

时间分辨免疫荧光技术在病毒检测中的应用

左曙生 李钟铎

摘要 目前,时间分辨免疫荧光技术(TR-IFMA)已有的两大系统即LKB系统和Cyberfluor系统均已应用于病毒的检测,主要检测的病毒有腺病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒,轮状病毒、乙肝病毒、艾滋病毒、风疹病毒等,与酶联、放免等其它方法相比,TR-IFMA具有敏感性高,特异性强,临床符合率高等优点,TR-IFMA检出病毒抗原的最低值在10~100pg之间,双标记TR-IFMA的应用也具有较好的效果,TR-IFMA还可用于病毒核酸的检测,其检出的靶区域可达pg水平。

关键词 时间分辨免疫荧光技术 病毒

时间分辨免疫荧光分析技术(Time-Resolved Immunofluorometric Assay简称TR-IFMA)是80年代兴起的一项微量分析检测技术,它主要是利用镧系元素(Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 等)螯合物所产荧光具有半衰期长的特点,在每次紫外光激发后停留一段时间开始荧光测量,这时非特异性荧光基本衰变完全,故而较大地消除了本底荧光的影响。与传统的免疫学方法如放免法(RIA)、酶联法(ELISA)、免疫荧光法(IFA)等相比,TR-IFMA具有敏感性高,特异性强,无放射污染,标记物稳定,重复性好,检测迅速等优点。目前,时间分辨免疫荧光技术有两个系统,一是LKB公司推出的解离增强免疫荧光系统,该系统采用多羧基化合物作为连接镧系元素及蛋白质的桥梁,通过加入含 β -丙二酮类化合物的增强液使镧系元素从标记物上解离下来并形成产生荧光的螯合物,另一种是加拿大Cyberfluor公司推出的荧光免疫系统,该系统采用螯合剂4,7-二苯磺基-1,10-邻二氮二杂菲-2,9-二羧酸(BCPDA)连接镧系元素与蛋白,直接检测吸附在白色不透明滴定条孔中的镧系元素螯合物所产生的荧光。两系统均已推出适于本系统荧光测量的时间分辨荧光仪^[1~2]。自从首次利用TR-IFMA检测风疹病毒抗体以来,仅十多年的时间,TR-IFMA已

在呼吸道及胃肠道病毒,风疹病毒(RSV)抗原抗体,乙肝病毒表面抗原(HBsAg),艾滋病毒(HIV)抗体的检测中应用。到目前为止,TR-IFMA在病毒检测中的应用主要采用的是LKB系统^[3~16],而Cyberfluor系统也有一些试用^[17]。

一、时间分辨免疫荧光技术在呼吸道及胃肠道病毒检测中的应用:目前,TR-IFMA较多地应用于呼吸道鼻咽分泌物及胃肠道排泄物中病毒的检测,如腺病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、轮状病毒等,它具有敏感性高,特异性强,检测迅速的特点,有较好的临床检测意义。能够贮存的检测多种呼吸道病毒的滴定条适用于常规大量的标本检测,这方面的工作主要由芬兰Wallac实验室开展。

Hierholzer(1989)采用TR-IFMA检测鼻咽分泌物(NPS)中呼吸道合胞病毒(RSV)及副粘病毒(PIV),同时与酶联中最敏感的全单克隆生物素亲和素酶联法和多克隆抗体捕捉酶联法相比较,实验以病毒培养结果作为阴阳性对照。对于RSV,TR-IFMA的阳性检出率为92%,明显高于上述酶联法的62%,76%;对于各型PIV,TR-IFMA的阳性检出率为

本文作者单位:军事医学科学院微生物流行病学研究所
100850 北京

94%~100%，也高于两种酶联法的75%~89%和66%~95%。以病毒培养作为对照，所有试验没有假阳性结果，酶联法较低的阳性检出率归因于标本中病毒滴度较低。TR-IFMA最低检出抗原值分别为0.8ng/mlRSV, 5ng/mlPI-1, 1ng/mlPI-2, 1ng/mlPI-3。包被好的滴定条在湿盒中4℃储存18个月不会降低敏感性^[3]。1987年他曾用该技术检测NPS及粪便中的腺病毒，结果是对于NPS标本，该法与酶联法没有显著差别；对于粪便标本，阳性率明显高于酶联法^[4]。

