

DOI:10.13350/j.cjpb.220604

• 论著 •

基于蛋白质芯片技术疟疾血清学监测方法的建立^{*}

崔延雯, 黄芳, 尹建海, 夏志贵^{**}

(中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所(国家热带病研究中心), 国家卫生健康委员会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, 国家级热带病国际联合研究中心, 上海 200025)

【摘要】 目的 建立基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法 **方法** 将间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)裂殖子表面蛋白₁₁₉ (merozoite surface protein-1₁₉, MSP-1₁₉)、环子孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 和恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的 MSP-1₁₉ 作为特异性抗原包被在蛋白质芯片上, 通过倍比稀释法筛选抗原并确定滤纸血洗脱液稀释倍数和筛选抗原的最佳包被浓度, 建立基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法。与间接 ELISA 法共同检测间日疟和恶性疟现症患者、健康者和高风险地区人群的滤纸血样本, 比较两种方法的敏感性和检出效率, 并对新建方法的特异性和质控品板间相关性进行验证。 **结果** *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 和 *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) 两种抗原与阳性质控品间的决定系数 R^2 分别为 0.9849 和 0.9317。滤纸血洗脱液的最佳稀释度为 1:4, 筛选抗原最佳包被浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。新建方法和间接 ELISA 法对间日疟和恶性疟现症患者的检出率差异无统计学意义 ($P>0.05$); 检测间日疟现症患者的 ROC 曲线下面积分别为 0.9167 和 0.9358, 检测恶性疟现症患者的 ROC 曲线下面积分别为 0.9167 和 1; 对高风险地区人群的检出率分别为 75.9% (22/29) 和 31.0% (9/29) ($P<0.05$), 对其中 19 例有既往感染史人群的检出率分别为 68.4% (13/19) 和 26.3% (5/19) ($P<0.05$)。新建方法中 *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 抗原对恶性疟患者和间日疟患者的检出率分别为 28.6% (2/7) 和 83.3% (20/24) ($P<0.05$), *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) 抗原对间日疟患者和恶性疟患者检出率分别为 29.2% (7/24) 和 85.7% (6/7) ($P<0.05$)。阳性质控品板间相关系数为 0.9-1, 阴性质控品板间相关系数为 0.965-1。 **结论** 基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法对疟疾现症患者和高风险人群的检出率高, 具有较好的敏感性和特异性, 芯片板间结果的一致性良好, 可作为疟疾消除和消除后阶段高效的血清学监测工具。

【关键词】 疟疾; 血清学方法; 监测; 蛋白质芯片技术

【中图分类号】 R531.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0635-08

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.; 17(6):635-642.]

Establishment of a method for malaria sero-surveillance based on protein chip technology

CUI Yan-wen, HUANG Fang, YIN Jian-hai, XIA Zhi-gui (National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention (Chinese Center for Tropical Diseases Research); NHC Key Laboratory of Parasite and Vector Biology; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases; Shanghai 200025, China) ^{***}

【Abstract】 Objective To establish a malaria sero-surveillance method based on the protein chip technology. **Methods**

The merozoite surface protein-1₁₉ (MSP-1₁₉) and circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium vivax* and the MSP-1₁₉ of *Plasmodium falciparum* have been coated on the protein chip as specific antigens. The optimal antigens, the dilution of serum eluted from filter paper and the optimal coating concentration of screening antigens is determined by multiple dilution method, so as to establish a malaria sero-surveillance method based on the protein chip technology. Filter paper blood samples from patients with *P. vivax* and *P. falciparum*, healthy persons and negative persons in high-risk areas have been tested together with the indirect ELISA and the new method to compare the sensitivity, detection efficiency. Meanwhile, the specificity of the new method and the inter-board correlation of quality control serum have been verified.

Results *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) and *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) have strong correlation with the positive quality control serum, the square of determination coefficient are 0.9849 and 0.9317 respectively. The optimal dilution of serum eluted from filter paper is 1:4, and the optimal concentration of coated antigens is 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Two methods have no statistically significant difference in the detection rate of patients with *P. vivax* and *P. falciparum* ($P>0.05$). The area under ROC curve of these two methods are 0.9167 and 0.9358 for *P. vivax* patients, and 0.9167 and 1 for *P. falciparum* patients. The detection rate of the two methods in high-risk negative population are 75.9% (22/29) and 31.0% (9/29) respective-

^{*} **【基金项目】** 上海市第五轮公共卫生体系建设三年行动计划重点学科项目 (No. GWV-10.1-XK13)。

^{**} **【通讯作者】** 夏志贵, E-mail: xiazg@nipd.chinacdc.cn

【作者简介】 崔延雯 (1996-), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事疟疾血清流行病学研究。E-mail: 505237995@qq.com

ly ($P < 0.05$), and in 19 patients with previous infection history are 68.4% (13/19) and 26.3% (5/19) ($P < 0.05$). In the new method, the detection rate of *PvMSP-1₁₉* (R01601) in patients with *P. falciparum* and *P. vivax* are 28.6% (2/7) and 83.3% (20/24) ($P < 0.05$). The detection rate of *PfMSP-1₁₉* (R01601) in patients with *P. vivax* and *P. falciparum* are 29.2% (7/24) and 85.7% (6/7) ($P < 0.05$). The correlation coefficient of inter-board positive quality control serum is 0.9-1. The correlation coefficient of negative quality control serum is 0.965-1. **Conclusion** The malaria sero-surveillance method based on protein chip technology has the advantages of high detection efficiency, good sensitivity and specificity in detection of *P. vivax* and *P. falciparum* patients and high-risk negative population. At the same time, the results of protein chips showed good interplate consistency. Thus, the method can be used as an efficient malaria sero-surveillance tool in malaria elimination and post-elimination phase.

