

人免疫缺陷病毒血清学诊断免疫酶法的建立及其应用

中国预防医学科学院病毒学研究所 王 哲 曾 毅

提要 将免疫酶法(IE)用于人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)血清学检测,并与间接免疫荧光法(IIF)进行比较。其阳性检出率和重复性与IIF法相同,而且敏感性高于IIF法。免疫酶法更为简单、实用,且适应性强,可成为取代IIF的便于基层应用的HIV血清学初筛方法。用HIV-1免疫酶试剂盒在非洲科特迪瓦进行初步应用,取得良好结果。

关键词 免疫酶法 人免疫缺陷病毒 血清学检测

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)血清学检测的初筛试验主要有ELISA、明胶凝集和免疫荧光等方法^[1~3],进口的HIV诊断试剂价格昂贵,且不能及时得到,无法用于国内大面积人群检测。我室已成功研制出间接免疫荧光试剂,并用于国内大面积血清学检测,初步解决了HIV诊断试剂的国产化问题。但免疫荧光试剂还存在一些缺陷,必须配备昂贵的荧光显微镜和非特异着色点多,对操作人员有一定要求,限制了其在基层单位的应用和推广,也影响了国内HIV血清学大面积检测的进行和尽快尽早地检查出HIV抗体阳性血清。

在免疫荧光试剂的基础上,结合我们进行EB病毒血清学诊断的经验,我们建立了HIV抗体检测免疫酶法,用于艾滋病血清学检测。该免疫酶试剂盒经国内外初步应用,取得良好效果。

材料与方 法

一、HIV-1抗原片:收集感染了HIV-1的MT-4细胞,离心、涂片、固定、吹干,变色硅胶封袋备用。HIV-1毒株为本室分离的HIV-1-Ac株^[4]。

二、血清: HIV-1抗体阳性血清为28份美

国AIDS病人血清及2份本室检测出的HIV-1携带者血清,经ELISA、Western blot确证为HIV-1抗体阳性。

HIV-1抗体阴性血清为本室EB病毒血清学检测门诊病人血清,经免疫酶法检测EBV IgA/VcA和IgA/EA阴性;ELISA、Western blot检测HIV-1抗体阴性。

三、试剂:

1. HRP-SPA由本室标记,滴度1:80,使用浓度1:20。

2. FITC-羊抗人IgG由本室标记,滴度1:80,使用浓度1:20。

3. AEC为Sigma公司产品。

4. N, N-二甲基甲酰胺、过氧化氢、伊文氏蓝及无机盐等为国产分析纯试剂。

四、方法:

1. 间接免疫荧光法(IIF): 常规方法见文献^[3]。

2. 免疫酶法(IE): 将阳性血清和阴性血清随机编号,滴于抗原片上,37℃孵育45分钟;PBS洗三次。滴加HRP-SPA,37℃45分钟, PBS洗三次。称30mg AEC溶于7.5ml DMF(二甲基甲酰胺)中,再加入17.5ml 0.05M 乙酸盐缓冲液(pH5.0)及0.25ml H₂O₂,将抗原片放入,显色2~3分钟,取出

后自来水冲洗，甘油封片，普通光学显微镜观察结果。

结果判定：细胞膜和细胞浆呈桃红色为阳性细胞，无色为阴性细胞。镜下出现阳性细胞即判为阳性，反之为阴性。

五、应用：组装HIV-1抗体检测免疫酶试剂盒，在非洲科特迪瓦一所教会医院进行应用，并同国外生产的ELISA试剂进行比较，并同时由当地医院技术人员判定结果和进行操作。

结 果

一、免疫酶法用于HIV-1血清学检测：用免疫酶法检测HIV-1抗体阳性血清，细胞膜及细胞浆呈桃红色，尤以膜上染色为深，而对照则无色且未出现假阳性。用IE和IIF法分别检测60份AIDS病人和正常人血清，结果IE法在阳性检出率上达到IIF法水平，AIDS病人血清全部为阳性，正常人血清均为阴性，且无假阳性出现。

二、敏感性实验结果：取10份HIV-1抗体阳性血清用IE和IIF法检测其滴度并计算GMT，结果IE法的GMT为IIF法的一倍（表1）。

表1 免疫酶法和免疫荧光法敏感性实验结果

血清号	血清HIV-1抗体滴度（1：）	
	免疫酶法(IE)	免疫荧光法(IIF)
468	20480	5160
539	1280	640
543	640	640
618	1280	640
623	1280	640
630	160	160
645	5120	1280
646	1280	640
652	5120	1280
663	80	80
GMT	1282.33	642.69