1989年Walls与芬兰学者合作利用TR-IFMA检测NPS标本中流感病毒甲、乙两型，实验检出最低值为10pg重组DNA所表达的甲型流感核蛋白^[5]。

二、时间分辨免疫荧光技术在乙肝等其它病毒抗原抗体检测中的应用：HBsAg的检测是TR-IFMA在病毒检测中应用较早的一例。1983年芬兰Siitari利用乙二胺四乙酸(EDTA)的氨基苯衍生物作为桥连接物进行血清中HBsAg的检测，该实验中TR-IFMA分别采用了两步法和一步法。所谓一步法实验，就是将标本和标记检测物同时与包被抗体反应，由于本法液相中抗原与标记抗体更加充分的反应，因而较两步法与RIA有更高的敏感性。在本实验中，一步法、两步法及RIA的敏感性分别为0.2ng/ml、1ng/ml及0.5ng/ml，其中一步法敏感性最高。放免的一步法实验敏感性较两步法反而有所降低，说明TR-IFMA中标记物的稳定性较好，受杂质成分的影响较小^[6]。1990年李振甲等采用二乙烯三胺五乙酸无水二酐(cDTPA)将Eu³⁺与抗HBsAg McAb结合，制备干燥物对96份血标本进行HBsAg检测，阳性率70.83%，高于酶联法的55.21%，其中本法阳性而酶联法阴性者19例，酶联法阳性而本法阴性者2例，差别显著^[7]。

Aceti (1987) 利用TR-IFMA检测人血清中高滴度和低滴度的抗HIV抗体，并与ELISA和RIA相比较，结果TR-IFMA具有

较高的抗体滴度。以IFA和(或)蛋白印迹法(WB)结果作为阴阳性对照，检测555份不同来源的血清，其中包括7份易产生假阳性的非洲人血清。475份采用了ELISA对照，结果TR-IFMA检出的阳性率为26.7%，ELISA为29.7%。经IFA和WB证实，没有假阴性出现，灵敏度均达100%，而ELISA实验中141份阳性血清有16份为假阳性(包括7份非洲人血清)，TR-IFMA仅两份(来源于献血者)，ELISA和TR-IFMA的特异性为87.5%及99.4%，由统计学方法分析，差别显著^[8]。

Meurman和Guido分别于1982年和1989年利用该技术检测风疹病毒抗原抗体，与其它的方法比符合率高，敏感性也较高^[9,10]。

三、双标记时间分辨免疫荧光技术在病毒检测中的应用：镧系元素中Eu³⁺作为标记物，敏感性最好，如果采用另一种镧系元素Tb³⁺或Sm³⁺标记不同的蛋白，与Eu³⁺标记物同时检测标本中两种不同的抗原，称之为双标记TR-IFMA。

Siitari 1990年采用双标记(Eu³⁺, Tb³⁺) TR-IFMA检测粪便中的腺病毒和轮状病毒，所用增强液含三甲基乙酰三氟丙酮(PTA)以利于Tb³⁺的荧光测量，采用的是一步法，整个实验只需1.5小时，两种病毒检出结果与酶联法基本一致，仅有一份标本TR-IFMA检出轮状病毒呈弱阳性，而酶联法阴性。与单一的Eu³⁺标记法相比，双标记法灵敏度有所降低，两种病毒的检出灵敏度在10ng/ml以下，而单标记法则在1ng/ml以下。究其原因，对于Eu³⁺标记物来说，增强液中含PTA而不是它最适合的2-萘酰三氟丙酮(2-NTA)，对Tb³⁺标记物来说，其检出的敏感性本来就低于Eu³⁺标记物^[11]。

Saarma 1989年采用Eu³⁺、Sm³⁺标记抗体，用2-NTA配制增强液检测样本中的马铃薯病毒X(PVX)及马铃薯病毒Y(PVY)。检出的灵敏度为1ng/ml，较双抗体夹心酶联法敏感^[12]。

