

流行性出血热冻干致敏人O型血球的研制及其应用

董关木 刘文雪 俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京)

提 要

本文应用致敏的人O型血球研究反向间接血凝(RPHA)和反向间接血凝抑制(RPHI)⁽²⁾方法用以检测流行性出血热抗原抗体, 并试验成功用pH9.0硼酸盐水制备灭活鼠脑病毒液作为抗原。为抗原制备提供了一种简便的方法。以上RPHA法用于检测组织培养内病毒与用荧光法检测细胞内病毒抗原法结果一致, 用RPHI检测病人血清抗体效价, 特异性高, 敏感性与IFA相同。该致敏血球和抗原是冻干制品, 稳定性好、使用方便, 是一种代替荧光检测病毒抗原和抗体的良好制品。

关键词: 流行性出血热, 致敏人O型血球

自从南朝鲜李镐汪首次分离到流行性出血热病毒(EHFV)⁽¹⁾, 世界各国检测EHFV抗原和抗体主要采用免疫荧光(IFA)和酶联免疫法(ELISA)。但这些方法较复杂且需要较昂贵的仪器设备, 实验条件要求较高。国外有人用小鼠免疫腹水及其球蛋白致敏羊血球检测立谷热和克里米亚—刚果出血热病毒抗原和抗体获得敏感、简单、快速的满意结果⁽²⁾。近来国内亦有人用单克隆抗体致敏羊血球检测EHFV抗原和抗体, 获得同样满意的结果^(3,4)。我们研制了冻干致敏人O血球, 以期进一步提高特异性和敏感性, 并对抗原的制备方法进行了简化。在实际应用上取得较满意的结果。

材料与方 法

一、致敏人O型红细胞 取健康人“O”红细胞, 用1%戊二醛和甲醛经双醛化后制备成10%醛化细胞⁽⁵⁾, 致敏前用1/2万的鞣酸鞣化双醛化的血球。用生理盐水洗涤三次, 并用生理盐水恢复到10%血球备用。

取兔抗EHFV(沟)株血清经三次饱和硫酸铵和DEAE层析提纯后的IgG备用。将纯化后IgG适当稀释, 按1体积IgG和1体积2%血球混合, 37℃孵育40分钟, 然后用含1%兔血清盐水洗涤二次, 最终将血球稀释成1%浓度, 加最终含量为二分之一浓度的福尔马林, 最后将血球分别以液体形式或冻干保存。

二、EHFV抗原制备 直接将感染小鼠鼠脑用三种不同稀释液(pH9.0硼酸盐水, pH7.0磷酸

本文于1988年2月8日收到

缓冲盐水和生理盐水) 研磨后经 2000r/m 离心 10 分钟, 取上清液即为抗原, 冻于各层。临用前用 1% 兔血清盐水稀释。

三、稀释液 本试验除血球融化过程中用 pH7.4, 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液外, 其余试验均用 1% 兔血清盐水。

四、反向被动血凝 (RPHA) 和反向被动血凝抑制 (RPHI) 试验 两法均用 V 型有机玻璃板, 方法同文献⁽⁴⁾, 判断标准以血球凝集模式“++”为阳性终点标准, RPHI 以能抑制到“+”为阳性终点标准, 抗原量固定 4 μ 。每次试验前用 RPHA 法滴定。

结 果

一、RPHA 抗原制备方法的改进。以三种不同稀释液研磨 A16 株感染的鼠脑, 稀释制备为 10⁻¹ 病毒悬液。将 10⁻¹ 悬液分为二份, 一份低速离心后取上清为抗原, 另一份冻融三次 (-60°C) 后再离心取上清为抗原。三种不同稀释液制备的二份上清抗原的效价见表 1。

表 1. 不同稀释液不同方法制备的 A16 株鼠脑抗原效价
Table 1. Titers of mouse brain antigen (A16 strain) made
by different diluents and different methods

感染鼠脑 Infected mouse brain				正常鼠脑 Normal mouse brain			
pH 7.2 PBS		pH 9.0 BBS		NS		pH 9.0 BBS	
*+	**-	+	-	+	-	-	
256	ND	712	1024	64	256	16	

*+ 经冻融三次后的 10% 鼠脑上清
Supernatant of 10% mouse brain after freezing and thawing three times.

