

病毒、立克次体及衣原体疾病

诊断技术

纳塔莉 J. 施密特, PhD

主编

理查德 W. 埃蒙斯, MD, PhD

顾方舟 等译

北京医学院中国微生物学研究所编著 北京出版社

058201 15

6th EDITION

Diagnostic Procedures For Viral, Rickettsial And Chlamydial Infections

EDITORS

Nathalie J. Schmidt, PhD
Richard W. Emmons, MD, PhD

APHA

American Public Health Association

[京]新登字 147 号

病毒、立克次体及衣原体疾病诊断技术

(第六版)

顾方舟 等编译

责任编辑:李景发 李宗彦

*

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版

四方计算机照排中心排版

北京市昌平精工印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

787×1092 毫米 1/16 60.5 印张 1500 千字

1993 年 10 月第 1 版 1993 年 10 月北京第 1 次印刷

印数:1—2000

ISBN 7-81034-247-9/R·247

定价:99.60 元

6th EDITION

Diagnostic Procedures For Viral, Rickettsial And Chlamydial Infections

EDITORS

**Nathalie J. Schmidt, PhD
Richard W. Emmons, MD, PhD**

APHA

American Public Health Association

《病毒、立克次体及衣原体疾病诊断技术》

(第六版)

编 译 委 员 会

主 任 顾方舟

副主任 曹逸云 董德祥 郭 仁 赵 玫

参 加 翻 译 人 员

(以姓氏笔划为序)

王立言	王树蕙	叶正中	石迺玉	孙茂盛	李 黎
李昌遵	李映波	李琦涵	吕绳敏	刘开民	向金华
阮 强	庞其方	苏诚钦	吴小娴	陈元鼎	陈统球
陈淑范	张和君	张惠敏	罗其胜	周 革	周 军
周德久	金 红	侬 亮	郭 仁	赵 玫	姜述德
胡 坚	胡云章	胡希民	练幼辉	顾方舟	梁梧生
唐恩华	徐维明	秦红星	曹逸云	龚春梅	董德祥
谭顺革	蔡宏荣	戴长柏	戴国珍		

序 言

鉴于本书有很高的实用价值和前五版的成功发行,预期这类综合性参考资料今后将会起到重要的作用;特别从1979年第五版以后,由于有关学科领域中新技术的迅速发展,从而促使我们再次修订出版了第六版。新版本和以前各版本一样,对公共卫生具重要意义的病毒、立克次体和衣原体疾病的诊断,提供最适用的实验室方法的详细资料;提供有关病原体及所致疾病的大量生物学、临床和流行病学资料,以便对实验室试验结果的意义和结论作出合理评估。新版本还就所述方法的科学基础和病原体基本理化性状方面提供资料。高级编著者Edwin H. Lennette博士主编的前几版本的框架和精选实例,对于本版修订很有帮助。

过去十年中积累的大量新资料,几乎要求对全书各章内容均作广泛修改和补充。新增添的单克隆抗体、电镜、核酸探针、乳多泡病毒、小DNA病毒以及人反录病毒等几章,既反映这些灵敏、快速诊断方法的重要意义和广泛用途,也反映出这些病毒紧迫的重要性。前几版涉及的某些章节和曾采用的一些材料,因现已少用而作缩减或删除,以利增添较新资料,但仍保持本书有一合理的篇幅。

全书更加侧重于基础生物学和生物化学,分子生物学方法,检测和鉴定病原体和抗体的快速、特异技术,质量保证原则和实验方法,以及实验室试验结果对于临床、流行病学和公共卫生学的重要性和含义。

高级编著者 Nathalie J. Schmidt 博士在设计、组织、修改本版,以及取得各章作者协助修订新版本方面发挥过重要作用。她的热诚、专业技能和奉献精神,对于此版本的完成具重大影响。1986年7月8日她不幸过早逝世,这对她的朋友、同事和敬慕者,以及诊断病毒学领域来说是一个重大损失;谨以此第六版献给她、纪念她,并希望能达到她以及美国公共卫生协会(American Public Health Association)对新版本的设想要求。谨向各位作者,美国公共卫生协会的出版工作人员,以及实验室标准化和实施委员会(the Committee on Laboratory Standards and Practices)的委员和工作人员致以深切感谢。

