

用酶免疫法检测细胞培养病毒的研究

I 一种简便的鉴定虫媒病毒新方法

中国预防医学中心病毒学研究所

张永和 郁文芳 田仲文 葛继乾 陈勤生 王逸民

自从使用白纹伊蚊细胞株C6/36细胞分离流行性乙型脑炎及其他虫媒病毒以来,阳性率已大大提高,极需简便、快速的方法对新分离株病毒进行鉴定。

近年来固相酶联免疫吸附测定法(ELISA)应用日趋广泛,在虫媒病毒方面亦有报道^[1,2]。因需提纯与浓缩病毒作固相包被,无法成为简便的方法用于此目的。新近又出现一些酶免疫的新方法,虽有用于检测病毒在细胞上的感染灶^[3],但多是用来检测抗病毒抗体^[4,5]。经我们进一步改进,发展成一种新的方法,用于鉴定新分离的虫媒病毒,甚为简便与特异,亦可用于病毒滴定。兹将研究结果报道于下。

材料与方法

细胞株及其培养:白纹伊蚊C6/36细胞株用于新分离的病毒培养及虫媒病毒滴定,置于28℃或33℃培养,乳地鼠肾细胞株BHK-21细胞及猴肾传代细胞LLC-MK₂细胞,用于虫媒病毒的比较滴定,置于33℃或37℃培养,其营养液为每100毫升中含0.5%水解乳蛋白, Hanks液30毫升, Eagle's液60毫升,小牛血清(经检查不含抗乙脑抗体)10毫升,及抗菌素,碳酸氢钠,在微量滴定盘中培养均置于含5% CO₂之湿润条件下。

病毒株及其小鼠免疫腹水:流行性乙型脑炎病毒京卫研1株(A2株)鼠脑40代, Murray河谷脑炎(MVE)病毒WK65株乳鼠脑5代;Kunjin病毒OR393株乳鼠脑5代,免疫腹水

为此三种病毒免疫小鼠制备,使用前未经灭活。

病毒滴定:用上述细胞营养液(不含小牛血清)稀释病毒,将不同稀释度之病毒1份,加至细胞悬液9份中,混匀,在96孔微量滴定盘中,每稀释度病毒的细胞悬液接种4孔,每孔150μl,置于33℃培养,同时作28℃培养的比较,判结果时先镜检观察细胞病变,然后进行酶免疫测定,并在部分实验中与蚀斑法滴定和小鼠脑内接种法滴定相比较。

乙脑病毒的分离与鉴定:从湖南长沙市郊区采集来三带喙库蚊,制成悬液,接种于C6/36细胞,于28℃培养,待出现细胞病变后收获其维持液冻存于-80℃冰箱中待鉴定,主要用酶免疫测定进行鉴定:先将C6/36细胞接种于96孔微量滴定盘中,每孔100μl,再于每孔种以50μl病毒悬液,每株病毒种4孔,并用细胞营养液接种4孔作为无病毒对照,培养于28℃5天,进行酶免疫测定。为了验证这种新的酶免疫测定鉴定病毒结果的可靠性,采用了免疫荧光方法及蚀斑中和试验进行检查。

细胞培养酶免疫测定:参照Anderson与Rowe所采用的方法进行^[5],病毒感染细胞与未感染对照细胞用10%福尔马林PBS在室温下固定30分钟,固定后可置于4℃下保存,1周以内使用,每个步骤(包括固定前、后)均洗2次,在最后加底物之前洗3次。洗液为含0.05% Tween20之PBS,用含1%牛血清白蛋白之洗液稀释小鼠免疫腹水,辣根过氧化物酶标记之金黄色葡萄球菌A蛋白的应用浓度为

1 : 3000, 结果的判定均用目测法。

免疫荧光方法: 接种了待检病毒材料的C6/36细胞, 于28℃培养, 待出现病变时, 刮下细胞涂玻片作间接荧光抗体法染色。第一抗体用乙脑病毒A₂株小鼠免疫腹水, 第二抗体用异硫氰酸荧光素标记抗小鼠免疫球蛋白抗体。

