

# 森林脑炎室溫补体結合試驗及其应用

李申德

白 峯

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京) (内蒙古传染病研究所, 呼和浩特)

申 三 乐

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

补体結合試驗在森林脑炎血清学诊断方法中, 是一种較简单而可靠的方法。我所有研究人員, 自 1957 年以来已对该方法中几个关键性問題作了研究。苏联学者已利用补体結合試驗对森林脑炎疫区中人群进行較广泛的血清学調查<sup>[1]</sup>, 并开始把它应用于自然疫源地調查, 借以检查野生动物和鳥类的血清或脏器浸液中的抗体<sup>[2]</sup>。而在我国, 其应用一般尚未超出临床诊断及病毒学研究的范畴, 在疫源地調查中尙少应用。

本实验的目的是进一步簡化并改进森林脑炎补体結合試驗方法, 使能适应現場調查的需要。这里着重探討以下两个問題: (1) 反应温度和時間对試驗敏感性的影响; (2) 检查免疫动物脏器浸液內抗体的方法。

## 材 料 与 方 法

**毒株** 主要采用森林脑炎病毒“Софьян”株, 同时还采用了几株国内分离的毒株(№ 379、№ 160、№ 410)。

### 抗原

(1) 粗制鼠脑抗原 以上述毒株感染 9—12 克小白鼠, 选择典型发病的小白鼠, 解剖取脑。鼠脑研磨后加入磷酸盐緩冲盐水 (pH7.4), 制成 10% 鼠脑悬液, 9,000 轉/分离心沉淀 10 分钟, 取上清液作为抗原。另取未感染病毒的健康小白鼠脑, 按同法制成抗原(正常鼠脑抗原)作为对照。

(2) 組織培养抗原[仅应用于实验(四)] 将森林脑炎病毒“Софьян 株”接种于初代鸡胚单层細胞培养, 感染后 5 天取出培养液, 經 1500 轉/分离心沉淀 5 分钟, 取上清液作抗原。

### 抗体

(1) 小白鼠免疫血清 以森林脑炎“Софьян”毒株按 Casals 法<sup>[3]</sup>对小白鼠进行腹腔免疫。为了获得較低效价的血清, 我們將采血日期提前至初次免疫后的第 16 天及第 20 天(原法为第 30 天采血)。血清在每次試驗前稀釋成 1:2, 然后加溫 62℃ 30 分钟灭能。

(2) 小白鼠免疫腹水抗体 实验中所采用的高价特异性抗体均系小白鼠免疫腹水抗体 (因为它可以大量制备)。制备方法如下<sup>1)</sup>: 以感染“Софьян”毒株的鼠脑及健康鼠脑悬液分别免疫小白鼠[免疫方法同(1)], 初次免疫后第 21 天腹腔接种 0.5 毫升 Ehrlich 腹水瘤細胞悬液, 再經過 10 天抽取腹水, 經 3000 轉/分离心沉淀 15 分钟后取上清液, 即为腹水抗体。腹水抗体在每次試驗前均經 60℃ 30 分钟加溫灭能。

(3) 免疫小白鼠的脏器浸液 以森林脑炎病毒“Софьян”株按 Casals 法免疫一批小白鼠, 于免疫后

1) 本法系我所刘汉明等同志首次提出的。

本文 1963 年 9 月 14 日收到。

第 16 天及第 20 天分別杀死 3—5 只,取出肝、脾、心脏分別放置于乳鉢中研碎,加入 pH 7.4 磷酸盐緩冲盐水制成 10% 脏器悬液,在 60℃ 水浴中加温 30 分钟,以 3000 轉/分的速度离心沉淀 10 分钟,其上清液即为脏器浸液。

紅血球悬液浓度为 1.5%,溶血素按 Нарцисов<sup>[4]</sup> 法制备,补体为三只以上雄性豚鼠(400—500 克)血清的混合物。各种成分均以 pH 7.4 磷酸盐緩冲盐水进行稀释。

补体結合試驗方法采用 Casals 等法<sup>[5]</sup>。溶血素用量采用 10 单位。抗原、抗体与补体三者結合的条件分室温結合(18—22℃)及冷結合(4℃)两种。

## 試 驗 結 果

### (一) 不同結合溫度和不同結合時間对抗体效价的影响

抗原用 1:4 稀释的 Софьин 鼠脑抗原和正常鼠脑抗原(相当二个单位),抗体用 Софьин 免疫腹水及正常腹水,按 2 倍稀释法連續稀释。結合溫度分室温結合与冷結合两种,每种結合溫度又随結合時間不同而分成若干組,實驗中还設置了相应的抗补体对照及非特异結合对照,實驗結果見表 1。結果表明,随着結合時間的延长,抗体的效价逐漸上升,而室温結合各組的抗体效价普遍高于冷結合組,其中尤以室温結合 24 小时的效果为佳,此时抗体效价达 1:32,而冷結合組相同時間的抗体效价仅达 1:8,由此可見,室温結合的敏感性高于冷結合,而結合時間則以 24 小时为宜。如把室温結合的結合時間延长至 48 小时,则在抗原抗补体对照管中开始出現“++”阳性,这样在讀取試驗結果时就会发生困难。

