBS内含0.05%吐温-20;血清稀释液为pH7.4PBS内含0.5%吐温-20及4%山羊血清;酶结合物稀释液为pH7.4PBS内含0.05%吐温-20及2%山羊血清。聚苯乙烯板以0.2毫升/孔加入抗原,置4℃冰箱20小时;洗涤3次后以0.2毫升/孔加入稀释血清,置37℃2小时;同法洗涤后以0.2毫升/孔加入酶结合物,置37℃2小时;再次洗涤后以0.2毫升/孔加入底物(邻苯二胺-H₂O₂溶液),置37℃30分钟;最后以0.05毫升/孔添加终止液(2MH₂SO₄),于30分钟内测取OD/492nm(GXM-201酶标光度计,四川分析仪器厂)。

每次试验均设(1)阳性参考血清对照;(2)阴性参考血清对照;(3)正常抗原对照;(4)血清稀释液对照;(5)包被液对照。以包被液对照孔调零。试验除(1)外各对照孔OD值应<0.2。

用下述公式对各次试验结果进行校正:

$$\frac{\text{标准阳性参考血清OD}}{\text{本次试验阳性参考血清OD}} \times \text{被检血清}$$

$$\text{OD} = \text{校正值}^{[7]}$$

以1:100阴性血清OD均值加3个标准差作为阳性血清OD值界限^[8],即 $0.112 + 0.047 \times 3 = 0.253$ (人血清)

$0.153 + 0.03 \times 3 = 0.243$ (豚鼠血清)

五、CFT和HIT操作程序:按常规方法进行。

结 果

一、实验条件的选择:

1. ELISA 抗原滴定: 为确定抗原包被的最适浓度, 使用人阳性参考血清和阴性参考血清对不同浓度的病毒抗原进行方阵滴定。结果表明, 以 1:60 病毒抗原包被固相既不影响试验的敏感性又无明显的非特异反应; 而抗原浓度过高(1:30)非特异反应增强; 抗原浓度过低(1:120) 试验敏感性下降。用最适浓度的抗原包被固相, 1:100 阳性参考血清 O.D 值为 1.146, 1:100 阴性参考血清 O.D 值为 0.15; P/N 值 > 7.0。故选用 1:60 抗原为最适抗原浓度。

2. 抗原包被液 pH 对 ELISA 系统的影响: 用不同 pH 的溶液 (pH 8.0 PBS, pH 9.0 Na₂-HPO₄-NaOH 溶液, pH 9.6 碳酸盐缓冲液) 稀释相同病毒抗原并致敏固相, 然后对相同血清进行检测 (见图 1, 图中每一点代表 3 次测定的均值)。结果表明以 pH 9.0 溶液稀释抗原时, 非特异反应最低且特异反应不受影响。本试验选 pH 9.0 溶液为最适抗原包被液。

