

流行性出血热病毒血凝和血凝抑制 试验的进一步研究

欧阳学农* 赵允祺

(第四军医大学二院传染病学教研室, 西安)

倪大石 沈宏开

(安徽省医学科学研究所病毒室, 合肥)

摘 要

本文对流行性出血热研究中传统采用的血凝和血凝抑制试验进行了较大改进。首次用吐温 80-乙醚法制备滴度较高的血凝素; 以鸽红细胞代替了常用的鹅血球; 采用冻存的血球替代了新鲜红细胞。

血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验^[1,2], 是检定流行性出血热病毒(EHFV)和诊断流行性出血热(EHF)的重要方法之一。但是, 目前采用的这一试验, 流行性出血热病毒血凝素(EHFV-HAN)血凝滴度较低, 并且始终要求使用新鲜的鹅血球, 给EHF的研究和诊断工作带来极大不便。我们首次采用吐温 80-乙醚法制备高滴度的血凝素, 用冻存鸽红细胞代替了新鲜鹅红细胞。现将研究结果报告如下:

材 料 和 方 法

一、病毒 流行性出血热病毒陈株系倪大石等^[3]分离。感染传代人淋巴细胞 5 天后收获, 细胞悬液作毒种^[4]。

二、EHFV-HAN 的制备 用已适应于乳鼠的 EHFV 陈株接种于鼠龄为 2~4 天的小白鼠乳鼠脑内, 待发病后于濒死状态下解剖取脑, 分别采用吐温 80-乙醚法^[5]和蔗糖-丙酮法^[6]制备血凝素。正常鼠脑同法制备。

三、血球 鹅、鸽血采自翅下静脉; 家兔血采自耳缘静脉; 豚鼠血自心脏穿刺采集; 小白鼠血球自尾静脉采集; 人“O”型血采自本院血库健康献血员。抗凝、洗涤、配制参见文献^[1]。

四、血球保存 参照夏东翔等^[1]和武士珍等^[7]的方法分别将鸽血球在 4℃ 保存及 -20℃ 冻存。

本文于 1987 年 9 月 30 日收到

*现在福州市南京军区福州总医院住院二部传染科

五、血清 4份EHF患者血清, 1985年冬季采自本院住院病人; 10份正常人血清采自本院血库健康献血员。

六、微量血凝和血凝抑制试验 采用夏东翔等^[1]建立的方法。测定冻存血球对EHFV-HAN的敏感性, 观察冻存鸽血球测定血抑抗体的效果。

结 果

一、吐温80-乙醚法制备的EHFV-HAN的特性: (一) 特异性 用EHF单克隆抗体致敏的酰化血球(南京军区军事医学科学研究所提供)检测新法获得的EHFV-HAN, 出现了较高滴度的血凝反应。此血凝素是EHFV特异性的。(二) 稳定性 该法制备的EHFV-HAN在4℃冰箱放置一个月效价未降; -20℃保存5个月(观察时间)血凝滴度无变化。(三) 与蔗糖-丙酮法的比较 将感染乳鼠脑混合后均分为两份, 分别用两种方法制备血凝素。测定其血凝滴度, 结果吐温80-乙醚法优于蔗糖-丙酮法(表1)。

表 1 两种方法制备EHFV-HAN的比较

Tab. 1 Comparison between 2 methods for the preparation of EHFV-HAN

方 法	血凝素稀释度										正常 抗原 对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		
蔗糖-丙酮法	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
吐温80-乙醚法	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-

二、动物血球种类的筛选: 选用6种动物血球, 分别保存于Alesver's液中, 经同样方法洗涤与配制。通过血凝试验测定它们对EHFV-HAN的敏感性。结果鸽血球最为敏感(表2)。

表 2 6种动物血球对EHFV-HAN敏感性的比较

Tab. 2 Comparison of HA titer among 6 sorts of erythrocytes to EHFV-HAN

血球种类	血凝素稀释度										正常 抗原 对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		
鸽血球	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
鹅血球	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
兔血球	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
豚鼠血球	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	+++
小白鼠血球	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
人“O”型血球	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-