目 录

第 一 部 分

第 一 章	病毒、立克次体及衣原体实验诊断方法的 一般原则	(3)
第 二 章	实验室安全	(31)
第 三 章	诊断病毒学的细胞培养技术	(41)
第 四 章	单克隆抗体制备	(79)
第 五 章	免疫荧光染色	(95)
第 六 章	免疫酶染色技术	(105)
第 七 章	酶免疫试验与放射免疫试验	(123)
第 八 章	电子显微镜技术	(139)
第 九 章	核酸探针	(161)

第 二 部 分

第 十 章	腺病毒	(177)
第 十 一 章	单纯疱疹病毒(附疱疹 B 病毒)	(215)
第 十 二 章	巨细胞病毒	(261)
第 十 三 章	水痘——带状疱疹病毒	(309)
第 十 四 章	EB 病毒	(333)
第 十 五 章	痘病毒	(371)
第 十 六 章	肠道病毒和呼肠病毒	(415)
第 十 七 章	鼻病毒	(473)
第 十 八 章	冠状病毒	(503)
第 十 九 章	流感病毒	(515)
第 二 十 章	副流感病毒、腮腺炎病毒和新城疫病毒	(545)
第 二 十 一 章	呼吸道合胞病毒	(561)
第 二 十 二 章	麻疹病毒	(577)
第 二 十 三 章	风疹病毒	(591)
第 二 十 四 章	虫媒病毒	(645)

第二十五章 砂粒病毒和丝状病毒..... (691)

第二十六章 狂犬病毒..... (717)

第二十七章 胃肠炎病毒..... (739)

第二十八章 肝炎病毒..... (765)

第二十九章 乳多泡病毒..... (849)

第三十章 微小病毒..... (879)

第三十一章 人反录病毒..... (887)

第三十二章 立克次体病..... (911)

第三十三章 衣原体..... (931)

第 一 部 分

第一章 病毒、立克次体及衣原体 实验诊断方法的一般原则

Nathalie J. Schmidt, Ph. D and Richard W.
Emmons, M. D., Ph. D

前 言

本章扼要地介绍一些与公共卫生和临床病毒学有关的一般原则与操作步骤。某些重要题目未能全部涉及，如实验室在疾病监测及预防中的作用；实验的组织与设计以及质量控制。但鉴于后者十分重要，所以某些重要原则将在书中有关章中阐述。某些试验方法未在有关章节中详述的，则在本章中提及。

大部分人的病毒、立克次体及衣原体感染的特殊血清学诊断和病原分离方法可见有关各章，同时附有生物物理，流行病学及临床的知识。有些疾病如“慢病毒”的库鲁病和 C-J 病，目前尚无统一的试验诊断方法，故未列入。细胞免疫以及相应的试验方法曾在前一版中论及，它是复杂和重要的内容，但不收在本书中。

和本书前一版相比，诊断方法有明显的进步（如快速免疫测定技术、单克隆抗体，分子病毒学方法以及电子计算机和自动化操作）。某些趋势在改变着病毒诊断学的费用、应用和特点，包括试剂、细胞培养物和试验盒的商品化，临床病毒实验室的增加和分散以及许多新技术的出现。但是，正由于试验程序变为更加快速和简单，基本的科学原理、质量保证以及对试验结果专门的分析和解释就更为重要。所以除试验程序的细节外，还要着重强调这方面的内容。

质 量 控 制

众所周知，质量控制对保证有效的科学研究和诊断试验结果至关重要。质量控制最重要的是要有高质量的训练有素的人员。这些人要求接受过上岗前的训练，持有仪器操作的执照和证明，还要接受岗上训练以及继续教育，进行技术熟练程度的定期测试以及给予一定的监督和激励。设备的设

计和维护也很重要。包括温度及湿度的控制，空气和污染的控制，交通以及安全状况等（见第二章）。

病毒诊断试验及研究步骤所用的仪器和装备日趋专门化，所以工作手册，装备的使用须知以及对仪器的维护、监测和使用作准确的记录都非常重要（例如，恒温箱、冰箱温度记录，离心机转头的使用，预防性维护及维修）。

应建立详细的记录制度；包括实验室工作各个方面，如可供使用的工作方法，所需标本采集、送样、受样、标记以及标本处理；测试结果的记录和报告；溶液与试剂之配制；每种类别的诊断试验的实施与结果的解释。这些记录至少应该每年复阅一次并注明资料的来源以使之保持内容的全新和准确。

记录系统很重要，应包括：完整的细胞株培养记录，病毒毒株历史记录；毒株分离用的细胞培养或实验动物记录；免疫血清制备记录；血清学试验记录；标本的送样、试验及实验室提供的结果的完整记录。

