

# 单扩散溶血试验检验虫媒病毒的研究

卫生部药品生物制品检定所 肖泽帅 曲小肃

单扩散溶血试验(SRH)具有简便、准确、可靠、抗原不需提纯与浓缩、血清标本不需处理等优点，近年来在病毒学研究中得到广泛的应用。国内外已有关于虫媒病毒SRH的报道，但因对适宜条件研究不够，方法尚未完全统一[1~9]。

## 材料与方法

**一、病毒：**A组包括Chikungunya(Ross株)[Chik]、Mayaro(Tr4675株)[May]、Sindbis [Sin]三种。B组蚊媒性病毒Dengue-2 [Den-2]、Dengue-3 [Den-3]、乙脑(SA<sub>14</sub>高株)[JE]、Murry Valley Encephalitis [MVE]、West Nile(Egypt101株)[WN]、Kunjin(OR393株)[Kun]、Ilheus [Ilh]等7种。B组蜱媒性病毒Langat株[Lan]、Absettarov [Abs]、Loupingill [LI]、Powassan [Pow]4种。

**二、抗原：**1.乳鼠脑抗原：JE为感染的乳鼠脑粗制抗原，其它病毒为蔗糖-丙酮抗原[SA-Ag]，均按常规方法制备。正常鼠脑抗原用同法制备。2.用感染的白纹伊蚊C6/36细胞培养液作为细胞培养抗原[TC-Ag]。用正常的C6/36细胞培养液作为对照抗原。

**三、免疫腹水：**由本实验室制备，共21种虫媒病毒冻干免疫腹水。除上述15种病毒外，还有Den-1(Hawai株)、Den-4(H241株)、St.Louis脑炎[SLE]、Negishi[Neg]、Batai[Bat]、Bunyawera[Bun]6种。正常小鼠腹水是液体冻存的。

**四、其它材料：**本实验采用绵羊及鹅红血球。琼脂糖为上海东风制药厂制。采用pH7.2

PBS和Dulbecco's PBS两种缓冲液。鼠脑及TC-Ag的试验，各用同一批补体(0.04ml 1:30补体为一个单位)。

**五、血凝[HA]及血凝抑制试验[HI]：**常规法。

## 六、单扩散溶血试验方法：

**1.常规法：**抗原加1.0ml 10%红血球悬液(配成病毒血凝的适宜pH)于0℃致敏10分钟后，用生理盐水洗一次，再用同上的PBS将红血球重悬成10%悬液，然后与7.5ml 1%琼脂糖和0.3ml补体混匀、铺板(聚苯乙烯盘4×10cm<sup>2</sup>)、打孔(3.5mm)后，每孔加腹水8μl，放37℃或28℃，18~20小时，用游标卡尺(精度0.02mm)测溶血区直径，以“+”表示溶血的程度。

**2.NaIO<sub>4</sub>法：**在红血球与抗原致敏前，用NaIO<sub>4</sub>处理红血球[10]，以后各步骤与常规法相同。

**3.后加补体法：**照常规法加腹水后，放4℃16~18小时，加稀释的补体3ml，放37℃3~4小时判定结果。

**4.**以清晰的溶血区直径≥2mm(不包括孔径)判定为阳性[11]。以下各种条件的对比试验中所用的各种材料均为同批制备的。

## 结 果

### 一、SRH最适条件的研究：

**1.孵育温度：**用JESA<sub>14</sub>株抗原，不同稀释度SA<sub>14</sub>免疫腹水、羊红血球和两种PBS作常规法，分别孵育于37℃及28℃进行比较，重复试验溶血程度均好(表1)。

**2.红血球种类：**用JE(SA<sub>14</sub>及高株)和Sin

表 1

## 孵育温度对单扩散溶血的影响

琼脂糖 缓冲液	孵育温 度(°C) #	不同稀释度免疫腹水的溶血区直径(mm)				
		1 *	4	16	32	64
pH7.2PBS	28	10.03	7.2	5.41	4.5	3.0
	37	9.43	6.95	5.07	4.1	2.9
Dulbecco's PBS	28	11.2	/	6.7	5.0	3.1
	37	9.9	/	5.2	4.7	4.1

