

· 实验研究 ·

抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体 在狂犬病街毒检测中的应用

徐葛林 严家新 Larrous F 祝玉桃 Cozette P 薛红刚 胡巧玲 Bourhy H

【摘要】 目的 测试抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体用于间接免疫荧光法检测已确认的狂犬病阳性及狂犬病阴性的动物脑组织标本的灵敏度和特异性。**方法** 将巴斯德研究所狂犬病参考中心保存的来自不同国家的 62 份狂犬病街毒动物脑组织标本以及 271 份法国境内收集的正常动物脑组织标本,用上述间接免疫荧光法检测,并以巴斯德研究所狂犬病参考中心提供的狂犬病毒酶联免疫吸附法、组织细胞分离法及直接免疫荧光法等三个试验作确认试验,进行比较。**结果** 间接免疫荧光法可检测涵盖狂犬病毒 7 个基因型在内的所有 62 份街毒标本,对确认为狂犬病阴性的动物脑组织标本检测均为阴性,其特异性和灵敏度均达到 100%。**结论** 抗狂犬病毒核蛋白单抗作为间接免疫荧光法检测狂犬病毒具有良好的应用前景。

【关键词】 狂犬病毒;单克隆抗体;免疫荧光

Application of McAbs against rabies nucleocapsid in diagnosis of rabies street virus XU Ge-lin*, YAN Jia-xin, Larrous F, ZHU Yu-tao, Cozette P, XUE Hong-gang, HU Qiao-ling, Bourhy H. *Wuhan Institute of Biological Product, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective McAbs against rabies nucleocapsid were used to detect rabies street viruses in animal brain specimens with indirect immunofluorescent assay to evaluate the sensitivity and specificity of this assay. **Methods** 62 specimen from rabid animal brains including genotype 1 to 7 and 271 specimens from different normal animal brains collected in Pasteur Institute in 2003 were tested and compared, using indirect immunofluorescent assay. All these specimens were identified and compared using rapid rabies enzyme immunodiagnosis, fluorescent antibody test and rabies virus isolation assay in neuroblastoma cell culture which were all provided by Pasteur Institute. **Results** Both sensitivity and the specificity of the indirect immunofluorescent assay were 100%. **Conclusion** The results showed a positive of rabies virus detection with these methods.

【Key words】 Rabies virus; McAbs; Immunofluorescent assay

我国对狂犬病感染的动物及狂犬病患者一般是通过观察动物或人的临床症状判别的,狂犬病街毒的实验室诊断,我国目前仅有少数实验室能开展这方面的工作,主要原因是缺乏检测用关键试剂——抗狂犬病毒核蛋白抗体。国外通常采用直接免疫荧光法和酶联免疫吸附法(ELISA)作为狂犬病毒的实验室检测手段,其中直接免疫荧光法已成为狂犬病街毒检测的金标准。我们在已研制成功抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体的基础上,发展了间接免疫荧光法,检测动物脑组织中的狂犬病毒街毒。

材料与方法

1. 材料:抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体由卫生部武汉生物制品研究所基因工程室制备^[1]。FITC 标记兔抗鼠 IgG 荧光抗体购自 BIO-RAD 公司。CVS 阳性对照标本:狂犬病毒 CVS 株,巴斯德研究所保存。正常乳鼠脑阴性对照标本:5 日龄 Swiss 乳鼠。狂犬病街毒脑组织标本:由法国巴斯德研究所 WHO 狂犬病参考中心 1981 年以来收集的(保存于 -70℃)来自不同国家和地区的狂犬病街毒动物脑,或样品经乳鼠颅内传代一次的脑组织标本,共计 62 份,经巴斯德研究所用 ELISA、免疫荧光及细胞培养等三个实验证实均为狂犬病毒阳性^[2-4]。经逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测证实其中基因 1 型有 52 株,分别分离于亚洲、欧洲和非洲大陆的狗、

基金项目:中法科技合作资助项目(PRA B01-06)

作者单位:430060 武汉,卫生部武汉生物制品研究所(徐葛林、严家新、祝玉桃、薛红刚、胡巧玲);Pasteur Institute, France(Larrous F, Cozette P, Bourhy H)

羊、猫、牛等家养动物和大鼠、狐狸、梅花鹿、貂等野生动物以及人;基因 2 型为 Lagos 蝙蝠株;基因 3 型 Mokola 共 2 株分离于尼日利亚和喀麦隆的地鼠;基因 4 型 Duvenhage 分离于中非的蝙蝠;基因 5 型共 3 株分离于丹麦、法国的蝙蝠;基因 6 型共 3 株分离于荷兰、瑞士的蝙蝠及芬兰被蝙蝠咬伤的人;基因 7 型 ABL 分离于澳大利亚被蝙蝠咬伤的人。

