

红斑性肢痛症相关痘病毒血清免疫学特征的研究

郑志明 张江虹 蔡安梅 诸卫平

(湖北医学院病毒研究所, 武汉)

Steven Specter Herman Friedman

(美国南佛罗里达大学医学院, Tampa, FL)

R373.12

提 要

本文从四个方面综合报道了红斑性肢痛症相关痘病毒(ERPV)血清免疫学特征的研究结果。血清学鉴定表明, ERPV 为正痘病毒属内成员, 但与正痘病毒属内成员痘苗病毒和鼠痘病毒具有中和抗原表位差异。流行性红斑性肢痛症患者血清中含有抗 ERPV 的中和抗体和抗 ERPVA 型包涵体 IgG 抗体, 其检出率明显高于当地未发病者和美国人群的检出率。

关键词: 红斑性肢痛症 痘病毒 免疫荧光中和试验

血清学;

红斑性肢痛症相关痘病毒(ERPV)是1987年冬本室自流行性红斑性肢痛症患者咽拭子中分离出的一种痘病毒^[1-3]。先前的研究指出, ERPV 在生物学特征上和电镜形态学特征上属于正痘病毒属内成员^[1,4]。然而, 该病毒的血清学特征一直不太清楚。本文报道近几年来我们对该病毒血清学特征的观察。

材 料 与 方 法

一、病毒与细胞培养 6株ERPV(ERP V H-1; ERPV P-1, P-2, P-3, P-4; ERPV W-1)均由本室分离自流行性红斑性肢痛症患者咽喉拭子^[1,11,11]。痘苗病毒天坛株和广-9株由卫生部药品生物制品检定所严子林教授提供中国鼠痘病毒MB-35株由卫生部药品生物制品检定所王惠英教授赠送。

上述病毒均用 MA104 细胞培养、滴定。培养液为含 10% 小牛血清的 MEME (购自 Gibco 公司)。

二、家兔免疫试验 方法见文献^[5]。

三、标准抗血清来源 绵羊抗ORF病毒血清(V74-1-003), 牛抗副痘病毒血清(V72-1-410)、兔抗痘苗病毒血清(pool #4)、恒河猴抗Tanapox病毒血清(82-10)、兔抗yaba样病毒血清(778)、浣熊(Procyon Lotor)抗浣熊痘病毒血清(V7-1-84)、人抗传染性软疣病毒血清(Hammond)均由美国疾病控制中心(CDC)痘病毒实验室 Joseph J. Esposito 博士提供。鼠抗鼠痘病毒抗血清由卫生部药品生物制品检定所王惠英教授赠送。

本文于1991年5月29日收到, 7月20日修回。

四、微量中和试验 采用空斑减数中和试验^[11]在 MA104 细胞上进行。

五、免疫荧光试验 待 Rat-2 细胞在 8-孔无菌细胞培养玻片上形成细胞单层后, 接种 ERPV。置 37°C CO₂ 孵箱培养 2 天后, 进行冷丙酮固定。然后, 采用常规间接免疫荧光法检测人血清抗 ERPV IgG 抗体^[11]。

结 果

一、ERPV 中和抗体产生的动态曲线

家兔免疫接种 ERPV 后第二周出现血清中和抗体, 滴度为 1 : 40, 第三周滴度为 1 : 160, 第四周达 1 : 320。第五周开始血清中和抗体滴度下降, 此时一般下降一个滴度。

二、各种标准抗血清对 ERPV 的鉴定结果

6 株 ERPV 分离物除可被兔抗 ERPV 血清中和外, 还可被兔抗痘苗病毒血清和鼠抗鼠痘病毒血清所中和。其它痘病毒抗血清对 ERPV 均无中和作用。

三、ERPV、痘苗病毒、鼠痘病毒之间的交叉中和作用观察

交叉中和试验结果表明, 虽然痘苗病毒抗血清和鼠痘病毒抗血清均可中和 ERPV P-4 株, 但兔抗 ERPV P-4 株抗血清对痘苗病毒和鼠痘病毒则无中和作用(表 1)。

表 1 采用空斑减数中和试验对 ERPV 痘苗病毒、鼠痘病毒之间的交叉中和作用观察

Table 1 Cross-neutralization of ERPV, vaccinia, and Ectromelia virus by plaque reduction neutralization assay

Viruses	Strains	Reciprocal neutralization titers		
		Rabbit anti-ERPV	Rabbit anti-vaccinia	Mouse anti-ectromelia
ERPV	P-4	80	80	320
Vaccinia	Tientan	<20	80	ND
	Guang-9	<20	80	ND
Ectromelia	MB35	<20	ND	320

ND, not done.

