

应用免疫粘附血凝技术检测流行性出血热 病毒抗原和抗体的试验研究

董关木 罗惠容 刘文雪 陈明 俞永新

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

提 要

本文对免疫粘附血凝(IAHA)技术进行了改进并用于检测流行性出血热病毒抗原和血清效价。比较了不同毒株在Vero-E₆细胞内抗原滴度, 表明A₉株的滴度最高达1:64, 以IAHA法对出血热病人9份血清, 3份恢复期血清和家兔免疫血清6份进行了效价测定。并同时用免疫荧光(IFA)法进行比较, 结果抗体阳性率两种方法一致, 但前者的抗体滴度和增长倍数较后者高2—64倍, 以上结果表明IAHA法可代替IFA法用于出血热病人或感染动物的抗体检测。

自1978年南朝鲜李镐汪^[1]等用非疫区黑线姬鼠以间接免疫荧光法(IFA)首次分离到朝鲜出血热病毒, 随后国内外均应用IFA法检测流行性出血热病毒(EHFV)的抗原和抗体。近来, 日本学者^[2, 3]应用免疫粘附血凝技术(IAHA)检测EHFV并认为该法可用于不同来源EHF病毒的抗原性鉴别^[5]。本文应用该技术检测EHF抗原和抗体, 并对某些实验因素进行了进一步研究, 同时对家兔免疫血清及临床诊断为EHF病人血清用IAHA法及IFA法进行了对比检测。获得满意结果, 现将结果报告如下:

材 料 与 方 法

一、IAHA 试剂和方法 基本上按文献^[4]报道方法进行, 抗原和抗体稀释液用聚乙二醇-巴比妥缓冲液(PVB)或葡萄糖-明胶-巴比妥缓冲液(DGV), 内含钙、镁离子, 0.1%牛清蛋白, 0.002%明胶。人“O”型红细胞稀释液用“708”液。

二、病毒 76-118、A₉出血热病毒株, 为宋干教授提供, 沟₂(G₂)株为朱智勇大夫提供, 本实验室均用E₆细胞传代。

三、抗原制备 Vero-E₆细胞长成单层后接种10⁻²—10⁻³病毒, 37℃吸附1.5—2小时, 加含3%小牛血清的MEM维持液, 每隔2—3天换液一次, 最后一次用含0.2%牛血清蛋白的MEM。14天后将病毒培养液和细胞一起置-20℃冻融三次。离心吸取上清即为抗原。或弃去病毒培养液, 每个培养瓶(10ml/瓶)内加入3mlPVB液, 置-20℃冻融三次, 离心取上清为抗原。制备灭活病毒时于病毒液内滴加β-丙内脂(BPL), 使其最终浓度为0.1%。摇匀片刻, 用7.5%NaHCO₃调pH到7.4, 置4℃18小时, 然后放

本稿1986年5月27日收到。

37℃ 1—2 小时后, 保存于 4℃ 备用。

四、血清 病人血清来自临床诊断为流行性出血热病人的早期和晚期血清, 由姜克俭大夫提供。家兔免疫血清为本实验室自制的灭活疫苗经皮下二次免疫家兔后获得。血清处理方法同文献^[4]。

结 果

一、不同抗原、血清稀释液和不同毒株的 IAHA 效价比较:

表1 两种抗原、血清稀释液对血凝效价的比较

Table 1 Comparison of IAHA titers detected by two diluent fluids
of antibody and antiserum

稀释液 Diluent fluids	试验次数 Test times	不同毒株的IAHA滴度		
		IAHA titers of different virus strains		
		76-118	A ₂	G ₃
DGV	1	8	64	8—12
	2	16	ND	16
PVB	1	8	64	8
	2	16—32	ND	16—32

表2 用IAHA法和IFA法检测病人血清抗体效价结果

Table 2 Comparison of antibody titers of EHF patient's paired sera with IAHI and IFA

血清号 Patient's serum No.	抗体滴度 Titers of antibody					
	IAHA			IFA		
	早期 Acute- phase serum	恢复期 Convale- cant serum	增长倍数 Folds of increase	早期 Acute- phase serum	恢复期 Convale- cant serum	增长倍数 Folds of increase
1	4	128	32	8	128	16
2	<4	64	32	4	16	4
3	<4	<4	0	<4	<4	0
4	<4	<4	0	<4	<4	0
5	<4	32	≥16	<4	8	≥4
9	8	256	32	64	256	4
11	32	512	16	128	512	4
12	<4	4	0	<4	<4	0
16	<4	512	≥256	64	256	4
8	—	64	—	—	—	—
21	—	256	—	—	—	—
25	—	32	—	—	—	—
Normal 76	<4	—	—	—	—	—
Normal 9	<4	—	—	—	—	—

* The standard of judged titer of antibody was ++.