【Key words】 malaria; serological methods; surveillance; protein chip technology

疟疾被世界卫生组织(WHO)列为全球三大公共卫生问题之一,在全球范围内造成严重的疾病负担^[1]。近年来随着一系列控制措施的实施,如预防性服药和以青蒿素为基础的联合用药等,许多国家的疟疾防控取得了显著成果并逐步迈向消除或消除后阶段。在该阶段,保持疟疾零传播状态、防止再传播是消除后国家的首要任务,因此加大对疟疾暴露风险的监测变得愈发重要^[2]。

在疟疾消除后地区人群的暴露风险监测中,高灵敏度的血清学监测方法逐渐受到重视^[3]。许多研究表明,感染者体内疟原虫清除后,大部分抗体仍能持续数月甚至数年(具体时间取决于相应抗体的半衰期),对抗体标志物的检测可反映人群既往和目前暴露情况^[4-6]。同时,将人群各年龄段抗体阳性率数据拟合合适的催化模型,还可预测人群的年感染概率,评估人群的暴露风险。因此,血清学监测方法可作为疟疾消除后阶段监测的重要补充工具,建立基于重组抗原的血清学监测方法也是疟疾消除地区研究的重点。

疟原虫裂殖子表面蛋白 1₁₉ (merozoite surface protein-1₁₉, MSP-1₁₉) 和环子孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 是血清学监测中常用的重组抗原,其特异性抗体的血清转化率与疟疾发病率、脾肿率等暴露指标相关,可作为抗体标志物进行监测^[7-8]。本研究以间日疟 MSP-1₁₉ (*PvMSP-1₁₉*)、间日疟 CSP (*PvCSP*) 和恶性疟 MSP-1₁₉ (*PfMSP-1₁₉*) 作为包被抗原,与高通量、高灵敏度的蛋白质芯片技术^[9] 结合,建立基于蛋白质芯片技术的血清学监测方法,通过与间接 ELISA 法比较,验证其用于疟疾消除后地区人群监测的可行性。

材料与方法

1 材料

1.1 抗原 购买不同公司生产的疟原虫商品化抗原 *PvMSP-1₁₉*, *PvCSP* 和 *PfMSP-1₁₉* 共 7 个,其来源、货号、名称、浓度及蛋白总量和保存介质信息见表 1。

表 1 抗原信息表
Table 1 Antigen information sheet

公司 Company	货号 Item number	抗原 Antigen	浓度(mg/ml) Concentration	蛋白总量(mg) Protein content	保存介质 Storage medium
US Biological	397268	<i>PfMSP-1₁₉</i>	4.86	1.0	CBS
US Biological	397270	<i>PvMSP-1₁₉</i>	3.32	1.0	CBS
US Biological	214776	<i>PvCSP</i>	1.00	0.1	CBS
Meridian	R01601	<i>PvMSP-1₁₉</i>	3.90	1.0	PBS
Meridian	R01602	<i>PvMSP-1₁₉</i>	3.32	1.0	PBS
Meridian	R01603	<i>PfMSP-1₁₉</i>	2.40	1.0	PBS
Meridian	R01604	<i>PfMSP-1₁₉</i>	4.86	1.0	PBS

1.2 滤纸干血滴和质控标本 24 例间日疟现症患者和 29 例高风险地区人群滤纸干血滴标本,以及间日疟患者高免疫混合血清(阳性质控)标本由云南省德宏傣族景颇族自治州盈江县那邦镇卫生院提供,均采自疟疾高发区缅甸拉咱市;7 例恶性疟现症患者滤纸干血滴标本和恶性疟患者的高免疫混合血清(阳性质控)标本由浙江省疾病预防控制中心提供,采自输入恶性疟疾患者;12 例健康者滤纸干血滴和健康者混合血清(阴性质控)标本由浙江省疾病预防控制中心提供,采自从未来去过疟疾疫区的健康体检人群。上述所有标本均通过疟原虫实时荧光定量 PCR 检测验证。

本实验获得伦理审查会批准,所有参与者均签署知情同意书。

1.3 主要试剂及仪器 环氧基芯片(1066643)为德国 Schott 公司产品;鼠抗人 IgG-Cy3 和羊抗人 IgM-Cy5 (209-165-082)为美国 Jackson ImmunoResearch 公司产品;PBS 缓冲液(B310KJ)为上海源培生物科技有限公司产品;BSA (A602442-0050)为英国 BBI 公司产品;吐温 20(A100777-0500)为上海生工生物工程股份有限公司产品;人疟疾抗体 ELISA 试剂盒为滁州仕诺达生物科技有限公司产品。4 ℃ 离心机购于美国 Thermo 公司;芯片小型离心机购于日本 Tomy 公司;芯片扫描仪 GenePix 4000B 购于美国 Axon Instruments 公司。

2 方法

2.1 基于蛋白质芯片技术血清学监测方法的建立

2.1.1 芯片点制 取一张包含 14 个区域,每个区域

含 256 个孔的芯片;分别将 7 种疟疾抗原倍比稀释为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,各取 25 μl 通过点样仪点在一个区域的 256 孔中,每个抗原每种浓度重复 4 次(14 个区域均按上述重复点制)(图 1);点样完成后,将芯片置于点样仪基片载台固定过夜,再放至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