四、人血清中 ERPV 抗体的血清流行病学调查

中和试验结果表明, 68% (17/25) 的红斑性肢痛症患者血清有抗 ERPV P-4 株的中和抗体, 平均几何滴度为 10.1 ± 2.3 。检测 8 份流行区“正常”学生血清中有 2 份 (25%) 血清含有抗 ERPV P-4 株的中和抗体, 平均几何滴度为 5.6 ± 1.6 。而非流行区 8 份正常儿童血清中均无可检出的 ERPV 中和抗体存在。在血清流行病学调查中, 我们还发现红斑性肢痛症患者血清中存在一种抗 ERPV P-4 株 A 型包涵体的免疫荧光抗体 (简称抗 ATI 抗体, 图 1)。核抗体仅能与感染细胞胞浆中的园球形 A 型包涵体起反应。采用间接免疫荧光技术共检查 125 份得自早期红斑性肢痛症患者血清、17 份流行区“正常”学生、42 份随机取样的美国人血清。检查结果见表 2。从表中结果可见, 病人血清中抗 ATI IgG 抗体的检出率明高于当地正常学生和美国人血清的检出率 ($P < 0.005$)。检测 11 对双份血清 (分别采自 1987 年 3 月和 1989 年元月) 抗 ATI IgG 抗体

显示,有6对双份血清出现4倍抗体效价上升。其中4人血清在1987年3月为阴性,但在1989年元月采血时为阳性。这11人均有痘史。

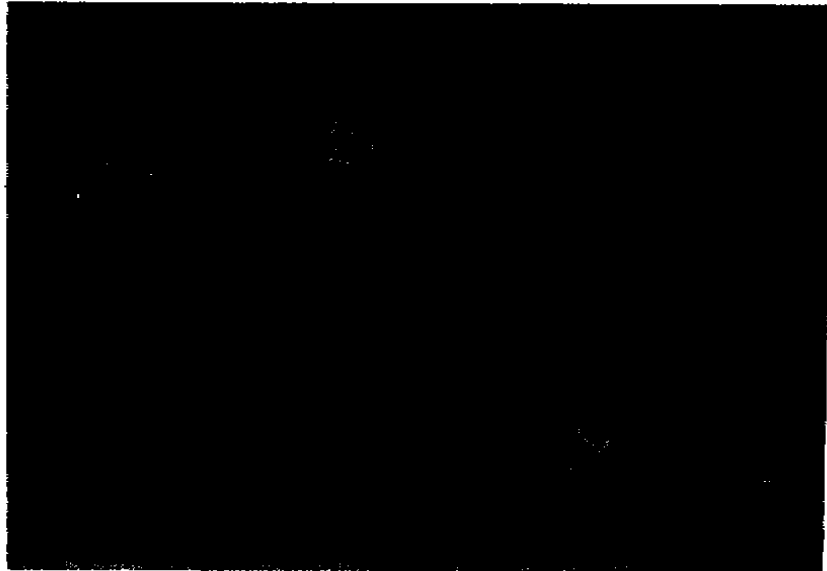


图1 病人血清抗ATI IgG抗体在ERPV P-4感染的Rat-2细胞胞浆中的免疫荧光阳性染色,血清稀释度1:80

Figure 1 Immunofluorescence positive staining of a patient's serum IgG antibody to the ATIs of ERPV in rat-2 cells, Serum dilution 1:80

表2 血清特异性 ERPV P-4 ATI IgG 抗体的免疫荧光检查结果

Table 2 Detection of serum specific IgG antibody to the ATIs of ERPV P-4 by immunofluorescence

	No. of sera tested	No. of positive ^a	% positive	GMT titers (X±SD) ^b
Erythromelalgia Patients	125	49	39.2 ^c	44.2±2.1
"Normal" students from epidemic area	17	2	11.8	40.0±0.0
Americans	42	5	11.9	34.7±1.8

a. Positive means titer $\geq 1:20$.

b. Means of positive samples only.

c. $X^2=14.24$; $P<0.005$, when compared to the sera from non-diseased students and "American" controls.