注: \* 免疫腹水稀释度的例数; #两个温度的结果差异P<0.05; /未做。

的SA-Ag, 各与其特异的不同稀释度免疫腹水在两种PBS及孵育温度下按常规法, 比较羊、鹅红血球的影响, 从二次重复试验结果(表2)可以看出: ①用pH7.2PBS和两种JE抗原时, 37°C下原液腹水溶血区平均直径羊、鹅红血球分别为10.6及8.0mm, 腹水滴度相近; 而28°C时重复4次, 羊红血球均明显优于鹅红血

球; ②用Dulbecco's PBS和JE抗原、Sin SA-Ag时, 37°C或28°C下, 溶血区的直径和免疫腹水滴度, 羊红血球均优于鹅红血球。各次试验的溶血程度均好, 羊红血球凝胶板的颜色较鹅红血球鲜艳, 表明前者的适宜条件范围宽于后者。

## 3. PBS种类: 用JE抗原与不同稀释度JE

表 2

## 不同种类红血球对单扩散溶血的影响

琼脂糖 缓冲液	试验次数	试验抗原	温度 (°C)	细胞种类	不同稀释度免疫腹水溶血区直径(mm)							
					1 *	4	16	32	64	128	256	512
pH7.2 PBS	1	JE (SA <sub>14</sub> 株)	37	羊	10.7	8.0	5.7	5.0	4.5	3.5	3.8	—*
			28	鹅	6.5	4.9	4.8	3.0	3.5	2.7	2.5	—
	2	JE (高株)	37	羊	11.4	8.5	6.0	4.8	4.0	3.5	2.0	—
			28	鹅	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulbecco's PBS	1	JE (高株)	37	羊	10.5	7.0	5.3	/	3.0	1.9	—	—
			28	鹅	9.5	8.0	5.4	/	4.1	2.0	—	—
	2	Sindbis	37	羊	12.0	7.6	5.7	/	3.2	—	—	—
			28	鹅	—	—	—	—	—	—	—	—

注: △示有不完全溶血, 但不彻底, 无法测量直径; #示无溶血区; “/”未做; “\*”同表1。

免疫腹水、羊红血球, 于两种孵育温度作常规法, 比较用pH7.2 PBS(不含Ca<sup>++</sup>及Mg<sup>++</sup>)和Dulbecco's PBS(含Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>)配制的1%琼脂糖的影响, 二次试验结果表明: 原液及不