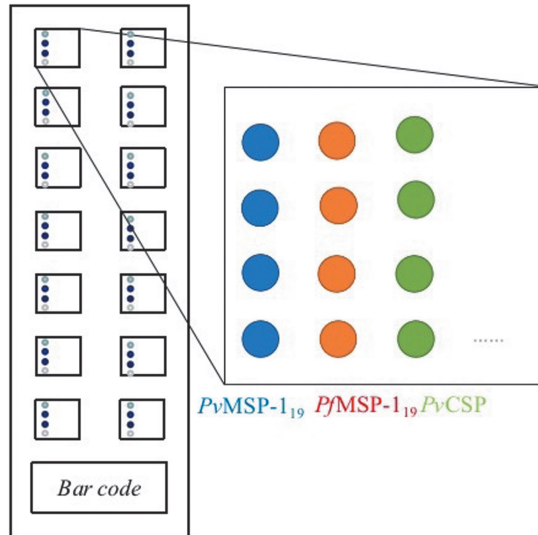


图 1 芯片布局
Fig. 1 The layout of chip

2.1.2 滤纸干血滴洗脱 各取 5 例间日疟患者、恶性疟患者和健康者的滤纸干血滴标本进行洗脱。随机从 903 滤纸上剪下血量约 20 μl 的滤纸并置于由 PBS、0.5% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.3% Tween 20 组成的 1 ml 洗脱液中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇过夜洗脱。

2.1.3 抗原包被浓度和滤纸血洗脱液稀释倍数的确定 将点制的芯片从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出并恢复到室温,与围栏贴合后加入 100 μl 3% BSA 封闭液室温封闭 1 h,除去封闭液。将 2.1.2 中 10 例现症患者的滤纸血洗脱液混合,从 1:1 开始作 4 倍系列稀释至 1:256,各取 100 μl 加入 2.1.1 中点制芯片的左侧 5 个区域内;5 例健康者滤纸血洗脱液混合后按同样标准稀释后加入点制芯片右侧 5 个区域内,剩余 1 个区域加间日疟恶性疟阳性质控品混合血清作阳性对照,1 个区域加阴性质控品混合血清作阴性对照,最后 2 个区域做空白对照,室温反应 2 h, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;将稀释的鼠抗人 IgG-Cy3 和羊抗人 IgM-Cy5 混合二抗加入到孔中,室温避光反应 1 h, PBS 清洗后拆出围栏,甩干后用 Axon 扫描仪扫描芯片,根据检测结果筛选抗原,并确定筛选抗原的最佳包被浓度和滤纸血洗脱血清稀释倍数。

2.2 敏感性 & 检测效能测定

2.2.1 敏感性测定 将筛选抗原包被在 4 张蛋白质芯片上,依据上述最佳反应条件和芯片操作流程检测

24 例间日疟现症患者滤纸干血滴标本、7 例恶性疟现症患者滤纸干血滴标本和 12 例健康者滤纸干血滴标本,每张芯片最后两个区域分别为阳性质控区和阴性质控区, cutoff 值为阴性质控区平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI) + 3 个标准差,高于 cutoff 值判为阳性,否则判为阴性。统计包被抗原的检出例数,计算检出率。

依据包被泛特异性重组蛋白的间接 ELISA 定性试剂盒操作说明检测上述 3 组滤纸干血滴标本,洗脱方法与 2.1.2 一致,反应结束后在 450 nm 波长处测定各孔的平均吸光度(A)值。结果判定:cutoff 值为试剂盒中阴性对照孔平均值 + 0.15,高于 cutoff 值判为阳性,否则判为阴性。统计间接 ELISA 法的检出例数,计算检出率。

2.2.2 检出效率评价 依据 2.2.1 中两种方法对现症患者和阴性患者的检测值绘制新方法和间接 ELISA 方法的 ROC 曲线,比较两种方法的检出效率。

2.2.3 高风险地区人群筛选能力评价 将筛选抗原包被在 2 张蛋白质芯片上,依据方法建立中确定的最佳反应条件和芯片操作流程,与间接 ELISA 方法共同检测高风险地区 29 例滤纸干血滴标本(其中 19 份通过问卷收集到有既往疟疾感染史)。由于间接 ELISA 法检测试剂盒只能检测出疟疾血清阳性者,不能区分间日疟患者和恶性疟患者,因此将新建方法中 PvMSP-119(R01601)和 PfMSP-119(R01604)抗原中任一抗原阳性的对象均计入结果,以此评价两种方法对高风险地区人群的检出能力。

2.3 基于蛋白质芯片技术监测方法的验证

2.3.1 特异性验证 根据 2.2.1 的检测结果分析新方法中间日疟抗原对 7 例恶性疟现症患者滤纸血的阳性检出例数和检出率;同时分析新方法中恶性疟抗原对 24 例间日疟现症患者滤纸血的阳性检出例数和检出率。

2.3.2 质控样品板间相关性验证 对 6 块蛋白质芯片的阴性质控品结果和阳性质控品结果进行相关性分析,评价板间试验结果的稳定性和一致性。

2.4 统计学分析 应用 SAS 9.4 软件对相关数据进行统计学分析。两种方法检出率比较均采用 Fisher exact test;高风险人群分析中,抗原组合对有无既往感染史两组人群检测值的比较采用 Welch's test 分析;抗原特异性验证采用 Unpaired t test 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 基于蛋白质芯片技术监测方法的建立

1.1 抗原筛选 绘制不同抗原包被浓度梯度下与阳

性质控品反应的信号值变化(图2),结果显示 *Pv*MSP-1₁₉(R01601)和 *Pf*MSP-1₁₉(R01604)抗原随包被浓度增加信号值显著增加并趋于饱和。包被浓度倒数转换后显示两种抗原与阳性质控品决定系数 R^2 分别为 0.9849 和 0.9317(图3),因此将 *Pv*MSP-1₁₉(R01601)抗原和 *Pf*MSP-1₁₉(R01604)作为筛选的最佳抗原。

