

### HFRS 的免疫学诊断问题

——第二届国际 HFRS 学术会议部分国外学者报告摘录

#### Diagnostic Problems of HFRS Immunology

张东海, 田华

R512804

作为临床诊断方法,仍推荐 $\mu$ -捕获 IgM ELISA 作为区别急性或既往感染的血清学技术,尤其是在 HFRS 高发区。但所用的抗体则为针对汉坦病毒 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 或 N 蛋白的特异性 McAb;抗原提倡应用基因重组产物 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 或 N 蛋白。

将汉坦病毒 RNA 的 S 基因片断及/或 M 基因片断插入大肠杆菌中,获取相应的重组细胞 N 蛋白或 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 蛋白的报告有多篇。鉴于 S 基因片断所表达的 N 蛋白是引起早期和长期维持体液免疫反应的主要识别抗原,德国及芬兰学者将汉坦 76/118 株, PuumaloCG18/20 株及 Sotkamo 株病毒 S 基因表达在大肠杆菌中,用获取的重组细胞 N 蛋白作为诊断抗原,应用于检测特异性 IgM 或/及 IgG 抗体的固相 ELISA 试验中,包括成功地用在快速诊断汉坦病毒感染的 IgG 亲和力 ELISA 试验中(类似 IFAT)。韩国学者新近建立了五株针对汉坦病毒的 McAb,均显示对 N 蛋白特异性,其中两株是 IgM 型 McAb,3 株是 IgG 型 McAb(NA4B,NA8B,MA4E)。最适宜作包被抗体的是 MA4E-McAb,最适于标记 HRP 的是 NA8B-McAb。与常规 ELISA 比较(检测特异性 IgM 抗体),McAb-ELISA 的灵敏性是 1ng/ml,而常规法为 64ng/ml;所需时间 McAb-ELISA 为 2.5 小时,常规法为 3.5 小时。德国 ZÖLLER. L. 等将重组 N 蛋白与特异性 McAb 作为一个检测系统,建立了一个新的 $\mu$ -捕获 ELISA,通过检测来源于世界不同地理区域 HFRS 病人的血清表明,总的灵敏性及特异性均可达 100%,优于 IFAT;IgM 抗体在发病第三天即可检出,其滴度最高时期为第 8—25 病日,阳性持续时间多在 3—4 个月以内,但有些病例发病 2 年后仍呈阳性。

鉴于 HFRS 可由血清型不同的 HFRS 病毒引起,各型所致临床症状程度不同,而目前所用 IFAT、ELISA 又难以区分临床某一病例是由何种血清型病毒感染所致(目前主要靠病毒分离、血清中和试验、PCR 等方法),故下一步临床诊断技术的发展,应采用糖蛋白(G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>)特异性的 ELISA 技术等。瑞典 Åke. L. 等建立了可稳定的分泌 McAb6 个月以上的五株 IgG 型单克隆淋巴瘤细胞系(LCLS),其中一个具抗 G<sub>1</sub> 蛋白特异性,4 个抗 G<sub>2</sub> 蛋白特异性(这 4 株均为 IgG<sub>1</sub> 型抗体,等电点均在 9.2)。这些 McAb 与 8 株 Puumala 病毒毒株均起反应,但不与汉坦,汉城及希望山血清型病毒起反应(IFAT);抗体 G<sub>2</sub> McAb 可中和 Puuma 病毒(PRNT)。据德国学者报告,这种血清型特异的诊断方法也包括应用特异性抗原。这些为汉坦病毒各血清型的诊断提供了一定的基础。

Tetsuo. T. 和 H. W. Lee 合作建立的简便快速血清学诊断方法—高密度颗粒凝集试验(HDPA),所用载体是高密度混合物颗粒(HDP),核心为硅石,涂上一层染料后再覆盖一层硅

• 本文 1993 年 4 月 2 日收到,1993 年 7 月 6 日修回

石。HDP 表面有功能基因,可吸附抗原和抗体。HDP 的密度( $d$ )=2,直径( $\varphi$ )=1.8 $\mu$ m。HDPA 实验原理同被动凝集试验。检测步骤为:将纯化的灭活病毒稀释后加入到相同体积的 HDP 在 PBS 的悬浮液中,室温下孵育 1 小时,然后用 PBS 洗涤 2 次,加上保护剂后冻干备用。使用时将已包被抗原的 HDP 悬浮于缓冲液中,加入待检血清,混匀后室温下孵育 40 分钟到 1 小时,即可用目测判定凝集反应结果。在用高度纯化的 Puumala 病毒抗原包被 HDP,以测定其特异性抗体,40 分钟即有结果,反应模式清晰,灵敏度同于 IFAT。但该抗原对汉坦病毒抗体亦起微弱反应;反之亦然,汉坦病毒抗原对两型抗体均起反应,但均不与其他病毒性出血热病毒抗体(如登革热)及其他疾病(如钩体病)起反应。应注意的是待测血清应在使用前加热灭活,否则灵敏度仅为 76%,特异性为 64%,而处理后分别可达 100%及 97.1%(检测 450 份血清结果)。HDPA 滴度似乎可与 ELISA 滴度一致,对 40 年前的病人进行检测时,其滴度仍可达 1:320。HDPA 较 IFAT、ELISA 等方法简便,试验时间短,而灵敏性及特异性高,故适于临床快速诊断及现场血清流行病学调查。但 HDPA 的限制是不能区别 IgG 和 IgM 抗体,只能检测 IgG 抗体(另一问题:该法未能区分汉坦及 puumala 血清型,是否与所用抗原为鼠脑病毒抗原有关。而应用基因重组细胞产物,如 G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>,N 蛋白三者或其中之一,之二作包被抗原,效果如何?——作者注)。

病毒抗原检测,较多采用 PCR 技术,关键是制备适当的核苷酸引物。国外学者在此方面做了较多工作,如:加拿大的 C. Y. Kong 等建立了 5 个表示属特异性的不同核苷酸引物(来自 S 基因片段的恒定区,可决定是否是布尼亚病毒科中的汉坦病毒属病毒),4 个血清型特异的核苷酸引物(分别来自汉城,汉坦,puumala,希望山病毒型病毒 RNA 的 M 基因片段)。但韩国 Y. K. Chui 等建立的属特异性引物,则分别来自 M 基因片断 G<sub>2</sub> 基因区的 1037bp 区和 365bp 区,他们用后者通过反向转录 PCR 检测连续采血的 HFRS 病人血清中汉坦病毒 RNA,发现病毒 RNA 在血清中存在可超过两个月。即使病毒分离阴性,在外周血单核细胞中和汉城病毒持续感染的大鼠骨髓粘附细胞中,仍可通过 PCR 技术测到病毒 RNA。

总之,PCR 技术具有应用于实验室检测和分离病毒株特异性鉴定的重大潜力,并有可能用于流行病学目的及临床诊断,尽管在后者尚存在一定的问题。

(张东海 田 华)