

直接荧光抗体技术在婴幼儿腺病毒肺炎 早期和快速诊断上的应用

丘福禧 邵 兰 张海燕 王秀云 索玉琴 李桂英

(北京友谊医院病毒研究室, 北京)

本研究用标记异硫氰酸荧光黄的 3 型和 7 型腺病毒高价免疫兔血清抗体球蛋白或精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清球蛋白, 检查临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿咽壁剥落细胞中的腺病毒抗原, 得到较高的阳性率。在临床诊断为其他肺炎的婴幼儿病例中, 大多数的结果为阴性。在患其他疾病的一些婴幼儿都是阴性。标记的腺病毒免疫球蛋白对麻疹病毒、流感病毒和副流感病毒没有交叉反应。封闭实验说明发出的荧光是特异的。同分离腺病毒和测定双份血清内腺病毒抗体的比较, 大多数符合。

病毒性肺炎的病原涉及到许多种型的病毒^[1]。在我国最常见的病原是 7 型和 3 型腺病毒^[2-4]。常用的实验诊断方法是测定急性期和恢复期血清中的抗体和分离、鉴定病毒。由于这些方法需要较长的时间才能判定结果, 所以只能作为回顾诊断。

近些年来, 荧光抗体技术的发展已经达到具有高度特异性和灵敏度的水平, 为各种病原的早期和快速实验诊断创造了有利的条件。

我们在 1974—1976 年连续三个冬、春从婴幼儿病毒性肺炎的早期病例取咽拭子涂片, 应用直接荧光抗体技术检查剥落细胞中的腺病毒抗原, 并测定其中一部分患儿双份血清内的腺病毒抗体和对其中一部分病例进行腺病毒分离以作比较, 期望通过应用这种方法能达到早期和快速实验诊断的目的。

材料和方法

(一) 标本

从病程早期的患儿取咽拭子, 在清洁的玻璃片上涂抹, 于空气中干燥后, 放入冷丙酮中在室温固定 10 分钟, 取出用磷酸缓冲盐水溶液冲洗, 放

在电扇前吹干。收集发病 1 周以内和第 3—4 周或以上的血清, 以及病程早期的咽拭子, 放于低温冰冻保存。

(二) 免疫球蛋白

所用的免疫球蛋白一种是我们制备的 3 型和 7 型腺病毒高价免疫兔血清, 经用盐析和透析法提取出免疫球蛋白^[5], 另一种是长春生物制品研究所用胃蛋白酶消化和明矾吸附法精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清球蛋白。标记异硫氰酸荧光黄后, 经对麻疹病毒、流感病毒, I 型和 II 型副流感病毒及 3 型和 7 型腺病毒感染细胞的培养进行染色鉴定, 表明有明显的特异性而没有交叉反应。

(三) 荧光素的标记^[6]

所用的抗体球蛋白浓度是 2 克%左右。按所含球蛋白量的 1/50 称取异硫氰酸荧光黄 (Fluorescein iso-thiocyanate, Isomer 1, BDH Chemicals, England), 溶于 0.5M 碳酸盐缓冲液中 (pH 9.5) 使其体积为免疫球蛋白量的 10%。第一种标记荧光素的方法是将异硫氰酸荧光黄慢慢滴加到免疫球蛋白中, 在 25°C 电磁搅拌 1 小时, 通过 Sephadex G-25 柱除去游离的荧光素, 然后通过

本文于 1976 年 10 月 21 日收到。

本工作中的荧光显微镜摄影由中国医学科学院肿瘤防治研究所病毒研究室协助摄制。

DEAE-纤维柱纯化荧光抗体。第二种标记荧光素的方法是将异硫氰酸荧光黄滴加到免疫马血清球蛋白中,在 37℃ 电磁搅拌 30 分钟后,放入透析囊内透析。透析容器用大烧杯内装 pH7.2 磷酸缓冲盐水,放在 4℃ 冰箱内透析 6—7 天,每天换磷酸缓冲盐水 3—5 次。然后低温高速离心(10,000 转/分)40 分钟去除杂质。将标记的 3 型和 7 型腺病毒免疫球蛋白加到同型腺病毒原型株感染的原代人胎肾单层上皮细胞盖玻片培养中,发出特异的荧光。

