

红细胞在不同 pH 下致敏对头孢他啶针剂的 IgM 和 IgG 抗体检测结果的影响

林观样, 郭红, 余磊 (温州医学院附属第一医院药剂科, 浙江温州 325000)

[摘要] 目的 研究在用微柱凝胶免疫法检测人血中头孢他啶针剂的 IgM 和 IgG 抗体时, 红细胞在不同 pH 下被药物致敏后对检测结果的影响。方法 O 型红细胞在苯巴比妥缓冲液 (pH = 7.0, 8.0, 9.6) 中用头孢他啶于室温下孵育 2 小时后作为致敏后的红细胞, 以致敏后的红细胞 (pH = 9.6) 为初试抗原, 测试 600 份待检血清, 根据检测结果选出 10 份血清样品, 阳性 3 份, 弱阳性 3 份, 阴性 4 份, 再分别用经 pH 8.0 及 pH 7.0 时致敏的红细胞检测, 比较结果的异同。结果 红细胞在不同 pH 下致敏对 4 份阴性结果的血清和 3 份阳性结果的血清都没影响, 但 3 份弱阳性标本在 pH 8.0 时一份转阴, 在 pH 7.0 时 3 份都转阴。结论 用微柱凝胶免疫技术检测人血中头孢他啶 IgM 和 IgG 抗体时, 红细胞致敏的 pH 小于 9.6 可能出现假阴性结果。

[关键词] 微柱凝胶免疫; 头孢他啶; IgM 和 IgG 抗体; 红细胞致敏

[中图分类号] R 978.1⁺1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0206-03

Effect on gel microcolumn assay of ceftazidime IgM and IgG in human serum with red cells packed by drug under different pH

LN Guan-yang GUO Hong, YU Lei (Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect on gel microcolumn assay of ceftazidime IgM and/or IgG in human serum with red cells packed by drug under different pH. **Methods** Drug-coated red blood cells were prepared by incubating 10 volumes of ceftazidime in the barbital buffer solution (pH = 7.0, 8.0, 9.6) for 2 hour at room temperature. 600 human serum samples were prepared for the drug-coated red cells test which the incubation pH was 9.6, and 10 samples were selected according to the results. Among 10 samples three were positive, four were negative, the others were weak positive. All were tested by the drug-coated red cells which the incubation pH was 7.0 or 8.0. **Results** In the three weak positive samples, one of them becomes negative when the incubation was pH 8.0, all of them become negative when the incubation was pH 7.0. The other seven were no different between the incubation pH was 9.6 or 8.0 or 7.0. **Conclusion** The results of gel microcolumn assay of ceftazidime IgM and/or IgG in Human Serum may be false negative when the incubation pH is lower than 9.6.

[Keywords] gel microcolumn assay; IgM and IgG; ceftazidime; drug-coated red blood cells

免疫原因的血液学异常是三代头孢的常见副作用之一, 一般认为它与体内存在的药物 IgM 和 IgG 抗体有关^[1], 不过目前还缺乏有效的预警技术。头孢他啶针剂是临床常用的三代头孢类抗菌药物, 在参考青霉素 IgM 和 IgG 抗体检测的基础上^[2], 我们尝试建立用微柱凝胶免疫技术检测对人血清中头孢他啶针 IgM 和 IgG 抗体。该技术属间接 Coombs 法, 其中红细胞被抗原物质致敏的条件较为关键, 以往^[2-4]我们一般选择缓冲液的 pH 值为 9.6, 不过在高 pH 下, 头孢他啶的稳定性降低, 为更好模拟体内真实环境, 我们考察红细胞在

稍低 pH 值下致敏对头孢他啶针剂的 IgM 和 IgG 抗体检测结果的影响。

1 研究对象、仪器和试剂

1.1 研究对象 随机选择 2008 年 4 月份我院内、外、妇产、耳鼻咽喉科 600 例住院患者 (包括初住院尚未用药患者), 男 378 例, 女 222 例, 年龄 20~78 岁, 平均 42.5 岁。

1.2 仪器和试剂 LISS/Coombs/IgG+C3d 微柱凝胶卡 (瑞士 Diamed 公司, 批号 50531.25.55), 卡式定速离心机 (瑞士达亚美公司), 37℃ 恒温孵育器 (瑞士达亚美公司)。注射用头孢他啶钠 (商品名西力欣, 苏州葛兰素, 批号 6006), 不同 pH 值的巴比妥缓冲液 (自制), O 型健康献血员血液 (采自健康献血者, 肝素抗凝)。

[基金项目] 浙江省医学会临床药学科专项 (2007zyc26); 温州市科技局科研项目 (Y20090193)。

[作者简介] 林观样 (1968-), 男, 学士, 副主任药师。Tel: (0577) 88069270, 13867702133, E-mail: lgy@hosp1.ac.cn.