**- 不经冻融的 10% 鼠脑上清
Supernatant of 10% mouse brain without freezing and thawing.

从表 1 结果可见, 以 pH9.0 的硼酸盐水为稀释液未经冻融的鼠脑抗原效价最高, 正常鼠脑以同样方法制备的抗原则未能测出抗原效价。

为了使用安全我们又将鼠脑上清抗原进行灭活, 比较了福尔马林和 β -丙内酯对抗原效价的影响。结果见表 2。

从表 2 结果可见, 以 β -丙内酯灭活基本不影响抗原效价, 而福尔马林灭活则降低 2—3 个滴度。

为了解不同毒株能否适于作 RPHA 抗原, 我们用 G₁、LR₁、L₉₉、A₁₆ 四株病毒鼠脑按上述方法制备抗原进行比较, 结果见表 3。

从表 3 结果可看出, 4 株病毒滴度虽有差异, 但均可用于制备 RPHA 抗原。抗原效价以 L₉₉ 株最高, 其次为 A₁₆ 株。以其中三株抗原检测 4 份 EHF 病人血清均能获得相似的较高抗体效价。

表 2 不同灭活剂对A₁₁株鼠脑抗原的影响
Table 2. Influence of inactive reagents to the titers of mouse brain antigen

pH 7.2 PBS			pH 9.0 BBS			NS		
灭活前 Before			灭活前 Before			灭活前 Before		
inacti- vated	*F	**B	inacti- vated	F	B	inacti- vated	F	B
256	64	256	1024	64	1024	256	32	128

*F Inactivated with formalin. 福尔马林灭活

**B Inactivated with β -propiolactone β -丙内酯灭活

表 3 不同毒株的RPHA抗原滴度比较
Table 3. Comparison of RPHA antigen titer made by different virus strains

毒株 Virus strains	病毒滴度 Virus titers TCID ₅₀ /0.1ml	RPHA抗原效价 Antigen titers	测定血清抗体的效价 Serum Ab titers measured
G ₃	3.6	64	128 256 256 256
LR ₁	4.5	16	ND
L ₀	5.6	2048	64 128 256 256
A ₁₁	7.0	512	128 128 256 256

* 4份EHF病人血清 Sera from 4 EHF patients.

二、人“O”型致敏血球在灭活疫苗抗原量测定上的应用。

灭活疫苗的抗原量测定用补体结合和 ELISA 法均较繁琐，为了简化方法，快速出结果，我们用 RPHA 法和 ELISA 法进行了比较检查，结果列于表 4。

表 4 灭活疫苗的抗原量测定
Table 4. Antigen contents of inactivated vaccines detected by RPHA and ELISA

生产单位 manufactures	疫苗批号 batches	抗原含量 Titers of Antigen	
		RPHA	ELISA
A	87-1	8	40
	87-2	2	20
B	87-3	4	20
	87-4	2	10
C	34	32	80-160
D	87-1	64	320

从表 4 结果可以看出，RPHA 和 ELISA 法检查灭活疫苗内抗原量有平行关系。虽然

RPHA 比 ELISA 滴度较低, 但 RPHA 方法简单, 出结果快, 适用于疫苗内抗原量测定。

三、人“O”型致敏血球在检测组织培养中病毒滴度的应用。

用 A₉、A₁₀、UR 和 G₃ 株病毒经接种 Vero-E₆ 细胞后, 上清液用 RPHA, 细胞用常规的直接免疫荧光法测定病毒。其结果见表 5。

表 5 RPHA 和 IFA 测定组织培养内病毒滴度
Table 5. Sensitivity of IFA and RPHA for detecting EHF virus titer in tissue cultures

病毒稀释度 Virus dilutions	IFA				RPHA			
	A ₉	A ₁₀	UR	G ₃	A ₉	A ₁₀	UR	G ₃
10 ⁻¹	++	++	++	++	++	++	++	++
10 ⁻²	++	++	++	++	++	++	++	++
10 ⁻³	++	+	++	+	++	+	++	+
10 ⁻⁴	++	++	+	-	++	++	++	+
10 ⁻⁵	+	+	-	-	++	++	-	-
10 ⁻⁶	ND	ND	ND	ND	++	-	-	-
TCID ₅₀	5.5	5.5	4.5	3.5	6.5	5.5	4.5	3.5

表 6 用 RPHI 和 IFA 法检测病人血清抗体
Table 6. Sensitivity of IFA and RPHI for detecting EHFV antibody in paired sera from patients