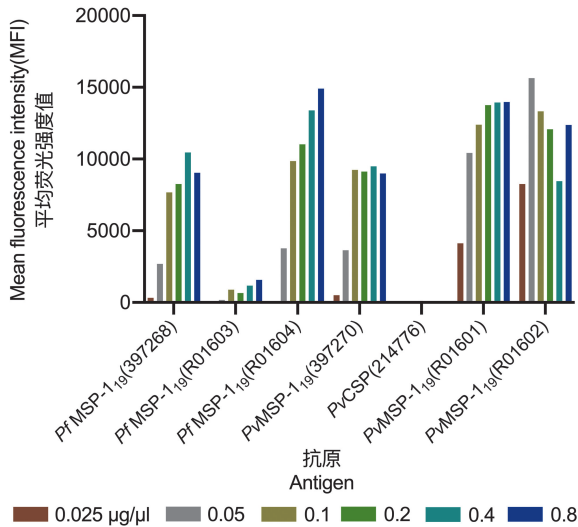


图2 7种抗原不同包被浓度下与阳性质控品反应的 MFI 值变化
Fig.2 The MFI changes of the reaction of 7 antigens with positive quality control serum at different concentrations

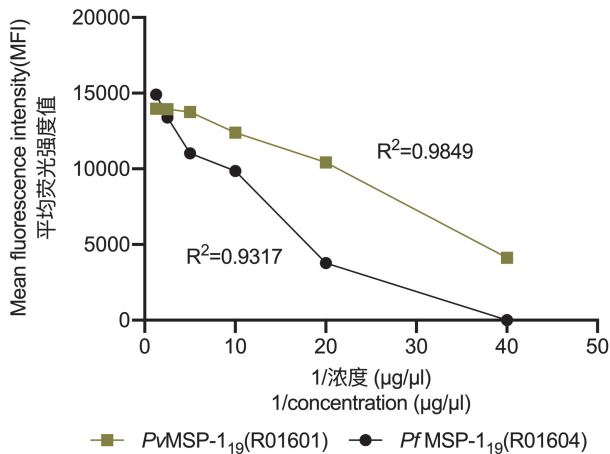


图3 筛选抗原浓度与阳性质控品 MFI 值的相关性分析
Fig.3 Correlation analysis between screening antigen's concentration and MFI value of positive quality control serum

1.2 滤纸血洗脱液稀释倍数的确定 芯片扫描图(图4)显示滤纸血洗脱液4倍和16倍稀释度下信号值较好。绘制不同包被浓度下 *Pv*MSP-1(R01601)和 *Pf*MSP-1(R01604)抗原与滤纸血洗脱液不同稀释倍数反应的信号值变化(图5),结果显示两种抗原在任意包被浓度下滤纸血洗脱液4倍稀释的反应信号值均大于16倍稀释时的信号值,因此将1:4作为滤纸血洗脱液的最佳稀释度。

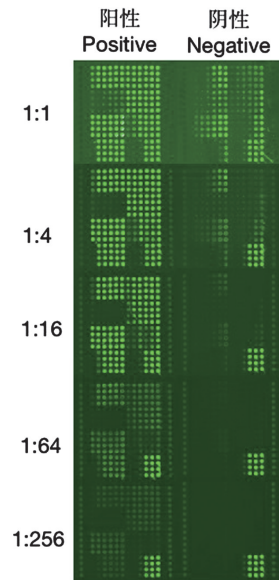
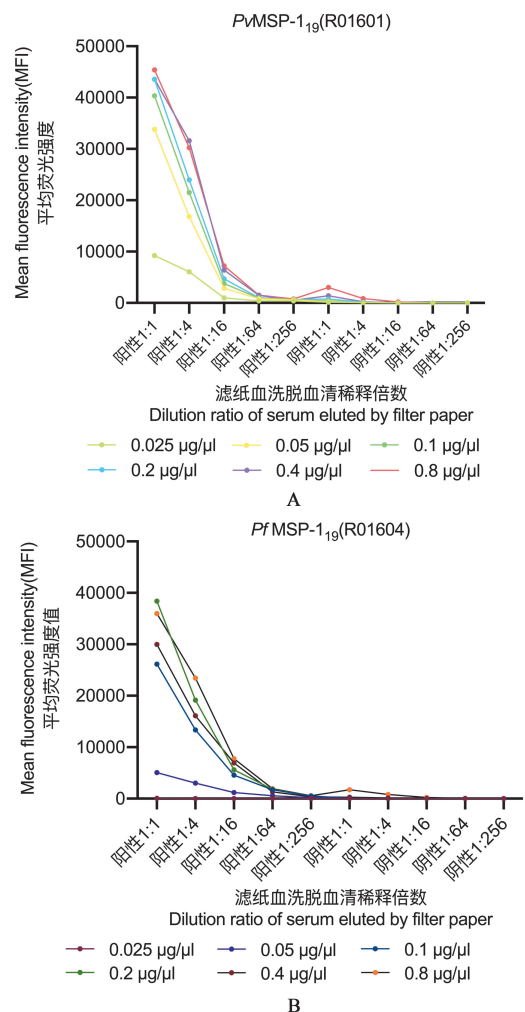


