

关于鼠痘病毒血清学試驗方法的若干探討

孙 望 楚 罗 惠 蓉

(卫生部藥品生物制品檢定所,北京)

我們在 1960—1962 年从事某些疑似“传染性肝炎病毒”和“麻疹病毒”的檢定、“双波热病毒”的傳代等工作中曾获得了三株鼠痘病毒,为了鉴别檢定,又对该病毒血清学試驗方法进行了若干探討,并找到了一些經驗,特此作一簡要介紹:

1. 血凝和血凝抑制試驗 系将 Robbins 等氏报告之改良 Salk 氏法^[1]略加改变,即在血凝抑制試驗中所用的試剂为一系列等倍稀释的灭活血清和病毒各 0.25 毫升,0.5% 鸡血球 0.5 毫升。

虽然感染鼠痘病毒的鸡胚絨毛尿囊膜,小白鼠肿胀足掌,肝、大网膜等均能与鸡血球起良好的血凝反应,但后二种标本尚能引起非特异性溶血作用,不利于血凝效价的判断,小白鼠足掌和鸡胚絨毛尿囊膜則无此作用,故較为理想。

根据鼠痘病毒豚鼠免疫血清和健康豚鼠血清分别与含有不同血凝单位(1—16)的病毒液作血凝抑制試驗結果(見表 1),証明 4 个血凝单位是一个既能排除健康血清对本病毒的非特异性血凝抑制作用,又能灵敏地反映免疫血清的特异抗体效价的实用标准,鉴于 2 个或 8 个血凝单位所得

結果也仅比 4 个单位略低或高一倍的事实,可以認為在流感病毒血凝抑制試驗中^[2],遇到病毒对照組血凝反应比 4 个单位标准相差不超过一倍的情况下所采用的糾正試驗結果的計算原則,同样也适用于鼠痘病毒。

表 2 列述了病毒-血清的作用溫度和時間对血凝抑制試驗的影响,从而可知免疫血清对本病毒的血凝抑制作用在相互接触 5 分鐘后即十分显著,至 30 分鐘时达高峯,此时 36℃ 組所得之滴度最高,長時間(22 小时)的冷溫(4°—6℃)作用,并不能使免疫血清的血凝抑制作用有进一步增强。

表 2 鼠痘病毒和免疫血清的作用溫度和時間对血凝抑制試驗的影响

受試血清	病毒和血清的作用溫度和時間		結果
3131	15°—18℃	5分	160
		30分	320
		1小时	320
		2小时	320
	36℃	30分	640
		1小时	640
		2小时	640
	4°—6℃	1小时	320
		2小时	320
		22小时	320
3130	15°—18℃	5分	320
		30分	640
		1小时	640
		2小时	640
	36℃	30分	1280
		1小时	1280
		2小时	1280
	4°—6℃	1小时	640
		2小时	640
		22小时	640

表 1 鼠痘病毒豚鼠免疫血清和健康豚鼠血清与不同血凝單位的鼠痘病毒所进行的血凝抑制試驗

受試血清		病毒和血清的作用条件	病毒血凝单位				
			16	8	4	2	1
免疫血清	A	37℃ 1小时	80	160	480	960	2560
	B	36℃ 1小时			640	1280	
	C	36℃ ½小时		240	640	1280	
	D	25℃ 1小时	120	160	320	640	2560
	B	20℃ 1小时			640	1280	
	E	5℃ 17小时	160	320	960	1920	
健康血清	a	5℃ 17小时	<10	<10	<10	10	30
	b	5℃ 17小时		<10	<10	15	
	c	25℃ 1小时		<10	<10	10	
	d	36℃ ½小时		<10	<10	15	
	e	36℃ 1小时		<10	<10	10	

本文 1963 年 1 月 11 日收到

表 3 应用各种不同的接种方法进行鼠痘病毒的中和試驗結果

試驗次數	中 和 試 驗 方 法				結果(LD ₅₀)		中和指數
	免疫血清	病 毒	接 种 方 法		對照組	試驗組	
No. 1	青島鼠腦株家兔血清	浙江株雞胚	8 日齡雞胚絨毛尿囊膜		10 ^{-3.66}	10 ^{-1.55}	128.8
			7—9克小白鼠	腦 腔	10 ^{-3.5}	≥10 ⁻⁵	≤3.2
				腹 腔	≥10 ⁻⁸	10 ^{-1.25}	≥56230
No. 2	同上	青島株小白鼠腦	7—9克小白鼠	腹 腔	≥10 ^{-6.5}	10 ^{-2.88}	≥18620
				足掌皮下	10 ^{-2.5}	10 ^{-2.5}	1000
No. 3	青島株豚鼠血清	同 上	7—9克小白鼠	腹 腔	10 ^{-5.8}	10 ^{-2.5}	1000
				腦 腔	10 ⁻¹	10 ^{-8.8}	1.6
No. 4	北京EV株家兔血清	浙江株之小白鼠	10—12克小白鼠	腹 腔	10 ^{-3.17}	10 ^{-2.23}	871000
				靜 脉	10 ^{-6.65}	≤10 ^{-1.5}	≥141300
				腹部皮下	10 ^{-5.27}	≤10 ^{-1.5}	≥5888
			同 上	腦 腔	10 ^{-5.97}	10 ^{-2.84}	676.1
				同 上	足掌皮下	10 ^{-3.25} (10 ⁻³)*	10 ^{-2.32} (10 ⁻⁴)*
No. 5	同上	浙江株雞胚	7 日齡雞胚	卵黃囊	10 ⁻⁴	10 ^{-0.88}	148000
				絨毛尿囊膜	10 ⁻⁵	10 ^{-3.87}	21.4
				尿囊腔	10 ⁻⁴	10 ^{-2.15}	7.1
			浙江株小白鼠肝	10—12克小白鼠腹腔		10 ^{-8.88}	10 ⁻⁸

