

## 影响风疹病毒血凝和血凝抑制 试验若干因素的研究

李初梅 顾方舟 陈伯权\*

(中国医学科学院基础所, 北京)

### 提 要

对大量制备高效价风疹病毒(RV)血凝素问题进行研究发现,每日更换RV感染细胞维持液可获得大量高效价血凝素。试验用Auletta液稀释血凝素、pH6.2、Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>离子浓度各0.1%时血凝滴度最高。比较两种处理血清中非特异性凝集抑制物的方法,发现高岭土法和肝素-氯化锰法结果相似。用此两种方法同时检测107份孕妇血清,结果符合率达98%。但高岭土法更为简便经济。

国外对影响RV血凝和血凝抑制(HI)试验的一些因素做过探讨和比较。但不同实验室所得结果不尽相同,有的甚至相悖<sup>[1-4]</sup>。国内这方面缺乏系统的研究报道。制备大量高效价血凝素有一定困难。戴斌等<sup>[5]</sup>曾就如何去除人血清中非特异性凝集抑制物做过研究。本文重点研究制备大量高效价血凝素问题,并对两种去除人血清中非特异凝集抑制物的方法进行了比较,结果报道如下。

### 材料与方 法

- 病毒** RV GOS株,卫生部药品生物制品检定所供给。RV血凝素(对照用),来源同上。
- 细胞** BHK<sub>21</sub>, Vero, 原代乳兔肾细胞(PRK), Hep-2。
- 溶液** 葡萄糖-明胶-巴比妥缓冲液(DGV)、生理盐水(NS)、磷酸缓冲液(PBS)、Auletta液(NS+0.1%CaCl<sub>2</sub>+0.1%MgSO<sub>4</sub>)。
- 血球** 新鲜鹅血球用Alsevers液采取并保存。使用前NS洗三遍。以DGV配成8%悬液,再用PBS配成0.25%悬液使用。
- 血清** 已知风疹阳性人血清2份,北京第二传染病院提供。风疹阴性血清1份,卫生部药品生物制品检定所提供。待检人血清107份,协和医院提供。
- 血凝和血凝抑制试验:** 均采用微量法。

\*中国预防医学科学院病毒学研究所。

本文1986年10月6日收到

## 结 果

### 一、收获RV的时间和方式与血凝素效价的关系

将同批传代的BHK<sub>21</sub>细胞分成二组, 接种RV GOS株, 接种量和病毒批号相同。一组每日收获感染细胞上清, 更换新鲜维持液。另一组不换液, 每日吸出感染细胞上清0.2ml, 比较这两种收获方式下的血凝素消长动态, 发现每日换液比不换液法的细胞维持时间长。多数情况下达7~8天, 而后者多为4~6天。每日换液血凝素出现较早, 在感染后2天便能检出, 而后者多在感染后3天方能检出。此外, 每日换液比不换液收获的血凝素效价高、量多。细胞维持时间越长, 得到的血凝素量越大, 常比不换液组多6~7倍。结果见图1。

### 二、用不同细胞制备血凝素

选传代后1~2天, 生长旺盛的BHK<sub>21</sub>、Vero、PRK、Hep-2细胞感染等量同批号病毒。4~5天收获, 制备血凝素。检测结果表明BHK<sub>21</sub>、Vero和PRK细胞均能支持RV繁殖, 产生血凝素。其中以BHK<sub>21</sub>细胞最佳。经多次重复结果相似。Hep-2细胞感染RV后不能检出血凝素。结果参见表1。