(四) 免疫荧光染色和观察

将标记荧光素的 3 型和 7 型腺病毒免疫兔血清球蛋白或混合免疫马血清球蛋白滴加在已用丙酮固定的病儿咽拭子涂片上,放在垫有湿纱布的平皿中,在 37℃ 结合 30 分钟,用自来水冲洗,然后用蒸馏水冲洗,放在电扇前吹干。用单筒显微镜观察。所用显微镜是“Ernst Leitz Wetzlar”牌显微镜,光源是 Vorschaltgerät HBO 50 高压水银灯。光线通过隔热滤板和 BG 12 蓝紫光激发滤板。用套着 OG 1 桔黄色滤板的 12 倍接目镜和 45 倍接物镜在暗视野下进行观察。每张涂片上的剥落细胞数以 50 个以上为合格。以细胞核发出特异荧光的上皮细胞作为荧光细胞(图版 I-1)。细胞核不发出特异荧光的上皮细胞为无荧光细胞(图版 I-2)。在一张涂片上,找到 3 个以上的特异的荧光细胞时,判定结果为阳性。找到一个或两个特异的荧光细胞时,判定结果为可疑。找不到荧光细胞时,判定结果为阴性。本工作用两种标记荧光素的方法所得结果相近。

(五) 组织培养

所用细胞是原代人胎肾单层上皮细胞。维持液是含有 2% 小牛血清的 0.25% 乳白蛋白水解物 Hanks 氏溶液。将咽拭子标本接种组织培养分离病毒。结果阳性的进行鉴定,阴性的盲目传代 2 次^[4]。

(六) 中和试验

将病儿的双份血清各以 Hanks 氏溶液作一系列四倍稀释,分别同 3 型腺病毒原型株(GB 株, Huebner 等, 1954 年)和 7 型腺病毒原型株(Gomen 株, Berge 等, 1955 年)(100—1,000 个组织培养 50% 感染剂量)在原代人胎肾单层上皮细胞中做中和试验^[4]。每次实验包括病毒对照和

细胞对照。

(七) 红血细胞凝集(以下简称血凝)抑制试验

将 3 型和 7 型腺病毒原型株分别接种原代人胎肾细胞,用“199”综合培养基作为维持液,制成血凝素。取合用的猴红血细胞,测定血凝滴度。病儿血清先经白陶土处理以除去非特异性抑制物,再经猴红血细胞处理以除去非特异性凝集素。经处理的血清作一系列稀释,同四个血凝单位的血凝素和猴红血细胞进行血凝抑制试验^[6,7]。

(八) 补体结合试验

将病儿的双份血清各以 Hanks 氏溶液作一系列四倍稀释,同腺病毒原型株(3 型)抗原和对照抗原用小量法进行补体结合试验^[4]。每次实验都包括腺病毒原型株(3 型)抗原的抗补体对照、对照抗原的抗补体对照、血清对照、溶血素对照和红血细胞对照。

结 果

(一) 应用荧光抗体技术检查病毒性肺炎的婴幼儿咽壁剥落细胞内 3 型和 7 型腺病毒抗原

在 1974—1976 年连续三个冬、春从临床诊断为病毒性肺炎,年龄为 4 个月—5 岁的早期病例取咽拭子涂片,用直接荧光抗体技术检查剥落细胞内 3 型和 7 型腺病毒抗原。结果见表 1。在 102 例中,有 75 例(73.5%)为阳性。6 例(5.9%)为可疑,其中有 2 例采取咽拭子标本涂片用荧光抗体技术检查时的病期超过第 10 天。21 例(20.6%)为阴性,其中有 4 例采取咽拭子标本涂片用荧光抗体技术检查时的病期超过第 10 天。

为了确定这种方法所得结果的特异性,在工作的前一个阶段曾对一部分阳性病例(大约 1/3 的病例)进行了封闭染色实验。将阳性病例的咽拭子涂片用丙酮固定后,先滴加未标记的精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清,然后用标记荧光素

表 1 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原的结果

临床诊断	结 果	阳 性		可 疑		阴 性	
		例数	(%)	例数	(%)	例数	(%)
病毒性肺炎	102 例	75	73.5	6*	5.9	21**	20.6
其他肺炎	36 例	8	22.6	1	2.8	27	75.0

* 其中有 2 例 } 采取咽拭子标本超过病期第 10 天。
** 其中有 4 例 }

的精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清球蛋白染色。结果涂片上原来应该能发出特异荧光的咽壁剥落细胞，其细胞核不出现特异的荧光，或者出现的特异荧光的亮度大为减弱，表示已被未标记的抗体封闭(图版 I-3)。阳性病例的咽拭子涂片，用丙酮固定后，无自发荧光。先滴加正常兔血清或磷酸缓冲盐水溶液，后用标记荧光素的免疫球蛋白染色，结果发出特异的荧光。先滴加未标记的免疫血清，后滴加磷酸缓冲盐水溶液，结果不发荧光。

在同一时期，还对 36 例临床诊断为其他肺炎，年龄范围相同的早期病例进行了同样检查。结果有 8 例(22.2%)为阳性，1 例(2.8%)为可疑，27 例(75.0%)为阴性。还对 15 例临床诊断为其他疾病(非呼吸道感染)，年龄范围相同的病例进行了同样检查，结果都是阴性。

