

⑥

123-128

R981

## ToRCH 系列酶标诊断试剂的研制

龚镇奎 黄鹤<sup>✓</sup> 骆林 肖红雨 龚睿\*

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉 430079)

**摘要** 报道了用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 和抗人 IgM(u 链)单克隆抗体作第二抗体, 用自己培养、纯化的弓形体(To)、风疹病毒(RuV)、巨细胞病毒(CMV)和单纯疱疹病毒(HSV<sub>1,2</sub>)的虫体和病毒抗原包被酶标板, 研制出检测 ToRCH 系列的特异性 IgG 和 IgM 的间接 ELISA 试剂。质量检定结果表明, 该试剂特异性强、本底低, 能有效消除 RF 因子等干扰因素的影响; 灵敏度达 1:160~640; 精密性好, 变异系数(C.V)在 1.4%~9.0%; 试剂稳定, 37℃ 存放 4 d, 各项指标的变化率不超过 15%。

**关键词** ToRCH 感染, 间接 ELISA, 诊断试剂

ToRCH 是 4 种人类致病微生物英文名称字头的组合: To 代表弓形体(*Toxoplasma gondii*, Toxo); R 代表风疹病毒(Rubella Virus, RuV); C 代表巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV); H 代表单纯性疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)。这 4 种病原微生物除容易感染人群引起多种疾病外, 还有两个共同特征: 其一是孕妇由于内分泌的改变和免疫力下降易发生原发性感染, 既往感染的孕妇体内潜伏的病原体也易被激活而出现复发性感染, 妊娠期感染不仅危害母体, 往往可引起宫内感染而导致流产、早产、死胎。胎儿受感后, 可能引起发育迟缓和先天畸形, 造成新生儿智力障碍、各种瘫痪、失明、耳聋、失聪弱智等严重后果。其二是一般成人感染后症状较轻或不出现明显症状, 不易被察觉而忽视。因此 ToRCH 感染的早期快速诊断对防止先天畸形、提高出生人口素质、优生优育有极其重要意义。目前关于 ToRCH 系列体外诊断试剂国内外虽上市, 但国外产品价格昂贵, 国内厂商大都是引进国外主要原料组装, 其质量尚不尽人意。我们全部用自己生产的原材料、采用间接 ELISA 方法研制了 ToRCH IgG、IgM 检测试剂, 并对其产品质量进行了全面鉴定, 取得了令人满意的结果。

## 1 材料与方方法

1.1 毒(虫)种 本试验所用的 Toxo 虫种、RuV、CMV 和 HSV 毒种、靶细胞(动物)来源见表 1。

1.2 抗人 IgG 和抗人 IgM(u 链)单克隆抗体 由本所制备, 方法见资料[1]。

1.3 弓形虫虫体抗原的制备 将冻存的弓形体虫种迅速置 36~38℃ 水浴融化, 用 PBS 洗涤离心去上清, 沉下的虫体用 PBS 悬浮后注入小鼠腹腔复苏、增殖。收集腹水, 离心, 用 PBS 洗涤 3 次后, 用 0.25% 胰酶消化 10~15 min, 再用 PBS 洗 3 次, 再冻融 3 次后超声破碎, 离心取上清即为包被用虫体抗原。测定蛋白含量及工

收稿日期: 1998-04-17, 修回日期: 1998-08-10

本课题为湖北省科委 95 攻关项目

\* 武汉大学生命科学院实习生

作浓度后加 50% 甘油, -20℃ 保存备用。

**1.4 病毒抗原的制备** 将 RuV、CMV、HSV-1 和 HSV-2 分别接种到相应的敏感细胞上培养, 待细胞病变(CPE) 达 III~III 后, 收集培养液和/或病变细胞, 采用相应措施对病毒抗原进行灭活处理, 冻融 3 次, 超声破碎, 差速离心和甘油梯度离心纯化病毒抗原。测定蛋白含量和包被工作浓度后, 加 50% 甘油 -20℃ 保存备用。

