

酶标葡萄球菌A蛋白组化法用于肾综合征出血热诊断的研究

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

纪绍忠 严玉辰 李爱芳 陶小霞 崔小英 孔令雄 赵荣辉 董必军 丘福禧

自1978年李镐汪等报告分离出肾综合征出血热(HFRS)病毒以来,免疫荧光抗体(IFA)技术已经成为该病的标准血清学诊断方法^[1,2]。尽管IFA技术简单、特异,但是此法需要昂贵的荧光显微镜,不宜于广泛应用。

李平佑等用IFA法检查黑线姬鼠肺中HFRS抗原的同时,也采用了酶标抗体技术(PAT),借助酶标抗体与特异性抗原反应示踪抗原存在部位,确定HFRS抗原存在于鼠肺上皮细胞内^[3]。但是,由于酶标抗体法的第二抗体标记物中存在着被标记的非特异成分能与其他组织成分结合产生非特异反应;加上鼠肺组织切片中有较多非特异内源酶存在,而使PAT法在HFRS的诊断方面应用受到了影响。

葡萄球菌A蛋白(SPA)具有与人和许多哺乳动物血清IgG的Fc段结合的特点,目前它已成为一种适用范围很广的免疫制剂。Dubois-Daleg等^[4]1977年成功地制备了辣根过氧化物酶标记SPA(HRP-SPA)并将其用于间接免疫酶染色,以光学显微镜和电子显微镜检出了组织培养细胞中麻疹、水疱性口腔炎、单纯疱疹及Visna病毒抗原,证明用HRP-SPA组化法检测上述抗原较用PAT法更为特异。但应用HRP-SPA组化法检测HFRS病毒抗原和抗体的研究尚未见报道。

我们应用HRP-SPA组化法检查了HFRS组织培养细胞(Vero-E6细胞)内的病毒抗原,并对该法用于HFRS的诊断与IFA法进行了比较研究,现报告如下。

材料和方法

一、病毒抗原:用HFRS病毒Vero-E6细胞抗原第96株(自安徽省疫区黑线姬鼠分离的)和Vero-E6细胞抗原第294株(分离自广西疫区的褐家鼠),分别制成细胞抗原片。用丙酮固定7分钟,放-70℃保存备用。

二、血清:(1)HFRS病人急性期和恢复期血清分别由上海市、安徽省、河南省焦作地区、广西壮族自治区卫生防疫站等单位提供;(2)肝炎、肾炎等非HFRS病人血清由北京市积水潭医院供给;(3)健康人血清采自北京市血站。

三、免疫血清:用HFRS病毒Vero-E6第23株(自人血分离)Vero-E6第64株(自黑线姬鼠分离)、Vero-E6第163株(自黑线姬鼠分离)、Vero-E6第294株(自褐家鼠分离),分别免疫家兔制备。

四、HRP-SPA:将HRP用过碘酸盐改良法标记SPA,工作滴度为1:200;显色液:底物3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)5mg,溶于0.05M Tris-HCl pH7.6缓冲液10ml中,临用前加30% H_2O_2 10 μ l。

五、染色方法:采用间接微量组化法,将抗原片加第一抗体,放37℃湿盒中保温45分钟,用流水冲洗,然后用0.02M PBS(pH7.2)和蒸馏水各振荡洗2~3次,每次3~5分钟,吹干;加第二抗体(HRP-SPA)放37℃湿盒中作用45分钟,用PBS和蒸馏水振荡洗,方法同前,吹干;加显色液,在37℃湿盒中作用20分

钟，用蒸馏水洗，吹干；加 1 : 4000伊文思蓝复染10分钟，用蒸馏水洗，吹干；用普通光学显微镜检查，细胞质内有棕褐色颗粒为阳性。荧光抗体法见文献〔2〕。

结 果

一、HRP-SPA组化法特异性实验：

1.兔免疫血清检查：检查了4份以不同来源的HFRS病毒抗原免疫的家兔血清，均呈阳性，在细胞质内可见清晰的褐色或棕黄色颗粒背景为蓝色如图1，正常兔血清为阴性。用HRP-SPA组化法所检测的抗体滴度为1:1280~1 : 5120，用IFA法为1 : 5120（表1）。从表1可以看出，HRP-SPA组化法的结果与IFA法基本一致。



