

# 影响免疫粘连血球凝集试验 某些因素的初步研究

中国医学科学院病毒学研究所 孙亚洲 周桂珍 朱 纯 杨秀凤 刘崇柏

IAHA法是一种简单、敏感、特异性较高的血清学技术[2,3,5,6,8]。近年来在病毒诊断方面应用日益广泛,引起更多学者的重视[4-7]。1975年Miller等人首先将此法应用于甲肝抗体的检测[8]。1978年我们开始应用于甲肝抗原、抗体的检测,并获得成功[1]。但此法技术条件要求较高,影响因素较多,稳定性较差。据我们几年来的实践体会,最大的影响因素为补体的用量、抗原非特异性凝集物的排除及红血球的选择。为此我们就这些主要因素进行了探索。现将结果报告如下:

## 材料和方法

一、HAAg(甲肝抗原): 来自早期甲肝病人粪便标本。编号: 海-1、F<sub>6</sub>、F<sub>10</sub>、F<sub>8</sub>、F<sub>9</sub>, 共五份。

二、甲肝病人双份血清4份: 来自不同的流行现场, 均经IAHA鉴定。

三、补体: 正常雄性豚鼠混合血清。

四、DTT (BDH, 20710): 以0.04M EDTA-GVB稀释。

五、2-ME(ROTH产)以0.04M EDTA-GVB稀释。

六、1.5%人红血球悬液: 人“O”型血球, 用生理盐水洗三次, 最后一次离心2,000转10分钟弃上清, 积压血球用0.04M EDTA-GVB配制1.5%悬液。筛试24份A、B、O型献血员血液。

七、IAHA溶液配制[8]:

1. 5 × VB(5倍巴比妥缓冲液), 氯化钠85克, 巴比妥钠3.75克, 巴比妥酸5.75克(先加热溶化), 双蒸水加至2,000毫升, pH7.5。

2. GVB<sup>++</sup>(含钙、镁离子、明胶巴比妥

缓冲液), 5 × VB200毫升, 0.03M CaCl<sub>2</sub> 5毫升, 0.1M MgCl<sub>2</sub> 5毫升, 2% Gelatin(明胶) 50毫升, 双蒸水加至1,000毫升pH7.5, 此液用于稀释抗原、抗体、补体。

3. 0.1M EDTA-Na<sub>2</sub>(乙二胺四醋酸二钠), EDTA-Na<sub>2</sub> 37.20克, NaOH 4.16克, 双蒸水加至1,000毫升, pH7.5, 此液用于稀释血球、DTT或2-ME。

4. 0.1M MgCl<sub>2</sub> 0.03M CaCl<sub>2</sub> 溶液, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1克, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.17克, 双蒸水加至50毫升。

八、0.05M PBS pH7.2, pH6.4, pH5.4 溶液配制:

	pH7.2	pH6.4	pH5.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.28克	0.24	0.65
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.38克	0.29	0.11
加双蒸水至	500毫升	500	500

九、基本上按Miller等人的方法[8]。采用微量法, 将“V”型血凝板每孔加0.025毫升GVB<sup>++</sup>稀释液, 用容量0.025毫升稀释棒蘸取一滴被检血清, 倍比稀释后, 每孔加0.025毫升抗原, 置37°C 60分钟后, 每孔加0.025毫升补体, 振荡1~3分钟, 置37°C 40分钟后, 每孔加DTT或2-ME 0.025毫升, 接着每孔加1.5%人的O型红血球0.025毫升, 振匀, 置室温下静置2小时后, 观察结果。并设有抗原、抗体及血球对照。结果判定同反向被动血凝试验。

## 结 果

二、抗原的补体耗量比较: 海-1、F<sub>10</sub>、F<sub>9</sub>抗原先用IAHA法测定各抗原效价, 然后用2个IAHA单位抗原测定各抗原的补体耗量。

从表1结果看出：各抗原耗补体量不同，非特异性凝集现象，用量过少出现假阴性，可见补体量适应矩较窄。

表1 不同甲肝抗原耗补体量比较

实验次数	抗原	血清	补体稀释度					
			1:50	1:100	1:150	1:200	1:300	1:400
I	海-1	鞍混合	I	N	—	—	—	—
			II	N	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280
II	F <sub>6</sub>	1285	I	N	N	—	—	—
			II	N	N	1:3200	1:1600	1:1600
III	F <sub>10</sub>	1285	I	N	N	—	—	—
			II	N	N	N	1:3200	1:1600

