

限量抗原底物珠体系固相酶免疫分析法 用于抗腺病毒的 IgG 抗体的检测

郑企静 王秀云 丘福禧

(北京热带医学研究所病毒学研究室, 北京)

马连提 陈 仁 程松高

(北京第二医学院微生物学教研室, 北京)

1978 年冬至 1979 年春我们用固相酶免疫分析法中的限量抗原底物珠体系 (DASS) 间接法检测临床诊断为病毒性肺炎及麻疹合并病毒性肺炎患儿的 91 例双份血清中的抗 3 和 7 型腺病毒的 IgG 抗体, 同时以微量血凝抑制试验进行对照, 其符合率为 90.5%。同时期对临床诊断为非腺病毒感染的 10 例双份血清进行检测, 两种方法滴度均无四倍升高。非腺病毒感染患者 DASS IgG 抗体水平较有近期感染患者为低, 前者 1:64, 后者 1:2,048。对抗 3 和 7 型腺病毒的兔免疫血清及正常兔血清 DASS 法测定结果及抑制与阻断实验均说明本方法是特异的, 其灵敏度较血凝抑制试验高约 50 倍左右。

对其中 48 例于疾病早期进行了咽部剥落细胞的直接荧光抗体技术检查, 与 DASS 法的符合率为 72.9%。

本方法简便、易行, 不需要特殊的设备, 可以代替血凝抑制试验。

3 型和 7 型腺病毒所致的病毒性肺炎是婴幼儿常见的急性传染病^[1-3]。为控制腺病毒肺炎, 必须寻找有效的简易快速诊断方法。近年来建立了固相酶免疫分析方法。此方法特异性强, 灵敏度高, 并不需要特殊的设备^[4]。国内外已应用于病毒性疾病抗原和抗体的测定^[5-9]。但对于腺病毒抗原和抗体测定的临床应用, 尚未见有报道。1978 年冬至 1979 年春, 我们应用酶免疫分析法中的限量抗原底物珠体系 (DASS)^[10] 间接法检测临床诊断为病毒性肺炎及麻疹合并病毒性肺炎患儿的急性期和恢复期血清内抗 3 和 7 型腺病毒的 IgG 抗体, 初步证明 DASS 法可代替血凝抑制试验, 灵敏度高, 简便易行。

材料和方法

(一) 马抗人 IgG 的提纯

马抗人 IgG 系由北京生物制品研究所生产, 经用硫酸钠盐析法及 DEAE-纤维素离子交换层析法提纯, 蛋白质含量为 4.5 毫克/毫升。

(二) 酶标记马抗人 IgG 的制备

我们选用的是辣根过氧化物酶 (西德 Boehringer Mannheim GmbH 分析 II 级 RZ0.51)。结合方法是过碘酸盐法^[10, 11]。

(三) 3 和 7 型腺病毒抗原及对照抗原的制备

为使酶免疫分析法有高度的准确性, 抗原质量的控制是很必要的。我们将 3 和 7 型腺病毒分别接种于原代人胎肾单层上皮细胞, 用 199 综合培养基作为维持液, 72—96 小时出现完全的细胞病变。收集病毒液, 快速冻融五次, 以 3,500rpm 离心 20 分钟吸取上清, 再以 15,000rpm 离心 30 分钟。上清用聚乙烯吡咯烷酮浓缩到原体积的十分之一, 在 4℃ 对生理盐水透析三天后使用。液

本文于 1980 年 3 月 29 日收到。

1) 北京第二医学院微生物学教研组、北京神经外科研究所免疫组: 北京第二医学院医学资料, 5: 11—25, 1976。

缩抗原的血凝滴度 3 型为 1:64, 7 型为 1:256。蛋白质含量前者为 1.4 毫克/毫升, 后者为 1.0 毫克/毫升。对照抗原以未接种病毒的原代人胎肾单层上皮细胞同法制备, 蛋白质含量为 1.5 毫克/毫升。

(四) 琼脂糖 4B 珠与抗原偶合

取 1 克溴化氢活化的琼脂糖 4B 珠, 加 5 毫克 3 和 7 型腺病毒混合抗原, 按参考文献 [8] 方法进行偶合。

(五) DASS 法测 IgG 抗体

取洁净的 12×8 凹井尖底型微量血凝有机玻璃板, 将偶合抗原的琼脂糖 4B 珠用 0.02M、pH 7.8 PBS 稀释至每滴约含 10—20 个珠子, 于凹井内各加入一滴。将待测血清按不同稀释度 (1:32—1:4,096) 各取一滴 (约 10—15 微升), 依次加入上述小井内, 置于振荡器上在室温作用 30 分钟。弃去上清, 用 0.05M、pH 7.6 含 0.6M NaCl 的 PBS 洗 3 次, 每次振荡 5 分钟。然后加酶标记马抗人 IgG, 每井各一滴, 置于振荡器上, 在室温作用 30 分钟。标记抗体的浓度用棋盘式滴定法测定。本实验所用的酶标记马抗人 IgG 的浓度为 1:75。加酶标记物作用后, 弃去上清, 按上述方法用 PBS 洗 3 次, 再将新鲜配制好的底物^[1] 3-3' 二氨基联苯胺四盐酸盐每凹井加一滴, 5 分钟后, 在低倍显微镜下观察。根据琼脂糖 4B 珠显色的深浅度判定结果: (-) 无色、(+) 浅黄色、(++) 黄色、(+++) 棕黄色、(++++) 棕褐色, 以 (++) 为滴定终点 (见图版 1)。恢复期血清比急性期血清的抗体滴度有 4 倍或 4 倍以上升高或恢复期血清的抗体滴度超过 1:2,048 (1:2,048 为有 4 倍或 4 倍以上升高之恢复期血清的抗体平均滴度) 者表示新近感染。实验同时作酶与底物对照, 前者不加血清, 后者不加血清及酶标记马抗人 IgG。