狂犬病阴性动物脑样品:2003 年 8-12 月期间法国巴斯德研究所 WHO 狂犬病参考中心收集的来自 12 种动物的脑组织样品共计 271 份,其中狗 136 份、猫 104 份、松鼠 2 份、大鼠 2 份、白鼬 6 份、鹿 1 份、狐狸 11 份、蝙蝠 3 份、貂 1 份、地鼠 1 份、牛 3 份以及刺猬 1 份。经巴斯德研究所用相应的 ELISA、免疫荧光及细胞培养等三个试验证实均为狂犬病毒阴性。

2. 方法:CVS 病毒颅内注射 Swiss 乳鼠,待发病后处死取脑组织标本;5 日龄正常乳鼠处死取脑标本,在载玻片上印片,丙酮室温固定 30 min 后, -30℃ 保存备用。取待检动物脑海马回部分,在载玻片上印片,丙酮室温固定 30 min 后, -30℃ 保存备用。取保存备用的脑印片,室温干燥后加入 1:1000 倍稀释的抗狂犬病毒核蛋白单抗,37℃ 湿盒孵育 1 h 后,PBS 漂洗 3 次,晾干后加入工作浓度的兔抗鼠 IgG 荧光抗体,内含 0.1% 的伊文思兰,37℃ 湿盒孵育 1 h 后,PBS 漂洗 3 次,荧光显微镜下观察。

结 果

CVS 阳性对照样品免疫荧光为强阳性,荧光显微镜下可见胞浆中布满大量的亮绿色荧光颗粒,此为狂犬病毒特异性核蛋白包涵体,同时发现细胞核中无任何荧光颗粒;63 份狂犬病毒阳性的街毒标本免疫荧光均呈阳性,细胞核中无狂犬病毒,荧光染色呈阴性,不同的样品胞浆中荧光颗粒大小及形状各不相同,有的呈条索状(图 1),有的呈大颗粒状(图 2),还有的呈砂砾状均匀分布(图 3)。

正常乳鼠脑阴性样品免疫荧光为阴性,荧光显微镜下仅见伊文思兰负染造成的暗红色细胞背景;所有已证实为狂犬病毒阴性的 271 份动物脑组织标本,免疫荧光试验均为阴性,印片可见呈暗红色细胞背景,无任何亮绿色荧光颗粒。

表 1 为免疫荧光特异性及灵敏度比较,计算特异性和灵敏度结果如下:特异性 = $63 \div (63 + 0) =$

100%,灵敏度 = $271 \div (271 + 0) = 100\%$ 。

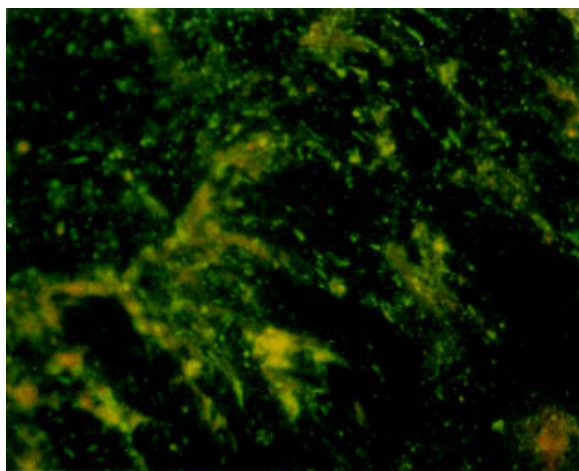


图1 狂犬病毒免疫荧光试验条索状荧光(×200)

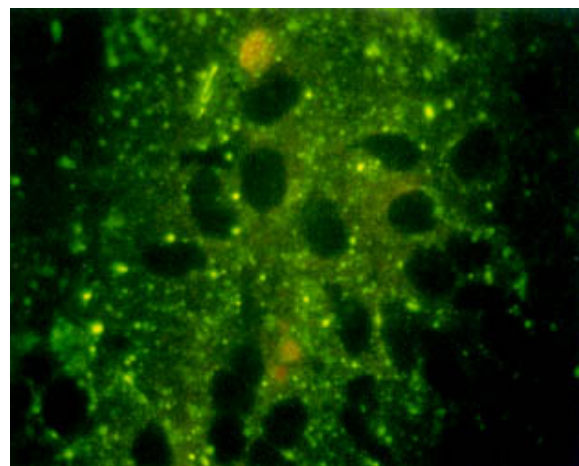


图2 狂犬病毒免疫荧光试验荧光大颗粒(×200)