**1.5 酶标抗体的制备** 本试验中所用酶标抗体(二抗)是采用抗人 IgG 单克隆抗体和三株抗不

同位点的抗人 IgM( $\mu$  链)单克隆抗体进行纯化、标记的。单克隆抗体杂交瘤细胞株为本所研制保存的<sup>[1]</sup>, 按常规方法制备腹水抗体, 用辛酸-硫酸铵沉淀法<sup>[2]</sup>纯化, 采用辣根过氧化物酶(RZ $\geq$ 3.0, Sigma 产品)过碘酸氧化法标记<sup>[3]</sup>。

**1.6 试剂盒的制备** 检测抗 ToRCH 特异性 IgG 和 IgM 的试剂盒均采用间接 ELISA 方法制备。分别用 4 种纯化的抗原按常规<sup>[4]</sup>制备预包被板。在试剂盒中除配有已稀释到工作浓度的相应的底物溶液(TMB 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 阳性、阴性、临界值血清(弱阳性血清, 弱阳性血清的定值是在普查了大量正常人阴性血清的基础上, 按 Cutoff 值 = 2.1 × 阴性平均值 + 2SD 来确定)外, 在检测 IgG 的试剂盒中还配有能消除内源性过氧化物酶等干扰因子的血清样品稀释液, 在检测 IgM 的试剂盒中配有能消除 IgG、类风湿因子(RF)等干扰因子影响的血清样品稀释液。试剂盒中所有试液均用滴瓶分装, 每滴 50  $\mu$ L, 直接使用。

**1.7 血清样品的检测** 按间接 ELISA 常规操作程序进行, 即先滴加 2 滴(100  $\mu$ L)血清样品稀释液到预包被板的孔中, 再加血清样品 1  $\mu$ L(或将血清先用 PBS 稀释 10 倍后, 再取 10  $\mu$ L 加入孔中), 37℃ 保温 30 min, 洗板 4~5 次后, 加入酶结合物 2 滴(100  $\mu$ L), 37℃ 保温 30 min, 洗板、拍干, 加底物 A(TMB)和底物 B(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)各一滴(50  $\mu$ L), 37℃ 显色 15 min, 观测结果。结果判断: ①目测: 显色深于弱阳性对照者为阳性, 否则为阴性。②机测: 先用 1 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止, 用酶标检测仪测定各孔 OD<sub>450</sub> 值。OD<sub>450</sub> 值 > 2.1 × 阴性对照 OD 值(阴性对照 OD 值小于 0.1, 按 0.1 计)者判为阳性, 否则为阴性。

#### 1.8 试剂盒的质量检定

**1.8.1 取相应的阳性和阴性血清**(RuV IgM 和 IgG 阳性血清来自江陵某中学一次风疹流行时的急性期和恢复期血清, CMV 阳性血清由同济医大小儿科和武汉市儿童医院提供, 其它阳性血清及阴性血清是从普查中筛选的)各 10 份, 分别用相应的试剂盒进行检测, 应不出现假阴性和假阳性。

**1.8.2 阻断试验** 将阳性血清(ELISA 检测 OD 大 0.4 左右)与相应的抗原(2 mg/mL)等量混合, 37℃ 中和 30 min, 然后同时测定中和前和中和后的血清, 阻断率应 > 50%。

$$\text{阻断率} = \frac{\text{中和前 OD 值} - \text{中和后 OD 值}}{\text{中和前 OD 值}} \cdot 100\%$$

**1.8.3 对 IgM 检测试剂加试了巯基乙醇破坏试验和 RF 因子影响试验。**

**1.9 灵敏度** 将各种 ToRCH 阳性血清用相应的血清样品稀释液从 1:10 开始作倍比稀释, 在相应的试剂盒中检测, 以最高稀释孔为阳性的稀释倍数定为灵敏度。

**1.10 精密性** 用一份阳性血清同时做 10 孔, 计算其变异系数(C.V.)。

**1.11 稳定性** 将试剂盒分别置 4℃ 和 37℃ 存放 4 d, 然后同步检测同一份阳性血清及试剂盒中阳参、弱阳参和阴参血清, 按下述公式计算变化率(%)。

$$\text{变化率}(\%) = \frac{4\text{℃ 存放的试剂盒测出的 OD 值} - 37\text{℃ 存放的试剂盒测出的 OD 值}}{4\text{℃ 存放的试剂盒测出的 OD 值}} \cdot 100\%$$