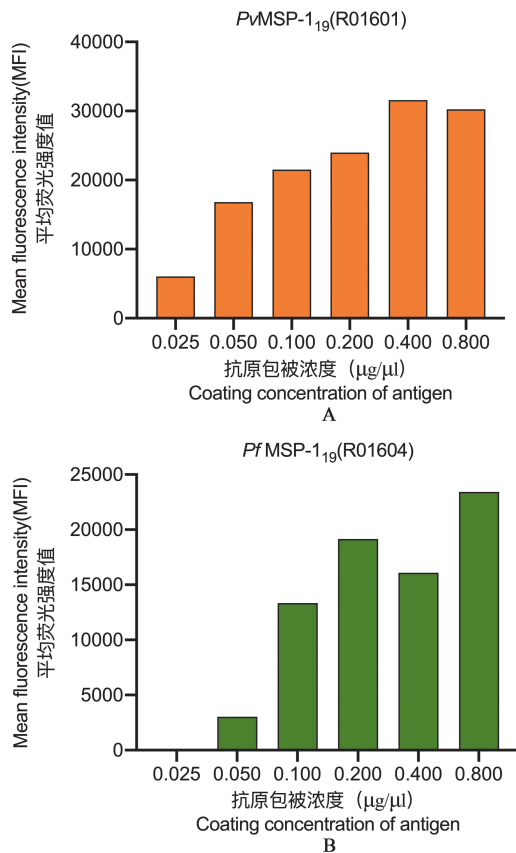
图4 滤纸血不同稀释倍数下的芯片扫描图
Fig.4 Chip scanning figure of serum eluted by filter paper with different dilution ratios



A *Pv*MSP-1₁₉(1601) B *Pf* MSP-1₁₉(1604)

图5 筛选抗原与滤纸血反应的 MFI 值变化
Fig.5 The MFI changes of the reaction of screening antigens with serum eluted by filter paper

1.3 抗原包被最佳浓度的确定 绘制滤纸血洗脱液4倍稀释时的 *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 和 *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) 抗原包被浓度梯度下的信号值变化, *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 在 0.025~0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的浓度范围内信号值逐渐增加, 在 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 达到饱和, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 对应的信号值均高于 20000 (图 6A); *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) 在 0.025~0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的浓度范围内信号值逐渐增加, 在 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 信号值较高 (图 6B)。为方便检测和统计, 两种抗原的包被浓度均确定为 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。



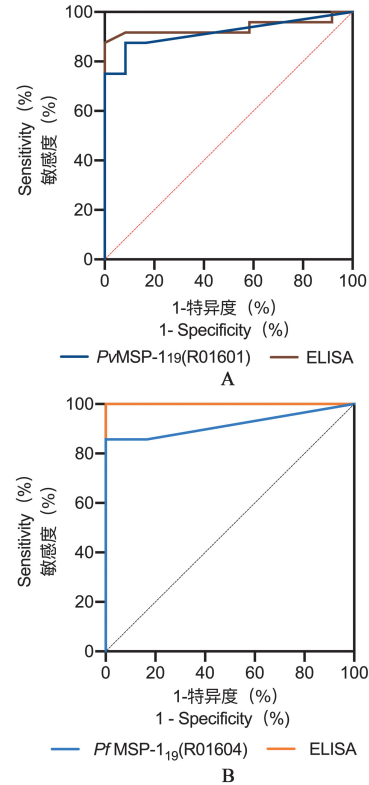
A *Pv*MSP-1₁₉ (1601) B *Pf* MSP-1₁₉ (1604)
图 6 包被浓度梯度下筛选抗原与 4 倍稀释滤纸血反应的 MFI 值变化
Fig. 6 The MFI changes of the reaction of screening antigens with 4-fold diluted serum eluted by filter paper

2 与间接 ELISA 方法的比较

2.1 敏感性 包被蛋白为 *Pv*MSP-1₁₉ (1601) 的新建方法和包被蛋白为泛特异性重组抗原的间接 ELISA 法对间日疟现症患者的滤纸血抗体检出率均为 83.3% (20/24) ($P>0.05$); 间接 ELISA 法 (包被蛋白为泛特异性重组抗原) 对恶性疟现症患者滤纸血抗体的检出率为 100% (7/7), 新建方法 (包被蛋白为 *Pf*MSP-1₁₉) 的检出率为 85.7% (6/7), 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 检出效率 根据新建方法中 *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 抗原和间接 ELISA 法检测 24 例间日疟现

症患者和 12 例健康者滤纸血标本结果绘制 ROC 曲线, ROC 曲线下面积分别为 0.9167 和 0.9358 (图 7A)。根据新建方法中 *Pf*MSP-1₁₉ (R01604) 抗原和间接 ELISA 法检测 7 例恶性疟现症患者和 12 例健康者滤纸血标本结果绘制 ROC 曲线, ROC 曲线下面积分别为 0.9167 和 1 (图 7B)。



A *Pv*MSP-1₁₉ (1601) B *Pf* MSP-1₁₉ (1604)
图 7 基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法和间接 ELISA 法的 ROC 曲线比较分析
Fig. 7 Comparative analysis of ROC curves between malaria sero-surveillance method based on protein chip technology and indirect ELISA method

2.3 高风险地区人群检出的能力 新建方法对 29 例高风险人群滤纸血标本抗体的检出率为 75.9%, 间接 ELISA 法为 31.0%, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。新建方法对其中 19 例有既往疟疾感染史者的检出率为 68.4%, 间接 ELISA 法为 26.3%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。将 29 例受试对象分为有既往感染史组和无既往感染史组, 比较两种方法的检测结果, 新建方法可筛选出具有疟疾既往感染史的人群, 组间差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 8A), 间接 ELISA 法的组间差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 8B)。