实验诊断的一般原则

这几年，随着快速病毒诊断方法的发展，病毒感染实验诊断的范围和重点有很大改变。传统的方法，如病毒培养或某种病毒的抗体滴度升高的测定，出结果慢，对医生处理病人，或流行病学研究或病后监测来说价值有限。但是，新方法现在可以在采集标本后几个小时即可测知并鉴别许多病毒，这就可以及时提供信息，使得临床或公共卫生方面作出有效的决定。过去，多数病毒诊断实验室的经费来自国家，但是现在越来越多的商业性实验室从事病毒诊断，而且所有试验方法必是经济而有效。但是，不能因求快和便宜而不管试验的准确性和可靠性，因此，在使用商品试剂和试验操作时必须考虑敏感性、特异性、安全性和必要的对照。

病毒感染的实验诊断的基本方法，直接检测临床材料中的病毒或病毒产物，用敏感宿主系统分离和鉴别病毒，用血清学诊断或免疫状态测定的抗体分析，这些方法几十年来大致相同。但是，这些方面都有了发展，能更快更有效取得结果。现在有多种分子技术可用于病毒核酸的分析，能比抗原分析更准确的鉴别病毒毒株，这在流行病学研究中非常有用。关于基因分析方法将在有关章节加以讨论。

直接检测临床标本中的病毒

有些方法可以不用在活的宿主系统中培养病毒，直接从临床标本中检

测到病毒或病毒产物。这种方法更快速和省钱。再者，这种方法可以检测那些用常规方法不能培养的病毒，或者那些不能在标本中长久存活的病毒。直接检测受到病毒量少的限制，并且和宿主本身的物质紧密相联，这种物质可以掩盖病毒的存在或者产生非特异性结果，或者受到病毒排出量少以及排出时间短的限制。目前，直接检测临床标本中病毒的方法有：电子显微镜（电镜，EM）；使用抗体探针的各种免疫测定法，例如免疫电镜（IEM），免疫荧光（IF）及免疫过氧化物酶染色（IP），酶免疫测定（EIA），放射免疫测定（RIA）及乳胶凝集试验（LA）；还有检测病毒基因物质的核酸杂交技术。这些方法的原理及应用将在后面各章中讨论。

用于检测病毒感染细胞的特有病理变化的组织病理染色，由于已有更敏感和特异的方法，所以不太常用。在后面几章中将提及这个方法。

病毒分离和鉴定

对那些可以用实验宿主系统分离的病毒来说，病毒培养法优于直接检测法。因为病毒数量在敏感宿主系统中生长而增加，检测病毒的敏感性也就增加。病毒分离比直接检测的范围广得多，因为直接检测使用抗体或核酸探针只能针对少数选定的病毒。而病毒培养法可以检测各种病毒，包括可能存在的新病毒。在多数情况下，病毒分离要用细胞培养；为了某些特殊的目的，有时也用小鼠，其它实验动物或鸡胚。应用免疫测定，如 IF, IP, EIA 作好快速鉴别细胞中的分离物的方法是一个很大的进步。在实验室可以从某一分离物的致细胞病变效应（CPE），血球吸附（HA_d）等性质或对宿主其他的作用获得线索，在几小时之内即可正确地鉴别出来。这就使得病毒学诊断更有效和易行。

也可以用免疫测定法。它可在尚未显示出 CPE 或 HA_d 前检测并鉴别从细胞培养物中分离出的病毒。有时可在接种后 24 小时内完成。但是，这种对细胞培养物的盲目检测只是在寻找一个或少数几个病毒时，或者大部分标本阳性的可能性很大时才行之有效。（例如检测性传播疱疹病人标本中的单纯疱疹病毒）。

过去，有些人认为，某些病毒的鉴定只有待“典型”CPE 出现时，或者分离物在某种细胞培养系统有选择性生长时才能进行。但是甚至最有经验的人，如只凭 CPE，也会作出错误的鉴定。由于临床是根据病毒检测结果作出重要决定的，所以如果用那些特异的免疫学或杂交操作程序还不能得出结果，那就再也不能作出判断了。不过，现在已经可以使用可靠的免疫试剂对大多数病毒分离物作出鉴定。标本的毒性或者细胞受霉菌或猴病

毒污染均可引起 CPE。人传染性软疣病毒或阴道滴虫可存在于培养 HSV 的标本中，它可引起 CPE，并可与 HSV 相混淆。粪便标本中的梭状菌毒素可以在培养肠道病毒时产生 CPE。生长缓慢的腺病毒产生的 CPE 可以误认为人巨细胞病毒的 CPE，这两种病毒都可同时存在于同一标本中，如尿及咽喉漱液。卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*) 可以在培养艾滋病人呼吸道标本时产生病毒样的 CPE。

