

应用酶联免疫吸附实验测定流行性出血热早期患者尿内抗原的研究

济宁医学院 曲晶毅 黄爱田 金朝抗 党锡连

摘要 本文首次报道应用酶联免疫吸附实验(ELISA),测定流行性出血热(EHF)患者尿中抗原,进行早期诊断,取得满意结果,本法系应用免疫的特异性和酶的高效能催化的敏感性相结合的一种方法,因而特异性强、灵敏度高。研究结果表明,7病日内阳性率较高,为93.89%;2病日内阳性率更高,为100%,故有早期诊断价值,本文用阻断实验证实尿中具有特异性抗原。此外,以正常人和其它疾病患者作对照,结果为阴性,证明本法特异性高。本法标本系用尿液,容易收集,方法简便,结果易判断,易于推广应用。

关键词 酶联免疫吸附实验 流行性出血热 尿中抗原检测 早期诊断

流行性出血热(EHF)病情重,死亡率高^[1],如能早期诊断、早期治疗,则可大大降低死亡率。目前,实验诊断虽有不少方法,但多系测定血液中抗体;而患者体内抗体的出现和滴度升高一般较晚^[2],早期诊断价值较小;但早期病人尿中可存有抗原,故测定尿中抗原有助于早期诊断。本方法^[3,4]具有特异性强、灵敏度高,尿标本易于采集,病人无痛苦,操作简便,不需要特殊仪器设备,结果易于判断,无主观因素干扰等优点,易于推广应用。应用ELISA法测定尿中抗原进行早期诊断,目前尚未见报道。现将本研究结果报告如下:

材料和方法

一、检查对象:

1.流行性出血热患者尿:从1985年5月至1986年4月,共收集尿液标本280人份,由济宁市传染病医院、市中区医院及泗水、加祥、汶上、金乡等县医院供给。患者尿均系空腹尿,所有患者皆经医院临床确诊和间接免疫荧光阳性证实者。

2.正常人尿:为健康者晨空腹尿,计103人份,其中本校学生52人,托儿所儿童43人,教工8人。

3.其它疾病患者尿:共118人,由济宁市第一人民医院、传染病医院和市中区医院供给,其中肝与肾病患者各19例、心脏疾病患者17例、肺病患者15例、发烧者5例、消化道患者等其它疾病共43例。

二、实验原理:系采用ELISA双抗体夹心法,即利用已知抗体测定未知抗原。先将纯化抗体包被于固相载体表面,使其与加入尿中抗原进行特异性结合,然后再加入酶标特异性抗体结合物,其结合物中的酶可催化加入的底物而产生黄褐色。根据颜色深浅,判定有无相应的免疫反应。颜色深浅与被检标本中的抗原成正比。

三、实验试剂:

1.提纯抗体:将3份以上EHF间接免疫荧光测定 $\geq 1:100$ 以上阳性患者血清混合,先用硫酸铵粗提,尔后用DEAE纤维素层析。提纯后,用间接免疫荧光测定其特异性抗体为阳性,再以电泳法分离为单条带,证明为特异性较纯的抗体;其后用紫外分光光度计测定含量、滴定操作效价,分装安瓿,低温冰箱保存备用。

2.酶标抗体结合物制备:将上述提纯抗体,用过碘酸钠法标上辣根过氧化物酶^[5,6],滴定其操作效价,分装安瓿,低温冰箱保存。

3.底物溶液：将40毫克邻苯二胺溶于100毫升 pH5.0磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中，临用前再加30% H_2O_2 0.15毫升。

四、实验方法：

1.以pH9.6碳酸盐缓冲液稀释提纯抗体，含量为10微克/毫升，加入聚苯乙烯凹孔微量板内（下称凹孔板，10×4孔，上海塑料三厂生产），每孔0.15毫升，放4℃冰箱24小时；再用pH7.4PBS-T洗三次、空干。

2.第一排4孔作空白对照，不加尿液，其它各孔皆加尿标本0.1毫升；同时以阴性、阳性尿作对照测定，放37℃水浴2小时，取出以pH7.4PBS-T洗三次、空干。

3.加入酶标抗体结合物于各孔中，用pH7.4PBS-T和10%小牛血清稀释酶标抗体结合物，使成1:20，每孔加0.1毫升，放37℃水浴2小时，用pH7.4PBS-T洗三次、空干。

4.各孔皆加入底物0.1毫升，放37℃水浴15分钟，加终止液2M H_2SO_4 1滴。

5.将凹孔板放入酶标仪（GXM型，四川分析仪器厂生产）中，用波长492毫微米，以空白孔对零点与100%透光度，再测其光密度值（OD值）。

五、结果判断：OD值0.07以上为阳性，低于0.07为阴性；对照阳性尿OD值均大于0.07，阴性尿均低于0.07。

六、尿中抗原的特异性鉴定：用阻断实验加以证明。先将EHF患者尿0.2毫升与提纯EHF IgG50微克/毫升0.2毫升，放37℃水浴30分钟，离心取上清液，按上法操作；同时以未阻断尿作对照。

