

# 冻干复溶对日本血吸虫病患者血清抗体检测的影响

蔡玉春 陈韶红 储言红 卢艳 艾琳 俞英昉 陈家旭\*

**【摘要】目的** 探讨冻干保存对日本血吸虫病患者血清抗体检测的影响。**方法** 将 30 份慢性日本血吸虫患者血清平均分为 2 份,其中 1 份冷冻干燥抽干为粉末,使用前用 0.9% 的生理盐水复溶到干燥前的体积,另 1 份无需处理,直接保存备用。用间接血凝法(indirect hemagglutination assay, IHA)、酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)、胶体染料试纸条法(dipstick dye immunoassay, DDIA) 3 种方法检测冻干复溶组和未处理组血清中日本血吸虫特异抗体,比较分析冻干复溶组与未处理组及 3 种检测方法阳性率的差异。**结果** 未处理组血清经过 IHA、ELISA 和 DDIA 法检测,阳性率均为 100%。冻干复溶组血清经 3 种方法检测,ELISA 法阳性率最高 100%(30/30),其次为胶体染料法 83.3%(25/30)和 IHA 法 80.0%(24/30)。经统计学分析,未处理组及处理组血吸虫病患者血清抗体阳性检出率不存在统计学意义差异,3 种免疫学方法检测未处理组及处理组血清抗体阳性率也不存在统计学意义差异。**结论** 冻干复溶对日本血吸虫患者血清抗体检测影响较小,冷冻干燥保存方法或可成为日本血吸虫患者血清长期保存的有效方法之一。

**【关键词】** 日本血吸虫; 冻干保存; 复溶; 血清抗体

## The influence of lyophilization and redissolution to detection on serum antibodies of schistosomiasis japonica patients

Cai Yuchun, Chen Shaohong, Chu Yanhong, Lu Yan, Ai Lin, Yu Yingfang, Chen Jiayu\*. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center Tropical Diseases, Shanghai 200025, China

\*Corresponding author: Chen Jiayu, Email: chenjiayu1962@163.com

Supported by Major National Science and Technology Projects (2012ZX10004220) and Parasitic and Tropical Diseases Resource Center Project of National Science and Technology Basic Conditions Platform Program

**【Abstract】Objective** To discuss the influence of lyophilization and redissolution to detection on serum antibodies of schistosomiasis japonica patients. **Methods** Thirty sera samples of chronic schistosomiasis japonica patients were used in this study, Each serum was divided into 2 equal parts, one part of the sera was freeze dried as powder, the sera were redissolved to the same volume with 0.9% normal saline at room temperature, the other part was without treatment and directly saved for further use. Serum samples of the untreated group and lyophilization and redissolution group were all detected by indirect hemagglutination assay (IHA), enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) and dipstick dye immunoassay (DDIA) methods for specific antibody of *Schistosoma japonicum*. The differences of positive rate between the untreated group and lyophilization and redissolution group and among the three detecting methods were statistically analyzed. **Results** The positive rates of the untreated group detected by IHA, ELISA and DDIA were all 100%. The positive rate of the lyophilization and redissolution group detected by ELISA was 100% (30/30), by DDIA method was 83.3%(25/30) and by IHA method was 80%(24/30). There was no significant difference between the untreated group and lyophilization and redissolution group and among the three detecting methods. **Conclusion**

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.05.009

基金项目: 国家重大科技专项 (2012ZX10004220); 国家科技基础条件平台专项寄生虫病和热带病科技资源中心项目  
作者单位: 200025 上海, 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心

\* 通信作者: 陈家旭, Email: chenjiayu1962@163.com

The influence of lyophilization and redissolution to detection on serum antibodies of schistosomiasis japonica patients was rather small, so the freeze drying preservation method could be used for long term preservation of sera samples of schistosomiasis japonica patients.

**[Key words]** *Schistosoma japonicum*; Lyophilization; Redissolution; Serum antibodies

血吸虫病是一种广泛流行于热带和亚热带地区的人兽共患寄生虫病,血吸虫病防治一直是寄生虫病防治工作的重点<sup>[1-2]</sup>,免疫诊断在血吸虫病防治中起着非常重要的作用<sup>[3]</sup>。免疫诊断需要标准的阳性血清参考品,因此长期保藏一批采自血吸虫病感染疫区的阳性血吸虫病患者血清很重要。中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所已经建立全国血吸虫病患者血清库,现保藏确诊血吸虫病患者血清200余份。常规保藏方法是超低温(-80℃)冰冻保存,但关于长期低温冰冻保存对血清抗体检测的影响还知之甚少。在临床中,标准血清一般为常温冻干保存,稳定性好、有效期长,且不影响其活性<sup>[4]</sup>。而冻干保存对血吸虫病患者血清抗体检出率的影响还少有研究。为了探讨冻干保存对血吸虫病患者血清抗体检测的影响,本研究用3种检测方法比较了血吸虫病患者血清在冻干前后血清中日本血吸虫特异性抗体检出情况,以评估冻干保存方法是否适用于血吸虫病患者血清的保存。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