图1 HFRS Vero—E6细胞抗原（96株）用兔抗HFRS病毒免疫血清和HRP—SPA组化法染色。细胞质内可见呈棕黄色圆形抗原颗粒

表1 用HRP-SPA组化法与IFA法检测4株HFRS病毒免疫血清抗体滴度的比较

抗 原	抗体滴度	
	HRP-SPA组化法	IFA法
Vero-E6 第23株	1:5120	1:5120
Vero-E6 第64株	1:5120	1:5120
Vero-E6 第163株	1:5120	1:5120
Vero-E6 第294株	1:1280	1:5120

2.HFRS病人双份血清检查：用HRP-SPA组化法和IFA法检查了上海市某县10例HFRS病人双份血清，均表现4倍或4倍以上抗体升高，如表2。

从表2可以看出HRP-SPA组化法与IFA法结果基本相同，证明HRP-SPA组化法是特异的。

3.健康人和非HFRS病人血清检查：用HRP-SPA组化法检查健康人30名和非HFRS病人血清35例（肝炎21例、肾炎8例尿毒症和肺心病各2例、肺炎和贫血各1例）均为阴性（图2）。用正常Vero-E6细胞及单纯用DAB底物作对照染色均为阴性。



图2 HFRS Vero—E6细胞抗原（96株）用正常人血清和HRP—SPA组化法染色。细胞质内无棕黄色颗粒。

表2 用HRP-SPA组化法和IFA法检测HFRS病人双份血清中抗体滴度的比较

病 例 号	病 日	抗 体 滴 度				
		第一份血清		病 日	第二份血清	
		HRP-SPA	IFA		HRP-SPA	IFA
1	10	1 : 320	1 : 320	19	1 : 1280	1 : 1280
2	12	1 : 320	1 : 320	17	1 : 1280	1 : 5120
3	9	1 : 320	1 : 320	15	1 : 5120	1 : 5120
4	4	1 : 320	1 : 320	16	1 : 5120	1 : 5120
5	3	1 : 320	1 : 320	24	1 : 5120	1 : 5120
6	4	1 : 80	1 : 320	14	1 : 320	1 : 1280
7	5	<1 : 20	<1 : 20	14	1 : 5120	1 : 1280
8	5	1 : 320	1 : 320	28	1 : 1280	1 : 1280
9	7	1 : 80	1 : 80	28	1 : 5120	1 : 5120
10	7	1 : 320	1 : 320	14	1 : 5120	1 : 5120

二、HRP-SPA组化法灵敏性实验：

1.HRP-SPA组化法与IFA法的灵敏性的比较：用两种方法同时检查30例不同疫区HFRS病人恢复期血清的抗体滴度，结果如表3。用HRP-SPA法比用IFA所测得的抗体滴度较

高的有4例(13.3%),相同的有20例(66.6%),较低的有6例(20%)。结果表明,用HRP-SPA组化法检测不同疫区病人血清同样灵敏,并且与IFA法基本相同。

表3 用HRP-SPA组化法与用IFA法检测HFRS抗体的灵敏性的比较

地区	病例号	抗体滴度	
		HRP-SPA组化法	IFA法
安	1	1:1280	1:1280
	2	1:1280	1:320
	3	1:1280	1:1280
	4	1:1280	1:1280
	5	1:1280	1:1280
徽	6	1:1280	1:1280
	7	1:80	1:80
	8	1:320	1:80
广	9	1:5120	1:5120
	10	1:1280	1:5120
	11	1:1280	1:5120
	12	1:5120	1:5120
西	13	1:5120	1:5120
	14	<1:20	1:80
	15	1:5120	1:5120
	16	1:5120	1:5120
	17	1:1280	1:5120
南	18	1:5120	1:5120
	19	1:5120	1:5120
	20	1:5120	1:5120
上	21	1:1280	1:1280
	22	1:1280	1:5120
	23	1:5120	1:5120
	24	1:5120	1:1280
	25	1:5120	1:5120
	26	1:320	1:1280
	27	1:5120	1:1280
	28	1:1280	1:1280
	29	1:5120	1:5120
	30	1:5120	1:5120