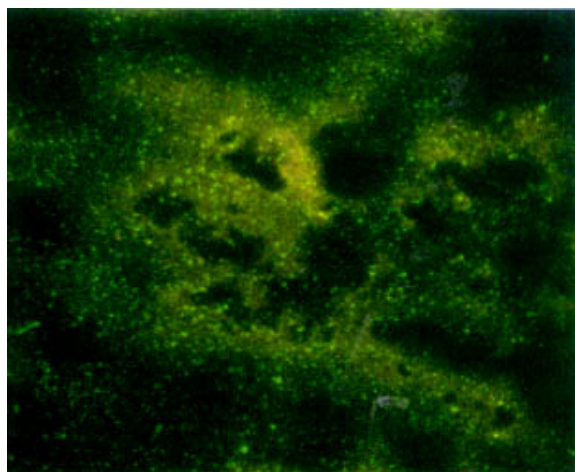


图3 狂犬病毒免疫荧光试验尘埃状荧光颗粒(×100)

表1 免疫荧光法特异性及灵敏度比较

	免疫荧光结果		合计
	+	-	
真实阳性	62	0	62
真实阴性	0	271	271

结果显示,我所生产的抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体不仅能检出狂犬病毒基因 1 型的街毒样品 51 份,还可检出基因 2 型 1 份、基因 3 型 2 份、基因 4 型 1 份、基因 5 型 3 份、基因 6 型 3 份以及基因 7 型 1 份,提示该单克隆抗体具有广谱性,对目前已确定的狂犬病毒 7 个基因型均能检出,该方法不仅能用于检测亚洲流行的狂犬病毒分离株,对欧洲、澳洲甚至非洲的狂犬病街毒分离株也能较好地检出,特异性和灵敏度均达到 100%,显示出较好的应用前景。

讨 论

狂犬病毒是 RNA 病毒,在感染的细胞浆内大量狂犬病毒核衣壳聚集形成包涵体。以提纯的狂犬病毒核衣壳免疫实验动物制备的多克隆抗体或抗核衣壳单克隆抗体用免疫荧光法可特异地与这些包涵体结合,该方法是 WHO 推荐的狂犬病毒实验室诊断最精确、快速和最可靠的方法。

该方法 1958 年由 Goldwasser 首创,后经 Dean 和 Kissling 改进^[5],目前已广泛用于人及动物狂犬病感染的诊断。脑或神经组织的印片、涂片或冰冻切片经过免疫荧光染色,在紫外线激发下,通过荧光显微镜即可检测,狂犬病毒阳性标本中分布有大量的黄绿色荧光颗粒,呈不同的形状和大小,较大的圆形或椭圆形发强烈荧光者为内基氏小体(negri bodies),而象沙粒或灰尘的较细小的荧光粒子及丝状荧光物为神经元或树突中含有的狂犬病毒颗粒,荧光颗粒大小范围为 0.24~27 μm 。

该方法的特点是耗时短,整个荧光免疫法(FAT)操作需 2.5 h,若加上涂片、固定,则需 3~4 h;特异性好,与小鼠颅内接种试验(MIT)相比,符合率达 99%^[4]。

由于狂犬病毒多分布在动物脑海马回及脑干处,因此合适的取样部位对抗原的检测很重要。脑样品印片必须用丙酮固定 30 min,因为丙酮可去除细胞膜表面的脂类,以便抗体到达细胞内与狂犬病毒结合。待测脑样品必须在含 50% 甘油的生理盐水中 0℃ 以下保存,印片染色前需用生理盐水洗涤数次,印片及丙酮固定过程需要在 P3 实验室中进行。荧光标记抗体需最大限度降低非特异性反应,因此制备特异性、高效价的抗体是 FAT 的关键,本试验采用抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体,可特异性地检测狂犬病毒,而且采用间接荧光法,比直接荧光法更敏感,实验证实与巴斯德研究所三个检测方法结果的符合率达到 100%。

已有资料报道免疫荧光法是狂犬病流行病检测的最佳方法,特别是在因运输条件不妥,个别动物脑组织高度腐烂时,ELISA 检测不出的样品,用免疫荧光法仍能较好地显示出狂犬病毒阳性。从结果可以看出,用武汉生物制品研究所生产的抗狂犬病毒核衣壳蛋白可以检测分离于世界各地涵盖狂犬病毒所有 7 个基因型的街毒样品,可用于狂犬病街毒的实验室诊断,显示出其良好的应用前景。

参 考 文 献

- 徐葛林,鲁晓知,朱家鸿. 抗狂犬病毒糖蛋白及核蛋白单抗的研制及应用. 中国生物制品学杂志, 1996, 9: 23-24.
- Perrin P, Rollin PE, Sureau P. A rapid rabies enzyme immunodiagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. J Bio Stand. 1986, 14: 217-222.
- Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. World Health Organization 1996 (Fourth edition). 88-95.
- Chitra L, Pandit V, Kalyanaraman VR. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. Indian J Med Res, 1988, 87: 113-116.
- Goldwasser R, Kissling R. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proceedings of the Society for Experimental Biology, 1958, 98: 219-229.

(收稿日期: 2004-06-24)

(本文编辑: 尹廉)