检测抗血吸虫循环抗体间接血凝法(indirect hemagglutination assay, IHA)试剂盒购自安徽安吉医药科技有限公司;酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)试剂盒购自深圳康百得公司;胶体染料试纸条法(dipstick dye immunoassay, DDIA)由江苏省血吸虫病防治研究所提供。

### 1.2 血清的冻干与复溶

30份慢性日本血吸虫患者血清为本所血清库新采集,每份1 ml,将每份血清平均分为2份,其中一份放入真空冷冻干燥器中抽干为粉末,使用前用0.9%的生理盐水室温下复溶到干燥前的体积,另一份无需处理,直接放4℃冰箱保存备用。

### 1.3 IHA法检测

取冻干致敏的红细胞加稀释液稀释并充分混

匀。于血凝板的第1列第1孔加稀释液100 μl,第2~4孔各加稀释液25 μl。再向第1孔加待测血清25 μl,充分混匀后吸出25 μl于第2孔,第2孔充分混匀后吸出25 μl于第3孔,第3孔充分混匀后吸出25 μl于第4孔,第4孔充分混匀后弃去25 μl,然后在第1孔吸取75 μl弃去。第1~4孔每孔加致敏红细胞悬液25 μl,震荡1~2 min,置37℃条件下30 min观察结果。IHA阳性阈值滴度为1:10。同时作阳性、阴性对照,所有结果由同一人判读。

### 1.4 胶体染料试纸条法检测

将标记染料混匀后加入塑料小杯中,再加待检血清10 μl,混合后将试纸条插至杯底,10 min后观察结果。检测带与对照带均出现紫蓝色为阳性反应;对照带出现紫蓝色,而检测带不显色为阴性反应。

### 1.5 ELISA法检测

将冻干后复溶的血清及未处理血清每个样本100 μl加入聚苯乙烯板孔中,37℃孵育1 h。PBST洗涤3次,加HRP-IgG 100 μl,37℃孵育0.5 h, PBST洗涤3次,加TMB显色液37℃孵育5 min,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>液终止反应,用酶标仪测定吸光度值(A<sub>450</sub>)。同时设空白和阴、阳性对照。以样品孔A<sub>450</sub>值>阴性对照均数×2.1作为阳性结果的参考阈值(cut off value, COV)。

### 1.6 统计学分析

用SAS软件进行McNemar检验的统计分析,两两比较3种方法检测日本血吸虫抗体阳性率的P值及Kappa值,分析未处理组及冻干复溶组之间有无统计学差异,以及不同免疫检测方法之间是否具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 IHA法检测结果

30份新鲜未处理血清样本及30份冻干后复溶的血清样本用IHA检测,结果未经处理组均为阳性,抗体滴度在1:10~1:40之间,1:40的为20份,1:20的

为 5 份, 1:10 的为 5 份。冻干复溶后的样本阳性 24 份, 阴性 6 份, 其中阳性样本中 1:40 的为 13 份, 1:20 的为 4 份, 1:10 的为 7 份 (表 1)。

### 2.2 胶体染料试条法检测结果

胶体染料试条法检测未处理组及冻干复溶组的 2 组血清样本, 未处理组 30 份血清均为抗体阳性, 冻干复溶后的血清样本有阳性 25 份, 阴性 5 份 (表 2)。

### 2.3 ELISA 检测结果

ELISA 法检测未处理组和冻干复溶组血清, 其阳性参考值为 0.364, 阴性参考值为 0.077, COV 值为 0.197, 实验结果符合要求, 结果成立。如表 3 所

示未处理组及处理组各 30 份血清样本, 经 ELISA 法检测结果均为阳性。

### 2.4 统计学分析

未处理组血吸虫病患者血清经过 IHA、ELISA 和 DDIA 法检测, 阳性率均为 100%。冻干复溶组血清经 3 种方法检测, ELISA 法阳性率最高 100% (30/30), 其次为 DDIA 法 83.3% (25/30) 和 IHA 法 80.0% (24/30) (图 1)。经统计学分析, 未处理组及处理组血吸虫病患者血清抗体阳性检出率无统计学意义差异 ( $P > 0.05$ ), 3 种免疫学方法检测未处理组及处理组血清抗体阳性率也无统计学意义差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。IHA 法与 DDIA 法一致性最高, 其  $kappa$  值为 0.56, 其次为 DDIA 法与 ELISA 法, 其  $Kappa$  值为

表 1 IHA 法检测血吸虫病患者血清结果

Table 1 The detection results of the untreated and treated sera samples by IHA method

