

# 醋酸纤维膜免疫扩散法鉴定蚊胃血血源的研究

中国预防医学科学院寄生虫病研究所\* 黄文洲 罗曼珍

鉴定蚊虫胃血来源,是虫媒疾病流行病学中虫媒食性调查及测定媒介能量的重要内容之一。鉴定方法,通常采用环状沉淀试验法<sup>[1,2]</sup>。我们在应用琼脂双向扩散法鉴定蚊胃血取得成功的基础上<sup>[3]</sup>,用醋酸纤维薄膜(简称醋纤膜)代替琼脂为载体作双向免疫扩散,其效果良好并可缩短免疫扩散时间。

## 材料与方 法

一、抗血清的制备:选择体重2.5~4 kg健康家兔为免疫动物,以人、牛、猪新鲜血清为免疫原,按本实验室常规使用之福氏佐剂血清抗原腹壁后腿法<sup>[4]</sup>,各免疫3只兔,分别制备兔抗人、牛、猪免疫血清,以环状沉淀试验法测定抗体效价,效价达 $\geq 1:32$ (抗原为1:5,000)<sup>[5]</sup>并证明无交叉反应后使用。

二、试验抗原:同种动物血清;实验室饲养中华按蚊刺吸已知动物离体血的胃血滤纸标本;现场采集的吸饱血中华按蚊胃血滤纸标本。试验时,剪下胃血滤纸标本浸泡于生理盐水0.5ml中,于室温下1小时或4℃冰箱中过夜后鉴定,估算抗原稀释度为1:500<sup>[5]</sup>。

三、免疫扩散:将醋纤膜(上海湖南化剂室出品,8×12cm,厚度12dm)放入巴比妥缓冲液(pH8.6)中浸透后,平铺于覆有一层滤纸的有机玻璃模板上,以玻棒圆头端在模板的孔上轻压使成凹井,模板打孔共24份,每份打孔7只,正中1只,外周6只,排列成梅花状。孔径约3.3mm,孔间中心距离为5mm。加样时将浸湿的醋纤膜以滤纸轻轻吸去多余的水份,中央凹井加入抗人、牛或猪血清,外周孔依次

加入待检的蚊胃血浸出液或作对照的正常兔血清。加样以充满凹井而不溢出为度,每凹井加液量约2 $\mu$ l。加样后,将醋纤膜放入有盖湿盒内的海绵垫上,置37℃恒温箱中反应2.5小时后,以清水浸泡3~5分钟,以洗去多余的抗原抗体,置0.5%氨基黑染色液中染色1~3分钟,放入盛5%冰醋酸培养皿中脱色2~4次,每次约5分钟,即观察结果,以抗原和抗体凹井间出现蓝色沉淀线者为阳性反应。

琼脂双向扩散按本实验室使用的方法<sup>[3]</sup>,抗血清为1:4,加样后于37℃恒温箱中反应24小时后观察结果。

四、环状沉淀试验:按常用的发酵管法,抗血清为1:16,加样后于37℃恒温箱中反应1小时观察结果<sup>[5]</sup>。

## 结 果

一、抗原抗体稀释度的选择:用牛血清为已知抗原,经生理盐水稀释后与各种浓度的兔抗牛血清进行醋纤膜免疫扩散,行双因素棋格式测定。结果全数标本均被检出的最低抗原稀释度为1:1,000及其相应的最低抗血清稀释度为1:4。以降低1个稀释度选择工作浓度,抗原用1:500及抗血清为1:2。以下试验均按此工作浓度进行。抗原为1:500时,血清蛋白质的含量按Lowry等法<sup>[6]</sup>测定,结果为0.78~0.91mg/ml。

二、特异性:离体刺吸人血或猪血的中华按蚊胃血滤纸标本,在冰箱内分别干燥保存1.5及15个月后,以醋纤膜免疫扩散及环状沉

淀试验同时分别对比鉴定72及36份,结果两法人血及猪血反应阳性率均为100%,与其他血源都未发现交叉反应。

三、吸血后不同时间制作和贮存不同时间的标本对比鉴定:上述的离体刺吸人血后4、12、24小时制作的中华按蚊胃血滤纸标本,以两法同时对比鉴定共108份,吸血后4及12小时制作的标本各36份,两法均全数检出;吸血后24小时标本36份,醋纤膜免疫扩散法人血阳性检出35份,环状沉淀试验检出36份,阳性检出率分别为97.2%与100%,两法结果近似。

