

用快速酶联免疫法检测放射工作人员巨细胞病毒感染

吴坚美, 朱波, 朱有名, 韩金祥, 吴围屏

中图分类号: TL75⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)02-0142-02

【摘要】 目的 建立了一种快速检测人巨细胞病毒 (HCMV) 抗体的酶联免疫方法, 了解放射工作人员 HCMV 感染状况。方法 应用常规 ELISA 法稀释液中加入 3% 聚乙二醇 (PEG) 来加速抗原抗体反应的快速法, 对放射工作人员血清 HCMV-IgG、HCMV-IgM 进行检测。结果 514 例济南地区放射工作人员中总阳性率为 96.69%, 其中 94.16% 为潜伏感染, 0.19% 为原发感染, 2.34% 为复发感染, 活动性感染率为 2.53%。结论 放射工作人员患 HCMV 感染性疾病存在一定的危险性, 应引起高度重视。

【关键词】 人巨细胞病毒; 放射工作人员; 聚乙二醇; 酶联免疫吸附

Detection of HCMV Infection of Radiation Workers with Rapid-ELISA Method WU Jian-mei, ZHU Bo, ZHU You-ming et al. Shandong Medical Biotechnology Centre Jinan 250062 China

【Abstract】 Objective To establish a rapid method to detect HCMV with ELISA and to study the infection conditions of radiation workers. Methods using routine ELISA except adding 3% PEG to dilution solution to accelerate the reaction of antibody to antigen, the HCMV-IgG and HCMV-IgM in the serum of radiation workers were detected. Results The total positive rate in 514 radiation workers in Jinan is 96.69%, of which 94.16% is latent infection, 0.19% is primary infection, 2.34% is relapse infection and active infection rate is 2.53%. Conclusion Radiation workers have certain risk to suffer from infection of HCMV which should be dealt with seriously.

【Key words】 Human Cytomegalovirus Infection; Radiation Workers; PEG; ELISA

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus HCMV) 是一种可导致多种疾病的 DNA 病毒, 在人群中的感染极为普遍, 正常情况下, 病毒处于潜伏感染, 通常为隐形感染, 一旦机体的免疫功能下降, 巨细胞病毒又会被活化从而引起疾病, 如传染性单核细胞增多症、胎儿先天性疾病和间质性肺炎^[1]。近几年研究发现 HCMV 感染与糖尿病^[2]、肿瘤^[3]、人类动脉粥样硬化甚至是冠心病^[4-6] 的发生有一定关系, 因此 HCMV 感染的早期快速诊断有重要的意义。2002 年 8 月~2003 年 3 月我们对检测 HCMV 抗体的常规酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行了改良, 从缩短反应时间着手, 建立了快速检测人血清 HCMV-IgG 和 HCMV-IgM 抗体的 ELISA 方法, 对 514 例放射工作人员血清进行检测, 以了解济南市放射工作人员 HCMV 感染状况, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 血清标本 514 名济南地区放射工作人员健康查体血标本, 由山东省医学科学院放射所提供, 抽取静脉血 2 ml 分离出血清, 置 -20℃ 冰箱保存; 类风湿因子阳性血清来自济南市各大医院; HCMV-IgM 和 HCMV-IgG 强阳性、弱阳性、阴性混合血清标本来自济南市计划生育门诊。

1.2 试剂 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人 IgG (γ 链) 和 IgM (μ 链) 购于 SIGMA 公司; 聚乙二醇 (PEG) 粉剂分子量为 6000 为日本产。

1.3 方法

1.3.1 HCMV 抗原的制备 感染 HCMV AD169 株的人胚肺纤维母细胞培养到细胞病变 > 80% 时收集, 灭活处理, -70℃ 反复冻融 3 次, 超声破碎, 离心取上清; 蔗糖密度梯度超速离心, 用少量 PBS 液稀释 HCMV 测定蛋白含量, 加等量体积甘油, -70℃ 保存备用。

1.3.2 常规法检测 HCMV-IgG 和 HCMV-IgM 抗体诊断试剂由本单位研制, 经一系列实验鉴定, 符合中国生物制品标准化委员会编写的中国生物制品规程中的酶联诊断试剂的基本要求^[7]。

