

炭凝集试验快速检测轮状病毒的研究

董继华 田慕贞

(同济医科大学附属协和医院 武汉 430022)

摘要 用炭凝集试验检测轮状病毒,结果表明该法是一种简便、快速、特异的诊断方法。用炭凝集试验及聚丙烯酰胺凝胶电泳法对 105 份粪样进行检测,结果两法阳性检出率无显著性差异,说明炭凝集试验可应用于临床。

关键词 炭凝集试验,轮状病毒,抗原检测

轮状病毒引起的腹泻是一种世界性传染病,全世界因急性胃肠炎而住院的儿童中有 50—60% 是由轮状病毒引起的。轮状病毒引起的婴幼儿腹泻是仅次于呼吸道感染的第二种重要疾病^[1]。国内外对轮状病毒(RV)胃肠炎的实验室诊断主要是检测粪便中的 RV 抗原。常用方法有电镜法(EM)^[2]、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)^[3]和酶联免疫吸附试验(ELISA)^[4]。但均较为费时,不能达到简便、快速、敏感的目的。

炭凝集试验(CAT)具有简便、快速、特异、敏感等优点。已被应用于某些细菌性疾病的实验室诊断^[5]。作者应用 CAT 法检测病毒性胃肠炎患儿粪便中的 RV 抗原,并与 PAGE 法平行进行检测,以评价该法用于 RV 检测的敏感性、特异性和稳定性及其用于临床快速诊断和流行病学调查等方面的价值。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞

人轮状病毒 Wa 株、猴轮状病毒 SA11 株和 MA-104 细胞由中国预防医学科学院病毒研究所方肇寅副教授惠赠。对照用的脊髓灰质炎 I 型病毒(PolioVI)、腺病毒 3 型(AdV3)、腺病毒 7 型(AdV7)病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSVI)为本室保存。

1.2 粪便标本处理

临床诊断为 RV 胃肠炎患儿的粪便标本用 0.01mol/L pH7.2 PBS 稀释成 20% 悬液,充分振摇,3 000r/min 离心 10 分钟,取上清液使用或 -25℃ 低温保存备用。

1.3 炭凝集试验

1.3.1 RV 免疫血清制备:用 MA-104 细胞培养人 RV(Wa 株)经超速离心法提纯并浓缩病毒抗原,免疫家兔制备抗血清,用对流免疫电泳法测得效价 $\geq 1:8\ 000$ 时放血。抗血清分装后 -25℃ 冻存备用。用硫酸铵盐析法提取免疫球蛋白(IgG);用紫外分光光度计测

• 本课题为湖北省科委重点资助课题。

本文于 1993 年 4 月 21 日收到。

其浓度。

1.3.2 免疫炭抗体(A液)的制备:化学纯活性炭(上海新中国化学厂,批号:66-4014)先经80—100℃烘烤8小时。称取0.1g炭粉置研钵中研磨10分钟,加入用0.01mol/L pH7.2 PBS稀释的抗体免疫球蛋白3ml(1mg/ml),在25—35℃下研磨致敏30分钟,离心取沉淀炭粉,用含1%灭活正常兔血清的PBS洗3次,最后将沉淀悬浮于10ml 2%灭活正常兔血清-1%硼酸生理盐水中。充分混匀,500r/min离心1分钟,取上面悬液(弃沉淀粗炭粒),加0.1%叠氮钠防腐剂置4℃冰箱保存备用。并用同法制备1份正常兔炭血清(B液)作对照用。

1.3.3 炭凝集试验(CAT):取平底酶标板,每孔先加PBS(或生理盐水)20 μ l(各加上、下2孔),再于上孔加A液20 μ l,于下孔加B液20 μ l,同时设已知阳性病毒(Wa株)和阴性细胞(MA-104细胞培养物上清液)作为对照,摇匀放37℃湿盒中静置30分钟,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(+-++++);A、B液孔均不凝集者为阴性。A、B液孔均凝集者经吸附剂处理后再做试验,依上法判定结果。

1.3.4 非特异性凝集处理试验:取A、B液孔均凝集者标本50 μ l,加活性炭粉10mg,混匀于37℃作用1小时,2000r/min离心10分钟,取上清液做CAT。依上述标准判定结果。同时设阳性标本对照。

1.3.5 CAT阻断试验:将CAT检查阳性的标本及RV(Wa株,SA11株)与等量的5倍稀释的兔抗RV血清(及正常兔血清对照)混合,37℃作用1小时,然后做CAT。A、B孔均不凝集者为阻断试验阳性。

1.4 轮状病毒核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

参照文献[3]进行。

1.5 特异性(交叉)试验

用RV免疫炭抗体与轮状病毒和其它病毒做CAT,以证实CAT特异性。

2 结果

2.1 CAT与PAGE的比较

取RV胃肠炎患儿粪便标本105份,用CAT和PAGE法同时进行RV抗原检测,结果见表1。

表1 CAT与PAGE检测结果
Table 1 The result of CAT and PAGE

标本 Specimens	份数 Number	CAT	
		阳性(%) No. of positive	阴性(%) No. of negative
PAGE	+54	51(94.44)	3(5.56)
	-51	4(7.84)	47(92.16)

