

# 用ELISA检测大鼠血清中肾综合征出血热病毒特异性抗体

徐海峰<sup>1</sup> 杨为松<sup>1</sup> 崔龙洙<sup>1</sup> 朱德生<sup>2</sup> 白雪帆<sup>1</sup>

**摘要** 本研究应用单克隆抗体 (McAb) 技术, 建立了三种检测大鼠血清中肾综合征出血热病毒 (HFRSV) 特异性抗体的ELISA。通过与间接免疫荧光法 (IFAT) 对比试验发现, 三种ELISA在检出大鼠血清HFRSV特异性抗体的阳性率和敏感性上均明显高于IFAT试验, 并且ELISA与IFAT总检出符合率为88.5%。此外还发现由于引入小鼠抗大鼠Kappa轻链McAb, 抗体捕捉ELISA和间接夹心ELISA具有早期诊断的特性。这些方法的建立对野生及实验动物的HFRSV流行病学监测及检疫有一定价值。

**关键词** 肾综合征出血热 抗体 酶联免疫吸附试验

肾综合征出血热 (HFRS) 是由布尼亚病毒科汉坦病毒属引起的自然疫源性疾病。本病的传染源除黑线姬鼠、褐家鼠、欧洲棕背鼯外, 能作为家鼠或实验动物型HFRS传染源的动物, 还有实验大白鼠 [1]。近十年来世界各地相继爆发了由实验大鼠引起的HFRS流行, 日益引起了人们的高度重视, 迫切的需要一些快速、简便、敏感、特异的检测手段, 用于野生及实验动物的HFRS病毒流行病学监测及检疫, 以预防野鼠型、家鼠型及实验室型HFRS的发生。虽然IFAT一直是主要可靠的血清学诊断手段, 但需用昂贵的仪器, 并且判定结果有一定的主观性, 因而限制了它的应用。为此我们建立了三种检测实验大鼠体内HFRSV抗体的ELISA, 并对这些方法的敏感性和特异性等进行了比较, 现报告如下。

## 材料与方 法

### 一、主要试剂:

1. 抗体: 兔抗HFRSV免疫血清 (本室自制); A<sub>35</sub>抗HFRSV McAb购自中国预防医科院病毒所; 小鼠抗大鼠Kappa轻链 McAb (Mark-1) 由比利时Bazin教授惠赠; 兔抗大鼠免疫血清、HRP-Mark-1 McAb和大鼠

辣根过氧化物酶McAb复合物 (GD<sub>1</sub> PAP) 购自北京肿瘤防治研究所; 抗HFRSV<sub>5</sub>H<sub>6</sub> McAb、JEV McAb、HSV McAb和酶标抗HFRSVH<sub>7</sub>McAb由本校分子病毒室和人单抗室提供; 荧光素标记的兔抗大鼠IgG、酶标兔抗人IgG和羊抗人IgG均为Sigma公司产品。

2. 病毒抗原: 10% HFRSV陈株感染鼠脑悬液及Vero-E<sub>6</sub>细胞抗原片本室自制; 其它无关病毒抗原JEV、HSV为本校分子病毒室提供。

二、大鼠血清: 2个自然感染HFRSV大鼠群待测血清115份和1个无HFRSV感染大鼠待测血清50份, 由本校实验动物中心提供。HFRSV免疫Lou大鼠血清及正常Lou大鼠阴性血清为本室自制。

### 三、实验方法:

1. 双McAb间接夹心ELISA法参照文献进行 [2]。

2. 抗体捕捉ELISA法按文献稍加改进 [3], 以Mark-1 McAb包被酶标板, 4℃过夜。洗涤后加入封闭液37℃ 1h 加入待检

1 第四军医大学附属唐都医院出血热研究室 710038  
西安市

2 第四军医大学动物实验中心



较：从表3可见间接夹心ELISA法与IFAT的总符合率为88.57%。

表3 间接夹心ELISA与IFAT的符合率

	IFAT		合 符 合		符合率%	
	+	-	计 数	数		
ELISA	+	26	4	30	26	86.66
	-	0	5	5	5	100
合计	26	9	35	31	88.57	