蚀斑法滴定病毒及蚀斑中和试验: 鸡胚细胞蚀斑滴定参照本室常规方法^[6]进行。于12 cm²的方瓶中鸡胚细胞接种病毒悬液0.2ml, 铺营养性琼脂后观察7天, 蚀斑中和试验为将依次10倍稀释之病毒悬液, 加等量乙脑A₂株高价兔免疫血清, 置于37℃水浴中1小时, 然后接种鸡胚细胞瓶作蚀斑法检查, 结果以中和100个蚀斑以上为阳性。

实验结果

用细胞培养酶免疫法鉴定流行性乙型脑炎新分离株病毒: 从三带喙库蚊分离的病毒经C6/36细胞传1~5代, 接种于96孔微量滴定盘中C6/36细胞, 经培养后用酶免疫法进行鉴定。所用抗体为乙脑病毒A₂株小鼠免疫腹水。共鉴定了35株新分离株病毒, 结果其中20株为流行性乙型脑炎病毒。同时用免疫荧光法鉴定这35株病毒, 结果与酶免疫法完全一致。从这20株鉴定为乙脑病毒的材料中抽取8株作蚀斑中和试验, 结果均能被乙脑A₂株免疫血清所中和, 其中和指数均>100。

不同细胞株感染病毒后酶免疫测定结果的比较: 为了解哪一细胞株比较适用于本方法检测虫媒病毒, 乙脑、MVE两种病毒作成不同稀释度同时接种于C6/36, BHK-21与LLC-MK₂细胞, 置于33℃培养5天, 用酶免疫法检测, 结果病毒感染的C6/36细胞特异性显色最浓, 阴、阳性界线很明显。另外在多次实验中见到: 由于C6/36细胞贴壁不牢固, 特别是产生病变的细胞即使经过甲醛固定, 由于反复洗, 有时使细胞完全脱落, 仍不影响特异性酶免疫反应。BHK-21细胞的特异性显色居于中等程度, 约为C6/36细胞特异性显色深度的一半左右, 其

与阴性反应间的界线仍明显。LLC-MK₂细胞特异性显色最差, 色淡到往往与阴性几无法区分, 结果不易判定。此细胞贴壁最牢, 经酶免疫操作全过程后细胞仍成片。

用C6/36与BHK-21两种细胞滴定乙脑与MVE两种病毒, 结果表明两种细胞所获的滴度基本上一致(表1), 基于上述实验结果, C6/36细胞较适于选作酶免疫法检测虫媒病毒。

表1 用酶免疫法判定病毒在两种细胞上的滴度

细 胞	不同病毒的滴度(log TCD ₅₀)	
	乙脑	MVE
C6/36	6.23	6.67
BHK-21	6.67	7.00

注: 均为33℃孵育5天后测定结果。

C6/36细胞感染病毒后特异酶免疫反应与细胞病变出现时间的比较: 为了解终末稀释度病毒接种后细胞出现特异性酶免疫反应与细胞病变的时间, 将乙脑, MVE与Kunjin三种病毒在C6/36细胞上进行滴定, 分别置于28℃及33℃培养。观察结果如表2所示, 细胞病变的出现迟于特异性酶免疫反应。在33℃下培养, 3~5天时仅Kunjin病毒出现融合巨细胞病变外, 乙脑与MVE两病毒尚未见明显细胞病变。而用酶免疫法检测, 则见感染后3天三种病毒在较低稀释度已显阳性, 5天时在终末稀释度均显阳性, 7天以后酶免疫法与细胞病变的滴度已趋于一致, 不再增高; 28℃下培养病毒繁殖较慢, 3天时酶免疫法所显示的滴度于三病毒均比33℃低1个对数以上, 7天时乙脑与MVE已同33℃一致, Kunjin病毒与33℃接近; 而此时在28℃细胞病变的滴度仍比33℃低2个对数。9天及11天, 细胞虽已趋于衰老, 但酶免疫测定仍显明确结果, 与7天的结果差不多, 在表2中未列出(表2)。

用酶免疫法判定病毒在C6/36细胞上的滴度与鸡胚细胞蚀斑法的比较: 为了解方法的敏感性, 将一定稀释度的乙脑, MVE与Kunjin病毒同时接种于C6/36细胞与鸡胚细胞, 前者