(六) 特异性鉴定

为鉴定本方法的特异性, 我们进行了以下的实验:

1. 以 DASS 法测抗 3 和 7 型腺病毒的兔免疫血清与正常兔血清进行对比 (所用的兔免疫血清及酶标记羊抗兔 IgG 分别为北京热带医学研究所病毒学研究室及北京第二医学院微生物学教研室所制备), 其结果有明显差别, 前者滴度 1:64, 后者原液呈 (+), 1:4 不显色。如将兔免疫血清与 3 和 7 型腺病毒抗原先在 37℃ 作用 30 分钟, 再用 DASS 法检测, 结果不显色。但以对照抗原、盐水、合胞病毒代替 3 和 7 型腺病毒抗原进行抑制试验, 其染色结果不受影响。

2. 病人的阳性血清与马抗人 IgG 在 37℃ 作用 30 分钟后, 再用 DASS 法检测, 结果不显色, 用正常马血清处理, 则其染色结果不受抑制。

3. 偶合于琼脂糖 4B 珠上的特异性抗原与马高价免疫血清作用后, 再用 DASS 法检测已知阳性血清, 则原来应显色的底物珠不显色。

上述实验直接和间接地证明了 DASS 测抗 3 和 7 型腺病毒抗体的方法是特异的。

实验结果

(一) 应用 DASS 法与血凝抑制试验测双份血清的比较

临床诊断为病毒性肺炎 91 例患儿双份血清检查结果表明两种方法符合率较高, 按 85 例统计, 其符合率为 90.5% (表 1)。在 DASS 法诊断有近期感染的阳性病例中, 其恢复期血清的 DASS 抗体滴度平均为 1:2,048, 较血凝抑制试验抗体滴度高约 50 倍左右 (表 2)。

表 1 91 例血凝抑制试验与 DASS 法的比较

血凝抑制试验		DASS 法			
抗体滴度有 4 倍以上升高	28 例	抗体滴度有 4 倍以上升高或高于 1:2,048	27 例	抗体滴度无明显升高	1 例
抗体滴度无明显升高	57 例	抗体滴度无明显升高	50 例	抗体滴度有 4 倍以上升高或高于 1:2,048	7 例
抗体滴度 $\geq 1:16$, 但无 4 倍升高	6 例	抗体滴度 $\geq 1:128$, 但无 4 倍升高			6 例

表 2 DASS 法与血凝抑制试验灵敏度的比较

方法 编号	血凝抑制试验	DASS 法	
78-76	7 型 1:64	B ₁ 1:128	B ₂ 1:4,096
78-95	3 型 1:64	B ₁ 1:256	B ₂ 1:4,096
78-98	3 型 B ₁ 1:16 B ₂ 1:128	B ₁ 1:64	B ₂ 1:1,024
78-101	3 型 B ₁ > 1:32* B ₂ 1:128	B ₁ 1:4,096	B ₂ 1:4,096
78-104	7 型 1:32	B ₁ 1:64	B ₂ 1:256
78-114	7 型 B ₁ > 1:16** B ₂ 1:128	B ₁ 1:8,192	B ₂ 1:8,192
78-79	7 型 1:16	B ₁ < 1:32	B ₂ 1:4,096
78-120	7 型 1:128	B ₁ 1:64	B ₂ 1:512
78-108	7 型 1:128	B ₁ 1:256	B ₂ 1:1,024
78-93	3 型 1:16	B ₁ 1:128	B ₂ 1:1,024

注: B₁ 为急性期血清, B₂ 为恢复期血清。

* 血抑 B₁ 未到终点。B₁ 在第 14 天, B₂ 在第 30 天采血。

** 血抑 B₁ 未到终点。B₁ 在第 15 天, B₂ 在第 24 天采血。

(二) DASS 法与荧光抗体技术比较

对其中 48 例于疾病早期进行咽部脱落细胞荧光抗体检查。20 例 DASS 法诊断有近期感染的阳性病例, 其中 11 例荧光抗体检查为阳性, 8 例阴性, 1 例可疑。28 例 DASS 法诊断为阴性的病例, 其中 23 例荧光抗体检查为阴性, 2 例阳性, 3 例可疑。两种方法的符合率为 72.9%。

(三) 非腺病毒患者血清检查结果

同时期用 DASS 法对临床诊断为非腺病毒感染 10 例患儿的双份血清进行抗体检测, 均无 4 倍以上升高, 第二份血清的平均滴度为 1:64, 高限为 1:256。9 例对照单份血清抗体测定结果, DASS 法的平均

