

用免疫荧光法检测登革病毒抗原

丘福禧 张浩燕 邵兰 韩燕

(北京热带医学研究所病毒学研究室, 北京)

罗惠蓉 俞永新 刘文雪 李雪东

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

建立了为检测登革病毒抗原的直接免疫荧光法。将标记荧光素的抗 IV 型登革病毒的免疫腹水 IgG 抗体, 滴加到感染了该病毒原型株的新生小白鼠脑印片和白纹伊蚊细胞系盖玻片培养上进行结合, 都观察到特异的荧光。而未经感染或感染了其它型别登革病毒或日本乙型脑炎病毒的新生小白鼠脑印片上, 均未观察到特异的荧光。这种特异的荧光能被未标记的特异性抗体阻断或抑制。在吸过感染了该病毒的小白鼠血的饲养的部份雌性白纹伊蚊头压片上, 观察到特异的荧光, 而在未吸过感染血的雌性白纹伊蚊头压片上, 均未观察到特异的荧光。

在流行区捕得的 21 只雌性白纹伊蚊中 8 只的头压片和 82 只中 5 只的涎腺、胃和卵巢压片中的细胞浆内观察到 IV 型登革病毒抗原的特异性荧光。而用此法对非流行区饲养的雌性白纹伊蚊的各种压片中均未观察到特异荧光。

登革病毒 (Dengue virus:s) 是在实验室中难于检测和增殖的病毒中的一类。这类病毒, 不象其它节肢动物传播的病毒那样, 接种新生小白鼠脑内所产生的致病作用不强, 有些株在小白鼠中作多次盲目传代仍无发病表现^[1]。

应用细胞培养方法检测登革病毒使灵敏性得到改进。现时灵敏的细胞培养方法是在 LLC-MK₂ 细胞系中的蚀斑检测^[2]。但对不同型和株的感受性不相同^[3]。

Rosen 和 Gubler^[1] 将登革病毒接种到白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 胸腔内, 然后检测, 认为较检测蚀斑的方法更灵敏。所有四个型都能在蚊中复制, 并达到高滴度^[1]。

1977 年 Kuberski 和 Rosen^[3] 报告, 用直接荧光抗体技术可检测任何一个型别的病毒抗原, 可简化分离步骤, 缩短检测时间。

1978 年 5—11 月在广东省佛山地区发生了一次在我国首次证实为登革热的暴发流行。根据病毒学和血清学的研究结果^[4], 确定引起该次流行的病原是 IV 型登革病毒。因为在该地区无埃及伊蚊, 因此推测在流行时期密度高的白纹伊蚊可能是该次流行的传播媒介, 但未从蚊体分离出登革病毒。

在 1979 年建立的直接免疫荧光法, 经鉴定其特异性和灵敏性均较好。将这个方法应用于检测从流行区捕得的雌性白纹伊蚊体内的登革病毒抗原, 目的是确定在佛山地区流行中该蚊是否起到传播媒介的作用。

材料和方法

(一) 材料

病毒: 登革病毒的四个原型株: 1 型 Hawaii

本文于 1980 年 11 月 13 日收到。

株 (CDC)、II 型 New Guinea 株 (CDC)、III 型 H87 株 (CDC) 和 IV 型 H241 株 (CDC) 均为 1978 年自法国巴斯德研究所引入, 都在新生小白鼠脑内传 5 代以上。

(二) 方法

1. 免疫腹水的制备: 按 Russell 等^[3]的方法在用肉瘤-180 诱发腹水的成龄小白鼠中制备抗 IV 型登革病毒的免疫腹水。

2. 免疫腹水 IgG 抗体的提取: 用盐析法和 DEAE-Sephadex A₅ 柱层析法从抗登革病毒的免疫腹水提取 IgG 抗体^[6,7]。用紫外线分光光度计测定其 IgG 抗体峰和蛋白质含量。

3. IgG 抗体的标记: 采用透析标记法^[6,7]。用 0.025 M、pH9.2 的碳酸盐-重碳酸盐缓冲液将 IgG 抗体的蛋白质含量稀释成 10 毫克/毫升, 装入透析袋。用同样缓冲液将异硫氰酸荧光黄配成 0.1 毫克/毫升的浓度, 装入圆柱形容器内。所用缓冲液量为 IgG 抗体溶液量的 10 倍。然后将装有 IgG 抗体的透析袋浸没于荧光素液中。将容器顶端盖紧, 底部放搅拌棒, 在 4℃ 冰箱内电磁搅拌 24 小时。取出透析袋, 放在 0.01 M、pH7.1 的冷磷酸盐缓冲液中透析, 去除游离的荧光素。荧光素标记抗体溶液的 F/P 比值为 1.14。

