

用反向间接血凝试验检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)

上海市第六人民医院检验组

(上海)

本文介绍一种简便、快速、敏感、适宜于一般临床化验室使用的反向间接血凝检测 HBsAg 方法。以丙酮醛、甲醛固定羊红细胞,在酸性条件下,用四种不同方法纯化的抗-HBs/豚鼠血清直接致敏。其中以免疫纯或固相吸收经 DEAE-纤维素层析-葡聚糖凝胶 G-20J 过滤的抗-HBs/豚鼠血清致敏效果最好,效价最高可达 2^{10} 。这种致敏羊红细胞检测 HBsAg 灵敏度高,特异性强,凝集模式稳定,重复性良好,比对流免疫电泳法的敏感度提高 500 倍左右。

作者对不同红细胞作了选择,比较了几种常用固定剂,并对致敏红细胞的 pH、时间、温度、蛋白量等条件进行了摸索。

用反向间接血凝试验,免疫粘附血凝试验,放射免疫对流白显影三种敏感方法测定 796 份样品,阳性率分别为 28.57%、28.39%、27.18%。以反向间接血凝法稍高。

随着乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 研究工作的深入开展,迫切要求有灵敏度高、特异性强、操作简便、不需特殊设备的诊断方法。间接血凝试验方法由于具有以上特点,正在日益广泛地应用于免疫学的各个领域^[1]。一般间接血凝试验系采用抗原致敏红细胞以测定被检样品中的抗体,反向间接血凝试验则以抗体致敏红细胞来测定相应抗原。1969 年 Juji 和 Yokochi 等^[2]报道用抗原-抗体复合物解离后得到的抗体,致敏经甲醛固定、鞣酸处理的人“O”型红细胞来测定乙型肝炎表面抗原。1973 年 Hirata 和 Emerick 等^[3]介绍用纯化抗体致敏经甲醛、丙酮醛固定的红细胞,敏感性可大大提高。致敏红细胞经冷冻干燥,可较长期保存,适用于大规模检测。

以丙酮醛、甲醛固定的羊红细胞或人“O”型红细胞,使红细胞表面阴离子化^[4],在 pH 4.0 条件下可使纯化的抗乙型肝炎表面抗原的豚鼠抗血清 (抗-HBs/豚鼠血清) 的 IgG 直接吸附在这种红细胞上,这样致敏的红细胞如遇到少量 HBsAg 即出现特

异性的灵敏凝集。

本文介绍用纯化抗-HBs/豚鼠血清的 IgG 直接致敏经丙酮醛、甲醛固定的红细胞进行 HBsAg 测定,并对抗体的纯化、红细胞的固定和致敏条件等方面进行了一些摸索。

材料和方法

一、IgG 的制备

(一) 液相吸收

HBsAg 经硫酸铵盐析,再用葡聚糖凝胶 G-200 过滤用以免疫豚鼠而得的抗-HBs/豚鼠血清,经 HBsAg 阴性人血清吸收,无杂抗体,对电泳法效价为 2^6 。

1. 经 DEAE-葡聚糖凝胶 A50 层析: 将液相吸收的抗-HBs/豚鼠血清在 0.01M pH 8.0 磷酸缓冲液平衡过夜,上 DEAE-葡聚糖凝胶 A50 柱,以 0.01M pH 8.0 磷酸缓冲液洗脱,流速 3 毫升/10 分钟,用部份收集器收集,将抗-HBs 阳性部分合并。

2. 18% 和 13% 硫酸钠沉淀处理: 上述经液

本文于 1976 年 10 月 16 日收到。

相吸收无杂抗体的抗-HBs/豚鼠血清,用0.2M pH 8.0 磷酸缓冲液稀释一倍,加入硫酸钠至18%,所得沉淀以磷酸缓冲液溶解至原血清体积的1/2,再以13%硫酸钠沉淀一次,沉淀溶解在原血清体积1/10量的生理盐水中。

