

单克隆抗体间接免疫荧光法检测 巨细胞病毒分离培养中的抗原

段艳平 陈秀珠* 吴远明**

(同济医科大学微生物学教研室, 武汉 430022)

(** 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

提 要

应用抗巨细胞病毒 (HCMV) 蛋白抗原 (分子量为 20 千道尔顿) 的单克隆抗体 (McAb-20k) 和 HCMV IgG 特异性阳性血清以间接免疫荧光试验检测 28 例器官移植病人尿标本接种人胚肺细胞后的 HCMV 感染情况, 结果前法于接种后 48 小时检测到 HCMV 阳性病人 9 例, 后者于接种 6 天检测到阳性病人 11 例。与病毒分离结果相比较, 两法的敏感性分别为 81.8% 和 90.9%, 特异性相应为 100% 和 194.12%, 符合率均为 92.9%, 比病毒分离提前数天至数周作出诊断, 重复性良好。因此, 抗 HCMV 蛋白抗原的单克隆抗体间接免疫荧光法是一种有效的、早期快速而又敏感特异的诊断方法, 操作简便, 既使没有单抗, 可用 HCMV IgG 阳性血清代替, 也可取得较好效果, 值得在一般实验室推广应用。

关键词: 巨细胞病毒 抗原 单克隆抗体 间接免疫荧光试验

器官移植病人因大量免疫抑制剂的应用常并发各种病原微生物感染, 尤其是病毒感染。细菌和真菌感染可用相应抗生素控制, 病毒感染尚无良好药物治疗, 因此, 早期诊断十分重要。病毒感染中以 HCMV 最常见, 病人易患 HCMV 间质性肺炎, 死于呼吸衰竭, 严重阻碍了移植物成活时间和病人寿命的延长^[1]。免疫排斥反应和病毒感染的处理原则截然不同, 前者需加强免疫抑制, 后者需增强免疫防御, 因而, 早期快速诊断 HCMV 感染具有重大实际意义。然而, 这类病人免疫功能的抑制使常用的血清学方法失去了有效性, 较可靠的病毒分离, 因费时间长, 不能满足早期快速的要求。HCMV 感染细胞后, 其即刻早期蛋白 (Immediate early protein)、早期蛋白 (early protein) 和晚期蛋白 (late protein) 在数小时至十几小时开始合成, 远早于成熟病毒颗粒的释放^[2]。检测这些蛋白质抗原可达到早期快速诊断 HCMV 感染。本文报道应用抗 HCMV 蛋白抗原的单克隆抗体以间接免疫荧光试验检测尿标本经短期分离培养而表达的病毒蛋白抗原, 并与 HCMV IgG 阳性血清的间接免疫荧光试验和常规病毒分离相比较。

材 料 与 方 法

1. 细胞、病毒和标本的收集及接种: 见参考文献^[3]。

本文于 1988 年 11 月 5 日收到

* 指导教师

2. 抗体: 抗 HCMV 蛋白抗原的单克隆抗体 (McAb-20k), 中科院武汉病毒所提供。FITC 标记兔抗 BALB/c 小鼠 IgG 荧光抗体, 北京生物制品研究所产; FITC 标记羊抗人 IgG 荧光抗体, 上海生物制品研究所产品; HCMV IgG 阳性血清和阴性血清, 中国预防医学科学院病毒学研究所肝炎室生产的 HCMV IgG ELISA 诊断试剂盒, 并经本室筛选 (抗 HCMV IgG 1:640 以上, HSV 和抗核抗体阴性者)。

3. 间接免疫荧光试验: 参考 Alpert 等人^[4]方法加以改进: 人胚肺细胞分装青霉素小瓶, 放入一块长方形飞片, 长至单层, 接种已处理的尿液, 每份接种 6 小瓶以上, 分别于接种后 48 小时和 6 天无菌取出飞片, 胰酶处理数秒, 冷丙酮固定 2 小时, 0.01mol/L pH8.0 的 PBS 中漂洗数次, 吸干, 固定于玻片上, 分别滴加一定稀释度的 McAb-20k 和 HCMV IgG 阳性血清, 37℃ 2 小时, 取出飞片, PBS 冲洗数次, 吸干, 分别滴加 FITC 标记兔抗 BALB/C 小鼠和羊抗人 IgG 荧光抗体, 37℃ 2 小时, 冲洗, 吸干, 滴甘油缓冲液 (5 份甘油加 1 份 PBS), 荧光显微镜镜检。同时以 HCMV AD169 株感染细胞作阳性对照和 HCMV IgG 阴性血清、PBS 及荧光抗体作阴性对照。