表 1 毒(虫)种及靶细胞(动物)

Table 1 Virus (protozoon) and target cells (animals)

病原体 Pathogens	毒(虫)种 Virus (Protoozoon)	靶细胞(动物) Target cells (Animals)
Toxo	Gondii	Kunming mouse
RubV	Gos	BHK21
CMV	AD169	HL
HSV-1	SM40	HeLa
HSV-2	333	HeLa

## 2 结果

### 2.1 试剂的特异性检定

随机挑选 ToRCH IgG、IgM 阳性和阴性血清样品各 10 份, 分别用相应的试剂盒检测, 结果见表 2。没有出现一份假阳性和假阴性。阴性血清样品的 OD 值均在 0.10 以下(用国营华东电子管厂制造的 DG5030 型酶联免疫检测仪检测, 下同)。

表 2 特异性检定结果

Table 2 The results of specificity assay

试剂盒 Kit	血清 Sera	血清样品 Serum sample										阳参 P C	弱阳参 W P C	阴参 N C
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Toxo	IgM 阳性血清(P.S)	0.565	0.648	0.727	0.731	0.776	0.829	0.856	0.572	0.437	0.609	0.784	0.268	0.025
	IgM 阴性血清(N.S)	0.013	0.073	0.066	0.009	0.004	0.016	0.000	0.084	0.015	0.017			
	IgG 阳性血清(P.S)	0.744	0.733	0.365	0.482	0.523	0.723	0.610	0.480	0.554	0.688	0.681	0.192	0.004
	IgG 阴性血清(N.S)	0.007	0.012	0.024	0.012	0.042	0.065	0.071	0.020	0.071	0.082			
RuV	IgM 阳性血清(P.S)	0.572	0.472	0.646	0.751	0.501	0.525	0.448	0.678	0.499	0.631	0.672	0.246	0.030
	IgM 阴性血清(N.S)	0.070	0.065	0.055	0.007	0.060	0.085	0.013	0.000	0.002	0.006			
	IgG 阳性血清(P.S)	0.734	0.732	0.654	0.691	0.521	0.454	0.385	0.710	0.456	0.484	0.700	0.202	0.009
	IgG 阴性血清(N.S)	0.080	0.060	0.002	0.048	0.009	0.052	0.061	0.074	0.056	0.003			
CMV	IgM 阳性血清(P.S)	0.508	0.700	0.575	0.634	0.617	0.705	0.589	0.665	0.585	0.647	0.726	0.228	0.040
	IgM 阴性血清(N.S)	0.034	0.044	0.000	0.001	0.051	0.054	0.000	0.000	0.027	0.043			
	IgG 阳性血清(P.S)	0.555	0.479	0.461	0.592	0.610	0.702	0.385	0.748	0.309	0.568	0.737	0.199	0.019
	IgG 阴性血清(N.S)	0.078	0.100	0.066	0.061	0.009	0.080	0.041	0.026	0.055	0.058			
HSV	IgM 阳性血清(P.S)	0.733	0.768	0.754	0.479	0.657	0.375	0.751	0.756	0.747	0.568	0.653	0.214	0.005
	IgM 阴性血清(N.S)	0.060	0.000	0.027	0.002	0.023	0.000	0.015	0.000	0.028	0.000			
	IgG 阳性血清(P.S)	0.658	0.610	0.574	0.585	0.810	0.350	0.425	0.708	0.445	0.656	0.700	0.172	0.005
	IgG 阴性血清(N.S)	0.048	0.079	0.075	0.004	0.036	0.000	0.062	0.080	0.006	0.053			

Note: P.S is positive serum; N.S is negative serum; P.C is positive control; W.P.C is weak positive control; N.C is negative control.

