207—212 414(2)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第8卷 第3期 中国病毒学 Vol. 8 No. 3
1993年9月 VIROLOGICA SINICA Sept. 1993

改良抗体捕获ELISA方法检测流行性出血热特异性IgE、IgA、IgG抗体的初步研究*

张东海

(山东省淄博第二卫生学校，淄博，255015)

R373.32

提 要 初步报道建立了一种检测流行性出血热(EHF)特异性IgE、IgA、IgG抗体的改良抗体捕获ELISA方法(EacELISA，AacELISA，GacELISA)。该法以抗人IgE、IgA或IgG单克隆抗体作包被抗体；酶标记物系两株组特异性较强的EHF·McAb(A_{25}，A_{25-1}株)；在实验中采用EHF病毒抗原与酶标记物混合后一次加入，而不是分别依次加入的方式，使操作步骤简化，实验时间缩短，又适当提高了试验敏感性。该法具有简便，特异性高，灵敏度较高(检测EHF·IgE，EHF·IgA>1∶100；EHF·IgG>1∶2560)，重复性较好(CV：EHF·IgE 2.51%，EHF·IgA 11.80%，EHF·IgG 10.85%)等优点。检测39份EHF病人血清，急性期病人(3～7病日)血清三种抗体的检出率分别为84.21%(16/19，EHF·IgG)，89.47%(17/19，EHF·IgA)和100%(19/19，EHF·IgG)；而发病3～6月后患者血清三种抗体检出率分别为10.00%(2/20)，45.00%(9/20)和100.00%。在急性期与恢复期病人之间，EHF·IgE和EHF·IgA两种抗体的检出率差异较显著(P<0.01)。70份其他人群血清三种抗体检出率均为阴性。

关键词 流行性出血热 IgE抗体 IgA抗体 IgG抗体 抗体捕获酶联试验

流行性出血热(EHF)发病机理较为复杂[1—3]，病变可累及全身多个系统器官[4,5]。有报道[6,7]EHF患者血清总IgE抗体水平较正常人明显升高，且与病程预后相关。已有应用PRIST[8]及IFA[9]法证实可检测到特异性EHF·IgE抗体的报告，但所需设备较昂贵，难以普及。我们发现急性期EHF病人血清中可测到EHF·IgA抗体，且检出率明显高于恢复期病人血清。应用ELISA法测定EHF·IgE和EHF·IgA抗体的方法似未见报道。本文依照抗体捕获ELISA原理，初步建立了一种较为简便易行，灵敏度较高，用于测定EHF·IgE及EHF·IgA抗体的方法(IgE Antibody Capture ELISA，简称"EacELISA"；IgA Antibody Caputure ELISA，简称"AacELISA")。为与前述两法及我们既往建立的MacELISA[10]方法配套，同时建立了检测EHF·IgG抗体的GacELISA方法，所得结果如下。

材料与方法

1 实验材料

1.1 抗人IgE·McAb，抗人IgG·McAb系中国医学科学院基础研究所提供。

1.2 抗人IgA·McAb系中国预防医学科学院病毒研究所提供。

1.3 鼠脑EHF病毒抗原(EHFV-Ag)及正常鼠脑抗原，由卫生部药品生物制品检定所提供。

* 本文于1992年3月16日收到，1993年1月14日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 HRP-EHF·McAb(A25-1,A35株)。鼠McAb腹水系病毒所提供。两者等量混合后纯化,标记辣根过氧化物酶(HRP,RZ=3)。

1.5 待测血清:来自当地病人及正常人群。

2 检测方法

本文方法基本同MacELISA[10],有几点说明:①包被抗体孵育条件为4℃,16h以上;②血清稀释(单孔法),测EHF·IgE,EHF·IgA均为1∶10,测EHF·IgG以1∶100稀释为宜;③EHFV·Ag与HRP-EHF·McAb均较其工作浓度提高一倍稀释后混合,实验中一次加入,4℃,16h以上;④需设置相同稀释度的阴、阳对照及空白孔。

结 果

1 实验条件的选择

1.1 包被抗体及酶标记物,抗原浓度的选择。经方阵滴定法,所用包被抗体较适工作浓度分别为:抗人IgE·McAb 1r/ml,抗人IgA及抗人IgG·McAb均为2r/ml(P/N≥10);酶标记物均以1∶2000稀释为宜(P/N≥10);EHFV·Ag仍以原定工作浓度(1∶80)较为适宜。

