

免疫滴金技术检测肾综合征出血热特异性抗体及中西医结合治疗的研究

储 峰 季 青 严润民 陈晓玲 王霞明

内容提要 目的 探索一种更为简便、快速、特异、灵敏的肾综合征出血热(HFRS)抗体的检测方法,及中西医结合治疗该病的有效手段。方法 采用免疫滴金法(CGIDA)检测 HFRS 患者 186 例,同时测定特异性免疫球蛋白 M、G 抗体(抗 HFRS-IgM、抗 HFRS-IgG),其中 101 例 HFRS 患者分组进行治疗(治疗组用苦黄注射液、参麦注射液联合黄芪汤治疗,对照组用利巴韦林联合甘利欣注射液治疗)。结果 检测 186 例 HFRS 患者中抗 HFRS-IgM 阳性 132 例(70.9%),抗 HFRS-IgG 阳性 163 例(87.1%)。越期情况 越休克期治疗组优于对照组($P < 0.05$),越少尿期及从发热期直接进入多尿期,两组差异无显著性。结论 CGIDA 检测抗 HFRS-IgM、抗 HFRS-IgG 具有快速、简便之优点。治疗方面两组比较差异无显著性。

关键词 肾综合征出血热 特异性抗体 免疫滴金技术

Study on Using Colloidal Gold Immuno-Dot Assay to Detect Special Antibody of Hemorrhagic Fever Renal Syndrome CHU Feng, JI Qing, YAN run-min, et al *Nanhua Hospital, Nanhui County, Shanghai (201300)*

Objective: To seek for a simple, sensitive and rapid assay to detect specific antibody of patients suffering from hemorrhagic fever renal syndrome (HFRS). **Methods:** Serum anti-HFRS IgM (sIgM) and IgG (sIgG) antibody were detected in 186 patients with HFRS using colloidal gold immuno-dot assay (CGIDA), and compared with those detected with enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) and indirect fluorescent antibody test (IFAT). Kuhuang Shenmai injection (KHSM) combined Astragalus decoction (AD) treatment was applied to 101 HFRS patients in a treated group ($n = 50$), and the effect of therapy was compared with that in a control group ($n = 51$) treated with ribarvirin and ganlixin injection. **Results:** CGIDA showed positive sIgM antibody in 132 cases (70.9%) and positive sIgG antibody in 163 (87.1%) of the 186 HFRS patients. As compared the two groups in crossing stage, the rate of crossing shock stage in the treated group was higher than that in the control ($P < 0.05$). As for rate of crossing oliguria stage and from febrile stage directly developed into diuretic stage, the difference between the two groups was insignificant ($P < 0.05$). **Conclusion:** CGIDA shows the merits of quick, simple and convenient in detecting sIgM and sIgG antibody in HFRS patients. The effect of KHSM combined AD treatment was not significantly different from that of ribarvirin and ganlixin injection.

Key words hemorrhagic fever renal syndrome, specific IgM antibody, colloidal gold immuno-dot assay

肾综合征出血热(HFRS)是由汉坦病毒引起的自然疫源性传染病。对该病的早期诊断与以基础液体疗法为主的中西医结合综合治疗是提高临床诊断、治愈率的关键。目前常用的酶联免疫吸附试验检测特异性抗体 IgM 和免疫荧光法检测特异性抗体 IgG,以及 PCR 法基因检测手段,在基层单位应用都受到条件和速度的限制。为了研究一种更为简便、快速、特异、敏感的检测方法及治疗手段,我们进行了反复研究,终于研究出免疫滴金技术对肾综合征出血热抗体检测

IgM、IgG 的同时检测方法和更为确切的中西医结合治疗方案,取得了满意结果,现报告如下。

材料与方法

1 病例选择 选择本院 1998 年 1 月 1 日~1999 年 5 月 31 日期间的发病 2~7 天(平均 5.1 天)发热期入院的 HFRS 住院患者 186 例,诊断均符合 1997 年 2 月卫生部颁布的《流行性出血热防治方案》所制订的标准^[1]。

2 临床资料 186 例 HFRS 患者中 101 例根据入院先后、临床分型随机分为两组。治疗组 50 例,男 27 例,女 23 例,年龄 18~70 岁,平均 48.5 岁;其中轻

型 15 例,中型 21 例,重型 8 例,危重型 6 例。对照组 51 例,男 30 例,女 21 例;年龄 20~74 岁,平均 49.5 岁,其中轻型 17 例,中型 20 例,重型 9 例,危重型 5 例,两组在发热、出血倾向及肾功能损害等方面比较差异无显著性,具有可比性。

同时选择非本病患者 68 例,男 35 例,女 33 例,年龄 18~72 岁,平均 48.3 岁;其中 20 例为发热待查患者,48 例为肝炎确诊患者,作为本研究检测指标参考值。

3 试剂来源 汉坦病毒核蛋白、抗 HFRS-IgG 免疫荧光法抗原片均由浙江省卫生防疫站提供。单抗人 IgM、IgG 抗血清购于上海生物制品研究所。抗 HFRS-IgM 酶联免疫吸附(ELISA)法试剂药盒由山东省淄博市传染病医院研制,上海市传染病医院提供。氯金酸由上海试剂一厂生产。