1.3.3 HCMV 包被抗原与 HRP-羊抗人 IgG (γ 链) 和 IgM (μ 链) 工作浓度配比 用棋盘滴定法确定工作浓度, 检测时样本稀释液、酶标记物稀释液中加 3% PEG^[8]。

1.3.4 快速 ELISA 试剂制备 用确定的最佳浓度的抗原每孔 50 μl 加于酶标板孔内, 4℃ 过夜, 次日甩掉多余的液体, 用 PBS 加吐温-20 洗涤液洗 1 次, 加封闭液 100 μl (0.1% 明胶/0.01 mmol/L PBS 加 0.5% 牛血清白蛋白), 37℃ 2 h。液体甩掉, 室温除湿干燥, 板条密闭包装, 4℃ 保存。样本稀释液、酶标记物稀释液中除加入加速剂 PEG 外, 在样本稀释液中还配有能消除 IgG 类风湿因子 (RF) 干扰的试剂羊抗人 IgG 血清。

1.3.5 快速 ELISA 法检测程序 ①检测 HCMV-IgM 的加样: 在包被好的酶标板孔中滴加 1 滴 (50 μl) IgM 样本稀释液, 再加稀释好的血清标本 10 μl (0.4 ml 生理盐水加 10 μl 血清混匀); ②检测 HCMV-IgG 的加样: 0.4 ml 生理盐水加 10 μl 血清混匀后, 取 50 μl 加在酶标板相应孔内; ③阴性、阳性对照血清直接加 1 滴 (50 μl) 于相应孔中; ④ 37℃、15 min 洗板 5 次, 拍干; ⑤加酶标记物 1 滴 (50 μl), 37℃、15 min 洗板 5 次, 拍干; ⑥加显色剂 A 液 (H₂O₂)、B 液 (TMB) 各 1 滴, 37℃、10 min; ⑦结果判断: 目测 出现明显蓝色的孔判为阳性, 无色或淡蓝色为阴性; 用 2 当量浓度 (N) 的 H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪测定各孔 OD₄₅₀ 值, > 2.1×阴性对照平均 OD 值判为阳性, 否则为阴性。

2 结果

2.1 快速 ELISA 法的反应温度、温育时间的确定 含有 3% PEG 的样本稀释液、酶标记物稀释液应用于检测中, 选择 37℃、41℃ 两种反应温度, 温育时间选择 15 min、15 min、40 min、40 min、60 min、60 min 三种条件, 与常规法 (37℃ 40 min、40 min) 及常规法 15' (不加 PEG 增加酶标记物含量, 温育为 37℃ 15 min、15 min) 对比检测 3 次, 所得 OD 值取平均数, 不同条件的实验用各自的最佳试验体系 (结果见表 1)。由表 1 所示 37℃ 虽然阳性显色趋势略低于 41℃, 但其阴性 OD 值低而且稳定。37℃ 温育条件下, 用 3 种不同温育时间检测人 HCMV-IgM 和 HCMV-IgG 强阳性、弱阳性、阴性混合血清标本的 OD 值无明显差别, 其与常规法比较也无显著差别; 常规法 15' 检测的 OD 值明显低于常规法, 弱阳性标本没有检出 (0.113 ÷ 0.058 = 1.95 < 2.1

0.119÷0.065=1.83<2.1)。因此将 ELISA 快速法确定为 37℃ 15min 15min

表 1 不同检测方法中 HCMV—IgG、HCMV—IgM 的 OD 值

试剂名称	标本	37℃			41℃			常规法	常规法 15'
		15'	40'	60'	15'	40'	60'		
HCMV—IgM	强阳性血清	0.673	0.681	0.686	0.685	0.689	0.693	0.688	0.323
	弱阳性血清	0.206	0.217	0.220	0.216	0.232	0.235	0.221	0.113
	阴性血清	0.076	0.067	0.069	0.084	0.102	0.083	0.076	0.058
HCMV—IgG	强阳性血清	0.964	0.937	0.978	0.955	0.983	1.058	0.957	0.629
	弱阳性血清	0.241	0.247	0.259	0.255	0.268	0.267	0.253	0.119
	阴性血清	0.068	0.073	0.076	0.084	0.078	0.101	0.078	0.065

2.2 快速法特异性检测

2.2.1 HCMV—IgG 和 HCMV—IgM 抗体阳性血清各 1 份,按 1:50、1:100、1:200、1:400 滴度稀释,然后做检测,可得到良好的剂量依赖曲线。

2.2.2 二巯基乙醇破坏特异性 IgM 试验 取 HCMV—IgM 抗体阳性血清 6 份,按快速 ELISA 法稀释标本后,与 0.1 mol/L 2-巯基乙醇混合,37℃ 作用 1 h 再加入到已包被了相应抗原的酶标板内进行检测,结果全部转为阴性,说明此方法检出的抗体为 HCMV 感染早期的 IgM。结果见表 2。

表 2 2-巯基乙醇破坏特异性 IgM 检测结果

试剂	处理	阳性标本检测 OD 值						阳性对照	阴性对照
		1	2	3	4	5	6		
CMV—IgM	处理前	0.586	0.687	0.457	0.876	0.541	0.436		
	处理后	0.076	0.075	0.087	0.088	0.081	0.074	0.873	0.087
破坏率(%)		87	89	81	90	85	83		

2.2.3 特异性抗体阻断实验 取 HCMV—IgG、HCMV—IgM 抗体阳性血清 6 份,血清标本按快速 ELISA 法稀释后,加入 HCMV 抗原(0.5 mg/mL)混合,37℃ 中和 30 min 做 ELISA 检测,结果测得 OD 值与对照相比至少减少 75% 以上,说明本试剂检测的 IgM 和 IgG 为 HCMV 的特异性抗体。

2.2.4 类风湿因子(RF)对特异性 IgM 的干扰试验 临床上检测 RF 阳性的血清 32 份,应用快速法试剂检测其 HCMV—IgM 抗体,结果只有 1 份 HCMV—IgM 呈阳性;HCMV—IgM 阳性血清 11 份标本,用 RF 乳胶凝集试剂检测,结果没有检测出 RF 阳性标本,说明类风湿因子对本试剂干扰不大。

2.3 快速法稳定性试验 将快速法的预包被酶标板、阴性和阳性对照血清、样本稀释液、酶标记物、浓缩洗涤液、显色剂、终止液全部试剂放入 37℃ 温箱烤 3 d 后,与同时 4℃ 存放的试剂盒比较,每份标本平行测定 5 次,OD 值取平均值,检测 HCMV—IgG、HCMV—IgM 的阴性、阳性标本变异系数(CV)分别为 8.5%、7.2%;9.3%、6.8%,均小于 15%,说明本试剂稳定性良好。

2.4 快速法精密性测定 取 HCMV—IgG、HCMV—IgM 抗体阳性血清各 1 份连续测定 10 孔,检测的 OD 值的 CV 分别是 8.9%、5.4%,均小于 15%。

2.5 快速法不同批号酶联试剂测定 用 3 个不同批次的整套试剂对阳性血清作 10 次测定,OD 值取平均数,结果 HCMV—IgG、HCMV—IgM 的 CV 分别为 7.1%、8.1%,均小于 15%。

2.6 HCMV 感染情况(表 3) 用自制的快速 HCMV—IgM 和 HCMV—IgG 试剂对放射工作人员血清进行检测。

表 3 514 例放射工作人员 HCMV 感染情况

	近期感染		既往感染	合计
	IgM	IgM+IgG	IgG	
阳性例数	1	12	484	497
阳性率(%)	0.19	2.34	94.16	96.69

结果表明,514 例放射工作人员 HCMV 感染的总阳性率为 96.69% (497/514);其中有 0.19% (1/514) 呈现单项 HCMV—IgM 阳性,为原发感染;有 2.34% (12/514) IgM 和 IgG 同时阳性为复发感染,近期感染率为 2.53% (13/514) 提示有活动性

HCMV 感染;有 94.16% (484/514) 的 HCMV—IgG 呈单项阳性,为既往感染,也称为潜伏感染。

3 讨论

目前检测 HCMV—IgM、HCMV—IgG 抗体多用间接 ELISA 法,该方法温育时间在 1 h 以上,耗时较长,不适合快速诊断和流行病学调查。PEG 是 1,2-亚乙基醇聚合而成的一类化合物,其作为促进剂和增强剂,可以提高和加速溶液中抗原、抗体复合物的形成,增强实验的敏感性,缩短实验时间^[9]。本结果发现,将 3% PEG 加在样本稀释液和酶标记物稀释液中的快速法与常规法抗原抗体反应效果无明显差别,但快速法缩短了反应时间。而常规法 15 因反应时间短,特异性抗原抗体没有充分发生反应,可能会出现弱阳性漏检的情况。此次试验在样本稀释液中同时还加入了特定吸附剂羊抗人 IgG 以消除类风湿因子和特异性 IgG 干扰而出现的假阳性结果,从而提高实验的特异性和敏感性。通过二巯基乙醇破坏特异性 IgM 试验,特异性抗体阻断试验、RF 的干扰试验,均说明快速 ELISA 诊断试剂特异性好;一份阳性血清连续检测 10 次,得到的 OD 值变异系数(CV)均<10%,整套试剂 37℃ 存放 3 d 相当于 4℃ 存放 6 个月)后变化率<10%。说明本试剂重复性好,稳定性强。以上结果表明我们研制的快速检测 HCMV—IgG、HCMV—IgM 的试剂质量良好,可用于 HCMV 感染的快速检测和流行病学调查。HCMV 是当今世界上列出的严重危害人类健康的十大病毒之一,可长期潜伏在人体内,HCMV—IgG 阳性是既往感染的标志,也是潜伏的标志,HCMV—IgM 抗体阳性是近期感染的标志。由于 HCMV 是潜伏病毒,复发感染时体内潜伏 HCMV 被激活,特异性 IgM 抗体可再出现^[10]。临床上确诊 HCMV 感染比较困难,主要依赖于实验室诊断。我们对 514 例济南地区放射工作人员血清进行检测,巨细胞病毒感染的总阳性率为 96.69%,其中 94.16% 为潜伏感染,2.14% 为复发感染,0.19% 为原发感染,近期感染率为 2.53%,也就是说 514 名济南市放射工作人员中有 13 人有活动性巨细胞病毒感染,因而会产生 HCMV 感染而引起的疾病,应引起高度的重视。

从事辐射工作的放射工作人员,都或多或少地接受到一些射线,日久天长易引起血象低,免疫力功能下降,目前研究放射工作人员的放射工龄、积累剂量、年剂量与 HCMV 感染性疾病的关系还是空白,有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 董永绥.继续深入进行巨细胞病毒的研究[J].中华儿科杂志,1995,23:3-4.
[2] 陈晖.CMV 感染与糖尿病的关系[J].国外医学病毒学分册,2005,12(1):24-27.
[3] Michaelis M, Korchetkov R, Vogel J, et al. Cytomegalovirus infection blocks apoptosis in cancer cells[J].Cell Mol Life Sci,2004,61(11):1307-1316.
[4] Shen YH, Utama B, Wang J, et al. Human cytomegalovirus causes endothelial injury through the ataxia telangiectasia mutant and P53 DNA damages signaling pathways[J].Circ Res,2004,94(10):22.
[5] Reinhardt B, Minisini R, Mertens T. Opinion article: cytomegalovirus infection and cancer[J].Cancer,2004,94(10):22.

活性炭法测量氡析出率的影响因素研究

刘良军

中图分类号: T1818⁺ 9 X837 文献标识码: A 文章编号: 1004—714X(2007)02—0144—03

【摘要】 用实验研究了活性炭法测介质表面氡析出率的影响因素。采用 24 h 的收集时间, 用含水海绵模拟介质的不同含水率, 使用 100 g 活性炭, 测量混凝土等介质表面时, 活性炭每多吸收 1 g 水造成测量值减少约 1%, 测量石膏介质表面时, 活性炭每多吸收 1 g 水造成测量值减少约 1.85%。正常测量情况下, 在石膏板析出率模型上测量时, 收集时间从 24 h 增大到 48 h 和 72 h 氡析出率测量值分别减小了 12% 和 25% 左右, 对于密度较大的介质, 如混凝土等, 反扩散效应不明显。

【关键词】 氡析出率; 活性炭; 影响因素

Study Of the Influencing Factors Of Measuring Radon Exhalation Rate By the Method Of The Activated Charcoal Absorption LU Liang-jun Radon Laboratory Nanhua University Hengyang 421001 China

【Abstract】 The influencing factor of measuring radon exhalation rate is studied with the method of the activated charcoal absorption. The sampling time is 24 hours and water sponge is used to simulate the medium with different water. We use 100 g activated charcoal to measure different materials. It is found that when we measure concrete surface, activated charcoal absorbs more than 1 g water, reducing the measured value by about 1%. When we measure plaster surfaces, activated charcoal absorbs more than 1 g water, reducing the measured value by about 1.85%. In normal condition, measured value of the radon exhalation rate from plaster surfaces reduces by about 12% and 25% respectively when we lengthen the sampling time from 24 hours to 48 hours and 72 hours. The anti-diffusion effects are not obvious to the medium which is biggish such in density as concrete.

