

## 炭凝集试验快速检测呼吸道合胞病毒的研究

董继华 江汉珍 周生华 谢红斌 田慕贞

(同济医科大学附属协和医院, 武汉 430022)

**摘要** 用炭凝集试验(CAT)检测呼吸道合胞病毒(RSV), 结果表明该法是一种简便、快速、特异的诊断方法。用 CAT 对 16 株 RSV 和 8 株其它病毒做试验, 结果仅 RSV 凝集, 而其它病毒均阴性。用该法与细胞培养法检测 83 份临床呼吸道感染幼儿鼻咽吸出物, 结果 CAT 法阳性率为 69.88% (53/83), 细胞培养法为 39.75% (33/83), 两者阳性检出率相差极显著。阻断试验证明 CAT 是高度特异的。结果证明 CAT 具有较高的敏感性与特异性, 可用于临床 RSV 标本的快速检测。

**关键词** 炭凝集试验, 单克隆抗体, 呼吸道合胞病毒, 抗原检测

呼吸道合胞病毒是婴幼儿急性下呼吸道感染的重要病因, 主要引起毛细支气管炎和肺炎, 且广泛流行于世界各地<sup>[1]</sup>。诊断 RSV 的经典方法是鼻咽吸出物细胞培养, 然而细胞培养法较慢, 最少得一星期, 且因 RSV 的不稳定性其敏感性也受影响。单克隆抗体的应用大大促进免疫化学技术的发展, 如直接免疫荧光法和抗原捕捉酶免法(EIA)<sup>[2]</sup>, 这些方法比细胞培养快, 出结果时间相同, 但敏感性和特异性不同。炭凝集试验(CAT)具有简便、快速、敏感、特异等优点。我们将其成功地用于轮状病毒的快速检测<sup>[3]</sup>。本研究用自制的 RSV 单克隆抗体标记炭抗体, 用于 RSV 的快速检测, 取得满意的结果。

## 材料和方法

## 1 病毒与细胞

RSV 国际 A 型标准株(Long 株)和武汉地区 B 型代表株(R6 株)及历年武汉地区分离株(14 株)均为本室低温保存, 均在 Vero 和 HeLa 细胞上传代备用。对照用的流感病毒甲 1 型、副流感病毒 1 型、腺病毒 3 型、7 型、单纯疱疹病毒 1 型、脊髓灰质炎病毒 1 型、人轮状病毒 Wa 株和猴轮状病毒 SA<sub>11</sub> 株均为本室保存。

## 2 标本的采集和处理

从年龄在 1 月至 2 岁(平均 8.6 月)的呼吸道感染的小儿收集鼻咽吸出物 83 份。用 2 ml 细胞维持液将分泌物吸入粘液收集管中。标本种于 HeLa 细胞上, 按常规进行病毒分离与鉴定<sup>[1]</sup>。取标本中鼻咽脱落细胞涂玻片 2 张, -25℃ 冻存备用。剩余标本平分 2 份 -25℃ 冻存备用。

## 3 炭凝集试验

3.1 单克隆抗体 本室用 RSV R6 株应用杂交瘤技术制备<sup>[4]</sup>。选用抗 RSV G 蛋白 2 株和抗 F、N、P、M 蛋白单抗各 1 株等量混合, 用辛酸法<sup>[5]</sup>提取单抗 IgG。

本文于 1994 年 12 月 20 日收到, 1995 年 1 月 23 日修回

• 本项目为湖北省科委重点资助课题

3.2 免疫炭抗体(A液)的制备 详见文献<sup>[3]</sup>,并用同法制备一份非 RSV 单抗 IgG 标记炭血清(B液)作为正常对照。

3.3 炭凝集试验 取平底酶标板(或凹玻片),每孔先加 PBS(或生理盐水)20  $\mu$ l(各加上、下 2 孔),再于上孔加 A 液 20  $\mu$ l,下孔加 B 液 20  $\mu$ l,取临床标本室温溶化后,2000 r/min 离心 5 min。各加上清 20  $\mu$ l 于上、下孔中。同时设已知阳性病毒 R6 株和阴性细胞培养物上清作为对照。摇匀放 37  $^{\circ}$ C 湿盒中 30 min,光学显微镜下(100 $\times$ )观察结果。A 液孔凝集、B 液孔不凝集者为阳性(十~卅),A、B 液孔均不凝者为阴性。A、B 液孔均凝集者为非特异性反应。

