

J. D. 阿尔梅达

P. 阿坦纳苏

D. W. 布拉德雷

P. S. 加德纳

J. E. 梅那德

A. W. 舒尔斯

A. 伏勒

R. H. 约肯

快速实验室 病毒诊断手册

46.5

M

1

人民卫生出版社

快速实验室病毒诊断手册

J. D. 阿尔梅达

英国, 伯金翰

Wellcome 研究室

D. W. 布拉德雷

美国, 亚利桑那州, 菲尼克斯
疾病控制中心流行病学部

肝炎实验室

J. E. 梅那德

美国, 亚利桑那州, 菲尼克斯
疾病控制中心流行病学部

肝炎实验室

A. 伏勒

英国, 伦敦, 动物学研究所

纳菲特比较医学实验室

P. 阿坦纳苏

法国, 巴黎

巴斯德研究所

P. S. 加德纳

英国, 新城, 皇家维多利亚
医院病毒系

A. W. 舒尔斯

荷兰, 奥斯, 研究法科学发
展小组

R. H. 约肯

美国, 马里兰州, 巴尔的摩
约翰霍普金斯大学医学院儿

科学系

人 民 卫 生 出 版 社

Z1122/05

快速实验室病毒诊断手册

世界卫生组织 编

人民卫生出版社 出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京通县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 1 $\frac{1}{2}$ 印张 34千字

1982年3月第1版第1次印刷

印数：1—11,300

统一书号：14048·4180 定价：0.22元

MANUAL FOR RAPID LABORATORY VIRAL DIAGNOSIS

JUNE D. ALMEIDA

The Wellcome Research
Laboratories
Beckenham, England

D. W. BRADLEY

Hepatitis Laboratories Division
CDC Bureau of Epidemiology
Phoenix, AZ, USA

J. E. MAYNARD

Hepatitis Laboratories Division
CDC Bureau of Epidemiology
Phoenix, AZ, USA

A. VOLLER

Nuffield Laboratories of
Comparative
Medicine
Institute of Zoology
London, England

P. ATANASIU

Institut Pasteur
Paris, France

P. S. GARDNER

Department of Virology
Royal Victoria Infirmary
Newcastle upon Tyne, England

A. W. SCHUURS

Organon Scientific
Development Group
Oss, Netherlands

R. H. YOLKEN

Johns Hopkins University
Medical
School
Department of Pediatrics
Baltimore, MD, USA

WORLD HEALTH ORGANIZATION

GENEVA

1979

前 言

在过去几年中，世界卫生组织对快速实验室病毒诊断技术在防治病毒病中所起的关键作用一直予以特殊的关注。曾先后于1976年12月在巴黎巴斯德研究所^[1]和1977年12月在伦敦西巴基金会^[2]两次召开有关这一课题的世界卫生组织专家会议。这两次会议都提出需要一本快速实验室病毒诊断技术手册作为培训学员之用。为培训目的而选择的技术应当适用于所有国家，尤其是还不能实际应用繁琐的组织培养技术和病毒分离步骤的那些国家。同样，也期望鼓励使用适合于研究发展中国家主要问题的这些技术，如狂犬病、病毒性肝炎和轮状病毒的诊断。

快速病毒诊断技术主要有四种：电子显微镜；免疫荧光；酶技术和放射免疫测定。对发展中国家来说，虽然电子显微镜还不能被认为是一种主要的诊断工具，但其中许多国家已有了装备有电子显微镜的中心。因此，本书中包括了有关电镜技术的一节，以鼓励凡具有这种设备的地方应用这种方法。在上述会议上大家赞成，在免疫荧光技术中应提倡用间接法。所以除狂犬病外，手册中只讨论了这种方法。酶技术包括了检测抗原和抗体的酶标记免疫吸附测定法，还包括了诊断狂犬病的免疫过氧化物酶法（非固相），后一技术在其它病毒中的应用已在一个合作研究报告中作了评价^[3]。本手册中还特别着重讲了用酶标记免疫吸附测定法检测轮状病毒，用免疫荧光法检测呼吸道病毒，以及用放射免疫法检测甲型肝炎病毒IgM抗体。乙型肝炎已在先前由美国疾病控制