3 基于蛋白质芯片技术监测方法的验证

3.1 特异性验证 基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法中 *Pv*MSP-1₁₉ (R01601) 抗原对 7 例恶性疟现症患者的检出例数为 2 例, 检出率为 28.6%, 低于对间日疟滤纸血的检出率 ($P<0.05$), 与 12 例健

康者的检测结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 9A)。PfMSP-1₁₉ (R01604) 抗原对 24 例间日疟现症患者的检出例数为 7 例, 检出率为 29.2%, 低于对恶性疟的检出率($P < 0.05$), 与 12 例健康者的检测结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 9B)。

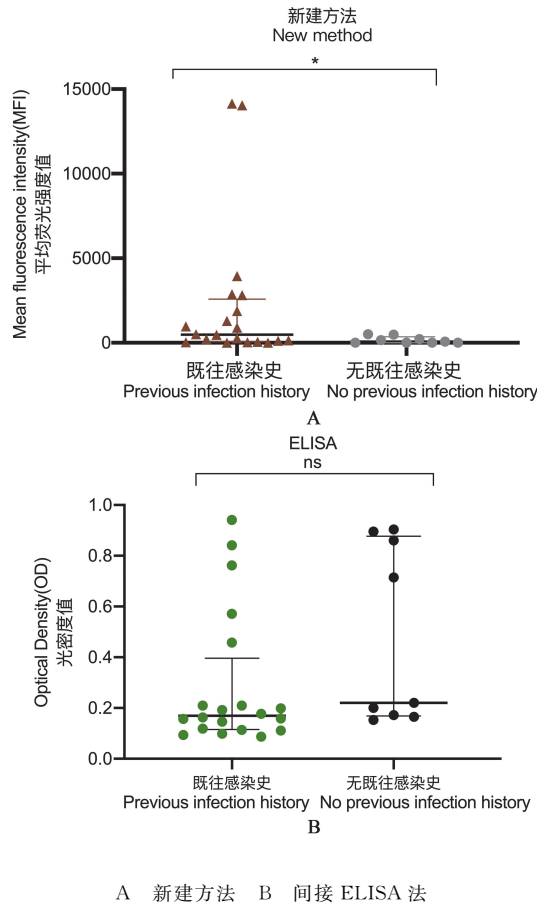


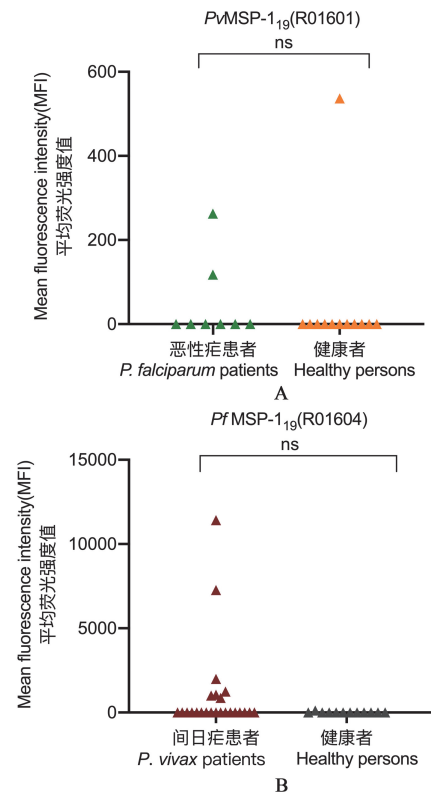
图 8 两种方法检测有无既往感染史人群结果的差异性
A New method B Indirect ELISA method
Fig. 8 Differences in detection results among people with and without prior infection history

3.2 板间质控样品相关性验证 从热图中可以看出, 6 块蛋白质芯片中阳性质控品结果的相关系数在 0.9 ~1 之间 (图 10A), 阴性质控品结果的相关系数在 0.965 ~1 之间 (图 10B)。

讨论

本研究采用重组蛋白 PvMSP-1₁₉ (R01601) 和 PfMSP-1₁₉ (R01604) 建立了基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法, 通过与间接 ELISA 法比较分析, 验证了其应用于人群疟疾监测的可行性。结果显示, 新建方法对间日疟患者和恶性疟患者的检出率分别为 83.3% 和 85.7%。胡凤悦^[10]的研究结果显示 PvMSP-1₁₉ 对间日疟患者的检出率为 83.9%。Rouhani 等^[11]的研究结果显示, PfMSP-1₁₉ 对恶性疟患者的检出率为 84.2%。表明新方法检测结果可靠。新建方法检出率与间接 ELISA 法比较差异无统计学

意义, 且根据新方法结果绘制的 ROC 曲线下面积大于 0.9, 检出效率高, 说明方法具有一定可行性^[12], 而该面积与间接 ELISA 法相比较小, 原因可能是与间接 ELISA 法包被的泛特异性抗原相比, 新建方法包被的 MSP-1₁₉ 抗原仅为某一疟原虫种感染过程中多样性抗原的一种, 受人群年龄、感染程度和自身免疫力影响, 相应疟疾抗体是否出现以及数量和持续时间都不能准确预测^[13-14]。因此, 为了提升方法的检出效率, 将更多抗原同时应用于疟疾血清学监测十分重要, 是今后研究的重点。