三、冻存鸽血球与新鲜鸽血球对EHFV-HAV的敏感性测定: 将同一批血球分成两份。一份于4℃保存在Alesver's液中, 一份于-20℃冰冻保存。7天后沿用微量血凝试验同时测定两种血球对EHFV-HAN的敏感性(表3)。结果提示, 两种方法保存的血球敏感性无明显差别。

表 3 冻存鸽血球和新鲜鸽血球对EHFV-HAN敏感性的比较
Tab. 3 Comparison of the sensitivity between frozen and fresh pigeon erythrocytes to EHFV-HAN

方 法	EHFV-HAN稀释度									正常 抗原 对照
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
普通冰箱保存鸽血球	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
冻存鸽血球	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

四、冻存血球测定血凝抑制抗体效果的观察：采用HI试验，同时平行使用冻存鸽血球、新鲜鸽血球、新鲜鹅红细胞对四份EHF患者血清（经间接免疫荧光试验证实特异性IgG抗体阳性）的血凝抑制（血抑）抗体进行了测定。同时测定了10份正常血清，以资对照。结果表明，使用冻存鸽血球者血抑抗体滴度与用新鲜鸽血球者一致，但一般要高出用新鲜鹅血球者一个血清滴度（表4）。

表 4 不同来源的血球测定血凝抑制抗体滴度
Tab. 4 The HI antibodies titers of EHF patient's sera detected by erythrocytes of different sources

血清编号	新鲜鹅血球	新鲜鸽血球	冻存鸽血球
1	1:32	1:64	1:64
2	1:128	1:512	1:256
3	1:64	1:128	1:128
4	1:256	1:512	1:512

讨 论

HA和HI试验不需特殊设备，颇受基层单位重视。进一步改进本试验方法，使之更便于推广应用，乃是本研究的主要目的。

迄今为止，EHFV-HAN主要来源仍是感染的乳鼠脑。然而此种感染材料普通实验室不易得到，且由于目前采用的蔗糖-丙酮法制备的EHFV-HAN血凝滴度偏低，使EHFV-HAN供应不能满足研究和诊断工作的需要。因此，用有限的材料制备高滴度的EHFV-HAN显得尤为重要。我们采用吐温80-乙醚法制备出了高滴度的EHFV-HAN（比蔗糖-丙酮法高2个滴度），其特异性、稳定性不亚于蔗糖-丙酮法。

血球的特性决定着其本身对血凝素的敏感性，在一定程度上也决定着HA和HI试验的结果。通过血凝试验对6种动物血球进行了筛选。我们找到了一种最为敏感的血球——鸽血球，并将它用于该项研究工作。与目前文献报道使用的鹅血球相比，鸽血球不仅敏感，而且易于采集，鸽子更便于饲养。

血球保存和质量控制是HA和HI试验的重要环节。新鲜血球不易保存，各批质量差异很大。我们参照文献对鸽血球进行了冻存，并用于HA和HI试验，取得了满意的结果。

可以相信, 通过上述一系列改进工作, HA和HI 试验将会得到更为广泛的应用。

参 考 文 献

- 〔1〕 夏东翔等, 1986, 病毒学杂志 1(3): 37
 〔2〕 汤一苇等, 1984, 上海第一医学院学报 11(5): 349
 〔3〕 倪大石等, 1983, 中华医学杂志 63(2): 65
 〔4〕 沈宏开等, 1987, 安徽医学情报 1: 27
 〔5〕 陈志慧, 1984, 麻疹流行病学实验室方法 耿贯一主编: 流行病学纹章(实验室方法在流行病学中的应用) 北京人民卫生出版社 193~199
 〔6〕 陈伯权等, 1976, 流行病学防治研究 No. 2, 114
 〔7〕 武士珍等, 1987, 中华流行病学杂志 8(3): 168

Further Studies on HA and HI Test for EHF

Ou Yang Xue-nong et al

(Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated
Hospital to the Fourth Military Medical College, Xi'an)

In this paper, we have modified the HA and HI test for EHF. EHFV-HAN was made by Tween₈₀-ether method as well as by sucrose-acetone method. Higher HA titer of EHFV-HAN was obtained by Tween₈₀-ether method. The pigeon erythrocyte was most sensitive to the EHFV-HAN among 6 sorts of red blood cells. Frozen pigeon erythrocytes have been used instead of fresh goose erythrocytes.