用PVB和DGV二种抗原和血清稀释液进行了血凝滴定比较，结果列于表1。结果表明，二种稀释液无多大差异，都可用于IAHA试验，抗原滴度可达8—64，但以A₆株的滴度最高。

二、IAHA法用于病人血清的抗原滴定

用A₆株病毒作抗原，固定4个单位抗原量，将血清作系列倍比稀释。同时用间接免疫荧光作比较测定，结果列于表2。表2结果可见9份双份病人血清中用IAHA和IFA二种血清测定抗体滴度均有4倍以上增长者有6份，其余3份二种方法均未增长。但用IAHA法的增长倍数明显高于IFA法2—64倍，说明前法较为敏感。单用IAHA法检查的血清亦全部有32倍以上的增长，而二份健康人血则未测出抗体阳性者。以上结果表明IAHA法可用于代替常规的IFA法。检测病人抗体作为临床诊断用。

三、家免免疫血清的抗体测定结果

我们同样用二种方法对免疫家兔血清进行了抗体检测，效价比较。结果见表3。

表3 用IAHA和IFA法检测免疫家免血清效价结果
Table 3 Antibody titers of EHFV immunized rabbit sera
tested with IAHA and IFA

动物号 No. of animals tested	抗体滴度 Antibody titers	
	IAHA	IFA
1	32	8
2	64	32
3	256	16
4	128	256
5	256	16
6	512	256
Normal 7	≤4	≤4

表3结果可见用IAHA法检测的6只家免血清效价，除一只外均较IFA法检测的高2—16倍，说明前法用于检测家免血清效价亦较敏感。

讨 论

IAHA是抗原—抗体的复合物与补体系统依次反应结合后所形成的Ag-Ab-C复合物对指示细胞的一种粘附作用。指示细胞常用“O”型人红细胞。近年来应用此技术检测EHF的抗原或抗体^[2,3]。我们参考国外文献对IAHA抗原制备方法和操作技术进行试验比较和改进。使其适用于国内的试验条件。用该方法对病人血清和动物免疫血清进行了抗体测定。试验结果说明IAHA不但可以代替IFA法，而且较其敏感。为了操作的安全我们还试验了灭活EHF抗原的制备方法。试验证明用0.1%β-丙内酯能有效地灭活EHFV而保持良好的抗原性。抗原滴度为32—64。为安全操作提供有效方法。

以上试验表明IAHA技术用于检测流行性出血热病毒抗原、抗体是一种特异、敏感的方法，尤其是方法简单、无需特殊仪器和试剂，在基层单位便于推广应用。该方法是

否可用于毒株间抗原性差异的比较以及用于灭活疫苗的抗原量测定尚待进一步试验研究。

参 考 文 献

- [1] Lee, H.W. et al., 1978, *J.Infect.Dis.* 137:298.
- [2] Sugiyama, K. et al., 1984, *J.infect.* 149:67-73.
- [3] Matsuura, Y. et al., 1984, *J.Clin Microbiol.* 23:483-485.
- [4] 顾彬昌:1978, 生物制品通讯 7(4):156-160.
- [5] Sugiyama, K. et al., 1984, *J.Infect dis.* 149, 3: 472.

DETECTING EPIDEMIC HEMORRHAGIC FEVER VIRUS ANTIGEN AND ANTIBODY BY IMMUNE ADHERENCE HEMAGGLUTINATION(IAHA) TEST

Dong Guanmu Luo Hui-rong Liu Wen-xue Chen Ming Yu Yong-xin
(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

We have modified and improved the method of immune adherence hemagglutination (IAHA) test and used it to detect virus antigen and antibody of epidemic hemorrhagic fever (EHF). We compared the IAHA titers of different strains infected in Vero-E₆ cells. The IAHA titer of A₉ strain showed to be the highest (1:64) among the three strains. 9 EHF patients' paired sera, 3 convalecant sera and 6 immunized rabbits' sera were detected with IAHA and compared with IFA. The positive rates detected by the two tests were just the same. But their antibody titers and fold increase with IAHA were 2-6 times higher than those with IFA. These experimental results indicated that IAHA could be used as an alternative of IFA to detect EHF virus antigen or antibody in the samples from patients or infected animals.