三、重复性实验结果：取6份阳性血清和2份阴性血清用IE和IIF法分别重复检测三次，结果均在上下一个稀释度范围内，表明两种方法重复性良好、稳定（表2）。

四、适应性实验结果：用感染了HIV-1的H9和CEM细胞代替MT-4细胞作抗原，结果较好。在室温条件下操作，免疫酶法第一次孵育30、45、60分钟，第二次孵育20、30、40分钟对结果无影响。

五、初步应用结果：在非洲科特迪瓦进行

表2 两法重复性实验结果比较

血清号	血清HIV-1抗体滴度（1：）					
	IE			IIF		
	第一次	第二次	第三次	第一次	第二次	第三次
468	20480	10240	20480	5120	5120	2560
618	1280	1280	1280	640	640	640
623	1280	1280	1280	640	640	640
630	160	160	160	160	160	160
645	5120	5120	5120	1280	2560	1280
652	5120	5120	5120	1280	1280	1280
9	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—

初步应用。取6份非洲人血清分别用 ELISA 和 IE法检测，结果相符，两种方法 均有 HIV-1

和HIV-2抗体交叉反应（表3）。

同时对当地医院技术人员进行免疫酶法检

表3 ELISA和IE法结果

	血 清 号					
	3015	3024	3025	3020	2994	3029
ELISA (HIV-1抗原)	+	—	+++	+	—	—
ELISA (HIV-2抗原)	+++	++	+++	+++	—	—
IE (HIV-1抗原) 1 : 10	+++	—	++	++	—	—
IE (HIV-1抗原) 1 : 20	+++	—	+	+	—	—

测培训。让5名技术员对上述结果分别 判定，都得到很好结果（表4）。采取双盲法 给 以血清，首次操作即得到极好结果（表5）。

表4 IE法判定结果

技术员 编 号	血 清 号					
	3015	3024	3025	3020	3029	2994
1	+	—	+	+	—	—
2	+	—	+	+	—	—
3	+	—	+	+	—	—
4	+	—	+	+	—	—
5	+	—	+	+	—	—

表5 IE法操作结果

技术员 编号	阳性 对照	阴性 对照	血 清 号			
			3025	3029	3024	2020
1	+	—	+	—	—	+
2	+	—	+	—	—	+
3	+	—	+	—	—	+
4	+	—	+	—	—	+
5	+	—	+	—	—	+

讨 论

本文所用的免疫酶法主要是利用SPA吸附 哺乳类IgG的特性来实现的。用酶标 抗人IgG 同样能得到满意的结果，但由于试剂盒配用的 阳性对照是鼠抗人单抗，用SPA则无需更换试 剂，更重要的是SPA能吸附部分IgM，在HIV 感染早期诊断上比 抗人IgG为佳。适应性 结果表明，在室温条件下，缩短各步时间，

可在1小时内完成整个检测，达到快速的目的。 免疫酶法无需特殊仪器，操作简单易于掌握， 红色底物显色易于辨认，各项指标达到免疫荧 光法的水平，因此，可以代替间接免疫荧光试 剂作为国内艾滋病血清学检测的初筛方法，特 别是其敏感性高于免疫荧光试剂，无非特异显 色，作为大面积检测的试剂就更为优越。

用本室组装的免疫酶试剂盒，经在本室及 一些基层防疫站使用，反应良好。在非洲科特 迪瓦进行的初步应用，表明易于掌握，达到国 外ELISA试剂的水平，而且价格便宜，受到 外国专家的高度评价。

Establishment and Application of Serol-
ogic Diagnosis Method of Human Immuno-
deficiency Virus Wang Zhe, Zeng Yi,
Institute of Virology, Chinese Academy
Preventive Medicine, Beijing

Using immunoenzymatic method(IE) for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) serologic detection, and comparing with indi- rect immunofluorescence method(IIF). This met- hod had same specificity and reproducibility but more sensitivity than IIF. Because it is simple, practical and suitable, IE method can replace IIF as the HIV serologic screening method suited to base application. Using HIV-1 immu- noenzymatic reagent kit in Ivory Coast obtained good results.

Key words Immunoenzymatic method
HIV Serologic detection

参考文献

1. McDougal JS, et al. Immunoassay for the detection of quantitation of infectious human retrovirus lymphadenopathy-associated virus (LAV). J Immunol Methods 1985; 76: 171~183.
 2. 曾毅, 等. 应用明胶颗粒凝集试验检测人免疫缺陷病病毒 (HIV-1) 抗体. 病毒学报 1988; 4(1): 65~68.
 3. 王必常, 等. 应用间接免疫荧光试验检测我国正常人和血友病病人血清中嗜T细胞Ⅱ型病毒抗体. 病毒学报 1985; 1(4): 391~392.
 4. 曾毅, 等. 我国首次从艾滋病病人分离到艾滋病病毒(HIV). 中华流行病学杂志 1988; 9(3): 135~138.
- (1989年10月21日收稿, 1989年11月3日修回)

家鼠型出血热病毒感染与人群发病的动态关系

梅志强¹ 李林森² 杨占奎² 李继善² 张法宽¹ 赵习芳¹ 张莉媛¹ 米尔英¹ (指导者)

监测作为流行病学的重要手段广泛用于流行性出血热(EHF)控制、预测、预报研究。为系统研究家鼠EHF病毒感染和人群发病的时间动态, 筛选、比较能更好地反映鼠群EHF病毒感染的强度指标, 我们于1986~1988年在山西侯马、洪洞地区进行了该项研究。

一、材料与方法: 根据家鼠型EHF流行期划分(梅志强, 等. 山西医药杂志1988; 17(5): 270)确定1、4、7、10月为调查时间, 选6个自然村为调查地点。3年每点调查10次。常规法捕鼠, 采集鼠肺和血标本。主要指标包括鼠密度、主要传染源密度、带病毒率、抗体阳性率、总感染率和带病毒指数(密度和带病毒率之积)。IFAT检测抗原与抗体。

二、结果: 居民室内仅捕到褐家鼠和小家鼠。总体来看家鼠密度冬春季高于夏秋季, 但差异不显著。调查期间鼠密度明显下降, 百分率趋势性检验差异非常显著($\chi^2=67.7$, $P<0.001$)。10次调查合计褐家鼠占76.05%(873/1148), 小家鼠占23.95%(275/1148)。褐家鼠EHF感染率冬春季增高、夏秋季降低, 差异高度显著($\chi^2_{\text{抗原}}=7.27$, $P<0.01$; $\chi^2_{\text{抗体}}=9.26$, $P<0.005$)。这种变化主要由褐家鼠引起。调查期间呈下降趋势($\chi^2=12.14$, $P<0.001$)。小家鼠虽占一定比重, 但感染率极低不起主导作用。褐家鼠感染率成鼠明显高于幼鼠而性别无显著性差异。582只褐家鼠同时进行抗原、抗体检测, 总感染率16.15%; 抗体检出率(14.26%)明显高于抗原检出率(7.04%)。抗原、抗体均表现出低强度、低滴度的偏态分布。30份双阳性标本中, 抗原强度与抗体滴度之间未发现明显关系。鼠密度、带病毒率、

带病毒指数分别与人群发病数按时间顺序动态配合, 带病毒指数这一指标与人群发病关系更为密切、一致。

三、讨论: 家鼠密度的季节性变化不明显, 表现出鼠和人关系密切的生态学特征。鼠密度下降除了和近年频繁灭鼠有关外, 还取决于鼠群自身生态学周期性变化。EHF发病数和褐家鼠带病毒率呈高度一致性。61份肺抗原阳性全部是成鼠, 血清抗体虽然成、幼鼠均检出阳性, 但成鼠远多于幼鼠。研究表明: 同一只鼠抗原阳性, 抗体也往往阳性, 说明鼠群EHF是带毒免疫。鼠群EHF病毒携带时间长, 增加了人群感染机会, 强化了发病。EHF监测中, 测抗体较测抗原方便、易定量, 对于了解动物间EHF感染状况, 发现新的疫源地有重要意义。但抗体阳性鼠不一定是传染源, 单纯检测抗体并不能反映鼠群传播EHF的频率或强度, 也不能用此来估计人群EHF感染程度, 作为传染源监测指标不如带病毒率。

常规的EHF鼠间疫情监测指标包括宿主动物密度、带病毒率等。但密度和带病毒率是难以分开考虑的, 密度很低时鼠间传播不易实现, 带病毒率也低。反之, 鼠未感染EHF病毒, 密度再高也不会传播EHF。如果把鼠密度和带病毒率综合起来考虑, 用带病毒指数权衡鼠密度和带病毒率对人群感染的影响可能更为可靠、敏感。

(临汾地区卫生防疫站郭崇诚、杨卫国、陈风叶、陈华梨、黄恩敏、李芳以及侯马、洪洞卫生防疫站的部分同志参加该工作, 谨致谢意)

1 山西省卫生防疫站

2 临汾地区卫生防疫站