

文章编号:1002-2694(2008)01-0022-04

一种 A 型流感病毒 NP 抗原快速检测试剂的建立*

徐飞海^{1,2},王锐^{1,2},白佳伟^{1,3},齐先佳¹,陈毅歆^{1,2},葛胜祥^{1,2},张军^{1,2},夏宁邵^{1,2}

摘要:目的 建立一种适合现场检测需要的 A 型流感快速诊断试剂。方法 以自制的抗 A 型流感(Flu A)病毒核蛋白(NP)单抗为原料,建立快速检测 A 型流感病毒的双抗体夹心酶免疫渗滤试验,并对其灵敏度和特异性进行了初步评价。结果 该试剂对不同地区流行的各种亚型的 A 型流感病毒株均有较高的反应性,而对非 Flu A 病毒株无交叉反应。比较该试剂与 BD 公司的两种流感快速诊断试剂,发现该试剂对随机选取的 3 株 Flu A 病毒的检测分析灵敏度高出 Directigen EZ Flu A 试剂 5~125 倍,对 2 株 Flu A 病毒的分析灵敏度高出 Directigen Flu A 试剂约 20 倍。另外,用该试剂对 57 份含漱液标本和 170 份动物拭子标本进行检测,结果显示:本试剂的灵敏度(>85%)和特异性(>95%)均优于当前主流的商品化 A 型流感快速诊断试剂。结论 利用抗 Flu A NP 单抗为原料建立了 A 型流感快速诊断试剂,该试剂的应用无需任何专用仪器,操作简便快速,可满足现场检测需要。

关键词: A 型流感病毒;核蛋白;快速检测;免疫渗滤

中图分类号: R373.1 **文献标识码:** A

Development of a rapid test kit for detection of influenza A virus specific nucleoproteins

XU Fei-hai, WANG Rui, BAI Jia-wei, QI Xian-jia, CHEN Yi-xin,
GE Sheng-xiang, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: A rapid test kit for influenza A based on detection of viral nucleoprotein(NP) was developed by using enzyme immuno-filtration assay. This kit has been demonstrated to have high reactivity with a range of influenza A strains from different areas and have no cross reactivity with non-influenza A viruses. In comparison with analytical sensitivity of this kit, Directigen EZ Flu A + B and Directigen Flu A, the results showed that limits of detection of influenza A viruses by this kit were 5-125 fold higher than Directigen EZ Flu A + B for the detection of three influenza A viruses strains, and about 20 fold higher than Directigen Flu A for another two influenza A viruses. Both 57 specimens from Flu patients and 170 trachea swabs from chickens were performed by this kit. The results showed that this kit had a high sensitivity(>85%) and specificity(>95%). Furthermore, this kit is easy to use and can produce results rapidly without the use of special test instruments.

KEY WORDS: influenza A virus; nucleoprotein(NP); rapid diagnostic; immuno-filtration

流行性感冒(简称“流感”)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,可对人群尤其是儿童、老年人及机体免疫力低下的易患人群造成很大的危害,是目前唯一的全球性监测疾病^[1]。流感病毒分为 A、B、C 三型,其中变异大、危害重的主要是 A 型和 B 型流感病毒,尤以 A 型为主。根据病毒外膜上的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的不同,A 型又分为 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型,它常以流行形式出现,能引起世界性大流行,从而造成巨大的经济损失和人员伤亡,因此,实时监测 A 型流感疫情,对流感疑似病例进行快速、准确的诊断就显得极其

重要^[2-4]。

A 型流感病毒诊断的方法包括病毒培养、免疫荧光、核酸检测、血清学检测和抗原快速检测法等^[5-8]。除抗原快速检测法外,其它方法须特殊的技

* 科技支撑计划(2006BAI01B06)、福建省科技重大专项(2004YZ01)、863 计划重点项目(2006AA020905)和福建省科技重点项目(2005Y020)

