

酶联免疫吸附试验检测鼠疫抗体实验研究

新疆自治区流行病学研究所 张挺秀 代 翔

精河县卫生防疫站 米吉提

七十年代初期, Van Woemen等^[1]首次报道了酶联免疫吸附试验(ELISA)技术, 并指出它具有敏感、特异、稳定、快速等特点。这一试验已应用于微生物学、寄生虫学、卫生学、内分泌学、免疫病理学和血液学等^[2,3]许多学科。1980年起作者等用ELISA间接法进行了鼠疫抗体检测的实验研究, 并与间接血凝试验(IHA)作了比较。现将结果报告如下。

材料和方法

一、被检血清:

1. 1980、1981年某疫区长尾黄鼠血清189份, 灰旱獭血清217份。

2. 阳性黄鼠血清对照: 非疫区捕获的黄鼠皮下接种10亿鼠疫EV菌, 免疫两周后, 采血分离血清, 血凝效价1:20。

二、试验方法:

1. PHA: 采用Boyden氏^[4]的试管法, 同时作HAF。血凝液为兰州生物制品研究所生产, 批号: 8001, 81001。

2. ELISA间接法试验: 其材料, 方法如下:

材料:

①载体: 聚苯乙烯微型血液板, 上海塑料三厂出品。

②辣根过氧化物酶(HRP), 美国Sigma V型, RZ为3.1。

③兔抗黄鼠、旱獭IgG的提纯: 于非疫区捕获的长尾黄鼠和灰旱獭, 采血分离血清。用饱和硫酸铵三次粗提后, 过DEAE纤维素, 用所得的纯IgG按Mollison氏^[5]采用的明矾

沉淀(即Proom氏法)γ球蛋白给家兔免疫。当血清环状试验效价达1:32,000和琼脂双相扩散效价达1:16时放血, 分离血清。血清用饱和硫酸铵粗提三次, 过DEAE纤维素, 即成为兔抗黄鼠、旱獭纯IgG。用凯氏定氮法测定蛋白含量, 结果兔抗黄鼠为1.6毫克/毫升, 兔抗旱獭为2.0毫克/毫升。

④酶结合物: 采用骆加里氏^[6]简易标记法的戊二醛—过碘酸钠法标记成兔抗黄鼠、旱獭IgG结合物。

⑤底物: 邻苯二胺(OPD)CP, 北京化工厂出品。

⑥终止反应法: 2M H₂SO₄。

⑦抗原: 兰州生物制品研究所生产冻干FI抗原, 批号: 7801, 81001。

步骤:

①包被抗原: 用pH9.6碳酸盐缓冲液将抗原稀释为10微克/毫升或200微克/毫升, 每个塑料板孔内加入0.2毫升, 置密闭的湿盒内于4°C过夜, 次日倾弃原液, 每孔加入洗涤液, 浸洗3分钟, 共3次(以下简称3×3')空干。

②加血清: 血清用血清稀释液由1:20开始作连续倍比稀释。每孔分别加入不同浓度血清0.2毫升于室温下置2小时, 洗涤3×3', 室温干燥。

③加入结合物: 每孔加0.2毫升酶结合物稀释液(预先滴定好, 兔抗黄鼠、旱獭酶结合物均作1:200或1:1000稀释), 于室温下置3小时, 洗涤3×3', 室温干燥。

④加底物: 每孔加0.2毫升, 于37°C置30分钟, 加入终止反应剂2M H₂SO₄ 0.05毫升,

终止反应，然后判定结果。

终点判定方法：

①目测法：将被检血清与阴性对照血清比较，颜色浅或近似对照者为阴性，比对照颜色深者为阳性。

②分光光度计测定法：用国产72型分光光度计，在490毫微米波段测定阴性对照血清的消光值(OD)，当被检血清OD值超过阴性血清OD值(0.14)一倍时，即为阳性。

本试验以目测法为主，滴定酶结合物、抗原，如目测结果可疑时，再用分光光度计确定。

结 果

一、阴性对照血清的消光值：用4份由非疫区捕获的长尾黄鼠和20份灰旱獭以及鼠疫ELISA阴性的血清进行试验，以490毫微米波段测定消光值，结果消光值在0.2以下。据此结果，选择消光值不超过0.2为鼠疫ELISA阴性对照。

