

简易实用的抗 HBs EIA 诊断药盒的研制 及其在新兵体检中的应用

吴鸿银 乔仁良

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

摘 要 研制了一种价廉、质量稳定、操作简便、特别适用于基层部队和广大农村的抗 HBs EIA 诊断药盒, 该药盒 4℃ 下保存 3 个月与新制备药盒性能相似。用本药盒与市售精装药盒对比检测 449 份新兵血清标本, 一致率为 98.89%, 阳性率 (30.5%, 137/449) 略高于市售药盒 (29.4%, 132/449)。阳性标本经中和试验证明特异性良好。

关键词 乙型肝炎表面抗体; 酶免疫测定法 (EIA); 诊断药盒; 新兵体检

乙型肝炎表面抗体 (抗 HBs) 是乙型肝炎的保护性抗体, 其最低保护水平为 10 mIU/ml^[1], 检测抗 HBs 对于乙型肝炎的临床和流行病学以及乙型肝炎疫苗的研制等均有重要意义。目前检测抗 HBs 大多采用酶免疫测定法 (EIA), 市售药盒有两种类型: 一种是简包装, 厂家只提供包被物、酶结合物和抗 HBs 阴、阳性对照。这类药盒虽然价廉, 但由于用户需要预包被, 特别是受固相载体等因素影响, 质量难以控制, 已趋于被淘汰。另一种即所谓精装药盒, 厂家提供预包被板条及滴瓶式酶结合物, 用户使用十分方便, 但价格昂贵。我们研制了一种简易、价廉、适于基层部队和广大农村应用的抗 HBs EIA 诊断新药盒, 并在新兵体检中进行了应用。

1 材料和方法

1.1 新药盒组成

1.1.1 HBsAg 预包被固相反应板条的制备

选用高效价 HBsAg 阳性人血清, 经亲和层析和超离心纯化, 然后用方阵滴定法选出最佳包被浓度用于包被固相反应板条, 每孔 0.1 ml, 4℃ 过夜后经洗涤、稳定剂处理、冷冻干燥机冻干后, 再用铝箔袋密封备用。

1.1.2 HRP · HBsAg 的制备 取上述亲和层析和超离心纯化的 HBsAg 5 mg 与 HRP 10 mg 按本室常规法^[2]制备 HRP · HBsAg, 经方阵滴定确定其工作浓度为 1 : 400, 用 2[#] 保护剂^[3]适当稀释后分装安瓿备用。

药盒中附抗 HBs 阴、阳性对照血清各 1 支, 药盒使用说明书一份。

1.2 其它材料

抗 HBs 特异性、灵敏度和精密性标准品: 购自中国药品生物制品检定所, 特异性标准品 20 份, 批号 9112; 灵敏度标准品含量为 10 mIU/ml, 批号 911; 精密性标准品批号 9112。

中和试验用 HBsAg: 选用原血清为对流免疫电泳阳性的献血员血清, 经 1 : 30 和 1 : 6 稀释后作中和试验用。

新兵血清标本: 取自某部队 1994 年新兵体检血清共 449 份。

酶标检测仪: 原西德产 $\Sigma 960$ 型。

1.3 实验方法

1.3.1 常规法 按药盒使用说明书采用快速一步法。

1.3.2 本法 用含 10% 小牛血清的 PBST 将 HRP · HBsAg 稀释至工作浓度, 然后加入

收稿日期 1994-06-02

HBsAg 预包被反应板条孔内,每孔 50 μ l,再加被检血清标本 50 μ l,其余操作同常规法。

1.3.3 中和试验方法 将 1:30 和 1:6 稀释的 HBsAg 分别与等体积被检血清混合,置 43℃ 水浴 30 min 后取出 50 μ l,按常规检测其抗 HBs。

2 实验结果

2.1 药盒特异性、灵敏度和精密性测定

用新制备的 HRP·HBsAg(N)以及经 2[#] 保护剂稀释后并置 4℃ 保存 3 个月的 HRP·HBsAg(O)分别对 20 份抗 HBs 特异性标准品、抗 HBs 含量为 10 mIU/ml 的灵敏度标准品和精密度标准品作三性测定,结果见表 1。新、旧 HRP·HBsAg 对 20 份抗 HBs 特异性标准品检测结果符合率均为 100%,相对标准偏差均小于 15%,抗 HBs 含量为 10 mIU/ml 的标准品与阴性对照 OD 值之比值分别为 3.37 和 3.00。

Tab 1. Results of specificity, sensitivity and stability tests of the anti-HBs

Tests	Before 3 months(N)	After 3 months(O)
Specificity, %	100	100
Sensitivity, S/N	3.37	3.00
Stability, RSD%	12.27	9.85