为了观察补体在室温下是否被破坏,我們还做了几份无抗原、抗体参加的补体滴定,与試驗組同样放置于室温,然后在不同時間(試驗开始时及 24、48、72 小时后)加入溶血素,結果:試驗开始时及 24 小时后,补体效价均为 1:37.5;48 小时后降至 1:33;72 小时后降至 1:30,可見补体效价在 24 小时內无明显下降。

### (二) 不同結合溫度、不同溶血素单位的比較試驗

試驗中采用两种溶血素浓度(3 单位及 10 单位),抗原用 Софьин 鼠脑抗原及正常抗原,抗体用 Софьин 免疫腹水。結合溫度仍分室温及冷結合两种,結合時間根据实验(一)結果,在本实验及以后实验中均固定为 24 小时。實驗結果見表 2。由表 2 可看出,室温結合的敏感性高于冷結合,另外,应用不同单位溶血素对試驗本身无影响,但采用 10 单位溶血素可节省补体用量。

### (三) 用不同結合溫度检查低免疫小白鼠血清及脏器浸液中抗体的比較試驗

制备血清和脏器浸液的方法如前所述,抗原用 Софьин 鼠脑抗原。試驗設置方法同实验(一),結果見表 3。

結果再次表明,室温結合的敏感性高于冷結合。免疫后 16 天小白鼠的心脏和肝脏浸液,用冷結合法检查不出抗体,而用室温結合法则能检出 1:2 阳性。

### (四) 用不同結合溫度检查不同来源材料中抗原效价的比較試驗

抗原采用以不同地方毒株制成的粗制鼠脑抗原及 Софьин 組織培养抗原,抗体采用 Софьин 免疫腹水。試驗中抗体浓度固定为 1:4 (含二个单位),抗原則作 2 倍連續稀释,結果見表 4。試驗中正常鼠脑抗原(1:2 稀释)与 Софьин 免疫腹水有輕度非特异結合,但稀释至 1:4 即呈阴性,故对試驗影响不大。

表 1 不同结合温度、不同结合时间对抗体效价的影响

結合溫度	結合時間 (小時)		4				8				16				24				48				72			
			4	8	16	32	64	鹽水	4	8	16	32	64	鹽水	4	8	16	32	64	鹽水	4	8	16	32	64	鹽水
抗原	抗体稀 釋度	4	++	+++***	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Софьян抗原 (1:4) 正常抗原 (1:4) 鹽水**	Софьян抗原 (1:4) 正常抗原 (1:4) 鹽水	4	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

\* 此纵行中各管均以盐水代替抗体,作为抗原抗体对照。

\*\* 此横行中各管均以盐水代替抗原,作为抗体抗体对照。

\*\*\* 不溶血程度在“+++”或以上者,定为阳性。

表 3 用不同结合温度检查低免疫小白鼠血清及脏器浸液内抗体

采取日期	第 16 天		第 20 天	
	室温	冷	室温	冷
结合温度	1:24	1:12	>1:32	>1:32
血清	1:2	—	1:4	1:2
心脏	1:2	—	未做	未做
脾脏	未做	未做	未做	—*
肝+脾	未做	未做	1:2	—*

表 2 不同温度、不同溶血素单位的比较试验

溶血素补体滴度(单位)定结果	抗体效价	
	室温	冷结合
3	1:27	1:32
10	1:33	1:32

表 5 在不同温度下增加待检材料用量对试验敏感性的影响

血清用量(毫升)	血清效价	
	室温结合	冷结合
0.1	1:128	1:64
0.3	>1:256	未做
0.5	抗补体	未做

表 4 用不同结合温度检查不同来源材料中抗原效价

结合温度	抗原效价		Coomb's 组织培养抗原		正常鼠脑抗原	
	№ 379	№ 160	№ 410	№ 410	№ 410	№ 410
室温	>1:16	>1:16	>1:16	1:8	1:2	1:2
冷	>1:16	1:8	1:4	1:2	1:2	1:2

### (五) 在不同結合溫度下增加待檢材料用量的比較試驗

試驗中採用 Софьин 鼠腦抗原, 待檢材料系免疫後 20 天的 Софьин 小白鼠免疫血清。試驗方法與實驗(一)基本相同, 但按血清用量不同分成三組, 各組血清用量分別為 0.1、0.3 及 0.5 毫升。由表 5 可看出, 如把血清用量由 0.1 毫升增加至 0.3 毫升並採用室溫結合法, 則血清抗體效價可高達 1:256 以上, 但如血清用量增至 0.5 毫升, 則抗原抗補體對照管出現不溶血現象, 以致不能讀取結果。