4. 鼠脑印片的制备: 取保存于鼠脑的登革病毒原型株, 研磨, 加 5% 灭活兔血清生理盐水制成 10^{-2} 悬液, 低速离心。取上清液接种 1—3 日龄新生小白鼠 (图版 I-1) 脑内, 每只 0.02 毫升。发病 (图版 I-2) 后, 剖取鼠脑, 立即印在已放 -20℃ 预先冷冻的玻片上, 制备成冷印片, 用电扇吹干。放入冷丙酮中固定 10 分钟。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液浸洗三次去除丙酮, 吹干。取未感染的新生小白鼠的脑, 用同法制备冷印片。

5. 白纹伊蚊细胞系盖玻片培养: 以 90% 的 1640 液和 10% 的小牛血清, 内含卡那霉素、青霉素、链霉素和双性霉素各 100 单位及 2% NaHCO₃, 作为蚊细胞系 (C6/36 白纹伊蚊细胞系)^[1] 盖玻片培养的营养液。长成单层后, 以 2% 人血清白蛋白 Hanks 溶液将研磨的登革病毒原型株稀释成 10^{-2} , 接种 0.2 毫升到细胞培养瓶中。在 28℃ 恒温箱中吸附 1 小时, 倒出病毒液, 用 Hanks 溶液洗一次。加营养液 1 毫升。放 28℃ 培育 4 日, 取出盖玻片, 用 pH7.1 的磷酸盐

缓冲液洗去杂质和衰老细胞, 用电扇吹干。放入新鲜冷丙酮中, 在室温固定 10 分钟。再用该缓冲液浸洗三次去除丙酮, 用电扇吹干。取未感染的蚊细胞系盖玻片培养, 用同法处理。

6. 制备饲养的蚊头压片: 取登革病毒原型株感染的新生小白鼠脑, 以 5% 灭活兔血清生理盐水制成 10% 悬液, 腹腔接种 8—10 克重的小白鼠, 每只 0.5 毫升。感染后 30 分钟, 使蚊吸血。然后放在 27℃ 饲养 10—14 日, 制备蚊头压片。按上述制备鼠脑印片的方法固定, 吹干。取未感染的蚊的头, 用同法制备压片。

7. 流行区的雌性蚊头压片及涎腺、胃和卵巢压片的制备: 均按上法制备。

结 果

(一) 鼠脑印片中抗原的检测和特异性鉴定

1. 将标记的抗 IV 型登革病毒的 IgG 抗体滴加到未感染和感染了 IV 型、II 型登革病毒或日本乙型脑炎病毒原型株的鼠脑印片上, 在 37℃ 恒温箱中 45 分钟进行结合。取出, 放入 pH7.1 的磷酸盐缓冲液中浸洗和电磁搅拌三次, 每次 5 分钟。用蒸馏水浸洗, 吹干, 在荧光显微镜下观察。结果见表 1、图版 I-3、4。

表 1 用标记的 IgG 抗体检测抗原的结果

| 新生小白鼠脑印片 | | | | 白纹伊蚊细胞系盖玻片培养 | |
|----------|----------|----------|----------|--------------|----------|
| 未感染 | 感染了 | | | 未感染 | 感染了 |
| | IV 型登革病毒 | II 型登革病毒 | 日本乙型脑炎病毒 | | IV 型登革病毒 |
| 0/18* | 29/29 | 0/11 | 0/11 | 0/13 | 13/13 |

* 分母表示检测数; 分子表示细胞浆内有特异性荧光的阳性数。

2. 将标记的未免疫腹水 IgG 滴加到 11 只感染了 IV 型登革病毒原型株的和 11 只未感染病毒的鼠脑印片上进行染色, 都

1) 美国夏威夷大学研究协会太平洋研究单位 Rosen, L. 教授赠给。

不发出特异的荧光。

3. 将未免疫的腹水 (稀释度为 1:12) 先滴加到感染了 IV 型登革病毒原型株的鼠脑印片上, 在 37℃ 保温后冲洗, 再滴加标记的免疫腹水 IgG 抗体进行结合, 细胞浆发出特异的荧光。

4. 阻断或抑制试验: 将未标记的免疫腹水 (红血细胞凝集抑制抗体滴度为 1:320。使用 25 个抗体单位, 其稀释度为 1:12) 先滴加到感染了该病毒原型株的鼠脑印片上, 在 37℃ 保温后冲洗, 再滴加标记的免疫腹水 IgG 抗体进行结合, 结果细胞浆只发出极微弱的荧光。这表明特异性结合受到阻断或抑制。

