

免疫荧光技术快速诊断小儿腺病毒肺炎的研究

赵锦铭 张梓荆 白莹 王树欣

(中国医学科学院儿科研究所)

赵金开 黄志尚 于曼 李红

(中国人民解放军 59175 部队)

近年来,常采用免疫荧光抗体技术诊断流感病毒、副流感病毒和合胞病毒感染的疾病^[1]。这一技术与鼻压片检出包涵体、白细胞碱性磷酸酶积分、鼻纤毛细胞破坏、四唑氮蓝还原试验等方法比较,有很多优点。但也有人认为该技术还不能代替常规的病毒学方法^[2]。本文采用了“疑似”小儿腺病毒肺炎^[3]患儿的咽部脱落细胞涂片及咽拭子标本转种细胞玻片,同时进行3、7型腺病毒直接法和间接法免疫荧光检查,并平行进行病毒常规检验,以探索免疫荧光技术诊断腺病毒感染的实用价值。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 毒株: 腺病毒3型 G、B 株, 7型 Comon 株。

2. 血清: (1)腺病毒3、7型免疫荧光血清: 本室的兔抗3、7型腺病毒 I_gG 和长春生物制品研究所的精制马抗3、7型腺病毒 I_gG。标记异硫氰酸荧光黄 (FITC), F/P 克分子比值为2。

(2) 间接法第1血清: 采用兔抗3、7型腺

病毒混合血清,中和效价 >1:320,免疫荧光效价 1:8。

(3) 间接法第 2 血清: 羊抗兔 IgG-FITC (制备方法见文献 4)。每毫升含 15 毫克蛋白, F/P 重量比值为 2.5×10^{-3} 。

3. 标本液: 0.5% 乳白蛋白水解物 Hanks 液。

4. 试验用细胞: 原代单层人胚肾细胞 (简称人胚肾细胞)。

5. 封片胶: 聚乙烯醇甘油磷酸缓冲液。

二、方法

1. 咽标本的处理: 发病 10 日内肺炎患儿的咽拭子, 浸入标本液中, 弃去咽拭子棒, 以 1000 转/分离心 8—10 分钟, 上清液用于分离病毒和转种细胞玻片, 沉淀用于制作脱落细胞涂片。

2. 病毒用人胚肾细胞分离、常规法鉴定。

3. 患儿双份血清检查: 用微量血凝抑制试验。

4. 脱落细胞涂片制作: 将咽标本的沉淀物用标本液快速制成 0.15—0.2 毫升细胞悬液, 在载玻片上, 分别均匀地涂成直径约 1 厘米左右的 6 个涂面, 凉干待查。

5. 细胞玻片标本的制作: 用 Hanks 液洗人胚肾细胞玻片 (0.6×1.7 厘米²) 一次, 感染 0.2 毫升标本液, 在 37℃ 下分别培养 24、48、72 小时后取出玻片, 用 0.01M 磷酸缓冲盐水 (简称 PBS) 洗一次, 凉干备用。凡第一代病毒分离阴性标本, 按上法再传一代 (制作细胞玻片均用人胚肾细胞, 简称玻片细胞)。

6. 标本固定: 室温丙酮固定。

7. 荧光染色: (1) 直接法: 染色前, 标本用 0.01M PBS 洗一次, 细胞涂片的每个涂面或细胞玻片各滴加 0.1 毫升 3、7 型腺病毒 IgG-FITC (0.02% 伊文思蓝 PBS 稀释), 37℃ 水箱染色 30 分钟, 然后流水冲洗 15 分钟, 凉干。(2) 间接法: 第一次染色用兔抗 3、7 型腺病毒混合免疫血清, 第二次染色用羊抗兔 IgG-FITC, 染色时间同上, 最后用封片胶封片。

8. 结果判断: (1) 咽标本转种细胞玻片荧

光阳性的判定按综合标准, 以每份标本的荧光阳性细胞数为主, 并与荧光亮度相结合 (见表 1)。

表 1 咽标本转种细胞玻片后荧光阳性判断标准

		阳 性 程 度			
		+	++	+++	++++
荧光细胞	个数	≤3	≤10	≤20	>20
	亮度	微亮	亮	明亮	十分亮

(2) 脱落细胞涂片荧光阳性的判定: 在 30 个以上的脱落细胞涂面中, 能找到 2 个以上的细胞核具有 3、7 型腺病毒特异性荧光者为阳性。

试 验 结 果

一、免疫荧光技术的特异性试验

1. 荧光血清质量的比较: (1) 用本室的兔抗 3、7 型腺病毒 IgG-FITC 和长春生物制品所的马抗 3、7 型腺病毒 IgG-FITC, 分别检查 36 例受标准 3、7 型腺病毒感染的人胚肾细胞玻片及肺炎患儿咽标本脱落细胞涂片。两种荧光血清阳性例数相同, 荧光亮度近似。

(2) 用两个单位的马抗 3、7 型腺病毒 IgG-FITC 同时检查 20 例脱落细胞涂片, 荧光血清染色结果一致的有 16 例, 染色荧光阳性的另外 4 例是两单位各有 2 例。上述结果表明两单位的 3、7 型腺病毒荧光血清质量相似。