结果与讨论

一、流行性出血热患者尿的测定结果：

1.患者尿的检测：标本280例，结果见表1。

由表1可看出，1~2病日共测12例，皆为阳性；3~4、5~7病日阳性率分别为90.91%和94.67%；8~10、11~15和16~28病日阳性率各为73.02%、66.67%和65.79%。结果表明，

表1 280例EHF1~28病日患者尿所测结果

病日	例数	阳性人数	阳性率%
1~2	12	12	100.00
3~4	44	40	90.91
5~7	75	71	94.67
1~7	131	123	93.89
8~10	63	46	73.02
11~15	48	32	66.67
16~28	38	25	65.79
8~28	149	103	69.13
总计	280	226	80.71

阳性率与病日有密切关系，即：病日越早，阳性率越高；病日不断延长，阳性率则不断降低。本法测定7病日以前阳性率较高（93.89%），尤以1~2病日更高（100%），可见此法具有较高的早期诊断价值。

2.EHF患者尿中抗原的特异性测定：为了进一步证实患者尿中抗原是否具有特异性，本文应用阻断试验来加以验证，即：应用已知出血热特异性抗体和患者尿中特异性抗原相结合，如患者尿中系特异性抗原，和已知出血热特异性抗体相结合，则尿中原有抗原量降低，可用测定OD值来查明；如尿中抗原量降低，其OD值亦降低，则可证明其尿中抗原为特异性抗原。

本文共测定10例EHF患者尿，其阻断试验前、后OD值变化见表2。

由表2可见，10例患者阻断试验前、后值均有明显变化，即：阻断试验后OD值下降幅度达65%以上（一般认为下降50%以上即有特异性）。此项结果表明，阻断试验后尿中的特异性抗原与特异性抗体结合后，使尿抗原量明显降低，佐证了所测患者尿中的抗原系EHF特异性抗原。

本文还测定了其它疾病组中2例OD值较高患者的阻断试验，结果见表3。

表3可见，其它疾病组中2例患者阻断试验前、后OD值结果相近。说明尿中无特异性抗原，故OD值不下降。

表2 10例EHF患者尿阻断试验前、后OD值比较

	编 号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
阻断试验前OD值	0.09	0.1	0.115	0.175	0.17	0.175	0.21	0.4	0.72	0.19
阻断试验后OD值	0	0	0.02	0.03	0	0.03	0.07	0.07	0.02	0.025

表3 其它疾病组中2例患者尿阻断试验前后OD值比较

	疾病名称	
	再生障碍性贫血	下肢骨折
阻断试验前OD值	0.51	0.11
阻断试验后OD值	0.51	0.105

3. ELISA尿抗原测定与间接免疫荧光(IFAT)血抗体测定结果的比较: 取EHF早期患者血, 用IFAT检查阴性者8例; 而同时用ELISA测尿中抗原, 此8例皆为阳性。经1~2周后, 此8例患者IFAT则转为阳性(表4)。

表4 EHF患者血抗体IFAT早期为阴性、尿ELISA为阳性的结果

EHF患者	IFAT血抗体 阴性病日	ELISA尿抗原 阳性OD值	IFAT血抗体 转阳性病日
曹×	2	0.56	12
赵×	4	0.17	14
曾×	4	0.47	24
杨×	5	0.17	16
薛×	5	0.34	12
黄×	6	0.16	25
李×	6	0.45	17
王×	9	0.14	18

由表4可看出, 应用IFAT测8例EHF患者早期血中抗体均为阴性, 而用ELISA检测均为阳性, 这8例患者1~3周后, 再用IFAT测定血中抗体则皆转为阳性。由此可见, 本法在诊断中的可靠性及其早期诊断价值。

二、EHF患者尿与正常人尿OD均值比较: 应用ELISA测定患者尿280份, OD均值为1.14; 正常人尿103份, OD均值为0.028。经OD值测验 ($t > 3, P < 0.01$), 具有显著性差异。可见本法有较高的特异性。

三、EHF患者尿与其它疾病患者OD值比较: 应用ELISA测定EHF患者280例, 测定其它疾病患者118例, 其所测OD均值见表5。

表5 EHF患者与其它疾病患者尿OD值比较

疾病名称	例数	OD均值
EHF	280	0.14
肝病	19	118 0.03
肾病	19	
肺病	15	
发烧	5	
消化道疾病	2	
心脏病	17	
再生障碍性贫血	2	
骨折	3	
癌及其它疾病	36	

由表5可见, 其它疾病组共测118例, 其OD均值为0.03; EHF患者280例, OD均值为0.14。经显著性测验 ($t > 3, P < 0.01$), 其差别具有非常显著性意义。本法有较高的特异性。其它疾病组118例中, 阴性116例, 另有2例(1例再障和1例骨折病人)出现假阳性(阻断试验证实属非特异性抗原), 故可否定为阳性。

A Study on the Early Diagnosis of Epidemic Hemorrhagic Fever by ELISA for Examining Antigen in Urine Qu Jingyi, et al., Jining Medical College

To determine the antigen in the urine of 280 samples of EHF patients by using ELISA was carried out. The positive rate was 93.89% with 7 days, while 100% within 2 days after onset. The results were all negative among 103 normal persons. Only 2 of 118 cases gave a false positive reaction for other diseases.