(二) 免疫纯或固相吸收

用亲和层析法结合葡聚糖凝胶 G-200 过滤而得到的纯化 HBsAg 免疫豚鼠,所得的抗血清为免疫纯或含有少量杂抗体。将含有少量杂抗体的抗-HBs/豚鼠血清,经琼脂糖珠偶联 HBsAg 阴性人血清蛋白的亲亲和层析柱吸附,或经用戊二醛交联的 HBsAg 阴性人血清蛋白免疫吸附柱吸附^[5],无杂抗体,对流电泳效价为 2^8-2^9 。

1. 经葡聚糖凝胶 G-200 过滤二次:将上述免疫纯的抗-HBs/豚鼠血清(对流电泳法效价为 2^8-2^9),经0.1M pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液平衡过夜,上葡聚糖凝胶 G-200 柱,以0.1M pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液洗脱,流速5毫升/20分钟,用部分收集器收集。将抗-HBs 阳性部分合并。再过滤一次。洗脱液在分光光度计280毫微米测定光密度,并以对流电泳法测定抗-HBs,然后将抗-HBs 阳性管中光密度最高的数管合并,浓缩,透析。

2. 经 DEAE-纤维素层析-葡聚糖凝胶 G-200 过滤:将上述免疫纯抗-HBs/豚鼠血清,或含有少量杂抗体用固相吸附法除去杂抗体的抗-HBs/豚鼠血清(对流电泳法效价为 2^8-2^9)一份,加生理盐水一份,再加饱和硫酸铵二份,混匀,在4℃放置2小时左右,离心,弃去上清液,沉淀用50%的饱和硫酸铵洗一次,以生理盐水溶解沉淀,透析除去铵离子和硫酸根离子,或用葡聚糖凝胶 G-25 脱盐。再按 Levy 等法^[6]用 DEAE-纤维素柱提取 IgG:即将已脱盐的抗-HBs/豚鼠血清在0.0175M pH 6.3 磷酸缓冲液中平衡过夜,上 DEAE-纤维素柱,以0.0175M pH 6.3 磷酸缓冲液洗脱,流速3毫升/10分钟,用部份收集器收集。洗脱液在分光光度计280毫微米测定光密度,并以对流电泳法测定抗-HBs,然后将抗-HBs 光密度较高的阳性管合并,浓缩。在0.025M pH 6.9 磷酸缓冲液中平衡过夜,上葡聚糖凝胶 G-200 柱,以0.025M pH 6.9 磷酸缓冲液洗脱,流速5毫升/20分钟,用部分收集器收集。洗脱液在分光光度计280毫微米测定光密度,并以对流电泳法测定抗-HBs,

然后将抗-HBs 阳性管中光密度最高数管合并,浓缩至原体积的1/5,以免电泳法鉴定纯度。与兔抗豚鼠血清的免疫电泳图谱:在 γ 球蛋白位置上为单一沉淀线。然后测定蛋白含量并用对流电泳法滴定抗血清效价,加迭氮钠后保存备用。此即为抗-HBs/豚鼠血清的 IgG。

(三) 中和用的抗-HBs/豚鼠血清

将免疫纯或固相吸收的抗-HBs/豚鼠血清,经硫酸铵盐析,再上 DEAE-纤维素柱,将收集下来的抗-HBs 阳性部分合并,用反向间接血凝法来测试其能抑制对照孔孔数,在平时检测样品时为节约起见,以稀释液稀释至能抑制对照孔为 2^6 。

二、固定红细胞

1. 取采血后3—7天的羊红细胞(或人“O”型红细胞)用10倍量的0.11M pH 7.2 磷酸缓冲液洗5次。

2. 用 pH 7.2 磷酸缓冲液配成8%红细胞悬液,取此红细胞悬液1份,加3%丙酮醛1份,在24℃左右缓慢搅拌17小时。

3. 将丙酮醛固定的羊红细胞用 pH 7.2 磷酸缓冲液洗5次,再以 pH 7.2 磷酸缓冲液配成8%红细胞悬液。

4. 取丙酮醛固定羊红细胞悬液1份,加3%甲醛1份,在24℃左右缓慢搅拌17小时。

5. 将丙酮醛,甲醛固定羊红细胞用 pH 7.2 磷酸缓冲液洗5次,再以 pH 7.2 磷酸缓冲液配成10%红细胞悬液备用。

三、致敏红细胞

1. 取10%已固定羊红细胞1毫升离心,弃去上清液,将红细胞悬浮在10毫升0.1M pH 4.0 醋酸缓冲液中,加入100—300微克纯化抗-HBs/豚鼠血清的 IgG,在24℃左右致敏60—75分钟,致敏完毕用 pH 7.2 磷酸缓冲液洗5次。