1.2 待检血清稀释度选择:各检测系统均分别选择3份阳性血清及1份阴性血清,血清均以1∶1,5,10,20,40,80,……作倍比稀释。结果表明测定EHF·IgE,EHF·IgA抗体均以1∶10稀释为宜;作滴度测定则可以从1∶5~10始作倍比稀释,但需设置相同稀释度的阴性血清对照,或设置自身血清对正常抗原对照孔,血清过浓或过稀均影响结果。测定EHF·IgG仍以1∶100稀释。

1.3 血清、抗原及酶标记物孵育条件的选择。结果见表1。

表1 血清、抗原、酶标记物不同孵育条件的选择

Tab.1 Choice of incubation conditions of sera, EHFV-Ag and HRP-EHFV-McAb

检测方法 Test Way		1	2	3	4△
血清 Sera		4℃,16h	37℃,2h	37℃,2h	37℃,2h
EHFV-Ag		37℃,2h	37℃,2h	4℃,16h	37℃,2h
HRP-EHFV-McAb					37℃,2h
P/N*	EHF-IgE	2.10	5.33	7.60	3.74
	EHF-IgA	2.31	3.34	7.28	3.40
	EHF-IgG	3.50	8.00	10.33	6.33

注:*当阴性对照OD≤0.05,均按0.05计算;0.05以上按实测值计算。

△常规方法,分三步作。

Note: * When OD490nm of negative sera was lower than 0.05, its was calculated with 0.05.

△ Routine method with 3 steps

2 特异性试验

2.1 应用不同试剂替代新建方法中某一试剂的测定结果。见表2。

2.2 免疫球蛋白特异性阻断试验。即在加样前,已包被McAb的各孔中加入各型纯化的人免疫球蛋白或PBS,以证实所设试验的特异性。均检测3份阳性血清、2份阴性血清。结果见表3。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 不同试剂替代所建方法中某一试剂的检测结果

Tab. 2 Replacing testing

检测方式 Test way	1	2	3	4	5	6
包被 Coating	5%BSA	McAb	McAb	McAb	McAb	McAb
加样 Adding Sample	sera	sera	PBS	sera	PBS	sera
抗原 Antigen	EHFV-Ag	EHFV-Ag	HBcAg	normal-Ag	EHFV-Ag	EHFV-Ag
酶结合物 Conjugates	EHF-McAb	抗-HBc	EHF-McAb	EHF-McAb	EHF-McAb	EHF-McAb
光密度 OD490nm						
EHF-IgE	(+)0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	1.08
	(−)0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.05
EHF—IgA	(+)0.07	0.03	—	0.01	—	0.68
	(−)0.04	0.00	—	0.02	—	0.04
EHF-IgG	(+)0.10	—	—	0.02	—	0.48
	(−)0.03	—	—	0.03	—	0.40

表3 纯化人免疫球蛋白特异性阻断效果的对比

Tab. 3 Block testing of immunoglobulin

免疫球蛋白 Ig	EHF-IgE		EHF-IgA		EHF-IgG	
	P/N($\bar{X}$/$\bar{X}$)	阻断率 PO(%)	P/N($\bar{X}$/$\bar{X}$)	阻断率 PO(%)	P/N($\bar{X}$/$\bar{X}$)	阻断率 PO(%)
IgE	1.4(0.07/0.04)	86.00	—	—	—	—
IgA	9.4(0.47/0.04)	6.00	1.6(0.08/0.03)	81.18	8.6(0.43/0.01)	10.40
IgM	8.4(0.42/0.03)	16.00	8.2(0.41/0.02)	3.53	7.8(0.39/0.02)	18.75
IgG	8.8(0.44/0.05)	12.00	8.8(0.44/0.04)	−0.05	1.4(0.07/0.04)	85.40
PBS	10.0(0.50/0.05)	—	8.5(0.51/0.06)	—	9.6(0.48/0.02)	—

注:计算P/N值,同表1注。

(/)数字系3份阳性血清OD490nm$\bar{X}$值/2份阴性血清OD490nm$\bar{X}$值。

Note: 1. P/N as Tab. 1. note.

2. ($\bar{X}$/$\bar{X}$): three positive sera/two normal sera (OD490nm$\bar{X}$/OD490nm$\bar{X}$).

3. PO*: Percentage of obstruction.

2.3 抗原吸收试验。将待检血清与工作滴度的EHFV-Ag等量混合后,经37℃,15分钟,取离心上清液检测,并与未处理前血清检测结果对比。结果见表4。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4 抗原特异性吸收试验结果对比

Tab. 4 Test of antigen obstruction

血清 Sera	未处理血清 Before obstruction	处理后血清 After obstruction	阻断率 Percentage of obstruction(%)
EHF-IgE	1.08	0.07	93.52%
EHF-IgA	0.68	0.16	76.47%
EHF-IgG	0.48	0.11	77.08%

3 重复性测定。各检测系统均分别重复测定1份阳性血清。EacELISA(n=5)批间误差变异系数(CV)为2.51%;AacELISA(n=6)11.80%;GacELISA(n=6)为10.85%。

4 灵敏度测定。用四种方法同时检测5份EHF病人血清,结果见表5。

5 各种血清标本检测结果。共测定109份血清标本。结果见表6。

6 临界值的选择。结果见表7。

表5 四种方法检测5份EHF抗体阳性血清滴度对比

Tab. 5 Titer comparison between EHF antibody positive sera detected by 4 methods

血清号 Sera No.	EacELISA EHF-IgE	AacELISA EHF-IgA	GacELISA EHF-IgG	IFAT EHF-IgG	血清采集病日 Time of sera collecting
1	1:100	1:100	1:2560	1:80	6
2	1:100	1:100	1:6400	1:320	7
3	1:100	1:100	1:2560	1:20	6
4	1:100	1:100	1:2560	1:80	7
5	1:100	1:100	—	1:20	6

表6 109份不同来源血清检测结果

Tab. 6 Results of testing 109 sera

血清 Sera	麻疹病人 (2) Measles			肝炎病人 (3) Hepatitis			健康人 (65) Health human			流行性出血热病人 EHF-Patients 3—7病日(19) 3—7 days after onset			流行性出血热病人 EHF-Patients 3—6月后(20) 3—6 months after onset		
	E	A	G	E	A	G	E	A	G	E	A	G	E	A	G
阳性 Positive	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	17	19	2	9	20
检出率 Detecting Percentage(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86.21	89.47	100.00	10.0	45.0	100.00

E=EacELISA,A=AacELISA,G=GacELISA. ()内数字系检测血清份数。Numbers of detecting sera.

维普资讯 http://www.cqvip.com

表7 临界值的选择及结果

Tab.7 Choice of critical value

项目 Methods	血清份数 Normal sare numbers	光密度范围 OD490nm	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}+3SD$	阳性判断值(P/N) Judgement of positive
EHF-IgE	65	0.00—0.08	0.030	0.020	0.10	P/N≥2.1
EHF-IgC	65	0.01—0.10	0.040	0.020	0.10	P/N≥2.1
EHF-IgG	65	0.00—0.10	0.030	0.020	0.10	P/N≥2.1

注: 1.本表结果均系计算机结果;2.计算P/N值,同表1注的方法。

Note: 1.These results come from computer. 2.P/N is the same Tab.1 note.

讨 论

初步结果表明,这种改良的捕获ELISA法用于检测EHF·IgE,EHF·IgA,EHF·IgG抗体是可行的。

影响捕获ELISA实验时间长短的主要因素为抗原孵育条件[11]。表1结果提示,加入抗原与酶结合物后,孵育条件均以4℃,16h优于37℃,2h,尽管不影响定性结果。我们认为,抗原孵育条件的选择,一方面取决于抗原本身;另一方面,可根据研究应用目的(如作机理研究或临床应用)来确定。

由于正常人血清总IgE、IgA,特别是IgE抗体水平较低,故选择适当的血清稀释度十分必要,特别是作单孔测定,血清稀释过高过低均可能影响OD值水平。我们初步选择1∶10稀释血清测定EHF·IgE,EHF·IgA抗体。参照其他检测血清特异性IgG抗体的方法(如抗-HBc),选择1∶100为测定EHF·IgG血清稀释浓度。