同稀释度免疫腹水的溶血区直径、溶血程度、免疫腹水滴度及凝胶板颜色均无明显差别。

4. 补体的不同浓度和加法: 用Sindbis SA-Ag和同批补体, 在相同条件下用常规法和后

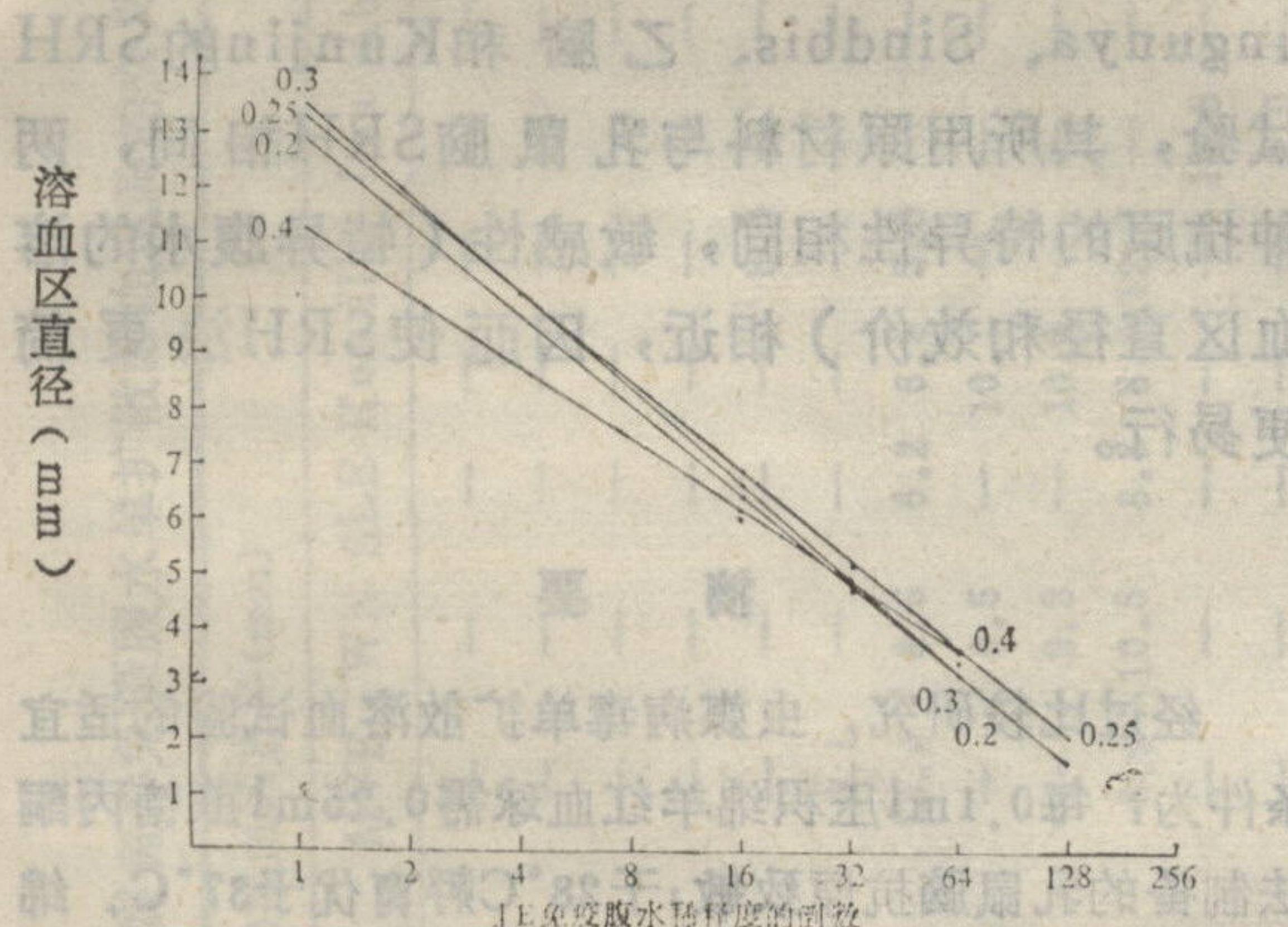
加补体(1:5及1:10)法，测定Sindbis不同稀释度免疫腹水和Chik、May免疫腹水的SRH，从二次重复试验结果(表3)可看出：

表 3

补体加法对Sindbis病毒单扩散溶血的影响

补体加法 及浓度	同种免疫腹水的SRH		与相关免疫腹水的SRH		正常小白 鼠腹水的 SRH
	原液腹水溶血区 直径(mm)①	滴 度	May	Chik	
常规法	14.5	1:1280 ≥1:512	—②	—	—
后加1:5	15.45	1:1280 ≥1:512	—	—	—
后加1:10	14.9	1:1280 ≥1:512	—	—	—

注：①两次试验共4孔的溶血区直径的均数，溶血程度均勻，边缘整齐；②同表2。



附图 抗原量对单扩散溶血的影响

从以上结果看出：随着免疫腹水稀释度的增加，溶血区的直径减小，表明本法可用于测定抗体效价。

5.抗原量：用JE抗原(血凝效价1:320)、羊红血球和Dulbecco's PBS作常规法，比较不同抗原量对SRH的影响。将不同抗原量与不同稀释度免疫腹水所得溶血区直径绘成回归直线，从二次重复试验平均值结果(附图)可看出：①抗原量为0.4ml者溶血区偏小，而0.3、0.25及0.2ml的3条回归直线较靠近，其中0.25ml直线略偏高，免疫腹水滴度为1:128，而其它抗原量的滴度仅1:64，但用0.2ml抗原时，溶血区模糊不清，边缘不整齐，表明抗原量不足。而其它抗原量则溶血区透明，边缘整齐。无抗原对照板均不出现溶血区，表明0.25ml抗原量较合适。本文各试验均用

①原液Sin腹水的溶血区直径、溶血程度和滴度于3个方法相近；②SinSA-Ag与Chik、May腹水之间均无交叉反应。

0.25ml抗原，实践证明是适宜的。②各组不同抗原量SRH溶血区的直径，与免疫腹水稀释度的对数值( $\log_2$ )呈负的直线相关。

二、SRH与HI结果之间的关系：LI、IIh、Chik、Sin 4种SA-Ag，各与其特异的免疫腹水，用SRH与HI法同时试验，从结果(表4)看出：①HI效价不同的免疫腹水，其SRH效价亦不同；SRH与HI效价相似；②未经处理与处理的免疫腹水SRH效价相近。

三、SRH试验的特异性：用14种虫媒病毒抗原，同时与21种虫媒病毒免疫腹水和正常小鼠腹水作SRH试验，从表5结果看出：①A组、B组蚊媒和蜱媒病毒三者之间无交叉反应，三者抗原与Bunya组病毒抗体亦无交叉反应；②A组三种病毒彼此无交叉反应；③7种B组蚊媒病毒之间有不同程度的交叉反应；④4种B组蜱媒病毒，除Pow外，交叉反应较广；⑤正常抗原与21种免疫腹水、正常小鼠腹水，均不出现溶血区。

综上所述，SRH查出的是组抗原，无非特异反应，其敏感性与HI相当，特异性高于HI试验，这有利于未知虫媒病毒的鉴定。

四、用TC-Ag做SRH的研究：至今，绝大多数虫媒病毒SRH试验用乳鼠脑SA-Ag，仅见委内瑞拉脑炎病毒用细胞培养的浓缩病毒抗原<sup>[3]</sup>。用NaIO<sub>4</sub>等结合剂作虫媒病毒的SRH试验未见报道。我们用JE(SA<sub>14</sub>株)、Kun

表 4

单扩散溶血与血凝抑制试验滴度比较

抗 原	未处理免疫腹水的SRH			处理的免疫腹水的SRH		H I
	抗 体	滴 度	原液腹水的溶血区直径(mm)	滴 度	1:10腹水的溶血区直径(mm)	
L I		1:20	14.8 *	1:10	9.5 *	1:10
Iiheus		1:320	15.2	1:320	10.0	1:320
Chik		>1:5120	18.0	>1:5120	15.0	1:2560
Sindbis		>1:5120	17.8	>1:5120	16.0	1:160

注: \* 溶血程度弱, 仅为“+”

Chik、Sin病毒感染C6/36细胞培养的抗原成功作了SRH试验, 从结果看出: ①TC-Ag不经浓缩可直接作SRH(常规法或NaIO<sub>4</sub>法), 其特异性与乳鼠脑 SA-Ag 同样较高, 尤其是 NaIO<sub>4</sub>法; ②从溶血区直径、溶血程度和特异免疫腹水的效价看, NaIO<sub>4</sub>后加1:5或1:10补体法结果相近; ③用人白蛋白代替小牛血清培养TC-Ag结果较好, 不同批号小牛血清结果不同。

## 讨 论

SRH的敏感性随抗原量的减少而增加。本文SRH试验用1.0ml 10%红血球加0.25ml乳鼠脑抗原, 与文献[4,5,8]相符。

对SRH最适条件的研究表明, 孵育于28℃, 用绵羊红血球较合适, 与Gaidamovich等报道[4,5]相符。郭元吉等[11]报道用流感病毒做SRH认为“后加”补体法较优。田辛等[9]报道在检测披膜病毒抗体时, 认为补体以先加法为宜。本试验表明“先加”、“后加”补体及补体浓度为1:5和1:10时SRH的敏感性、特异性相同, 从未出现羊血球自溶或非特异溶血区。“后加”补体法具有凝胶板不易长菌、铺板易于操作、制好的凝胶板可存于4℃一个月备用等优点, 特别利于现场应用。一般公认SRH测定抗体的结果与HI试验平行或较为敏感, 本文结果与此相符。SRH较HI简便、易行。但无血凝的病毒如Bunyawera未作成功SRH, 其最适条件有待进一步研究。

虫媒病毒种类繁多, 抗原性关系较复杂。已有用SRH比较几种虫媒病毒抗原性关系的

报道[1,3,4,6~9], 本文同时作了十几种虫媒病毒的交叉反应, 比较的范围广, 表明SRH的特异性高于HI试验。

我们用细胞培养的病毒首次作成功Chikungunya、Sindbis、乙脑和Kunjin的SRH试验, 其所用原材料与乳鼠脑SRH相同, 两种抗原的特异性相同, 敏感性(特异腹水的溶血区直径和效价)相近, 因而使SRH法更简便易行。

