

酶联免疫吸附试验在检测 登革免疫复合物应用*

王 飞 罗章炎 郭日波 柯伟民
(传染病学教研室)

罗惠蓉 廖育煌 雷凌冰
(广东省卫生防疫站)

提 要 采用 ELISA 法检测登革热 (DF) 病人血清特异性免疫复合物, 发现在发病后 1~5 天内测出光密度 (OD) 值为 $2.22 \pm 0.02 \sim 2.55 \pm 0.00$, 而正常人及肝炎病人血清 OD 值均为 1.35 ± 0.03 , 两者 OD 值比较有显著差异 ($P < 0.01$); 登革免疫复合物 OD 值判别界限为 1.78, 登革热病人血清特异性免疫复合物 OD 值全部大于截断点 1.78, 而肝炎病人或正常人血清 OD 值无一例超过 1.78。可见 ELISA 法检测登革热病人血清特异性免疫复合物特异性高, 重复性好, 对于研究登革特异免疫复合物在登革出血热 (DHF) 发病机制中的作用有一定意义。

关键词 登革热 登革出血热 特异性循环免疫复合物

登革免疫复合物在登革出血热发病机制中的作用日益受到重视^[1], 然而其检测手段仍为细胞放免分析及聚乙二醇沉淀试验等非特异性方法^[2]。酶联免疫吸附试验具有高度敏感性和特异性, 广泛用于多种疾病的研究。我们探索将其用于登革免疫复合物的测定, 结果显示以多克隆登革抗体建立的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对于研究特异性登革免疫复合物具有一定价值。

材 料 与 方 法

材 料 ①多克隆登革抗体 (4D) 军事医学科学院病毒所制备。②辣根过氧化物酶标记鼠抗人 IgG 卫生部生物制备。③底物 测定时临时制备, 联苯二胺 40 毫克, 用 pH 5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 100 毫升溶解, 临用时加 30% H_2O_2 0.5 毫升。④被测血清 共 46 份登革热病人血清, 全部均经过病毒分离及免疫荧光试验证实为登革 II 型。阴性对照为体检正常人血清 12 份以及肝炎病人血清 13 份。血清 -30℃ 保存。

检测方法 采用 ELISA 间接法。

1. 包被抗体 ①以 0.1M pH 9.5 碳酸盐

缓冲液按 1:250 稀释多克隆登革抗体, 包被于聚苯乙烯板, 每孔 0.2 毫升, 置于 37℃ 两小时。②移去包被液, 用含 Tween-20 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS-T) 洗涤 3 次, 每次在室温下放置 3 分钟, 最后 1 次倒扣在滤纸上待干。

2. 加被检血清 ①用含 10% 小牛血清的 PBS-T (pH 7.2) 液将待检血清稀释 4 倍, 每份标本加两孔, 每孔 0.2 毫升, 室温下放置 2 小时凉干。同时设置有阳性及阴性孔作对照。

②同上洗涤 3 次。

3. 加鼠抗人 IgG-HRP 用含 0.1% 白明胶的 PBS-T 液将抗 IgG-HRP 按 1:1000 稀释, 每孔加 0.2 毫升, 放置 37℃ 两小时, 同上洗涤 3 次。

4. 加 OPD 每孔加新配制 OPD 底物溶液 0.2 毫升, 室温放置 15 分钟, 再每孔加入 2 M 硫酸溶液 1 滴终止反应。

判读结果 以酶免疫测定光密度阅读器 (MINIREADER II) 490 毫微米波长测定光密度 (OD 值)。

结 果

ELISA 检测登革免疫复合物特异性

以本法检测 46 例登革血清, 其免疫复合物 OD 值为 2.40 ± 1.15 , 高于正常人 (12 例) 及

* 卫生部科研基金资助课题

肝炎病人(16例)的OD值, *t* 检验两者有显著性意义 ($P < 0.01$), 而正常人血清与肝炎病人血清 OD 值则无显著性差异, 说明本法对于检测登革免疫复合物有特异性(表1)。

表1 ELISA 检测登革免疫复合物特异性

| 组别 | 受检人数 | OD值范围(X) | $\bar{x} \pm s$ |
|-----|------|-----------|-----------------|
| 登革热 | 46 | 2.20~2.55 | 2.40 ± 0.11* |
| 正常人 | 12 | 1.30~1.40 | 1.35 ± 0.03** |
| 肝炎 | 16 | 1.30~1.40 | 1.35 ± 0.03 |

$F = 1161.69 \quad P < 0.01$

*登革热分别与正常人及肝炎病人比较, 均为 $P < 0.01$ **正常人与肝炎病人比较, $P > 0.05$

ELISA 检测登革免疫复合物重复性

随机抽取5例登革热病人血清分别作3次测定(结果见表2), 其OD值变化不大($F = 0.22, P = 0.80$), 重复性好。

表2 ELISA 检测登革免疫复合物重复性

| 标本编号 | 光密度(GD)值 | | |
|------|----------|-------|-------|
| | 第1次 | 第2次 | 第3次 |
| 1 | 2.55 | 2.52 | 2.52 |
| 2 | 2.35 | 2.25 | 2.20 |
| 3 | 2.34 | 2.35 | 2.35 |
| 4 | 2.40 | 2.40 | 2.45 |
| 5 | 2.38 | 2.40 | 2.34 |
| 平均值 | 2.40 | 2.38 | 2.36 |
| 方差 | 0.007 | 0.009 | 0.013 |