滴度为 1:64, 其高限为 1:128。非流行季节 19 例非呼吸道感染患儿的单份血清平均滴度为 1:20, 高限为 1:80。非腺病毒感染患者 DASS 抗体水平远较有近期感染患者的抗体水平为低, 前者平均滴度为 1:64, 后者为 1:2,048, 前者的高限在 1:128—256, 后者除一例为 1:64 外, 其余均在 1:128 以上。二者有显著差别。

讨 论

本实验结果证明, DASS 法测抗 3 和 7 型腺病毒 IgG 抗体的方法是特异的, 较微量血凝抑制试验有更高的灵敏度。对婴幼儿可采用微量法, 更有实用价值。DASS 法与荧光抗体技术相比, 符合率为 72.9%。符合率偏低, 可能与咽拭子标本的采取时间和质量有关。

DASS 法比 ELISA 方法要求条件简单, 如能解决偶合抗原底物珠的冻干保存和结合物的供应问题, 这种血清学方法将比现有的其他方法更易在基层推广。

参 考 文 献

- [1] 王慧瑛等: 北京医学, 2:56, 1965。
- [2] 丘福清等: 微生物学报, 17(2): 143, 1977。
- [3] 小儿呼吸道病毒抗体调查协作组: 中华医学杂志, 12: 274, 1978。
- [4] Voller, A. et al.: Bull. WHO., 53: 55, 1976。
- [5] Bidwell, D. E. et al.: J. Inf. Dis., 136: 274, 1977。
- [6] Mabert S. P. and M. Anken: J. Inf. Dis., 136: 318—323, 1977。
- [7] Miranda Q. R. et al.: J. Inf. Dis., 136: 304—310, 1977。
- [8] 周葆华等: 微生物学报, 19(4): 447, 1979。
- [9] Deelder, A. M. & J. G. Streefkerk: Experimental Parasitology, 37: 405, 1975。
- [10] Nakane P. K. & A. Kawachi: J. Histo-Chem. Cytochem., 22: 1084—1091, 1974。
- [11] 盛树力, 程松高等: 国外医学免疫学分册, (2): 75: 1979。

AN INDIRECT METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY IN DEFINED ANTIGEN SUBSTRATE SPHERES (DASS) FOR IgG ANTIBODIES IN TYPES 3 AND 7 ADENOVIRUS PNEUMONIA

Zheng Qijing Wang Xiuyun Qiu Fuxi (Ch'iu Fu-shi)
(Department of Virology, Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing)

Ma Lianti Chen Ren Cheng Sunggao
(Department of Microbiology, Beijing Second Medical College, Beijing)

An indirect method of enzyme immunoassay in defined antigen substrate spheres (DASS) was investigated to detect IgG antibodies to types 3 and 7 adenovirus in 91 paired sera of patients diagnosed clinically as virus pneumonia or measles complicated with virus pneumonia from the winter of 1978 to the spring of 1979. Types 3 and 7 adenovirus mixed antigens were coupled to the CNBr-activated sepharose 4B beads which were used as the solid-phase carrier. Then the tested serum and the HRP(horseradish peroxidase) labeled horse antihuman immunoglobulin G were added successively. An enzyme immune complex was thus formed. The amount of the specific IgG antibody present in the serum was measured by the amount of the substrate degraded as expressed by the color change in different degrees. A fourfold or greater rise in antibody titre between the acute and convalescent sera or the titre higher than 1:2,048 indicated a recent infection. Specificity experiments such as comparison of the DASS IgG antibody titre of the rabbit immune serum against types 3 and 7 adenovirus with normal rabbit serum and inhibition or blocking tests showed that the DASS method was specific.

Of the 91 cases a fourfold or greater rise in hemagglutination-inhibiting antibody titre to types 3 and 7 adenovirus was demonstrated in 28 cases, among which

27 had a fourfold or greater rise in DASS IgG antibody titre or titre greater than 1:2,048. 57 showed no marked elevation in hemagglutination-inhibiting antibody titre among them 50 had no marked elevation in DASS IgG antibody titre too. 6 had a hemagglutination-inhibiting antibody titre $\geq 1:16$ and DASS IgG antibody titre $\geq 1:128$ respectively, but neither showed marked rise in titre. The coincidence rate between the two methods was 90.5%. The sensitivity of the DASS indirect method was about 50 times greater than that of the HAI. Ten paired control sera showed no marked elevation in DASS IgG antibody titre. The average DASS IgG antibody titre of the convalescent sera of the patients recently infected was 1:2,048, while that of the control was 1:64.

Immunofluorescence antibody technique was carried out to detect the exfoliated pharyngeal cells from 48 of the 91 patients at the early stage of disease. The coincidence rate between the DASS indirect method and IFA was 72.9%. Our experiments showed that the indirect method of enzyme immunoassay in DASS for IgG antibodies in types 3 and 7 adenovirus pneumonia is specific and more sensitive. It is simple without need of sophisticated equipments. It may be applied as an alternative serological method.