二、血清颜色反应与血清阳性强度的关系：见表1。因无微量分光光度计，故测定平均OD值并高于阴性一倍以上者即为阳性。

表1 血清颜色反应与阳性强度的关系

血清号	目测值	消光值	效价	血清号	目测值	消光值	效价
		1:				1:	
*	-	0.14	-	65	+	0.68	160
13	±	0.17	10	73	+	0.71	40
14	-	0.12	-	76	+	0.22	20
19	+	0.38	20	85	+	0.32	40
24	-	0.012	-	88	+	0.88	80
25	+	0.32	20	116	+	0.69	40
34	-	0.135	-	133	-	0.11	-
36	-	0.05	-	134	-	0.175	-
47	-	0.115	-	147	-	0.175	-
49	-	0.16	-	152	-	0.175	-
52	-	0.14	-				

注：(+)阳性呈棕黄色，(-)阴性不显色

(±)为可疑，*阴性对照。

从表1可见，目测颜色反应深者平均OD值高，其ELISA滴度亦高。

三、ELISA的抑制试验(中和试验)：用鼠疫FI抗原10微克/毫升包被反应板，加入试验血清0.1毫升的同时再加入10微克/毫升的0.1毫升FI抗原进行中和，显色结果呈递减梯度，随着中和抗体浓度的递减，颜色逐渐减弱直至不显色。结果所有被试血清，均被中和三个稀释度以上。

四、ELISA与PHA阳性率的关系：用189份长尾黄鼠和217份灰旱獭血清，将ELISA与PHA进行比较时，其结果见表2。

由表2可见，ELISA阳性率可高于PHA阳性率10%以上，其平均几何滴度亦高。表2还可看出PHA阴性的19份黄鼠和6份旱獭血清而ELISA则为阳性。

五、ELISA特异性试验：从非疫区捕获的黄鼠2只，用10亿假性结核菌作皮下接种，于20天后，采血分离血清。然后再将疫区捕的4只黄鼠皮下感染7亿鼠疫强毒菌，于35天后，采血分离血清，同时用阳性对照血清121、603号及阴性对照血清，进行了ELISA和PHA试验。结果表明，假性结核免疫血清与鼠疫阴性血清，无论是ELISA还是PHA均未出现交叉反应，见表3。

讨 论

我们应用ELISA对189份长尾黄鼠血清和217份灰旱獭血清检测了鼠疫抗体，同时作PHA，结果ELISA获44份黄鼠阳性血清，PHA获25份。旱獭血清中ELISA获8份阳性血清，而PHA只获2份。经多次重复试验，仍得同样结果，证明ELISA滴度高于PHA。用鼠疫强毒菌和EV菌分别以7~10亿菌/毫升给黄鼠皮下接种，经14~35天后，可产生血凝素，尤其用鼠疫强毒免疫的1~4号黄鼠血清，可产较高的血凝素和ELISA高滴度。从而为检测鼠疫抗体提供了一种新的技术方法。1980、1981年在两个疫区调查的189匹长尾黄鼠其ELISA的阳性率为23.3%，而217匹灰旱獭的阳性率则为3.6%。本试验的目测法和测OD值的

ELISA 与 PHA 结果比较

材料来源	检查数	阳性率 (%)	ELISA 滴度						PHA 滴度						
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	81920
长尾黄鼠	189	44 23.3	9	4	5	4	14	3	2	3	218.8	25	13.2	6	2
灰旱獭	217	8 3.6	5	2	1	1	1	1	1	1	1	68.9	2	0.9	2

$$\chi^2 = 8.76$$

$$0.01 > P > 0.001$$

表 3 ELISA 特异性试验结果

材料来源	ELISA				PHA 滴度	HAI
	1 滴度	平均 OD值	2 滴度	平均 OD值		
黄鼠 1 号	80	0.69	80	0.73	40	—
" 2 号	160	0.88	160	0.93	160	—
" 3 号	160	1.09	80	0.74	80	—
" 4 号	1280	0.68	1280	0.82	640	—
假性结核	—	0.14	—	未作	—	—
"	—	0.15	未作	未作	—	—
121 号	160	0.76	未作	未作	—	—
603 号	160	0.70	80	0.84	—	—
鼠疫 EV	80	0.65	80	0.65	20	—
阴性对照	—	0.14	—	0.14	—	—

结果基本相同,建议在今后的野外调查工作中,可用目测法代替分光光度计测定法,以便于推广应用。我们对从非疫区采集的长尾黄鼠、灰旱獭血清以及假性结核菌免疫血清,进行了ELISA,结果未出现阳性和可疑阳性反应,看来无交叉和非特异性反应。

摘要

1980年作者等应用ELISA间接法对189份长尾黄鼠血清和217份灰旱獭血清检测了鼠疫抗体,并与间接血凝试验(PHA)比较。结果ELISA法检出黄鼠阳性血清44份,旱獭8份。而PHA法检出黄鼠阳性血清25份,旱獭2份。经多次重复试验,结果相同,证明ELISA滴度高于PHA。用鼠疫强毒菌和EV菌分别以7~10亿菌/毫升给黄鼠皮下接种,经14~35天后,可产生血凝素,个别的黄鼠可产生较高的血凝素和ELISA高滴度。从而为检测鼠疫抗体提供了一种新的敏感有效的技术方法。

