DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.04.003

单扩溶血试验检测猪血清中流行性乙型脑炎病毒特异性抗体

朱德钟 李光平 刘启富

（微生物学教研室）

摘 要

本文报导了一种乙脑病毒的SRH试验，并用它检测了重庆地区101份猪血清中的乙脑病毒特异性抗体。经用乙脑病毒CF和HI对比研究，证明SRH比HI和CF的特异性更高（对同组病毒无交叉反应），而且在猪血清中乙脑抗体的检出率也最高（SRH 60.4%，HI 57.4%，CF 39.6%）。由于SRH简便、快速、敏感、特异，适用于乙脑感染的临床诊断和血清流行病学调查。

单扩溶血试验（single radial hemolysis SRH）自1975年Schild等[1]在流感病毒研究中创用以来，已广泛试用病毒和其他病原体感染的血清学诊断研究[5-8][10-11]，但尚未见试用于流行性乙型脑炎病毒（乙脑）的具体报导。我们于81年建立了乙脑病毒的SRH试验条件，用它检测了重庆地区猪（隐性感染）血清中的乙脑病毒抗体，并与补体结合试验（CF）、血凝抑制试验（HI）进行对比研究，结果较满意，报导如后。

材料和方法

病毒为乙脑高株，$LD_{50}10^{-7.5}$，免疫血清有抗乙脑、抗森林脑炎（森脑）及抗登革热病毒4型，分别由成都、长春生物制品所及军事医学科学院提供；抗圣路易脑炎（圣脑）病毒血清由本室自制。猪血清于1981年6月采自重庆市屠宰场。上列血清均冻存于－20℃，用前均经56℃/30分钟灭活。

CF和HI按常规方法[8][17]，HI效价＞1:20，CF效价＞1:4判为阳性。

SRH基本上按Duca等[8]，略有改进。即将感染鼠脑以pH9.0硼酸盐水（BS）制成10%脑悬液，经3000转20分钟离心沉淀取上清（即粗血凝素），再以BS稀释成含320个血凝单位（HAU）/ml的病毒液，与等量5%洗涤（用pH7.2 PBS离心洗涤）绵羊红细胞（SRBC，用pH6.0硼酸磷酸盐缓冲盐水—BPBS稀释）混匀，放4℃致敏1小时，再以PBS离心洗涤2次，其压积SRBC即为致敏SRBC。对照抗原用正常鼠脑悬液同法致敏。上述两种抗原致敏的SRBC分别加入已煮沸熔化、含有1‰NaN_3并保温在54℃水浴中的1.2%（用PBS配）琼脂糖凝胶（英国BDH）中，使最终浓度为2.5%，再加新鲜补体达最终浓度为10个恰定单位，混匀后浇注于玻板（7.5×5.0cm），此即免疫板，待其凝固后，放湿盒内4℃保存，至少可用12天。用前以3 mm外径的打孔器打孔，以塑料管加血清样本（每孔可加约10微升），

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

每样本分别加于试验的和对照的免疫板，放37℃/16—24小时后，分别观察、测量和记录试验和对照板孔周围的溶血环直径。溶血环直径＞3 mm判为阳性。两板溶血滴度相同时为阴性结果，试验板的溶血滴度超过对照板时为阳性结果。

结　果

一、SRH实验条件的选择：

1．致敏SRBC的合适病毒量：以每ml含1280、640、320及160HAU的病毒液分别致敏等量5％SRBC，使最终浓度的致敏SRBC为2.5％，补体为10个恰定单位分别制备免疫板，然后比较测定抗乙脑血清的抗体效价。结果见表1。表1表明以320～640HAU/ml的病毒量致敏SRBC效果最好。

表1　不同病毒量致敏SRBC对试验敏感性的影响

致敏SRBC的乙脑病毒量 (HAU/ml)	抗乙脑血清的稀释倍数的倒数					
	10	20	40	80	160	320
1280	7*	6	5	4	4	—
640	8	8	7	5	5	4
320	9	8	6	6	5	4
160	5	4	±Δ	—	—	—

