

# 人血清中青霉素抗体的酶联免疫吸附测定

俞小忠, 王 勇, 陈芝河, 项小春

[摘要]目的: 建立检测青霉素抗体的 ELISA法, 并探讨其临床意义。方法: 以氨苄西林用 SPDP法与兔血清白蛋白交联, 用此交联物为包被抗原, HRP抗人 IgG为酶标抗体, 建立检测青霉素抗体的 ELISA法, 并对部分临床标本进行青霉素抗体检测。结果: 建立的方法其批内、批间变异系数分别为 6.8%、8.4%。氨苄西林-兔白蛋白交联物免疫家兔获得兔抗氨苄西林的抗体, 以此抗体作阻断试验, 抑制 HRP抗人 IgG的显色。临床标本检测结果表明, 不同疾病患者青霉素抗体的阳性率不同。结论: ELISA可用于临床对青霉素抗体的检测, 具有较好的特异性、敏感性和重复性。

[关键词] 抗体/分析; 青霉素; 酶联免疫吸附测定

[中国图书资料分类号] R 446.62 R 978.11 [文献标识码] A

Detection of penicillin antibodies in human serum by enzyme linked immunosorbent assay

YU Xiao-zhong, WANG Yong, CHEN Zhi-he, XIANG Xiao-chun

(Department of Clinical Laboratories, Chinese PLA 123rd Hospital, Bengbu 233015, China)

[Abstract] Objective: To establish an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of the antibody of penicillin in human serum. Methods: The ELISA to detect the penicillin antibody was established by adding sera into the polystyrene microtiter plates coated with penicillin conjugated rabbit serum albumin and HRP-conjugated goat anti-human IgG. The penicillin antibody in some clinical samples was detected with this method. Results: The within and between assay CV were 6.8% and 8.4% respectively. The rabbit anti-penicillin antibody which was obtained from penicillin conjugated rabbit serum albumin could control the HRP-anti-human IgG reaction. The positive rate of penicillin antibody in patients with different diseases was significantly different. Conclusion: ELISA is more sensitive and specific in clinically detecting and antibody of penicillin.

[Key words] antibodies/analysis; penicillin; enzyme linked immunosorbent assay

青霉素为最常用的治疗细菌感染性疾病的药物之一, 广泛应用于临床, 同时由于它的严重副作用, 使应用受到一定的限制。国外有关青霉素抗体与过敏反应及副作用的关系研究有较多的文献报道<sup>[1-3]</sup>。为探讨青霉素抗体与青霉素过敏反应的关系, 本研究采用 ELISA法检测青霉素抗体, 并探讨其意义。

## 1 材料与方法

1.1 试剂 氨苄西林为 Serva公司产品, 购自华美公司, 采用 SPDP法<sup>[4]</sup>与兔血清白蛋白交联, 其浓度为 1 000 μg/ml, 包被液为 0.05 mol/L, pH 9.6 CBS, 洗涤液为 0.01 mol/L, pH 7.4 含 0.05% Tween-20 的 PBS 稀释液为 15% 小牛血清的洗涤液, 底物为邻苯二胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 均按常法配制<sup>[5]</sup>。

1.2 氨苄西林抗体的制备 采用氨苄西林-兔血清白蛋白交联物免疫家兔, 制备氨苄西林抗血清, 第一次用氨苄西林-兔血清白蛋白交联物 2 ml 加完

全佐剂 2 ml 皮下多点注射, 20 天后加不完全佐剂同剂量注射, 第 40 天注射同剂量不加佐剂的交联物 1 次, 以后每隔 1 周注射不加佐剂的交联物, 采兔耳静脉血检测青霉素抗体效价合格后放血。抗血清用 50% 饱和度硫酸铵盐析, 提取 γ 球蛋白组份。

1.3 HRP 抗人 IgG 制备 按改良过碘酸钠法<sup>[5]</sup>制备抗人 IgG 酶结合物。经方阵滴定其工作浓度为 1:1 000。

1.4 ELISA 法检测氨苄西林抗体 氨苄西林-兔血清白蛋白交联物用包被液 1:100 倍稀释后包被反应板微孔, 4℃ 过夜; PBS-T 洗孔 5 次, 每次 3 ml; 加 1:10 稀释的血清, 37℃ 40 min 后同上述洗孔; 加 1:1 000 稀释的 HRP 抗人 IgG, 37℃ 40 min 后同上述洗孔; 加底物液, 呈色 10 min 用 2 mol/L 硫酸终止反应, 测 490 nm 吸光度 (A) 值。各反应物加样量均为 100 μl。

1.5 正常上限 以正常对照 A 值的  $\bar{x} \pm 2s$  为正常上限, 高于此限者为氨苄西林抗体阳性。

1.6 统计学方法 采用秩和检验。

## 2 结果

2.1 血清标本最佳稀释度的选择 血清标本的稀释度直接影响方法的灵敏度和特异性, 为降低非特

[收稿日期] 2006-12-26

[作者单位] 解放军第 123 医院 检验科, 安徽 蚌埠 233015 (现工作单位: 南京军区杭州疗养院 检验科, 浙江 杭州 310007)