3.4 CAT 阻断试验 将 CAT 检测阳性而 EIA 和病毒分离阴性标本及 RSV Long 株 R6 株与等量 RSV 混合单抗(1:10 稀释)混匀(同时设其它单抗对照),37  $^{\circ}$ C 中和作用 1 h,然后测 CAT。A、B 液孔均不凝集者为阻断试验阳性。

#### 4 特异性(交叉)试验

用 RSV 免疫炭抗体与 RSV 和其它病毒测 CAT,以证实 CAT 特异性。

#### 5 捕捉抗原酶免(EIA)试验

采用美国 Abbott Test Pack RSV 盒。按使用说明实验。

## 结 果

### 1 CAT、细胞培养与 EIA 的比较

本研究对 20 例临床标本(先经 CAT 初筛)用三种方法进行试验。其阳性检出率见表 1。

表 1 三种方法的比较

Table 1 Comparison of 3 methods

方法 Method	病例数 Total cases	阳性 Positive	阳性率(%) Positive rate
CAT	20	19	95
Tissue culture	20	8	40
EIA	20	10	50

由表 1 可知 CAT 阳性率最高(因先用 CAT 初筛选择标本,再做 EIA。因 EIA 试剂盒太贵),EIA 次之。但经 CAT 初筛的 1 份阴性标本,三种方法均一致为阴性。

### 2 CAT 与细胞培养法的比较

83 份临床标本检测,CAT 阳性率为 69.88%(58/83),细胞培养法为 39.75%(33/83)。表明 CAT 法比细胞培养法敏感得多。两者阳性检出率有极显著差异( $X^2 = 14, P < 0.01$ )。

### 3 CAT 阻断试验

选用 CAT 检测阳性而 EIA 和病毒分离阴性标本 7 份及 RSV Long 株 R6 株进行阻断试验,结果经 RSV 单抗中和作用后则不再出现凝集,而对照单抗处理者仍凝集,说明 CAT 具有高度的特异性,7 份标本均为真阳性。

### 4 特异性(交叉)试验

用免疫炭抗体与已知病毒进行 CAT 试验,结果所试 16 株 RSV(不论 A、B 亚型)均产生凝集,其它 8 种病毒均不产生凝集。全部试验没有 B 液孔凝集的,说明不存在非特异性凝集,从而证明 CAT 具有高度的特异性。

## 5 重复性、稳定性试验

本研究中 CAT 试验均用“盲”法重复二次,结果一致。特别是将 1992 年冬收集的一批标本 -25℃ 冻存 1.5 年后再试验,也取得令人满意的结果。分别用 1992、1993、1994 年标记不同批号炭抗体试验,结果也一致。表明标记炭抗体在 4℃ 冰箱至少可保存 2 年。

## 讨 论

目前国内外对 RSV 感染的实验室诊断主要有病毒分离、免疫荧光和 EIA 法<sup>[2]</sup>。这些方法各有优缺点:病毒分离法操作复杂,出结果太慢且敏感性太低。免疫荧光法虽然近年来敏感性有所提高,但需昂贵的荧光显微镜和相当的经验。EIA 法试剂昂贵(用 Abbott kit 每做一标本需人民币 200 元左右),有效期短,且敏感性与病毒分离差不多。以上方法均满足不了简便、快速、价廉的要求。本研究首次报道了 RSV 的另一种检测方法,该方法是将高效价的 RSV 单抗标记在活性炭粉上,然后用此炭抗体与相应的抗原作用,观察炭凝集来检测被检标本中相应抗原的存在。CAT 法对 16 株 RSV(分属 A、B 亚型)均可产生特异性凝集,而其它的 8 种病毒均不产生凝集,进而用 CAT 法与病毒分离法平行对 83 份婴幼儿下呼吸道感染标本进行检测。两法的 RSV 检出率分别为 69.88%(53/83)和 39.75%(33/83),两者有极显著性差异。分别用 CAT 与流感病毒、副流感病毒、腺病毒等做交叉试验,结果表明 CAT 具有高度的特异性。CAT 阻断试验也证实该法是特异而敏感的。经重复性试验表明临床标本 -25℃ 冻存 1.5 年不会影响检出结果。而标记炭抗体在 4℃ 冰箱至少可保存 2 年。特别是单克隆抗体成功地用于 CAT,这将大大降低快速检测病毒的实验费用,有利于试剂的标准化,因此使 CAT 法有更为广阔的应用前景。

