

基于化学发光肠道病毒 71 型 IgM 抗体检测试剂的研制及初步应用*

陈 堃¹, 宋晓国¹, 张向颖², 杨锡琴¹, 王国华¹, 冯晓燕¹, 何 竞¹, 张贺秋¹, 修冰水^{1△} (1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 北京市肝病研究所 100069)

【摘要】 目的 在肠道病毒 71 型(EV71)重组外壳蛋白 VP1 的基础上建立以化学发光为基础的 IgM 抗体检测技术, 并与普通 TMB 显色酶联免疫吸附法比较, 评价其临床应用前景。**方法** 采用抗 IgM 单克隆抗体及辣根酶标记的重组 VP1 抗原, 在此基础上建立 EV71-IgM 捕获法化学发光检测技术, 并对比化学发光检测技术与普通酶联检测技术在 45 份 EV71 抗体阳性和 30 份阴性血清中的反应情况。**结果** 化学发光法、普通酶联免疫吸附法、市售 EV71-IgM 检测试剂分别能与 38 份、19 份、26 份 EV71 抗体阳性血清发生阳性反应, 灵敏度分别为 84.4%、42.2% 和 57.8%; 化学发光法灵敏度显著高于其他两种, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 种检测方法与阴性血清均无阳性反应。**结论** 在 EV71-VP1 重组抗原的基础上建立的 EV71-IgM 捕获法化学发光检测技术具有很高的灵敏度, 并有很好的临床应用前景。

【关键词】 肠道病毒 71 型; VP1 基因; 化学发光

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.24.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)24-2945-02

The manufacture and applications of the detection of IgM against Enterovirus 71 based on chemiluminescence immunoassay* CHEN Kun¹, SONG Xiao-guo¹, ZHANG Xiang-ying², YANG Xi-qin¹, WANG Guo-hua¹, FENG Xiao-yan¹, HE Jing¹, ZHANG He-qiu¹, XIU Bing-shui^{1△} (1. Basic Medicine Institute, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Beijing Liver Disease Institute 100069, China)

【Abstract】 Objective To establish the chemiluminescence immunoassay to detect IgM against Enterovirus 71 (EV71) based on recombinant protein of the capsid protein VP1 and evaluate its applications in clinic diagnosis. **Methods** The capture chemiluminescence immunoassay and routine ELISA method were established to detect IgM against EV71 based on the recombinant VP1, and the chemiluminescence immunoassay were compared with ELISA and commercial kits in 45 sera of EV71 infected patients and 30 blood donors. **Results** The sensitivity of chemiluminescence immunoassay, routine ELISA, and commercial kits were 84.4%, 42.2% and 57.8% respectively. The sensitivity of chemiluminescence immunoassay was significantly higher than that of ELISA based on VP1 and commercial kits ($P < 0.05$); There was no positive reaction with blood donor in the three methods. **Conclusion** Chemiluminescence immunoassay based on the recombinant VP1 antigen shows high sensitivity, and is promising in clinical diagnosis of EV71.

【Key words】 enterovirus 71; VP1 gene; chemiluminescence

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)感染在临床上主要引起患者手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD), 主要感染对象为 5 岁以下的幼儿^[1]。成年人亦可感染, 并在同一家庭成员内部传播, 但临床症状不明显。这种亚临床感染或隐性感染也是 EV71 快速传播的又一个重要途径^[2]。

EV71 型为小 RNA 病毒科肠道病毒属, 病毒基因组为单股正链 RNA, 编码 VP1、VP2、VP3、VP4 四个病毒衣壳蛋白, 除 VP4 包埋在病毒粒子外壳的内侧与病毒核心紧密连接以外, 其他 3 种结构蛋白均暴露在病毒颗粒的表面, 抗原决定簇基本上位于 VP1~VP3 上^[3]。Shih 等^[4]曾用 EV71 的 VP1 基因的原核表达产物作为抗原, 以间接酶联免疫吸附(ELISA)法建立了相应的 EV71-IgM 检测试剂, 初步证实重组蛋白 VP1 抗原在制备 EV71-ELISA 诊断试剂中的重要地位。本研究在前期 EV71-VP1 重组抗原的基础上, 采用 IgM 捕获法建立 EV71-IgM 捕获法的化学发光检测技术, 并与普通 ELISA 进行比较, 评价化学发光检测技术在 EV71-IgM 检测中的应用

前景。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 45 份血清样本为临床检测 EV71 RNA 阳性, 30 份阴性样本来自于健康献血员。