2. 用稀释液(含有1%兔血清、0.5%羊红细胞膜、0.5%聚乙二醇、0.1%叠氮钠的0.11M pH 7.2 磷酸缓冲液)将致敏红细胞配成0.5%悬液备用。

四、测定样品

1. 在微量血凝反应板上(V型孔底)每孔加入

稀释液 1 滴(0.025 毫升), 每份样品二排孔, 一排为测定孔, 一排为对照孔。

2. 用微量稀释棒 2 支各蘸取被检血清 0.025 毫升, 分别放入测定排及对照排的第一孔, 顺序进行倍比稀释。

3. 在测定排孔内加入稀释液 1 滴, 在对照孔内加入中和用抗-HBs/豚鼠血清 1 滴, 在微型搅拌器上混匀 1—2 分钟, 盖上玻璃板一块, 在 37℃ 保温一小时。

4. 在反应板上每孔加入 0.5% 致敏红细胞 1 滴(0.025 毫升)混匀 1—2 分钟后, 置室温 2 小时左右观察结果。

5. 在测定每批样品时必须同时做已知阳性、已知阴性样品及空白试剂(只加试剂, 不加血清)作为对照。

五、观察结果

红细胞沉积于孔底, 集中呈一点, 为不凝集; 红细胞均匀分布于孔底周围, 为凝集(见图)。

阳性: 测定排红细胞凝集, 对照排红细胞不凝集; 或测定排红细胞凝集孔超过对照排凝集孔二孔以上为阳性。以 50% 凝集的孔为滴度终点, 此孔样品稀释倍数即为阳性滴度。

阴性: 测定排和对照排红细胞均不凝集为阴性; 测定排和对照排孔数相等则为非特异性凝集。

实验结果

一、不同方法纯化的抗-HBs/豚鼠血清对致敏结果的影响

将以上各种方法处理的抗血清, 在 pH 4.0 条件下, 直接致敏同一批固定红细胞, 致敏量分别以蛋白量和效价二种方式计算, 实验结果如下:

