DOI:10.16016/j.1000-5404.1980.01.007

用免疫荧光技术检查几种呼吸道病毒

训练部微生物学教研室　朱德钟　李光平　刘启富

免疫荧光抗体技术(简称IFAT)在快速鉴定病毒方面较有价值，但作为常规诊断方法尚未广泛应用[1][2]。近年来国内外学者对某些呼吸道病毒，如流感病毒[3]—[6]、副流感病毒[2]及呼吸道合胞病毒[1]等，应用免疫荧光抗体技术作为快速诊断的手段已有一些报导。我们为研究平战时病毒疾病的快速诊断问题，曾试图用免疫荧光抗体技术作为快速诊断的途径之一。为建立方法和探索病毒在组织细胞中增殖的规律，曾选择流感病毒、副流感病毒及腺病毒实验感染原代人胚肾细胞，用间接免疫荧光染色法检查感染细胞中的病毒抗原，并与常规法比较，以观察其特异性和敏感性。现将实验结果汇报于后。

材料和方法

一、病毒：

流感病毒：甲型—A_3/京生71—1和乙型—B/湘防71—2均由北京生物制品研究所赠给。我室在鸡胚中已传至13代和7代。副流感病毒—1型(仙台株)和3型，由北京军事医学科学院赠给。我室于原代人胚肾细胞中传至8和9代。腺病毒—3型由北京病毒研究所赠给，我室在人胚肾细胞中传过10代。

二、细胞培养和感染细胞片

原代人胚肾细胞按常规方法制备[7]，接种于内放6×15mm盖片的小瓶中，待盖片上基本形成单层细胞后，换成维持液(Eagle氏液98%、灭活小牛血清2%，pH7.2)。并接种稀释病毒液(10^{-3}) 0.2ml，于35℃培养不同时间后，取出感染细胞片，经无菌磷酸盐缓冲液(PBS)pH7.2漂洗后，丙酮固定15分钟，保存于－20℃冰箱。正常对照细胞不接种病毒。

三、特异性免疫血清

1．抗病毒免疫血清：流感病毒按Lief氏[8]鸡血球吸附释放法提纯和浓缩病毒作为免疫抗原(血凝效价>2560/0.2ml)；副流感病毒和腺病毒抗原用原代人胚肾培养物冻化3—4次，经3000转/分钟离心沉淀，取上清再以3.5万转/分钟超速离心沉淀90分钟，将沉淀物用PBS(pH7.2)重新悬起，即为免疫抗原。副流感病毒抗原血凝效价>2560/0.2ml；腺病毒抗原补结效价>1：64。

免疫动物均用体重400克以上的健康雄性豚鼠。免疫方法每次抗原1ml加福氏不完全佐剂1ml，皮内、皮下及肌肉多点注射，间隔10—14天共3次，第4次不加佐剂腹腔注射2ml抗原，10天后试血。流感和副流感病毒免疫的动物血清中血凝抑制抗体效价>2560/0.2ml，腺病毒免疫动物血清中补结抗体效价>1:64时即放血。

2．山羊抗豚鼠IgG血清：取健康豚鼠混合血清，以50%饱和硫酸铵盐析法提取粗球蛋白后，再以DEAE柱层析(0.02M Tris，pH8.0平衡，0.02M Tris，pH8.0＋0.05M NaCl洗脱)纯

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

化，经聚丙烯酰胺凝胶电泳证明在丙球区只有一条带即为豚鼠IgG免疫抗原。免疫方法：选取健康山羊，第一针用1mg/公斤体重抗原加等量福氏完全佐剂，从第二针起每次抗原为2-3mg/公斤体重，加等量不完全佐剂，间隔2周。第4针免疫后10—12天，用双向琼脂扩散法测定抗豚鼠IgG抗体效价，达1：32～1：64时即放血。以上免疫血清均用冻干或—20℃冻存。

四、荧光抗体的制备、染色及镜检法

1．荧光抗体的制备：羊抗豚IgG的提取及纯化法同豚鼠IgG。异硫氰基荧光黄系我校化学教研室供给。荧光素与IgG的重量比为1:100。结合时先将IgG(25mg/ml)溶液调正pH到9.0，荧光素溶于少量0.2M Na_2HPO_4中，于37℃搅拌IgG溶液下逐滴加入荧光素溶液，并滴加0.1M Na_3PO_4调正IgG溶液pH到9.0，继续搅拌2小时。通过葡聚糖凝胶G25除去游离色素后，再以DEAE层析法纯化，取F/P值2—3的组分使用。经特异性染色滴定工作浓度为1:8—1：16。