巯基乙醇破坏试验: 由于巯基乙醇能将-S-S-键还原成-SH, 破坏了 IgM 结构, 从而使其失去活性。取 9 份风疹患者急性期血清各 0.1 mL, 用 PBS 稀释 10 倍后, 分成试验组和对照组, 试验组中加入等量 0.01 mol/L 2-巯基乙醇, 对照组中加入等量 PBS, 同时置 37 °C 作用 1 h, 然后用 RuV IgM 试剂盒检测, 对照组呈阳性反应, 试验组均转阴。结果见表 3。

表 3 9 份 RuV IgM 阳性血清 2-巯基乙醇处理前后的测定结果

Table 3 The results of 9 anti-RuV IgM positive sera assay before and after treatment with 2-mercapto ethanol

血清号 No. of serum	5~1	7~1	9~1	16~1	20~1	22~1	24~1	26~1	87
处理前 Before treatment	+	+	+	++	++	+	++	+	++
处理后 After treatment	-	-	-	-	-	-	-	-	-

阻断试验: 取 ToRCH IgM 阳性血清各一份与相应的抗原混合, 37 °C 中和 30 min, 然后同时用相应的试剂盒检测中和前和中和后的 OD 值。结果见表 4。

RF 因子影响试验: 取 RF 阳性血清 5 份(其中强阳性 2 份, 中等强度阳性 2 份, 弱阳性 1

份)。用 Toxo IgM 试剂盒检测均为 IgM 阴性。随机取 ToRCH IgM 检测为阳性血清和阴性的血清各 10 份进行 RF 因子检测,在阴、阳血清中都检出了一定份数的 RF 因子阳性的血清(表 5)。

表 4 阻断试验结果

Table 4 The results of block test

试剂盒 Kit	中和前 Before neutralization	中和后 After neutralization	阻断率(%) Block rate
Toxo	0.330	0.145	56.1
RubV	0.433	0.041	90.5
CMV	0.490	0.130	76.3
HSV	0.409	0.111	72.9

表 5 RF 因子检测结果

Table 5 The results of RF factor assay

ToRCH IgM 阳性血清编号 No. of ToRCH IgM positive sera	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RF 胶乳凝集 RF latex agglutination	-	++	-	-	-	+++	±	+++	-	-
ToRCH IgM 阴性血清编号 No. of ToRCH IgM negative sera	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RF 胶乳凝集 RF latex agglutination	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-

## 2.2 灵敏度检测

结果见表 6。OD<sub>450</sub> ≥ 0.21 判为阳性终点。

表 6 灵敏度检测结果

Table 6 The results of sensitivity test

试剂盒 kit	阳性血清稀释度 Positive serum dilution									P.C	W.P.C	N.C	灵敏度 Sensitivity
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280				
Toxo IgG	0.744	0.637	0.545	0.423	0.352	0.246	0.138	0.041	0.014	0.681	0.192	0.031	1:160
	IgM	0.776	0.685	0.571	0.462	0.370	0.269	0.146	0.043	0.021	0.768	0.206	0.045
RubV IgG	0.824	0.812	0.798	0.741	0.587	0.392	0.303	0.175	0.108	0.767	0.215	0.027	1:320
	IgM	0.824	0.829	0.779	0.763	0.666	0.518	0.338	0.225	0.015	0.671	0.201	0.035
CMV IgG	0.658	0.642	0.501	0.410	0.342	0.256	0.185	0.150	0.085	0.637	0.199	0.050	1:160
	IgM	0.588	0.536	0.442	0.385	0.309	0.264	0.201	0.148	0.079	0.624	0.228	0.040
HSV IgG	0.547	0.517	0.431	0.376	0.307	0.234	0.176	0.131	0.064	0.603	0.225	0.045	1:160
	IgM	0.785	0.678	0.567	0.457	0.368	0.255	0.142	0.027	0.010	0.593	0.210	0.065

Note, P.C is positive control; W.P.C is weak positive control; N.C is negative control.