ABSTRACT

In 1980, 189 sera samples from *Citellus undulatus* Pallas and 217 from *marmota baibacina* Brandt were tested for anti-plague antibody with ELISA. PHA was used parallelly as control. ELISA detected out 44 positive samples from sera of *Citellus* and 8 positive samples from *marmota*, whereas by PHA method only 25 from *Citellus* and 2 from *marmota*. By repeating tests, the same results were obtained, which indicated higher sensitivity with

ELISA. After subcutaneous inoculation of *Citellus* with $7 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cells of virulent or EV strain of *Yersinia pestis*, 14—35 days later hemagglutinin was revealed. In certain individuals of *Citellus undulatus Pallas* high titre of hemagglutinin and ELISA-antibody were found. The author believed that ELISA provides a new tool in plague surveillance as being more sensitive and effective in detecting specific antibodies.

参 考 文 献

1. Engvall E et al: Immunochim, 8: 871, 1971.
2. Carlson HE: Infect Immunity, 6: 703, 1972.
3. 罗海波等: 生物制品通讯, 6: 281, 1978。
4. 中国医学科学院流行病学微生物学研究所第一室: 世界卫生组织鼠疫委员会: 第4报, 内部资料, 1973。
5. 北京医学院微生物教研组: 实验免疫学, 第一版378~379, 人卫, 北京, 1980。
6. 骆加里氏: 上海免疫通讯, 4: 1, 1980。

沈阳市和平区1981年全区人口肝功及伤寒、痢疾、结核带菌情况的估计

沈阳市和平区卫生防疫站 陈 静

我区历年来, 对从事饮食服务行业的从业人员都要进行例行的体检, 检查肝功及伤寒、痢疾、结核的带菌状况。得出各相应的超过标准率(以下简称“超标”)及带菌的阳性率。现以1981年的检查为抽样, 对全区人口的超标及阳性率进行估计。

材料与方法: 检样为从业人员开业前健康检查的血、便、痰。

检验方法: SGPT采用赖氏法, 正常值为40单位微克/100毫升。硫酸锌浊度试验为改良孔氏法, 正常值为2~12单位。麝浊试验为麦氏法, 正常值为0~6单位。HBsAg为反向被动血凝法(RPHA), 以中和试验 $16\times(++)$ 以上为阳性, 超过上述各标准者为超标。痢疾定性凝集试验所用血清为长春生物制品研究所产品, 批号811。伤寒沙门氏菌属分型血清亦为长春生物制品研究所产品, 批号: 811。结核杆菌为直接涂片, 荧光染色, 镜检。

结果与分析: 在受检的8279人中, SGPT、硫酸锌浊度、射浊、浓碘、HBsAg、痢疾、伤寒、结核8个项目中一项以上“超标”者752人, 占总检人数的9.08%, 其中肝功超标者723人, 占超标总数的96.14%; 检出致病菌的仅有29人, 其中痢疾26人, 超标率0.32%; 伤寒2人, 超标率0.03%; 结核1人, 超标率0.01%, 说明结核的防治卓有成效, 以95%可信限的上限计

算, 全区最多也只161人左右。全区伤寒的上限可达376人, 说明对伤寒患者出院后的追踪监测是十分必要的, 应做到粪便反复培养均阴转后停止监测方为安全。痢疾的上限估计, 全区可达2470人, 是混在健康人群中的带菌者。加上伤寒和结核, 带菌人群可达3007人。其余单项超标者, 以HBsAg为最多275人, 超标率3.32%, 全区人口如以53.7万计算, 估计其95%可信限当为15,680~19,976人之间, 这是乙肝传播中不能忽视的潜在危险。其次为SGPT, 超标者267人, 超标率3.23%, 估计全区也将有1.5~1.9万人超标; 再次为浓碘, 超标率3.30%, 估计全区也将有1.5~1.9万超标; 再次为硫酸锌浊度237人, 超标率2.86%, 估计全区超标人数1.3~1.7万左右; 最低为射浊, 79人, 超标率0.95%, 估计全区超标人数将有2920~6283。

讨论: 以饮食服务行业的健康人群抽样检测, 他们的职业本身不存在上述8指标特别高的客观可能, 所以, 由他们的超标信息所求出的95%可信限区间, 其上限可能是低于人群的总体超标率, 因此, 这种估计具有流行病学价值。对这些人进行追踪监测, 直至阴转才终止管理的措施也是很重要的。

(本文系根据本站体检科、微生物检验科体检资料整理)