血清学诊断

用常规方法作病毒感染的血清学诊断主要是看病程中抗体水平升高的情况。这需要采集急性期血标本。发病后愈早采血愈好。同时至少在 14 天后采恢复期血标本。由于要等恢复期血清，所以血清学诊断是回顾性的，这就在许多临床方面用处有限。但是，它比病毒分离便宜得多。对一些非致命的虫媒病毒感染或某些呼吸道感染排毒时间短，病毒或抗原很难分离或测知，就需要用血清学诊断。抗体测定能说明病毒分离的意义，因为针对所分离病毒的抗体升高说明病人所患疾病与此病毒有关。同样，为了能对某种病毒的免疫力也需测定单份血清标本的抗体。

病毒感染的血清学诊断的传统方法有中和试验 (Nt)，血球凝集抑制试验 (HI)，补体结合试验 (CF)，间接免疫荧光试验 (IIF) 及间接免疫过氧化物酶染色 (IIP)，以及使用不多的单向辐射扩散 (SRD)，凝胶溶血试验 (HIG) 及免疫粘附血凝试验 (IAHA)。新方法中有直接 RIA 及 EIA，被动血凝 (PHA) 及 LA。病人血清与单个的病毒多肽的反应性可用 Western 印迹测定。将打碎的病毒放到凝胶中走电泳，分散的多肽物移到硝酸纤维膜上，然后与被测血清起反应。血清中抗体和单个病毒多肽的反应性可用酶标记的抗 Ig 试验来检测。另一种测定血清与完整抗原反应性的免疫印迹试验是将抗原直接点在硝酸纤维膜上与被测血清起反应，然后用酶标记的抗 Ig 来检测阳性结果。这些血清学方法在本章的附录中或者在有关病毒各章中予以描述。

中和试验是以抗体和病毒反应后失去对敏感宿主的感染性为根据的。这项试验费钱，因为要使用活的宿主系统；出结果慢，因为病毒对宿主系统产生作用需要时间。其优点是敏感性和特异性很高。中和抗体在体内存在时间长，大多数病毒的中和抗体与免疫力直接有关。

血凝抑制试验是基于某些病毒可以附着在某些红细胞 (RBC) 的受体上并产生凝集，但是特异性抗体和病毒结合后可以阻止凝集。血凝抑制试验主要的缺点在于非抗体血清成份也可抑制血凝。这些成分必须预先除去或灭活。还有，不是所有的病毒都能凝集红细胞。此法具有经济、快速的优

点。其敏感性和特异性接近中和试验。

由于补体结合试验在测定抗体滴度升高上具有多方面性、广泛反应性以及有效性，所以多年来被广泛使用于病毒感染的体外检测上。但是，敏感性较差，为产生 CF 复合物需要高浓度的抗原。同时，血清如有抗补体物质或抗宿主细胞成份的抗体时，试验结果往往不可靠。虽然 CF 试验逐渐被其他新方法所代替，如 EIA，但它仍然有用，特别是有些标本还没有可用的商品 EIA 以及有一些动物的血清，它的抗免疫球蛋白结合物难以制备。标准的微量 CF 试验的细节在本章附录中有介绍。

IAHA 试验是补体介导的一种反应。反应中，补体附着到抗原-抗体复合物后可激活补体 C_3 。所以它附于人 RBC 的受体上，然后把 RBC 凝集。抗原使用稀释度可比 CF 的高一些，2~3 小时即可出结果。但是，前区反应可以产生在抗体或抗原过量的区域，所以需要事前测定标本稀释度的范围。

SRD 试验是将病毒或病毒亚单位固定在琼脂糖凝胶上，然后在凝胶上戳孔，将被测血清标本放入，抗体发生辐射状扩散，在小孔周围产生免疫沉淀。沉淀带的面积和血清中抗体的浓度成正比。试验方法简单，试剂稳定。但在凝胶中需要高浓度的抗原。

HIG 试验。RBC 用病毒抗原包被，固定于凝胶中。小孔中的被测血清作辐射状扩散，在补体参予下，特异性血清可将包被抗原的 RBC 溶解，产生溶血圈，其大小与样品在血清中抗体含量成正比。此法简便易行，但凝胶不能长久保存。