## 討 論

森林腦炎病毒的補體結合試驗在文獻中一般均採用冷結合法<sup>[3,6,7]</sup>。但 Леви 等<sup>[8]</sup>指出, 蟬傳腦炎、鳥疫等病毒的補體結合試驗, 以室溫下結合 3 小時為宜; 周明先等<sup>[9]</sup>指出, 在乙型腦炎補體結合試驗中, 如將結合時間延長至 42 小時, 則可提高試驗的敏感性。可見結合溫度及時間均可影響試驗的敏感性。我們的試驗證明, 在室溫(18—22℃)下結合 24 小時對森林腦炎病毒較為適宜, 此時試驗的敏感性可比冷結合同樣時間提高 1—3 倍。鑑於補體效價在室溫下放置 24 小時後無明顯下降, 所以我們認為敏感性增高似乎不是由於補體部分破壞, 而是由於反應溫度增高, 促使抗原、抗體及補體之間的特異性結合更為完全所致。

為了進一步提高試驗的敏感性, 可採用室溫結合與待檢材料增量法<sup>[10]</sup>相結合的方法。實驗證明, 如把血清用量由 0.1 毫升增至 0.3 毫升, 並用室溫結合法進行檢查, 則抗體效價可高達 1:256 以上, 這在我們以往的試驗中是罕見的。

在自然疫源地調查中, 常通過測定野生動物體內特異性抗體的方法來了解森林腦炎病毒在自然界的分布和循環情況, 但捕獲的動物往往是死的, 不能抽取血清, 故 Загоркина 等<sup>[2]</sup>提出檢查臟器浸液中抗體。我們的實驗證明, 臟器浸液中抗體效價遠遜於血清, 而用室溫結合法獲得陽性的可能性比冷結合法大。製備臟器浸液的材料可採用心臟或肝臟。由於我們採用的臟器材料不作洗滌處理, 故浸液中抗體有可能來自血液。最後值得一提的是, 室溫補體結合試驗不須冰箱設備, 故適用於現場調查研究。

## 結 語

(1) 本文對在室溫(18—22℃)及 4℃ 條件下進行森林腦炎補體結合試驗作了比較。發現在 18—22℃ 室溫下結合 24 小時較為適宜, 此時試驗的敏感性比在 4℃ 結合相同時間提高 1—3 倍。

(2) 室溫結合配合待檢材料增量法可進一步提高試驗的敏感性。

(3) 用室溫結合法檢查免疫實驗動物臟器浸液中的抗體, 獲得初步成功。

## 參 考 文 獻

- [1] Львов, Д. К.: Мед. Паразитол. и Паразитар. Бол., (3):318, 1959.
- [2] Загоркина, Т. Н., Наумов, С. Л.: Мед. Паразитол. и Паразитар. Бол., (4):463, 1959.
- [3] Casals, J. et al.: J. Exp. Med., 79:45, 1944.
- [4] Нарцисов, И. В.: 引自 A. K. 舒勃拉采:实用病毒学简明教程, 95 頁, 人民卫生出版社, 北京, 1957.
- [5] Casals, J., Olitsky, P. K.: Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections, p. 57, 1949.
- [6] Тюшняков, М. К. и др.: Вопросы вирусологии, (2): 204, 1960.

- [7] Мельникова, Е. Э. и др.: *Вопросы вирусологии*, (2):158, 1964.  
[8] Леви, М. И. и др.: *Acta virologica*, 4(6):348, 1960.  
[9] 周明先等: 微生物学报, 6(1):58, 1958.  
[10] Смородинцев, А. А.: 引自 A. K. 舒勃拉采: 实用病毒学簡明教程, 111 頁, 人民卫生出版社, 北京, 1957.

## MODIFIED COMPLEMENT FIXATION TEST FOR TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND ITS APPLICATION

LI SHEN-TEH

(Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Chinese Academy of Medical  
Sciences, Peking)

BAI FUONG

(Institute of Infectious  
Diseases, Hohokoto)

SHEN SEN-LWO

(Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Chinese Academy of Medical  
Sciences, Peking)

This study was designed with the view to develop a technique that would make the complement fixation test of Tick-borne encephalitis suitable for field investigations.

In comparison with the complement fixation test for Tick-borne encephalitis that is usually carried out at 4°C ("cold fixation"), we found that this test performed at room temperature (18—22°C) would show an enhancement of its sensitivity to 2—4 folds. The optimal time for fixation in our tests was found to be 24 hours. Aside from this, we also found that a combination of the method of fixation at room temperature and the increase in the quantity of materials to be examined would further improve the sensitivity in detecting antibodies in these materials.

It was proved to our satisfaction that antibodies contained in the organs of immunized animals could be demonstrated by means of the complement fixation test under room temperature. Heart or liver of infected animals from which antibodies were extracted was proved to be suitable for this test.