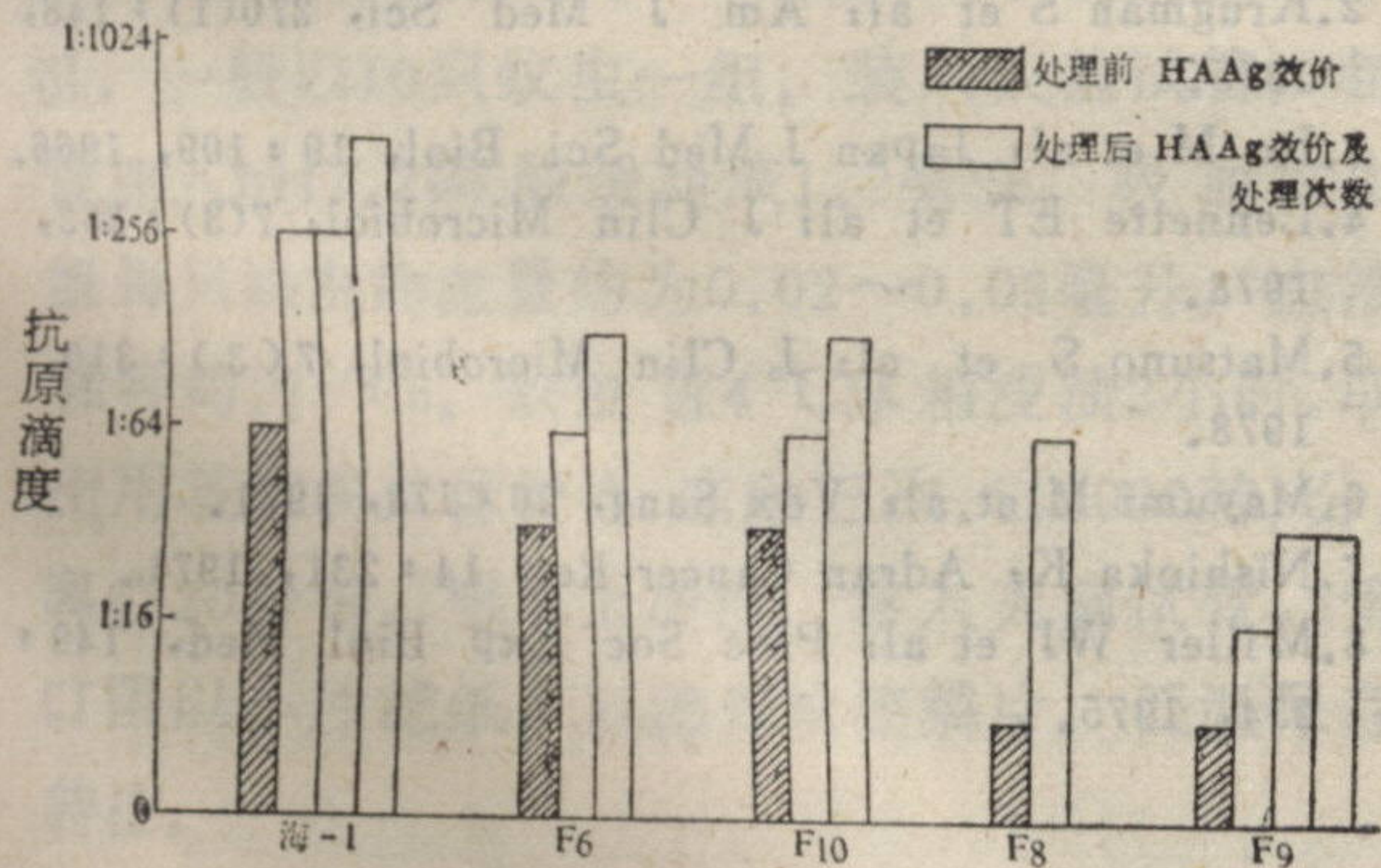
注“N”为非特异性凝集

二、不同pH、不同时间处理抗原对其效价的影响：将海-1抗原，分别用pH7.2、pH6.4、pH5.4的PBS做1:8稀释，以pH7.5的GVB<sup>++</sup>稀释液做对照。置37°C60分钟和120分钟，然后用各自的pH稀释液在试管内倍比稀释。用IAHA法测定各pH值的抗原效价。从表2看出，当海-1抗原用pH6.4或pH5.4处理后，其抗原效价由1:64升高到1:256，处理时间，60分钟与120分钟无差异。

表2 不同pH值处理时间HAAg其效价比较

时 间 (37°C分钟)	不同pH值处理HAAg(海-1)前后效价			
	处理前	处 理 后		
	pH7.5	pH7.2	pH6.4	pH5.4
60	1:64	1:64	1:256	1:256
120	1:64	1:64	1:256	1:256

用pH6.4PBS按同样方法处理5份抗原(海-1、F<sub>6</sub>、F<sub>10</sub>、F<sub>8</sub>、F<sub>9</sub>)从附图看出，抗原效价均比处理前有不同程度提高，达2~8倍。



