

单克隆抗体在酶联免疫吸附试验检测单纯疱疹病毒抗原中的实用性*

沈茜 唐家琪 秦克峰
指导: 汪美先 姜绍淳

(第四军医大学微生物学教研室, 西安)

提 要

本文采用ELISA双夹心法,通过对70份临床送检标本HSV抗原的检测,评价了单克隆抗体(McAb)在快速检测HSV抗原中的实用性。McAb ELISA法的敏感性为20~30 TCID₅₀/0.1ml,临床送检标本病毒抗原的检出与病毒分离结果的一致率为85%。两种McAb混合使用,可以提高方法的敏感性。

单纯疱疹病毒(HSV)可以引起人类的龈口炎、角膜结膜炎、坏死性脑炎等疾病,并且与宫颈癌、唇癌有关。HSV感染的临床表现多样,给诊断和治疗造成一定困难,需要敏感、快速的实验室诊断方法。酶联免疫吸附试验(ELISA)已公认是检测HSV抗原一种敏感、特异、快速的方法^{[1][2]}。我们在实验研究中发现,使用免疫动物多价血清(Poly Ab)进行ELISA,有一定的非特异性着色。单克隆抗体(McAb)因其特异性高、质地纯、易于标准化等优点,日益取代Poly Ab供检测诊断之用。为了进一步提高ELISA的敏感性,便于质量控制,我们采用本室研制的抗HSV McAb^[3]、检测了70份临床标本中HSV抗原,在敏感性、特异性、稳定性等方面与PolyAb进行了比较,初步获得满意的结果。

材料与方法

1. 病毒 HSV-1 SM₄₄株(引自北京生物制品所)、HSV-2 Sav株(引自成都生物制品所),均由BHK₂₁细胞制备,以微量法滴定TCID₅₀/0.1ml,分别为10^{-4.5}(3.1×

* 本项研究得到陕西省卫生厅资助

* 本稿1986年元月6日收到

$10^4 \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$) 及 $10^{-3.67}(4.7 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml})$ 。巨细胞病毒AD 169 株抗原由西安医学院惠赠。麻疹病毒L₄ 株抗原及乙脑病毒S₄ 株抗原分别以FL细胞及SA 细胞自制。

2. 临床送检标本和病毒分离 59份宫颈分泌物标本以棉拭采自不同程度宫颈炎和宫颈癌病人，浸泡于1 ml培养液(0.5%水解乳蛋白Hank's液，含青、链霉素及二性霉素B)。7份拟诊疱疹性口粘膜炎的病损标本；2份唇疱疹标本及2份面部皮肤疱疹标本，均以棉拭采集，浸泡于0.4ml培养液中。取0.1ml标本液在24小时内接种原代乳兔肾细胞(PRK)单层，37℃吸附1小时，加入细胞维持液，37℃培养。逐日观察典型细胞病变(CPE)的出现情况，接种后5天无CPE出现者继续传代，育传三代无CPE出现判为病毒分离阴性。

3. 多价免疫血清的制备 用含 10^4TCID_{50} 的HSV-1、HSV-2接种PRK细胞，制备粗提抗原，皮下多点感染家兔及豚鼠，每周一次，血清抗体效价达 10^{-4} 以上(ELISA间接法)者放血。血清用饱和硫酸铵盐折，DEAE-Sephadex A₅₀提取IgG。

4. 单克隆抗体的制备 杂交瘤IA_{12/2}E₈、ID_{10/2}E₈分泌的McAb为HSV特异，无血清型特异性，腹水效价分别为 10^{-7} 、 10^{-8} (ELISA间接法)。正常腹水用SP₂/D细胞接种Balb/c小鼠获得。

5. ELISA 取IA_{12/2}E₈、ID_{10/2}E₈腹水等量混合，用pH9.6 0.05M碳酸盐缓冲液稀释至 $50 \mu\text{g/ml}$ ，致敏微量板4℃18小时。正常腹水等量同时致敏。洗涤后，用含5%羊血清PBS37℃封闭40分钟。在McAb和正常腹水致敏孔中分别加入0.1ml检测标本，37℃孵育1小时。洗涤后，每孔加入 $30 \mu\text{g/ml}$ 免疫兔IgG，37℃温育1小时。再加入1:10000稀释的HRP-羊抗兔IgG，37℃温育1小时。洗涤后，加入0.1ml OPD-H₂O₂底物，37℃作用20分钟，以5.4M H₂SO₄中止反应，测定A_{490nm}。Poly Ab ELISA以正常豚鼠及免疫豚鼠IgG包被微板，操作同上，第二抗体和酶标抗体工作浓度减少一倍。

以冰冻干燥的HSV-1、HSV-2感染的PRK细胞培养液为阳性对照，用时1:10稀释。正常细胞培养液为阴性对照。抗体致敏孔A_{490nm}与对照致敏孔A_{490nm}的比值(P/N) ≥ 2 ，抗体致敏孔A_{490nm} ≥ 0.1 判为阳性。

6. 预先致敏微量板的使用 微量板致敏、封闭完后，放37℃1小时干燥，装入有干燥剂的塑料袋中封闭，分别置4℃、-10℃保存。将保存不同时间的微量板与新致敏的微量板同时检测，以供对比。

结 果

1. 稳定性：为了比较McAb和PolyAb的稳定性，固定了各抗体的使用浓度，尽量在条件一致的情况下，进行了冻融、4℃保存、37℃保存、干燥预致敏微量板使用等研究，结果见表1。

2. 敏感性：将HSV-1、HSV-2感染的细胞培养液作为ELISA检测抗原，等稀释度的正常细胞培养液为对照。PolyAb ELISA检测HSV-1、HSV-2的最低限度为25~35TCID₅₀/0.1ml及40~50TCID₅₀/0.1ml；McAb ELISA检测HSV-1、HSV-2的最低

度分别为 $20\sim30$ TCID₅₀/0.1ml及 $5\sim15$ TCID₅₀/0.1ml(图1)。检测HSV-1, McAb ELISA的敏感性与PolyAb ELISA相同; 检测HSV-2, McAb ELISA比PolyAb ELISA约敏感4~5倍。

表 1. McAb与PolyAb稳定性的比较

Tab 1. Comparison in reliability between McAb and Poly Ab

Condition of comparison	McAb (A490nm)	PolyAb (A490nm)
New coated microplate	$0.7 \pm 0.12^*$	0.67 ± 0.1
Freeze and thaw 10 times	0.6 ± 0.11	0.61 ± 0.08
Freeze and thaw 20 times	0.42 ± 0.05	0.56 ± 0.11
Store at 4°C 30 days	0.74 ± 0.05	0.7 ± 0.08
Store at 37°C 10 days	0.71 ± 0.06	0.79 ± 0.04
Pre-coated microplate		
Store at 4°C (day)		
4	0.58 ± 0.07	0.64 ± 0.09
7	0.58 ± 0.03	0.7 ± 0.05
10	0.67 ± 0.06	0.77 ± 0.04
Store at -10°C (day)		
4	0.67 ± 0.1	0.67 ± 0.06
7	0.75 ± 0.04	0.69 ± 0.07
10	0.8 ± 0.08	0.76 ± 0.07

* Virus antigen 1:10 dilution A490nm $\bar{X} \pm SD$

用IA₁₂、ID₁₀的混合和腹水及IA₁₂、ID₁₀腹水分别等蛋白量致敏微量板, 检测HSV-1, 结果见图2。IA₁₂致敏板的检出最低限度为90TCID₅₀/0.1ml, ID₁₀致敏板约为150TCID₅₀/0.1ml, 而IA₁₂与ID₁₀混合物致敏板则为 $20\sim30$ TCID₅₀/0.1ml, 比前二者敏感约4~6倍。

3. 特异性: 由于McAb IA₁₂、ID₁₀无血清型特异性, 而第二抗体为HSV-1、HSV-2分别免疫的兔IgG、检测HSV-1、HSV-2的交叉试验的结果见图3。兔抗HSV-1 IgG的McAb ELISA检测HSV-1、HSV-2的最低限度分别为 $20\sim30$ TCID₅₀/0.1ml及 $70\sim80$ TCID₅₀/0.1ml; 兔抗HSV-2 IgG McAb ELISA检测HSV-1、HSV-2的最低限度为 $15\sim25$ TCID₅₀/0.1ml及 $5\sim15$ TCID₅₀/0.1ml。因此, 兔抗HSV-1、HSV-2 IgG的McAb ELISA检测HSV-1、HSV-2存在一定程度的型的差异。

McAb ELISA和PolyAb ELISA检测巨细胞病毒抗原、乙脑病毒抗原及麻疹病毒抗原均呈阴性, P/N值≤1.2。

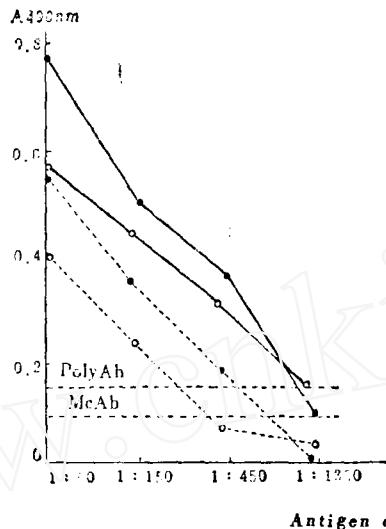


图1. McAb ELISA与PolyAb ELISA敏感性比较
Fig. 1. Comparison of sensitivity between McAb ELISA and PolyAb ELISA

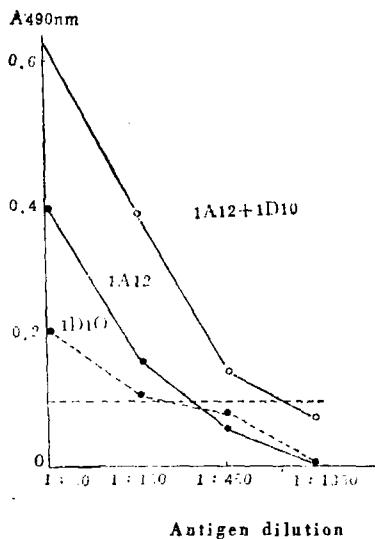


图2. 三种McAb敏感性的比较
Fig. 2 Comparison of sensitivity among three McAbs

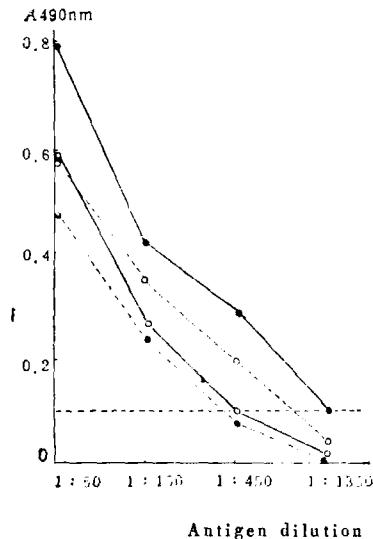


图3 免抗HSV-1和HSV-2 IgG McAb ELISA交叉检测HSV-1、HSV-2抗原的结果
Fig. 3 The results of McAb ELISA used rabbit anti-HSV-1 and HSV-2 IgG cross detecting HSV-1 and HSV-2 antigen

4. 临床标本的检测：McAb ELISA 和 PolyAb ELISA 分别检测 70 份不同来源的临床标本，以病毒分离为对照，结果见表 2。18 份标本病毒分离阳性，阳性率为 25.7% (18/70)。20 份标本 McAb ELISA 检测阳性，阳性率为 28.6% (20/70)，与病毒分离结果的阳性一致率为 85% (17/20)。其中 50 份检测阴性的标本，病毒分离亦阴性。11 份标本 PolyAb ELISA 检测阳性，阳性率为 15.7% (11/70)，与病毒分离结果的阳性一致率为 61% (11/18)。其中 7 份标本 PolyAb ELISA 检测阴性，病毒分离和 McAb ELISA 均为阳性。经配对 χ^2 检验，两种 ELISA 法的检测结果，无统计学差异。

表 2 70 份临床标本病毒分离及 ELISA 检测的结果

Table 2. Results of ELISA and Virus isolation for HSV antigen
in 70 clinical specimens

Source of specimens	No.	Virus isolation (+) No.	ELISA (+) No.	
			McAb	PolyAb
Cervical secretion	59	9	11	2
Suspected gingivo-stomatitis	7	5	5	5
Lip herpes	2	2	2	2
Facial skin herpes	2	2	2	2

讨 论

McAb 具有高度的特性，IA₁₂ 及 ID₁₀ McAb 可以与 HSV-1、HSV-2 型共同抗原起反应。因此，尽管使用兔抗 HSV-1、HSV-2 IgG 交叉检测 HSV-1、HSV-2 时，存在一定程度型的差异，但以 McAb 作为捕获抗体，可以同时检出 HSV-1 和 HSV-2 抗原。

McAb 是抗单一抗原决定簇，若与 PolyAb 相比，对抗原的亲和力较低^[4]。然而，在本 McAb ELISA 系统中，使用了二种 McAb 的混合物，则能大大增加对抗原的结合力，检出抗原的能力约较单独应用时提高 4~6 倍。这种现象已有报道^[5]，从而提示，使用多个高效价、抗不同抗原决定簇的 McAb 混合物，可以明显地提高检出能力。同时，McAb ELISA 几乎没有本底着色 (0~0.05 A_{400nm})，解决了 PolyAb ELISA 本底非特异性着色的问题，提高了敏感性，减少了假阴性反应。

应用 McAb ELISA 检测 70 份临床标本，20 份阳性 (28.6%)，与病毒分离结果的阳性一致率为 85%，其中 2 份标本病毒分离阴性，而 McAb ELISA 检测阳性。这些结果表明，McAb ELISA 检测的结果是可靠的，其敏感性完全达到临床病原学检测的要求，并且可以检出标本中因某些原因失活的 HSV 抗原。与 PolyAb ELISA 检测结果的比较，虽经 χ^2 检验无统计学差异，但是，McAb ELISA 的阳性检出率及与病毒分离结果的阳性一致率均高于 PolyAb ELISA。尤其是 59 份宫颈分泌物标本，McAb ELISA 检测的阳性率为 18.6% (11/59)，PolyAb ELISA 仅为 3.4% (2/59)，从而表明，检测宫颈分泌物

这类病毒含量少、成份复杂的标本，McAb ELISA远比PolyAb ELISA敏感。

McAb的稳定性将决定它的应用价值。本文的结果表明，McAb腹水的稳定性是较好的，足以满足检测试剂的要求。在反复冻融20次后，A_{490nm}下降30~40%，可以经受4℃保存30天以上、37℃保存10天以上，结合抗原的能力仅轻度下降。用 McAb 敏感的微量板在 4℃保存12天或-10℃保存12天以上，与抗原的结合能力轻度下降。这不仅简化了操作步骤，缩短操作时间，还减少了每次致敏抗体浓度的误差，提高了可重复性，使之更利于基层实验室推广使用。

参 考 文 献

- [1] Ziegler, T., 1983, *J.Virol. Methods* 7:1.
- [2] Pronovost, A.D., 1984, *J.Clin. Microbiol.* 13:97.
- [3] 高谦等: 1984.第四军医大学学报 5(2):封底。
- [4] Goding, J.W., 1985, *J.Immunol Methods* 38:285.
- [5] Ehrlich, P.H., 1982, *J.Immunol.*, 128:2709.

THE AVAILABILITY OF MONOCLONAL ANTIBODY IN DETECTING HERPES SIMPLEX VIRUS ANTIGEN WITH ELISA

Shen Qian

(Department of Microbiology, The Fourth Military Medical College, Xian)

A double sandwich ELISA has been developed to detect herpes simplex virus(HSV) antigen in 70 clinical specimens. A valuation on availability of Monoclonal Antibody (McAb) in rapidly detecting HSV antigen was set. The sensitivity of McAb ELISA was 20-30 TCID₅₀/0.1ml. The concordance of detecting HSV between McAb ELISA and virus isolation in clinical specimens was 85%. The mixture of two McAbs was used, it might elevate the sensitivity of ELISA.