(一) 液相吸收

1. 经 DEAE-葡聚糖凝胶 A 50 层析。
2. 18% 和 13% 硫酸钠沉淀处理。

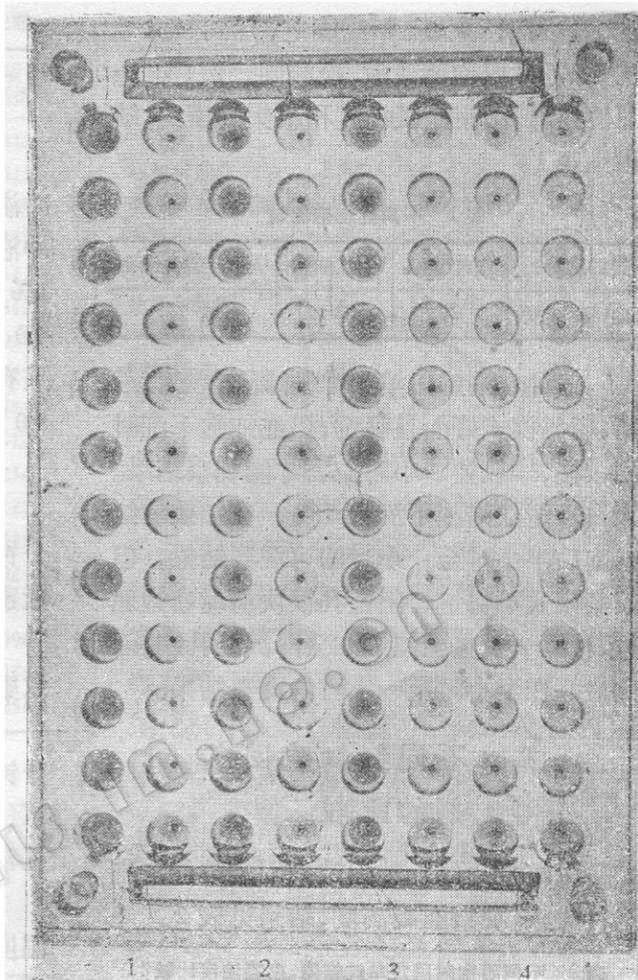


图 反向间接血凝试验凝集模式

均能致敏上, 但滴度低, 不灵敏, 凝集模式也不理想。

(二) 免疫纯或固相吸收

1. 经葡聚糖凝胶 G-200 过滤二次。
2. 经 DEAE-纤维素层析-葡聚糖凝胶 G-200 过滤。

均能致敏上, 其中以经 DEAE-纤维素层析-葡聚糖凝胶 G-200 过滤纯化的抗体最为理想。因为纯度高, 滴度高, 蛋白含量少, 致敏的红细胞检测灵敏度高, 凝集模式好, 重复性也好。

二、红细胞的选择

将羊红细胞、兔红细胞、人“O”型红细

胞,同样以丙酮醛、甲醛固定,用同一批号抗-HBs/豚鼠血清致敏,检测同一份HBsAg阳性血清,观察血凝滴度和凝集的模式,结果见表1。

表1 不同红细胞比较

红细胞种类	羊红细胞	兔红细胞	人“O”型红细胞
血凝滴度	2 ¹⁷	2 ¹⁶	2 ¹⁵

三种红细胞以羊红细胞凝集滴度最高,凝集模式好而且稳定,但红细胞下沉时间较慢,一般要2小时左右才能观察结果。人“O”型红细胞下沉时间快,在加致敏红细胞后半小时至一小时即可观察结果,但凝集模式不稳定,阳性孔很快出现卷边现象,时间一长甚至红细胞会滑沉至孔底,因此最好在半小时至一小时内观察结果。

三、不同红细胞固定剂的比较

以较常用的几种固定剂固定羊红细胞进行比较,观察血凝滴度,结果见表2。

表2 不同固定剂固定羊红细胞,血凝滴度比较*

固定剂	血凝滴度
丙酮醛、甲醛	2 ¹⁷
甲醛	2 ¹³
戊二醛	2 ¹⁶
丙酮醛	2 ¹⁵
戊二醛、丙酮醛	2 ¹⁹
丙酮醛、戊二醛	2 ¹⁵

* 甲醛、丙酮醛浓度都是3%,与8%红细胞悬液等量混匀,24℃固定17小时;戊二醛为2.5%,5%红细胞悬液10毫升加2.5%戊二醛2毫升,室温缓慢搅拌一小时。

表2结果说明,先用戊二醛再以丙酮醛固定羊红细胞血凝滴度敏感性最高,单用甲醛固定的最差。考虑到丙酮醛、甲醛固定红细胞重复性较好,而且都是国产试剂,因此我们采用丙酮醛、甲醛作为固定剂。

四、致敏红细胞的条件

1. pH

应用pH 4.0、5.0、6.0的0.1M醋酸缓冲液和pH 6.4、7.2、8.0的0.11M磷酸缓冲液,在24℃各用100微克抗体蛋白致敏1%红细胞悬液10毫升,实验结果以pH 4.0为最好,滴度为2¹⁷;pH 5.0较差,滴度只有2⁸;pH 6.0、6.4、7.2均未致敏上;pH 8.0对照孔自凝。