通讯作者:夏宁邵,Email:nsxia@xmu.edu.cn

作者单位:1. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门 361005;

2. 厦门大学生命科学学院,厦门 361005;

3. 厦门养生堂生物技术有限公司

术和设备、操作复杂、耗时、成本较高,因而难以在一般临床单位广泛开展。抗原快速检测试剂具有快速、方便、廉价、操作简单和无需特殊设备等特点,可实现现场检测,有效减少病人间或已感染人群与高危人群之间的传播。此外,由于抗流感药物在疾病发生早期服用才有效,这进一步突显了快速诊断的重要性,因此抗原快速检测试剂逐渐成为广大临床单位进行 A 型流感病原学诊断的首选^[9-12]。在该领域,国内虽有极少数几家公司开发出了相应产品,但受检测灵敏度等所限,无法满足现场检测的需求。国外商品化 A 型流感病毒抗原快速检测试剂如 Directigen EZ Flu A + B (Becton Dickinson, USA)、Binax NOW (Binax Inc., USA) 等,虽已用于临床上的流感快速诊断,但其缺点是生产成本高、价格昂贵^[13],如 Quidel 公司的 QuickVue Influenza Test 每人份 25 美元,高昂的价格极大地限制了流感快速诊断试剂在我国的普及应用,无法发挥其临床上对流感的有效控制和治疗方面的应有效果。因此我国迫切需要一种自主开发、能满足现场检测需要的 A 型流感病毒快速诊断试剂。

近两年,本中心研制出了一种能够直接鉴定 A 型流感 H5 亚型的禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂 H5-Dot^[14-15]。在此基础上,本研究以自制的抗 A 型流感病毒 NP 单抗为主要原料,利用双抗体夹心法原理和免疫渗滤酶联分析技术平台 (Dot-ELISA),建立了一种适合现场检测需要的 A 型流感病毒特异性 NP 抗原快速诊断试剂。

1 材料与与方法

1.1 细胞、病毒与实验动物 小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) 为本中心保存。所有病毒培养液、气管拭子及泄殖腔拭子均由香港大学新发传染病国家重点实验室管轶教授提供。BALB/c 小鼠 (6~8 周龄) 为本中心动物室提供。

1.2 主要试剂及耗材 PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基喋呤、DMSO、HRP 和显色底物等试剂均为 Sigma 公司的产品。RPMI1640、MEM 基础培养基为 Gibco 公司的产品。胎牛血清为 Hyclone 公司的产品。羊抗鼠 IgG 由北京万泰生物药业有限公司提供。各种常规化学试剂为国产分析纯。硝酸纤维素膜为 MDI 公司的产品。渗滤装置由本中心完全自主设计开发。

1.3 抗 Flu A NP 单抗的制备 利用分子进化分析挑选出包含近年 A 型流感病毒变异分支主要抗原决定簇的毒株,以 HA 滴度 512 的灭活病毒液

与等量的福氏完全佐剂混匀,经皮下注射免疫 BALB/c 小鼠,剂量为 400 μ L/次。初免后 15d 和 29d,分别用同样剂量的病毒液加弗氏不完全佐剂进行加强免疫。融合前 3d,再以 100 μ L 病毒液经脾脏注射做最后加强免疫。细胞融合、克隆化、腹水制备及纯化均按常规方法进行^[16],融合株筛选使用基于 Yu22 病毒的血凝抑制试验法。