2.两种不同来源抗原的检查:用河南省焦作地区8例HFRS病人恢复期血清,以HRP-SPA组化法分别检查了来源于黑线姬鼠的Vero-E6第96株和来源于褐家鼠的Vero-E6第294株病毒抗原,结果一致(表4,图3和图4)。

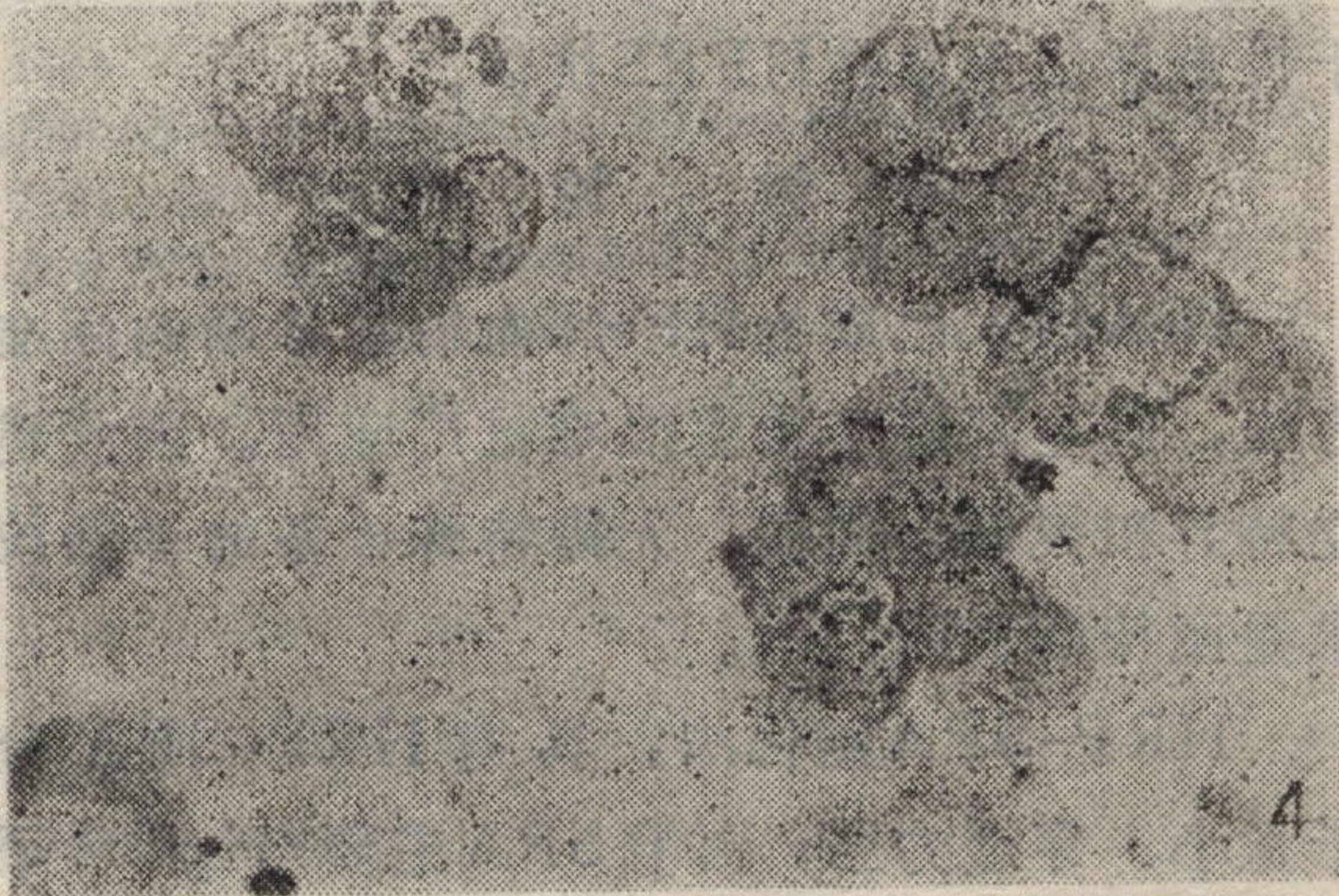


图3、4分别为HFRS Vero-F6细胞抗原96株和294株用HFRS恢复期病人血清和HRP-SPA组化法染色。两株抗原分布部位及形态一样。

表4 用HRP-SPA组化法检查不同来源的Vero-E6细胞病毒株抗原的比较

病人血清号	抗体滴度	
	Vero-E6第294抗原	Vero-E6第96抗原
1	1:5120	1:5120
2	1:5120	1:5120
3	<1:20	<1:20
4	1:5120	1:5120
5	1:5120	1:5120
6	1:1280	1:1280
7	1:5120	1:5120
8	1:5120	1:5120