现场采集的中华按蚊胃血滤纸标本148份,贮存6及16个月各为96及36份,两法阳性检出人数相同,分别为95及36份;贮存29个月标本16份,醋纤膜免疫扩散法及环状沉淀试验阳性反应各为10与11份,阳性检出率分别为62.5%及68.8%,两者无显著性差异。

四、现场蚊胃血标本对比鉴定:现场采集的中华按蚊胃血标本,在冰箱内干燥保存5~6个月后,以醋纤膜免疫扩散与环状沉淀试验两法同时对比鉴定1,061份。阳性检出率两法同为98.4%(表1)。

表1 1061份胃血标本醋纤法与环状法对比鉴定结果

试验方法	抗血清浓度	阳性数					合计	
		人	牛	猪	人猪	牛猪	数	%
醋纤法	1:2	12	677	322	14	19	1044	98.4
环状法	1:16	12	676	313	14	29	1044	98.4

另以醋纤膜免疫扩散法与琼脂双向扩散法同时对比鉴定现场蚊胃血标本452份,阳性检出率分别为99.8%与99.3%(表2)。

表2 现场蚊胃血标本醋纤法和琼脂双扩法对比鉴定结果

试验方法	抗血清浓度	标本数	阳性数			合计	
			人	牛	猪	数	%
醋纤法	1:2	452	0	451	0	451	99.8
琼脂双扩法	1:4	452	0	449	0	449	99.3

## 讨 论

利用醋纤膜作载体可进行区带电泳及免疫电泳扩散,常用于血清蛋白质的分离及免疫学测定。本文根据相同的原理,改变为双向免疫扩散用于蚊胃血血源的鉴定。以本试验选择1:2抗血清与1:500抗原的工作浓度进行试验,与常用的环状沉淀试验法同时对比鉴定蚊胃血标本,结果表明其阳性的检出及特异性等均与环状沉淀试验法相似。

鉴于醋纤膜由纯的醋酸纤维素构成,具有均一的泡沫样结构,厚约120μm,对分子的迁移几无阻力,免疫扩散所需时间比在琼脂上进行(24小时)要短,本试验仅需2.5小时,即取得与环状沉淀试验及琼脂双向扩散法相同的测定效果,表明醋纤膜免疫扩散法是一种较为快速的免疫扩散鉴定方法。且样品用量少,每凹井加样用量仅2μl,为琼脂双向扩散法每凹井用量(25μl)的1/12.5,为常用环状沉淀试验发酵管法每管用量(30~60μl)的1/15~1/30。此外,检查的标本可长期保存,或经透明液(冰醋酸3份,95%乙醇7份)处理几分钟使透明,干燥后长期保存。

此法操作虽然简便,但要求比较严格,醋纤膜的质量优劣,操作过程正确与否,加样的液量过多、过少或是否均匀,加样前后醋纤膜的过湿或过干等十分影响结果,实验时必须严密注意。而反应以后的醋纤膜必须经染色才能判读结果是此法的不足之处。

## 摘 要

以醋纤膜双向免疫扩散法鉴定蚊胃血血源,经试验选定的工作浓度抗血清为1:2及抗原为1:500,于37°C中免疫扩散2.5小时后观察结果,与常用的环状沉淀试验法同时对比鉴定中华按蚊胃血标本,两法结果一致及特异性相似,表明这是鉴定蚊胃血另一较为快速的免疫扩散方法。

A Cellulose Acetate Membrane Immunodiffusion (CAMID) Test for Identification of Host

Source of Mosquito Blood Meals Huang Wen-zhou, et al., Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai

A double immunodiffusion test using cellulose acetate membrane has been tried to identify the host source of mosquito blood meals and compared with the precipitin ring test (PRT). The optimum dilutions of antiserum and antigen for the test are 1:2 and 1:500 respectively. After an incubation for 2.5 hours at 37°C a positive result was shown by presence of a precipitin arc between the serum and the antigen.