1.4 辣根过氧化物酶 (HRP) 的标记^[17] 采用改良过碘酸钠法将 HRP 标记单抗 14F10。

1.5 BD 公司 Directigen EZ Flu A 快速试剂盒的检测 按其说明书进行。

1.6 Flu A NP Dot-ELISA (Flu A-Dot) 首先将高纯度抗 Flu A NP 单抗 14B11 按 2 μ g/孔包被于硝酸纤维素膜的样品检测区,同时包被 200ng 羊抗鼠 IgG 于对照区,25 $^{\circ}$ C 干燥后真空封装 4 保存备用。检测步骤为: 标本预处理:取 200 μ L 待测标本 (病毒培养液或拭子标本浸出液) 加入样品处理装置中,再滴入 14 滴裂解液并充分混匀; 加样:将上述处理样品全部滴入样品检测区,待样品完全渗入,摘掉流控装置; 加入酶标二抗:滴加 4 滴酶标试剂,待酶标试剂完全渗入后,静置反应 2min; 洗涤:用专用洗涤液洗涤 2 遍; 显色:待洗液渗入后,滴入 2 滴显色液,显色 3 min; 终止读值:加 1 滴终止液,5min 内判定结果。

2 结果

2.1 单抗最优配对组合的获得 已筛选到 20 株抗 Flu A NP 单抗,用 13 株不同亚型 (H1~H13 各 1 株) A 型流感病毒代表株、10 株 B 型流感病毒代表株和 2 株新城疫病毒 (NDV) 对现有单抗进一步筛选,最终确定 14B11 为包被单抗,14F10 为酶标单抗。

2.2 Flu A-Dot 试剂与 BD 公司流感快速检测试剂的比较 随机选取 3 株 A 型流感病毒培养液,进行 5 倍系列稀释,分别以 Flu A-Dot 试剂与 BD 公司的 Directigen EZ Flu A 试剂 (胶体金层析法) 进行检测,结果表明 Flu A-Dot 试剂对 3 株病毒均能检测到 0.008 个血凝滴度,而 Directigen EZ Flu A 试剂对该 3 株 A 型流感病毒的检测下限分别为 1、0.2 和 0.04 个血凝滴度 (表 1),提示本试剂盒具有更高的分析灵敏度。

选取 2 株 A 型流感病毒培养液,进行系列稀释,分别以 Flu A-Dot 试剂与 BD 公司的 Directigen Flu A 试剂 (渗滤法) 进行检测,结果表明 Flu A-Dot 试剂对于这 2 株病毒的检测分析灵敏度高出 Directigen Flu A 试剂约 20 倍 (表 2)。

表1 Flu A NP Dot-ELISA 与 Directigen EZ Flu A 检测 A 型流感病毒的分析灵敏度比较

Table 1 Comparison of Flu A NP Dot-ELISA and Directigen EZ Flu A (EZ) for detection of Influenza A viruses

HA Titer	Y280/97 (H9)		Yu22/02 (H5)		1038/06 (H5)	
	EZ	Flu A-Dot	EZ	Flu A-Dot	EZ	Flu A-Dot
1	+	+	+	+	+	+
0.2	-	+	+/-	+	+	+
0.04	-	+	-	+	+/-	+
0.008	-	+/-	-	+/-	-	+
0.0016	-	-	-	-	-	+/-
0.0032	-	-	-	-	-	-

+, Positive; +/-, Weak positive; -, Negative.

表2 Flu A NP Dot-ELISA 与 Directigen Flu A 检测 A 型流感病毒的分析灵敏度比较

Table 2 Comparison of Flu A NP Dot-ELISA and Directigen Flu A (Directigen) for detection of influenza A viruses

HA Titer	Yu22/02		YN115/04	
	Directigen	Flu A-Dot	Directigen	Flu A-Dot
10	+	+	+	+
1	+	+	+	+
0.5	+/-	+	-	+
0.1	-	+	-	+
0.02	ND	+	ND	+/-
0.01	ND	+/-	ND	-

+, Positive; +/-, Weak positive; -, Negative; ND, Not tested.