2. 荧光血清的特异性试验: (1) 游离荧光黄的检查: 用 1/3 饱和硫酸铵沉淀合格的荧光血清, 结果上清液中未发现游离荧光黄存在。

(2) 交叉染色试验: 用本室制备的马、兔抗 3、7 型腺病毒 IgG-FITC, 同时染已被甲₃流感病毒 (76—15 株)、II 型副流感病毒 (CA)、合胞病毒 (Long 株)、柯萨奇 B₃、单纯疱疹病毒 (76—36 株) 和 3、7 型腺病毒感染的人胚肾细胞玻片, 结果均未发现马、兔抗 3、7 型腺病毒 IgG-FITC 与其他病毒抗原之间有交叉染色。另外用从患者分离出的乙型流感病毒、单纯疱疹病毒和合胞病毒的咽标本转种细胞玻片后进行

荧光染色，也未见此荧光血清与上述病毒抗原
有交叉反应。说明此荧光血清是特异的。

3. 特异性封闭试验：在检查标本前，用未
标记荧光黄的 3、7 型腺病毒高价特异性抗体，
封闭标本细胞内的病毒抗原，然后用标记的荧
光血清 (I_gG-FITC) 染色，结果在 24 份标本中
有 18 份可使细胞核内的荧光明显减弱，但不能
使之完全消失。说明细胞核内荧光是 3、7 型腺
病毒特异的。

4. 正常儿童咽部脱落细胞的 3、7 型腺病毒
荧光染色检查：对 39 例 5 岁以下正常儿童的
咽部脱落细胞进行 3、7 型腺病毒直接法免疫荧
光染色，结果有 2 例荧光阳性。其原因可能是
以往感染病毒抗原的存留或无临床症状感染所
致。全部标本经人胚肾细胞病毒分离均阴性。

二、咽标本转种细胞玻片的荧光检查

1. 将 117 份肺炎患儿咽标本转种细胞玻片
后，用直接法和间接法同时进行 3、7 型腺病毒
荧光染色检查，荧光阳性总数为 51 例，阳性率
为 43.6%。用直接法或间接法荧光染色检查，
荧光阳性数均为 46 例(阳性率为 39.4%)，另有
5 例或直接法荧光阳性或间接法荧光阳性。全
部标本经人胚肾细胞分离出 53 株 3、7 型腺病
毒，以 7 型为主。标本转种细胞玻片的荧光染
色检查和病毒分离的关系见表 2。

表 2 咽标本转种细胞玻片免疫荧光检查和病毒分离的关系

病毒性 肺 炎	病毒分离	腺病毒 3、7 型荧光检查		荧光/病毒 一致率
		阳性(例)	阴性(例)	
117 例	阳性 53 例	51	2	96.2%
	阴性 64 例	0	64	100%

表 2 结果说明，53 例病毒分离阳性的咽标
本转种细胞玻片后培养 72 小时仅 2 例荧光阴
性，其原因是标本中病毒含量低所致。

2. 48 例咽标本转种人胚肾细胞玻片后，细
胞核内荧光出现时间与病毒分离时病变出现时
间的关系(见表 3)。

表 3 结果说明，48 例咽标本转种细胞玻片
后培养一天，有 19 例可查出腺病毒特异性荧

表 3 咽标本转种细胞玻片的荧光出现时间
和病变出现时间的关系

荧光出现 时间(天) 和 例 数	病变出现的时间(天)和例数									
	1 (天)	2	3	4	5	6	7	8	9	>10
1(天) 19(例)	0	7	5	1	1	3	0	1	1	0
2 24	0	1	2	6	6	3	0	4	1	1
3 5	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0

光，而分离病毒时无一例出现明显细胞病变。在
48 例中仅有一例两者出现的时间相同，同是 2
天。其余 47 例病变出现的时间比荧光出现迟，
约有 77% 的标本迟 2 天以上。

三、咽部脱落细胞涂片的荧光检查

对 172 例肺炎患儿咽部脱落细胞涂片进行
3、7 型腺病毒直接法免疫荧光检查，荧光阳性
数 83 例(阳性率为 48.3%)，病毒分离阳性数
69 例(阳性率 40.1%)。对 172 例中的 85 例标
本同时进行间接法免疫荧光检查，荧光阳性数
42 例(阳性率为 49.4%)，病毒分离阳性数 45
例(阳性率 52.9%)。结果间接法比直接法检
查，病毒分离阳性率高于荧光阳性率。其原因
与各个涂片中荧光阳性细胞数分布不匀有关。

四、直接法和间接法荧光检查结果的比较

1. 咽标本转种细胞玻片用两种方法检查结
果：将 95 例细胞玻片培养 24、48、72 小时后，
用直接法和间接法 3、7 型腺病毒免荧光检查，
结果见表 4。