* 为孔周溶血环直径（mm），　Δ 为溶血环模糊不清，—为不溶血

2．不同pH的SRBC稀释液(B-PBS)配制SRBC对试验敏感性的影响：用pH5.5、5.8、6.0、6.2及6.5的B-PBS分别配制5％SRBC悬液与等量320HAU/ml病毒液致敏后，使最终浓度的致敏SRBC为2.5％，补体为十个恰定单位分别制备免疫板，再比较测定抗乙脑血清的SRH效价，结果见表2。表2可见用pH5.5B-PBS配制SRBC无SRH效果，因免疫板整个呈溶血现象；pH5.8～6.5均可测出较高的SRH效价，但以pH6.0B-PBS配制SRBC为最敏感。

表2　不同pH B-PBS配制SRBC对试验敏感性的影响

SRBC稀释液的pH	抗乙脑血清的稀释倍数的倒数					
	10	20	40	80	160	320
5.5	○	○	○	○	○	○
5.8	9*	7	6	5	4	—
6.0	9	8	7	5	5	4
6.2	8	7	7	6	5	—
6.5	7	7	5	4	4	—

* 为孔周溶血环直径（mm），○为全板呈溶血

3．不同补体浓度对试验敏感性的影响：制备分别含最终浓度补体为10、5、3.3和2.5个恰定单位的免疫板，比较测定抗乙脑血清的SRH效价，结果见表3。表3表明免疫板中补体最终浓度为10～3.3个恰定单位均可，但以10个恰定单位最敏感。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

表3　不同补体含量对试验敏感性的影响

免疫板中补体△含量（恰定单位）	抗乙脑血清稀释倍数的倒数					
	10	20	40	80	160	320
10	10*	9	8	7	6	4
5	9	7	6	6	5	—
3.3	8	7	6	5	4	—
2.5	6	5	—	—	—	—

* SRH溶血环直径，△补体一个恰定单位为1:100

4．不同致敏SRBC浓度对试验敏感性的影响：制备致敏SRBC最终浓度分别为5%，2.5%和1.25%的免疫板，比较测定抗乙脑血清SRH效价，结果见表4。表4可见致敏SRBC最终浓度为1.25%～5%均可。但5%时其溶血环常不透明，而1.25%时血色过淡对比不够明显，2.5%时溶血环最易观察，而且SRH效价最高。

表4　不同致敏SRBC浓度对试验敏感性的影响

免疫板中致敏SRBC的最终浓度	抗乙脑血清稀释倍数的倒数					
	10	20	40	80	160	320
5 %	8*	7	7	5	4	—
2.5 %	10	9	8	7	6	5
1.25%	9	8	7	5	4	—

* SRH溶血环直径（mm）

5．免疫板在4 ℃保存不同时间对试验敏感性的影响：制备免疫板一批保存于4 ℃，每隔数天取出2块测定抗乙脑血清SRH效价，结果见表5。表5表明免疫板成批制成后于4 ℃保存，至少在12天内并不影响使用效果。

表5　不同保存时间的免疫板对试验敏感性的影响

免疫板在4℃保存时间（天数）	抗乙脑血清稀释倍数的倒数					
	10	20	40	80	160	320
3	9*	9	8	7	6	5
7	8	8	7	6	5	4
10	8	7	6	6	5	4
12	9	8	7	6	5	4
14	9	8	7	6	5	—
17	8	7	6	6	5	4

* 为SRH溶血环直径（mm）

6．不同个体绵羊红细胞对试验敏感性的影响：曾抽取本校及重庆市各兄弟院校饲养的绵羊血9份（其中公羊2头，母羊7头），分别制备免疫板，比较测定抗乙脑血清的SRH效价，结果未发现有何差别。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

二、SRH的敏感性和重现性

取抗乙脑免疫血清（或腹水）三份，分别用SRH，HI及CF检测抗乙脑抗体效价，结果见表6。表6说明SRH检测抗乙脑病毒特异性抗体与HI具有相同的敏感性，而比CF敏感。

表6　SRH、HI和CF检测抗乙脑抗体敏感性比较

免疫血清（腹水）	抗乙脑抗体效价		
	SRH	HI	CF
抗乙脑豚鼠血清（成生所）	1:320	1:320	1:128
抗乙脑豚鼠血清（本室）	1:160	1:160	1:64
抗乙脑小鼠腹水（本室）	1:160	1:160	1:64

在整个试验期间曾用乙脑抗原SRH前后测定成都生物研究所及本室自制的抗乙脑豚鼠血清的SRH效价共16次，各次间除在阳性范围内溶血环有大小波动外，未发现有滴度的差别，表明该试验的重现性是良好的。