(二) 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同分离腺病毒的比较

从 47 例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿取咽拭子标本分离腺病毒，并应用荧

光抗体技术检查咽拭子涂片上剥落细胞内 3 型和 7 型腺病毒抗原，进行比较。结果见表 2。有 34 例分离出 7 型或 3 型腺病毒，其中用荧光抗体技术检查结果阳性 31 例，阴性 3 例。有 13 例未分离出腺病毒，这 13 例的 7 型或 3 型腺病毒中和抗体都升高 4 倍以上，其中用荧光抗体技术检查结果阳

表 2 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同分离腺病毒的比较

病 毒 分 离		荧光抗体技术检查	
		阳性	阴性
腺病毒阳性 (7 型或 3 型)	34 例	31 例	3 例
腺病毒阴性	13 例*	12 例	1 例

* 这 13 例的 7 型或 3 型腺病毒中和抗体都升高 4 倍以上。

性有 12 例，阴性有 1 例。

(三) 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同测定双份血清内腺病毒抗体的比较

从 88 例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿取到急性期和恢复期双份血清，其中

表 3 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同测定双份血清内腺病毒抗体的比较

双份血清内腺病毒抗体的测定		荧光抗体技术检查		
		阳 性	可 疑	阴 性
7 型或 3 型中和抗体升高 4 倍以上 51 例		43 例	5 例	3 例
7 型或 3 型血凝抑制抗体	升高 4 倍以上 17 例	17 例	0	0
	未显著升高 20 例	3 例	2 例	15 例
补体结合抗体升高 4 倍以上 9 例		9 例	0	0

51 例测定了 7 型和 3 型腺病毒中和抗体，37 例测定了 7 型和 3 型腺病毒血凝抑制抗体，9 例测定了腺病毒补体结合抗体，并应用荧光抗体技术检查咽拭子涂片上剥落细胞内 3 型和 7 型腺病毒抗原，进行比较。结果见表 3。

所有 51 例的 7 型或 3 型腺病毒中和抗体都升高 4 倍以上，其中用荧光抗体技术检查结果阳性 43 例，可疑 5 例，阴性 3 例。

在测定腺病毒血凝抑制抗体的 37 例中，17 例升高 4 倍以上，用荧光抗体技术检查结果都是阳性。有 20 例的腺病毒血凝抑制抗体未显著升高，其中 15 例用荧光抗体技术检查结果为阴性，2 例可疑，3 例为阳性。

所有 9 例的腺病毒补体结合抗体都升高 4 倍以上，用荧光抗体技术检查结果也都是阳性。

（四）应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同测定双份血清内腺病毒抗体和分离腺病毒的比较

对 31 例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿进行了荧光抗体技术检查同双份血清抗体测定和病毒分离的比较。结果见表 4。

表 4 应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同测定双份血清内腺病毒抗体和分离腺病毒的比较

7 型或 3 型腺病毒中和抗体	病 毒 分 离	荧光抗体技术检查	
		阳性	阴性
升高 4 倍以上 28 例	分离出同型腺病毒 17 例	15 例	2 例
	未分离出病毒 11 例	9 例	2 例
未升高 3 例	阴性 3 例	0	3 例

（五）应用荧光抗体技术检查 3 型和 7 型腺病毒抗原同尸体剖检结果的比较

有一死亡病例在尸体剖检时，在其肺组织细胞内找到核内包涵体，病理诊断为腺病毒肺炎，用荧光抗体技术检查结果为

阳性。另有一死亡病例的病理诊断为细菌性肺炎，用荧光抗体技术检查结果为阴性。

讨 论

近几年来，在国外，直接荧光抗体技术已较普遍地被应用作为一些呼吸道病毒感染的一种早期和快速的实验诊断方法。应用比较成熟的是在流感病毒感染^[8-10]、呼吸道融合细胞病毒感染^[11-13]和副流感病毒感染^[12,14]。而在腺病毒感染方面的应用却很少。Liu (1969 年)^[10]和 Kawamura (1969 年)^[5]在他们对荧光抗体技术的专门论述中都没有提到直接荧光抗体技术在腺病毒呼吸道感染的应用。Horstmann 和 Hsiung (1965 年)^[15]以及 Fenner 和 White (1970 年)^[16]在论述病毒性疾病的快速诊断技术时根本没有提到荧光抗体这一技术。1972 年 McCormick 等^[17]报告应用直接荧光抗体技术检查呼吸道感染病人咽壁剥落细胞中的腺病毒抗原，得到与用病毒分离技术相近的结果。

