

369-372

6868(14)

检测肾综合征出血热抗原特异性循环 免疫复合物 ELISA 方法的建立

张东海 孙 辉 高峰

(山东省淄博第二卫生学校, 淄博 255015)

关键词 肾综合征出血热病毒, 循环免疫复合物, 特异性, ELISA

R512.803
R373.32

肾综合征出血热(HFRS)发病机理有多种学说, 其中在体液免疫学说中研究较多的主要是 IgG、IgM 及 IgE 抗体及其免疫复合物^[1-3]。为进一步研究肾综合征出血热患者免疫状况, 我们在建立了检测 HFRS-IgA、IgE、IgG、IgM 抗体方法的基础上^[4,5], 建立了检测 HFRS 抗原特异性循环免疫复合物(CIC)的 ELISA 方法。鉴于检测 IgE、IgD 型特异性免疫复合物的方法已有报告^[6], 故本文仅报告检测 IgG、IgM、IgA 型免疫复合物的方法。

材料与方 法

1 材 料

- 1.1 兔抗 HFRSV 多克隆抗体(兔抗 HFRS-Ab), 卫生部药品生物制品检定所俞永新教授惠赠。
- 1.2 HRP-抗人 IgG、IgM、IgA-McAb 及基 89-1(IgS 工作标准), 中国医学科学院基础研究所提供。
- 1.3 鼠抗 HFRSV-McAb: A25-1 系抗 HFRSV 核蛋白型, A19 系抗 HFRSV 糖蛋白 G2 型抗体, 均由中国预防医学科学院病毒学研究所陈伯权教授惠赠。
- 1.4 待测血清, 来自当地病人及正常人群。

2 检测方法——夹心 ELISA

用适当稀释度的兔抗 HFRS-Ab 包被, 4℃, 18 h 以上→1% 牛血清白蛋白 PBST 封闭(亦为稀释液), 37℃, 2 h, 用 pH7.4 PBST 洗×4→加 1:20 稀释的待检血清及对照, 4℃, 18 h, 洗×4→加入适当稀释度的 HRP-抗人 IgS, 37℃, 2.5 h(或 4℃, 18 h), 洗×4→加 OPD→终止反应。

结果与讨论

结果见表 1~5。

本研究依据夹心 ELISA 原理建立的直接检测 HFRS 抗原特异性 IgG、IgM、IgA 型 CIC 方法, 是建立在抗原抗体特异性反应的基础之上, 因此受影响因素较少。据替代试验、阻断试验(包括 PEG 沉淀试验)、重复性试验、灵敏度试验及临床标本检测结果, 所建方法特异性、重复性、灵敏度均较高。

本文于 1996 年 3 月 4 日收到, 4 月 24 日修回

• 山东省卫生厅科研基金资助课题

表1 不同试剂替代试验

Tab. 1 Replacing testing

方式 Test way	1	2	3	4	5	6
包被物 Coating	PBST	RA-HFES	RA-HFRS	RA-HFRS	RA-HFRS	RA-HFRS
加样 Adding sample	P-Sera	P-Sera	P-Sera	N-Sera	PBST	P-Sera
HRP-conjugates	Anti-IgS	Anti-HBc	PBST	Anti-IgS	Anti-IgS	Anti-IgS
IgG	0.08	0.06	0.04	0.07	0.03	0.57
CIC-OD _{490nm} IgM	0.07	0.10	0.10	0.08	0.07	0.78
IgA	0.09	0.08	0.06	0.03	0.07	0.46

Note: * P-sera is patient sera; N-sera is normal sera.

表2 不同试剂阻断不同步骤试验

Tab. 2 Block testing

No. 阻断物 Block reagent	IgG-CIC		IgM-CIC		IgA-CIC	
	Actue	Convalescence	Actue	Convalescence	Actue	Convalescence
1 PEG-upper sera	-27.48	-11.00	-28.36	-19.75	-18.50	+5.51
2 PGE-sediment	+43.48	+46.26	+66.31	+116.33	+13.78	+24.74
3 RA-HFRS-Ab	-23.84	-14.96	-22.39	-41.98	-34.40	-17.42
4 A19McAb	-35.90	-13.19	-44.83	-17.91	-46.23	-26.93
5 A25-1McAb	-19.86	-12.26	-20.35	-32.65	-42.28	-20.00
6 MA-IgM-McAb	-2.33	+9.48	-36.21	-25.00	-23.76	+11.67
7 MA-IgD-McAb	-12.52	+7.63	-17.85	-9.12	-11.81	-26.03
8 MA-IgA-McAb	+5.05	+14.80	-32.54	-8.93	-31.68	-31.66
9 MA-IgE-McAb	-25.02	-24.34	-30.47	-4.95	-29.12	-16.93
10 MA-IgG-McAb	-26.28	-27.39	-26.91	-17.31	-0.45	-16.54
11 MA-IgM+G-McAb	-39.02	-28.70	-33.85	-34.69	-12.54	-21.54
12 MA-IgM+A-McAb	-14.00	+17.12	-31.19	-36.59	-43.87	-41.16
13 MA-IgA+G-McAb	-29.05	-32.77	-24.58	+13.93	-42.66	-28.72
14 MA-IgM+G+A-McAb	-35.53	-32.45	-36.57	-34.07	-49.68	-39.74
15 (89-1)Human IgS	-88.26	-80.15	-89.31	-84.13	-90.11	-92.78

注: No. 1~14 均为用工作滴度阻断物与 1:20 稀释待测血清 37℃ 作用 30 min 后, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清加样。

No. 15 为工作滴度 HRP-抗人 IgS 与相同蛋白量基 89-1 作用 37℃, 30 min 后, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清加样。

Note: No. 1~14 Reagent of obstruction (Working titer) adds sera (1:20), 37℃, 30 min, 3000 r/min, 15 min.

