

肾综合征出血热血清IgG的固相发光免疫测定

兰州军区军事医学研究所 薛小平 田红 李秋瑾 李彤

提要 采用固相化学发光免疫测定法,检测23例出血热病人血清标本中的IgG抗体,结果均为阳性。本方法的敏感性高于间接免疫荧光法,抗体滴度较高($> 1:3200$),阳性率稍高。对15份对照血清标本重复检测 $1:200$ 稀释时均为阴性。本方法重复性良好,组内 $CV=2.3\sim 6.0\%$, $n=6$,组间 $CV=7.0\%$, $n=3$ 。

关键词 固相化学发光免疫测定法 肾综合征出血热 IgG抗体

肾综合征出血热(HFRS)是一种流行广泛,发病率高的自然疫源性传染病,对患者血清IgG抗体的检测可以用于临床诊断和流行病学调查。本实验室在近两年工作的基础上建立了固相发光免疫测定法检测HFRS患者血清IgG的实验程序。现将工作情况总结如下:

材料与方 法

一、材料:

1. 发光剂: 鲁米诺(Luminol) $MW=177.18$ (北京试剂厂)。氯化血红素(Hemin) $MW=561.96$ (本所医学防护科提供)。羊抗兔IgG: 双扩 $1:32$, 羊抗人IgG: 单扩 $1:200$ (均为兰州生物制品研究所出品),使用时用 $pH 9.6$ $0.05M$ 碳酸盐缓冲液(C·B)配成 $100\mu g/ml$ 包被固相载体。

2. 兔抗HFRS血清: 兰州生物制品研究所提供。用时以 $pH 7.5$ $0.05M$ 磷酸盐缓冲液(PBS)-2%的小牛血清稀释,工作浓度 $1:500$ 。

3. 抗原: 出血热灭活病毒(南京军区军事医学研究所提供)用前以 $pH 7.5$ $0.05M$ -2%小牛血清PBS稀释,工作浓度 $1:250$ 。

3. HFRS病毒细胞抗原片、兔抗人IgG荧光抗体: 均由第四军医大学403研究室提供。

4. 标本: HFRS患者血清23份,正常人血清5份,乙肝、甲肝阳性血清各3份,流行性腮

腺炎病毒阳性血清、E-B病毒阳性血清、类风湿因子阳性血清、发烧待查病人血清各1份。

5. 聚苯乙烯塑料管: $4.2\times 1.3cm$ (上海塑料三厂)。

6. 发光测定仪: BCL-I型,生物化学发光测定仪(由本室与兰州化物所共同研制)。

7. Luminol-羊抗兔IgG结合物: 参照Pamela氏重氮化偶联法制备,结合物经鉴定合格后 $-20^{\circ}C$ 保存。用前以 $pH 7.5$ $0.05M$ PBS稀释,工作浓度 $1:100$ 。

二、方法:

1. CLIA程序: 羊抗人IgG $400\mu l/管$ (过夜)→洗三次→病人血清 $400\mu l/管$ ($37^{\circ}C$ 1小时)→洗三次→抗原 $400\mu l/管$ ($37^{\circ}C$ 2小时)→洗三次→兔抗出血热抗体 $400\mu l/管$ ($37^{\circ}C$ 1小时)→洗三次→L-羊抗人IgG结合物 $400\mu l/管$ ($37^{\circ}C$ 1小时)→洗三次→加入 $0.1N$ NaOH $50^{\circ}C$ 水浴1小时后做发光测定。

