

巨细胞病毒抗原片的制备及其 在快速诊断中初步应用

汪慧民 骆林 龚镇奎

(湖北省医学科学院, 武汉)

提 要

本文报道了用巨细胞病毒(CMV, AD₁₆₈株)感染的人胚肺细胞(HL)制备CMV抗原片。在这种抗原片上进行的间接免疫酶组化法(IPA)初步应用于CMV的快速诊断,并与补体结合试验(CFT)和免疫荧光技术(IFA)进行了比较。检测103份血清中抗CMV-IgG抗体和18例双份血清中抗CMV-IgG和IgM抗体的结果表明,本方法是特异的,其结果与CFT和IFA的结果一致。这种方法简便、快速、灵敏,不需要特殊的设备,可广泛用于临床诊断和流行病学调查。

巨细胞病毒(CMV)感染对早产婴儿、先天感染的婴儿、器官移植病人、免疫功能低下以及外科手术接受大量输血病人均能引起严重疾病。该病毒也是单核细胞增多症、肝炎、心肌炎等常见病的病原因子^[1,2,3]。国际卫生组织(WHO)科技小组的报告^[4]强调快速诊断有助于在一地区进行传染病监测,对预防和治疗均有积极作用。因此,对巨细胞病毒感染进行快速、准确地诊断,是预防和治疗该病毒引起的疾病的关键。目前的诊断多采用病毒分离、补体结合试验(CFT)等方法^[1,2],也有采用免疫荧光等法^[5,6]。但前者操作繁琐,历时较长;后者要求设备条件较高。为此,我们制备了一种巨细胞病毒抗原片。此种抗原片适用于间接免疫酶组化法(IPA)和间接免疫荧光法(IFA)检测CMV-IgG和CMV-IgM抗体。初步应用此抗原片检测了共103份血清标本,结果表明,在该抗原片上进行IPA和IFA测定血清中CMV-IgG和IgM抗体特异性强,结果客观,容易观察判断,操作简便易行,仅3小时内便可得出结果,适用于临床诊断和流行病学调查工作。

材 料 与 方 法

1. 材料

病毒: CMV AD₁₆₈株(来自北京医科院基础医学研究所)。

细胞: 传代人胚肺成纤维细胞(本所自传的30 HL)或人包皮成纤维细胞(FSD二倍体细胞株,来自美国Monto HO实验室)。

本稿于1985年11月13日收到

血清: (1) 阳性对照血清: ①CFT为1:256(本所以一名临床疑似巨细胞包涵体病的2个月婴儿采集的恢复期血清, 已分离出CMV, 并有4倍抗体增长); ②CFT为1:128(美国Monto Ho惠赠)。

(2) 阴性对照血清: ①CFT < 1:2(来自一健康婴儿); ②CFT < 1:2(美国Monto Ho惠赠)。

(3) 血清标本: 均为双份血清, 分别来自: ①临床疑似CMV感染者; ②肾移植病人(术前、术后相隔7—30天左右); ③心脏手术者(术前、术后相隔20天左右); ④临床呼吸道感染者。

酶标抗体: ①冻干辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG(北京生物制品所产品)。②辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgM(μ 链)(北京302医院病毒室吴慎惠赠)。

荧光抗体: ①异硫氰基荧光黄(FITC)标记的羊抗人IgG(上海生物所产品)。②FITC标记马抗人IgM(上海生物产品)

2. 方法

(1) 抗原片的制备: CMV AD₁₃₈感染细胞4—5天, 病变达4+后, 用PBS(0.01M, pH7.4)洗3次, 用Versene 37℃消化5分钟, 再用PBS洗3次, 加入适量PBS震荡下细胞, 吹散, 300rpm离心5分钟, 去上清, 将沉淀细胞用PBS悬浮, 充分吹打分散细胞, 并调整至100万个细胞/ml。按同法处理正常未感染病毒的细胞, 然后以感染细胞: 未感染细胞 = 5:1制成均匀的混合细胞悬液, 滴于特制的载玻片(每张玻片上印有直径6mm的10个圆圈)的圆圈内, 每圈内滴加20 μ l(下同), 凉干后, 用冷丙酮4℃固定10分钟, 干燥冻存备用。

(2) 间接免疫酶组化法(IPA): 大体参照Israel Sarov和Hava Haikin的方法^[7,8]。待测血清从1:8开始4倍稀释后, 滴于抗原片的圆圈内, 置湿盒中于37℃保温, 测IgG时保温45分钟, 测IgM时保温60分钟。继用PBS冲洗一次, 漂洗2次。每次2分钟。晾干或电风吹干后, 加酶标抗体, 置37℃保温45分钟, 用PBS冲洗和漂洗。干后加底物溶液(盐酸联苯胺溶液)室温蔽光作用15分钟, PBS冲洗一次, 漂洗2次, 用蒸馏水一过性漂洗后, 置普通光学显微镜下观察结果。根据阳性细胞数及染色深浅判断: 视野内棕红色细胞达70%左右为4+; 50%左右为3+, 棕黄色细胞25%左右为2+; 10%左右为1+。以血清最高稀释度达2+为终点计算血清中抗体滴度。