四、时间分辨免疫荧光技术在病毒核酸检测中的应用：TR-IFMA也可用于病毒核酸的检测，Eu³⁺可以直接标记核酸，也可以标记能与核酸结合的半抗原如7-碘-N-醋酸-N-2-乙酰氨基苄（AAIF）的抗体或抗抗体，还可以标记亲和素及链亲和素等。捕获用的核酸可以直接包被滴定杯，也可以包被纤维素膜，待增强液解离增强后再将液体移至滴定杯中进行测量。

Syvänen 1986年检测了腺病毒（ADV）DNA，采用待测DNA直接包被纤维素膜，Eu³⁺标记AAIF的抗抗体的方法，实验发现可检出0.3pg的靶区域，此法较夹心法敏感性高，但待测DNA要求经过一定的纯化^[13]。

Dahlén 1987年采用夹心法检测核酸，实验以微滴定条为固相，以Eu³⁺标记链亲和素（SA）检测生物素化探针，检出PBR322的敏感性为4×10⁵个分子，较其它非放射夹心杂交实验敏感^[14]。同年他对Ⅱ-型腺病毒DNA检测，用腺病毒直接包被滴定条孔，Eu³⁺标链亲和素检测生物素化核酸探针，发现标记值为10Eu³⁺/SA时效果较好，该法最低检出值为10pgAd₂DNA^[15]。1988年他又用该技术检测腺病毒DNA并应用于临床，这次用DNA样本直接包被纤维素膜，Eu³⁺螯合物直接标记核酸作为探针，与放免法相同，检出的灵敏度在10~100pg之间。用放免，非同位素杂交和TR-IFMA三种方法检测20份标本中腺病毒核心抗原，所得结果完全相同^[16]。

有些病毒的检测方法不多如人乳头瘤病毒（HPV），目前仅核酸杂交具有检测价值。Wallac 1991年采用Eu³⁺标记链亲和素的夹心法检测HPV-16，检测的灵敏度为2×10⁵个分子（相当于2pg靶DNA）。

综上所述，时间分辨免疫荧光技术在病毒检测领域中具有重大应用前景，预计今后至少将部分取代放免而成为一项重要的检测手段，然而，时间分辨免疫荧光技术也有它的不足，如LKB系统中所采用的增强液对外界Eu³⁺污

染比较敏感，进口的时间分辨免疫荧光仪比较昂贵等，如果国产化仪器试制成功，将大大推进TR-IFMA在我国检测领域中的应用。

Application of the Time-resolved Immunofluorometric Assay in the Detection of Viruses Zuo Shusheng, et al., Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

Two systems of time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA), i.e., LKB system and Cyberfluorsystem, were applied in the detection of viruses. The viruses detected were mainly adenovirus, influenza virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus, rotavirus, hepatitis B virus, human immunodeficiency virus, rubella virus, etc. Compared with methods of ELISA and RIA, TR-IFMA has the merits of high sensitivity, specificity and consistency with clinical diagnosis. The low detection limit of virus antigen by TR-IFMA is between 10~100pg. The application of dual-label TR-IFMA also showed good effect. TR-IFMA can also be used in the detection of viral nucleic acids. The target region detected may reach the level of pg.

Key words Time-resolved immunofluorometric assay Viruses

参 考 文 献

- 1 I.Hemmilä. Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays. Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1988, 48: 389.
- 2 P. Diamandis. Immunoassays with Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy: Principles and Applications. Clin. Biochem, 1988, 21: 139.
- 3 J.C.Hierholzer, P.G.Bingham, R.A.Coombs, et al. Comparison of Monoclonal Antibody Time-Resolved Fluoroimmunoassay with Monoclonal Antibody Capture-Biotinylated Detector Enzyme Immunoassay for Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus Antigen Detection. J.Clin. Microbiol, 1989, 27: 1243.