## 2.3 稳定性试验

试剂盒置 37℃ 存放 4 d 后,与 4℃ 存放的试剂盒相比,各种参数的变化率均未超过 +15%,结果见表 7。

## 2.4 精密性试验

同一份阳性血清用相应的试剂盒连续测 10 孔,根据各孔 OD 值,计算变异系数(C.V)结果见表 8。

表 7 ToRCH 试剂盒稳定性试验结果

Table 7 The results of ToRCH kit stability test

试剂盒 Kit	测试血清 Sera tested	存放 4 天		变化率 Variation(%)
		4 ℃	37 ℃	
Toxo	阳性血清样品(P.S) 阳 参(P.C)	0.320	0.345	+7.8
	弱阳参(W.P.C)	0.616	0.652	+5.8
	阴 参(N.C)	0.255	0.223	-12.5
		0.035 <sup>*</sup>	0.030	0
RuV	阳性血清样品(P.S)	0.404	0.395	-2.2
	阳 参(P.C)	0.636	0.541	-14.9
	弱阳参(W.P.C)	0.237	0.231	-2.5
	阴 参(N.C)	0.000	0.004	0
CMV	阳性血清样品(P.S)	0.315	0.324	+2.9
	阳 参(P.C)	0.524	0.462	-11.8
	弱阳参(W.P.C)	0.171	0.175	+2.3
	阴 参(N.C)	0.034	0.026	0
HSV	阳性血清样品(P.S)	0.362	0.345	-4.7
	阳 参(P.C)	0.628	0.652	+3.8
	弱阳参(W.P.C)	0.220	0.204	-7.3
	阴 参(N.C)	0.023	0.007	0

\* OD &lt; 0.05, 按 0.05 计算。

\* OD &lt; 0.05, calculated by 0.05.

表 8 精密性检测结果

Table 8 The results of precision test

试剂盒 Kit		10 次测定结果										$\bar{X}$	SD	CV(%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Toxo	IgG	0.242	0.246	0.249	0.277	0.280	0.253	0.255	0.258	0.287	0.320	0.267	0.024	9.00
	IgM	0.493	0.442	0.459	0.498	0.475	0.486	0.468	0.474	0.503	0.498	0.480	0.020	4.16
RuV	IgG	0.795	0.759	0.779	0.772	0.788	0.765	0.783	0.778	0.767	0.786	0.777	0.011	1.40
	IgM	0.667	0.652	0.661	0.697	0.646	0.650	0.660	0.676	0.627	0.626	0.662	0.019	2.87
CMV	IgG	0.575	0.587	0.599	0.573	0.567	0.573	0.566	0.575	0.582	0.559	0.576	0.011	1.90
	IgM	0.474	0.453	0.514	0.501	0.526	0.502	0.532	0.478	0.510	0.492	0.498	0.024	4.82
HSV	IgG	0.643	0.626	0.595	0.657	0.663	0.616	0.663	0.611	0.656	0.669	0.640	0.026	4.10
	IgM	0.651	0.662	0.671	0.682	0.690	0.707	0.711	0.691	0.702	0.689	0.686	0.019	2.77

### 3 讨论

ToRCH 感染不仅能引起人类各种疾病,孕妇感染后会引引起宫内感染,可能造成流产、死胎和新生儿先天性畸形,对出生人口素质有直接影响。因此,对 ToRCH 感染的诊断引起人们的高度重视。一些发达国家已将 ToRCH 感染的检测作为婚前、孕前和孕期的常规检测项目,我国近几年也相继开展这方面检测。国内外目前已有 ToRCH 系列诊断试剂面市,但国外原装试剂价格昂贵,国内厂家大多引进国外公司的主要原材料进行组装,其质量尚不尽人意,尤其是阴性本底高、特异性欠佳,假阳性或假阴性的情况普遍存在。本所研制的 ToRCH 系列诊断试剂,所有原材料都是自己研制生产的。我们所用酶标抗体(二抗)全是单克隆抗体,减少了多克隆抗体中一些非特异性因子的干扰。同时我们采用多株抗不同位点的单抗混合标记,提高