2．染色方法：在已固定的病毒感染和对照细胞片上滴加已稀释(一般为1：8)的正常豚鼠血清、抗病毒豚鼠血清或PBS，于37℃湿合中30分钟，以pH8.0 PBS淋洗，再滴加羊抗豚IgG荧光抗体，又于37℃30分钟，同上淋洗后，加1/2-3万Evan氏兰复染2—3分钟，同上淋洗，反转盖片封于9：1甘油PBS(pH8.0)中待荧光镜检。

3．荧光镜检及摄影：用普通显微镜装上暗视野集光器，光源为上海医疗器械批发站新产品门市部出品的超高压200瓦汞灯。激发滤光片为$BG_{17}+BG_{12}$，吸收滤光片为GG_9+OG_1。呈现黄绿色荧光为特异荧光染色，以耀眼的特异荧光为阳性判定标准。摄影暴光时间为3分钟。

结　　果

一、几种呼吸道病毒感染细胞的免疫荧光染色观察：

1．流感病毒：原代人胚肾细胞接种甲、乙两型流感病毒感染鸡胚尿液的10^{-3}稀释液后，培养8小时已有少数细胞的核被染有特异性荧光，至12—16小时则核荧光细胞明显增加，其中有的细胞核周围的胞浆中也呈现荧光。20小时左右核内和胞浆内有荧光的细胞均逐渐增加(见图1)。24小时胞浆内出现明显的荧光颗粒，核内荧光相对减弱。36小时以后则胞浆内的荧光颗粒反而减少，似乎病毒抗原已被释放于胞外。

2．副流感病毒：将副流感病毒1和3型病毒10^{-3}稀释液接种于原代人胚肾细胞，培养10小时前尚未发现有明显的荧光细胞。培养12小时则有少数细胞核周围的胞浆内出现明显的特异荧光，16小时—24小时荧光细胞的数目逐渐增加，胞浆内荧光逐渐由核周向细胞膜扩展，并出现大小不等散在的荧光颗粒(见图2)。24小时以后大多数细胞的胞浆内均充满荧光颗粒。

3．腺病毒：原代人胚肾细胞接种腺病毒3型感染组织培养液10^{-3}稀释液后，孵育10小时即可见少数细胞的核内呈现特异性荧光，随着培养时间的推移，核内荧光细胞数目和荧光强度也逐渐增加；24小时绝大多数细胞核呈现荧光，并有些细胞已变圆肿大，胞浆内也出现弥散性荧光；48小时以后则多数细胞变圆，胞浆荧光细胞增加，而核荧光减弱或消失。

二、几种呼吸道病毒感染细胞免疫荧光法与常规法检查的比较：

流感病毒和付流感病毒感染人胚肾细胞后，细胞病变作用不甚明显，常需用血凝或血吸

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

附试验来测定，而以血吸附试验较为敏感。腺病毒3型致细胞病变作用明显。故我们对流感和副流感病毒采用血吸附试验（Had），而腺病毒采用细胞病变（CPE）的常规检查法与免疫荧光（IF）检查法作比较，接种的病毒均为10^{-3}稀释液。结果见表1。

表1 几种呼吸道病毒感染细胞免疫荧光法与常规法检查的比较

病毒	型别	检查方法	感染后培养的时间（小时）							
			6	8	10	12	16	24	36	48
流感	甲	IF	—	+	+	+	+	+	+	+
		Had	—	—	—	+	+	+	+	+
	乙	IF	—	+	+	+	+	+	+	+
		Had	—	—	—	+	+	+	+	+
副流感	1	IF	—	—	—	+	+	+	+	+
		Had	—	—	—	+	+	+	+	+
	3	IF	—	—	—	+	+	+	+	+
		Had	—	—	—	+	+	+	+	+
腺	3	IF	—	—	+	+	+	+	+	+
		CPE	—	—	—	—	—	+	+	+

注：“+”表示阳性结果，“—”表示阴性结果

从表1可以看到，免疫荧光法检出特异性荧光细胞与流感、副流感病毒血吸附试验阳性结果、腺病毒细胞病变的出现是一致的，但流感病毒荧光细胞的检出比血吸附试验阳性结果的出现至少可提前4个小时；两型副流感病毒两种检查法均于感染后12小时检出；而腺病毒3型则免疫荧光法可比细胞病变法提前14小时。