中心和世界卫生组织联合发行的一本书中^[4]作了详细论述，故在此没有讨论。放射免疫测定或许也属于电子显微镜技术一类，它可能不适合于所有国家，当有了诊断特殊病毒感染的其它方法时，可能被取代。

除 IgM 外，严格说来，虽然不能将用酶标记免疫吸附测定法检测其它抗体看作是一种快速诊断技术，但它易于操作，并与传统的血清学方法十分平行，作为本书内容也是不无理由的。

推荐的这些技术中所用的试剂需要确保其纯度。有些组织，如从事快速实验室病毒诊断的欧洲和泛美小组与世界卫生组织配合，将随时出版适用的试剂目录。病毒学材料的安全处理虽然没有在这本小册子中讨论，然而也是至关重要的；例如在 Lennette 和 Schmidt 所著书的第一章和第二章中作了有益的介绍^[5]。

目 录

前言	[1]
1. 用于负染色及免疫电镜的临床标本制备技术	1
2. 应用间接免疫荧光技术诊断临床标本（主要用于呼吸道病毒）	5
3. 免疫荧光技术诊断狂犬病	11
4. 鉴定狂犬病毒抗原和抗体的免疫酶技术	14
5. 酶标记免疫吸附测定在诊断病毒学中的可能应用	18
6. 应用酶标记免疫吸附测定法检测人轮状病毒和埃希氏大肠杆菌不耐热毒素	27
7. 应用酶标记免疫吸附测定法检测轮状病毒抗体	33
8. 应用放射免疫测定法作急性甲型肝炎 IgM 抗体的血清学诊断	35
参考文献	42
附录 1 酶标记免疫吸附测定——材料和方法	46

1. 用于负染色及免疫电镜 的临床标本制备技术

几乎各种临床标本都可用来做负染色电子显微镜技术检查，但制备标本的方法一般有好几种。其中一些具有快速的优点，但与之伴随的可能是敏感性下降。最敏感的技术一般需要高速离心。

所有方法都要采用 400 目的碳-聚乙烯醇缩甲醛微筛膜。用 1M KOH 将染色用的磷钨酸调到 pH 6，在这一 pH 一般可得到最好的结果。但有些病毒，如鼻病毒和口蹄疫病毒是对酸敏感的，应当用 pH 8 的磷钨酸染色。

直接处理生物液体中病毒的方法

这些液体包括疱液、尿囊液以及粪便悬液。

将一滴含病毒的液体滴到载膜上使其吸附，但勿使变干。然后用几滴蒸馏水轻轻冲洗膜片，再用 pH 6 的 20 克/升磷钨酸冲洗。最后撕一小块滤纸，用其毛边把膜吸干，就可送去镜检。制备时间约为 10 分钟。（这种方法也可用于处理密度梯度带中的病毒，但冲洗的时间要相当长，以去除标本中的氯化铯或蔗糖。）

处理组织培养标本的方法

在组织培养的上清或细胞成分中都可存在病毒，因此最好将这两部分都进行检查。下述方法可能是最省时的。用有橡皮头的短棒把细胞从玻璃或塑料上刮下。因为最终要将细

细胞裂解，所以做这一步时无需特别小心。将细胞悬液移到锥形离心管中，用临床台式离心机中速离心 10 分钟，以沉淀细胞成分。倒出上清液，然后将离心管倒置于含吸附剂的烧杯中，使细胞沉淀控干（图 1）。将上清液移到适当的离心管内离心约 12000 g 1 小时。弃去上清液，再像上面那样把离心管倒置于烧杯中使沉淀控干。在离心组织培养上清液的同时，可用电子显微镜检查细胞部分。如果能够作出诊断，就不必再检查上清液了，以节省时间。

对细胞沉淀的处理如下：用巴氏吸管向离心管内加少许蒸馏水将沉淀混悬，再继续加蒸馏水，直至悬液稍呈云雾状。然后滴一滴到玻片上（图 2），再加 pH 6 的 40 克/升磷酸一滴，将其混匀后滴一滴到载膜上，用滤纸吸去多余的液体（图 2）。