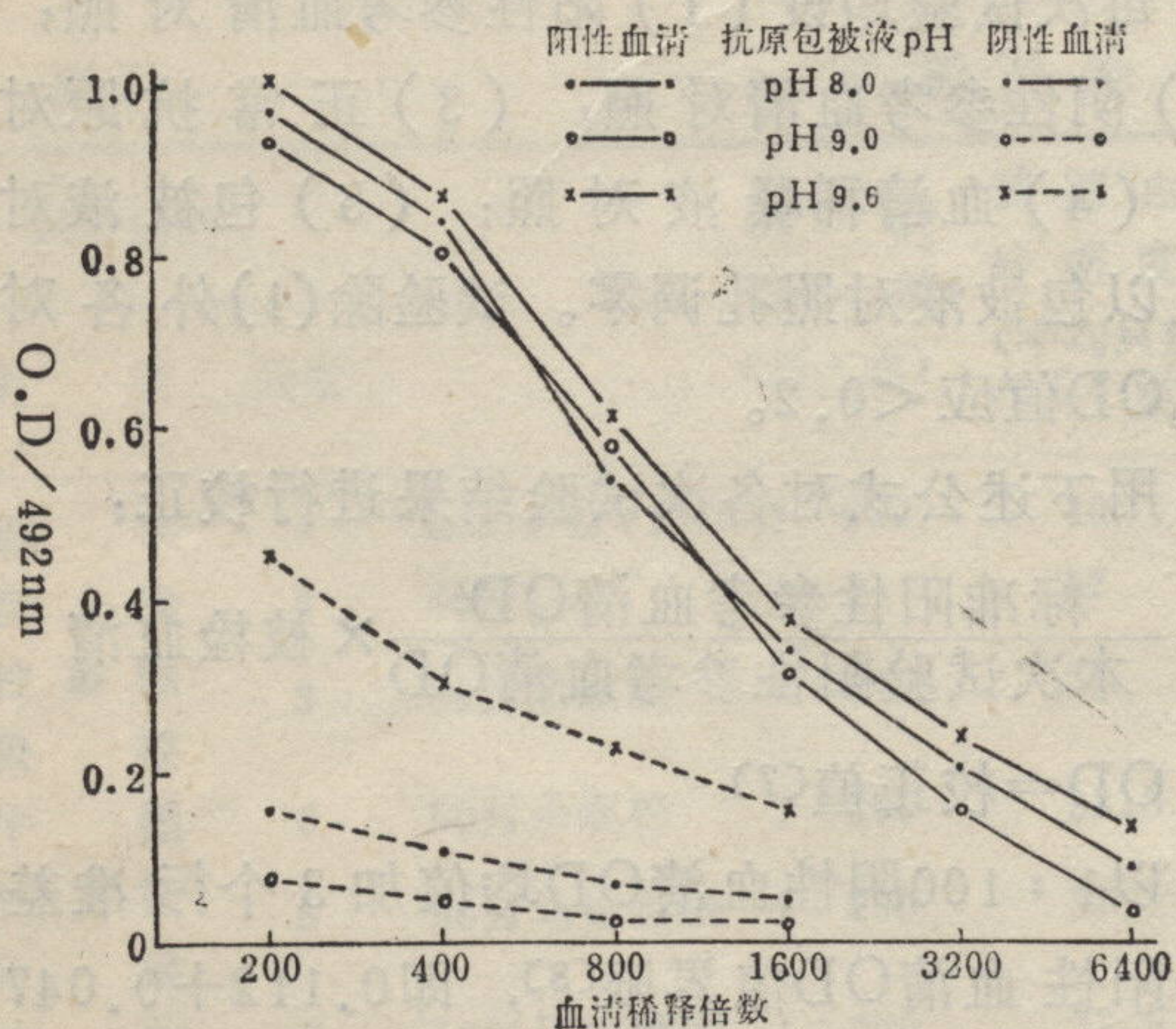


图 1 抗原包被液 pH 对 ELISA 试验的影响

3. 血清稀释液中吐温-20 浓度对 ELISA 系统的影响: 用浓度分别为 0.05%、0.5%、1.0% 的吐温-20 溶液稀释相同的豚鼠阳性参考血清和阴性参考血清并进行检测 (见图 2, 图中每一点代表 3 次测定的均值)。结果发现 0.05% 吐

温-20 不能有效地去除血清的非特异反应; 1.0% 吐温-20 又降低了试验的敏感性; 仅 0.5% 吐温-20 能有效地降低血清的非特异反应又不影响试验的敏感性。

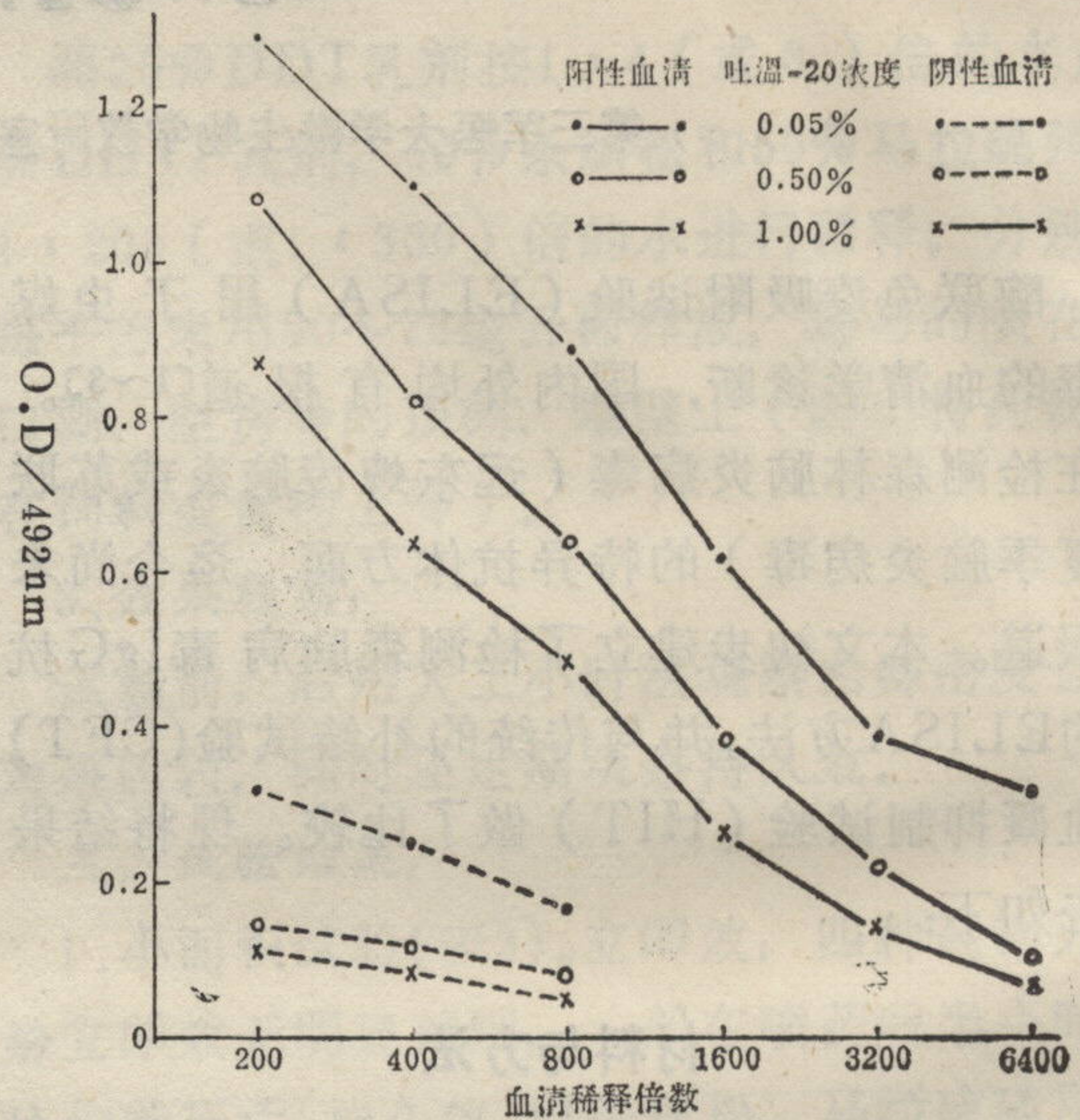


图 2 血清稀释液中吐温-20 浓度对 ELISA 试验的影响

4. 待检血清起始浓度的选择: 实验证实, 1981 年发病的病人血清经 1:800~1:12,800 稀释后仍呈阳性反应; 1972~1973 年发病的病人血清需 1:100~1:200 稀释才有呈阳性反应者; 12 份疫区正常人血清经 1:100 稀释后仅发现 1 份呈阳性反应; 49 份非疫区正常人血清 1:100 稀释后无 1 份呈阳性反应。为检出血清中最低浓度的特异抗体, 试验以 1:100 稀释血清作为检测的起始浓度。

二、特异性试验:

1. 抗原对照试验: 用病毒抗原和对照抗原同时检测相同血清, 结果表明人阳性参考血清与病毒抗原的反应 O.D 值为 1.146; 与对照抗原的反应 O.D 值为 0.15。阴性参考血清与病毒抗原和对照抗原的反应 O.D 值均 < 0.2。