$F = 0.22 \quad P > 0.05$

登革热血清免疫复合物 OD 值判别界限的确定 根据王若涛^[5]诊断界限确定的电脑程序, 输入 X_1 (肝炎病人或正常人血清 OD 平均值) = 1.35, S_1 (上述 OD 值标准差) = 0.03, X_2 (登革热病人血清 OD 平均值) = 2.40, S_2 (DF 病人 OD 值标准差) = 0.11, 计算出截断点1.78(假设 $\alpha = 0.01, \beta = 0.01$), OD值

大于1.78可诊断为登革免疫复合物阳性, 少于1.78可诊断为阴性。从表2可以看出登革热病人免疫复合物 OD 值全部大于截断点1.78, 而肝炎病人或正常人 OD 值全部少于1.78。

不同病日登革免疫复合物检测结果 不同病日抽血测定登革免疫复合物, 以第1日最高, 其OD值为 2.55 ± 0 ; 以后逐日下降, 至第5日仍可测出登革免疫复合物, 其OD值为 2.22 ± 0.019 ; 病程第1~4日间OD值结果有显著差异($P < 0.01$), 而病程第4和第5日间变化不大($P = 0.24$)(表3)。

表3 不同病日登革免疫复合物检测结果

| 病程 | 检测例数 | OD值范围 | $\bar{x} \pm s$ |
|-----|------|-----------|-----------------|
| 第1日 | 7 | 2.55 | 2.55 ± 0 |
| 2日 | 15 | 2.40~2.55 | 2.46 ± 0.04 |
| 3日 | 12 | 2.37~2.43 | 2.39 ± 0.02 |
| 4日 | 8 | 2.20~2.40 | 2.26 ± 0.07 |
| 5日 | 4 | 2.20~2.24 | 2.22 ± 0.02 |

注: $F = 82.46 \quad P < 0.05$

第1日与第2日比较, $P < 0.01$; 第2日与第3日比较, $P < 0.01$; 第3日与第4日比较, $P < 0.01$; 第4日与第5日比较, $P > 0.05$

讨论

免疫复合物导致补体激活消耗是登革免疫病理机制中的重点, 已用于解释登革出血热的出血倾向^[8]。然而检测登革免疫复合物的传统方法均有不足之处, 即非抗原特异性。1987年 Kuno 等^[4]研究应用 ELISA 法检测人工合成登革 IgM 免疫复合物获得成功, 为测定特异性登革免疫复合物提供了可能途径。在本文实验中曾设计用各型单克隆登革抗体包板检测免疫复合物, 但均告失败, 其原因可能与单克隆抗体与抗原结合位点少致使吸附力差有关; 而用多克隆登革抗体进行检测获得成功。实验表明用ELISA检测登革免疫复合物具有特异性和重复性好的特点。

据 Ruangjirachuporn 报道^[2], 用非特异

性的 Raji 细胞放免法, 80% DHF 病人血清可测出循环免疫复合物, 其高峰值出现在发病后第 4~5 日。本文研究结果, 发病 5 日内均可测得免疫复合物与其他报道相似, 但高峰值却以发病第 1 日为最高, 以后随之下降。结果差异原因有待进一步研究。

近年来登革热在海南省及广州等地仍有流行, 深入开展登革免疫复合物在 DHF 发病机理中所起作用的研究有着现实意义。

参 考 文 献

1. Mitrakul, C. Bleeding diathesis in dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1979;10(3):434
2. Ruangjirachuporn W. Circulating immune complexes in serum from patients with dengue haemorrhagic fever. *Clin Exp Immunol* 1979;36(1):46
3. Russell, PK, et al. Immunologic processes and viral antigens associated with sequential dengue virus infection. In: Pollard P, ed. *Persistent Virus Infections*. New York: Academic Press Inc, 1973:263
4. Kuno, G. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36(1):153
5. 王若涛. 临床流行病学. 第 1 版. 北京: 中国医药科技出版社, 1987:152

PRELIMINARY STUDY ON SPECIFIC CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN PATIENTS WITH DENGUE FEVER USING ELISA

Wang Fei Luo Zhangyan Guo Ribo Ke Weimin

(Department of Infectious Diseases, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences)

Luo Huirong Liao Yuhuang Lei Lingbing

(Guangzhou Anti-epidemic Station)

We employed ELISA technique to detect specific circulating immune complexes in the sera of patients with DF(dengue fever). During first 5 days from the onset of DF, OD (optical density) value in the sera ranged between 2.22 ± 0.02 and 2.55 ± 0.00 , while OD value in the sera from normal persons and hepatitis patients was 1.35 ± 0.03 . The values in the sera of patients with DF and normal persons as well as patients with hepatitis were significantly different. Cut-off point for diagnostic value of specific CIC (circulating immune complexes) of DF was 1.78. OD value in all sera taken from DF patients were more than 1.78, but no one case in the serum taken from normal persons and the hepatitis patients was more than 1.78.

ELISA technique is specific and reproducible for detecting specific CIC in the sera taken from patients with DF. It suggests that if we employed ELISA technique to study relationship between specific CIC and dengue haemorrhagic fever, more important data would be obtained.

Key words Dengue fever Dengue haemorrhagic fever Specific circulating immune complexes