4 检测方法 患者入院当日即采肘静脉血做滴金法抗 HFRS-IgM、抗 HFRS-IgG 等检测。

4.1 胶体金制备 在 100ml 双蒸水中加入 1% 枸橼酸钠液 4ml,煮沸后迅速加入 1% 氯金酸 1.0ml,继续煮沸 10min,冷却后用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 至 8.0。

4.2 标记抗体 取已纯化抗体作线性稀释,每管加入制备好的胶体金溶液 1ml,再于各管中加入 10% 氯化钠溶液 0.1ml,静置 2h,以保持红色不变管为胶体金与待标记蛋白的最适比例。

4.3 胶体金与蛋白质的联结 以 10ml 胶体金溶液为基准,加入抗人 IgM 或 IgG 100 μ g,迅速混匀,10min 后加入牛血清白蛋白(BSA)1ml,聚乙二醇 0.1g,混匀,35000r/min 4℃ 离心 30min,弃上清液,沉淀复悬于 1ml pH8.2 PBS 液中。将孔径为 0.65 μ m 的硝酸纤维素膜制成 1cm 直径的方片,用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.6 浸泡,再在 0.01mol/L PBS 漂洗 0.5h,取出晾干后,将备用抗原 0.1 μ l 直接滴加于载体膜上,室温干燥后用 0.5% BSA 液封闭 2h 以上,再用 PBS 洗涤 3 次,干燥后于 4℃ 中保存。将已晾干的抗原膜片装入塑料小盒中,盒内充满吸水材料。在膜的中央滴加血清标本 5 μ l,待渗入后用 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次,然后滴加已制备好的金抗体,待渗入后用 PBS 洗涤 3 次,观察结果,阳性者在膜中央出现红色斑点,阴性则无红色斑点形成。

4.4 抗 HFRS-IgM ELISA、抗 HFRS-IgG 免疫荧光(IFAT)法测定严格按说明书操作。

5 治疗方法 两组病例均给予含电解质等渗的平衡盐液作基础治疗。平衡盐液的种类见《肾综合征

出血热》^[2]。治疗组加用苦黄注射液(内含苦参、大黄、茵陈、柴胡、大青叶,每支 10ml,由江苏常熟制药厂生产),每天 30ml 加入 10% 葡萄糖注射液 250ml 内静脉滴注。参麦注射液(每支 10ml,含红参 1g、麦冬 3.12g、五味子 1.56g,由正大青春宝药业有限公司生产),每天 30ml 加入 10% 葡萄糖注射液 250ml 内静脉滴注。黄芪煎液 125ml(含生药 40g),每天分 2 次口服,由我院药剂科统一代煎。对照组加用利巴韦林注射液(三氮唑核苷注射液,又名病毒唑,由江西东亚药业有限公司生产),每天 600~1000mg 加入 10% 葡萄糖液 250~500ml 内静脉滴注,甘利欣注射液(甘草酸二铵注射液,由江苏连云港正大天晴药业公司生产),每天 30ml 加入 10% 葡萄糖液 250ml 内静脉滴注。两组均以 5 天为 1 个疗程。

6 临床观察项目 每日观察体温、尿量、血压及头痛、腰痛、恶心、呕吐等主要症状和尿蛋白的消长情况,每期观察心、肝、肾、脑、肺等重要脏器的损害情况,随时观察并发症的发生并记录。

7 统计学方法 采用 *t* 检验。

结 果

1 CGIDA 法、ELISA 法及 IFAT 法检测 HFRS 结果 186 例 HFRS 患者用 CGIDA 法检测抗 HFRS-IgM 阳性 132 例(132/186,占 71.0%);用 ELISA 法检测抗 HFRS-IgM,阳性 167 例(167/185,占 90.3%);用 CGIDA 法检测抗 HFRS-IgG,阳性 163 例(163/186,占 87.6%);用 IFAT 法检测抗 HFRS-IgG,阳性 135 例(135/186,占 72.6%)。对 68 例非 HFRS 患者用 CGIDA 法检测抗 HFRS-IgM、抗 HFRS-IgG 的结果均为阴性。另随机抽取 HFRS 患者抗体阳性和阴性血清各 10 份,用免疫滴金法重复检测 5 次,均得到相同结果。

2 两组患者主要临床症状、体征缓解时间结果见表 1。两组除尿蛋白、肾功能缓解时间比较有差异($P<0.05$, $P<0.01$)外,其余症状和体征差异无显著性。

3 两组患者治疗后退热及越期情况

3.1 退热时间(d) 治疗组为 3.28 ± 1.80 ,对照组为 2.84 ± 2.12 ,两组比较差异无显著性。

3.2 越期情况 (1) 越少尿期治疗组为 40 例,对照组为 43 例,两组比较差异无显著性 (2) 发热期直接进入多尿期治疗组为 30 例,对照组为 28 例,两组比较差异无显著性 (3) 越低血压期治疗组 47 例(94.0%),对照组 37 例(72.5%),两者比较,治疗组显著优于对