2.3 对培养病毒的检测 将 55 株不同地区的代表性 A 型流感病毒株 (H1 ~ H13) 培养液进行 10 倍系列稀释,用于检测 Flu A - Dot 试剂的分析灵敏度 (图 1) 和检测病毒谱,结果表明该试剂盒对 55 株 0.1 个血凝滴度含量的病毒都能检出,其中 50 株能检测到 0.01 个血凝滴度,5 株甚至能检测到 0.001 个血凝滴度,说明 Flu A-Dot 试剂对不同地区流行的各种亚型的 A 型流感病毒均有较高的分析灵敏度。用 Flu A-Dot 试剂对 19 株 B 型流感病毒和 1

株新城疫病毒 (NDV) 的鸡胚培养液进行检测,结果无一阳性,提示本试剂具有较好的特异性。

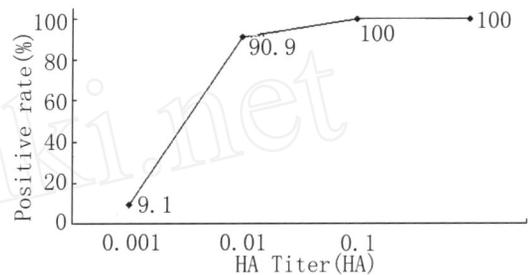


图1 Flu A NP Dot-ELISA Kit 对不同亚型 A 型流感病毒尿囊液的分析灵敏度

Fig. 1 Analytical sensitivity of Flu A NP Dot-ELISA Kit for detection of different subtypes of Influenza A viruses

2.4 对现场标本的检测 用 Flu A-Dot 试剂分别对病人标本和动物标本进行检测 (表 3), 结果具体如下: 1) 病人标本: 香港玛丽医院用 Flu A-Dot 试剂对 37 份病毒培养确证为阳性的含漱液标本进行检测, 结果均为阳性, 对 20 份培养阴性的含漱液标本的检测结果均为阴性; 2) 动物标本: 检测香港某农贸市场采集的 170 份鸡咽拭子, 以病毒分离培养法的检测结果为标准, 结果显示其灵敏度为 74/84 (88.1%)、特异性为 83/86 (96.5%)。

表3 Flu A NP Dot-ELISA 试剂对不同现场标本的检测

Table 3 Performance of Flu A NP Dot-ELISA Kit compared to culture for detection of different field specimens

Host	Specimen types	Sensitivity	Specificity	Predictive Value (%)	
				Positive	Negative
Human	Throat wash	37/37 (100%)	20/20 (100%)	100	100
Chicken	Throat swab	74/84 (88.1%)	83/86 (96.5%)	96.1	89.2

3 讨论

由于流感检测方法的临床价值很大程度上取决于方法的快速性,因而近年国际上流感快速检测试剂发展很快,并得到了 WHO 的推荐用于临床上的流感快速诊断。A 型流感病毒的现场快速检测主

要有两种方法,即胶体金层析法和酶免疫渗滤法。胶体金层析法虽然具备了快速、操作简便和适于现场检测等特点,但敏感性相对较低。2007 年,澳大利亚 WHO 流感中心对目前国际上最多见的 6 种采用胶体金层析法的流感抗原快速检测试剂进行了平

行比较,对 49 例 A 型流感患者临床标本的检测结果显示,其中 Directigen EZ Flu A + B、Binax Now Influenza A & B、Denka Seiken Quick Ex-Flu、Fujirebio Espline Influenza A & B 和 QuickVue Influenza A + B test 五种试剂的灵敏度十分接近,均仅为病毒分离培养法的 67% ~ 73%,Rockby 试剂灵敏度更是仅为 10%^[18]。酶免疫渗滤法虽然在操作简便性上稍逊于胶体金试剂,但其分析灵敏度高出胶体金法 10 倍以上,临床检测灵敏度达到病毒分离培养法的 82.9%^[19]。因此,虽然近年来国外胶体金流感试剂层出不穷,但 BD 公司的 Directigen Flu A + B 试剂(酶免疫渗滤法)在全球流感试剂市场上仍占据约 70% 份额。