2. 与乙脑免疫血清的交叉试验: 用本试验系统同时测定森脑病毒豚鼠抗血清和乙脑病毒豚鼠抗血清 (成都生物制品研究所 81-1, CFT 1:128, HIT 1:320), 结果发现森脑病毒抗

原与1:100乙脑免疫血清无交叉反应(表1)。

表1 森脑病毒与乙脑免疫血清的ELISA交叉试验结果

包被抗原	免疫血清	血清稀释倍数					
		100	200	400	800	1600	3200
森脑	森脑	0.88	0.71	0.53	0.40	0.29	0.16
森脑	乙脑	0.08	0.04	0.02	0	0	0

三、ELISA重复性试验:在不同时间内由不同人员操作,对36份病人血清检测了两次。结果发现26份(72.2%)滴度无变化;10份(27.8%)滴度改变,但仅限于一个滴度(倍比稀释)范围内,说明重复性是好的。

四、血清标本的检测及与HIT、CFT的比较:用ELISA、HIT和CFT三种方法对109份血清进行了平行检测。48份临床诊断为森脑的病人血清中,ELISA阳性45份;HIT阳性39份;CFT阳性31份。12份疫区正常人血清中,仅ELISA阳性1份,HIT和CFT未发现阳性。49份非疫区正常人血清中,ELISA、HIT、CFT均未发现阳性。未发现ELISA阴性而HIT和/或CFT呈阳性之血清。ELISA与HIT的符合率为93.6%,与CFT的符合率为86.2%,三种方法的符合情况(表2)是好的。

表2 ELISA、HIT、CFT三种方法检测109份血清的结果符合情况

		ELISA		合计(%)
		+	-	
HIT	+	39	0	39(35.8)
	-	7	63	70(64.2)
	合计(%)	46(42.2)	63(57.8)	109(100)
CFT	+	31	0	31(28.4)
	-	15	63	78(71.6)
	合计(%)	46(42.2)	63(57.8)	109(100)

经统计学分析表明,ELISA与HIT、CFT对109份血清的检测结果(相应检出滴度)呈非常显著的阳性相关($\gamma_{HIT}=0.9550$, $\gamma_{CFT}=0.8912$, $P<0.001$)。

比较三种方法的阳性血清检出份数,ELISA比HIT及CFT分别多检出7份及15份;比较三种方法的相应检出滴度,ELISA比HIT和CFT分别敏感10~80倍和50~200倍,这与ELISA阳性检出率高是一致的。

五、纯化病毒抗原及致敏固相的保存试验:纯化病毒抗原中添加NaN₃至1/万浓度,在4℃条件下可保存6周以上抗原活性无变化。致敏固相在4℃条件下可保存3周左右对试验结果无明显影响。

讨 论

一般认为,抗原纯度是建立间接ELISA系统的最关键问题[9]。但就多数虫媒病毒讲,从感染鼠脑中难以提取出高纯度高活性的抗原[4,5]。本试验联合使用鱼精蛋白处理-聚乙醇浓缩-蔗糖密度梯度离心三种方法,从感染鼠脑中获得了较满意的ELISA用森脑病毒抗原,且纯化抗原在4℃条件下可保存6周以上,这对ELISA技术在虫媒病毒血清学诊断中的推广和应用有一定意义。

目前,国内外广泛应用pH9.6碳酸盐缓冲液作为抗原包被液[10];以0.05%吐温-20溶液作为血清稀释液[10]。实验证明,就用ELISA方法检测森脑病毒的IgG抗体讲,上述条件并非最适条件。这一结果提示,不同病毒抗原对包被条件的要求是不一致的;不同ELISA系统亦可通过不同浓度的吐温-20溶液最大限度地去除血清的非特异反应。因此,不同的抗原-抗体系统应建立各自的最适条件。Hofmann等人在检测中欧蜱传脑炎特异抗体的间接ELISA系统中[2],以pH7.8PBS作为抗原包被液,以2%吐温-20稀释血清亦说明了这一点。