了试剂的灵敏度。此外,在检测 IgM 试剂盒中,血清样品稀释液内加入了适量羊抗人 IgG 抗体,这不仅可防止 IgG 与 IgM 竞争抗原位点,提高 IgM 检测的灵敏度,而且可以排除 RF 因子的干扰<sup>[6]</sup>。试剂盒中阴性参考血清的 OD 值一般在 0.05 左右,我们检测了近 400 名 ToRCH 抗体阴性正常人血清,平均 OD 值也只在 0.1 左右。在试剂的稳定性方面,我们在酶标抗体、阳性、弱阳性参考血清中加入能有效保护抗体蛋白的保护剂,使试剂盒的稳定性得到有效提高,37℃ 存放 4 d(相当于 4℃ 存放 6 个月),各项指标的变化率小于 15%。目前我国还没有正式颁发 ToRCH 系列酶标诊断试剂盒的质量检定规程。我们参照已颁布的其它酶标试剂盒的质检规程<sup>[5]</sup>,从特异性、灵敏度、精密性和稳定性等方面进行了检定,结果是令人满意的。本所用此套试剂对武汉地区育龄妇女和孕妇进行了 ToRCH 抗体水平的调查<sup>[7,8]</sup>,得到了令人满意的结果。

### 参 考 文 献

- 1 田慕贞,董继华,李川江等.分泌抗人 IgM(链)单克隆抗体细胞株的建立与鉴定.中华免疫学杂志,1985,6:1-4
- 2 詹发先,龚镇奎,王玉娥.两种方法提纯的抗-HBc 单克隆抗体及其酶结合物的比较.湖北预防医学杂志,1995,6(4):4-6
- 3 宋干主编.流行性出血热防治手册,1987.227-228
- 4 黄鹤,龚镇奎,肖红雨.抗-HBc 检测试剂中 3 种预包被方法的效果比较.湖北预防医学杂志,1995,6(4):1-3
- 5 中华人民共和国卫生部.中国生物制品规程二部 1993.
- 6 闵福援,吴昊,王健等.用 ELISA 法检测丙型肝炎病毒 IgM 抗体试剂盒的研究.中华实验和临床病毒学杂志,1996,8(2):158-160
- 7 肖红雨,骆林,黄鹤等.育龄 ToRCH 感染的情况调查.社会与医学,1997,9:12-13
- 8 骆林,肖红雨,黄鹤等.孕妇妊娠期 ToRCH 感染的情况调查.湖北预防医学杂志,1997,8(增刊):56-57

## Preparation of Indirect ELISA Reagent to Diagnose ToRCH Infection

Gong Zhenkui Huang He Luo Lin Xiao Hongyu Gong Rui

(Institute of Virology, Hubei Academy of Medical Science, Wuhan 430079)

**Abstract** Torch is the abbreviation of four pathogenic microbes; *Toxoplasma gondii* (Toxo), Rubella Virus (RuV), Cytomegalovirus (CMV), and Herpes Simplex Virus (HSV<sub>1,2</sub>). A new indirect ELISA reagent to detect the specific IgG and IgM antibody to ToRCH has been prepared. McAbs, labeled with horseradish peroxidase, against human IgG and IgM are used as the second antibodies. Purified Toxo, RuV, CMV, HSV<sub>1,2</sub> are used as antigens to coat wells. The reagent's quality has been tested. The result showed that the reagent has high specificity and low background. The sensitivity is up to 1:160~640, the precision is high and the coefficient of variation (C.V) is between 1.4%~9.0%. The reagent is stable (stored at 37℃ for 4 days, the change range of each target is no more than 15%).

**Key words** ToRCH infection, Indirect ELISA, Diagnose reagent