* 括号內数字系指 ID₅₀ 及由此而获得之中和指數。

表 4 各种鼠痘病毒抗原与其免疫血清所
作的补体結合試驗

試驗結果		血清抗 体效价	病毒抗 原效价	正常抗原 与血清之 非特异性 反应
血清	抗原			
豚鼠	尿囊膜	32	2	≥16
	尿囊液	<16	<1	<8
	鼠腦	<16	<1	<8
	鼠肝 3 *	256	2	<8
	鼠足 1 *	256	2	<8
家兔	尿囊膜	32	2	≥16
	尿囊液	<16	<1	<8
	鼠腦	16	2	≥16
	鼠肝 3	64	2	16
	鼠肝 4	64	2	<8
	鼠肝 5	64	2	<8
	鼠足 1	128	2	16
	鼠足 2	128	2	16
	鼠足 3	128	2	<8
小白鼠	鼠肝 3	16	2	8
	鼠肝 4	16	2	<8
	鼠足 1	64	2	8
	鼠足 3	64	2	<8

* 抗原右边之数字指溶化次数。

II. 病毒中和試驗

系按病毒稀释,血清定量的常規法操作,以被接种之 7—12 克小白鼠(观察 14 天)或 7—8 日齡鸡胚(观察 10 天)是否能免于死亡作为判断病毒是否被血清中和之指征。

从表 3 列述的 5 次試驗結果可知血清-病毒混合物的接种方法对中和試驗結果有很大影响,即用小白鼠腹腔(0.03 毫升/只)、足掌皮下(0.03 毫升/只)、鸡胚絨毛尿囊膜(0.2 毫升/只)、尿囊腔(0.2 毫升/只)等接种途径均不能灵敏地反映免疫血清对本病毒的中和作用。而小白鼠腹腔(0.1 毫升/只)、静脉(0.2 毫升/只)、腹部皮下(0.1 毫升/只)及鸡胚卵黃囊(0.3 毫升/只)注射等試驗組則呈現了良好的抗体效价,尤以小白鼠腹腔法之操作簡便,敏感性強等优点曾得到多次試驗的証实而值得推广。

小白鼠体重对中和試驗也有一定影响,根据体重为 7—9 克、10—12 克及 13—15 克三組小白鼠的試驗結果,发现以 10—12 克組获得之中和指

数最高(213800)、13—15 克次之(21380),7—9 克最差(5370)。

III. 补体結合抗原的制备和选择 将感染鼠痘病毒的鸡胚尿囊液,絨毛尿囊膜(按一个膜加 2 毫升生理盐水制成悬液,置 -26°C — -30°C 低温冰箱和室温反复冻化三次,继以 2000—3000 轉/分沉淀 30 分钟,吸取上清液)、小白鼠脑(用生理盐水制成 20% 悬液,冻化三次)、肝(用生理盐水制成 20% 悬液,冻化 3—5 次)和肿胀足掌(按一个足掌加 2 毫升生理盐水制成悬液,冻化 1—3 次)等 5 种材料及其相应的正常組織制成之抗原,分別与本病毒的家兔、豚鼠和小白鼠免疫血清进行旨在同时测定抗原和抗体效价的重迭式补体結合

試驗(按总量为 0.6 毫升的方法操作),从表 4 可知鸡胚尿囊液、絨毛尿囊膜和鼠脑三种抗原均无明显的特异性反应,冻化一次的鼠足和冻化 3 次的鼠肝抗原与豚鼠免疫血清有高度特异性反应,冻化 3 次的鼠足抗原和冻化 4 次的鼠肝抗原与家兔和小白鼠免疫血清作試驗时也能获得同样良好的結果,尤以鼠足抗原之顏色純淨,制备簡便等优点更有利于实际应用。

参 考 文 献

- [1] Robbins, F. C. *et al.*: *J. Immunol.*, **61**: 235—242, 1949.
- [2] 流行性感胃手册, P.91, 人民卫生出版社, 1959.