72 and 36 blood meal specimens from *Anopheles sinensis* fed through a membrane on fresh human or pig blood and 1,061 specimens collected from field and 96, 36 and 16 specimens stored for 6, 16 and 29 months at 4°C respectively were examined. The results of the two methods were in good agreement. In addition, positive rates of 99.8% and 69.3% were observed in 452 specimens collected from

field and test by CAMID and agar gel diffusion (AGD) method respectively. It appears to be that the accuracy and the specificity between PRT and CAMID or AGD and CAMID methods for identification of mosquito blood meals were identical.

### 参 考 文 献

1. Weitz B. Identification of blood meals of blood-sucking arthropods. Bull Wld Hlth Org 1956;15:473.
2. Tempelis CH, et al A modified precipitin method for identification of mosquito bloodmeals. Am J Trop Med 1963;12: 825.
3. 黄文洲, 等. 琼脂双向扩散法鉴定蚊胃血血源的研究. 寄生虫学与寄生虫病杂志 1984;2(1):39.
4. 黄文洲, 等. 应用抗白蛋白单价免疫血清作对流免疫电泳鉴定蚊胃血血源. 中华流行病学杂志 1985;6(5):300.
5. 中国医学科学院寄生虫病研究所编. 实用疟疾学 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1978:88.
6. Lowry OH, et al Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chemist 1951;193:265.

(本项研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持)

## 乙型肝炎患者唾液中HBV-DNA的检测

兰州军区总医院传染科 樊俊杰 孙青珍 王积福 甘果夫

近年来, 从乙型肝炎病毒感染患者唾液中检出HBsAg的报道已引起了人们对通过唾液传播乙型肝炎的关注。我们应用<sup>32</sup>P HBV-DNA探针技术检测了46例乙型肝炎患者唾液中乙型肝炎病毒DNA(HBV-DNA), 并与血清中HBV-DNA、HBeAg、抗HBe(ELISA)进行了对照研究。以7例非乙型肝炎患者作为对照, 以探讨唾液中HBV-DNA的存在情况及与血清HBeAg和抗HBe的关系。现报告结果如下:

<sup>32</sup>P HBV-DNA探针试剂盒由北京医学院附属人民医院肝病研究室提供, 取被检者潜血阴性唾液60微升、血清40微升, 采用斑点杂交法检测HBV-DNA。46例乙型肝炎患者中, 急性肝炎29例、慢性迁延型肝炎17例。唾液和血清中HBV-DNA检出阳性率为63.04%(29/46)和80.43%(37/46)。46例中血清HBeAg阳性者26例, 其唾液和血清中HBV-DNA检出阳性率为80.77%(21/26)和96.15%(25/26)。HBeAg阴性者20例, 唾液和血清HBV-DNA检出阳性率

为40%(8/20)和60%(12/20)。血清HBeAg阳性者唾液和血清中HBV-DNA阳性率非常显著的高于血清HBeAg阴性者, 有极显著的差异( $P < 0.01$ )。血清抗HBe阳性者10例, 唾液和血清中HBV-DNA阳性率为20%(2/10)和40%(4/10)。抗HBe阴性者36例, 唾液和血清HBV-DNA阳性率为75%(27/36)和91.67%(33/36)。抗HBe阳性者唾液和血清中HBV-DNA阳性率非常显著的低于抗HBe阴性者, 有非常显著的差异( $P < 0.01$ )。血清HBeAg阳性者唾液HBV-DNA阳性率(80.77%)非常显著的高于抗HBe阳性者(20%), 有极显著的差异( $P < 0.001$ )。7例非乙型肝炎中甲型肝炎5例, 非甲非乙型肝炎2例, 唾液和血清HBV-DNA均为阴性。

根据本文乙型肝炎患者唾液中检出HBV-DNA, 尤以HBeAg阳性者, 其唾液作为媒介物传播乙型肝炎的流行病学意义是今后乙型肝炎预防对策中值得重视的一个问题。