

应用系列呼吸道病毒单克隆抗体快速检测 分泌物中的病毒抗原

段佩若 张励力 李晓光 刘 华 李凤秀 张会川 林 京

摘要 应用系列主要呼吸道病毒〔呼吸道合胞病毒(RSV), 甲型流感(FluA)、乙型流感(FluB)、副流感1、3型(PIV1.3)、副流感2型(PIV2)病毒共6种〕单克隆抗体(McAb), 联接APAAP桥联技术, 深入部队对260例呼吸道感染青年战士的鼻咽部脱落细胞中的抗原进行检测。检出FluA抗原18例, PIV2抗原10例, FluB和RSV各1例。以上结果经间接免疫荧光(IFA)以及阻断和替代试验, 证实系列单克隆抗体检出抗原结果是特异的。笔者认为本方法是临床快速诊断以及流行病学调查的有效手段。

关键词 呼吸道感染 单克隆抗体

呼吸道感染是最常见的流行病, 它的症状可以从隐性感染直到危及患者生命〔1〕。因此, 系列呼吸道病毒多病原的快速检测, 对临床及时诊断和疫情报告均有重要意义。本文介绍我们在1993年2~4月份, 对北京部队260例战士的呼吸道感染者分泌物, 应用系列单抗联接碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase-Anti Alkaline Phosphatase, APAAP)桥联技术, 进行呼吸道病毒抗原检测, 获得满意结果。

材料与方 法

一、系列单克隆抗体: RSV-McAb为本实验科制备〔2〕。PIV1.3和PIV2-McAbs为本实验科制备〔3〕。甲和乙型流感病毒McAb, 从中国预防医学科学院病毒学研究所购进〔4〕。

二、APAAP复合物的制备: 碱性磷酸酶单克隆抗体, 本院实验科制备, 1B5株杂交瘤培养上清, 加入12u/ml碱性磷酸酶(美国Promega公司产品), 其它按文献〔5〕制备APAAP复合物。

三、APAAP桥联技术操作: 于患者脱落

细胞涂片上, 首先滴加10~15 μ l 0.2%牛血清白蛋白, 于37 $^{\circ}$ C封闭20分钟, 其它操作按文献〔6,7〕进行。APAAP操作中的兔抗鼠IgG(二抗), 由本室制备与纯化。

四、检测标本及其特异性试验:

1. 标本来源: 于1993年2、3月份, 分别对来自南苑、北苑、长辛店及南口等5个部队的男性青年战士, 凡留标本者逐个进行呼吸道临床症状登记。对260例患者采集咽部脱落细胞。

2. 标本采集方法及标本制备, 按文献〔6,7〕进行, 由于是多病原检测, 每份标本涂5个点(每张玻片), 每个圆点直径4~6mm, 共涂3张片子。

3. 特异性试验: 对经检测后已确定的FluA和PIV2阳性标本, 按文献〔3,7〕进行阻断试验和小鼠血清替代试验。鸡抗FluA血清和兔抗PIV2血清, 购于中国预防医学科学院病毒学研究所。

五、对照试验:

1. IFA对照: 兔抗鼠荧光标记IgG, 本实

验科自行免疫、纯化与标记。首先对标本涂片,以0.2%牛血清白蛋白进行封闭20分钟,然后按间接免疫荧光法对FluA和PIV2标本进行检测。

2. 病毒阳性对照: RSV、A和B Flu、PIV1.2.3型6种病毒,本实验科分别以Vero细胞、MDCK细胞以及BHK21细胞进行复制并制成基质片,以相应的单抗与病毒结合,作APAAP染色。

3. 细胞阴性对照: 未感染病毒的Vero细胞、MDCK细胞以及BHK21细胞传代复制分别制成基质片,以APAAP染色。

结 果

一、系列McAbs对260份呼吸道分泌物标本涂片的抗原检测结果: 见附表。附表所示,除极个别标本检出了RSV和FluB抗原外,主要检出的病毒抗原是FluA(18例)和PIV2(10例),并且APAAP技术和IFA技术抗原检测结果基本一致,FluA APAAP阳性18例,仅1例在IFA法中未检出,PIV2 APAAP阳性10例与IFA完全相符,其阳性符合率100%,阴性符合率>99%。

附表 系列单抗检测呼吸道鼻咽部脱落细胞中病毒抗原结果

类别	APAAP技术(n=260)		IFA技术(n=260)	
	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
RSV	1	0.38	—	—
FluA	18	6.90	17	6.50
FluB	1	0.38	—	—
PIV1.3	0	0.00	—	—
PIV2	10	3.80	10	3.80

— 未检测

二、特异性试验结果: (1) 阻断试验: 选出10份已检出的典型FluA阳性标本和5份典型PIV2阳性标本涂片,以原倍鸡抗FluA和兔抗PIV2血清竞争阻断后,APAAP呈阴性结果。

(2) 替代试验,以1%小鼠血清代替McAbs,

全部呈阴性结果。

三、对照试验结果:

1. IFA技术对FluA和PIV2结果进行复核对照,仅1例阳性结果与IFA不符,见附表。

2. 阳性对照结果: 系列呼吸道病毒McAbs分别与相应的RSV、FluA、FluB、PIV1、PIV2、PIV3 6种病毒抗原片作用,以APAAP和IFA染色,结果全部为强阳性。

3. 阴性对照结果: Vero、MDCK、BHK21分别加RSV-McAb、FluA.B混合McAbs、PIV1.2.3混合McAbs,以APAAP和IFA染色全部呈阴性。

