

## 流式细胞术检测汉坦病毒抗原血症的临床应用\*

王卫华<sup>1</sup>, 王峰<sup>2</sup>, 陈洁<sup>1\*\*</sup>, 汪丽<sup>1</sup>, 邹循亮<sup>1</sup>,  
顾欣<sup>3</sup>, 周彬雷<sup>1</sup>, 于宏升<sup>4</sup>

(1. 宁波大学医学院附属医院检验科, 浙江宁波 315020; 2. 宁波市医疗中心李惠利医院检验科, 浙江宁波 315010; 3. 宁波市中心血站, 浙江宁波 315010; 4. Dart Mouth Medical College, USA)

### Clinical Application of Flow Cytometry for Quantification of Hanta Virus

#### Antigenemia in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

WANG Wei-hua<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>1\*\*</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, ZHOU Xun-liang<sup>1</sup>, GU Xin<sup>3</sup>,  
ZHOU Bin-Lei<sup>1</sup>, YU Hong-shen<sup>4</sup>

(1. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital of Medical College, Ningbo University, Ningbo 315020, China; 2. Medical Center of Ningbo City, Lihuili Hospital, Ningbo 315010, China; 3. Blood Center of Ningbo, Ningbo 315010, China; 4. Dart Mouth Medical College, USA)

**Abstract:** The clinical value of the detection Hanta virus antigenemia in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with Hemorrhagic fever with renal syndrome was evaluated. Samples from 32 cases with varying degrees of HFRS were subjected to quantitative detection for HV membrane antigen in PBMC by flow cytometry. The correlation between clinical severity and positive rates was analyzed. On the first day of onset of illness, positive PBMC rates were highly different from group to group ( $P < 0.01$ ), which suggested a close relationship between clinical severity and the positive rate. Dynamic observations showed that in the light and moderate groups, positive rates differed significantly from day to day. This was not the case in the severe group with no statistical significance between the 7th and 10th day ( $P > 0.05$ ), which implied a relatively slow rate of virus elimination. Quantitative analysis of HV antigen in PBMC by FCM is a promising method in early diagnosis, individualized therapy and in evaluating the prognosis of HFRS.

**Key words:** Flow cytometry; Hemorrhagic fever with renal syndrome; Antigen; Hantavirus

关键词: 流式细胞术; 肾综合征出血热; 抗原; 汉坦病毒

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0298-03

在我国, 肾综合征出血热(HFRS)是严重威胁人民身体健康乃至生命安全的急性传染病。及时有效的实验室检查对于指导临床尽早实施抗病毒治疗、进行预后评估, 从而减轻患者临床症状、改变病程甚至降低死亡率都有极其重要的意义。本研究旨在建立流式细胞术定量检测外周血单个核细胞(PBMC)中汉坦病毒抗原血症, 并观察其在 HFRS 的诊断和预后评价中的作用, 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2002 年 4 月至 2004 年 5 月本院就诊的 32 例 HFRS 患者, 诊治标准: GB15996-1995, 捕捉 ELISA 法特异性 IgM 检测均呈阳性。其中男性 25 例, 女性 7 例; 年龄 19 至 75 岁, 平均 (47.5±14.5) 岁。临床分型轻度 19 例 (平均年龄 47.8±10.9 岁), 中

收稿日期: 2005-11-14, 修回日期: 2006-03-06

\* 基金项目: 宁波市医学科技项目 (2003034)

作者简介: 王卫华 (1969-), 男, 湖北黄梅籍, 硕士研究生; 研究方向为医学病毒学。

\*\* 通讯作者: 陈洁 (1971-), 女, 湖北武汉籍, 讲师。Corresponding author. Tel: 0574-87035034, E-mail: wwh196906@msn.com



度 8 例 (平均年龄  $45.3 \pm 17.4$  岁), 重度 5 例 (平均年龄  $50.6 \pm 23.3$  岁), 各组间年龄差异无统计学意义, 定度标准参考文献<sup>[1]</sup>。汉坦病毒膜抗原相应的单克隆抗体由武汉大学医学院医学病毒研究所所长杨占秋教授惠赠; 藻红蛋白 (PE) 标记的羊抗鼠 (IgG<sub>1</sub>) 购自丹麦 DAKO 公司; 流式细胞仪为 BD 公司的 FACSCalibur。