2 方法

2.1 空白 O 型人红细胞的制备 取 10 只试管, 每只试管加 1 ml O 型健康献血员压积红细胞 (由多人等量混合而成) 和 9 ml 生理盐水, 混匀后 2 000 r/min 离心 2 min (离心半径 12 cm), 弃上清液, 用生理盐水洗 3 次, 即成不含药物的空白红细胞。配成 2% 红细胞悬液, 备用。

2.2 头孢他啶化红细胞的制备 分别将 1 g 头孢他啶注射剂溶于 60 ml 不同 pH 巴比妥缓冲液中, 各加入 4 ml 空白 O 型人红细胞, 室温孵育 2 h 用生理盐水洗涤红细胞 3 次, 即成头孢他啶化红细胞。配成 2% 红细胞悬液, 备用。

2.3 待检血清的制备 收集研究对象的血液, 肝素抗凝作为待检样品, 经 2 000 r/min 离心 2 min (离心半径 12 cm), 取上清液低温保存。测试时取适量血清置 56 °C 恒温水浴箱中, 保温 30 min 灭补体后备用。

2.4 空白红细胞微柱凝胶的制备 取 40 μl 2% 红细胞悬液加于微柱凝胶卡中, 再加补体灭活后的血清 100 μl 置 37 °C 恒温孵育器中孵育 20 min, 置卡式定速离心机中 1 030 r/min 离心 10 min, 读取结果。

2.5 含药红细胞微柱凝胶的制备 取 40 μl 2% 含药红细胞悬液加于微柱凝胶卡中, 再加补体灭活后的血清 100 μl 置 37 °C 恒温孵育器中孵育 20 min, 置卡式定速离心机中 1 030 r/min 离心 10 min, 读取结果。

2.6 含药红细胞微柱凝胶对照组的设立 用 100 μl 0.9% 氯化钠注射液代替灭活补体后的血清, 其余操作同 2.5 项下。

3 结果

3.1 阳性结果的判定 观察离心后的微柱凝胶, 红细胞群完全沉积于凝胶柱底部者为阴性, 红细胞群完全停留于凝胶柱上部者为阳性, 红细胞群分布于凝胶柱中间者为弱阳性。典型结果见图 1。

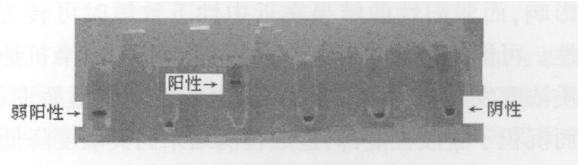


图 1 头孢他啶 IgM 和 IgG 抗体的微柱凝胶免疫检测测定典型结果

3.2 重复性试验结果 用在 pH 为 9.6 的缓冲液下致敏的红细胞测试, 600 份待检血清经 2 次平行检测, 阳性 6 份, 弱阳性 8 份, 阴性 586 份, 2 次检测结果中阳性、阴性的血液标本号完全相同, 说明操作技术较稳定。

3.3 干扰试验结果 用在 pH 为 9.6 的缓冲液下致敏的红细胞测试, 待检血清、补体灭活血清和生理盐水对非头孢他啶化红细胞都表现为阴性。提示两种血清对上法制备的多人混合的健康献血者 O 型人红细胞都没有凝集反应。待检血清、补体灭活血清和生理盐水对头孢他啶化红细胞中的结果一致, 表现为阳性、阴性的血液标本号完全相同。说明待检血清中的补体及其他组分对阳性反应的结果没有干扰。结合阴性对照组的的结果, 可确定阳性血清具有头孢他啶针剂抗原反应特性。

3.4 不同 pH 值下致敏红细胞的检测结果 根据 3.2 项的筛查结果, 选取 10, 11, 17, 197, 202, 354, 355, 561, 562 号等 10 例患者的血清作为检测样品。分别用不同 pH 值下致敏红细胞测试, 结果阳性和阴性的不变, 不同 pH 值下致敏对弱阳性结果有一定影响。详见表 1。

表 1 红细胞在不同 pH 值下致敏对 10 份血清的检测结果

	样品号									
	11	202	354	561	197	17	10	203	355	562
pH 7.0 组	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
pH 8.0 组	+	+	+	+-	+-	-	-	-	-	-
pH 9.6 组	+	+	+	+-	+-	+-	-	-	-	-

注: + 为阳性, +- 为弱阳性, - 为阴性。

4 结论与讨论

4.1 头孢他啶针剂中含有半抗原物质, 当这些成分被红细胞吸附后 (头孢他啶化) 可成为全抗原, 这种具有抗原性质的颗粒可被血清中的头孢他啶抗体桥连而形成一定大小的团块, 再与微柱凝胶中非特异

性 IgG 的连接变成更大的团块, 以致不能通过凝胶柱中微小的凝胶孔隙, 从而停留于凝胶柱上端。相反, 如果血清中没有头孢他啶抗体, 头孢他啶化的红细胞就会在离心力的作用下穿过凝胶柱, 从而沉积于凝胶柱底部。当药敏化的红细胞和头孢他啶抗体不是以最佳比例结合时, 团块可分布在凝胶柱中间,

呈现弱阳性。

4.2 在间接 Coombs法中,红细胞通常是在 pH 9.6 的苯巴比妥缓冲液中被抗原物质致敏^[4],考虑到此 pH 与临床用药条件差别较大,因此本研究比较近中性下致敏对结果的影响。结果表明,阳性的结果不受 pH 影响,而弱阳性的结果在近中性下致敏时可转为阴性。可能的原因是此条件下红细胞表面的半抗原物质浓度发生变化,不能被血清中的抗体合适桥联,从而沉积于凝胶柱底部,造成检测结果的灵敏度降低。

【参考文献】

[1] Amdt PA, Leger RM, Gamatty G. Serology of antibodies to sec

ond and third generation cephalosporins associated with autoimmune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests [J]. *Transfusion* 1999; 39: 1239.