(3) 间接免疫荧光法(IFA): 按Stagno等的方法^[9]略加改进。操作过程大致与上述IPA相同, 只是用荧光标记抗体代替酶标抗体, 每次漂洗时间为5分钟, 末次漂洗后, 用1/万伊万氏兰复染1—2分钟, 置Olympus荧光显微镜落射光下进行观察。细胞膜与细胞核出现特异荧光达2+之血清最高稀释度为血清中抗体滴度。

在进行上述两种试验时, 均按常规设有相应的对照。

(4) 微量补体结合试验(CFT): 按常法进行。抗原、补体、溶血素均为2单位。抗原、血清量按每孔25 μ l, 补体和致敏羊红细胞悬液各50 μ l。以最高血清稀释度不溶血为最终滴度。

(5) 类风湿因子试验(RF): 按武汉生物制品所出售的类风湿乳胶检验法进行。

结 果

1. IPA 结果:

阳性参考血清 IgG 滴度为 1:128, IgM 为 1:32。阴性参考血清均不显色。将阳性和阴性血清分别滴于抗原片上后, 不加酶标抗体, 只加底物溶液, 均不显色, 其它相应的对照亦不显色。

对 103 份血清标本在抗原片上用 IPA 测定了 CMV-IgG 滴度, 并与常规 CFT 进行比较, 结果见表 1。

表 1. CFT 和 IPA 测定 103 份血清中 IgG 的结果比较

Table 1. Comparison of results between the CFT and IPA in detection of anti--CMV IgG antibody in 103 sera

The number of Serum	CFT titer	IPA titer					GMT*
		<1:8	1:8	1:32	1:128	1:512	
36	1:4	23	12	1			8
23	1:8		19	4			12.2
26	1:16		6	19	1		30.2
7	1:32			6	1		45.7
11	1:64			7	2	2	136.7

* GMT, geometry mean titer.

2. IPA 和 IFA 比较的结果:

用我们制备的抗原片同时对 18 例双份血清中的抗 CMV 的 IgG 和 IgM 抗体用 IPA 和 IFA 进行了测定, 结果列于表 2。从表 2 可看出: ① 1、2、23、31、36、43、44、46、48 和 49+ 例 CFT 和 IPA-IgG 滴度均有 4 倍以上增长, IFA-IgG 滴度除 31 号急性期偏高外, 其余九例亦有 4 倍以上增长。② 用三种方法测定 8、10 和 20 三例双份血中 IgG 均为阴性; 25、37、39、45 和 47 五例无增长。③ IPA 和 IFA-IgM 滴度在 1:32 以下(含 1:32) 者有 2、8、10、20、25、31、37、39、47 和 48 共 10 例, 除 2、31 和 48 外, 其余 7 例均为 IgG 阴性或无 4 倍增长者。④、用 IPA 和 IFA 测得急性期血清中 IgM 均高出 1:32 (不含 1:32) 者有 1、23、36、43、44 和 49 六例, 而这六例正好其 IgG 抗体均有 4 倍以上增长, 并从 23 和 44 号病人血清分离到了 CMV (资料未附)。此外, 用 IPA 和 IFA 测得的急性期 IgM 滴度均大于或等于恢复期 IgM 的滴度, 这与 IgM 在病程中的消长规律是一致的。

表 2. IPA 和 IFA 测定 18 例双份血清中抗 CMV IgG 和 IgM 的结果比较
Table 2. Comparison of results between the IpA and IFA in detection
of anti-CMV IgG and IgM in 18 paired sera

Patient No	CFT		IPA				IFA				RF	
			IgM		IgG		IgM		IgG			
	A	C	A	G	A	C	A	C	A	C	A	C
1	—	32	128	32	32	128	512	128	—	32	—	—
2	8	32	32	32	8	128	32	32	8	128	—	—
8	—	—	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	8	8	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23*	—	64	512	32	—	128	512	32	8	128	—	—
25	64	64	8	—	128	128	8	—	128	128	4+	4+
31	16	64	8	8	8	128	32	32	128	128	+	+
36	—	8	128	32	—	32	128	32	32	128	—	—
37	8	8	32	32	8	8	32	32	8	8	+	+
39	8	8	32	8	8	8	32	8	8	8	—	—
43	8	64	128	32	8	32	512	512	32	128	—	—
44*	16	64	128	8	128	512	512	128	128	512	—	—
45	64	64	32	8	32	32	128	32	32	32	—	—
46	—	32	128	8	—	32	32	8	—	32	+	+
47	64	64	32	8	128	128	32	8	128	128	+	+
48	—	16	8	32	—	32	32	32	8	32	—	—
49	—	32	128	128	—	32	128	128	—	32	—	—

Note: A—acute serum, C—convalescent serum.

*—CMV had been isolated from the patient.