### 1.2 外周血单个核细胞(PBMC)的制备

取 EDTA 抗凝血 2.0 mL, 用淋巴细胞分离液常规分离 PBMC。

### 1.3 PBMC 中病毒抗原的标记 (间接免疫荧光染色法)

取浓度为  $1 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液 100 $\mu$ L, 加 PBA 适当稀释的汉坦病毒膜抗原相应单克隆抗体 (一抗)100 $\mu$ L, 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 30 min, 离心弃上清, 加冷 PBA 离心, 洗涤一次, 以除去多余未结合的特异性抗体。加入冷 PBA 适当稀释过的 PE 标记的羊抗鼠 (IgG<sub>1</sub>) (二抗)50 $\mu$ L, 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 30 min, 避光。冷 PBS 离心, 洗涤二次, 将细胞重新悬浮于 100 $\mu$ L PBS 液中, 混匀, 置 FACS 测试管, 用 FACSCalibur 进行测定。

### 1.4 流式细胞术检测方法

先调出 CELLQUEST 应用软件, 用荧光微球校准仪器, 设信号收集方式为: 前向角散射 (FSC) 和侧向角散射 (SSC) 为线性放大, 荧光 (FL2) 为对数放大, 作 FSC-SSC 点图和 FL2 直方图 (二抗为 PE 染料)。用先期与待测样本同时处理的正常标本作对照, 调节仪器电压和阈值, 并定出 FL2 阳性界限 (采用 95% 界限分隔阴阳性)。在 FSC-SSC 图上寻找到低 SSC 表达的淋巴细胞群, 设门, 剔除碎片和其他白细胞; 分析门内细胞 FL2 表达情况。为保证分析结果的可靠性, 流速选择 LOW, 大致为 60~90 个/s, 分析细胞总数为 10 000 个。每次检测均在标本留取后 6 h 内完成, 同时设阴性对照; PBMC 中病毒抗原阳性率 (%) 以 FL2 阳性区域的表达百分比表示。

### 1.5 统计方法

所测数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示; 组间两样本均数的比较先做方差分析, 再作 *t* 检验, 统计过程由 SPSS 10.0 完成。

## 2 结果

### 2.1 病毒抗原阳性率与临床症状的关系

32 例 HFRS 患者中, 临床表现为轻度者 19 例、

中度 8 例、重度 5 例、无危重患者。FCM 检测结果显示: 同一病程日、临床表现不同组之间 PBMC 中病毒抗原阳性率均差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 提示病毒抗原血症程度与 HFRS 患者临床症状的轻重密切相关。

### 2.2 病毒抗原阳性率动态变化与临床预后的关系

对各组不同病程日患者动态观察结果显示: 轻、中度组不同病程日之间比较均为  $P < 0.01$ ; 重度组第 10、第 7 两个病程日之间的阳性率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明重度组患者病毒清除速率相对缓慢。结果见图 1、表 1。

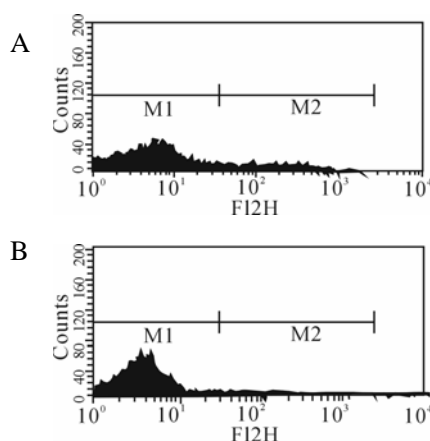


图 1 汉坦病毒抗原血症流式细胞术检测结果实例

Fig.1 A sample of hanta virus antigenemia tested by FCM  
A: Positive sample; B: Negative control.

表 1 PBMC 中病毒抗原阳性率 (%) 与临床症状的关系  
Table 1 The relationship between HV antigen positive rate in PBMC and clinical symptoms

Symptoms(group)	Days after onset		
	7	10	13
Light	13.55 $\pm$ 1.73 (19) *	8.34 $\pm$ 1.27 (12)	5.61 $\pm$ 1.65 (10)
Moderate	22.05 $\pm$ 3.36 (8)	15.31 $\pm$ 2.06 (8)	11.86 $\pm$ 2.50 (6)
Severe	31.57 $\pm$ 4.02 (5)	29.92 $\pm$ 4.89 (5)	21.96 $\pm$ 3.97 (5)

Note: 1. Case number; 2. For the same day after onset, the positive rates of HV antigen differ from group to group ( $P < 0.01$ ); For the same group, the positive rates of HV antigen decreased from day to day in light and media groups ( $P < 0.01$ ), but that was not the case with the severe group, with no statistical difference between the 10<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days ( $P > 0.05$ ), and for the 13<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days,  $P < 0.05$

