

# ELISA检测疟疾抗体有关问题的探讨

严自助<sup>1</sup> Dennis Bidwell<sup>2</sup>

自从Voller创建微量法ELISA以来,由于该反应的敏感性好,试剂节省等优点,已广泛用于疟疾、血吸虫病、丝虫病、锥虫病及黑热病等抗体的测定<sup>[1~4]</sup>。近年来国内也将ELISA法用于疟疾抗体的检测及流行病学调查<sup>[5,6]</sup>。为了制备高效价的疟原虫抗原,减少ELISA在实际应用中的非特异性反应,提高反应的重演性,以更适于流行区大规模应用,特将本人在伦敦纳飞尔德比较医学研究所短期进修期间所做的工作作一归纳,并介绍一种适于现场试验及流行病学调查的抗原保存方法。

## 材料与方 法

一、疟原虫可溶性抗原的制备:将冻存的感染恶性疟原虫夜猴血(原虫率20%左右)置室温融化,用PBS冷冻离心洗涤3次,弃上层液。沉淀加适量PBS置冰浴经超声粉碎处理20秒,于4℃8000转/分离心15分钟,上层液即为可溶性抗原。按常规法测定此抗原用于ELISA法的最适稀释度。恶性疟参考阳性与正常人参考阴性血清由纳飞尔德研究所供给,1:200稀释;过氧化物酶标记兔抗人IgG由纳飞尔德研究所制备,1:20000稀释。底物为邻苯二胺系统。

根据测定的抗原最适稀释度,再分别测定非洲恶性疟病人血清与欧洲正常人血清OD值。

二、抗原保存:上述抗原100 $\mu$ l加碳酸盐缓冲液200ml(1:2000)稀释后加至微量塑料板上,每井200 $\mu$ l,于4℃过夜,次日倾去未吸附的抗原液,用PBS/吐温与蒸馏水各洗涤2次,置37℃干燥。将抗原板置铝箔塑料薄膜袋内,每袋放一块抗原板及一小包干燥用矽胶,用电烙铁封口。抗原包板的即时,室温下

保存半年、1.5年,随机抽取2~6块板,按常规法测试非洲恶性疟,我国淮北地区间日疟病人血清及正常人血清。参考阳性及阴性血清由纳飞尔德研究所及我所疟疾诊断组提供,阳性血清OD值在1.0以上。

三、非特异性反应的消除:上述抗原作1:2000稀释包板,用PBS/吐温、含25%正常兔血清的PBS/吐温稀释血清或酶结合物,再按常规法测定上海献血员血清。

四、重复性试验:将上述抗原稀释后,用多头移液器加样包被4块塑料板,次日每井加同份稀释的疟疾病人血清、孵育、洗涤后亦以多头加样器加入酶结合物,于自动ELISA读数机上测定OD值。该实验重复测定4次。

另于抗原板上滴加14份恶性疟血清、5份正常人血清,每块板上设阳性参考血清、阴性参考血清及PBS对照。本实验重复测定4次,分别于自动ELISA读数机上测定OD值。

## 结 果

一、用超声粉碎、冷冻离心制备的可溶性恶性疟原虫抗原,经ELISA法测定其最适稀释度为1:2000。用该浓度包被塑料板测定42份非洲恶性疟、15份欧洲正常人血清,结果,病人血清的OD值均在1.0以上;正常人血清的OD值均在0.35以下。该抗原吸附于塑料板上置铝箔塑料袋中保存于室温下。于保存即时、保存后半年及1.5年,分别测定非洲恶性疟血清及正常人血清。结果于保存即时、保存半年时,检测恶性疟病人血清14份及10份,阳性率均为100%;于保存1年半时,检测我国淮北地

1 中国预防医学科学院寄生虫病研究所

2 伦敦纳飞尔德比较医学研究所

区间日疟病人血清103份,阳性85份,阳性率为82.5%(表1)。检测正常人血清均未有阳性反应。表明用吸附于塑料板上的形式来保存疟原虫抗原,其抗原性至少可保存一年以上。