3.黑线姬鼠抗体检查:将用IFA法检查HFRS抗原结果阳性的7份黑线姬鼠肺用PBS洗一次(每个肺PBS 0.5ml),洗液作为第一抗体,用HRP-SPA组化法和IFA法(用异硫氰酸荧光黄标记的抗黑线姬鼠IgG,工作单位为1:8)对比检查,均为阳性(表5)。

表5结果表明,HRP-SPA组化法可以用

表 5 黑线姬鼠抗HFRS抗体检查

鼠肺号	HFRS 抗原强度	抗体滴度	
		HRP-SPA组化法	IFA 法
1	++	1 : 80	1 : 80
2	++	1 : 20	1 : 20
3	++	1 : 20	1 : 20
4	++	1 : 80	1 : 40
5	++	1 : 20	1 : 20
6	++	1 : 20	1 : 20
7	++	1 : 320	N

注：N=未作

于检查黑线姬鼠抗HFRS抗体。

讨 论

IFA技术已成为HFRS血清学诊断的标准方法，但在基层实验室很难推广应用。因此建立特异和灵敏、简便、无需特殊设备的诊断技术是亟待解决的问题。

HRP-SPA组化法，具有HRP-SPA分子量小、穿透力强，并且SPA主要与IgG分子Fc段上的两个位点结合，非特异性小等优点，已用于组织培养细胞内多种病毒抗原的检查^[4]。由于SPA具有与人和多种哺乳动物IgG的Fc段结合的特点，用HRP-SPA代替第二抗体可以检查病人和多种动物的抗体^[5]。

本文报告应用HRP-SPA组化法检测HFRS抗体和组织培养细胞Vero-E6细胞中HFRS病毒抗原获得满意的结果。检测用4株不同来源HFRS病毒免疫的家兔血清，均为阳性，抗体滴度为1 : 1280~1 : 5120；10例病人双份血清中抗体的滴度均呈4倍或4倍以上升高，抗体滴度与IFA法的结果基本相同；30名健康人血清和35例非HFRS病人血清均为阴性。用HRP-SPA组化法和IFA法同时检查安徽省、广西壮族自治区、河南省、上海市某县等疫区30例HFRS患者恢复期血清的抗体滴度，HRP-SPA法高于IFA法4例，相同20例，低于IFA法6例。检查7只黑线姬鼠肺洗液中的抗体，两法结果完全一致。上述结果表明，用HRP-SPA组化法检测HFRS抗体与用IFA法一样，具有较高的特异性和灵敏性。以HRP-SPA法，

用8例HFRS病人恢复期血清检查来源于黑线姬鼠和来源于褐家鼠的病毒抗原，结果一致。

应该指出，HRP-SPA组化法不仅可以检查病人血清，而且可以检查兔、黑线姬鼠等多种动物血清中的HFRS抗体，可用于鼠类HFRS自然感染的调查，但此法用于鼠类带病毒的检查尚待进一步的研究。使用组织培养细胞抗原，内源酶少，非特异性小；用普通光学显微镜即可见到阳性细胞胞质内有棕黄色或褐色抗原颗粒状分布，背景着蓝色，结果容易判定，标本可以长期保存。因此HRP-SPA组化法有利于基层实验室推广应用。

在实验中我们用HRP-抗人IgG代替HRP-SPA检查HFRS病人双份血清和恢复期血清各10例，并与IFA法比较其结果基本一致，说明HRP-抗人IgG组化法用于HFRS的诊断也是可行的。