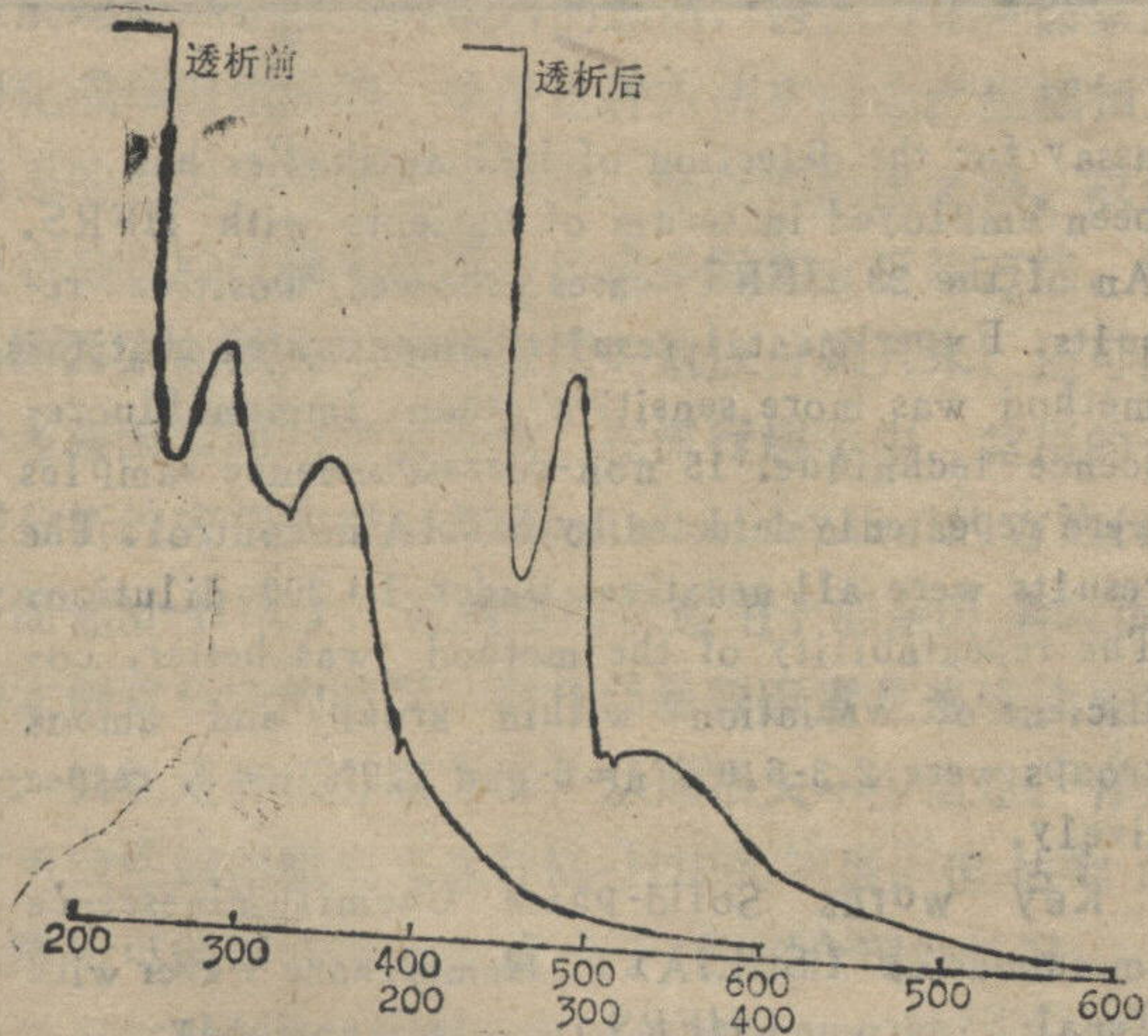
2. 化学发光测定: 取 $0.2ml$ 反应液,加入测量管,加入 $0.14\mu M$ Hemin $0.2ml$,放入仪器测量位置。避光注入 $5mM$ H_2O_2 $0.2ml$,激发发光反应,测定发光强度(5秒钟内积分值或发光峰值 mV)。

3. 间接免疫荧光试验: 按文献[2]进行。

结 果

一、结合物质量鉴定: 结合物IgG含量经

改良Lowry氏法和紫外吸收法(UV法)两种方法测定,蛋白含量为52.7mg/ml;结合物Luminol含量经UV法测定,含量为1.86mg ($Luminol_{\epsilon_{347nm}} = 7100$),Luminol:IgG克分子比为9.3。免疫活性琼脂双扩散法测定(以同样蛋白浓度的未结合羊抗人IgG为参比),二者的抗体滴度均为1:8;发光强度为 5.7×10^6 (5秒钟内积分值)。从结合物的紫外线吸收图谱可见,透析前的结合物在345~350nm和280nm各有一较强的吸收峰,分别为Luminol和IgG的特征吸收峰;透析处理后280nm吸收峰不变,由于未结合Luminol被除去,在345~350nm吸收峰明显减弱,但仍有一个较弱的吸收峰,表明Luminol与IgG确实产生偶联反应(附图)。



附图 L-IgG结合物紫外线吸收图谱(Pamela氏法)
(波长200~600nm, pH8.0 0.2M PBS)

二、发光测定条件的选择:为提高检测灵敏度,对发光系统中的几个主要影响因素做了实验筛选(表1)。

表1 发光测定条件选择实验结果*

NaOH (mM/ ml)	测定值	H ₂ O ₂ (mM/ ml)	测定值	Hemin (μ M/ml)	测定值
1	6309	5	70795	0.07	6309
10	15848	10	56234	0.14	30950
100	25119	15	44868	0.28	15848