组别 Group	样本检测滴度 <sup>c</sup> Titer of the samples <sup>c</sup>									
A	1:40	1:20	1:40	1:10	1:40	1:20	1:40	1:40	1:10	1:40
B	1:10	1:5	1:40	1:5	1:40	1:5	1:40	1:10	1:5	1:20
A	1:40	1:40	1:20	1:40	1:40	1:40	1:20	1:20	1:40	1:40
B	1:5	1:10	1:20	1:40	1:40	1:40	1:10	1:10	1:40	1:20
A	1:10	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:10	1:40	1:10	1:40
B	1:10	1:20	1:40	1:40	1:40	1:40	1:5	1:40	1:10	1:40

A: 未处理组; B: 冻干复溶组; C: 样本检测滴度  $\geq 1:10$  为阳性

A: The untreated group; B: Lyophilization and redissolution group; C: The samples with titer beyond 1:10 were all positive samples

表 2 胶体染料试条法检测血吸虫病患者血清结果

Table 2 The detection results of the untreated and treated sera samples by DDIA method

组别 Group	检测结果 Result of detection									
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

A: 未处理组, B: 冻干复溶组 A: The untreated group, B: lyophilization and redissolution group

表 3 ELISA 法检测血吸虫病患者血清结果

Table 3 The detection results of the untreated and treated sera samples by ELISA method

组别 Group	吸光度 $A_{450}$ Absorbance $A_{450}$										阴性对照 Negative control	阳性对照 Positive control
A	1.177	0.451	2.520	1.053	2.246	0.550	0.652	1.098	0.968	1.502	0.077	0.364
B	1.144	0.488	2.395	1.039	2.181	0.527	0.620	1.019	0.861	1.463		
A	0.723	1.818	1.743	2.013	2.236	2.118	1.027	1.848	1.986	1.529		
B	0.616	1.860	1.731	2.020	2.296	2.010	0.933	1.873	1.655	1.326		
A	0.858	1.698	1.330	0.977	2.556	2.153	1.099	1.786	0.512	0.737		
B	0.829	1.736	1.436	0.969	2.3	2.086	1.003	1.718	0.413	0.697		

A: 未处理组, B: 冻干复溶组 A: Untreated group, B: Lyophilization and redissolution group

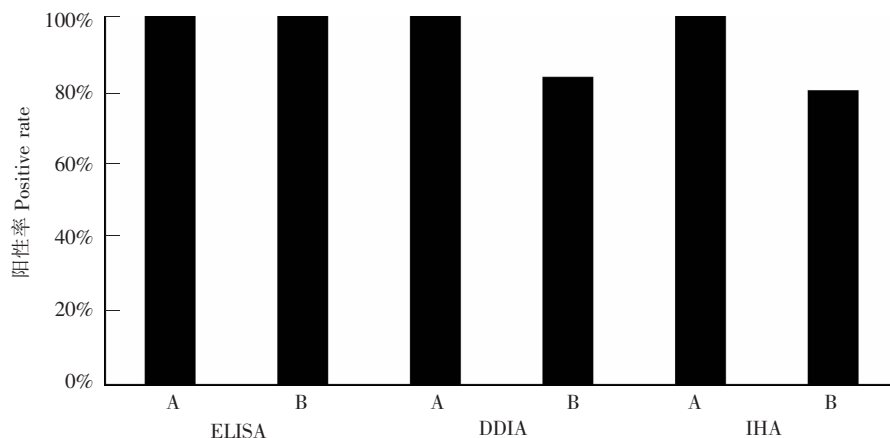


图1 3种不同免疫检测方法检测未处理及冻干复溶样本的阳性率

A: 未处理组, B: 冻干复溶组

Fig. 1 Detection results of the untreated and treated sera samples with three different test systems

A: Untreated group, B: Lyophilization and redissolution group

表4 3种不同方法检测处理组及未处理组血吸虫病患者血清结果的统计学分析

Table 4 Statistical analysis of the results from three different methods to detect the untreated and treated sera samples of schistosomiasis japonica patients

组别 Group	A 组 P 值 (Kappa 值) P value of group A (kappa value)			B 组 P 值 (Kappa 值) P value of group B (kappa value)			
	IHA	ELISA	DDIA	IHA	ELISA	DDIA	
	A	IHA	-	1	1	0.10 (0.17)	1
	ELISA	1	-	1	0.10 (0.17)	1	0.17 (0.21)
	DDIA	1	1	-	0.10 (0.17)	1	0.17 (0.21)
B	IHA	0.10 (0.17)	0.10 (0.17)	0.10 (0.17)	-	0.10 (0.17)	0.56 (0.67)
	ELISA	1	1	1	0.10 (0.17)	-	0.17 (0.21)
	DDIA	0.17 (0.21)	0.17 (0.21)	0.17 (0.21)	0.56 (0.67)	0.17 (0.21)	-