组织培养上清液

将控干的离心管内壁上多余液体擦掉，然后加少量蒸馏水，将沉淀混悬，后者有时用肉眼可能看不出来。染色及膜制备技术如同前述。

尿囊液和尿

可用前述的直接法检查或按组织培养上清液的处理方法。

粪 便

用蒸馏水制成 100 克/升的粪便悬液，用台式离心机离心 10 分钟，将所得上清液用直接法检查或同组织培养上清液一样处理。

血 清

用等量磷酸盐缓冲液稀释血清，15000 g 离心 1 小时，弃去上清，加原体积的磷酸盐缓冲液将沉淀混悬，再 15000 g 离心 1 小时，弃去上清。按常规将管控干，然后按前述进行负染色。

鼻 洗 液

用磷酸盐缓冲液稀释到适当体积，然后按组织培养上清液处理。

实 体 组 织

软组织，如脑或肝脏，可用蒸馏水在 Tenbroek 型玻璃和 PTFE 匀浆器中制成匀浆。水量可以不等，但一般地说，100 克/升的悬液较为合适。将所得的匀浆澄清。同组织培养一样，沉淀的碎片和上清液都可进行负染色。

硬组织，主要是表皮的病变，如疣，最好是放到研钵中研磨，用银纱效果更好。然后把研碎的组织澄清，取上清液 12000 g 离心 1 小时，其沉淀按常规作负染色。

注意 在制备负染色标本时，大的结构一般不成为问题，但分子量较小的蛋白质会覆盖病毒使之模糊不清。这就是为什么一定要把离心管控干的原因。

免疫电子显微镜术

同样，对许多类型的标本都可使用这种方法。组织培养上清液，澄清的粪液，尿囊液和血清都可应用。如果标本中有大量的杂质，最好先稍许澄清一下。

这种方法一般用 2 毫升病毒抗原较为合适。但根据材料是否容易得到，也可少至 0.2 毫升或多达 5 毫升。

如果用 2 毫升病毒抗原，则加 0.2 毫升适当稀释的抗血清较为合适。这个稀释度取决于抗血清的滴度和抗原制剂中病毒的量。如果抗血清未经滴定，可用 0.2 毫升 1:10 稀释液先测试一下，然后根据所得的结果再作调整。

将抗血清加到病毒抗原中并彻底与其混合。然后放置一段时间使其反应。在紧急情况下，可在 37℃ 放置半小时，但室温放置 1 小时或 4℃ 过夜也可得到满意结果。反应阶段过后，将标本离心 12,000 g 1 小时，所得沉淀按前述方法进行负染色处理。

注意 免疫电镜最重要的一点是判定抗原与抗体的相对比例。抗体过多会使每个病毒颗粒都完全被抗体包裹，而过少又不能导致复合物形成。但如果将抗血清进行测定，就会发现形成凝集的比例范围可以允许有很大的波动。

安 全 性

电子显微镜标本中仍然含有活的病毒，因此，用于制备膜的所有材料，都应在次氯酸盐液中浸泡（图 1）。

2. 应用间接免疫荧光 技术诊断临床标本

(主要用于呼吸道病毒)

这里仅叙述检查病毒感染的临床材料的方法。这些方法能否成功取决于很多因素,包括适当地制备标本,以及能否得到不受非特异性活性干扰的试剂。¹

直接检测病毒

标本的制备 研究呼吸道病毒感染的最好标本是鼻咽分泌物,将其从鼻咽部吸到一个粘液抽取器中(图3)。应将分泌物放冰浴中迅速送往病毒实验室。在4℃离心350g以分离出细胞。弃去上清,细胞沉淀用于快速病毒诊断。取3~4毫升磷酸盐缓冲液将其混悬,然后用粗径巴氏吸管轻轻吹洗。把未裂解的厚的粘稠块弃去,将细胞悬液移到试管中,再加4毫升磷酸盐缓冲液,混匀,离心350g 10分钟。将沉淀物再混悬于磷酸盐缓冲液中以稀释残留的粘液。将足量的标本滴在玻片上,以便能够检查许多病毒抗原。载玻片上可先涂一层PTFE,暴露出滴细胞悬液的方格,或在普通载玻片上刻出这种方格。每一方格内加1滴细胞悬液,使其均匀分布,可在空气中干燥,干后将细胞标本用丙酮在