1.1.2 试剂与仪器 EV71-VP1 重组抗原由军事医学科学院基础医学研究所制备; 抗 IgM 单克隆抗体购自天津 Biotechnologies 公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 购自美国 Sigma 公司; 化学发光底物鲁米诺购于 Millipore 公司。化学发光仪为 PE 公司生产的 PerkinElmer 2030 multilabel reader, ELISA 测定仪为 SLT-III 型。

1.2 方法

1.2.1 EV71-VP1 抗原标记 取 HRP 5 mg 溶于 0.2 mol/L pH 5.6 醋酸盐缓冲液 0.5 mL; 加入新鲜配制的 0.1 mol/L NaIO₄ 0.25 mL; 混匀, 4 °C 30 min。加入 2.5% 乙二醇 0.5 mL, 混匀, 室温放置 30 min。加入待标记抗原 5~10 mg,

用 1.0 mol/L pH 9.5 CBS 调 pH 至 9.0, 混匀。4 °C 过夜, 加入 NaHB₄ 0.1 mL(0.5 mg), 混匀。4 °C 2 h 后用 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)透析, 4 °C 过夜。加入适量中性甘油后小量分装, -20 °C 保存。

1.2.2 抗 EV71-IgM 捕获法的化学发光检测 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液将抗人 IgM 单克隆抗体包被 96 孔发光酶联板, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜, 0.01 mol/L PBS-0.5% Tween20 洗板 2 次, 加 2% 牛血清蛋白(BSA), 封闭 4 h, 弃封闭液拍干。每孔加入 10 μL 待测样品, 90 μL 辣根酶标记的 EV71-VP1 抗原 37 °C 30 min, 弃液, 洗板 5 次拍干。加入鲁米诺反应 A、B 液各 50 μL, 5 min 后由 PerkinElmer 2030 multilabel reader 检测发光值 RLU, 以 30 份阴性样本进行 Cut off(CO) 设定, Cut off 值 = $x + 3s$, 样本发光值 S/CO > 2 判断为阳性。

1.2.3 抗 EV71-IgM 捕获法的普通 ELISA 检测 步骤同 1.2.2, 最后显色换成 TMB 显色液: A 和 B 液各 50 μL, 37 °C 避光显色 10 min, 每孔加入终止液 50 μL, 用酶标仪读取 450 nm 吸光值, 以 30 份阴性样本进行 Cut off(CO) 设定, CO 值 = $x + 3s$, 当样本吸光值 S/CO > 2 判断为阳性。市售 EV71-IgM 检测试剂(商品化试剂)检测参照说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 化学发光法、普通 ELISA 法和商品化试剂与阴性样本的反应及 CO 的确定 普通 ELISA 法与 30 份阴性血清反应的均值为 0.05, 标准差 s 为 0.007 7, CO 值定为 0.073, S/CO > 2 判断为阳性; 而化学发光法与 30 份阴性血清反应的均值为 15 555 RLU, 标准差 s 为 4 245, CO 值定为 28 290, S/CO > 2 判断为阳性; 商品化试剂的 CO 依照试剂说明书为 0.150, 当样本 S/CO > 1 判断为阳性。结果显示 3 种方法与 30 份阴性血清均无反应, 特异性为 100%。

2.2 3 种方法检测灵敏度比较 采用健康人血清对同一 EV71 抗体阳性样品进行倍比稀释, 稀释度由 1 : 200 稀释至 1 : 102 400, 然后采用 3 种方法检测各种稀释度的样本, 见表 1。

表 1 3 种方法灵敏度比较

稀释倍数	S/CO		
	普通 ELISA 法	化学发光法	商品化试剂
1 : 200	22.9(+)	248.0(+)	10.3(+)
1 : 400	17.7(+)	161.0(+)	4.9(+)
1 : 800	9.9(+)	86.3(+)	3.9(+)
1 : 1 600	7.7(+)	46.3(+)	3.2(+)
1 : 3 200	3.5(+)	22.9(+)	2.6(+)
1 : 6 400	2.0(+)	11.7(+)	1.7(+)
1 : 12 800	1.3(-)	6.3(+)	0.9(-)
1 : 25 600	0.8(-)	3.8(+)	0.6(-)
1 : 51 200	0.7(-)	2.2(+)	0.6(-)
1 : 102 400	0.7(-)	1.6(-)	0.6(-)