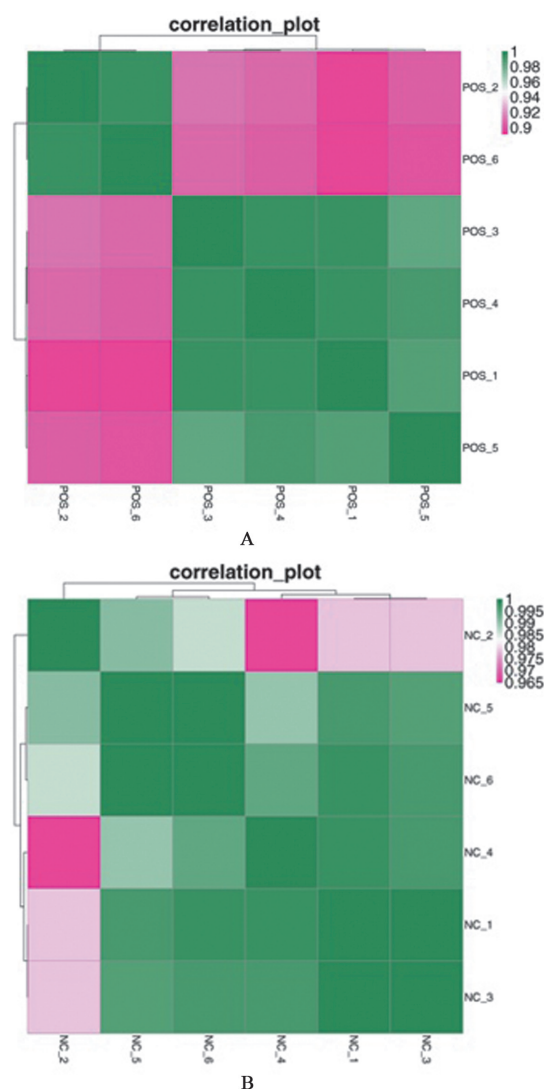


A PvMSP-1₁₉ (1601) B PfMSP-1₁₉ (1604)
图 9 新建方法抗原特异性验证

Fig. 9 Validation of antigens specificity of the new method

新建方法检测高风险地区人群的血清学阳性率高于间接 ELISA 法, 且能够筛查出具有疟疾既往感染史的人群($P < 0.05$), 原因可能与包被的抗原种类以及蛋白质芯片技术有关: ①MSP-1₁₉ 的抗体半衰期长, 可以提供较长的窗口期反映人群的疟疾既往感染史, Drakeley 等^[15]的研究显示即使没有周期性感染, 该抗体在体内也可能持续至少 10 年; ②MSP-1₁₉ 为保守抗原, 不易突变, 相应的抗体相较于其他抗体而言在暴露人群体内检出率高^[16]; ③从检测原理看, 蛋白质芯片结果的荧光强度值与吸光度值相比有更宽的动态范围, 因此敏感性高于 ELISA 方法, 当人群症状消失或体内抗体水平较低时也可以检测到, 在检测高风险人群时具有优势^[17]。基于蛋白质芯片技术的疟疾血清

学监测方法对人群既往和现期暴露情况的全面掌握,在疟疾消除后阶段的监测中具有重要的应用价值^[4]。



A 阳性质控血清 B 阴性质控血清

图 10 质控品的板间相关性

A Positive quality control serum B Negative quality control serum
Fig. 10 Inter-board correlation of positive and negative quality control serum

对新建方法进行特异性验证,结果显示 *Pv*MSP-1₁₉ (R01601)对恶性疟和间日疟滤纸血抗体的检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$),抗原特异性良好,但对 2 例恶性疟滤纸血的检测结果仍为阳性,同样的 *Pf*MSP-1₁₉ (R01604)对 7 例间日疟滤纸血的检测结果也为阳性。分析其原因是 *Pf*MSP-1₁₉ 和 *Pv*MSP-1₁₉ 属于同源性抗原,蛋白质中的氨基酸序列具有 48%~58% 的同一性^[18-20],但由于这些氨基酸多是半胱氨酸和其它不太可能暴露于免疫系统的疏水性氨基酸^[21-22],因此在检测时虽具有一定的交叉反应性,但 MSP-1₁₉ 抗原的检测结果仍具有较高的特异性。在一项针对柬埔寨成年女性疟疾抗体反应的研究中, Priest 等^[23]发现 79% 的女性血清只与一种 MSP-1₁₉ 抗原反

应。Bousema 等^[24]在索马里疟疾低流行区开展人群血清学调查时也未观察到恶性疟原虫和间日疟原虫 MSP-1₁₉ 抗体反应间的相关性,本研究结果与之相似。

本研究建立的基于蛋白质芯片技术的疟疾血清学监测方法具有应用潜力。该方法与间接 ELISA 法的检测效率相当,并且对高风险地区人群的血清阳性检出率高,能筛选出既往疟疾感染史患者。同时,与 ELISA 试剂盒不能区分具体虫种相比,该方法两种抗原可以分别检测出间日疟和恶性疟患者,弥补了间接 ELISA 试剂盒的不足。这些优点使其在掌握疟疾消除后地区人群一段时间的疟疾暴露情况等方面具有重要的应用价值,可作为消除后地区疟疾监测的重要补充工具。