* 表中测定值均为Luminol = 10^{-9} g/ml时5秒钟内发光积分值

数据表明在其它反应条件不变的情况下,NaOH为0.1N; H₂O₂为5mM; Hemin为0.14 μ M时发光反应系统具有较高的发光效率,可作为实验中使用的发光测定系统。

三、出血热患者血清标本测定结果:我们用CLIA法对23份出血热患者血清标本做了检测。实验中设置空白、阴性抗原、阴性血清、阴性抗体等多组对照。阳性结果判别标准:阳性标本测定值/阴性对照组测定值 ≥ 2 。测定结果见表2。

表2 23份出血热患者血清标本检查结果

抗体滴度	阳性份数
1:1600~1:3200	0
1:3200~1:6400	5
1:6400~1:12800	10
1:12800~1:25600	6
>1:25600	2

四、特异性试验:在实验中选择15份非对应血清标本进行测定。其中乙肝、甲肝阳性血清6份,正常人血清5份, E-B病毒阳性、流行性腮腺炎病毒阳性、发热待查、类风湿因子阳性血清各1份,每份标本重复检测3次,血清稀释度为1:200时,其测定结果均为阴性。

五、方法重复性试验:为验证试验方法的稳定性和实验结果的重复性,对4份不同稀释度的标本做批内试验,每次做6管;另选1份标本做批间试验,1个月内重复测定3次,每次做3管。结果见表3。

六、CLIA与IFAT检测结果的比较:两种方法对23份出血热患者血清的检测结果表明无显著性差异($\chi^2 < \chi^2_{0.05}, P > 0.05$),见表4。

讨 论

通过实验证明,CLIA法检测HFRS患者血清IgG具有较好的敏感性和特异性,对23份血清标本检测的阳性结果与IFAT法基本一致;检出滴度均在1:3200以上,明显高于后者;对15份对照血清标本重复检测1:200稀释时均

表 3

重 复 性 试 验 结 果*

管号	批内试验 (标本号)				批间试验	
	1269	1259	949	99	949	
1	4813	12556	34061	13315	36610	} $\bar{X} = 35699$
2	5188	13840	34014	13184	35225 34245 36719	
3	4623	13612	34097	12790	32006	} $\bar{X} = 31103$
4	5453	13725	35524	13409	32797 30812 22800	
5	4996	13615	35950	12305	34061	} $\bar{X} = 34424$
6	4646	13147	34054	11857	34014 34097 35524	
n	6	6	6	6	3	
X	4953	13416	34616	12810	33742	
S (S \bar{X})	297	441	802	565	2372	
CV (%)	6.0	3.3	2.3	4.4	7.0	

* 数字为5秒钟内发光积分值

表 4 CLIA与IFAT检测结果的比较

病程 (天)	标本 数	CLIA		IFAT	
		+	-	+	-
1~4	7	7	0	7	0
5~8	8	8	0	8	0
9~12	8	8	0	7	1

为阴性。因此在检测病人血清时从1:200稀释度开始检测基本可避免非特异反应产生,防止出现假阳性。发光标记物制备方法比较简便,结合物比较稳定,有助于保证试验结果的稳定与重复。我们认为本法的建立为检测HFRS血清IgG抗体提供了一种可供选择的新方法。

Detection of IgG Antibody in Serum of Hemorrhage Fever with Renal Syndrome (HFRS) by Solid-Phase Chemiluminescence Immunoassay Xue Xiaoping, et al., Institute of Military Medicine, Lanzhou

The solid-phase chemiluminescence immuno-

assay for the detection of IgG antibodies has been employed in serum of Patients with HFRS. An of the 23 HFRS cases showed positive results. Experimental results demonstrated that this method was more sensitive than immunofluorescence technique. 15 non-correspondence samples were repeatedly detected by SCLIA in control. The results were all negative, under 1:200 dilution. The repeatability of the method was better, coefficient of variation within group and among groups were 2.3-6.0% n=6 and 7.0% n=3, respectively.

Key words Solid-phase Chemiluminescence Immunoassay (SCLIA) Hemorrhage Fever with Renal Syndrome (HFRS) IgG antibody

参 考 文 献

1. Pamela J, et al. A solid-phase chemiluminescence immunoassay for determination of IgG in eluates of psoriatic Scales. J Immunol Methods 1984; 70: 185.
2. 李钟铎, 等. 用免疫荧光法对我国流行性出血热患者的血清学研究. 中华预防医学杂志 1982; 16(2): 68.