

# 应用捕获 ELISA 法检测人巨细胞病毒特异性 IgM 抗体的研究

陆应玉<sup>1</sup> 杨文兴 陈禹保<sup>\*</sup>

(1、安徽医大附院检验科, 北京美迪科生物技术有限公司, 北京 100012)

**摘要** 应用捕获 ELISA 法检测人巨细胞病毒感染者血清特异性 IgM 抗体。通过与间接 ELISA 法对 47 例临床标本的检测比较, 该法灵敏度及特异性均高于间接法, 且不受 RF 的影响。试验表明, CMV IgM 捕获法特异敏感、简便、快速、重复性好。CMV IgM 捕获法试剂的研制成功, 将为血清学的检测、流行病学的调查及临床诊断等提供可靠的科学诊断依据, 有助于优生及优育。

**关键词** 巨细胞病毒(CMV) 捕获 ELISA 法 IgM 抗体

巨细胞病毒(CMV)属疱疹病毒科<sup>[1]</sup>, CMV 种类很多, 分布广泛, 婴儿先天性 CMV 感染发生率为 0.5-2.0%<sup>[2]</sup>, 妇女怀孕早期巨细胞感染是引起先天性感染和先天性缺陷的重要原因<sup>[3]</sup>, 而判断巨细胞感染的一个重要依据是巨细胞病毒特异性 IgM 抗体的被检出。因为 IgM 为抗原刺激机体后最早出现的抗体, 且半衰期较短, 血清内若出现特异性 IgM 抗体, 表示有近期感染<sup>[4]</sup>, 病毒在体内复制。而目前临床使用的检测试剂盒基本是间接法, 由于间接法易受 RF 因子影响, 且灵敏度、特异性不理想, 因此我们根据“抗人 IgM 链包被固相载体+被检血清+特异性抗原+酶标记特异性单克隆抗体+底物液显色”捕获 ELISA 法的原理研究检测 CMV 感染患者血清中特异性 IgM 抗体, 以达到建立一种灵敏度高、特异性强且不受 RF 因子干扰的检测方法, 通过与间接 ELISA 法的比较, 得到了满意的结果, 现报道如下

## 材料与方法

1. 抗人 IgM  $\mu$  链抗体、巨细胞病毒特异性抗原和巨细胞病毒单克隆抗体。北京美迪科生物技术有限公司应用物生技术室提供;
2. 参照标本: 阳性血清 20 份, 弱阳性血清 12 份, 阴性血清 20 份(用进口试剂筛选)
3. 间接 ELISA 法试剂均由北京美迪科生物技术有限公司提供, 做法参照试剂盒中说明书;
4. 被检血清: 来自安医大附院(用意大利进口试剂捕获法试剂初筛)
5. 酶标抗体的制备: 采用改良过碘酸钠法标记<sup>(5)</sup>

6. 包被板的制备: 按常规包被法进行。

7. 血清样品检测:

取出预包被板, 按检测顺序编号(设空白对照 1 孔), 各孔加入相应血清 50ul, 37℃温育 30min, 弃去孔内液体, 用 PBST 洗板 36 遍, 然后拍干; 除空白对照外, 每孔滴加结合物 1 滴(或 50ul)(为特异性抗原和特异性抗体的混合物)37℃温育 30min; 弃去孔内液体, 用 PBST 洗板 5 遍, 然后折干, 各孔加入 TMB 底物 A、B 各 1 滴, 置 37℃温育 10min 加入 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>50ul 终止反应, 于 450nm 波长下, 用空白孔调零, 读取各孔 OD 值。以 > 2.1 阴性平均值为阳性。(Cutoff= 0.084)

8. 特异性抗原及酶标记单克隆抗体浓度的确定:

用特异性抗原按递度 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1000, 1: 1500 用 0.05M PH9.6Cb 稀释后 100/孔包被 PS 板。4℃过夜, 次日甩去液体, 用 10% BSA0.01M PBB 液封闭, 37℃2h; 甩去液体, 用 PBST 洗板一次, 拍干设空白对照 1 孔, 将酶标记的单克隆抗体按 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1000, 1: 1500 稀释, 按棋盘滴定, 以 OD 值为 1.0 左右为最佳工作浓度, 经确定, 抗原浓度为 1: 800, 酶标记浓度为 1: 1000, 两者按工作浓度用 0.01M PH7.4PBS 稀释在一起即为结合物。

## 结果

1. 抗人 IgM  $\mu$  链包被浓度的确定:

抗人 IgM  $\mu$  链按递度稀释后 100ul/孔包被 PS 微孔板, 用以确定的结合物对阳性, 弱阳性, 阴性参

\* 联系人: 陈禹保, 北京美迪科生物技术有限公司 yubao.Chen@yahoo.com

照标本进行检测, 实验结果表明抗人 IgM $\mu$  链的包被浓度为 1: 1000 合适。

2. 特异性:

2.1 用本试剂检出的阳性, 用马抗人 IgM 进行阻断实验, 阻断率大于 50%, 可知本法特异。

2.2 交叉实验: 试验室拟用以知阳性标本混在美迪科公司肝炎参比试验室(中澳合作), TORCH 试验室提供的乙肝、甲肝、RV、HSV IgM 阳性血清中, 经检测, 除混入标本为阳性外, 其余标本均为阴性, 与预期结果符合率为 100%。(见表 1)