2. 时间与温度

在24℃致敏时,致敏时间以60—75分钟最好;致敏90分钟,对照孔圆点不够紧密清晰;120分钟以上,对照孔自凝。

18℃致敏120分钟灵敏度不及24℃致敏60分钟高。

30℃致敏60分钟及37℃致敏30—45分钟结果和24℃致敏60—75分钟相仿。

50℃致敏30分钟滴度最高,但对对照孔常易自凝。

一般来说,温度低,致敏时间要长些,温度高,致敏时间可相应缩短。但温度越高,红细胞自凝的可能性越大。

3. 致敏红细胞用的蛋白量

致敏时蛋白的用量随红细胞的固定方法、致敏时的pH、温度、时间、致敏用的蛋白种类、纯度、理化特性和抗体的活力等不同而有所不同。我们用抗-HBs/豚鼠血清的IgG部分,对流电泳效价为2⁸,蛋白量4.5毫克/毫升,在24℃pH 4.0致敏1%红细胞悬液10毫升,蛋白量以100—300微克最为适宜,25—50微克出现红细胞自凝,超过300微克则随蛋白量的增加而敏感性逐渐降低。

五、反向间接血凝法测定HBsAg的敏感性

1. 用对流电泳法、反向间接血凝法同

表 3 对流电泳法与反向间接血凝法灵敏度比较

样品号	血清编号	对流电泳法滴度	反向间接血凝法滴度	灵敏度提高倍数
1	74-7-8	2 ³	2 ¹²	512
2	74-7-9	2 ⁴	2 ¹³	512
3	74-7-10	2 ¹	2 ¹⁴	512
4	74-7-11	2 ⁶	2 ¹⁵	512
5	74-7-12	2 ³	2 ¹²	512
6	74-7-13	2 ⁴	2 ¹³	512
7	74-7-14	2 ⁴	2 ¹⁴	1024
8	74-7-15	2 ⁶	2 ¹⁵	512
9	74-11	2 ⁶	2 ²⁰	16384
10	74-11	2 ³	2 ¹²	512
11	74-11	2 ⁴	2 ¹²	256
12	74-11	2 ⁵	>2 ¹²	>128
13	74-11	2 ⁶	2 ¹⁷	2048
14	74-12	2 ³	2 ¹³	1024
15	74-12	2 ⁶	2 ¹⁴	256
16	74-12	2 ⁶	2 ¹⁸	4096
17	74-12	2 ²	2 ¹⁰	256
18	74-12	2 ⁴	2 ¹²	256

时测定 HBsAg 阳性血清, 结果见表 3。

2. 用免疫粘附血凝试验、放射免疫对流白显影、反向间接血凝法, 同时测定某地肝癌高发区样品, 结果见表 4。

表 4 三种检测方法比较

方法	免疫粘附血凝试验	放射免疫*对流白显影	反向间接血凝试验
阳性数/样品数	226/796	217/796	228/796
阳性率(%)	28.39	27.19	28.57

* 放射免疫对流白显影法由上海生化所协助完成。

六、反向间接血凝法测定正常人及肝炎病人样品结果

1. 经对流电泳法测定 HBsAg 阴性的献血员 136 名中反向间接血凝法阳性 5 名, 占 3.67%。

2. 虹桥医院各类肝炎病人 360 名测定结果见表 5。

讨 论

反向间接血凝法具有灵敏度高, 操作

表 5 对 360 名肝炎患者两种不同检测方法比较

临床分类	例数	对流电泳法		反向间接血凝法	
		阳性数	(%)	阳性数	(%)
急性黄疸型肝炎	42	8	19	17	40.5
急性无黄疸型肝炎	78	39	50	45	57.7
急性肝炎	50	25	50	29	58
慢性肝炎	43	27	62.8	33	76.7
迁延性肝炎	79	52	65.8	62	78.5
肝硬化	18	6	33.3	16	88.8
重症肝炎	18	9	50	11	61.2
诊断不明肝炎	32	20	62.5	24	75
总 计	360	186	51.8	237	65.8

简便等优点, 但其反应的特异性则取决于致敏到红细胞上抗体的纯度和效价, 所用豚鼠抗血清应该是单相和高效价的, 并要求除去非抗体的其它血清蛋白, 尽可能只含有抗-HBs/豚鼠血清的 IgG。用这样的纯化抗体致敏红细胞可以得到灵敏度高、特异性强、凝集模式好、重复性可靠的血凝反应。否则, 会出现自凝或致敏不上的现象, 即使效价在 2⁸ 以上也无济于事。如抗体纯度较好, 而效价不高也能致敏红细胞, 但灵敏度不如纯度高、效价高的抗体好。按效价致敏也可获得同样满意的结果。