三、SRH的特异性

用乙脑抗原的SRH和HI分别检测乙脑、森脑、圣脑及登革热第4型病毒的免疫血清，结果见表7。表7表明在HI中乙脑抗原对同组病毒（圣脑、森脑及登革）的三种抗血清都发生不同程度的交叉反应，而在SRH系统中，则乙脑抗原对同组其他三种抗血清均无交叉反应，说明SRH比HI具有更高的特异性。

表7　SRH与HI检测四种黄病毒抗血清的比较

抗血清	用乙脑抗原检测的抗体效价	
	SRH	HI
抗乙脑血清　（成生所）	1:320	1:320
抗圣脑血清　（本室）	—	1:160
抗森脑血清　（长生所）	—	1:10
抗登革4型血清（军科院）	—	1:160

四、SRH、HI及CF检测101份猪血清中抗乙脑病毒特异性抗体结果的比较

用上述三种试验检测101份猪血清，其抗乙脑病毒抗体的检出结果见表8。从表8可以看出：（1）抗乙脑病毒抗体的阳性检出率，SRH为60.4%（61/101）；HI为57.4%（58/101）；CF为39.6%（40/101）。表明SRH与HI的敏感性相近，而CF的敏感性则较差；(2) SRH与HI、SRH与CF检测结果的符合率分别为97%（58+40/101）及77.2%(39+39/101)，也说明SRH与HI检测结果的高度一致性；由于CF敏感性较差，SRH与CF检测符合率稍次，但在CF检出阳性的40份血清中，除1份CF低滴度（1：4）未被SRH检出外，其他全部是符合的。

SRH与HI，SRH与CF检测猪血清中抗乙脑抗体结果的相关情况见图1和图2。经统计学分析表明，SRH与HI，SRH与CF检测结果相关都非常显著（$\gamma_{HI}=0.6894$，$P<0.01$；$\gamma_{CF}=0.6747$，$P<0.01$）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

表8　SRH、HI及CF检测101份猪血清中抗乙脑病毒抗体的结果

		SRH		
		+	−	合计(%)
HI				
	+	58	0	58(57.4)
	−	3	40	43(42.6)
	合计(%)	61(60.4)	40(39.6)	101(100)
CF				
	+	39	1	40(39.6)
	−	22	39	61(60.4)
	合计(%)	61(60.4)	40(39.6)	101(100)