EHF可累及人体多个器官[4,5]。乙肝病人多种体液可检出HBV感染标志,故设想EHF病人测定特异性IgA抗体具有积极意义。EHF发病机理与I型变态反应及IgE亦相关[3,6,7]。因此,本文首次报道的用捕获ELISA法检测EHF·IgE、EHF·IgA抗体方法,有可能为EHF发病机理、诊断及治疗等方面的研究提供一种新的选择,但尚待进一步探索。由于该方法只是初步建立,因此选择EHF·IgG抗体阳性的血清作为待检血清,以企图证实在EHF病人血清中确可检出EHF·IgE、EHF·IgA抗体。而建立GacELISA的目的,是为在相同试制浓度及试验条件下同步对比检测同一病人的三种特异性抗体,了解其间滴度差异、相互关系等,同时,可使操作过程进一步简化。但GacELISA是否优于其他ELISA法,尚须进一步对比研究。

感谢中国药品生物制品检定所俞永新教授,基础所吴安然教授,邹明发技师,病毒所陈伯权教授,山东省卫生防疫站谢慰杖主任,淄博市传染病医院王焕章主任,淄博市防疫站王育芜主任的热情指导、支持与帮助。

参 考 文 献

1 金再望,等.流行性出血热免疫功能检查及意义.中华内科杂志,1981;20:474

2 王嘉端,等.流行性出血热发病机理的研究.上海医学,1981;(4):5

3 王文余,等.特异性IgE在流行性出血热发病机理中的作用.中华内科杂志,1986;25:28

4 徐晓,等.流行性出血热病毒在一例胎儿体内繁殖部位的研究.中华传染病杂志,1990;(8):150

5 杨为松,等.流行性出血热病毒抗原在感染胎儿脏器中分布的研究.中华传染病杂志,1988;(6):128

6 王立庄,等.流行性出血热患者血浆IgE及FDP裂解产物的检测.中华传染病杂志,1987;5(2):92

维普资讯 http://www.cqvip.com

7 王文余，等.流行性出血热免疫学 发病机理探讨—病人血清中 IgE 水平动力学研究.哈尔滨医科大学学报，1983；17(2)；1
8 吴常有，等.应用 PRIST 法检测流行性出血热病人血清中特异性 IgE. 哈尔滨医科大学学报，1984；18(3)；38
9 田景光，等.用 IFA 法检测 EHF 早期病人血清特异性 IgE. 哈尔滨医科大学学报，1984；18(3)；31
10 张东海，等.检测 EHF · IgM 抗体捕获 ELISA 的某些改进.实验和临床病毒学杂志，1989；(3)；75
11 郭可喜.病毒 特异性 IgM 抗体的检测及在病毒病诊断中的应用.实验和临床病毒学杂志，1988；(2)；79

Preliminary Study on the Improved Antibody Capture ELISA for Detection of EHF Specific IgE, IgA and IgG Antibodies

Zhang Donghai

(*Zibo Second Health School, Zibo, Shandong*, 255015)

In this study, an improved antibody capture ELISA method was established for the detection of EHF specific IgE, IgA and IgG antibodies. The anti-human IgE, IgA and IgG monoclonal antibodies were used as coated antibodies and Hantaan virus group specific McAb (A35, A25-1) were used as HRP conjugates. In order to simplify the procedure, shorter test time and promote the sensitivity, the EHF virus antigen and HRP-McAb were mixed up then added simultaneously.

Thirty-nine EHF patient's sera were tested by this method, the results showed that the positive rates of IgE, IgA and IgG in 19 actue patient's sera (3—7 days after illness) were 84.21%(16/19), 89.47%(17/19) and 100%(19/19) and in the 20 convalescent sera (3—6 months after onset) were 10%(2/20), 45%(9/20) and 100%. The positive rates of IgE and IgA between acute and convalescent sera were significant differences ($P<0.01$). The 70 serum specimens from other patients (measles and hepatitis) and healthy persons were all negative.

The developed method showed simple, highly specific and sensitive as well as reproducible (CV: IgE 2.51%, IgA 11.88% and IgG 10.58%) for the detection of EHF IgE, IgA and IgG.

Key words: Epidemic hemorrhagic fever (EHF) IgE IgA IgG antibody Improved antibody capture ELISA