由于致敏红细胞的抗血清来源于豚鼠, 有些豚鼠血清蛋白成份可以和人血清蛋白反应出现非特异性凝集。开始时我们采用正常豚鼠混合血清按抗体纯化程序得到的 IgG 来致敏红细胞作为对照, 在 30 份肝炎病人和献血员的 HBsAg 阳性血清的对照孔来看, 对照孔出现凝集大部分在 2² 左右。对照孔凝集与阳性滴度无明显的平行关系。但有时在阴性样品中, 测定孔不出现凝集, 对照孔反而出现凝集, 所以出现这种情况, 我们认为测定孔用的致敏红细胞, 致敏上去的主要是抗-HBs/豚鼠血清的 IgG, 对照孔致敏上去的都是正常豚鼠血清的 IgG, 这样的对照孔就不能准确反映测定孔内由于正常豚鼠 IgG 引起的非特异性反应

的客观实际,所以我们后来改用在对照孔中加抗体,以中和抗原来抑制它与致敏细胞的凝集(抗体中和法)作为对照,排除由于非特异性反应而引起的干扰,保证实验的可靠性。在对照孔中加入的抗体浓度,可按实验要求和具体情况而定,可用抑制 2^{12} 以上,也可用抑制 2^8 ,但不宜低于 2^6 。

我们检测大量样品中,对照孔采用抗体中和法,在 25°C 左右让红细胞自然沉降,则对照孔几乎都不出现凝集。在室温较低情况下,可能出现 2^1 — 2^2 凝集,极个别的样品有 2^3 。在判定结果时,不管对照孔是否出现凝集,仍以测定排凝集孔数超过对照排凝集孔2孔以上为阳性,以避免实验误差而引起假阳性。

用本法测定高滴度的HBsAg阳性血清

比对流电泳法灵敏度提高达2,000倍以上,一般在500倍左右。本法之所以灵敏,除抗-HBs/豚鼠血清的纯度与血凝滴度有很大关系外,还由于红细胞用丙酮醛和甲醛固定^[1]。经丙酮醛、甲醛固定的红细胞不宜用鞣酸处理后再致敏,否则灵敏度相差很大。

参 考 资 料

- [1] Hirata, A. A. et al.: *J. Immunol.*, **100**: 641, 1968.
- [2] Juji, & Yokochi.: *Japan. J. Exp. Med.*, **39**: 615, 1969.
- [3] Hirata, A. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **143**: 761, 1973.
- [4] Ling, N. R.: *Brit. J. Haemat.*, **7**: 299, 1961.
- [5] Avrameas, B. et al.: *Immunochemistry*, **1**: 53, 1969.
- [6] Levy, B. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**: 250, 1960.

THE DETECTION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN BY THE REVERSED PASSIVE HEMAGGLUTINATION

Department of Laboratory Investigation, Shanghai No 6 People's Hospital
(Shanghai)

A reversed passive hemagglutination (RPHA) test for detection of hepatitis B surface antigen (HB_sAg) is described in this paper. The method is simple, rapid, sensitive and suitable for use in ordinary clinical laboratories.

Sheep red cells stabilized by pyruvic aldehyde and formaldehyde were used in the test. Anti-HB_s guinea pig sera purified by four different methods were tested for sensitization in acid medium. The best result was obtained with the immunologically pure antibody or with the antiserum absorbed on solid phase and treated with DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. A maximum titer of 2^{20} may be attained. The sheep red cells sensi-

zed in this manner, when used in detection of HB_sAg gave high sensitivity, high specificity, stable hemagglutination patterns and good reproducibility. The test was 500 times more sensitive than counterimmunoelectrophoresis.

Different conditions of hemagglutination have been studied, including various species of red cells, different stabilizer, the effect of pH, temperature, duration of exposure and antibody protein concentration.

796 specimens were examined for HB_sAg with three kinds of sensitive test, i. e. the RPHA, the immune adherence hemagglutination test and the radioimmunoassay, the positive rates were 28.57%, 28.39%, and 27.18% respectively.