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

普通 ELISA 法及商品化试剂均在样本 1 : 12 800 稀释后检测为阴性, 而化学发光法在样本 1 : 51 200 稀释后依然检测为阳性, 显示出化学发光法具有较高的灵敏度。

2.3 3 种方法与阳性样本的反应结果 采用化学发光法、普

通 ELISA 法及商品化试剂与 45 份阳性标本的 EV71-IgM 抗体反应结果见表 2。

表 2 3 种方法检测结果比较[n(%)]

方法	阳性	阴性
化学发光法	38(84.4)	7(15.6)
普通 ELISA	19(42.2)	26(57.8)
商品化试剂	26(57.8)	19(42.2)

化学发光检测敏感度最高, 为 84.4%, 而普通 ELISA 法检出率最低, 为 42.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

EV71 的早期诊断对后期疾病的防治工作意义重大。尽管 RNA 检测已经研制成功, 但该方法操作复杂, 且价格昂贵, 难以在基层推广应用^[5]。同时, 由于 EV71 隐性感染的存在, 仅凭 RNA 阳性往往不能确定患者是否为近期发病。相比之下, ELISA 检测简单、价格低廉, 且是 EV71-IgM 是急性感染的重要标记物, 具有更广泛的应用价值^[6]。目前, 商品化 EV71-IgM 检测试剂中所采用的抗原均为灭活的 EV71 全病毒颗粒, 能在发病的第 2 天即可检测出 IgM 抗体的存在^[7]。但以重组抗原为基础研制试剂, 通过工艺及方法学的优化, 完全可达到灭活 EV71 全病毒颗粒抗原的性能, 而在生产及操作等方面具有明显的优势。

研究显示, EV71 的抗原表位主要位于 VP1、VP2、VP3, Shih 等^[4]证实了重组 VP1 抗原在制备 EV71-ELISA 诊断试剂中的重要作用。本研究所采用的以重组 VP1 建立的普通 ELISA EV71-IgM 检测技术, 与商品化试剂具有相同的最高稀释倍数, 提示两者对 VP1 抗体的检测灵敏度是相同的。但建立在以重组 VP1 抗原为基础的 ELISA 技术, 在 EV71 阳性血清中的检出率显著低于以全病毒颗粒为基础的商品化试剂, 这一结果提示, 采用多种 EV71 重组抗原联合对 EV71-IgM 抗体进行检测可能显著提高对 EV71 阳性血清的检出率。

近年来, 鲁米诺及其发光信号增强剂的使用进一步提高了化学发光检测的灵敏度和可操作性, 已广泛应用于医学免疫学检测领域^[8]。本研究结果显示, 化学发光技术除了具有很好的特异性外, 灵敏度也显著高于普通 ELISA 法。在采用相同的重组 VP1 抗原的基础上, 化学发光检测 EV71-IgM 抗体的检出率得到明显提高。但与商品化试剂反应的模式并不相同(结果未显示), 具有一定的互补性, 分析可能与采用的抗原不同有关。提示采用多表位抗原标记 HRP, 特异的抗 μ 链单克隆抗体作为捕获抗体, 结合化学发光技术建立 EV71-IgM 抗体捕获检测技术, 可进一步提高特异性和灵敏度, 并具有很好的临床应用前景。

参考文献

[1] Ooi EE, Phoon MC, Ishak B, et al. Seroepidemiology of human enterovirus 71, Singapore[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 995-997.
 [2] Lin TY, Chang LY, Hsia SH, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(Suppl 2): S52-S57.
 [3] Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. J Clin Microbiol, 2006, (下转第 2948 页)

2 结 果

2.1 入院时 80 例 LRTI 患者 PCT 为 (1.179 ± 0.490) ng/mL, hs-CRP 为 (13.016 ± 7.590) mg/L, 与 LRTI 均有一定的相关性 ($r=0.342, P<0.01$)。

2.2 入院时患者 PCT 的阳性率 85.0%, 高于 hs-CRP 的阳性率 17.5%, PCT 的灵敏度 (85.0%) 与 hs-CRP (82.5%) 相似, 但特异度 (90.0%) 明显高于 hs-CRP, 说明在反映老年患者下呼吸道感染时 PCT 明显优于 hs-CRP。见表 1、2。

表 1 PCT 与 hs-CRP 的阳性率比较 (n)

hs-CRP	PCT		合计
	+	-	
+	10	4	14
-	58	8	66
合计	68	12	80

注: PCT 阳性率为 85.0%, hs-CRP 阳性率为 17.5%, 经配对 χ^2 检验, $\chi^2=47.032, P<0.01$ 。+ 表示阳性, - 表示阴性。