- 4 J.C.Hierholzer, Kaija H.Johansson, Larry J. Anderson, et al. Comparison of Monoclonal Time-Resolved Fluoroimmunoassay with Monoclonal Capture-Biotinylated Detector Enzyme Immunoassay for Adenovirus Antigen Detection J.Clin.Microbiol, 1987, 25: 1662.
- 5 Harriet H. Walls, Kaija H. Johansson, Maurice W. Harmon, et al. Time-Resolved Fluoroimmunoassay with Monoclonal Antibodies for Rapid Diagnosis of Influenza Infections. J.Clin. Microbiol, 1986, 24: 907.
- 6 H.Siitari, I. Hemmila, E. Soini, et al. Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay. Nature, 1983, 301 (20): 258.
- 7 李振甲, 杨梅芳, 陈素娟, 等. 时间分辨荧光免疫测定技术及其初步实验研究. 解放军医学杂志, 1990, 15 (1): 24.
- 8 A.Aceti, Tiffi F, Verani P, et al. Time-Resolved Immunofluorescence: a Sensitive and Specific Assay for Anti-HIV Antibody Detection in Human Sera. J.Virol. Methods, 1987, 16: 303.
- 9 Meurman OH, Hemmila IA, Lovgren TN, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay: a new test for rubella antibodies. J.Clin. Microbiol, 1982, 16: 920.
- 10 Guido Scalia, Gerna G, Halonen PE, et al. Detection of Rubella Virus Antigen by One-Step Time-Resolved Fluoroimmunoassay and by Enzyme Immunoassay. J. Med. Virol, 1989, 29: 164.
- 11 H.Siitari. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for the simultaneous detection of adenovirus and rotavirus in faeces. J. Virol. Methods, 1990, 28: 178.
- 12 Saarma M, Jarvekulg L, Hemmila I, et al. Simultaneous quantification of two plant viruses by double-label time-resolved immunofluorometric assay. J. Virol. Methods, 1989, 23 (1): 47.
- 13 Ann-christine Syvanen, Paul Tchen, Marjut Ranki, et al. Time-resolved fluorometry: a sensitive method to quantify DNA-hybrids. Nucleic Acids Research, 1986, 14 (2): 1017.
- 14 P. Dahlén, Ann-christine Syvanen, Pertti Hurskainen, et al. Sensitive detection of genes by sandwich hybridization and time-resolved fluorometry. Molecular and Cellular Probes, 1987, 1: 159.
- 15 P. Dahlén. Detection of Biotinylated DNA Probes by Using Eu-labeled Streptavidin and Time-Resolved Fluorometry. Analytical Biochemistry, 1987, 164: 78.
- 16 P. Dahlén, Pertti Hurskainen, Timo Lovgren, et al. Time-Resolved Fluorometry for the Identification of Viral DNA in Clinical Specimen. J. Clin. Microbiol., 1988, 26: 2434.
- 17 M. Brown, Shami Y, Zywuiko M, et al. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for Enteric Adenoviruses Using the Europium Chelator 4, 7-Bis(Chlorosulfohenyl)-1, 10-Phenanthroline-2, 9-Dicarboxylic Acid, J. Clin. Microbiol, 1990, 28: 1398.

(收稿: 1993-01-20 修回: 1993-06-21)

额尔古纳右旗在押人员性病调查分析

李春和 罗学秋

1991年11月, 作者对额尔古纳右旗看守所在押人员29人(男28人, 女1人, 年龄为16~49岁), 按全国性病防治中心推荐的STD调查方案, 进行STD患病情况调查。结果查出淋病2例, 尖锐湿疣3例; 年龄最小17岁, 最大30岁, 其中, ~20岁3例, ~25岁1例, ~30岁1例; 干部1例、工人2例、无业2例; 小学文化

2例、初中2例、中专1例。患病者中3例有不洁性病史, 1例是强奸犯, 1例与前妻再婚后感染。5例患者均为青壮年, 道德、法制观念缺乏、对性病危害认识不足。对在押人员的性病病人, 如不经正规治疗, 返回社会将成为性病传染源。

本文作者单位: 内蒙古额尔古纳右旗防疫站 022250