【Key words】 Radon Exhalation Rate; Activated Charcoal; Influencing Factors

测量介质表面的氡析出率是评价天然辐射水平和评价铀矿山退役治理是否合格的重要手段之一。使用局部静态累积法测量介质表面的氡析出率时, 用活性炭收集积累的氡, 用 γ 谱法测量计算氡析出率是最常用的方法之一^[1~3], 该法测量可靠、便宜又可重复使用。一般认为活性炭对氡的强烈吸附效应, 介质表面析出的氡全部为活性炭吸附。由于活性炭对氡的吸附一方面存在吸附和解析的动态平衡过程, 另一方面活性炭对氡的吸附受其吸附的水分多少的影响。如: 文献[4]的作者使用经烘烤的活性炭做氡的吸附试验并与未经烘烤的活性炭比较, 发现后者的氡吸附量比前者少 16%~24%, 且下降量与炭装量和暴露时间的长短无关; 文献[5]的作者对 1 g 活性炭加水 1.5 g 发现其吸附系数下降约 15%。因此, 活性炭累积法测氡析出率时, 累积盒中总有一定的自由氡。由于介质对氡的扩散具有双向性, 即由高氡浓度区向低氡浓度区扩散, 活性炭法测介质表面的测氡析出率同样可能低估真实值, 只是累积盒中氡浓度的增加相对其他方法要小得多, 因此氡的泄漏和反扩散也要小得多, 用活性炭法测得的氡析出率也最接近真实值。

为了氡析出率模型的准确定值, 我们选择了活性炭累积法

作为主测量方法, 并就该方法可能的影响因素作了实验研究。

1 湿度效应研究

1.1 实验方法和装置 为保证实验过程与实际的测量相一致, 我们将吸水的海绵置于测量装置中, 其余测量条件不变, 为达到相同累积时间活性炭吸附水分量的不同, 每次测量使用不同的吸水海绵面积, 吸水海绵的面积 (单位 cm^2) 分别为: 0, 50, 80, 130, 150, 200。吸水海绵用容器装好, 并用铜质筛网支撑该容器。不同的测量采用相同的累积采样时间即 24 h 使用 100 g 活性炭, 活性炭使用前在 120℃ 的温度下烘烤 8 h 时, 并在无氡干燥环境下冷却。收集的活性炭样品放置 3 h 时后开始测量, 整个测量过程中, 环境平均温度基本相同。测量装置为 ORTEC 公司生产的 GEM30P4—Plus 型高纯锗 γ 能谱仪, 测量前先用 ^{60}Co 源进行能量刻度, 然后用已知活度的活性炭标准源刻度 γ 能谱仪的探测效率 (ϵ)。测量使用氦子体 Bi-214 的 609.32 keV 的 γ 特征峰。实验使用的氡析出率源分别为固体氡源、混凝土模型、石膏板模型, 实验装置如图 1 和图 2 所示。上述氡析出率源经过了 3 年以上的监测, 证明是稳定的。图 1 中的磨口玻璃瓶体积约为 2 600 m^3 , 实验时磨口玻璃瓶盖和瓶的结合处用凡士林密封。图 2 中的采样器底面积即收集面积为 615.4 cm^2 , 采样器与模型间用橡皮泥密封。

基金项目: 湖南省科技厅重点项目 (05FJ2003)

作者单位: 南华大学氡实验室, 湖南 衡阳 421001

作者简介: 刘良军 (1963—), 男, 湖南湘潭人, 高级工程师, 从事氡的测量和核电子学研究。

京: 化学工业出版社, 2000

- egilovirus is a risk factor in atherogenesis[J]. Herpes 2002 9 (1): 21—23
- [6] Altannavch TS, Roubaeva K, Buz J, et al. Serological markers of Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus and helicobacter pylori infection in diabetic and non-diabetic patients with unstable angina pectoris[J]. Cent Eur J Public Health 2003 11(2): 102—106
- [7] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程[M]. 北

- [8] 俞建民, 谢忠平, 董承红, 等. PEG 沉淀 HAV 的最佳条件[J]. 中国生物制品学杂志, 1997 10(1): 52—53
- [9] Wenz B, Apuzzo J, Shah DP. Evaluation of the Polyethylene glycol—Potentiated indirect antiglobulin test[J]. transfusion 1990 30(4): 318—21.
- [10] 吕绳敏. 巨细胞病毒感染的实验室诊断[J]. 实用儿科杂志, 1992 7(2): 67—68

(收稿日期: 2006—11—17)