A: 未处理组, B: 冻干复溶组 A: Untreated group, B: Lyophilization and redissolution group

0.21, IHA法与ELISA法一致性最差, 其Kappa值为0.17。

### 3 讨论

免疫诊断在血吸虫病防治中起着非常重要的作用, 我国已发展了多种血吸虫病免疫诊断方法, 如皮内试验、环卵沉淀试验、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验、胶体染料试纸条等<sup>[5]</sup>, 但至今尚无一种诊断试剂被国家批准为合法的免疫诊断试剂, 也无统一的质量标准和质量标准品。另外, 随着防治力度的加大, 低感染度的流行地区越来越多, 血吸虫患者血清的采集越来越困难。因此, 能够长期保存一批血吸虫患者血清, 并建立一套血吸虫病免疫诊断用的国家标准品显得尤为重要。辛晓芳等<sup>[6]</sup>曾制备血吸虫病诊断试剂IgG免疫血清国家参考品,

即将经标定和验证合格的阳性血清制成冻干粉, 再用不同免疫诊断方法评价冻干血清的效价, 结果符合要求。本研究与其处理血清的方法相似, 均为将已确诊的血吸虫患者血清制备成冻干粉, 再对比观察冻干前后血吸虫特异抗体检测率的变化情况。结果未处理组用IHA、ELISA、DDIA等方法检测, 阳性率均为100%。这些检测结果也与Kato-Katz法检测结果相一致。在冻干后, 用0.9%的生理盐水室温下复溶到干燥前的体积, 再用3种相同的方法检测, 结果冻干前后血清经ELISA法检测一致度最高, 均为100%, 其次为胶体染料法(83.3%)和IHA法(80%)。经统计学分析, 未处理组及处理组血吸虫病患者血清经3种方法检测, 血清抗体阳性率无统计学意义差异。这一结果说明, 冷冻干燥对血清抗体滴度的影响不大, 对干燥后复溶的血清

样本用ELISA法仍然能够100%检测到血吸虫病特异性抗体。而用DDIA和IHA法检测时,有20%左右的样本出现阴性结果。这一方面可能与复溶后的血清加入的为0.9%的生理盐水,破坏了原始血清的微环境有关;另一方面,也可能与这两种检测方法的敏感性有关,具体原因还需进一步研究。

血清样本制备成冻干品长期保存更具优势,本研究也为制备血吸虫患者血清的国家参考品提供一定参考<sup>[7]</sup>,为以后建立大型的全国寄生虫病标准血清库提供研究基础。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Wang LD, Guo JG, Wu XH, et al. China's new strategy to block *Schistosoma japonicum* transmission: experiences and impact beyond schistosomiasis [J]. Trop Med Int Health, 2009, 14(12): 1475-1483.

[ 2 ] Zhou YB, Liang S, Jiang QW. Factors impacting on progress towards elimination of transmission of schistosomiasis japonica in China[J]. Parasit Vectors, 2012: 275.  
 [ 3 ] Zhu YC. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review[J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 130-136.  
 [ 4 ] 叶章发, 雷志华, 杨桦. 冰冻保存复溶后冻干质控血清标本对实验结果的影响[J]. 中国实用医药, 2008, 25(3): 64.  
 [ 5 ] 吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 323-328.  
 [ 6 ] 辛晓芳, 朱荫昌, 何伟, 等. 冻干血吸虫病诊断试剂IgG免疫血清国家参考品的制备及标定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(4): 400-401.  
 [ 7 ] 张瑾, 辛晓芳, 薄淑英, 等. 弓形虫IgG抗体检测试剂用血清国家参考品的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(6): 702-704.

(收稿日期: 2015-05-05)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊可直接用缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液(PBS)	聚合酶链反应(PCR)
十二烷基磺酸钠(SDS)	逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)
聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	酶联免疫吸附试验(ELISA)
邻苯二胺(OPD)	蛋白质印迹(Western blot)
辣根过氧化物酶(HRP)	一氧化氮(NO)
树突状细胞(DC)	辅助性 T 淋巴细胞(Th)
主要组织相容性复合体(MHC)	艾滋病(AIDS)
异硫氰酸荧光素(FITC)	人类免疫缺陷病毒(HIV)
二氨基联苯胺(DAB)	干扰素(IFN)
改良加藤法(Kato Katz)	白细胞介素(IL)
间接血凝试验(IHA)	肿瘤坏死因子(TNF)
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)	自然杀伤细胞(NK 细胞)
计算机 X 线断层照相术(CT)	随机对照研究(RCT)
磁共振成像(MRI)	美国食品药品监督管理局(FDA)
核因子-κB(NF-κB)	世界卫生组织(WHO)