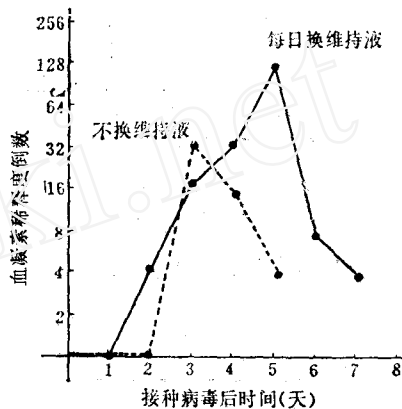


图1 RV收获时间和方式对血凝素效价的影响

Fig1 The effect of RV harvesting days and way on the titer of hemagglutinin

表1 用四种细胞制备RV血凝素的结果

Tab 1 The results of RV hemagglutinin prepared from four different cell lines

细胞	血凝素稀释度倒数								对 照			
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	P	N	RBC
BHK <sub>21</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	+++	—	—
Vero	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PRK	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hep-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

P: 阳性对照

N: 阴性对照

RBC: 红血球+血凝素稀释液

### 三、稀释液对血凝效价的影响

血凝素分别用DGV、PBS(pH7.2)、Auletta和NS液倍比稀释后测血凝效价。结果见表2。从表中可以看出, RV血凝在四种稀释液中均能凝集鹅血球。其中以Auletta液稀释血凝素时效价最高。试验重复几次, 结果一致。

Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>离子对血凝的影响尚有争议<sup>[3,4]</sup>。在上述四种溶液中, Auletta液含Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>离子浓度最高, DGV液次之, PBS和NS则不含Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>。从表3结果看, 血凝效价确

表2 稀释液对血凝试验的影响  
Tab 2 The effect of diluents on HA test

稀释液	血凝素稀释度倒数								鹅血球对照
	2	4	8	16	32	64	128	256	
DGV	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
PBS	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Auletta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
NS	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-

实有随 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 浓度升高而增高的趋势,为甄别 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 对血凝是否有影响,分别用含 $\text{CaCl}_2$ 和 $\text{MgSO}_4$ 各0.01%、0.05%和0.1%的NS液倍比稀释血凝素做血凝试验。试验结果见表3。可见血凝效价确有随 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 浓度增加而增高的趋势。

表3  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 对血凝试验的影响  
Tab 3 The effect of  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  on HA test

$\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 浓度(%)	血凝素稀释度倒数								鹅血球对照
	2	4	8	16	32	64	128	256	
0	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
0.01	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
0.05	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
0.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-

#### 四、pH对血凝的影响

用Auletta液倍比稀释血凝素,鹅血球用pH6.0~7.0的PBS液配成0.25%悬液。通过试验发现pH对血凝试验影响很大。其血凝效价在pH6.2时最高。pH6.0~6.6范围内均能凝集鹅血球。pH6.8以上则不能凝集。结果见表4。

表4 pH值对血凝试验的影响  
Tab 4 The effect of pH on hemagglutination titer

pH值	血凝素稀释度倒数								鹅血球对照
	2	4	8	16	32	64	128	256	
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
6.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
6.4	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
6.6	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 五、两种处理血清的方法对血凝抑制试验的影响。

分别用高岭土和肝素-氯化锰处理两份风疹阳性血清和1份风疹阴性血清<sup>[6,5]</sup>,然后做血凝抑制试验。结果见表5。两种方法处理血清结果相同。

用两种方法处理107份健康孕妇血清后,检测其风疹血凝抑制抗体。结果二种处理方法的符合率达98%。参见表6。

表5 两种处理人血清的方法对HIT的影响  
Tab 5 The effect of treatment of sera  
in two ways on HIT

处理方法	阳性血清	阳性血清	阴性血清
高岭土	1:80	1:640	1:8
肝素-氯化锰	1:80	1:640	1:8

HIT = 血凝抑制试验

\* 血凝抑制效价用血清稀释度表示

表6 两种血凝抑制法检测107份孕妇RV抗体的结果  
Tab 6 The results of detecting RV  
antibody in 107 serum samples with two HIT

高岭土	肝素-氯化锰		符合率
	+	-	
+	98	2	98%
-	2	0	

\* 血清标本数

符合率 =  $\frac{\text{真阳性} + \text{真阴性}}{\text{真阳性} + \text{真阴性} + \text{假阳性} + \text{假阴性}}$