摘 要

本文报告应用HRP-SPA组化法检测用4株不同来源的HFRS病毒抗原免疫的家兔血清和10例HFRS病人双份血清的抗体滴度，结果与IFA法基本一致，证明了HRP-SPA组化法的特异性。用HRP-SPA组化法和IFA法检测了不同疫区30例病人的恢复期血清，来源于黑线姬鼠和褐家鼠的Vero-E6细胞HFRS病毒抗原和7只HFRS抗原阳性黑线姬鼠肺洗液中的抗体，两法结果相同，证明了HRP-SPA组化法与IFA法一样，具有较高的灵敏性。此外，HRP-抗人IgG组化法用于HFRS的诊断也是可行的。

ABSTRACT

This article reports the establishment of an indirect immunoenzymatic histochemical method with horseradish peroxidase-labelled staphylococcus protein A for the diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. Using this method, hemorrhagic fever virus antigens in Vero-E6 cells infected two strains of HFRS virus were stained. Positive and negative results were easily read under light microscope. Paired sera from 10 HFRS patients were examined and a fourfold or more increase in antibody titer was shown in all the convalescent

sera. The titer of the antibody to HFRS virus were assayed in convalescent sera of 30 patients with HFRS and in rabbit immune sera against HFRS virus by indirect immunoenzymatic histochemical method with horseradish peroxidase-labelled staphylococcus protein A and by indirect immunofluorescence for comparison. The titers of antibody detected by indirect immunoenzymatic histochemical method were similar to those by indirect immunofluorescence in all sera of patients with HFRS. Sera from 30 normal individuals and 35 non-HFRS patients were all negative by both methods. These data indicate that indirect immunoenzymatic histochemical method with horseradish peroxidase-labelled staphylococcus protein A is rather sensitive and specific, and thus may be applied as a new method for the diagnosis of HFRS.

We have also used horseradish peroxidase-labelled anti-human IgG in substitution for horseradish peroxidase-labelled staphylococcus protein A in the

assay of the titers of the antibody to HFRS virus in paired sera of 10 patients and convalescent phase-sera of another 10 patients with HFRS, and compared with those by indirect immunofluorescence. The results were coincidental, indicating that an indirect immunoenzymatic histochemical method with horseradish peroxidase-labelled anti-human IgG may be used for the diagnosis of HFRS.

参 考 文 献

1. Lee HW et al: J Infect Dis, 137: 298, 1978
2. 严玉辰等: 中国医学科学院学报, 4(2): 73, 1982
3. Lee PW et al: J Korean Med Assoc, 21(5): , 1978
4. Dubois-Daleg M et al: J Histochem Cytochem, 25: 1201, 1977
5. 李爱芳等: 中华流行病学杂志, 3(6): 382, 1982

20242名正常人群乙肝病毒感染标记检测报告

江苏南京梅山工程指挥部职工医院

白鹤鸣 吴大钧 胡林华 管荣清 陈进菁 廖志敏 赵船仙 钱 瑛 杨裕国

我们于1982年3~5月用滤纸血片法对南京市郊7岁以上不同年龄组人群20242人进行了HBsAg与抗-HBc检测, 结果如下:

HBsAg阳性40人(0.20%), 抗-HBc阳性3678人(18.17%), HBsAg+抗-HBc双阳性741人(3.66%), 如将单项HBsAg及抗-HBc分别与HBsAg+抗-HBc组合并, HBsAg感染率为3.86%, 抗-HBc感染率为21.83%, 有HBV感染标志一项和二项阳性者共4460人, 总感染率为22.03%。HBsAg与抗-HBc单项男女之间无明显差别($\chi^2=1.31$ $P>0.05$) 而男女之间的HBsAg+抗-HBc阳性率则差别显著

($\chi^2=10.93$ $P<0.001$)。如果将HBsAg, 抗-HBc分别与HBsAg+抗-HBc合并, 可见HBsAg阳性率随着年龄增长而降低, 而抗-HBc阳性率各年龄组变化不大, 单项抗-HBc的阳性率则大致随着年龄的增大而升高。

各种职业人群HBV感染率为: 医务人员、教员、工人、学生各自的总感染率均高于全部被检人群的感染率; 而干部、炊事员、保育员、营业员各自的总感染率均低于全部被检人群的总感染率。医务人员的感染率最高。