[作者简介] 俞小忠 (1963-), 男, 副主任技师。

异性吸附,经实验,血清标本以 1:10 稀释度时阴性对照 A 值在 0~0.12 范围内,目测背景无色,故选 1:10 作为血清标本的稀释度。

2.2 重复性与特异性 1 份阳性标本,批内重复测定 20 次,其变异系数为 6.8%;批间重复测定 14 次,其变异系数为 8.4%。用兔抗青霉素血清作阻断试验,其吸光度 A 值从 0.65 降至 0.22。用类风湿因子、抗核抗体阳性血清作干扰试验,结果全部阴性。

2.3 临床测定结果 检测各组青霉素抗体,阳性率见表 1。

表 1 正常对照和各疾病组青霉素抗体阳性率 (%) 比较

分组	n	阳性	阳性率 (%)	Hc	P
对照组	45	1	2.2		
呼吸系疾病组	38	5	13.2**		
心血管疾病组	52	1	1.9**	161.12	<0.005
消化系疾病组	40	1	2.5**		
外科疾病组	150	5	3.3**		
皮试阳性组	15	14	93.3		

两两比较秩和检验,与皮试阳性组比较 \*\* P<0.01

### 3 讨论

青霉素为治疗细菌感染性疾病最常用的药物之一,常可引起皮疹、蛋白尿及血小板和粒细胞减少等副作用,有的可导致过敏性休克,甚至死亡。动物实验表明,青霉素可致动物产生抗体,其抗体的产生有赖于青霉素与大分子物质交联后作为免疫原刺激机体产生<sup>[1]</sup>,推测人体产生青霉素抗体可能为青霉素进入机体后与体内某种蛋白质结合刺激机体所致。本文检测结果表明,各病例组其青霉素抗体的阳性率不同,青霉素抗体的阳性率在不同疾病组之间其差异有统计学意义 (P<0.005),经常使用青霉素致使与人体内某些蛋白结合的几率增加,从而作为抗原刺激机体产生免疫反应的几率增加,抗体阳性率增加。

Storch 等<sup>[3]</sup>对 34 例有显著青霉素毒副作用和 40 例无毒副作用的患者检测了青霉素抗体,结果分别有 27 例和 1 例阳性,并认为青霉素诱发的毒副作用和青霉素抗体之间是一种因果关系。本文对 5 例青霉素抗体阳性的呼吸系系统疾病患者观察发现,5

例中有皮疹 2 例,血小板减少 3 例,提示 IgE 介导的速发型过敏反应是以组织释放活性物质引起急性效应作用的急性病理损伤过程,而 IgG 类抗体介导细胞毒型过敏反应是以激活补体引起组织细胞破坏为主的慢性病理损伤过程。因而青霉素引起的 I 型变态反应与青霉素引起的一般副作用其免疫变态反应机制不同,结果各异。本文对 15 例青霉素皮试阳性的患者检测青霉素抗体,阳性率明显升高,达 94%,提示青霉素过敏患者较一般人群更易产生青霉素 IgG 类抗体,所以阳性率较高。Torres 等<sup>[6-8]</sup>认为,青霉素 IgG 类抗体阳性反而对 IgE 介导的速发型青霉素过敏反应患者有保护作用,可能与 IgG 中和青霉素抗原有关,此有待进一步观察。

由于青霉素分子量小,直接用于包被酶标板不够理想,尚需与大分子物质交联,我们用兔血清白蛋白交联后包被反应板,获得较为满意的效果。此法简便、快速,其重复性与特异性均能满足临床要求,可用于青霉素抗体的检测。

#### [参 考 文 献]

- [1] Kitteringham NR, Christie G, Coleman JW, et al. Drug-Protein conjugates. X. II. A study of the disposition, irreversible binding and immunogenicity of penicillin in the rat. *J. Biochem Pharmacol* 1987; 36(5): 601-608.
- [2] Blanca M, Mayorga C, Perez F, et al. Determination of IgE antibodies to the benzyl penicilloyl determinant. *J. Immunol Methods* 1992; 153(1-2): 99-105.
- [3] Storch WB. Clinical significance of penicillamine antibodies. *J. Lancet* 1988; 2(8604): 214.
- [4] 洪孝庄主编. 蛋白质连接技术 [M]. 北京: 中国医药科学技术出版社, 1993: 17.
- [5] 武建国主编. 实用临床免疫学检验 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989: 97-103.
- [6] Torres MJ, Mayorga C, Panjes R, et al. Immunologic response to different determinants of benzyl penicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock. *J. Allergy* 1999; 54(9): 936-943.
- [7] Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, et al. Controlled administration of penicillin to patients with a positive history but negative skin and specific serum IgE tests. *J. Clin Exp Allergy* 2002; 32(2): 270-276.
- [8] Fernandez T, Torres MJ, R-Pena R, et al. Decrease of selective immunoglobulin E response to amoxicillin despite repeated administration of benzylpenicillin and penicillin V. *J. Clin Exp Allergy* 2005; 35(12): 1645-1650.