三、用免疫荧光法和常规法检查几种呼吸道病毒在细胞中感染效价的比较

原代人胚肾细胞接种不同稀释度的（$10^{-2}-10^{-8}$）流感、副流感及腺病毒后，培养24、48及72小时后，分别以常规血吸附试验或细胞病变检查与免疫荧光检查，比较病毒在细胞中50%感染效价（$ID_{50}/0.2ml$），结果见表2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 用免疫荧光法和常规法检查几种呼吸道病毒在细胞中的感染效价

病毒	型别	检查方法	感染后不同时间（小时）的病毒感染效价(LogID50/0.2ml)		
			24	48	72
流感	甲	Had	3.5	4.5	—
		IF	5.0	5.5	—
	乙	Had	3.5	4.5	—
		IF	5.0	5.0	—
副流感	1	Had	4.5	5.5	—
		IF	5.5	6.5	—
	3	Had	4.0	5.0	—
		IF	5.5	6.0	—
腺	3	CPE	3.5	4.5	5.5
		IF	4.5	5.5	6.5

注："—"表示未做

从表2看出，用两种方法检查流感、副流感及腺病毒在细胞中的感染滴度均一致地随培养时间而增高，而免疫荧光法比常规法多高于一个对数值，表明免疫荧光法比常规敏感。

讨　论

免疫荧光技术的应用要求具有高纯度的诊断试剂及荧光显微镜的设备[2]。我们采用自制的抗病毒血清、山羊抗豚鼠IgG血清、荧光素以及国产的荧光光源和普通显微镜，对流感、副流感及腺病毒的实验感染细胞进行了免疫荧光染色检查，获得了比较满意的结果。我们认为免疫抗原的纯化、免疫方法的选择和荧光抗体的纯化是保证获得高纯度诊断试剂、减少非特异性的重要环节。国产荧光光源基本上能满足荧光镜检和显微摄影的需要，有利于该技术的推广应用。

用间接免疫荧光检查法观察了流感、副流感和腺病毒在原代人胚肾细胞中的繁殖动态规律，其结果是与国内外有关报导相符合的[4]、[9]、[10]。通过用免疫荧光法与常规法(Had或CPE)对上列三种病毒感染细胞的对比检查表明，免疫荧光法荧光细胞的检出与常规法阳性结果的出现是一致的，而免疫荧光法比常规法可提前4—14小时检出病毒抗原，说明该法具有更高的特异性和敏感性。

通过用免疫荧光法和常规法对上述三种病毒在人胚肾细胞中感染效价比较测定试验表明，两法在反映病毒繁殖的动态规律上是一致的，但免疫荧光法比常规法多高于1个对数值，进一步阐明了该法在病毒定量测定方面的高度特异性和敏感性。因此，我们认为免疫荧光抗体技术在实验室感染细胞中快速检出病毒抗原和快速鉴定病毒上是具有很大优越性的，应于实验室常规检查中推广应用。也只有通过常规应用的实践中，才能不断改进和提高，才能逐步推广应用于临床和流行病学的常规快速诊断。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小　　结

用间接免疫荧光抗体技术检查了流感病毒(甲、乙型)、副流感病毒(1、3型)及腺病毒(3型)实验感染原代人胚肾细胞中的病毒繁殖动态，并与常规法（血吸附或细胞病变）比较，测定了病毒检出的时间和病毒感染效价。实验表明该法比常规法具有更高的特异性和敏感性。

参　考　文　献

1. Fulton, R. E. et al.: Infect. & Immunity, 10(1):92, 1974.
2. Nairn, R. C.: Fluorescent protein Tracing, 4th ed. p. 255, 1976.
3. Tateno, T. I.: Jap. J. Exp. Med. 35(5):383, 1965.
4. 湖北省医学科学院病毒研究室：应用荧光抗体技术快速诊断流感的研究，1979年　第9期　530页。
5. Hers, J. H. PH: The Lancet 1:510, 1968.
6. 朱德钟等：第三军医大学学报，1979年　第1期　第25页。
7. Lief, F. S. et al: J. Immunol. 80:53, 1958.
8. Gardner, P. S. et al: Bull, WHO. 56(1):105, 1978.
9. Kamforin, L. E.: Acta. Virologica 12:144, 1968.
10. Sminina, A. A. et al: Acta Virologica 11:424, 1967.

野战飲水消毒余留色味改善的探討

卫生防疫系军队卫生教研室　卓鉴波　李　文　陈兴春

編者按： 目前外军与我军都在探求改善野战饮水消毒后余留的色味，我校军队卫生教研室于1979年7月开始对此进行了研究，并已取得初步成果，现正按计划对脱氯矫味剂的剂型、作用、储存等方面作进一步的研究。

近代国内外军队野战饮水消毒使用的药物，主要仍是卤素化合物，如我军曾使用过的清水片、有机碘片，目前使用的漂白粉精片，691个人饮水消毒片等。卤素化合物虽然消毒效果好，但最大缺点为消毒后水有嗅味或颜色，不为战士所欢迎，甚至拒绝使用[①②③]。外军野战饮水消毒后，常用硫代硫酸钠或活性炭以去色味，或加用矫味剂，而我军则无此类药物装备。为保证野战饮水消毒能顺利实行，消毒后余留色味的改善已是急待解决的问题。为此，我们在用维生素C片测定漂白粉有效氯的研究工作中得到的启发下[④]，直接用维生素C片去除饮水消毒后的余留色味获得初步结果并总结如后。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

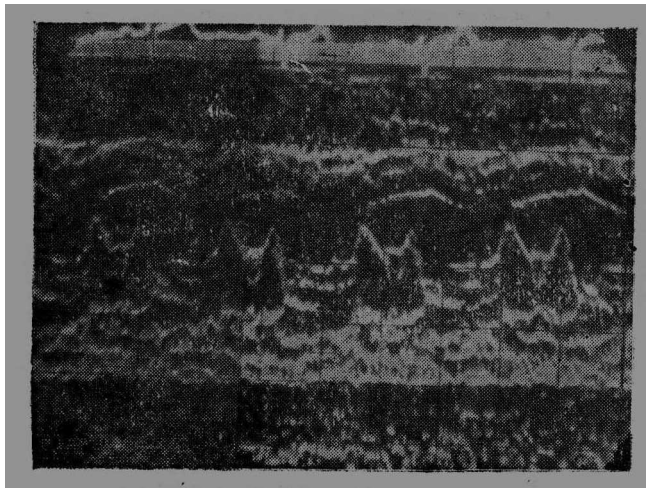


图9　高原心脏病病人二尖瓣脱垂，CD段多重回声，后叶呈弓形向后

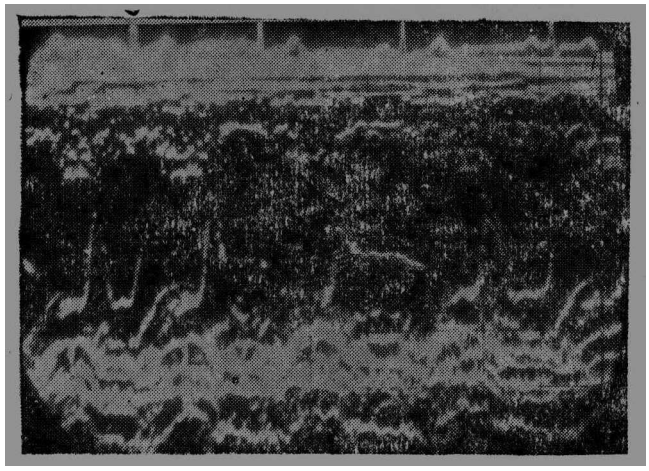


图10　高原心脏病病人之左心室扩大

用免疫萤光技术检查几种呼吸道病毒（见正文37页）



图1　甲型流感病毒（A_3／京生71－1）感染鸡胚尿液，10^{-3}接种原代人胚肾细胞，培养20小时，间接萤光染色后，可见细胞核和胞浆内的特异性萤光

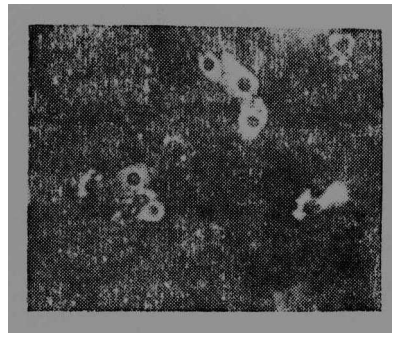


图2　副流感病毒3型感染组织培养液，10^{-3}接种原代人胚肾细胞培养24小时，间接萤光染色后，可见细胞核周围胞浆内呈大小不等的特异性萤光颗粒，有的荧光颗粒已弥散于整个胞浆

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net