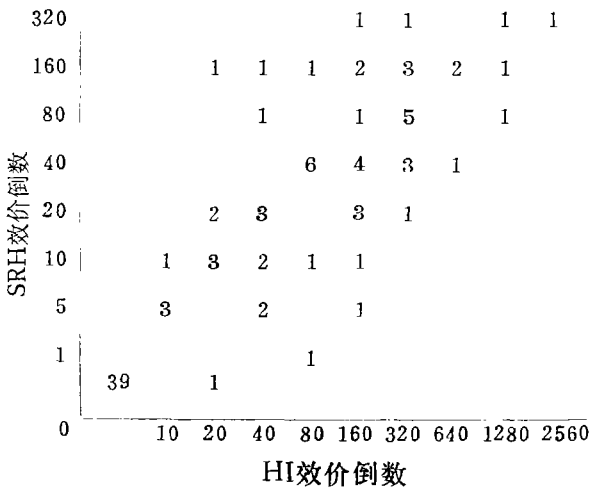


图1　SRH与HI检测101份猪血清中乙脑抗体结果

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

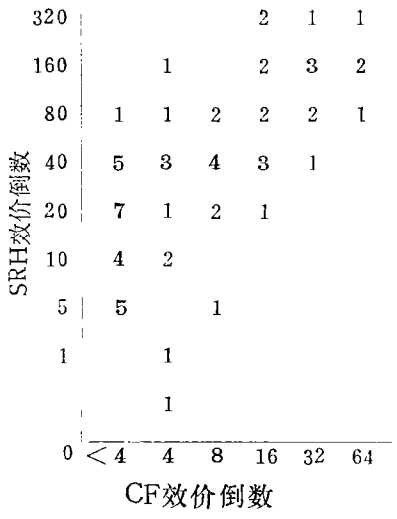


图2 SRH与CF检测101份猪清血中乙脑抗体结果

讨 论

SRH具有简便、敏感、特异和重现性好等优点已被国外学者广泛研究和应用所证实[1-7][11]，国内学者在流感病毒等研究中也已开始试用[12][13]。最近Duca等报导用西尼罗和Sindbis病毒的粗制抗原致敏1日龄小鸡红细胞制成免疫板检测同种病毒抗血清和同组异种病毒抗血清，并与HI比较，发现SRH比HI略为敏感且更为特异[8]。Gaidamovich等用乙脑和登革病毒抗原致敏红细胞的SRH检测登革热病人血清，也发现登革热病人血清用HI和CF检测与乙脑病毒抗原均有交叉反应，而用SRH检测则无交叉反应[10]。在我们的SRH特异性实验中和检测猪血清中乙脑抗体的研究中也同样证实了SRH比HI具有更高的特异性和敏感性。因此我们认为乙脑病毒的SRH可以试用于临床诊断和血清流行病学调查。

虫媒病毒的SRH国外报导需用1日龄小鸡血作为红细胞来源[8]，我们也曾试用过，但深感雏鸡血量太少，很不实用。后来我们改用SRBC代替，实验证明效果完全相同，且无绵羊个体差异。由于绵羊血来源丰富，为开展乙脑病毒的SRH研究提供了方便，也为乙脑病毒的SRH提高了实用性。

不同病毒的SRH应根据病毒不同特点探讨其最适宜的实验条件。乙脑病毒的SRH认为用pH6.0的B-PBS配制5%SRBC与等量含320HAU/ml粗血凝素致敏，使免疫板中最终浓度的致敏SRBC为2.5%，补体为10个恰定单位，琼脂糖为1.2%是比较合适的。由于人和动物血清中普遍存在低滴度的SRBC异嗜性抗体（一般＜1：5），可以产生非特异性溶血环。因此免疫板应同时制备乙脑抗原板和正常抗原板。每个标本同时滴加两种板。这样就很容易通过比较观察把非特异性溶血判明和排除。

我国乙脑流行广泛，根据各调查材料表明，在家畜家禽中以猪的乙脑隐性感染率最高（西安44%，北京27.6%、南京80%）[14-16]。我们于81年6月初在重庆市乙脑流行季节前期采取的101份猪血清中，乙脑抗体的检出率为60.4%，说明重庆地区近年猪的乙脑隐性感染率也是很高的。如在流行后期采取血清，可能阳性检出率还会更高，有待进一步研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

参 考 文 献

1. Schild GC,et al: Bull WHO 52:43,1975
2. Russell SM,et al: J Gen Virol 27:1,1975
3. Callow KA,et al: Infect Immun 13:1,1976
4. Farrohi K,et al:J Clin Microbiol 5:353,1977
5. Probert M,et al: Ibid 2:157,1975
6. Strannegard O,et al: Ibid 1:491,1975
7. Grillner L,et al: Ibid 3:86,1976
8. Duca M,et al: Bull WHO 57(6):933,1979
9. Lennete EH,et al:Diagnostic Proceedures for Viral and Ricketsial infections 4th ed 1969
10. Gaidamovich S Ya,et al: Acta Virol 24(2):153,1980
11. Lycke E,et al, J Clin Microbiol 4:450,1976
12. 中国医学科学院流研所流感组：流行病防治研究 3:162,1977
13. 郭元吉等： 中华微生物学和免疫学杂志 2(1):61,1982
14. 汪美先等： 微生物学报 4(2):357,1956
15. 张乃初： 微生物学报 5(3):340,1957
16. 李葆华等： 微生物学报 6(2)225,1958

Detection of Japanese B Encephalitis Specific Antibody in Pig's Serum with Single Radical Hemolysis

Zhu Dezhong, Li Guangping, Liu Qifu

(Department of Microbiology, The Third Military Medical College)

This paper is to report our study of using single radical hemolysis(SRH) technique to detect the specific antibody for Japanese B encephalitis(JBE) virus in 101 samples of pigs' serum at Chongqing area. It was found that SRH was more sensitive and more specific in the detection of the JBE virus antibody in the pig's serum than CF or HI. SRH is simple in its technique and easy to perform. In addition, it is very sensitive and specific and it can be reproduced easily. It is suggested that SRH be used in clinical diagnosis and in seroepidermic survey of JBE virsus infection.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne