

# 流行性乙型脑炎组织培养中和试验方法研究

王 用 楫

(北京生物制品研究所, 北京)

1. 组织培养中和试验可以先将血清、病毒、维持液混合, 然后一次加到细胞瓶中, 简化操作, 可节省人力、物力。2. 在血清稀释的中和试验中, 可使用乙脑 P<sub>1</sub> 株鼠脑病毒, 合适的病毒稀释度为  $10^{-7}$ , 试验后第 5—6 日即可判定结果。3. 病毒稀释、血清稀释两种组织培养中和试验方法都可用于测定乙脑抗体, 所得到的中和指数与中和效价, 在强度上与小鼠脑内法所得到的中和指数是可比的。4. 血清稀释这个组织培养中和效价法, 已证明适用于测知乙脑活疫苗免疫豚鼠、马匹、儿童血清中的乙脑中和抗体水平。

为测知抗流行性乙型脑炎(乙脑)的中和抗体, 一般都是采取小鼠中和试验法。这个方法不但需用大量小鼠, 而且还必需有饲养小鼠的人员、房屋、设备。已知乙脑病毒对地鼠肾细胞能规则地引起病变<sup>[1]</sup>。这就为在试管中做乙脑中和试验提供了条件。从节省人力物力的愿望出发, 1969 年后半年来曾从事于乙脑组织培养中和试验工作。这里报告这项工作中方法学方面的一些试验结果。

## 材料和方法

### 一、血清

选用自然界获得乙脑中和抗体的牛血清及乙脑活疫苗免疫的豚鼠、马和儿童血清。

### 二、病毒

使用乙脑 P<sub>1</sub> 株鼠脑病毒或组织培养传代病毒作为攻击毒。鼠脑病毒具有毒力高, 毒力稳定, 病变出现早等优点。因此, 除注明者外, 组织培养中和试验结果都是用鼠脑病毒得到的。

### 三、小鼠脑内注射中和试验

同以往报告<sup>[2]</sup>, 但血清病毒混合液不经 37℃ 孵育。

### 四、组织培养病毒稀释法中和试验

方法和中和指数计算同小鼠脑内注射中和

试验。唯以青霉素瓶培养地鼠肾细胞代替小鼠, 每个病毒稀释度用两瓶细胞, 据特异性病变出现与否判定结果。

### 五、组织培养血清稀释法中和试验

血清两倍连续稀释; 病毒定量, 使用 32(10—100) 个 TCD<sub>50</sub>。其余同病毒稀释法中和试验。

## 结果和讨论

### 一、组织培养中和试验

1. 血清-病毒混合液、维持液加至细胞先后次序的比较

乙脑中和试验的操作, 一般是先将血清与病毒液在试管内等量混合, 然后接种小鼠。在地鼠肾细胞上作中和试验, 血清、病毒与维持液, 都要加至细胞瓶内, 这里就存在先加血清-病毒混合液或先加维持液的差别。

先加血清-病毒混合液, 似乎比较合理, 血清、病毒可以直接与细胞接触, 后才加维持液。这种先加血清-病毒混合液, 后加维持液的操作次序, 称为分加法。

在先加维持液、后加血清-病毒混合液的情况下, 血清-病毒混合液实际上是经维

本文 1973 年 12 月 4 日收到。

持液稀释后才与细胞接触的。这与血清、病毒在细胞瓶外先与维持液混合均匀,然后将血清、病毒与维持液的混合液加至细胞瓶,是相同的。这种血清、病毒与维持液预先混合,然后加至细胞瓶内的操作次序,称为混加法。

混加法操作比分加法简单,可以节省操作时间,省用玻璃器具,但不知能否得到与分加法相似的结果。为解答这一问题,我

们使用已知中和抗体阳性牛血清与 P<sub>3</sub> 鼠脑病毒、组织培养病毒分别进行分加、混加操作方法的比较。为加深两种方法的差异,在分加法操作中血清-病毒混合液加至细胞以后,不即刻加入维持液,而是在室温中平置 1 小时,然后才加维持液,以增加血清-病毒混合液与细胞接触的时间。

两种方法比较结果见表 1。血清稀释不同浓度与鼠脑病毒或组织培养病毒试验

表 1 混加、分加两种方法中和试验比较

血清稀释	P <sub>3</sub> 鼠脑病毒试验结果				组织培养传代病毒试验结果			
	混 加 法*		分 加 法*		混 加 法		分 加 法	
	TCD <sub>50</sub>	指 数	TCD <sub>50</sub>	指 数	TCD <sub>50</sub>	指 数	TCD <sub>50</sub>	指 数
10 <sup>0</sup>	1.0	320,000	1.0	100,000	1.5	3,200	1.0	32,000
10 <sup>-1</sup>	2.5	10,000	2.5	3,200	3.0	100	3.5	100
10 <sup>-2</sup>	6.0	3.2	5.5	3.2	5.0	1.0	5.0	3.2
10 <sup>-3</sup>	6.0	3.2	5.5	3.2	5.5	0.32	5.0	3.2
对 照	6.5	—	6.0	—	5.0	—	5.5	—

\* 混加法: 1 份血清+1 份病毒液+8 份维持液制成混合液,以此混合液 1.0 毫升加至地鼠肾细胞青霉素瓶内。  
分加法: 先将血清、病毒液混合加 0.2 毫升至地鼠肾细胞青霉素瓶内,室温平置 1 小时,然后加维持液 0.8 毫升。

所得到的中和指数来看,两种方法结果基本一致。10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 两组由于血清稀释过高,用两种病毒试验,都不能测知中和作用。10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup> 两组用鼠脑病毒试验得到的指数较大,似与鼠脑病毒滴度高于组织培养病毒有关。

由于两种方法所得到的中和指数基本一致,以下试验全部采用混加法。

试验证明,三种成分混合次序,并不影响试验结果。为简化操作,可采用病毒与维持液先混合,而后加至血清的操作程序。

## 2. 病毒稀释、血清稀释中和试验比较

血清、病毒的中和试验有两种方法。一种是病毒稀释、血清固定;另一种是血清稀释、病毒固定。前者用于病毒毒力变化范围较广时,以中和指数表示血清中和抗体的强度;后者在病毒毒力比较恒定的情况下应用,以血清效价(滴度)表示中和抗

体强度。

为了解上述两种方法在乙脑血清中和乙脑病毒所表现的相互关系,我们使用阳性牛血清与 P<sub>3</sub> 鼠脑病毒同时适当稀释,交叉进行中和试验。每个相应病毒、血清稀释度各接种地鼠肾细胞青霉素小瓶两瓶,结果见表 2。

表 2 病毒稀释、血清稀释两种中和试验方法比较

血清稀释	P <sub>3</sub> 鼠脑病毒稀释					滴度 TCD <sub>50</sub>	中和指数
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>		
未稀释	++	--	--	--	--	5.5	3,200
1:2	++	--	--	--	--	5.5	3,200
1:4	++	++	+-	--	--	7.0	100
1:8	++	++	++	+-	--	8.0	10
1:16	++	++	++	++	--	≥8.5	≤3.2
1:32	++	++	++	++	--	≥8.5	≤3.2
病毒对照	++	++	++	++	+-	9.0	
中和滴度	0	1:2	1:4	1:8			

表 2 数据表明: (1) 从血清不同稀释度判定中和指数, 未稀释与 1:2 两组血清的  $TCD_{50}$  均为 5.5, 中和指数均为 3,200, 表明这两组血清都具有较强的中和能力; 1:16 与 1:32 两组血清都未显出中和病毒的作用(中和指数  $\leq 3.2$ ); 1:4 与 1:8 两组血清显示有不同程度的中和能力(中和指数分别为 100, 10)。

(2) 从病毒不同稀释度来判断血清的中和效价: 用  $10^{-5}$  病毒时, 由于病毒量过大, 未能测出中和作用(效价为 0), 即便是未稀释的血清亦不能阻止细胞病变的产生。 $10^{-5}$  病毒分别与未稀释及 1:2 血清混合试验的各两瓶细胞, 虽然都出现病变, 但未稀释血清试验的两瓶细胞, 如与 1:2 的比较, 在病变发展时间, 病变严重程度都有明显不同。未稀释血清的病变发展较迟, 程度轻微; 1:2 病变出现较早而且严重。当采用  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  的病毒量试验时, 得到的血清中和效价依次为 1:2、1:4、1:8。这表明病毒用量愈大, 得到的血清效价愈低。为得到较高的血清效价, 为提高中和试验的灵敏程度, 病毒用量愈小愈好, 但必须使病毒对对照瓶的细胞产生病变。

(3) 1:2 血清能阻止  $10^{-6}$  病毒引起病变, 使用病毒(对照)的毒力滴度( $TCD_{50}$ )为  $10^{-9}$ , 即 1:2 血清能阻止以千计的  $TCD_{50}$  引起病变。这表明在血清稀释中和试验中 1:2 血清中所含的中和效价, 相当于病毒稀释中和试验法得到的以千计的中和指数。同样 1:4、1:8 稀释的血清能阻止  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  病毒所引起的病变。由于使用病毒(对照)的毒力( $TCD_{50}$ )达  $10^{-9}$ , 则  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  稀释度的病毒, 相当于以百计和以十计的  $TCD_{50}$ 。由此, 可以认为 1:4、1:8 血清中所含的中和效价, 相当于百位计、十位计的中和指数。换句话说, 即中和效价差两倍相当于中和指数相差十倍。

### 3. 病毒用量与效价判定时间比较

为提高中和试验的灵敏程度, 为得到较高的血清效价, 病毒用量与效价判定时间是两个可变的重要因素。用阳性牛血清经 1:2、1:4、1:8 稀释, 与 P<sub>3</sub> 鼠脑病毒  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  四个稀释度, 交叉进行了中和试验, 试验开始后第 3 日起逐日观察细胞病变。细胞病变结果, 判定时间, 中和效价列为表 3。

表 3 病毒稀释度不同、判定时间不同中和试验结果

病毒 稀释度	判定 时间	对照管 病变	血 清 稀 释 度			中和效价
			1:2	1:4	1:8	
$10^{-4}$	第 4 天	++	--	++	++	1:2
	第 5 天	++	++	++	++	0
	第 6 天	++	++	++	++	0
$10^{-5}$	第 4 天	++	--	--	--	$\geq 1:8$
	第 5 天	++	++	++	++	0
	第 6 天	++	++	++	++	0
$10^{-6}$	第 4 天	--	--	--	--	未能判定
	第 5 天	++	--	--	+-	1:8
	第 6 天	++	++	++	++	0
$10^{-7}$	第 4 天	--	--	--	--	未能判定
	第 5 天	++	--	--	--	$\geq 1:8$
	第 6 天	++	--	++	++	1:2
$10^{-8}$	第 4 天	--				
	第 5 天	--				
	第 6 天	++				

由表 3 可以看出: (1) 当病毒用量为  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  时, 对照病毒细胞第 4 日才出现病变, 此时才能判定结果, 血清中和效价分别为 1:2 和  $\geq 1:8$ ; 至第 5、6 日细胞全部出现病变, 表明全无中和效价。(2) 用  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  病毒剂量试验时, 第 4 日对照细胞尚未出现病变, 因而未能判定; 第 5 日对照细胞才出现病变, 此时中和效价分别为 1:8 和  $\geq 1:8$ ; 至第 6 日,  $10^{-6}$  组已无效价,  $10^{-7}$  组效价降至 1:2。(3)  $10^{-8}$  感染的对照细胞于第 6 日全出现病变, 说明  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  组的病毒用量依次为 32、320、

3,200、32,000 个 TCD<sub>50</sub>。

上述结果表明, 最合适的病毒量稀释度为  $10^{-7}$  (即 32 个 TCD<sub>50</sub>), 最合适的判定时间为第 5 日 (即对照细胞出现病变当日)。这样得到的血清中和效价较高。

## 二、组织培养中和试验与小鼠脑内注射中和试验的比较

### 1. 免疫豚鼠血清比较试验

选用乙脑活疫苗免疫的豚鼠血清, 以小鼠脑内、组织培养的病毒稀释, 以及组织培养的血清稀释三种方法进行中和试验。得到的结果按照组织培养中和指数数值的大小, 分为  $>100$ 、 $10-100$ 、 $<10$  三组, 将组织培养方法得到的中和指数、中和效价以及小鼠脑内的中和指数列为表 4、表 5、表 6。

表 4 免疫豚鼠血清比较试验 (一)