表 2 PCT、hs-CRP 的灵敏度及特异度比较

检测项目	检测结果	金标准 (n)		灵敏度 (%)	特异度 (%)
		患者	对照		
PCT	+(≥ 0.5)	68	6	85.0	90.0
	-	12	54		
hs-CRP	+(≥ 3.0)	66	31	82.5	48.3
	-	14	29		

注: 经配对 χ^2 检验, PCT 与 hs-CRP 的灵敏度差异无统计学意义 ($\chi^2=0.184, P=0.668$); PCT 的特异度高于 hs-CRP ($P<0.01$)。+ 表示阳性, - 表示阴性。

3 讨 论

PCT 是 1992 年发现的人类降钙素的前体物质, 含 116 个氨基酸的蛋白质, 相对分子量 13×10^3 , 不受体内激素水平的影响, 体内半衰期为 25~30 h^[4], 这就为临床采血提供了良好时机。PCT 在健康人血清中水平极低, 几乎检测不到。全身细菌感染时, 内毒素或细胞因子抑制 PCT 分解成降钙素释放入血, 使血中 PCT 增高^[5]。PCT 水平 2 h 开始升高, 6~12 h 明显超过正常, 24 h 达高峰, 是近年来发现的一种新的炎性指标。作为传统的炎性指标, C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是肝脏合成的一种急性时相反应蛋白, 其合成与致

炎症细胞因子有着密切的关系, 是一种非特异性免疫应答组分。在炎症开始数小时就升高, 48 h 即可达高峰, 随病变消退, 组织结构和功能的恢复降至正常水平。除细菌感染外, 病毒感染、急性排异反应、心血管系统疾病及手术都可引起 CRP 的升高, 因而对感染缺乏特异性^[6]。近年相继采用胶乳增强免疫比浊法等技术大大提高了 CRP 的灵敏度, 在低浓度 CRP (0.15~10 mg/L) 测定范围内有很高的准确度。用这些方法进行 CRP 测定称为高敏感 CRP, 即简称为 hs-CRP^[7]。本研究探讨了血清 PCT 与 hs-CRP 检测在 LRTI 患者中的临床意义, 发现入院的 LRTI 患者, PCT 和 hs-CRP 检测值显著相关, 提示二者均是检测感染的良好指标, PCT 指标的灵敏度 (85.0%) 与 hs-CRP (82.5%) 相似, 但特异度 (90.0%) 明显高于 hs-CRP, 说明在反映 LRTI 时 PCT 明显优于 hs-CRP。

参考文献

- [1] 张静萍, 陈佰义. 欧洲呼吸学会和欧洲临床微生物与感染病学会对成人下呼吸道感染诊治指南的修订[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(12): 1030-1033.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2007 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 6-17.
- [3] 邓伟吾. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 651-655.
- [4] Petitjean S, Assicot M, Etude I. Immunreaefivite calcitonine like all cours des processus infectieux [M]. Paris: Diplome Detudes Approfondies de Biotechnologie Universite, 1995: 9-18.
- [5] 陈鸿恩, 黄丽辉. 血清降钙素原测定在感染性疾病中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(1): 20-21.
- [6] 王丽芬, 李宗英. 超敏 C 反应蛋白检测的临床意义[J]. 按摩与康复医学, 2010, 1(35): 61.
- [7] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice; a statement for health-care professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association[J]. Circulation, 2003, 107(3): 499-511.

(收稿日期: 2011-06-12)

(上接第 2946 页)

44(6): 2212-2219.

- [4] Shih SR, Li YS, Chiou CC, et al. Expression of capsid [correction of caspid] protein VP1 for use as antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection[J]. J Med Virol, 2000, 61(2): 228-234.
- [5] Tsao KC, Chan EC, Chang LY, et al. Responses of IgM for enterovirus 71 infection[J]. J Med Virol, 2002, 68(4): 574-580.
- [6] Chang LY, Tsao KC, Hsia SH, et al. Transmission and

clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan[J]. JAMA, 2004, 291(2): 222-227.

- [7] Xu F, Yan Q, Wang H, et al. Performance of detecting IgM antibodies against enterovirus 71 for early diagnosis [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11388-e11389.
- [8] 柳光芬. 化学发光免疫技术对乙型肝炎两对半定量检测的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(14): 1181-1182.

(收稿日期: 2011-07-22)