讨 论

感染的CMV主要是与细胞相伴随,很少游离地释放到培养液中,以往采用一般血清学方法进行诊断时,往往用超声破碎或反复冻融来破碎受感细胞制备病毒抗原。采用抗原片,不仅可以省去这一步骤,而且可以保持病毒在细胞内的自然状态,使抗原性免受破坏。根据我们的试验(资料未附),这种抗原片在干燥冻存条件下,至少在六个月内其抗原性保持不变。为了排除IFA检测中出现假阳性反应^[10],通过一定数量的未感染细胞和已感染细胞的混合可清楚地辨别^[6]。我们在制备抗原片时按5:1的比例加入正常未感染细胞收到了较好的效果。

从表1看出,IPA法与CFT法敏感性相近,上下滴度在4倍范围内。其特异性相符。用IPA法低于1:8为阴性,高于或等于1:32为阳性。此结果与Haikin等^[8]报道的大体

一致。

表 2 的结果表明, 在抗原片上用IPA和IFA法测定血清中IgG的结果与CFT结果是相符的。例如在已测的18例双份血清中, CFT测出了有10份(1、2、23、31、36、43、44、46、48、49)的IgG有4倍增长, IPA测出这10例亦有4倍增长, IFA测出的结果除31号急性期IgG较高外, 其余与CFT结果也相符; 3例(8、10、20)用CFT检测为阴性, IPA和IFA测出的结果也是阴性; 5例(25、37、39、45、47)CFT检测表明IgG抗体无增长, IPA和IFA检测亦无增长。可见在此抗原片上用IPA或IFA检测血清中的CMV-IgG抗体的结果是可靠的。

由于未测CFT-IgM抗体, 故在抗原片上进行IPA-IgM和IFA-IgM检测不能得出肯定的阳性阈值, 但从表2可看出CFT-IgG阴性者, IPA和IFA-IgM滴度多数在1:4以下, CFT-IgG 1:8以上者, IPA和IFA-IgM滴度一般在1:32以上, 因此, 在我们的实验条件下, 急性期IPA和IFA-IgM在1:32以上者为阳性可能是合适的。

为了排除类风湿因子(RF)引起的IgM假阳性反应^[4], 在对所测的18例双份血清进行了RF检查(结果见表2), 5例测出了有RF, 其中有1例(25)双份血清中RF凝集试验均达4+, 而IgM滴度第1份血清为1:8, 第2份血清为(-)有2例(31、46)CFT-IgG有4倍增长, RF为+, IPA-IgM分别为8, 8和128, 8, IFA-IgM分别为32, 32和32, 8。这表明在血清中RF存在与否对IPA和IFA-IgM的测定结果并无明显干扰。同时, 在抗原片上只加待测血清和底物, 不加酶结合物则不显色(-), 表明经多次传代的人胚肺(二倍体)细胞不存在内源性过氧化物酶对实验的干扰。

参 考 文 献

- [1] Monto, H., 1982, Cytomegalovirus, P.P. 139, Printed in the United States of America New York.
- [2] Hanshaw, J.B., et al., 1978, Viral Disease of the Fetus and Newborn, Vol XVII in the series Major Problems in clinical Pediatrics, P130, Saunders Company, Philadelphia, London.
- [3] Christie, A.B., 1980, *Infectious Disease 3rd ed.* PP.907. Beccles and London.
- [4] Chief, P.D., Rapid Laboratory Techniques for the Diagnosis of Viral Infections, Report of a WHO Scientific Group, WHO, Geneva 1981.
- [5] Horodnicanu, F., et al., 1980, *Arch. Virol.* 64(4):287.
- [6] Gibert, R., et al., 1982 *Bull WHO.* 60(3):357.
- [7] Israel Sarov et al., 1983, *J. Virol. Methods* 6(3):161.
- [8] Haikin H., et al., 1980, *Intervirology* 14:155.
- [9] Stagno, S., et al., 1978, *J. Clin. Microbiol.* 7(5):486.
- [10] Robertson, P.W., et al., 1977, *J. Clin. Microbiol.* 6(2):174.

PREPARATION AND PRELIMINARY APPLICATION OF CYTOMEGALOVIRUS ANTIGEN—GLASS SLIDE TO RAPID DIAGNOSIS

Wang Hui-min Luo Lin Gong Zhen-Kui

(Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan)

Cytomegalovirus (CMV) Antigen-glass slide was prepared with human embryonic lung cells (HL) infected with CMV(AD169 strain). An indirect immunoperoxidase technique (IPA) carried out on the glass slides was preliminary applied to rapid diagnosis of CMV. Complement fixation test (CFT) and immunofluorescence antibody technique (IFA) were run in parallel. The results of detection CMV IgG antibody in 103 sera and CMV IgG and IgM antibody in 18 paired sera showed that IPA is specific, while results of IPA were coincident with those of CFT and IFA. IPE is a simple rapid, sensitive method without the requirement of sophisticated equipment, it may be widely used in the clinical diagnosis and epidemiology investigation.