讨 论

本文对 ERPV 的血清免疫学特征的深入研究,再次证明了作者过去根据 ERPV 生物学特征和电镜形态学特征所得的结论, ERPV 属于正痘病毒属内成员^[1-4]。血清中和

试验表明, ERPV 具有与正痘病毒属内成员痘苗病毒、鼠痘病毒相同的共同抗原。因而可被抗痘苗病毒血清和抗鼠痘病毒血清所中和。不能与痘病毒科其它病毒属内成员的抗血清出现中和反应提示, ERPV 与它们无抗原关系。虽然血清学上 ERPV 属于正痘病毒属内成员, 但兔抗 ERPV 抗血清不能中和痘苗病毒。天坛株、广一9株, 也不能中和鼠痘病毒。这一观察结果提示, ERPV 中和抗原表位与痘苗病毒和鼠痘病毒中和抗原表位有所不同。前者诱导产生的中和抗体仅能识别自身表位, 而后者刺激机体产生的抗体则具有识别两种表位的能力。先前的研究曾指出, ERPV 基因组结构明显不同于痘病毒和鼠痘病毒。虽然 ERPV 基因结构内切酶图谱更接近于鼠痘病毒基因结构, 但二者之间有6个酶切点不同^[7]。因此, 抗原表位的不同是否与其基因结构的差异有关有待进一步研究。

人群血清流行病学调查显示, 无论是 ERPV 中和抗体还是抗 ERPV ATI 抗体, 流行性红斑性肢痛症患者血清的检出率均高于当地未发病者和美国人血清的检出率。种痘史回顾性调查的结果提示, 这种中和抗体和抗 ATI IgG 抗体的检出率与种痘史无关。莫尤美等亦曾比较了127份流行性红斑性肢痛症患者血清和非流行区97份正常人血清抗 ATI IgG 抗体检出率表明, 24份患者血清为阳性, 而非流行区正常人全部为阴性(莫尤美等, 待发表资料)。二次不同的调查结果提示 ERPV 与我国流行性红斑性肢痛症的某种病因学联系。双份血清标本血清阳转的观察加强了这种推断。值得提出的是, 阳性血清中和抗体和抗 ATI IgG 抗体滴度均较低。在我们所检测的49份阳性血清标本中, 仅18份血清抗 ATI IgG 抗体滴度在1:80—1:160之间。低滴度抗体出现的原因不甚清楚。一种可能是采血日期过早, 另一种可能是此种 IgG 抗体在体内不稳定。本文实验指出, 尽管病毒接种后第四周家兔血清中和抗体达高峰, 但在第五周抗体滴度已开始下降。先前的研究也观察到类似现象^[8]。

参 考 文 献

- [1] Zheng Z M, et al., 1988, *Lancet* 1: 296.
- [2] 郑志明等, 1988, 实验和临床病毒学杂志 2(1): 4-8.
- [3] 郑志明等, 1988, 实验和临床病毒学杂志 2(2): 43-46.
- [4] 张江虹等, 1990, 武汉医学杂志 14(1): 41-42.
- [5] 蔡安梅等, 1989, 武汉医学杂志 13(3-4): 73-74.
- [6] Zheng Z M, et al., 1988, *J Chin Microbiol.* 17: 396-399.
- [7] Zheng Z M, et al., *Virology* In press.

Studies on the Serological Properties of Erythromelalgia-Related Poxvirus

Zheng Zhi-ming Zhang Jian-hong Cai An-mei Zhu Wei-ping

(*Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071*)

Steven Specter Herman Friedman

(*Department of Medical Microbiology and Immunology, University
of South Florida, Tampa, Florida, USA*)

The serological reactivity of erythromelalgia-related poxvirus (ERPV) which originally was isolated from the throat swab of a patient with erythromelalgia was analyzed in the present study. Rabbits immunized by foot-pad inoculation of ERPV started to produce neutralizing (NT) antibody to ERPV at 2 weeks postinfection (p.i.). The peak NT antibody titers were observed at 4 weeks p.i. and then began to decline. When eight antisera including sheep anti-Orf, bovine anti-parapox, rabbit antivaccinia, rhesus monkey anti-Tanapox, rabbit anti-Yabapox, raccoon anti-raccoonpox, human anti-molluscum contagiosum, and mouse antiectromelia virus were used to identify 6 ERPV isolates, only rabbit anti-vaccinia, mouse anti-ectromelia, and rabbit anti-ERPV antisera reacted with all isolate. Thus, ERPV was serologically identified as an orthopoxvirus. However, when rabbit anti-ERPV antisera were used to cross-neutralize vaccinia or ectromelia virus, neither was neutralized by these antisera, suggesting that there are some epitope differences in NT antigens between ERPV, vaccinia and ectromelia. Furthermore, 68% (17/25) of the patients with a history of epidemic erythromelalgia and only 25% (2/8) of non-diseased control subjects tested positive for anti-ERPV antibody in their sera using a plaque reduction NT test. In addition, the detection of anti-ERPV IgG using immunofluorescence was significant higher ($P < 0.005$) in the sera from patients with epidemic erythromelalgia (49/125, 39.2%) as compared with the sera controls (2/17, 11.8%) or "American" controls (5/42, 11.9%).

Key Words: Erythromelalgia Poxvirus Serological assay