¹ 快速实验室病毒诊断欧洲小组试验了下列Wellcome试剂,认为它们是令人满意的。

抗血清:甲型流感、呼吸道合胞病毒、人疱疹和麻疹。

抗种属标记物:抗家兔、抗牛。

4℃固定 10 分钟。

咳嗽拭子^[6]远不如鼻咽分泌物适用。可用吸管吸取磷酸盐缓冲液反复吹洗拭子，使其上面的细胞洗脱下来。将咳嗽拭子上的细胞直接涂在载玻片上对免疫荧光技术是不适用的。从此拭子上洗脱下细胞的处理方法同鼻咽分泌物中的细胞完全一样。

皮肤刮取物取自痘疤的底部。结痂病灶不太适于作免疫荧光诊断。眼刮取物可取自结合膜，尤其是树枝状溃疡部位。将这些病灶的刮取物置载玻片上，加一滴磷酸盐缓冲液，用两根解剖针将其剔开，直至完全成为游离的细胞以混悬于磷酸盐缓冲液中，然后将细胞悬液置空气中干燥，按前述方法在丙酮中固定。

至于活检或尸检材料，从呼吸道取出的分泌物均按上述方法处理。检查组织的最适当方法是压片法。将 2~3 立方毫米的组织块在两块载玻片间挤压制成压片。然后按上述方法将其干燥，并在丙酮中固定。

试剂 免疫荧光诊断用试剂，需充分检定其特异性，并去除不必要的抗体。需要严格检查，不仅在组织培养上，而且还要在临床材料上检查，以确保试剂不会有任何非特异性反应。多数抗血清都需要细心地去除不必要的抗体。通常要用供制备抗血清所用病毒繁殖的正常组织培养细胞来吸收，还要用人来源的细胞吸收。大多数病毒抗血清是由使用者自己制备的。但某些商业公司现在可生产出特异性病毒抗血清，例如，Wellcome 试剂公司生产一种抗呼吸道合胞病毒的牛免疫血清和一种抗甲型流感病毒的牛免疫血清。他们也生产抗疱疹病毒的家兔免疫血清。但由于商业公司生产的种类有限，许多实验室一直是自己制备抗血清。用间接免疫荧

光法已在临床材料中检测出的病毒包括：呼吸道合胞病毒，甲型和乙型流感病毒，副流感病毒 1, 2, 3, 4a 和 4b 型，腺病毒群，麻疹，流行性腮腺炎，风疹，人疱疹病毒，水痘带状疱疹病毒，以及巨细胞病毒。

标记物可从商业上购买，但在用前也需要吸收。也有经过适当吸收的抗种属标记物 (Wellcome)。

必须通过在适当感染病毒的组织培养物和临床材料上进行滴定来判定抗血清和标记物的最适荧光抗体滴度。所有步骤都可用含 0.1 克/升萘黑的磷酸盐缓冲液稀释抗种属标记物来进行，这对于减少临床材料中人细胞的自发荧光是特别有用的。

显微镜的光源 需用能够强力发射紫外和紫蓝波长的高强度光源。这里最常用的是 HBO 200 型汞蒸气灯头。在只需用蓝色荧光时，可用带干涉滤光镜的碘石英。

透射光和投射光都适用于荧光显微镜。但随着可靠的干涉滤光镜的发展，已比较广泛地应用了投射光照明。每种显微镜及照明方法都需要其本身的滤光系统。

染色技术 每个载玻片上通常要放三种细胞，并要用数种抗血清处理。例如，哮喘患儿的细胞一般要检测副流感病毒 1, 2, 3, 4a 和 4b 型，而当甲型和乙型流感以及呼吸道合胞病毒流行时，也要检查这些病毒。在每块载玻片的细胞标本上，覆以预先测定的最佳稀释度的抗血清，在 37℃ 湿盒中放置 30 分钟。然后轻轻地冲洗，并在盛有磷酸盐缓冲液的平皿中分别浸洗三次，每次 10 分钟。将载玻片干燥后，向每个方格中加入用异硫氰酸荧光素标记的适当的抗种属血清，再放 37℃ 湿盒中保温 30 分钟。冲洗的方法与上一次完全相同，只是最后要在蒸馏水中浸泡，以去除常可在载玻片干燥