我们从 1974 年开始应用直接荧光抗体技术检查婴幼儿病毒性肺炎早期病例的咽壁剥落细胞中的腺病毒抗原，在大多数病例得到阳性结果。所用的免疫球蛋白是我们制备的 3 型和 7 型腺病毒高价免疫兔血清球蛋白。所查出的腺病毒抗原型别以 7 型为多，其次是 3 型。在同一时期，我们了解到长春生物制品研究所制备出精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清，试用于临床治疗腺病毒肺炎，并初步应用于荧光抗体技术做早期诊断。1975 年和 1976 年我们采用长春生物制品研究所精制的 3 型和 7 型腺病毒混合免疫马血清球蛋白标记荧光素，也获得满意的结果。在分离出腺病毒的 34 例病毒性肺炎中，用直接荧光技术检查结果为阳性的有 31 例，两者的阳性符合率达 91.2%。在双份血清内 7 型或 3

型腺病毒中和抗体显著升高的 51 例中,用直接荧光抗体技术检查结果为阳性的有 43 例,两者的符合率达 84.3%。

本研究用直接荧光抗体技术检查得到较高的阳性率表明,这种实验诊断方法是较灵敏的。标记的腺病毒免疫球蛋白对麻疹病毒、流感病毒、I 型和 II 型副流感病毒没有交叉反应。封闭实验表明,发出的荧光是特异的。在临床诊断为其他肺炎的婴幼儿病例中,大多数的结果为阴性。在患其他疾病(非呼吸道感染)的婴幼儿都是阴性。直接荧光抗体技术同分离腺病毒和测定双份血清内腺病毒抗体的比较,大多数符合。这些结果表明,这种实验诊断方法是特异的。

本研究用直接荧光抗体技术检查婴幼儿腺病毒肺炎早期的咽拭子标本,可以在采取标本后 1 个多小时得出结果,从而为本病提供一种实用的早期和快速的实验诊断方法。

参 考 资 料

- [1] 丘福禧: 医学参考资料, (9): 386—392, (10): 459—467, 1975.
- [2] 任贵方等: 中华医学杂志, 48: 71—76, 1962.
- [3] 朱既明等: 微生物学报, 9: 20—29, 1963.
- [4] 丘福禧等: 微生物学报, 17(2): 141—145, 1977.
- [5] Kawamura, A. Jr.: *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, p.23—25, 38—44, 94—95, 104—109, University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore and Manchester, 1969.
- [6] Rosen, L.: *Amer. J. Hyg.*, 71: 120—128, 1960.
- [7] Rosen, L. et al.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 107: 434—437, 1961.
- [8] Liu, C.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 92: 883—887, 1956.
- [9] Tateno, I. et al.: *New Eng. J. Med.*, 274: 237, 1966.
- [10] Liu, C.: *Fluorescent antibody technics*. In “*Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*” (EH Lennette and NJ Schmidt, eds.) 4th Ed., p. 193—199, American Public Health Association, New York, 1969.
- [11] Gardner, P. S. and McQuillin, J.: *Brit. Med. J.*, 3: 340, 1968.
- [12] D'Alessio, D. et al.: *Appl. Microbiol.*, 20: 233—239, 1970.
- [13] Nagahama, H. et al.: *J. Infect. Dis.*, 122: 260—271, 1970.
- [14] Marks, M. I. et al.: *Pediatrics*, 48: 73—78, 1971.
- [15] Horstmann, D. M. and Hsiung, G. D.: *Principles of Diagnostic Virology*. In “*Viral and Rickettsial Infections of Man*” (FL Horsfall and I Tamm, eds.) 4th Ed., p. 405—424, Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania, 1965.
- [16] Fenner, F. and White, D. O.: *Laboratory Diagnosis of Viral Disease*. In “*Medical Virology*”, p. 213, Academic Press, New York and London, 1970.
- [17] McCormick, D. P. et al.: *Appl. Microbiol.*, 24: 389, 1972.

THE APPLICATION OF DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE IN THE EARLY AND RAPID DIAGNOSIS OF ADENOVIRUS PNEUMONIA IN CHILDREN

Qiu Fuxi, Shao Lan, Zhang Haoyan, Wang Xiuyun,
Suo Yuqin and Li Guiying

(Virus Research Laboratory, Beijing Friendship Hospital, Beijing)

The application of rabbit hyperimmune serum globulin against Type 3 and against Type 7 adenovirus or horse purified mixed immune serum globulin against Type 3 and Type 7 adenovirus labeled with fluorescein isothiocyanate in examination for antigen of adenovirus in exfoliated pharyngeal cells from cases of infants with the clinical diagnosis of virus pneumonia showed a rather high positive rate. Whereas in cases of infants diagnosed clinically as pneumonia of other etiologic agents, a negative result was ob-

tained in the great majority of cases. Some infants with various other diseases all gave a negative result. Labeled immune serum globulin against adenovirus did not react with measles virus, influenza virus or parainfluenza viruses. Blocking experiment (or inhibition test) demonstrated that the emission of fluorescence was specific. Comparison with isolation of adenovirus and assay of antibodies to adenovirus in paired sera showed good agreement in the majority of cases.