表 4 95 例细胞玻片用两种方法免疫荧光检查的结果

荧光出现 时间(小时)	病 毒 分 离							
	阳 性				阴 性			
	荧光阳性		荧光阴性		荧光阳性		荧光阴性	
	直接	间接	直接	间接	直接	间接	直接	间接
24	13	11	0	0	0	0	0	0
48	29	26	2	3	1	1	0	0
72	4	7	2	3	0	0	44	44

表 4 结果说明，在病毒分离阳性的 50 例
中，直接法荧光阳性 46 例，间接法 44 例。病毒
分离阴性的 45 例中，两种方法均荧光阴性者 44

例,另一例均荧光阳性。病毒分离阴性是因分离病毒时仅传一代。由此说明,腺病毒的直接法和间接法免疫荧光技术,用于检查咽标本转种细胞玻片的结果相似。

2. 咽部脱落细胞涂片用两种方法检查结果: 82 例咽部脱落细胞涂片用 3、7 型腺病毒直接法和间接法免疫荧光检查, 结果(见表 5)说明, 82 例用两种方法检查均为阳性者有 34 例, 均为阴性者有 30 例。若按两者结果一致计

表 5 咽部脱落细胞涂片用两种方法

		直接荧光		符合率(%)
		阳性(46 例)	阴性(36 例)	
间接 荧光	阳性(40 例)	34	6	85.0
	阴性(42 例)	12	30	71.5

算,平均总符合率为 78%。符合率不太高的原因,可能与每个涂面中荧光细胞阳性数分布不均匀有关。

五、免疫荧光检查和双份血清抗体检查结果的比较

在咽标本经病毒分离阳性,并转种细胞玻片后进行了荧光检查的 53 例患儿中,采集到 20 例双份血清。进行血凝抑制抗体检查,其结果与免疫荧光检查的关系见表 6。

表 6 双份血清抗体检查和细胞玻片荧光检查结果比较

血清血凝抑制 抗体检查		荧光检查			
		直接法		间接法	
		阳性	阴性	阳性	阴性
抗体 增长	≥4 倍(16 例)	13	3	12	3
	0 倍(4 例)	1	3	1	3

注: 间接法荧光阳性有一例染色失败。

表 6 结果说明, 在患儿恢复期血中凡有同型病毒抗体增长者, 用直接法或间接法免疫荧光检查, 绝大多数均是阳性, 其中仅有 3 例免疫荧光阴性, 其原因是标本中病毒含量低。因这 3 例标本感染细胞分离病毒时, 受染细胞在染毒后 12—13 天才出现明显细胞病变, 标本转种细胞时, 又仅培养 48 小时, 因此未能查出荧光阳性。

讨 论

1. 免疫荧光技术诊断呼吸道感染, 与病毒分离和血清抗体检查的平行关系, 文献报道不一^[5-6]。本文报道的 172 例“疑似”小儿腺病毒肺炎及其他病毒肺炎患儿咽部脱落细胞涂片, 以及 117 例患儿咽标本转种细胞玻片后, 进行 3、7 型腺病毒荧光检查的结果, 发现脱落细胞涂片荧光检查, 在与病毒分离的符合率及区别非特异荧光方面, 不如咽标本转种细胞玻片后的荧光检查。这两种方式的荧光抗体检查各有其优缺点, 如脱落细胞涂片的荧光检查, 整个过程操作简单, 出结果快, 但与病毒分离的符合率低, 阴阳性荧光区别不明显; 而咽标本转种细胞玻片后的荧光检查恰好相反。前者还容易产生非特异荧光, 与特异荧光很难区别, 而后者不仅可以克服这一缺点^[9], 还比常规病毒学方法简便, 省时。

2. 应用直接法免疫荧光抗体技术, 需要具备各型的病毒荧光血清, 但制备此血清比较困难, 致病腺病毒的型别又多, 除 3、7 型外, 尚有一部分 11 型, 偶见其他型^[10]。因此, 应用直接法荧光检查腺病毒有一定的局限性。而间接法荧光技术不仅可以解决这一问题, 而且用直接法和间接法荧光检查脱落细胞涂片和咽标本转种细胞玻片结果比较近似, 说明应用间接法检查呼吸道感染比直接法有前途。

参 考 文 献

[1] Atanasin, P. et al.: *Bull. WHO.*, 55(1): 33. 1977.
[2] Fulton, R. B. & P. J. Middleton,: *Infect. Immu.*, 10(1): 92, 1974.
[3] 赵锦铭等: *中华儿科杂志*, 17(3):142, 1979.
[4] 中国人民解放军后 236 部队五所: *微生物学通报*, 2(2): 22, 1975.
[5] Mequillin, J. et al.: *Lancet*, 11(1967): 690, 1970.
[6] McCormick, D. P. et al.: *Appl Microbiol.*, 24(3): 389, 1972.
[7] 湖北省医学科学院病毒研究室: *中华医学杂志*, 9: 530, 1977.
[8] 邱福清等: *微生物学报*, 17(2):148, 1977.
[9] Gardner, P. S. & J. Mequillin,: *Brit. Med. J.*, 3: 340, 1968.
[10] 赵锦铭等: *中华儿科杂志*, 18(3):149, 1980.