时出现的磷酸盐结晶沉淀物。洗好的载玻片放空气中干燥，然后用油浸镜头观察。不需要任何固定或盖玻片。

对照 通常要用不同家兔的几份抗血清作为对照。临床材料的标本没有真正的阴性对照。但在结果可疑时，可用制备抗血清动物的接种前血清作为附加对照。

判断阳性血清的最好指标如下：

1. 细胞内荧光。
2. 荧光在细胞内的分布应符合根据经验所了解到的该病毒的特点。
3. 荧光应呈苹果绿色。如果同这种颜色有差异就应作为可疑处理。

当我们引进一种新技术的时候，在将阳性的免疫荧光同常规技术进行足够大量的对比（至少 100 次）之前，决不要把常规技术放弃。最普通的常规技术是病毒分离。显然，这两种技术应是高度一致的，其符合率可达 95~100%。

试剂的质量对照

(a) 用感染和对照细胞试验以判定检出抗原的最佳抗血清稀释度。用以往标化的和适当的抗种属标记物，这种抗血清的稀释度至少要比在未感染细胞出现非特异荧光的稀释度高四倍。对照细胞培养应包括一种传代人细胞系，一种传代猴肾细胞系，一种二倍体细胞株，以及一种原代猴肾细胞。

(b) 在适合于病毒检查的阳性临床材料上进行有限的滴定以作最后的评价。

(c) 应在阴性咽分泌物上测定抗血清最佳稀释度。如可能，还应在其它阴性人临床标本上测定。

(d) 抗血清应在感染有代表性的标准病毒的细胞上进行实验，如呼吸道合胞病毒和副流感病毒 1, 2, 3, 4a 和 4b

型，流行性腮腺炎病毒，甲型和乙型流感病毒，麻疹病毒，疱疹病毒，巨细胞病毒，以及至少两种肠道病毒。抗血清在最佳稀释度时应与它们没有非特异性反应，并且对异种病毒抗原也应当没有非特异性活性。

抗种属标记物的质量对照（抗兔或抗牛）

（a）抗球蛋白标记物的稀释液与适当的抗血清要在阳性组织培养或阳性人标本上进行试验，以寻找使用的最佳稀释度。用组织培养可获得初步的最佳稀释度，但最后使用的稀释度还必须用直接取自病人的材料进行试验所得的结果来加以调整。

（b）以后就用这种最佳稀释液在实验室可能用到的细胞系上检测是否有非特异性反应，包括上面抗血清一节中所列举的那些。

（c）然后应以最佳稀释度的抗球蛋白抗体测试阴性人材料，包括鼻咽分泌物、肺组织以及活检材料。

这些标准仅在检测系统的条件下适用，因此，对于试剂的使用者来说，应用染色技术，包括上述的对比染色，是十分有益的。

关于这些技术的细节可参阅文献〔6〕。

应用免疫荧光技术检测特异性 IgM 抗体

用病毒感染适当的细胞系。把感染的细胞制备在载玻片上，在丙酮中固定 5 分钟，然后即可使用。将固定好的细胞用急性期病人血清稀释液在 37℃ 处理 3 小时，然后按前述方法洗 3 次，每次 10 分钟（共半小时）。再用抗人 IgM 在 37℃ 染色半小时，冲洗，然后用油镜头观察。未固定的细胞可用来作“膜荧光”观察。在微量滴定板的每个孔中加 0.02 毫

升血清稀释液，然后加 0.015 毫升病毒感染的细胞悬液，于室温放置 1 小时。过多的血清用 Hanks 液冲洗。在平板离心机上 100 g 离心，重复三次。然后每孔加抗人 IgM 0.015 毫升，放室温 1 小时，再按上法冲洗。将沉淀的细胞悬浮于 0.03 毫升 Hanks 液中，滴到载玻片上，盖好盖玻片，用蜡封好，然后就可观察。有时特异性 IgM 可被高水平的特异性 IgG 掩盖。但在疾病早期的快速诊断中，这可能不太要紧，因为 IgG 滴度还不应上升。分离 IgM 的方法很多，包括用 Cowan 1 型金黄色葡萄球菌吸收，在蔗糖梯度中特异性 IgM 的荧光染色，薄层凝胶过滤和亲和层析。

试验结果可能会受类风湿因子的影响。如果有这种因子存在，可用凝集的 IgG 复合物吸收去除。