The test was therefore highly sensitive and specific. Meantime it was easily to be performed, and the results could be judged without

difficulty.

Key words ELISA Epidemic hemorrhagic fever For examining antigen in urine The early diagnosis

参 考 文 献

1. Lee HW, et al. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis 1978; 137 (3): 298.
2. 陈化新, 等. 流行性出血热疫区黑线姬鼠带毒检查及鼠肺抗原在诊断中的应用. 中华流行病学杂志 1982; 3 (4): 193.

3. 北京医学院微生物教研组编. 实用免疫学, 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1980: 257~285.
4. O'Beirne AJ, et al. Heterogeneous enzyme immunoassay. J Histochem Cytochem 1979; 27: 1148~1162.
5. 林性玉, 等. 对过碘酸钠氧化法制备标记抗体的体会. 临床免疫与实验免疫 1980; 1 (4): 38.
6. 骆加理. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体的简易方法. 生物化学和生物物理学报 1981; 13: 1.

(本文在路步炎教授指导下进行, 标本由济宁市防疫站、济宁市传染病医院、泗水、曲阜、汶上县医院供给, 一并致谢)

用人HBV血清学试剂检测143份鸭血清结果分析

江苏省淮阴市卫生防疫站 王培龙 中国人民解放军82医院 葛志中

鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 与人乙型肝炎病毒 (HBV) 同属嗜肝DNA病毒科 (Hepadnaviridae). DHBV 表面具有与人HBV HBsAg相关的抗原决定簇。我国高邮麻鸭DHBV-DNA的检出率高达50%。最近, 我们对143份高邮麻鸭血清用人HBV的诊断试剂进行检查。鸭血采自本市禽兔加工厂, 鸭龄均>6个月。HBsAg诊断血清与诊断血清由上海生物制品研究所生产 (批号8505和8618); 抗HBc ELISA法诊断试剂由北京军事医学科学院生产 (批号8681); HBeAg和抗HBe ELISA法诊断试剂由上海静安区医学化

验所生产 (批号8680)。

结果: 143份血清中人HBsAg试剂测定阳性者 ($\geq 1:8$) 共24份 (1:8、16、32、64、分别为9、12、1和2份), 但均不能被抗HBs中和。在24份HBsAg阳性血清中, 抗-HBc阳性者6份, HBeAg和抗-HBe阳性者各4份; 在HBsAg阴性的24份血清中, 抗-HBc阳性4份, 抗-HBe阳性3份, HBeAg则无一阳性。以上结果提示, 鸭肝炎病毒与人HBV的HBsAg、HBeAg和HBcAg都可能存在一定的抗原相关性。

1986年广西罗城、宜山血吸虫病流行区的人群弓形体感染调查报告

广西壮族自治区卫生防疫站 崔君兆 韦增良 陆宙光 陈锦华

为了了解血吸虫病流行地区人群弓形体的感染情况, 1986年我们对罗城、宜山县血吸虫病流行地区人群进行了弓形体感染调查。

血清标本分别由两县血防站提供。系采自血吸虫病流行地区5~70岁人群静脉血。检查方法按我站弓形体病实验室间接红细胞凝集试验操作常规。抗原、红细胞均由本室制备, 经标准阳性血清和阴性血清测试效价达到应用要求。以 $\geq 1:64$ 判为阳性。调查结果表明, 罗城县阳性率为18.07% (60/332); 宜山县为3.77% (18/474)。两者差别非常显著 ($P < 0.01$)。两县共检测806人, 阳性78人, 阳性率为9.67%; 其中有血吸虫病治疗史者405人, 阳性31人, 阳性率为7.65%; 无血吸虫病治疗史者401人, 阳性47人, 阳性率为11.72%, 有显著差异 ($\chi^2 = 3.84$,

$P < 0.05$)。尤其罗城县更为显著, 有血吸虫病治疗史者阳性率为13.3% (25/188), 无血吸虫病治疗史者阳性率为24.3% (35/144), $\chi^2 = 7.80$, $P < 0.01$; 而宜山县的前者为2.77% (6/217), 后者为4.66% (12/257), 二者无显著差异 ($\chi^2 = 1.17$, $P > 0.05$)。各年龄组除10~19岁与50~59岁组阳性率为18.48% (22/119) 与14.56% (15/103) 稍高外, 其他各年龄组无显著差异。男性阳性率为8.49% (35/412), 女性阳性率为10.91% (43/394), 两者亦无显著差异 ($P > 0.05$)。有血吸虫病治疗史者阳性率低是否与曾服用过吡喹酮等广谱抗虫药物有关, 尚待进一步研究。

(本工作得到广西寄生虫病防治研究所谭浩光医师的协助, 谨此致谢)