置于33℃培养5天,用酶免疫法测定,后者在37℃下吸附1.5小时后铺营养性琼脂,置于37℃培养7天,计蚀斑数。结果表明两者的滴度基本一致(表3)。

表2 用酶免疫法及细胞病变观察三种病毒在C6/36细胞上滴度的比较

观察指标	病毒	培养温度(°C)	感染后各天判定的滴度(log TCD ₅₀ /0.1ml)			
			1天	3	5	7
酶免疫法	乙脑	33	≤2.00	5.50	6.50	6.77
		28		4.50		6.67
	MVE	33	≤2.00	6.67	7.50	7.23
		28		4.50		7.50
	Kunjin	33	≤2.00	6.50	7.00	7.23
		28		3.50		6.67
细胞病变	乙脑	33	≤2.00	≤2.00	≤2.00	6.77
		28		≤2.00		4.50
	MVE	33	≤2.00	2.67	≤2.00	7.33
		28		≤2.00		3.67
	Kunjin	33	≤2.00	3.22	4.50	7.00
		28		3.33		4.50

表3 用酶免疫法判定病毒在C6/36细胞上的滴度与鸡胚细胞蚀斑法滴度的比较

滴定方法	不同病毒的滴度		
	乙脑	MVE	Kunjin
C6/36细胞酶免疫法(log TCD ₅₀ /0.1ml)	6.67	8.00	7.11
蚀斑法(log PFU/0.1ml)	7.20	8.05	7.54

甲醛溶液固定感染细胞对于酶免疫测定的影响:为操作病毒的安全起见,在进行酶免疫步骤之前,可先将感染及未感染对照细胞进行固定,起消毒作用,乙脑病毒A₂株感染之C6/36细胞在33℃下培养2天后,连同其未感染的对照组细胞在固定前及固定后分别洗2次,在4℃下用10%福尔马林PBS溶液分别固定2、4、6、8、10小时,其后用酶免疫测定检查,结果感染细胞全部呈强阳性,未感染的对照细胞均未见非特异性反应。若再将甲醛溶液固定的时间继续延长至24小时,可见感染细胞仍呈强阳性,而未感染的对照细胞呈轻微的非特异性显色。由此看来,延长甲醛溶液的固定时间不

至于破坏病毒的抗原性。

讨 论

长期以来,乙脑病毒主要是用交叉中和试验与补体Roehrig等报道用常规ELISA鉴定虫媒病毒,其病毒抗原需经浓缩与提纯作固相包被[7]。本文报道的酶免疫方法则省去了此浓缩与提纯病毒的步骤,而代之以直接在细胞培养病毒,大大简化了鉴定病毒的步骤,这就有可能作到一周内鉴定数百株新分离株病毒的速度。

细胞培养酶免疫方法亦可用于滴定病毒。虫媒病毒在C6/36细胞上的特异性酶显色比BHK-21细胞浓,酶免疫反应比细胞病变出现早,滴度终点阴、阳性界线分明,易于用肉眼判定。正常小鼠腹水对照完全不显酶免疫反应。

用10%福尔马林固定细胞,未感染的对照细胞本底显色较其他固定剂为低[4]。将甲醛固定的时间延长至8小时,并不增加对照细胞的本底显色,又未见破坏特异性酶显色反应。甲醛固定可灭活未知病毒,特别是烈性病毒在本法操作中经过甲醛灭活的步骤,可保证安全。

C6/36细胞易于脱落,甚至经过甲醛固定,仍不能避免。由于反复洗,感染细胞脱落,孔内仍然呈特异性显色。可能由于自细胞释放的病毒抗原已在塑料孔表面包被的缘故。

乙脑病毒属于黄病毒属,特别与MVE,西尼罗热及圣路易脑炎等病毒的抗原性有明显交叉,成为一个较为近缘的亚组[8]。然而在我国乙脑流行区内,目前还未见到属于和乙脑同一亚组的其他黄病毒存在,因而使用乙脑免疫腹水或免疫血清多克隆抗体来鉴定乙脑新分离株病毒是可以的。至于乙脑与国外同一亚组的几种黄病毒的鉴别,则需用单克隆抗体方能解决。

一部分免疫腹水有非特异性反应,我们在制备过程中分不同鼠个体采集,进行予试,将抗体滴度高而无非特异性反应者合并使用,可以解决此问题。同时,用含1%牛血清白蛋白之0.05%Tween20PBS溶液在37℃下予先处理细胞孔1小时并用于稀释抗体,可作为常规以

减少非特异反应。

在本工作中我们对聚苯乙烯微量滴定盘是反复使用的,洗净后经紫外光灭菌即可用,不需每次都用新的,可以节约大量材料。

摘 要

本文报道一种十分简便的新方法,用以鉴定虫媒病毒。即用辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌A蛋白作间接酶免疫测定,检测C6/36细胞培养的虫媒病毒。35株从三带喙库蚊分离的病毒,经鉴定结果20株为流行性乙型脑炎(乙脑)病毒。此与免疫荧光及蚀斑中和试验的结果完全一致。还研究了本方法的适宜条件,检测病毒滴度的敏感性以及操作的安全性等问题。结果表明本方法很值得在虫媒病毒的调查与研究中推广应用。

ABSTRACT

This paper introduces a simple and new method for the identification and testing the titration of arbovirus isolates. Horseradish peroxidase conjugated *Staphylococcus aureus* protein A was used for the indirect staining of virus antigens grown in an *Aedes albopictus* cell line C6/36 cells. Thirty-five isolates from *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes were examined by this method and 20

of them identified as Japanese encephalitis virus (JEV). These results were confirmed by immunofluorescent assay and plaque neutralization test. Comparative titration of JEV, Murray Valley encephalitis and Kunjin viruses showed that this method was as sensitive as chick embryo plaque assay. Specific enzymatic reactions on these virus-infected cells began to appear before the third day and reached the end-point on the fifth day post infection of C6/36 cells, whereas the cytopathic effect appeared about 2 days later than the specific enzymatic reactions. Fixation with 10% formalin for 1/2~8 hrs did not [damage the specific reaction in infected cells, nor increase the background colour for uninfected cells.

参 考 文 献

1. Hofmann H et al: J Gen Virol, 42: 505, 1979.
2. Igarashi A et al: Trop Med, 23: 49, 1981.
3. Smith KO et al: J Immunol Methods, 40: 297, 1981.
4. Anderson J et al: J Immunol Methods, 53: 183, 1982.
5. Pan IC et al: J Clin Microbiol, 16: 650, 1982.
6. 张汉荆等: 微生物学报, 9: 253, 1963.
7. Roehrig JT: J Gen Virol, 63: 237, 1982.
8. Pond WL et al: J Immunol, 75: 78, 1955.

(Murray河谷脑炎及Kunjin病毒由澳大利亚N.F. Stanley教授惠赠; 解放军总医院谷志远、宋海静两同志曾协助工作, 于此一并致谢)

自猪体分离出一株卡劳沙门氏菌

辽宁省建昌县卫生防疫站 李云英 刘 丹 孙斌华

1982年7月,我们在建昌县屠宰厂对新宰的猪取材检验,调查猪群沙门氏菌属染带情况。

方法:对所宰的猪,均取肠淋巴结1克,剪碎,置10毫升pH7.4磷酸盐蛋白胨水,37°C增菌6小时,取出1毫升接种于10毫升亚硒酸增菌液,43°C20小时,再接种SS平板,挑可疑菌落再接种双糖培养基,继而进行生化及血清学鉴定。

结果:从421头猪的检材中检出一株卡劳沙门氏菌(*S. Carrau*)。

形态特点:本菌为革兰氏阴性无芽胞小杆菌,有动力,在SS平板上生长良好,菌落圆形,呈半透明,边缘整齐,为光滑型菌落。

生化特性:葡萄糖“⊕”;对硝酸盐还原、甘露

醇、卫矛醇、阿拉伯胶糖、木糖、山梨醇、鼠李糖、麦芽糖、M-R试验、Simmon枸橼酸盐、H₂S、赖氨酸脱羧酶均为“+”;对侧金盏花醇、水杨苷、肌醇、乳糖、蔗糖、尿素、靛基质、明胶液化、V-P试验、氰化钾生长、丙二酸钠利用均为“-”。

按照Kauffmann对沙门氏菌亚属的分类位置,本菌属于沙门氏菌亚属I。

血清学性状:用沙门氏菌因子血清鉴定,本菌抗原式为:6,14,24:y:1,7。结合生化特性,鉴定为卡劳沙门氏菌。

1982年12月7日送卫生部药品生物制品检定所复鉴,结果亦确认本菌为:卡劳沙门氏菌。