表 1 CMV-IgM 捕获法检测的特异性(均为 2 孔平均)

	混入血清	乙肝 IgM 血清 (5 份)	甲肝 IgM 血清 (5 份)	RV IgM 血清 (5 份)	HSV IgM 血清 (5 份)
巨细胞病毒 IgM 检测与预期符合率	1. 012 100%	均< 0. 084 100%	均< 0. 084 100%	均< 0. 084 100%	均< 0. 084 100%

3. 灵敏度

把已确定的阳性参照标本用 0. 01M PH7. 4PBS 进行倍比稀释后检测, 其结果见表 2:

表 2 CMV-IgM 捕获法检测的灵敏度

血清滴度	原液	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192
OD 值	1. 121	0. 14	0. 0745	0. 032	0. 0487	0. 031	0. 0212	0. 0186	0. 0062

由表 3 可知, 当稀释度为 1: 4096 时, 仍可判断为阳性, 而间接法只能检测到 1: 512 的稀释度, 可见捕着法灵敏较高。

4. 稳定性:

按卫生部的考察要求, 将整套试剂置 37℃ 三天, 经平衡后与 4℃ 试剂对照实验, 其结果阳性 CV = 7. 6%, 弱阳性 CV = 13. 1%, CV 均在 15% 以内, 故本试剂盒稳定性好, 且从阳性参照标本来, 几次结果相近, 可知试剂重复性也很好。

5. RF 因子的影响:

任何检测 IgM 的试剂盒都应考虑类风湿因子(RF)的影响。本试剂盒对 10 份类风湿血清(用乳胶法测出)进行检测, 其结果均为阴性, 可见本试剂盒几乎不受 RF 的影响。

6. 捕区法 ELISA、间接 ELISA 对临床标本检测的比较

由表 6 可知捕获法准确, 间接法中多出一例阳性, 经证实为非特异性造成的假阳性。且同一份阳性, 间接法测定的 OD 值远远小于捕获法的测定值。可知灵敏度不如捕获法。

表 6 CMV- IgM 检测的二种方法的比较

标本数	捕获法		间接法	
	阳性	阴性	阳性	阴性
47 例	2 例	45 例	3 例	44 例
OD 值	0. 843 0. 679	均< 0. 084	0. 213 0. 186 0. 144	均< 0. 084

(2 种方法阳性编号为: 24、33、间接法中另一例阳性编号为: 45)

讨论

捕获法最早是 1977 年 Price 用来测定抗肺炎支原体 IgM, 随后 Flehning 和 duermeyer 等用其测定甲型肝炎的特异性 IgM, 并与传统的密度离心法比较, 符合率 100%, 近年应用捕获法检测其他病毒屡见报道<sup>[6][7][8][9]</sup>, 是因为优点是间接法无法替代的。间接法易受类风湿因子及特异性 IgM 的影响; RF 是一种抗变性 IgG 的抗体, 无种属特性, 它和变性、聚合或与抗原结合的 IgG 发生凝集, 不与正常的 IgG 发生反应, 间接法中, 血清中特异的 IgG 与包被的特异性抗原结合, 而后与 RF 反应造成假阳性<sup>[10]</sup>, 同时, 特异性的 IgG 与 IgM 竞争结合特异性抗原<sup>[11]</sup>, 以及易受人体免疫球蛋白影响而必须稀释标本<sup>[12]</sup>, 故造成间接法的灵敏度不高, 而捕获法是利用抗人 IgM $\mu$  链直接从被检血清中捕获 IgM, 然后才进行特异性的鉴定, 这样避免了上述间接法中影响因素的影响, 在捕获法中, 笔者认为主要决定因素在单克隆抗体, 单克隆抗体的特异决定与它相连抗原的特异, 从而决定了检出的 IgM 的特异。这样即使原纯度差一些, 也不会太大影响结果而, 间接法中则是直接的影响因素。

PCR 法是最根本、直接、准确的方法, 但由于其成本较高, 对实验室及实验员的要求比较高而不易普及, 随着全民素质的提高, 优生优育以尤为重要, 巨细胞 IgM 捕获法的建立, 将为临床巨细胞病毒的检测提供一个科学的、可靠的诊断依据。

参考文献

[ 1 ] 黄祯详, 医学病毒学基础及实验技术, 科学出版社; 1990.  
[ 2 ] Anilorsk, 国外医学流行病学传染病分册 1 期; 1985.  
[ 3 ] 邓锡等, 实验和临床病毒学杂志, 48, 3(1), 1989.  
[ 4 ] 邵惠训, 病毒性感染快速诊断, 北京科学技术研究院北京生化免疫制剂中心( 现北京美迪科生物技术有限公司)  
[ 5 ] 沈关心, 周汝麟等, 现代免疫学实验技术, 湖北科学技术出版社; 1998.  
[ 6 ] 朱托夫, 张礼璧, Chinese Journal of virology (2), 1989.  
[ 7 ] 刘洪等, 中华医学检验杂志, 221: 14(4)1991.  
[ 8 ] 张国新, 中华医学检验杂志, 353: 12(6), 1989.  
[ 9 ] 张国成, 中华医学检验杂志, 164: 14(3), 1991.  
[ 10] Ender G, et al, J Med virol 337: 19, 1986.  
[ 11] Echevarria JM, et al, J clin Microbiol 423: 22(3), 1985.  
[ 12] 王京杭, 上海医学检验杂志, 48: 8(1), 1993