本试验系统与乙脑免疫血清(1:100)未发现明显的交叉反应(滴度<1:100)。国内其它作者在用ELISA方法检测乙脑IgG抗体的研究中[11],虽然报道乙脑病毒与森脑免疫血清存在交叉反应,但其O.D值并未达到阳性血清的O.D值界限。本文所用的抗原纯化方法与他们

不同,可能是交叉反应低的原因。

摘 要

本文报告了用ELISA技术检测森脑病毒IgG抗体的实验条件和方法,并与HIT和CFT作了比较。抗原由感染鼠脑经鱼精蛋白处理-聚乙二醇浓缩及蔗糖密度梯度离心纯化制备。共检测了109份血清,结果发现ELISA与HIT的检出符合率为93.6%,与CFT的检出符合率为86.2%;ELISA与HIT和CFT的相应滴度相关非常显著($r_{HIT}=0.9550, r_{CFT}=0.8912, P<0.001$),且比HIT和CFT分别敏感10~80倍及50~200倍,未发现与乙脑免疫血清存在交叉反应。ELISA技术特异性和重复性均好,所需标本量少且不需预先处理,可代替常规方法用于森脑的临床诊断、血清流行病学调查等研究。

ABSTRACT

A method was developed to use ELISA for detection of IgG antibody against spring-summer encephalitis, compared with HIT and CFT. Antigen was prepared from infected mice brains treated with protamine, PEG and purified with sucrose gradient ul-

tracentrifugation. 109 samples of sera were examined. It was found that the agreement between ELISA and HIT was 93.6%, ELISA and CFT 86.2%. The correlation between their titres was very significant ($r_{HIT}=0.9550, r_{CFT}=0.8912, P<0.001$). ELISA proved 10-80 times more sensitive than HIT and 50-200 times than CFT. Unspecific cross reaction with Japanese Encephalitis had not been found. In view of its specificity, high reproducibility and requirement of only small amount of sample, ELISA was recommended as a routine in clinical and epidemiological investigation of spring-summer encephalitis.

参 考 文 献

1. Frazier CL et al: J Clin Microbiol, 10: 583, 1979
2. Hofmann H et al: J Gen Virol, 42: 505, 1979
3. 顾方舟等: 北京医学, 3(1): 1, 1981
4. Slavik I: Acta Virol, 12: 535, 1968
5. Heinz F et al: Acta Virol, 21: 301, 1977
6. Voller A et al: Br J Exp Pathol, 56: 338, 1975
7. 石连发: 云南医药, 2(6): 47, 1981
8. Ukkonen P et al: J Clin Microbiol, 11(4): 319, 1980
9. 朱关福等译: 国外军事医学资料(第5分册), 1: 19, 1979
10. Voller A et al: Bull WHO, 53: 55, 1976

兰州市流行性乙型脑炎病毒分离与鉴定

兰州市卫生防疫站

赵星垣 高宝珍

兰州市近年来虽有疑似流行性乙型脑炎(下简称乙脑)病例发生,但均未作病毒分离特异性诊断。1981年8月,我们自市传染病院临床诊断为病毒性脑炎的病死者采得一份脑组织,分离出一株嗜神经性病毒,经鉴定为乙脑病毒,患者系我市郊区公社社员一男孩,9岁。81年8月22日上午发病,具典型病毒性脑炎症状,27日凌晨4时抢救无效死亡。

分离病毒:于患者死后5小时取脑组织接种6~8克小白鼠脑内,接种鼠于第4日发病,第5日全部死

亡,剖取发病死亡鼠脑连传三代,均于接种后第4天发病死亡。

病毒鉴定:以分离到的病毒与高顺生毒株制成的免疫血清作交互血凝抑制试验、补体结合试验(与北京生物制品研究所生产的免疫血清)、中和试验(与高顺生毒株免疫血清),对小白鼠皮下感染致死力试验等结果,证明自患者分离到的病毒株是流行性乙型脑炎病毒。