表1 抗原板保存不同时间后测定各种血清的结果

保存时间	参考血清(OD)		病人血清		正常人血清	
	阳性	阴性	例数	阳性率(%)	例数	阳性率(%)
即时	0.97	0.18	14*	100	5	0
6个月	1.10	0.20	10*	100	5	0
18个月	1.00	0.10	103**	82.5	11	0

\*为非洲恶性疟病人血清 \*\*为我国淮北地区间日疟病人血清

二、以PBS/吐温稀释血清与酶结合物,测定12份上海地区献血员血清,结果有3份献血员血清的OD值在0.4以上。以含25%兔血清的PBS/吐温稀释血清及酶结合物,再测定上述献血员血清,结果3份有非特异性反应的血清OD值均降至0.4以下,但参考阳性血清的OD值仍保持在1.0以上。另用常规法PBS稀释,测定19份上海献血员血清,其中2份血清OD值在0.5~0.8,经用25%兔血清PBS/吐

表3 4次重复测定病人血清与正常人血清的结果比较

测定次数	病人血清*(OD)			正常人血清**(OD)	
	$\bar{X}$ (范围)	SD	CV	$\bar{X}$ (范围)	SD
1	0.94(0.71~1.18)	0.02	10.63	0.04(0.01~0.06)	0.004
2	0.96(0.70~1.17)	0.03	13.54	0.05(0.03~0.08)	0.008
3	0.84(0.63~1.02)	0.02	13.09	0.08(0.07~0.11)	0.004
4	0.88(0.67~1.04)	0.02	12.5	0.08(0.07~0.11)	0.004

\*14份; \*\*5份; 故未做CV分析。

最小差值为0.01,但并未影响反应的判断(表3)。

### 讨 论

一、本文采用感染恶性疟原虫猴血球经超声粉碎、冷冻离心制备的可溶性抗原,具有制备方法简单、效价高的优点,其抗原最适稀释度可达1:2000。但进行现场试验时,由于现

场条件不稳定,抗原容易失活,影响对测定结果的评价。本文将抗原一次稀释包被塑料板,保存于铝箔塑料袋内,于保存即时、半年及1年半检测参考血清、病人及正常人血清的结果表明,疟原虫的抗原性至少保存一年左右。因而建议在现场或实验室开展大规模疟疾ELISA检测时,可将抗原稀释包被塑料板保存,这样既可避免每次稀释抗原所引起的误差,又可

温稀释结合物再测定时,2份血清OD值均降至0.4以下,表明用25%兔血清PBS/吐温稀释血清样本及结合物或单用25%兔血清PBS/吐温稀释结合物均能有效地降低非特异性反应。

三、将疟原虫抗原作1:2000稀释包被4块塑料板,每块板上作48#,然后分别用多头移液器加同一份疟疾病人血清,经常规法洗涤、加结合物及自动读数机测定。重复4次的结果,每块板上最高值与最低值之间的差值为0.089~0.139。重复4次测定中,各次平均值见表2,经统计分析,其变异系数均不超过10%。

表2 4次重复测定同份血清的结果比较(每次48井)

测定次数	血 清		
	OD( $\bar{X}$ )	SD	CV(%)
1	0.61	0.006	6.84
2	0.49	0.001	2.23
3	0.56	0.003	4.67
4	0.54	0.007	9.46

在病人血清与正常人血清的4次重复测定中,平均值的差最大为0.12,各次测定的变异系数比较接近;同份血清间最大差值为0.19,

场条件不稳定,抗原容易失活,影响对测定结果的评价。本文将抗原一次稀释包被塑料板,保存于铝箔塑料袋内,于保存即时、半年及1年半检测参考血清、病人及正常人血清的结果表明,疟原虫的抗原性至少保存一年左右。因而建议在现场或实验室开展大规模疟疾ELISA检测时,可将抗原稀释包被塑料板保存,这样既可避免每次稀释抗原所引起的误差,又可