讨 论

近年来随着国内各类抗生素的广泛应用,呼吸道细菌感染有所降低,且病毒性肺炎和支气管炎却相对更加突出,而医院目前对呼吸道病毒不能及时确诊,造成滥用抗生素以及医源性交叉感染比比皆是。所以,呼吸道病毒抗原在2~3小时内的快速诊断,有重要的实际意义。笔者于1990、1991和1992年曾采集那些高热住院患者的脱落细胞标本,每类病毒感染检出率均较高[3,6,7]。本次应用系列呼吸道病毒McAbs,所检测的对象均非住进医院、高热重症呼吸道感染的患者,而系北京呼吸道感染的高峰季节(1993年2~4月份),即春节前后,部队呼吸道感染增多,临床症状不十分严重,仍坚持工作和训练的青年战士,所以他们的病毒抗原检出率较低,只有11%左右,又由于对象是青年而不是小孩,所检出的病原不是RSV[6],主要是FluA和PIV2两种,临床症状分析18例FluA感染者均有全身酸痛、头痛、咽痛、咳嗽。部分人有发热。PIV2感染患者全身症状较轻,特点是咽喉疼痛、声哑、咳嗽。笔者认为以上结果提示,那些不需住院的成人呼吸道感染患者中的带病毒率约在10%~15%左右。

应用系列呼吸道病毒McAbs联接APAAP桥联技术来检测脱落细胞中的抗原,已证实具有快速(2~3小时内)、很少内源酶干扰、操作简

便、结果清晰、不需特殊设备、易于在基层推广等优点^[6~8]。笔者为排除非特异性染色的可能，以IFA技术对FluA和PIV2作对照检测，还对典型已检出的FluA和PIV2阳性标本作了异种动物血清竞争阻断试验以及小鼠血清替代试验，证实系列单抗检测结果是特异的。笔者认为它对临床诊治和疫情报告均是有效手段。

Rapid Detection for Antigens of Respiratory Tract Viruses by Using Serizes of Monoclonal Antibody Duan Peiruo, Zhang Lili, Li Xiaoguang, et al. Department of Clinical Experiment, 262 Hospital, Beijing, 100088

A series of monoclonal Antibodies (McAb) against six main respiratory tract viruses (RTV) — respiratory syncytial virus (RSV), Influenza A virus (FluA), influenza B virus (FluB), para-influenza virus type 1.2.3 (PIV1.2.3) were developed, and were used in APAAP bridge-enzyme assay to rapidly detect the antigens of RTV. Total 260 samples of nasopharyngeal exfoliated cells were collected from young men in Beijing Army suffered from respiratory tract virus infections. The results showed that 18 cases were tested with FluA antigen; 10 with PIV2 antigen and 1 with FluB and another with RSV antigen, respectively. All the positive samples were determined by indirect immunofluorescence assay

(IFA) and blocking test and replacement test. It is suggested that the method used in the study be effective in clinical rapid diagnosis and epidemiological survey.

Key words Infections of respiratory tract viruses Monoclonal antibody

参 考 文 献

- 1 张梓荆主编. 小儿病毒性呼吸道感染与病毒性肺炎. 中国医药科技出版社, 1990. 265.
- 2 段佩若, 赵一博, 赵华, 等. 合胞病毒单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立和临床应用. 中华医学杂志, 1989, 69(3): 174.
- 3 段佩若, 张励力, 韩洪彦, 等. 单克隆抗体用于免疫荧光技术快速检测副流感病毒3型抗原的研究. 中华微生物和免疫学杂志, 1992, 12(5): 393.
- 4 陶三菊, 杨东荣, 范瑞莲, 等. 甲型流感病毒单抗的建立. 病毒学报, 1986, 2(2): 106.
- 5 赵宁, 刘雪松, 黄传书, 等. 分泌高效价碱性磷酸酶McAb杂交瘤系的建立及其在APAAP研究中的应用. 中国免疫学杂志, 1991, 7(5): 275.
- 6 段佩若, 林京, 韩洪彦, 等. 呼吸道合胞病毒单克隆抗体用于碱性磷酸酶桥联酶标快速诊断. 中华医学检验杂志, 1990, 13(2): 89.
- 7 段佩若, 张励力, 韩洪彦, 等. 甲型和乙型流感单克隆抗体用于碱性磷酸酶桥联酶标快速诊断. 单克隆抗体通讯, 1991, 7(1): 45.
- 8 段佩若, 张励力, 韩洪彦, 等. 单克隆抗体用于APAAP桥联酶标技术快速检测副流感病毒3型抗原. 单克隆抗体通讯, 1992, 8(4): 42.

(收稿, 1993-07-16)

欢迎订阅1995年《中国媒介生物学及控制杂志》

本刊是全国爱卫会主管的、中国预防医学科学院流研所编辑出版的、与《中华流行病学杂志》相配套的国家级杀虫、灭鼠专业期刊，是中华预防医学会系列杂志之一。

本刊主要刊载鼠类等医学动物及蚊、蝇等卫生害虫的生物学、生态学、防制措施及灭鼠、杀虫药械方面的最新科技成果与信息，其中包括动物和虫媒源性疾病（如细菌病、病毒病、寄生虫病等），具有学术研究和实际应用价值。读者对象：卫生防疫、爱国卫生、临床救治以及有关的科研单位、大专院校、药械生产厂家的高级专业人员和管理人员等。

本刊为双月刊，16开本，每期80页15万字左右，内容丰富、信息量大、可读性强。订价：3.50元/期，全年6期21元整。现已开始办理1995年征订手续。需要征订单的单位和订户请来信，函（信）到即寄。

地址：102206，北京昌平流字5号，《中国媒介生物学及控制杂志》编辑部；电话：(01) 9742919转359，
联系人：宋秀华。