结果判断: 根据预试验和有关资料^[4], 我们选择同一飞片上有 3 个以上的视野, 或一个视野中有 2 个以上的阳性荧光灶 (核内荧光灶或胞浆、胞膜荧光团) 为阳性。

结 果

McAb-20k 的间接免疫荧光法 (IIFA) 结果显示细胞核内亮绿色荧光, 胞浆不染荧光, 而 HCMV IgG 阳性血清的 IIFA 结果则表现为胞浆和胞膜亮绿色荧光, 细胞外形清晰可见。28 例病人中, 前法于接种后 48 小时检测出 9 例阳性病例; 后法于接种后 6 天检测到 11 例阳性者, 二者的操作全程可在 10 小时内完成。病毒分离于接种后 14~48 天, 平均 29 天才出现典型的病变, 28 例中计有 11 例病毒分离阳性。二种 IIFA 与常规病毒分离的比较见表 1、2 和附图。

HSV-1 和 HSV-2 感染的 Vero 细胞, 经 McAb-20k 和 HCMV IgG 阳性血清均未检测出类似荧光灶。

绝大多数的同一标本三块飞片结果相同, 表明重复性良好。

表 1 两种 IIFA 与病毒分离结果的比较

Tab. 1 Comparison of results from two IIFA procedures and conventional virus isolation

Results of conventional virus isolation	Results of IIFA by using McAb-20k		Results of IIFA by using positive sera		Total
	(+)	(-)	(+)	(-)	
(+)	9	2	10	1	11
(-)	0	17	1	16	17
Total	9	19	11	17	28

Coincidence:

both 92.9%

表 2 两种IIFA敏感性和特异性的比较
Tab. 2 Comparison of two IIFA procedures with sensitivity and specificity

	IIFA (MoAb-20k)	IIFA (positive sera)
Sensitivity	81.8% (9/11)	90.9% (10/11)
Specificity	100% (17/17)	94.12% (16/17)

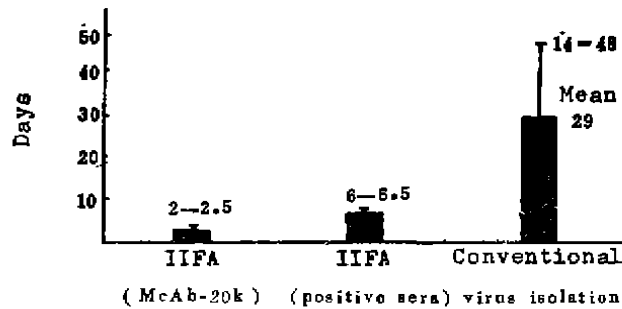


图 1 三种方法所需检测时间的比较
Fig. 1 Comparison of three methods with the detecting time

讨 论

HCMV 感染的快速诊断主要是通过检测病毒核酸、蛋白或特异性 IgM 而实现的^(6,7,8)。核酸杂交虽然具有高度的敏感性,可测出1~6pg DNA 同源序列,且不受病毒死活之限制,但其所需贵重的同位素及其放射性危害和其它众多因素影响它的敏感性和实用性。其它标记物如生物素的应用可改善其缺点^(9,10),目前尚处于实验室研究阶段。特异性IgM 的检测在免疫抑制病人中几乎没有意义。HCMV 感染的临床实验室诊断中,至今仍以病毒分离最敏感可靠,但费时间长,分离后的鉴定较复杂,不能达到早期快速诊断。通过特异性抗体包括单克隆和多克隆抗体检测临床样本接种敏感细胞后病毒装配前合成的多种蛋白质抗原,可于短期内作出诊断,本文介绍的这种融短期细胞培养和免疫荧光反应于一体的检测法具有早期快速,特异敏感的特性,重复性良好,操作较简单,适宜于一般实验室推广应用。