六、对实验大鼠感染HFERSV后不同时间检出抗体阳性鼠的比较：从表4可见间接夹心ELISA和抗体捕捉ELISA均可在感染病毒后第5天检出抗体阳转鼠1只。而PAP ELISA和IFAT法分别仅在感染病毒第7天和第9天检出抗体阳转鼠。

表4 ELISA、IFAT对实验大鼠感染HFERSV病毒后不同时间抗体阳性鼠检出的比较

感染HFERSV 病毒后检测 时间(天)	抗体阳性鼠数/受试鼠数			
	间接夹心 ELISA	抗体捕捉 ELISA	PAP ELISA	IFAT
3	0/5	0/5	0/5	0/5
5	1/5	1/5	0/5	0/5
7	3/5	3/5	1/5	0/5
9	4/5	4/5	4/5	3/5
11	5/5	5/5	5/5	5/5

## 讨 论

近年来多种用于检测HFERS患者体内血清抗体的ELISA方法已经建立并广泛应用<sup>[4~6]</sup>，但在检测大鼠种群HFERSV抗体的方法除IFAT外，应用ELISA法的报告尚不多见。本文根据大鼠免疫球蛋白轻链95%是Kappa型，并且与小鼠轻链无交叉这一原理<sup>[7]</sup>，引入抗大鼠Kappa轻链McAb，用于建立检测大鼠血清中HFERSV抗体的ELISA方法，并将建立的ELISA法和IFAT进行了比较研究。结果发现三种ELISA法在检测大鼠血清抗体阳性率或检测抗体滴度敏感性方面均优于IFAT，并

且发现抗体捕捉ELISA和间接夹心ELISA最早可在感染HFERSV后第5天的大鼠血清中检出特异性抗体，优于PAP ELISA和IFAT。但从比较检测大鼠免疫血清抗体滴度方面，PAP ELISA显示了更高的敏感性，优于其它三种方法。分析上述结果的差异，可能是由于抗体捕捉ELISA和间接夹心ELISA采用了抗大鼠Kappa轻链McAb所致。因为抗Kappa链McAb具有检出血清中各种类或亚类抗体的功能，所以能检测出病毒感染早期IgM类抗体，而PAP ELISA和IFAT使用的包被抗体和酶标抗体均主要针对检测大鼠IgG类抗体，故PAP ELISA和IFAT在病毒感染早期IgG类特异性抗体尚未产生或表达水平极低时，未能检出HFERSV特异性抗体。随着病毒感染时间的推移，大量的IgG类特异性抗体产生，因而PAP ELISA法发挥了其有效的放大效应。

以往检测血清特异性抗体的ELISA方法中，通常使用免疫血清r-G作为包被或酶标抗体。由于免疫血清成分复杂，纯化困难，批间差异大，易造成实验本底升高，导致误差。研究表明，应用McAb作为ELISA检测系统中的包被和酶标抗体，具有特异性强、降低本底、提高灵敏度的良好作用。实验发现，由于间接夹心ELISA和抗体捕捉ELISA在包被抗体和酶标抗体上均使用了McAb，因而在包被McAb后的封闭步骤可省略，替之以5%牛血清-PBS-T作为各层试剂的稀释液，对实验特异性无影响。但PAP ELISA尽管酶标抗体为McAb，然而因包被和桥抗均使用了多克隆抗体，并且层次多，所以封闭步骤不能省略，并应充分洗涤，否则易造成信噪比升高，值得注意。

总之，以上结果表明，三种ELISA法均可作为检测大鼠HFERSV抗体的良好工具。它们具有特异性强、敏感性高、操作简便，判定结果客观，并能同时快速检测大量标本的优点，有助于HFERS流行病学、病原学、实验动物检疫和监测的研究，值得试用推广。

The Study on ELISA Methods for Detection of Specific Antibodies against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus in Rat Sera Xu Haifeng, Yang Weisong, Cui Longzhu, et al. Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710038

Three ELISA methods were developed to detect specific antibodies against hemorrhagic fever with renal syndrome virus (HFRSV) in rats sera. It was shown that all three kinds of McAb-ELISA were specific, sensitive and simple for the detection of HFRSV antibodies in rat sera.