血 清 号 数	组织培养 中和指数	组织培养 中和效价	小鼠脑内 中和指数
81-2	3,200	1:8	5,000
75-2	3,200	$\geq 1:8$	630
60-2	3,200	1:8	500
53-2	1,000	1:8	1,000
62-2	1,000	$\geq 1:8$	500
50-2	320	1:8	160
50-3	320	1:4	3,200
81-2	320	1:4	2,000

表 5 免疫豚鼠血清比较试验 (二)

血 清 号 数	组织培养 中和指数	组织培养 中和效价	小鼠脑内 中和指数
93-3	100	1:8	1,000
27-2	100	—	630
44-2	100	1:4	200
83-3	100	1:4	160
89-2	100	1:4	160
49-2	100	—	50
38-2	32	1:4	100
39-2	32	1:4	100
68-2	10	1:2	50

从表 4、表 5、表 6 的结果可以认为: 组织培养中和指数与小鼠脑内中和指数基

表 6 免疫豚鼠血清比较试验 (三)

血 清 号 数	组织培养 中和指数	组织培养 中和效价	小鼠脑内 中和指数
56-2	3.2	$<1:2$	16
56-3	3.2	$<1:2$	16
94-2	3.2	$<1:2$	3.2
66-3	1.0	—	6.3
87-2	1.0	$<1:2$	2.0
21-2	1.0	—	1.0
35-2	1.0	$<1:2$	1.0
12-2	1.0	—	1.0
25-2	0.32	—	1.3
48-2	0.32	$<1:2$	1.0

本可比, 两种中和指数数值的出入不超过 10 倍。病毒是按 10 倍连续稀释的, 即两种方法的差别在病毒 10 倍稀释范围之内。组织培养方法所得到的中和效价范围与中和指数范围亦有相应关系。表 4、表 5、表 6 中组织培养中和指数范围分别在 320—3,200、10—100 及 0.32—3.2 之间, 其相应组织培养中和效价分别在  $1:4- \geq 1:8$ 、 $1:2-1:8$ 、及  $<1:2$  的范围内。总的看来, 中和指数数值大的血清样品, 其中和效价亦高。组织培养中和指数在阴性范围内的血清, 其中和效价均为  $<1:2$ , 小鼠脑内中和指数也都没有  $\geq 50$  的。

### 2. 免疫马匹血清比较试验

血清变量病毒定量的中和试验方法有明显的优点<sup>[3]</sup>。第一, 衡量抗体水平的结果比较精确, 因为即便使用大量病毒并不能使血清效价发生极明显的改变; 第二, 血清用量较少, 还可同时检查几个血清稀释度; 第三, 毒力滴度较低的病毒亦可用作攻击毒。这个方法已经成为在组织培养系统中进行中和试验的标准方法<sup>[3]</sup>。

为将组织培养血清变量病毒定量中和和效价法, 与传统惯用的小鼠脑内注射中和试验法进一步比较, 从乙脑活疫苗免疫的马匹中<sup>[4]</sup>, 据小鼠脑内法测知免疫后血清阳转及未阳转的马各取 3 匹, 再以组织培

养法测定其免疫前、后的血清中和效价。两种方法得到的结果,颇为一致,数据见表7。

表7 马匹免疫前后血清比较试验

马匹号数	组织培养中和效价			小鼠脑内中和指数		
	免疫前	免后二月	免后四月	免疫前	免后二月	免后四月
131	<1:2	1:4	1:4	≤3.2	500	160
141	<1:2	1:8	1:6	≤3.2	800	1,600
202	<1:2	1:6	1:6	0.5	630	500
132	<1:2	<1:2	<1:2	0.5	0.8	0.8
168	<1:2	<1:2	<1:2	2.0	10	5
205	<1:2	1:2	1:2	4.0	16	32

### 3. 免疫儿童血清比较试验

为了解乙脑活疫苗免疫后血清抗体反应的效果,曾在某地区免疫前、免疫后1个月采取6—8岁儿童静脉血及耳血各若干人。静脉血先以传统惯用的小鼠脑内中和法检查血清抗体,部分还有剩余的血清样品,再用组织培养法测中和效价,以资比较。耳血由于血清量过少,只能作组织培养中和效价检查,从1:4开始稀释血清,攻击病毒使用组织培养传代株。