血清号 No of serum	抗体滴度 Titers of Antibody			
	RPHI		IFA	
	早期 Acute phase serum	晚期 Convalescent serum	早期 Acute phase serum	晚期 Convalescent serum
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	128	-	128
4	-	16	2	4
5	32	256	8	256
6	128	512	128	1024
9	64	256	64	256
12	16	128	16	128
14	16	512	8	1024
*DG 9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
**JE 1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
***Lep 1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

* Dengue Fever 登革热病人血清
** Japanese Encephalitis 乙脑病人血清
*** Leptospira 钩端螺旋体病人血清

以上结果可见, 4株病毒用二种方法检查结果基本一致, 证明 RPHA 可以代替 IFA 法测定病毒滴度。

四、人“O”型致敏血球用 RPHI 法在临床诊断上的应用。

用 RPHI 法检测临床诊断为出血热病人的血清, 同时以 IFA 作对照。结果见表 6。

从以上结果看出, 二法检测的阳性率相同, 敏感性相仿, 特异性亦很好, 经特异性检测确定为登革热病人和乙脑病人及钩端螺旋体病人血清均为阴性, 且急性期与恢复期二法结果均有 4 倍以上增长。另外, 还作了 20 份单份 EHF 病人血清, 其中 18 例阳性, 阴阳 2 例。与 IF 法结果相同。

此外, 我们在制备单克隆抗体时检测融合细胞上清液, 共检测了 165 份样品。同时用 ELISA 作对照。除了 2 份不符外, 其余 163 份结果二法一致, 符合率为 98.8%。

讨 论

我们用人 O 型致敏血球以 RPHA 法检测 EHFV 灭活疫苗的抗原含量, 其结果虽比 ELISA 法稍低, 但结果二者有平行关系, 而 RPHA 出结果快, 操作简单, 条件易掌握, 重复性好。可用于快速检测疫苗内抗原量。用 RPHA 检测组织培养液病毒可以代替用荧光检测细胞中病毒, 将大大减少时间和节省贵重仪器设备, 便于科研和基层应用。

我们用不同毒株制备鼠脑抗原均获得满意结果并发现以 pH9.0 硼酸盐水为稀释液效果最佳。经冻融后样品反而效价下降, 是否由于病毒经冻融过程中易失活, 还是细胞破碎后释放出使抗原下降的物质所致, 有待进一步研究。

为了实验的安全性, 我们将病毒用福尔马林和 β -丙内酯灭活, 结果以后者为佳, 对抗原几乎无影响, 为制备安全的抗原提供一种良好的方法。

用 RPHI 法测定病人血清与 IFA 法相比的结果一致。而且人“O”型血球作载体在检测人血清时比动物血球作载体的非特异性少, 不必吸收处理⁽⁵⁾, 是临床辅助诊断和流行病学调查的好方法, 为无荧光显微镜和酶标设备的基层单位提供方便。

参 考 文 献

- (1) Lee, H W, et al, 1978, *J Infect Dis* 137: 298.
- (2) R. Swanepoel, et al., 1983, *Am. J. Trop. Med. Hyg* 32(3): 610-617.
- (3) 陈伯权等, 1986, *病毒学报* 2(4): 280.
- (4) 苏涛等, 1987, *病毒学报* 3(3): 288.
- (5) 俞水新等, 1978, *生物制品通讯* 7(1): 1.
- (6) 宋殿森, 1979, *免疫化学* 下册, 北京医学院微生物学教研组, P123.

Use of Antibody Sensitized Human O Red Blood Cells for Reverse Passive Hemagglutination Test (RPHA) and RPHA Inhibition Test (RPHI) for Detection of Antigen and Antibody

Dong Guan-mu Luo Wen-xue Yu Yong-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and
Biological Products, Beijing)

We have studied RPHA and RPHI test using anti-EHFV antibody sensitized human red blood cell for detecting EHF antigen and antibody. The antigen used in RPHI was successfully prepared with infected mouse brains extracted by pH 9.0 borate buffered saline (BBS), providing a method of simplicity for preparing antigen.

This RPHA test can be used for detection on antigen content of EHF vaccine instead of ELISA, and for detection of EHF virus in tissue culture fluid instead of using IF technique for detecting EHF antigen in cells.

The sensitivity and specificity of RPHI method for diagnosis of EHF patients were proved to be identical to the IF method, but the RPHI was much simpler and easier to carry out than IF.

Key Words: HFRS, Sensitized human type O red blood cells