本研究采用酶免疫渗滤法,以自制的抗 Flu A NP 单抗为原料,建立了适于现场检测需要的 A 型流感病毒 NP 抗原快速检测试剂。该试剂对不同地区流行的各种亚型的 A 型流感病毒株均有较高的反应性,而对非 Flu A 病毒株无交叉反应,说明该试剂能够用于当前流行的 A 型流感病毒的特异性诊断。另外,在分析灵敏度方面,用本试剂分别与 BD 公司的 Directigen EZ Flu A、Directigen Flu A 试剂进行平行比较,结果显示 Flu A-Dot 试剂对随机选取的 3 株 Flu A 病毒的分析灵敏度高出 Directigen EZ Flu A + B 试剂 5 ~ 125 倍,对另 2 株 Flu A 病毒的分析灵敏度高出 Directigen Flu A 试剂约 20 倍。

2005 年,WHO 对当前十几种流感快速诊断试剂进行了评价,结果灵敏度介于 70% ~ 75%,特异性约 90% ~ 95%^[20]。本研究用 Flu A-Dot 试剂对 50 份流感病人含漱液标本和 170 份动物拭子标本进行检测,结果显示 Flu A-Dot 试剂的灵敏度(> 85%)和特异性(> 95%)均优于当前主流的商品化 A 型流感快速诊断试剂。此外,该试剂的应用无需任何专用仪器,操作简便,无需特殊培训,检测周期不超过 40min,可满足现场检测需要。

参考文献:

- [1] 珠玉芝,杨明,苏杨. 流感病毒快速检测分离鉴定新技术的应用[J]. 中国公共卫生管理,2006,22(3): 233-234.
- [2] Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, et al. Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong [J]. Virology, 1998, 252: 331-342.
- [3] Cattoli G, Drago S M, Toffan A, et al. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds [J]. Avian Path, 2004, 33(4): 432-437.
- [4] WHO. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans [EB/OL]. 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/index.html.
- [5] Maurice W H, Kathy M P. Enzyme immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1982, 15(1): 5-11.
- [6] Michelle Q, Ann C, Maura N, et al. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 759-763.
- [7] Weinberg A, Walker M L. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(3): 367-370.
- [8] William D R, Zubair M W, Michael F, et al. New point of care test is highly specific but less sensitive for influenza virus A and B in children and adults [J]. J Med Virol, 2004, 74: 127-131.
- [9] Landry M L, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B [J]. J Clin Virol, 2004, 31(2): 113-115.
- [10] William J R, Richard H S, Mary M T. Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice [J]. Pediatr Infect Dis, 2002, 21(3): 193-196.
- [11] Guy B, Isabelle H, Andrew K. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA Test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 730-732.
- [12] Kamps B S, Hoffmann C, Preiser W, et al. Influenza report 2006. <http://www.influenzareport.com/influenzareport2006.pdf>.
- [13] Andreea C C, Sooyoung E C, Jewel G, et al. Comparison of the Directigen Flu A + B Membrane Enzyme Immunoassay with Viral Culture for Rapid Detection of Influenza A and B Viruses in Respiratory Specimens [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3707-3710.
- [14] 葛胜祥,徐飞海,罗海峰,等. 一种新型 H5N1 禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂的建立 [J]. 病毒学报,2006,22(6): 445-449.
- [15] 陈毅歆,罗海峰,徐飞海,等. H5N1 禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂对不同现场标本的检测比较 [J]. 病毒学报,2007,23(2): 91-95.
- [16] Harlow E, Lane D. Antibodies: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, 139-312.
- [17] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates for enzyme immunoassays [J]. Anal Biochem, 1984, 136: 451-457.
- [18] Hurt A C, Alexander R, Hibbert J, et al. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens [J]. J Clin Virol, 2007, 39(2): 132-135.
- [19] Reina J, Padilla E, Alonso F, et al. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A + B) for simultaneous and differential detection of influenza a and B virus antigens from respiratory samples [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9): 3515-3517.
- [20] World Health organization. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis [EB/OL]. 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_testing/en/index.html

收稿日期:2007-07-15;修回日期:2007-10-13