附图 甲肝抗原经pH6.4处理后与处理前效价比较

三、不同浓度的DTT或2-ME对IAHA影响的比较：用2个IAHA单位的海-1抗原，取不同浓度的DTT(0~2毫克/毫升)及2-ME(1:60~1:110稀释度)测定甲肝病人双份血清中抗-HAV效价。从表3看出：DTT浓度0.25~2毫克/毫升时，所测结果无明显差异。用1:60~1:110浓度的2-ME时，结果也无明显差异。但2-ME耗补体量大些，例如用1:70补体量时，DTT组出现非特异性凝集，而2-ME出现阳性反应。DTT较2-ME的结果稳定，用2-ME时，须在2小时内观察结果，否则阳性结果可逐渐转阴(表3)。

四、不同A、B、O血型及同一血型不同个体红血球凝集效价的比较：用2个IAHA单位抗原和抗体测定24份不同血型人红血球。从表4看出：A型2例、B型6例、O型2例凝集效价为1:1280，A型2例、B型3例、O型6例凝集效价为1:640，O型1例凝集效价为1:160，B、O型各1例阴性(表4)。

不同血型及同一血型不同个体间的血球凝集效价确有差异。

### 讨 论

按差速离心-PEG(6,000)-氯仿提取的HAAg仍含有粘蛋白、肠细菌产物、食物代谢物等不纯物，因而在进行IAHA实验时，有不同程度的抗补体现象，单纯加热法难以去除。

表 3

不同浓度DTT与2-ME对IAHA结果的影响

实验次数	补体量	血清号	血清抗-HAV 效价											
			DTT毫克数/毫升						2-ME稀释度					
			2	1.5	1	0.5	0.25	0	1:110	1:100	1:90	1:80	1:70	1:60
1	1:70	81	非特异性凝集						1:640	1:640	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560
								(-)	(-)					
2	1:100	81	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	1:640	1:640	1:1280	1:1280	1:640	
								(-)	(-)					
3	1:100	42	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:320	1:640	1:320	1:320	1:320	1:320	
								(-)	(-)					
稳定性 (2小时后)			稳 定						2小时后开始转阴性 (-)					

表 4 人A、B、O型红血球凝集效价比较

血型	血清(42号)抗-HAV效价					总计
	1:1280	1:640	1:320	1:160	阴性	
A	2	2	—	—	—	4
B	6	3	—	—	1	10
O	3	6	—	1	1	10
总计	10	11		1	2	24

不同甲肝病人的粪便标本提取的抗原，其补体耗量不同，很难选定一个适当的补体用量，本实验的目的就是探索适用于一切甲肝抗原标本的补体量，但结果不够理想。由于实验采用差速离心-PEG(6,000)-氯仿法提取的甲肝抗原，在IAHA试验中，补体耗量不同，因此在试验前，应首先测定抗原的补体耗量，才能保证试验顺利进行。

提高抗原滴度也是甲肝抗原提取的关键问题。在流行区采集早期病人大便，工作量很大，难度也较大。黄疸前大便往往抗原滴度不高，IAHA滴度1:4~1:8者居多，1:16以上的比较少。改进提取技术，提高抗原滴度就成为甲肝实验诊断中能否应用于临床诊断的关键。本实验用pH6.4~5.4在37°C下60分钟抗原加热的处理法，就可以提高抗原滴度2~8倍，机理尚不清楚，但有一定实际价值。

对于血球的筛选问题，我们认为是重要

的，A、B、O三型血球中均能选出可用的血球，但在实用中以O型为佳，以排除A、B(H)因子的干扰。

### 小 结

本文初步探索了补体、pH值、DTT(二巯基苏糖醇)或2-ME和人不同血型的红血球等对免疫粘连血球凝集试验(IAHA)及抗原滴度的影响。结果显示了来源于不同病人的甲肝抗原对补体耗量不同；pH6.4处理(37°C 1小时)可提高HAAg效价2~8倍；DTT较2-ME对IAHA试验结果稳定，其用量可减少至0.25毫克/毫升，人不同血型(A、B、O型)的红血球均适于IAHA之用，但效价不同，因此，实验前需进行筛选。

### 参 考 文 献

1. 孙亚洲等: 中华医学杂志, 59(4): 193, 1979.
2. Krugman S et al: Am. J. Med. Sci, 270(1): 148, 1975.
3. Ito M et al: Japan J Med Sci Biol, 19: 109, 1966.
4. Lennette ET et al: J Clin Microbiol, 7(3): 282, 1978.
5. Matsuno S et al: J Clin Microbiol, 7(3): 310, 1978.
6. Mayumi M et al: Vox Sang, 20: 178, 1971.
7. Nishioka K: Adran Cancer Res, 14: 231, 1971.
8. Miller WJ et al: Proc Soc Exp Biol Med, 149: 254, 1975.