(二) 蚊细胞系盖玻片培养中抗原的检测和特异性鉴定

1. 将标记的免疫腹水 IgG 抗体滴加到未感染和感染该病毒原型株的蚊细胞系盖玻片培养上进行结合。结果见表 1 和图版 I-5。

2. 将标记的未免疫腹水 IgG 滴加到 8 瓶感染了该病毒原型株的蚊细胞系盖玻片培养上和 8 瓶未感染的蚊细胞系盖玻片培养上进行染色, 结果都不发出特异的荧光。

3. 阻断或抑制试验: 将未标记的免疫腹水先滴加到感染了该病毒原型株的蚊细胞系盖玻片培养上, 在 37℃ 保温后冲洗, 再滴加标记的免疫腹水 IgG 抗体进行结合, 结果细胞浆只发出极微弱的荧光。这表明特异性结合受到阻断或抑制。

(三) 饲养的蚊头压片中抗原的检测和特异性鉴定

将标记的免疫腹水 IgG 抗体滴加到未吸过和吸过感染了该病毒的小白鼠血的饲养的雌性白纹伊蚊头压片上进行结合。结果见表 2、图版 I-6、7。

(四) 在流行区捕得的和在非流行区

表 2 用标记的 IgG 抗体检测蚊压片中抗原的结果

| 雌性白纹伊蚊头压片 | | 雌性白纹伊蚊压片 | | | |
|------------------|------|-----------------|----------------|--------|-----------|
| 吸过感染病毒的小白鼠血 | 未吸过 | 捕得的 | | 实验室饲养的 | |
| | | 头压片 | 涎腺、胃和卵巢压片 | 头压片 | 涎腺、胃和卵巢压片 |
| 6/50* (12.0%) | 0/21 | 8/21 (38.1%) | 5/82 (6.1%) | 0/43 | 0/9 |

* 同表 1。

饲养的蚊的各种压片中抗原的检测

将标记的免疫腹水 IgG 抗体滴加到从流行区捕得的和作为对照的在非流行区饲养、繁殖、羽化的雌性白纹伊蚊各种压片上进行结合。结果见表 2 和图版 I-8。

讨 论

我们检测吸过感染该病毒的小白鼠血的饲养的雌性白纹伊蚊头压片所得的阳性率较低, 可能与饲养温度偏低 (27℃) 以及提供病毒血症的实验动物种类不同 (所使用的是小白鼠而非猴) 有关。

从白纹伊蚊的头压片中检出的阳性率较高表明, 蚊头部含的病毒抗原量较多。

参 考 文 献

- [1] Rosen, L. and Gubler, D.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, 23: 1153—1160, 1974.
- [2] Yuill, T. M. et al.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, 17: 441—448, 1968.
- [3] Kuberski, T. T. and Rosen, L.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, 26: 533—537, 1977.
- [4] 广东省佛山防治登革热协作组: *微生物学报*, 21(2): 239—246, 1981.
- [5] Russell, P. K. et al.: *J. Immunol.*, 105: 838—845, 1970.
- [6] Kawamura, A. Jr.: *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, 2nd Ed., University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore and Manchester, 1979, pp. 13—94.
- [7] Liu, C.: *Fluorescent antibody techniques*. In "Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections" (E. H. Lennette and N. J. Schmidt, eds), 4th Ed., American Public Health Association, New York, 1969, pp. 179—204.

THE DETECTION OF DENGUE VIRUS ANTIGEN BY IMMUNOFLOUORESCENCE METHOD

Qiu Fuxi (Chiu Fuhsi) Zhang Haoyan Shao Lan Han Yan

(*Department of Virology, Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing*)

Luo Huirong Yu Yongxin Liu Wenxue Li Xuedong

(*National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing*)

The method of direct immunofluorescence for the detection of dengue virus antigen was established. Brain imprints of newborn mice and coverglass cultures of *Aedes albopictus* mosquito cell line which had been infected with prototype strain of Type IV dengue virus were stained with Fluorescein isothiocyanate-labeled IgG of immune ascitic fluid against Type IV dengue virus. Specific fluorescence was observed in the cytoplasm of all the samples tested which could be inhibited by unlabeled specific antibody. No specific fluorescence was observed in all the corresponding uninfected imprints and coverglass cultures, and also brain imprints of newborn mice infected with dengue virus other than Type IV or Japanese B encephalitis virus.

Specific fluorescence was detected in a portion of the head squashes of female *Aedes albopictus* mosquitoes which had sucked the blood of mice infected with Type IV dengue virus. While in all the head squashes of normal female *Aedes albopictus* mosquitoes, no specific fluorescence was demonstrated.

Type IV dengue virus antigen was found in 8 out of 21 head squashes and in 5 out of 82 salivary gland, stomach and ovary squashes of female *Aedes albopictus* mosquitoes captured from the epidemic region of dengue fever. On the other hand, in 43 female *Aedes albopictus* mosquitoes bred in the laboratory in non-epidemic region, results were all negative.