2.2 两种药盒检测 449 份新兵血清标本的对比

用市售药盒(本所产,批号 9312)与本药盒对比检测 449 份新兵血清标本,结果见表 2。两种药盒均阳性 132 份,均阴性 312 份,一致率为 98.89%。市售药盒阴性而本药盒阳性 5 份。

Tab 2. Comparison of the detect results on the commercial and tested kits

	Commercial kit		Total
	+	-	
Tested kit +	132	5	137
-	0	312	312
Total	132	317	449

2.3 中和试验结果

为了确认检出新兵血清中抗 HBs 的特异性,选出 10 份血清,分别用 1:30 和 1:6

稀释的 HBsAg 作中和试验,结果见表 3。用 1:30 HBsAg 作中和试验时,10 份标本的 OD 值均有明显下降,用 1:6 HBsAg 作中和试验时,大多数标本均转为阴性。

Tab 3. The results of the neutralization test of the ten anti-HBs positive sera ($A_{450\text{nm}}$ values)

Sample No.	Neutralization test		Control
	1:30 HBsAg	1:6 HBsAg	
10	0.758	0.154	1.114
28	0.186	0.011	0.596
104	0.244	0.032	0.718
123	0.546	0.064	0.706
132	0.620	0.059	0.902
257	0.287	0.011	0.652
263	0.319	0.085	0.767
273	0.187	0.007	0.896
341	0.661	0.121	0.824
370	0.675	0.095	0.962

3 讨论

1)该药盒在 4℃ 保存 3 个月时,其特异性、灵敏度和精密性测定结果均符合国家质量标准。该药盒既保留了简装药盒价廉的优点,又具有精装药盒质量稳定、操作简便的特点。另外还发现^[3],该药盒即使在 37℃ 下存放 14 d,其质量未见明显改变。因此,这种药盒必将受到广大基层部队和农村医务工作者的欢迎。

2)用本药盒与市售精装药盒对比检测 449 份新兵血清标本,结果二者均阳性 132 份,均阴性 312 份,一致率为 98.89%,另有 5 份标本市售药盒阴性而本药盒阳性,本药盒阳性率为 30.5%(137/449)。为证实其特异性,我们曾对部分阳性标本用 1:30 稀释的 HBsAg 作中和试验,结果发现其 OD 值虽然均有明显下降,但仍有一些标本的 OD 值仍很高,为此,又选出 10 份阳性标本,分别用 1:30 和 1:6 稀释的 HBsAg 作中和试验,加大 HBsAg 用量后,大多数标本转为阴性,从而进一步证明药盒特异性是好的。

3)一些学者^[1,4,5]对成年人接种乙肝疫苗后的免疫应答研究表明,首次接种后 7 个月,抗 HBs 阳性率高达 94.9%~100%,而且

大多数受试者均产生高滴度(≥ 500 mIU/ml 或 $S/N \geq 10$)抗 HBs。本研究在新兵体检中抗 HBs 阳性率为 30.5%,中和试验表明大多数阳性标本抗 HBs 滴度较高,推测可能与部分新兵入伍前已接种过乙肝疫苗有关。

参考文献

- 1 李淑秋,石桂荣,井立臣等. 接种乙肝疫苗后抗 HBs 最高滴度与保护水平持久性的关系探讨. 中华流行病学杂志, 1992, 13(3): 134
- 2 吴鸿银,潘秀珍,乔仁良. 检测血清 HBcAg 的简易法. 中国输血杂志, 1992, 5(4): 196
- 3 吴鸿银,乔仁良,何 亮. 不同保护剂对 HRP • HBsAg 保护效果的观察与评价. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1994, (5)增刊: 351
- 4 汪能平,梁焱森,何 超等. 成年人乙肝疫苗接种问题初探. 中华预防医学杂志, 1991, 25(3): 161
- 5 汪能平,梁焱森,何 超等. 血清抗 HBs、抗 HBc 阳性成年人对乙型肝炎疫苗的免疫应答. 中华流行病学杂志, 1992, 13(1): 15

Preparation of the Simple and Useful Anti-HBs EIA Kit and Its Application in New Soldiers Health Check Up

Wu Hongying, Qiao Renliang

The Military Medical Research Institute of Nanjing Command of PLA, Nanjing 210002

Abstract A new kit for detecting anti-HBs was developed. This kit has a high specificity, sensitivity and stability, and it is simple and economical to perform. After stored at 4℃ for 3 months the kit had about the same efficiency, compared with the new one. By using new kit and commercial kit to detecting anti-HBs in 449 sera samples of the new soldiers, the positive rate was 30.5% (137/449) and 29.4% (132/449), respectively, and the coincident rate was 98.89%.

Key words antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs); enzyme immunoassay (EIA); diagnostic kit; new soldiers health check up