**Key words** Hemorrhagic fever with renal syndrome Antibody Enzyme-linked immunosorbent assay

参 考 文 献

1 Lee HW. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hemorrhagic

gic Fever with Renal Syndrome) Institute for Viral Diseases, Korea University, 1989:39.

2 徐志凯, 王海涛, 姜绍淳, 等. McAb ELISA间接夹心法检测HFRS病人血清IgG和IgM抗体的研究. 中国免疫学杂志, 1987, 3(1):46.  
 3 邢峥, 李德新, 霍子威, 等. Mac ELISA, RPHI和IFAT用于流行性出血热早期诊断的比较. 病毒学报, 1988, 4(4):342.  
 4 薛采芳, 安献禄, 甄荣芳, 等. 提高免疫酶技术检测HFRS病毒抗原敏感性的初步研究. 第四军医大学学报, 1988, 9(4):233.  
 5 徐志凯, 汪美先, 王海涛, 等. McAb-ELISA间接夹心法检测家鼠型HFRS度又人和动物血清中特异性抗体. 第四军医大学学报, 1988, 9(3):178.  
 6 王海涛, 徐志凯, 汪美先, 等. McAb-ELISA间接夹心法对西北地区HFRS的血清流行病学调查初报. 第四军医大学学报, 1988, 9(4):262.  
 7 Bazin H. Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. CRC. Press, Boca Raton, Florida, 1990:165.

(收稿: 1993-12-22 修回: 1994-03-07)

## 广州市高温作业人员蛋白尿情况分析

张 敏 黎满全 何耀明 周献松

天气炎热地区, 在阳光直射的建筑工地工作的工人和于室内工作的办公室人员在工作时的生理状况是明显不同的。我们分别同步对这两种人的尿液进行尿蛋白定性测定和比较, 藉以了解在高温状况下作业人员肾脏的受累情况。

### 一、对象和方法

1. 对象: 检查时间为5~9月份, 所选择的对象为年龄20~40岁的健康工作人员(事先已排除原有泌尿系疾患者), 并确定受检对象在当时的工作环境中工龄超过一个月, 因所选的室外工作人员均为建筑工地的男性工作人员, 所以室内人员也相应选择男性做对照。

2. 对象的工作环境: 室外的建筑工人每日于阳光直射下工作, 环境平均温度为35℃~37℃; 室内工作人员的平均环境温度约24℃~30℃, 其中部分人员于空调环境中工作, 两组人员每日的工作时间相同。

3. 采样及检测方法: 我们分别同步在两组人群的工作现场采集尿液, 使用NA-4210尿液快速分析仪对尿液进行尿蛋白定性测定, 然后比较两组结果。

### 二、结果与分析:

我们共收集到室内人员的尿液标本1154份, 室外人员尿液标本883份, 尿蛋白阳性率分别为3.03%(35/1154)和9.74%(86/883)。将两组结果进行比较, 其 $\chi^2=40.28$ ,  $P<0.005$ , 有显著差异。两组中尿蛋白均为+~++; 其中室外人员尿蛋白+者占93.33%, ++者占6.67%; 室内工作人员尿蛋白+者占89.13%, ++者占10.8%。其原因是高温作业时大量水分经汗腺排出, 肾血流量和肾小球滤过率降低, 尿液浓缩, 量少, 肾脏的负担加重, 从而出现蛋白尿, 此时应及时补充水分。

(收稿: 1993-03-10 修回: 1993-05-07)

本文作者单位: 黄埔卫生检疫局 510700