PHA 试验。病毒抗原包被的 RBC 可被待测血清中的病毒抗体所凝集。

LA 试验。病毒抗原包被的乳胶可被病毒抗体所凝集。

这些方法简单，快速，可广泛用于临床。但缺点是大多数商品试剂不能提供适当的对照，以检测可能的非特异凝集。

病毒 IgG 抗体检测法的应用和重点在这些年来已有所改变。虽然仍然以传统方式用于诊断感染，但更广泛的使用是测定对某些病毒的免疫状态，如风疹病毒、CMV、带状疱疹病毒；测定抗人免疫缺陷病毒（HIV）抗体；筛选血液制品以防止输血性的 HIV，肝炎及 CMV 感染等。这些年，测定病毒抗体的简便快速的商品测试方法已经出现，如 EIA，PHA 及 LA 等。

特异性病毒抗体类别的测定

有时，检测早期血清中或脑脊液中的病毒特异 IgM，可快速作出病毒感染的血清学诊断。出生后病毒感染时，IgM 可在感染发生后 7~10 天内出现，并能持续 3~6 个月保持在测知的水平上。所以病毒 IgM 抗体意味着新近感染，这就有可能使用一份早期血清标本作出快速的诊断。由于母

亲自己的病毒 IgM 抗体不能透过胎盘，所以，根据新生儿的病毒特异 IgM 阳性即可判定是先天感染。但是，脐带血被母亲 IgM 所污染的可能也存在，所以必须再作一份婴儿血样予以证实。测定脑脊液中病毒 IgM，可用于某些虫媒病毒感染的早期诊断，因为这种感染中很难分离到病毒。所以，测 IgM 就特别有用。

判断各种新的病毒 IgM 测定法是否特异，有人用蔗糖密度梯度法将 IgM 与 IgG 分开，然后用 Nt、HI 或 IF 检测 IgM 部分的特异病毒抗体。但是，有些情况常使 IgM 部分被凝聚的 IgG 所污染。例如，血清加热，-20℃ 长期保存，反复冻融，血清本身有污染或者病毒特异 IgG 与类风湿因子 (RF) 形成复合物等都可使 IgG 凝聚。所以，必须用一种敏感方法检查一下 IgM 是否被 IgG 所污染。

鉴于蔗糖梯度密度法复杂且昂贵，以后又建立了一些适用的，可作大量标本的检测法。间接免疫测定法就是其中的一个。这个方法是把病毒抗原固定在一种固体物上，然后将病毒抗体与之复合，再用标记的抗 IgM 抗体检测。此法曾被广泛使用。但有一些缺点：首先，病毒 IgG 与 IgM 竞争抗原结合点，从而降低此法之敏感性；其次，是类风湿因子，它常常存在于急性病毒感染中，它与 IgG 结合，并与抗原形成复合物，然后再与标记的抗 IgM 结合，造成假阳性。病毒 IgM 阳性结果的特异性必须加以证实，其方法是用凝聚的 IgG 吸附血清，以除去 RF 因子，然后再测试，或者在测试之前血清一律吸附。凝聚 IgG 的制备以及吸附被检血清的方法见后。

抗体类别捕获试验 (ACCA) 可克服固相法的某些困难。将人 IgM 的 μ -链抗体吸附到固相上，用于捕获抗体。加上被检血清。这样，IgM 所有的特异性都被抗 μ -链抗体保留在固相上。洗去未被固定的血清中其他成份，然后加病毒抗原，如被检测血清中有特异性 IgM，二者就结合。随之加标记的抗病毒抗原的 IgG，它就与被 IgM 固定的抗原结合。标记物可用同位素 (RIA) 或某种酶标的底物 (EIA) 检测。

测定 IgM 的这种 ACCA 使 IgG 及其他抑制物与 IgM 分开。被检抗原通过与固相上的病毒抗体结合，得到一定的纯化。这样，可以避免抗原直接被固定或吸附到固相时可能发生的变形。这种方法的敏感性决定于高比例的病毒特异抗体。这种情况见于产后感染急性期，先天感染以及某些虫媒病毒感染的脑脊液中，IgM 的含量就较高。此法不适用于病毒 IgG，因为病毒特异 IgG 占整个血清中 IgG 的比例小。RF 由于在固相上与病毒 IgM 竞争结合点，还能降低其敏感性。

虽然 RF 在 ACCA 中产生假阳性，但可能性比抗原结合在固相上的方法要小得多。有二种原因产生假阳性。首先，结合到固相上的抗 μ -链抗体