避免抗原因保存引起的效价降低。

二、本文制备的恶性疟原虫抗原，虽然有效价高的优点，但在测定上海地区的献血员血清时，对个别血清出现非特异性反应。其原因尚待分析。本研究结果表明，采用25%正常兔血清PBS/吐温稀释血清样本或酶结合物，或单用25%兔血清稀释结合物均能有效地降低非特异性反应而不影响反应的敏感性，适用于流行病学调查或监测。

三、微量ELISA法测定疟疾抗体有方法敏感、节省试剂的优点。但有时重复性不够满意。由于ELISA方法步骤多，试剂用量甚微，因而每一个环节，每一次稀释，每一次加样，都会影响反应结果。本研究在观察反应重复性时，将抗原一次稀释包板供多次试验，并采用多头（8只头）移液器加样，以最大限度地减少由于稀释或加样所引起的误差，经重复测定同份血清样本或不同的病人血清、正常人血清样本，虽各次测定的OD值间仍有误差，但经统计分析，各次测定的变异系数之差小于10%，属允许范围，不影响反应结果的判断。

### 摘 要

感染恶性疟原虫的夜猴血球经超声处理、低温高速离心后可获得高效价的恶性疟原虫可溶性抗原。该抗原吸附于聚苯乙烯塑料板上于室温下可保存抗原性一年以上，适于现场试验及流行病学调查。在ELI

SA测定中，用含25%正常兔血清的PBS稀释血清与酶结合物可减少非特异性反应。采用抗原一次稀释包板供多次试验及多头移液器加样可减少试验的误差，提高反应的重复性。

**ELISA Detection of Malaria Antibody: Related Problems** Yan Zizhu, et al., Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai

High titer-effective soluble antigen was obtained after sonicating and high speed low temperature (refrigerated) treatment of centrifuged monkey blood. The antigen absorbed on polystyrene plates could keep the antigenicity for at least twelve months at room temperature. This method could be used for field detection and epidemiological survey. Non-specific reaction could be lowered through diluting sera and enzyme conjugate by 25% normal rabbit serum-PBS. Test errors might be decreased and the reproducibility enhanced by using a batch of plates coated by diluted antigen in a series of tests and by adding samples with a polymicropipette.

### 参 考 文 献

1. Voller A, et al. Bull WHO 1974; 51: 209.
2. WHO Memorandum. Bull WHO 1976; 54: 129.
3. 严自助, 等. 中国医学科学院学报 1980; 2: 47.
4. 瞿靖琦, 等. 中华微生物学免疫学杂志 1981; 1: 134.
5. 王捷, 等. 中国医学科学院学报 1982; 5: 319.
6. 王捷, 等. 中华流行病学杂志 1985; 6: 74.

(本文系第一作者在伦敦纳飞尔德研究所短期进修期间所做的工作。本所韩萌同志协助抗原保存测定，特此致谢)

## 从四川省褐家鼠和黄胸鼠体内首次分离出汉坦病毒

阎炯有<sup>1</sup> 谢运菊<sup>1</sup> 张传安<sup>1</sup> 郑国英<sup>1</sup> 张尚贵<sup>1</sup> 唐文庭<sup>2</sup> 张 健<sup>2</sup>

我们应用Vero E6细胞直接分离法和单克隆抗体直接(FA)和间接(IFA)荧光抗体技术，从流行性出血热疫区达县捕获的家鼠鼠肺抗原阳性标本中，首次从褐家鼠和黄胸鼠体内分离出两株汉坦病毒。分别命名为R84-162株和Rf84-1株。将R84-162和Rf84-1

两株病毒进行连续传代，并经型和组特异性单克隆抗体鉴定，证明为野鼠型汉坦病毒。

- 1 四川省卫生防疫站
- 2 达县卫生防疫站