表 1 两组患者临床症状、体征缓解时间结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	头痛	腰痛	肾区叩痛	酒醉貌	出血点	尿蛋白	肾功能
治疗	3.68±1.62 (41)	5.81±1.87 (50)	5.99±1.81 (50)	2.14±1.41 (28)	5.01±3.20 (50)	6.01±3.80*	11.51±3.02**
对照	3.89±1.47 (40)	5.47±1.45 (51)	5.35±1.40 (50)	2.32±1.12 (31)	4.58±2.90 (51)	4.91±2.91 (51)	7.75±5.36 (38)

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ ()内为例数

对照组($P<0.01$)。

4 并发症发生情况 出现心脏并发症(表现为窦性心动过缓、窦性心动过速及心房纤颤)治疗组 15 例,对照组 11 例;并发支气管周围炎治疗组 4 例,对照组 3 例。

5 药物副反应 两组患者均未出现明显的药物副反应。

6 治疗转归 治疗组 50 例,治愈 46 例,好转 2 例,死亡 2 例;对照组 51 例,治愈 49 例,死亡 2 例。4 例死因均为颅内出血。

讨 论

免疫滴金法又称胶体金免疫斑点试验,是在 20 世纪 80 年代后期发展起来的先进、快速技术,曾成功地用于多种传染病的检测。其基本原理是以微孔滤膜为载体,以胶体金为免疫标记物,通过滤膜的渗滤作用,使抗原抗体反应在膜上迅速完成,最终阳性结果在膜上出现肉眼可见的红色斑点,阴性结果则不会出现红色斑点。本研究以免疫滴金法与酶联免疫吸附法检测 HFRS 患者血清特异性抗体 IgM 相比较,敏感性虽不及后者高,但特异性则比酶联免疫吸附法高,可排除假阳性存在。以免疫滴金法检测 HFRS 患者血清特异性抗体 IgG 与免疫荧光法相比较,特异性和敏感性都比后者更高,而且操作方法更为简便,不需要特殊仪器,实验更为快速,实验时间仅需 5~10min 即可报告结果。本研究检测 186 例结果显示,HFRS 特异性 IgM 和 IgG 抗体均可进行胶体金免疫标记,为早期动态检测抗 HFRS-IgM、抗 HFRS-IgG 消长情况,为判断疗效、预测预后及开展有效预防工作打下了基础,这无疑为早期诊断提供了新的有效手段,现在申报国家发明专利,预见早期诊断试剂药盒推向广大农村基层、广泛推广应用这一方法将具有十分重要的现实意义。

HFRS 发热期应用抗病毒药物利巴韦林是目前较

为公认的治疗措施之一,有报道甘利欣注射液与利巴韦林合用可增强其疗效。本研究对 HFRS 的中医发病机理认为时令疫毒夹风寒湿热外邪,乘机体正虚侵入腠理而发病,且每易热化而成湿热温病,发病早期往往卫气同病,故选用清热利湿解毒、益气固表且气阴兼顾的中西医综合治疗方式以期提高疗效。苦黄注射液由苦参、茵陈、栀子、大黄、大青叶 5 味中药中提取的灭菌注射液,具有清热解毒、利湿祛邪之功效,现代药理研究证实,上述 5 药都具有一定程度的抗病毒、抗真菌、抗细菌和免疫调节作用⁽³⁾;参麦注射液中的人参、麦冬可益气养阴,现代药理研究表明,该制剂能保护心脏、抗休克、改善低氧血症、提高机体免疫功能等作用⁽⁴⁾,佐以黄芪煎液以加强益气固表,诸药合用可起到相互协同、祛邪外出的作用。本研究资料表明,应用苦黄、参麦注射液与黄芪合用治疗 HFRS,经与利巴韦林联合甘利欣组对照观察,在退热天数、主要症状、体征缓解天数方面无明显差别,但尿蛋白消失与肾功能恢复情况,治疗组差于对照组。而越休克期则治疗组优于对照组,越少尿期与从发热期直接进入多尿期,两组情况相似;并发症、药物副反应及治疗转归方面,两组均无明显差别。因此,坚持以基础液体治疗为主的中西医结合综合治疗手段,合理选择两组药物,充分发挥各自优势,值得进一步研究。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国卫生部. 全国流行性出血热防治方案. 1997: 21—28.
2. 储 峰. 肾综合征出血热. 昆明: 云南科技出版社, 1999: 163.
3. 苦黄注射液协作组. 苦黄注射液治疗黄疸型肝炎的临床评价. 江苏医药通讯 1994; 5: 8—17.
4. 蔡 青, 荣烨之, 黄 芳, 等. 参麦注射液对损伤心肌细胞乳酸脱氢酶及心肌细胞超微结构的影响. 中西医结合杂志 1991; 11(5): 286—288.

(收稿 2000-11-24 修回 2001-04-04)