CAT 法具有简便、快速、敏感、特异、价廉的优点,特别适用于广大基层医疗单位用于快速诊断 RSV 引起的急性下呼吸道感染。随着这一方法的广泛应用,对 RSV 引起疾病的防治与研究将起到很大的促进作用。

## 参 考 文 献

- 1 田慕贞,韦浩春,董继华,等.武汉地区婴幼儿急性呼吸道感染中合胞病毒的分离.病毒学集刊,1982;27
- 2 Welliver R C. Detection, pathogenesis and therapy of respiratory syncytial virus infections. Clin Microbiol Rev, 1988, 1;27
- 3 董继华,田慕贞.炭凝集试验快速检测轮状病毒的研究.微生物学报,1994;34(2):156
- 4 田慕贞,董继华,余福助,等.抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体的制备及其对 RSV 病毒株抗原性的分析.中国病毒学,1992;7(2):181
- 5 陈伯权,吴美英,叶群瑞.几种部分纯化单克隆抗体方法的比较.病毒学报,1990;6(2):122

## Study of Carbon Agglutination Test for the Rapid Detection of Respiratory Syncytial Virus

Dong Jihua Jiang Hanzhen Zhou Shenghua *et al.*

(Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022)

This study reports a simple, rapid and special diagnosis method of carbon agglutination test (CAT) to detect Respiratory Syncytial Virus (RSV). Sixteen specimens of RSV were seen agglutination but 8 specimens of other virus were negative. We compared CAT with tissue culture by using nasopharyngeal secretions from children with suspected RSV infection. Of 83 specimens, 53 (69.88%) were positive by CAT, 33 (39.75%) were positive by virus culture. There were very significant difference in the positive rates between CAT and culture. Blocking test showed that CAT has high specificity. We believe that CAT has a high sensitivity and specificity and it can be used for the rapid detection of clinical specimens of RSV.

**Key words** Carbon agglutination test, Monoclonal antibody, Respiratory Syncytial Virus, Antigen detection

## 国内第一本《药物流行病学》专著问世

由药物流行病学杂志社和中国药学会药物流行病学专业委员会组织编写的《药物流行病学》是一本内容丰富的中文专著。该书借鉴了国外有关资料,融汇了国内研究成果,全面系统地介绍了药物流行病学的基本知识、基本方法、基本技能和最新进展。全书 19 章涉及药物流行病学研究方法,偏倚、混杂、交互作用,因果关系,药物作用,药物不良反应和国际协调,药物管理、药物经济学,随机临床试验和重要药物流行病学调查实例等。主编周元瑶,副主编朱永琪、施侣元、曾繁典、唐镜波会同三十余名相关学科专家,密切合作、三载笔耕、数度修改后完稿;经周海钧、耿贯一主审定稿;由中国医药科技出版社编辑出版。全书 75 万字,结构严密,层次清晰,好读易懂,图文并茂,印装精良。该书可作为医药科研的参考书,医药生产的向导,医药经营的指南,医药监测的工具和医药应用手册。故此书为医药工作者的良师益友。欢迎订购,款到寄书。联系电话:027-2835077;邮编:430014;地址:湖北省武汉市胜利街 122 号药物流行病学杂志社芦德梅收。