【参考文献】

- [1] WHO. World Malaria Report 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] Bousema T, Stevenson J, Baidjoe A, et al. The impact of hotspot-targeted interventions on malaria transmission: Study protocol for a cluster-randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2013, 14(1): 1-12.
- [3] Cook J, Speybroeck N, Sochant T, et al. Sero-epidemiological evaluation of changes in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* transmission patterns over the rainy season in Cambodia [J]. *Malar J*, 2012(11): 86.
- [4] Greenhouse B, Smith DL, Rodriguez-Barraquer I, et al. Taking sharper pictures of malaria with CAMERAs: Combined antibodies to measure exposure recency assays[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 99(5): 1120-1127.
- [5] Cunha MG, Silva ES, Sepulveda N, et al. Serologically defined variations in malaria endemicity in Par state, Brazil [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113357.
- [6] Dewasurendra RL, Dias JN, Sepulveda N, et al. Effectiveness of a serological tool to predict malaria transmission intensity in an elimination setting[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 49.
- [7] Ondigo BN, Hodges JS, Ireland KF, et al. Estimation of recent and long-term malaria transmission in a population by antibody testing to multiple *Plasmodium falciparum* antigens[J]. *Infect Dis*, 2014, 210(7): 1123-1132.
- [8] Kusi KA, Bosomprah S, Dodo D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation[J]. *Malar J*, 2014(13): 103.
- [9] Aguiar JC, LaBaer J, Blair PL, et al. High-throughput generation of *P. falciparum* functional molecules by recombinational cloning[J]. *Genome Res*, 2004, 14(10B): 2076.
- [10] 胡凤悦. 蛋白芯片技术在疟疾血清学研究中的应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [11] Rouhani M, Zakeri S, Mehrizi AA, et al. Comparative analysis of the profiles of IgG subclass-specific responses to *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1 in naturally exposed individuals living in malaria hypoendemic settings, Iran[J]. *Malar J*, 2015(14): 58.

- [12] 林楠. 四种结核分枝杆菌特异蛋白抗原的克隆表达和血清学评价[D]. 北京:中国疾病预防控制中心,2014.
- [13] Perraut R, Marrama L, Diouf B, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with *in vitro* inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village[J]. J Infect Dis, 2005,191(2):264-271.
- [14] Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: Insights into immunological markers for exposure and protection[J]. Malar J, 2017(16):107.
- [15] Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005,102(14):5108-5113.
- [16] Qari SH, Shi YP, Goldman IF, et al. Predicted and observed alleles of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1), a potential malaria vaccine antigen[J]. Mol Biochem Parasitol, 1998,92(2):241-252.
- [17] Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, et al. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls[J]. Proteomics Clin Appl, 2015,9(3/4):406-422.
- [18] Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Coffey R, et al. Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* merozoite surface protein 1-p19 antibodies in human malaria patients and experimentally infected nonhuman primates[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010,17(10):1631-1638.
- [19] Soares IS, Levitus G, Souza JM, et al. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria[J]. Infect Immun, 1997,65(5):1606-1614.
- [20] Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria[J]. Parasitology, 2009,136(12):1445-1456.
- [21] Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, et al. Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010,82(6):996-1003.
- [22] Priest JW, Plucinski MM, Huber CS, et al. Specificity of the IgG antibody response to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* MSP1₁₉ subunit proteins in multiplexed serologic assays[J]. Malar J, 2018(17):1-20.
- [23] Priest JW, Jenks MH, Moss DM, et al. Integration of multiplex bead assays for parasitic diseases into a national, population-based serosurvey of women 15-39 years of age in Cambodia[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016,10(5):e0004699.
- [24] Bousema T, Youssef RM, Cook J, et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008[J]. Emerg Infect Dis, 2010,16(3):392-399.

【收稿日期】 2022-02-19 【修回日期】 2022-04-20

(上接 634 页)

- [10] 石鑫,舒畅,许军,等. 黑龙江省 2017-2019 年腹泻患者诺如病毒检测及基因特征分析[J]. 中国公共卫生管理, 2020,36(4):457-459,498.
- [11] Devant JM, Hansman GS. Structural heterogeneity of a human norovirus vaccine candidate[J]. Virology, 2021, 553 (prepubl):23-34.
- [12] Farahmand M, Moghoofei M, Dorost A, et al. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: a meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020[J]. Rev Med Virol, 2022,32(1):e2237.
- [13] 李学,杨汶桢,雷娟. 2009-2018 年贵阳市其他感染性腹泻流行及病原学特征分析[J]. 现代预防医学, 2020,47(8):1360-1363.
- [14] 耿启彬,赖圣杰,余建兴,等. 中国 26 省(直辖市、自治区)2011-2014 年 5 岁以下儿童腹泻病例轮状病毒流行特征分析[J]. 疾病监测, 2016,31(6):463-470.
- [15] 王新荣,刘亚丽,汪云鹏,等. 2016 年婴幼儿轮状病毒腹泻感染特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018,13(2):189-191,195.
- [16] 于悦,郭新慧,严寒秋,等. 札如病毒急性胃肠炎暴发特征系统综述[J]. 中华流行病学杂志, 2019,40(1):93-98.
- [17] 石鑫,许军,舒畅,等. 哈尔滨市腹泻患者星状病毒感染的分子流行病学研究[J]. 现代预防医学, 2019,46(21):3841-3844.
- [18] 胡月. 2017-2019 年重庆市急性腹泻患儿腺病毒、星状病毒、札如病毒感染的流行病学研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2021.
- [19] Cho SR, Chae SJ, Jung S, et al. Trends in acute viral gastroenteritis among children aged ≤ 5 years through the national surveillance system in South Korea, 2013-2019[J]. J Med Virol, 2021, 93(8):4875-4882.
- [20] 张平,张静. 我国 2014-2015 年其他感染性腹泻监测现状分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017,38(4):424-430.
- [21] Tohma K, Lepore CJ, Ford-Siltz LA, et al. Phylogenetic analyses suggest that factors other than the capsid protein play a role in the epidemic potential of G II.2 norovirus[J]. mSphere, 2017,2(3):e00187-17.

【收稿日期】 2022-02-23 【修回日期】 2022-05-16