## 3 讨论

HFRS 的病原体汉坦病毒 (Hanta virus, HV) 侵入人体后, 首先在外周血单个核细胞 (包括 T、B 淋巴细胞, 单核巨噬细胞)、血管内皮细胞以及淋巴结、胸腺、骨髓等免疫器官中增殖, 形成病毒血症。此时受染机体表现为以发热为主的非特异性病

毒感染症状。经过 7~15 d 的潜伏期后,表现出发热、出血、肾损害等 HFRS 症状<sup>[2]</sup>。因此,在 HFRS 典型症状出现之前,应用抗病毒药物如利巴韦林、 $\alpha$ -IFN 等阻断 HV 感染,对于防止或减轻病理损伤至关重要,这就要求临床实验能对 HV 的感染程度进行准确、及时和定量地检测。

利用 HV 首先在 PBMC 中增殖的特性,可检验 PBMC 中病毒核酸和抗原。检测 HV 核酸的方法如核酸杂交探针、RT-PCR 技术等,由于操作繁琐、重复性不理想等原因难以作为临床常规开展项目;白敬羽<sup>[3]</sup>等应用免疫组织化学方法对 HFRS 患者 PBMC 中 HV 的核蛋白和膜蛋白进行了动态观察,认为该方法可作为 HFRS 的早期诊断、预后判断及指导治疗的一项指标;但是免疫组织化学方法既不能定量,也因其操作复杂、不能实现自动化检测等原因仅限于理论研究。

FCM 技术是一种对处在液体中的细胞或其他生物微粒逐个进行多参数快速定量分析和分选的技术。在临床病毒学检验方面,FCM 既可检测感染细胞内的病毒抗原,也可检测感染细胞表面的病毒抗原<sup>[4-6]</sup>,有较高的实用价值,但迄今国内外尚未见将 FCM 应用于 HFRS 的报道。本研究利用针对 HV 病毒外膜糖蛋白(MP)单克隆抗体,快速检测并定量感染细胞,达到了预期目标。

研究表明,在发病早期,不同临床表现组之间的病毒抗原阳性率差别较大,组间两两比较均差异有统计学意义( $P<0.01$ );由于 PBMC 中病毒抗原阳性率(%)既可反映机体感染细胞的量,也可反映机体的病毒载量(virus load),因此可作为病毒是 HFRS 的始动因子、可直接致病的有力佐证<sup>[7]</sup>。同时,动态观察表明,轻、中度组能以较快的速度清除病毒,而重度组病毒血症在较高的水平上维持

较长的时间,因此 FCM 检测对 HFRS 病情发展、预后判断也有很高的参考意义。

我们所建立的 FCM 方法灵敏、快速、准确,并可实现自动化检测,因而显示出很好的特异性和重复性,特别适合于临床常规开展,在 HFRS 的早期诊断、个性化治疗和预后判断等方面有一定的临床应用价值。

## References

- [1] Chen H Z (陈灏珠). Practical Physiology (实用内科学) [M]. Beijing: The People's medical publishing house, 2001. 362-363.
- [2] Yang Z Q, Yu H, (杨占秋, 余宏) *et al.* Clinical virology (临床病毒学) [M]. Beijing: Chinese medical technology publishing house, 2000. 242-244.
- [3] Bai J Y, Ni D S, Zhou G P, (白敬羽, 倪大石, 周国平) *et al.* An analysis on viral structural protein in Peripheral blood mononuclear cells in patients with Hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. Chin J Infect Dis (中华传染病杂志), 1996, 14: 85-88.
- [4] Ma W H, Xu C H, Fan J, (马伟杭, 徐陈槐, 范骏) *et al.* The use of flow cytometry for the detection of CMV in recipients of transplantation [J]. Chin J Lab Med (中华检验医学杂志), 2002, 25: 20-22.
- [5] Barardi C R, Emslie K R, Vesey, *et al.* Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry [J]. J Virol Methods 1998, 174: 31-38.
- [6] Zoetewij J P, Eyes S T, Orenstein J M, *et al.* Identification and rapid quantification of early-and late-lytic human herpesvirus 8 infection in single cells of flow cytometric analysis: characterization of antiherpesvirus agents [J]. J Virol, 1999, 73: 5894-5902.
- [7] Yang W S, Huang C X (杨为松, 黄长形). The current and future research on Hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. Chin J Infect Dis (中华传染病杂志), 1996, 14: 191-192.