由表1可见,PAGE阳性标本作CAT检测阳性率为94.44%,而PAGE阴性粪样作

CAT 有 7.84% 呈阳性反应。两种方法总符合率为 93.33%。

2.2 非特异性凝集素处理结果

所试样品中有 7 份 A、B 液孔均凝集,说明有非特异性凝集素。用吸附剂处理后重新做 CAT,结果 2 份转阴,5 份仍为阳性,与 PAGE 结果相符。而所设 RV 对照 Wa 株、SA11 株处理后仍为阳性,说明吸附剂处理后阳性标本影响不大,而对非特异性凝集素处理是有效的。

2.3 CAT 阻断试验

取 CAT 阳性标本 15 份,加兔抗 RV(Wa 株)血清各 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 中和作用 1 小时后作 CAT。结果阳性标本经兔抗 RV 血清中和作用后,则不再出现凝集,而用正常兔血清处理者仍为凝集。说明 CAT 具有特异性。其中有 4 份标本 CAT 阳性,PAGE 为阴性。而经阻断试验后转阴,说明是特异性的。特别是 10 号标本 CAT 阳性,而 PAGE 阴性。将其 RNA 经乙醇低温沉淀浓缩 20 倍后,PAGE 才能检出。说明 CAT 较 PAGE 敏感。

2.4 特异性(交叉)试验

用免疫炭抗体与已知病毒作 CAT。结果人轮状病毒(Wa 株)和猴轮状病毒(SA11)均产生凝集,而其它科 5 株病毒均不产生凝集。说明 CAT 具有较强的特异性。

2.5 重复性、稳定性试验

取 1988 年收集的 6 份患儿粪标本分别于 1988、1989 和 1992 年进行多次重复试验,结果一致。证明其检测标本重复性好。用该 6 份标本同时用 1988、1989 和 1992 年标记不同批号免疫炭抗体试验,结果也一致,表明标记炭抗体在 4 $^{\circ}$ C 冰箱至少可保存 3 年以上。

3 讨论

目前国内外对 RV 胃肠炎的实验室诊断主要有 EM、PAGE 和 ELISA,这些方法各有优缺点:有的需要昂贵而复杂的设备,有的操作方法较繁杂,有的需要高质量的试剂且保存期短,均不能满足简便、快速的要求。本文报道了 RV 的另一种检测方法。该方法是将高效价的抗 RV 血清标记在活性炭粉上,然后用此炭抗体与相应的抗原作用,从而观察炭凝集来检测被检标本中相应抗原的存在。我们用人 RV(Wa 株)免疫血清制备了炭抗体,作 CAT 对人 RV 和猴 RV 均可产生特异性凝集,而其它科 5 株病毒均不产生凝集。进而用 CAT 法与 PAGE 法平行对 105 份婴儿腹泻标本(1988—1992 年收集)进行检测,两法总符合率为 93.33%。两法的轮状病毒检出率分别为 52.38%(55/105)和 51.43%(54/105)。两者相差不显著($X^2=2.21, P>0.05$)。分别用猴 RV 和人 RV 与 PolioVI、AdV3、AdV7、RSV、HSV1 等病毒做交叉试验结果表明 CAT 具有较高的特异性。特异性阻断试验也证实 CAT 是特异的。

在试验中发现有的粪标本(6.67%,7/105)有非特异性凝集,采用吸附剂处理成功地非特异性凝集素去除,从而保证试验的准确性。经重复性试验表明粪标本放 -25 $^{\circ}$ C 冻存 4 年不会影响检出结果。而标记炭抗体在 4 $^{\circ}$ C 至少可保存 3 年。

CAT 法具有简便、快速、敏感、特异且价廉的优点,适用于快速检测 RV 引起的胃肠炎,特别适用于广大基层卫生医疗单位的使用。若将 RV CAT 试剂推广到畜牧兽医方面,进行猪、牛、羊等牲畜的 RV 腹泻的诊断,将会取得较大的社会效益和经济效益。

参 考 文 献

- [1] 侯云德主编. 分子病毒学, 北京: 学苑出版社, 1990.
- [2] 鹿其芳, 丘福禧, 俞高荣, 等. 中华医学杂志, 1979, 59(10): 589—591.
- [3] Herring A J, Inglis N F, Ojeh C K *et al.* *J Clin Microbiol*, 1982, 16: 473—477.
- [4] Hjelt K, Grauballe P C, Paerregaard A *et al.* *J Med Virol*, 1987, 21: 39—47.
- [5] 高树德, 江美先. 防疫检验手册, 北京: 人民卫生出版社, 1982. 208—210.

STUDY OF CARBON AGGLUTINATION TEST FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF ROTAVIRUS

Dong Jihua Tian Muzhen

(Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022)

Abstract This paper reports the result of experiment of carbon agglutination test used for the diagnosis of Rotavirus. The results of our experiments demonstrate that this method has many advantages, such as simplicity, rapidity and specificity. One hundred and five stool samples were detected by carbon agglutination test and polyacrylamidegel electrophoresis. The result showed that no obvious difference in the positive rates of them. Thus, it can be concluded that CAT method can replace the PAGE in clinic.

Key words Carbon agglutination Test, Rotavirus, Antigen detection

JOURNAL OF MICROBIOLOGY