No. 15 HRP-MAH-IgS (Working titer) adds human IgS (89-1), 37℃, 30 min, 3000 r/min, 15 min

表3 三种免疫复合物批内批间重复性测定(变异系数)

Tab. 3 Reproducible testing (CV)

血清号 Sera No.	IgG-CIC		IgM-CIC		IgA-CIC	
	批内 Batch (n=7)	批间 Between (n=8)	批内 Batch (n=7)	批间 Between (n=8)	批内 Batch (n=7)	批间 Between (n=8)
混1 Mixed sera 1	12.07%	15.98%	6.29%	13.16%	12.89%	16.22%
混2 Mixed sera 2	10.22%		5.31%		9.47%	

表4 三种特异性免疫复合物灵敏度测定及与特异性抗体的比较

Tab 4 Titer comparison between HFRS antibody and specific CIC

血清号 Sera No	病日 Days after illness	特异性抗体(捕获法) Specific antibody			特异性免疫复合物 Antigen specific CIC		
		IgG *	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
47-1	8	800	25600	320	640	80	80
47-2	21	3200	25600	640	640	20	40
48-1	5	100	25600	640	80	80	40
48-2	12	1600	25600	1280	80	40	40
49-1	8	400	12800	640	80	80	20
49-2	25	3200	25600	1280	80	40	20
32-1	6	400	12800	320	20	20	80
32-2	11	3200	51200	640	40	640	640

注: * 特异性 IgG 抗体滴度仅检测到 1:3200

Note: The titer of HFRS - IgG antibody was only tested to 1:3200

表5 191份不同来源血清标本检验结果(阳性率%)

Tab. 5 Results of testing 191 sera (positive rate)

血清来源 Sera	血清数 Sera samples	特异性抗体 Specific antibody			特异性免疫复合物 Antigen specific CIC		
		IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
HFRS(1~8 days after illness)	73	84.93	100.00	95.89	68.49	69.86	56.16
HFRS(10~28 days after illness)	54	100.00	100.00	100.00	90.74	85.19	75.93
HFRS(1~3 years after illness)	28	100.00	46.43	89.29	0.00	0.00	0.00
Hepatitis B patient	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Normal sera	26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

初建方法时曾采用 McAb 作包被抗体,但结果不稳定,可能与抗体的结合位点不同或较少有关,故转而采用兔抗 HFRS - Ab。但也可能与不同病期免疫复合物中结合的 HFRSV 蛋白性质不同相关。从阻断试验结果(No. 3~5)看, A19 阻断率在 3 型免疫复合物中均以急性期高于恢复期; A25 - 1 阻断率差异在 IgG 型不明显, 在 IgM 型恢复期高于急性期, 在 IgA 型则仍是急性期高于恢复期。既提示了上述差异, 又提示了不同抗体清除 HFRS 病毒的差异性, 似乎支持特异性 IgA 抗体具有保护性的可能。上述 3 型抗原特异性免疫复合物及 IgE 型抗原特异性免疫复合物水平与临床之间的关系研究正在进行中。

从检测临床标本的结果看, 免疫复合物在病后血清标本中均未检出, 而在病程血清中检出率达 56.16~90.74%, 进一步提示了免疫复合物在 HFRS 发病中的地位。但若作为临床诊断学指标, 特异性免疫复合物检测似乎仍然难以替代特异性抗体的作用。

参 考 文 献

- 1 白雪帆, 杨为松. 流行性出血热发病机理研究的若干进展. 中华内科杂志, 1993, 32(11): 773

- 2 Groen. J, Gerding. M, Jordens. JG *et al.* Class and Subclass Distribution of Hantavirus - specific Serum Antibodies at Diferent Times After the Onset of Nephropathia Epidemica. *J Med Virol*, 1994, 43(1):39
- 3 张风蕴, 赵育莹, 王文余等. 流行性出血热病人特异性循环免疫复合物的检测. *中国免疫学杂志*, 1995, 11:63
- 4 张东海. 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. *中国病毒学*, 1993, 8(3):207
- 5 张东海, 王焕章, 宋丽娟等. 检测 EHF - IgM 抗体捕获 ELISA 的某些改进. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1989, 3(3):75
- 6 杨东亮, 汪由昆, 李琳等. 流行性出血热特异性 IgE, IgD 型循环免疫复合物检测及其意义. *中华微生物和免疫学杂志*, 1993, 13:137

Study on ELISA Method for Detecting Specific Circulating Immune Complexes in Sera of Patients with HFRS

Zhang Donghai Sun Hui Gao Feng

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

A new ELISA method was established for detecting specific IgG, IgM, IgA type circulating immune complexes (CIC) in sera of patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS). The rabbit anti-HFRS virus antibody was used as coated antibody and anti-human IgG, IgM, IgA monoclonal antibodies were used as HRP conjugates. The results showed that the detected rates of specific IgG, IgM, IgA types CIC in 73 acute phases (1~8 days after illness) were 69.49%, 69.86% and 56.16% respectively, in 54 convalescence phases (10~28 days after illness) were 90.74%, 85.19% and 75.93% respectively, 28 sera in 1~3 years after illness were all 0.00%, 36 serum specimens from normal and hepatitis B patients were all negative. The developed method showed highl specificity and sensitirity as well as reproducibility (CV: IgG 12.07%, IgM 6.29% and IgA 12.89%) for the detection of HFRS specific CIC.

Key words Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Specific Circulating Immune Complexes (CIC), ELISA