同一儿童以两种方法测中和抗体的结果见表8。从表8可以看出:(1)组织培养

表8 儿童免疫前后血清比较试验

血清号数	组织培养中和效价		小鼠脑内中和指数	
	免疫前	免疫后1个月	免疫前	免疫后1个月
47	<1:4	1:12	1	1,000
167	<1:4	1:16	5	500
14	<1:4	1:4	20	32
44	<1:4	1:12	40	320
71	<1:4	1:16	32	320
96	<1:4	1:12	32	2,000
114	<1:4	1:12	16	1,000
50	<1:4	1:8	63	100
49	1:4	≥1:24	63	2,000
73	1:12	≥1:24	160	3,200
143	1:16	≥1:24	630	3,200
56	1:16	≥1:24	1,000	63,000

的中和效价与小鼠脑内的中和指数之间有相应的关系,中和效价高的血清,其中和指数数值大都也较大。(2)免疫后组织培养中和效价都可反映出抗体水平的明显增长,而小鼠脑内中和指数法测出的结果中,14、44、50号血清的抗体反应表现得不甚显著。(3)从中和效价来看,有些血清样品亦表现有刺激免疫后抗体效价急剧升高的回顾现象。

为表示免疫前血清中和效价不同的儿童,经免疫后血清中和效价所反映的抗体变化情况,将采耳血儿童的免疫前、后血清中和效价列为表9。从表中结果可以认为,免疫前抗体效价不同水平的儿童,免疫后以组织培养中和效价法大部分可测知抗体有明显增长,同时还表明有刺激免疫能够唤起抗体回顾反应使中和效价急剧增高的例子。

表9 免疫前抗体水平不同儿童免疫后血清中和效价变化情况\*

免疫前效价	例数	免疫后1个月血清中和效价							≥2倍效价增长比
		<1:4	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16	≥1:24	
<1:4	10	2		2	3	2		1	8/10
1:4	4		2				2		2/4
1:6	7			2	1	1		3	4/7
1:8	7				4	1		2	2/7
1:12	6						2	4	4/6
1:16	8						1	7	≤7/8
合计	42	2	2	4	8	4	5	17	

\* 耳血清组织培养中和试验结果。

基于上述比较观察结果,可以认为组织培养可以代替小鼠,来测定豚鼠、马匹、儿童乙脑免疫血清内的中和抗体。组织培养中和试验法与小鼠脑内法比较,不仅可以大量节省人力、物力,而且还可以把观察时间从3周缩短至1周。前已述及,血清变量病毒定量的组织培养中和试验法有种种优点<sup>[3]</sup>,采用前述混加法则又大大简化

操作。这个简化的方法已经用于测定流行性腮腺炎疫苗免疫人体前后血清内中和抗体的水平,并获得初步的成功<sup>[5]</sup>。

### 参 考 资 料

- [1] 俞永新等: 微生物学报, 8: 261, 1962。  
[2] 王用楫等: 微生物学报, 1: 97, 1953。

- [3] Lennette, E. H. and Schmidt, N. J.: *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections* 4th ed. p.45—46. American Public Health Association, Inc. 1969.  
[4] 王用楫等: 微生物学报, 14 (2): 191—202, 1974。  
[5] 北京生物制品研究所、中国人民解放军 302 医院流行性腮腺炎免疫协作组: 中华医学杂志, 在印刷中。

## STUDIES ON THE NEUTRALIZATION TEST METHODS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS CONDUCTED IN MONOLAYER CELL CULTURES

WANG YUNG-CHI

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

(1) Neutralization test in tissue culture system may be carried out in a simplified procedure by directly mixing serum, virus and maintenance fluid and adding the mixture into cell vials immediately. The results might be read by CPE on the fifth to sixth days.

(2) In the tissue culture system, the neutralizing antibody against Japanese B encephalitis may be assayed by testing either 10-fold dilutions of the virus against an undiluted serum or 2-fold dilutions of the serum against a standard dose (usually 10—100 TCD<sub>50</sub>) of the virus.

The neutralization indeces and the neutralization titers obtained in the tissue culture system appeared to be comparable in magnitude to the neutralization indeces obtained by mouse intracerebral inoculation method.

(3) The serum-diluting tissue culture neutralization method was suitable for the detection of Japanese B encephalitis-neutralizing antibody level in the sera of guinea pigs, horses and children immunized with Japanese B encephalitis live vaccine.