

间接血凝试验检测抗乙型肝炎表面抗原的抗体

河南省卫生防疫站* 开封市卫生防疫站
开封县卫生防疫站 开封市传染病医院

间接血凝试验是将抗原吸附在红血球上,当遇到血清中存有相应抗体时,即可发生血球凝集。间接血凝试验检测抗乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的抗体(Anti-HBs)较琼脂扩散、对流电泳和补体结合试验敏感性高,而与放射免疫试验敏感性近似,且具有优于放射免疫的简单、快速等特点。我们采用鞣酸法将HBsAg吸附至鸡红血球上,进行间接血凝试验检测Anti-HBs获得成功,现将试验方法及结果报道如下。

材 料

1. HBsAg的提纯:将对电泳滴度为1:16—1:32的阳性血清,用硫酸铵沉淀及葡聚糖凝胶G-200过滤,制得纯化的HBsAg,其对电泳滴度为1:4。

2. 0.15M pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS):0.15M Na_2HPO_4 72 毫升,加 0.15M NaH_2PO_4 28 毫升,再加生理盐水 100 毫升。

3. 2.5% 戊二醛:25% 戊二醛用pH7.2 PBS 稀释 10 倍。

4. 5 毫克%鞣酸:称 5 毫克鞣酸,加生理盐水 100 毫升。

5. 来亨鸡红血球:采血,脱纤维蛋白后,保存在ACD保养液(柠檬酸4.8克,柠檬酸钠13.2克,葡萄糖14.7克,叠氮钠1.0克,用无离子水溶解后加到1,000毫升)中,一周内使用。

6. 羊红细胞膜:取羊血后,用脱纤维法去

除纤维蛋白。用 10 倍量的生理盐水洗血球三次。然后加 10 倍量的蒸馏水,放冰箱冰格子内使其结冰,然后取出放室温溶解,反复三次,离心沉淀,弃去上清液,沉淀物用 pH5.8 0.15M PBS 洗 3—4 次,至细胞膜呈粉红色,用 pH7.2 0.15M PBS 稀释 50—100 倍。

7. 2% 兔血清稀释液:正常兔血清(经56℃ 30 分钟灭活)2 毫升,加 pH7.2 0.15M PBS 97.5 毫升,加羊红细胞膜 0.5 毫升。

8. 器材:微量稀释棒,微型振荡器,V 型或 U 型有机玻璃反应板,滴管(自制、校正至每毫升 40 滴)。

方 法

一、致敏鸡血球的制备

1. 戊二醛固定鸡血球:鸡血离心,弃去上清液,用 10 倍量生理盐水洗血球三次,用 pH7.2 PBS 配成 5% 血球悬液。取 5% 血球悬液 100 毫升,加入 2.5% 戊二醛 20 毫升,室温搅拌一小时,用生理盐水洗四次,用 pH7.2 PBS 配成 5% 血球悬液,保存冰箱内备用。

2. 鞣酸处理鸡血球:5% 戊二醛固定鸡血球悬液 5 毫升加 5 毫克%鞣酸 5 毫升,放入 37℃ 水浴 10 分钟后离心,用 pH7.2 PBS 洗二次,最后加 pH7.2 PBS 5 毫升,即成 5% 鞣酸处理鸡血

* 本文由河南省卫生防疫站金志宏同志执笔。

球悬液。

3. 抗原致敏: 5% 鞣酸处理的鸡血球悬液 5 毫升加提纯的 HBsAg (用 pH7.2 PBS 1:5 稀释) 5 毫升, 放入 37°C 水浴, 每隔 5 分钟搅拌一次, 30 分钟后离心, 用 pH7.2 PBS 洗三次, 最后加 2% 兔血清稀释液 25 毫升, 即为 1% 致敏鸡血球悬液。

4. 致敏鸡血球抗原浓度的选择: 每批纯化抗原在致敏前按下法选择最适浓度, 用 pH7.2 PBS 将抗原作 1:1、1:5、1:10、1:15 稀释, 按上法分别与鸡血球致敏后配成 4 种 1% 鸡血球悬液。取对流电泳阳性抗体一份, 在 V 型反应板上作一系列倍比稀释, 用 4 种鸡血球悬液进行间接血凝试验, 观察哪一种稀释度的抗原致敏血球与抗体凝集滴度最高, 此稀释度即为最适浓度。

二、操作过程

1. 在微量 V 型反应板(8 排, 每排 12 孔)上, 每份标本做二排, 一排为测定, 一排为对照。

2. 每孔滴入 2% 兔血清稀释液 0.025 毫升。

3. 用微量稀释棒两支各蘸取待测血清 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。

4. 测定排中每孔滴加 2% 兔血清稀释液 0.025 毫升, 对照排中滴加 1:5 稀释(用 2% 兔血清稀释液稀释)纯化抗原 0.025 毫升, 摇匀后, 盖上玻板, 置 37°C 温箱一小时。

5. 取出后, 每孔加 1% 致敏鸡血球悬液 0.025 毫升, 在微型振荡器上振荡, 使其充分混匀, 然后室温静置 1—2 小时, 观察结果。以 50% 血球凝集孔作为终点, 滴度在 1:8 以上为阳性。测定排血球凝集, 对照排血球不凝集或测定排血球凝集孔多于对照排即为阳性。若两排血球均不凝集, 为阴性; 若两排血球凝集孔数

相等, 则为非特异性凝集。

结果与讨论

在农村防治肝炎试点工作中, 我们用间接血凝试验检测 Anti-HBs, 同时以对流电泳作对照。145 份血清间接血凝试验结果, 阳性 57 例(占 39.3%), 而对流电泳检测结果均为阴性。由此亦可说明间接血凝试验敏感性明显高于对流电泳法。145 份血清 Anti-HBs 滴度分布见表 1。

表 1 145 份血清 Anti-HBs 滴度分布

滴度	1:64	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	阴性
份数	12	13	14	18	15	5	68
%	8.3	9.0	9.7	12.4	10.3	3.5	46.8

在工作实践中, 我们对间接血凝试验有如下的体会:

1. 间接血凝试验检测 Anti-HBs 试验的敏感性及其特异性与 HBsAg 的纯度关系很大。用硫酸铵沉淀及葡聚糖凝胶 G-200 过滤所得的纯化抗原可得到较满意的结果。供纯化用血清中 HBsAg 的滴度越高越好, 但越高越难获得。

2. 我们采用了来亨鸡红血球来制备致敏红血球, 此种血球反应快, 室温静置一小时就可判定结果。

3. 致敏血球的抗原浓度, 初步认为 1:5—1:10 较合适。浓度太高, 既浪费抗原又会影响观察结果。

4. 由于微量稀释棒及微型振荡器等器材, 一般基层单位不易购置。我们在进行间接血凝试验中, 曾用自制标划 0.025 毫升的玻璃吸管代替微量稀释棒, 用双手振荡反应板或用康氏振荡器来代替微型振荡器, 用 U 型代替 V 型反应板, 亦可得到满意的结果。