实验结果表明,单克隆抗体应用效果远较 HCMV IgG 阳性血清好,主要优点是时间早,多克隆抗体也有其好处,因可能含有 HCMV 晚期或早期等蛋白抗原的抗体其敏感性较高,但缺点在于其中可能会混有疱疹病毒属其它成员的抗体或交叉抗体以及抗核抗体,此外,疱疹病毒属病毒可使感染的细胞表达出人 IgG Fc 受体⁽²⁾(感染后 36 小时出现,76小时达高峰,持续 6 天),此受体可与人 IgG 结合,上述三种情况均可导致假阳性出现,影响多克隆抗体间接免疫荧光的特异性,分析结果时应特别注意。采取的策略是每次均设阴阳对照,筛选好阴、阳性血清,此外,采用婴幼儿 HCMV IgG 阳性血清可减少假阳性的出现(实验室观察到的现象,未发表资料)。

应用抗即刻早期蛋白的 McAb 或抗早期蛋白的混合 McAb,可更早地判断出 HCMV 在

细胞中的增殖⁽⁴⁾。

HCMV 接种细胞后用 McAb-20k 可在 24~96 小时检测出蛋白抗原, 时间的迟早与病毒量有关, 量越低, 时间越长, 用多克隆抗体则在 3~9 天测出特异荧光。考虑到成人尿液中每毫升带毒量很少, 结合文献报道, 我们选择接种 48 小时和 6 天取出飞片检测 HCMV 抗原, 结果表明此时间较合适。

采用 McAb IIFA 能在一周内确定有无 HCMV 活动性感染, 对于器官移植后的 HCMV 感染的早期快速诊断具有十分重要的意义, 为临床治疗原则的选择提供了重要依据。

参 考 文 献

- (1) Ho, M. Dowling JN, 1980, *Current Clinical Topics in Infectious Disease*, New York, McGraw Hill.
- (2) 黄晓莉, 葛治华, 1986, *微生物学杂志*, 6(2): 53~57.
- (3) 段艳平等, 1989, *中华器官移植杂志*, 发表中.
- (4) Alpert et al., 1985, *J Infect Dis* 152(3): 631-633.
- (5) Chou & Merigan TC., 1983, *N Engl J Med* 308: 921-925.
- (6) Spector SA et al., 1984, *J Infect Dis* 150(1): 121-135.
- (7) Schuster V et al., 1986, *J Infect Dis* 154(2): 309-315.
- (8) McKeating JA et al., 1985, *J Med Virol* 16: 367-372.
- (9) Venkovet A et al., 1987, *J Virol Methods* 16: 29-37.
- (10) Sundqvist VA & Wahran BJ., 1981, *J Virol Methods* 2: 301-312.
- (11) Sutherlands et al., 1983, *J Med Virol* 11: 147-158.
- (12) Nerurkar LS et al., 1983, *J Clin Microbiol* 17: 149-157.
- (13) Myerson D et al., 1984, *J Infect Dis* 150(2): 272-283.

Detection of the Antigen of Human Cytomegalovirus Isolates in Cell Culture by Indirect Immunofluorescent Assay Using Monoclonal Antibody

Duan Yan-ping Chen Xiu-zhu Wu Yuan-ming*

(Department of Microbiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Two indirect immunofluorescent assays (IIFA), using a monoclonal antibody directed against protein antigen (McAb-20k) and specific positive sera of human cytomegalovirus (HCMV) respectively, were applied for the rapid detection of the virus from fifty urine specimens (28 cases) inoculated onto human embryonic fibroblast. By the former procedure 9 of 28 cases were positive at 48 hours postinfection and all of them developed cytopathic effect, by the latter 11 were positive at 6 days postinfection and only 10 cases developed recognizable

cytopathic effect. Comparing with the conventional cell culture in which 11 of 28 cases produced the cytomegalovirus cytopathic effect at a mean of 29-days after inoculation, the sensitivity was 81.8% and 90.9% respectively, the specificity was 100% and 94.12% respectively, and the coincidently was both 92.9%.

So, both procedures were effective, rapid, sensitive and specific. Using the McAb-20k could make a very early diagnosis and have significant practical value. But if there is no McAb, specific positive sera could be substituted.

Key words, Human cytomegalovirus Antigen Monoclonal antigen Indirect immunofluorescent assay