## 摘 要

经过比较研究, 虫媒病毒单扩散溶血试验的适宜条件为: 每0.1ml压积绵羊红血球需0.25ml蔗糖丙酮法制备的乳鼠脑抗原致敏; 于28℃孵育优于37℃, 绵羊红血球在此两种温度下均发生特异溶血, 而鹅红血球仅在37℃能溶血, 28℃下结果均为阴性。单扩散溶血试验的敏感性相当于血凝抑制试验。用C6/36细胞培养的病毒作抗原, 首次作成功了Chikungunya、Sindbis, 乙型脑炎和Kunjin单扩散溶血试验, 其特异性和敏感性与乳鼠脑抗原相近。用21种虫媒病毒小鼠免疫腹水与14种虫媒病毒乳鼠脑抗原做了交叉单扩散溶血试验。

## ABSTRACT

Through comparative studies, the optimal conditions for single radial haemolysis (SRH) for the detection of antibodies to arboviruses are as follows: (1) 0.1ml packed sheep red blood cells (SRBC) which were sensitized with 0.25ml sucrose-acetone suckling mouse brain antigens gave larger specific haemolytic zones than that sensitized with 0.4ml antigen. (2) The incubation temperature at 28°C was better than that at 37°C. Sensitized SRBC incorporated in gel developed specific haemolytic zones at both temperatures, whereas sensitized goose cells developed zo-

14种虫媒病毒与21种虫媒病毒免疫腹水单扩散溶血试验的交叉反应①

抗原	免疫腹水的溶血区直径(mm)																				
	Chik	Sin	May	Den-1	Den-2	Den-3	Den-4 (SA14)	JE	MVE	WN	SLE	Kun	Ihh	Lan	Abs	LI	Pow	Neg	KFD	Bun	Bat
Chik	15.2	— <sup>③</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin	—	14.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
May	—	—	11.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Den-2	—	—	—	10.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Den-3	—	—	—	—	11.0	8.3	10.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
JE(SA14)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MVE②	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
WN	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kun	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ihh	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lan②	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Abs	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pow	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：①溶血直径(mm)为2~6次试验的平均值；②冻干抗原；③“—”示无溶血区。

nes only at 37°C. Furthermore, culture fluid of C6/36 cells infected by virus was successfully used for SRH instead of using sucrose-acetone antigens, so that the procedures were largely simplified. The culture fluids of C6/36 cells infected by Japanese encephalitis (JEV), Kunjin, Chikungunya and Sindbis viruses gave results as sensitive as those given by sucroseacetone antigens. Cross SRH was performed with 21 antiarbovirus ascitic fluids and 14 arboviruses antigens. It was found that there was no cross reaction among three group A viruses, between group A and B arboviruses, and between mosquito and tick-borne flaviviruses, whereas close relationships were observed among four JEV subgroup viruses and tick-borne encephalitis complex. The extent of cross reactivity in SRH was lower than haemagglutination inhibition test and somewhat higher than complement fixation test. Having such a characteristic, SRH could be applied to the identification of newly isolated arboviruses.

### 参 考 文 献

1. Malkova D et al: Acta Virol, 27: 439, 1983
2. Väänänen P: J Virol Methods, 4(2): 117, 1982
3. Gaidamovich S Y et al: Acta Virol, 25 (1): 36, 1981
4. Gaidamovich S Y et al: Arch Virol, 64 (4): 339, 1980
5. Мелникова Е Э и.Др: Вопр Вирус., (4): 492, 1980
6. Odelola H A: Arch Virol, 60: 325, 1979
7. Duca M et al: Bull WHO, 57(6): 937, 1979
8. Гайдамович С Я и Др: Вопр Вирус., (5): 550, 1979
9. 田辛等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(1): 40, 1984
10. Väänänen P et al: Arch Virol, 52: 91, 1976
11. 郭元吉等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2 (1): 61, 1982  
(李雪东、赵桂芳同志参与制备部分鼠脑抗原, 特此致谢)