## 讨 论

RV繁殖滴度较低。制备大量高效价血凝素有一定困难。我们通过实验摸索，找到了一个简便有效的制备大量高效价RV血凝素的方法：每日收获RV感染细胞上清液，制备血凝素。同时给感染细胞补充新鲜维持液，继续繁殖病毒。该法与国内普遍采用的不换液法相比，收获的RV血凝素效价高峰期大4倍，血凝素量大6~7倍，血凝素出现早，维持时间长。实验重复多次，结果相似。究其原因，可能与下面两因素有关。(1) 细胞因素。每日更换维持液使细胞生长状态较佳，因而病毒繁殖滴度较高，细胞维持时间也较长。(2) 病毒因素。每日更换维持液可及时清除灭活病毒和缺损病毒，减少它们的干扰作用，使完整病毒得以大量繁殖。及时收获释放到细胞外的病毒，还可减少在培养温度(33℃)下血凝活性的丧失。

影响RV血凝试验的因素较多。血凝素稀释液是影响因素之一。国内较多采用的是DG V液<sup>[7-9]</sup>。我们将该溶液与NS、PBS和Auletta液进行了比较，发现用Auletta液稀释血凝素效果最佳，血凝效价可比用DG V液高4倍以上。同时该溶液还具有配方简便经济的优点。进一步实验的结果表明。血凝作用与Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>有关，随着这两种离子浓度的升高，血凝效价有上升的趋势。血凝作用也受pH值的影响，pH6.2时血凝效价最高，在pH6.0~6.6范围内RV血凝素均能凝集鹅血球。

文献报道能支持RV繁殖的细胞较多<sup>[10]</sup>。从我们的实验结果看，RV感染BHK<sub>21</sub>、Vero和PRK细胞后都能产生血凝素，不过血凝素效价悬殊。用BHK<sub>21</sub>细胞制备的血凝素，其效价为后两种细胞的64倍。说明在一定实验条件下，选择适宜的细胞繁殖RV是血凝试验非常重要的一环。

戴斌等<sup>[5]</sup>曾研究过肝素-氯化锰处理血清在去除非特异性凝集抑制物方面的作用。我们将该法与高岭土处理血清法<sup>[6]</sup>进行了比较。检测二份已知人阳性风疹血清和一份人阴性血清结果相同。用于检测107份健康孕妇血清中的风疹抗体，二种处理法的符合率达98%。由于高岭土处理血清更为简便、经济，我们主张用该法去除人血清中非特异性凝集抑制物。

## 参 考 文 献

- [1] Liebhaber H, et al., 1970, *J. Immunol.* 104: 818.
- [2] Trudel M, et al., 1979, *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. A Orig.* A244: 175.
- [3] Schmidt N J, et al., 1970, *Appl. Microbiol.* 19: 491.
- [4] Auletta A E, et al., 1968, *Appl. Microbiol.* 15: 681.
- [5] 戴斌等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志, 1: 203.
- [6] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 科学出版社 p225.
- [7] 戴斌等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志, 1: 411.
- [8] 顾方舟等, 1982, 中华流行病学杂志 3(6): 321.
- [9] 韩世杰等, 1982, 山东医学院学报, 3: 5.
- [10] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术 科学出版社 p255.

## STUDY OF VARIABLES AFFECTING RUBELLA VIRUS HEMAGGLUTINATION AND HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST

Li Chu-mei Gu Fang-zhou Chen Bo-quan

(*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical  
Sciences, Beijing*)

The variables which affect the qualitative and quantitative aspects of rubella virus hemagglutination were defined. Large amount of high titered hemagglutinin was obtained by replacing the supernatant of rubella virus infected BHK<sub>21</sub> cells with fresh medium daily. The optimal result was obtained by using Auletta's buffer, pH6.2.

Kaolin and Heparin-MnCl<sub>2</sub> were employed to the treatment of serum samples in hemagglutination inhibition test. Among the 107 serum samples tested, the agreement was 98%. Kaolin treatment was simpler.