[2] 谢作昕, 钱林利, 陶志华, 等. 血清青霉素 IgM 和 IgG 抗体检测方法的建立及评价 [J]. *中华检验医学杂志*. 2006, 29(6), 527.

[3] 谢作昕, 季丽丽, 陶志华, 等. 血清抗头孢菌素和抗青霉素 IgG 与 IgM 抗体联合检测分析 [J]. *临床检验杂志*. 2008, 26(2): 132-134.

[4] 吕鹏. *最新输血技术学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 432.

[收稿日期] 2009-08-24

[修回日期] 2009-11-03

(上接第 185 页)

表 6 溶出方法对穿心莲内酯片溶出度的影响 (%)

溶出方法	取样时间 (min)				
	10	20	30	45	60
第一法	13.00	27.42	39.50	52.87	68.25
第二法	7.75	32.62	42.26	59.52	69.46

第一法和第二法溶出曲线经过 t 值法分析无显著性差异, 本研究选择中国药典第一法 (转篮法)。

2.3.3 穿心莲内酯片与自乳化软胶囊的溶出曲线对比研究 取本品, 照溶出度测定法 (药典 2005 年版二部附录 X C 第一法), 以 900 ml 的 0.2% SDS 为溶出介质, 转速为 100 r/min 依法操作。于第 10、20、30、45、60 分钟取样 1 ml 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液待测。穿心莲内酯的浓度用高效液相色谱法测定, 溶出曲线见图 1。

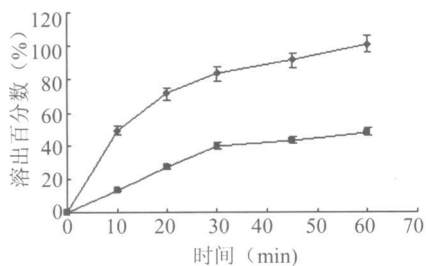


图 1 穿心莲内酯溶出曲线

◆-穿心莲内酯片; ■-穿心莲内酯自乳化软胶囊

穿心莲内酯自乳化软胶囊溶出度测定结果表明, 其 t₅₀ 约为 9 min, T_d 约为 12 min, 45 min 时溶出度均在 70% 以上, 溶出参数方差分析结果表明, 穿心莲内酯自乳化软胶囊与穿心莲内酯片溶出度有显著性差异, 说明自乳化软胶囊能显著提高穿心莲内酯的体外溶出度。

3 讨论

3.1 穿心莲内酯的溶解性差, 因此选择适当的溶出介质是研究穿心莲内酯新制剂溶出度评价的关键一步。通过试验筛选, 确定以 0.2% SDS 为溶出介质。试验结果也表明, 穿心莲内酯不同制剂能够在该溶液中有效地区分, 均匀性好。

3.2 自乳化释药系统目前在国内研究得相对较少, 国外也刚刚起步。现在上市的产品有环孢素软胶囊。自乳化释药系统是一种非常有前景的新剂型, 将为解决大量水溶性差的药物的口服吸收提供一个新的途径, 尤其对那些在水中不稳定, 生物利用度又低的药物意义更大, 具有巨大的经济和社会效益。

【参考文献】

[1] 中国药典 2005 年版一部 [S]. Vol I 2005

[2] Shen YC, Chen CF, Chiu WF. Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide [J]. *Planta Med* 2000, 66(4): 314

[3] 李玉祥, 樊华, 张劲松, 等. 中草药抗癌的体外实验 [J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(1): 37

[4] Julianto T, Yuen KH, Noor AM. Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation [J]. *Int J Pharm*, 2000, 200(1): 53.

[5] Krishna G, Sheh BB. A novel self emulsifying parenteral drug delivery system [J]. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999, 53(4): 168.

[6] Geishank G, Benzeno S, Benita S. Interaction of a self emulsifying lipid drug delivery system with the evened rat intestinal mucosa as a function of droplet size and surface charge [J]. *Pharm Res* 1998, 15(6): 863.

[7] HU RM. A quantified analysis of the dielectric dispersion in a simple emulsion system [J]. *Int J Pharm*, 2001, 227(1-2): 139.

[8] Charman SA, Chaman WN, Pouton WC, et al. Self emulsifying drug delivery systems formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound [J]. *Pharm Res* 1992, 9(1): 87.

[收稿日期] 2010-01-15

[修回日期] 2010-02-22