

兔出血症病毒与细小病毒抗原相关性试验

刘佃章 徐为燕[√]杜念兴

(南京农业大学兽医系, 南京 210014)

S852.65

提 要

用间接ELISA、ELISA交叉阻断法和交叉血凝抑制试验对兔出血症病毒(RHDV)与6种细小病毒进行抗原相关性试验。用间接ELISA证实,RHDV与它们有轻度交叉关系,其抗原相关值分别为:小鼠细小病毒(MVM)5.59%;猪细小病毒(GPV)3.54%;猪细小病毒(PPV)1.76%;水貂肠炎病毒0.7%。细小病毒间的抗原相关值:MEV与PPV为31.6%,MEV与MVM为35.36%;而GPV与MEM、PPV、MVM的相关值均为零,即无相关性。在ELISA交叉阻断法中证实:犬细小病毒(CPV)、猫泛白细胞减少症病毒(FPV)和MEV均不能阻断RHDV与其抗体结合,仅GPV有轻度阻断作用,其最大阻断率为40%。在血凝交叉抑制试验中,未发现RHDV与细小病毒及其相应抗体间存在交叉抑制现象。以上结果表明RHDV与细小病毒在血清学方面有轻度相关性。

关键词: 兔出血症病毒 细小病毒 ELISA 血凝交叉抑制 相关系数

抗原相关性;

我国学者对RHDV的形态、大小、浮密度、沉降系数、血凝潜、血凝适宜的pH和温度范围、核酸类型、结构多肽等方面都做了大量的工作,表明RHDV与细小病毒有一定的相关性。综合这些特征提出RHDV应属于细小病毒科,是该科的一个新成员^[1]。对此,有些国外学者持不同观点^[2,3]。

本试验就是试图通过血清学试验方法来检验RHDV与细小病毒在血清学方面是否存在相关性,从一个侧面来充实RHDV的分类依据。

材 料 与 方 法

一、材料

1. 病毒:兔出血症病毒(RHDV),小鼠细小病毒(MVM),猪细小病毒(PPV),水貂肠炎病毒(MEV),猫泛白细胞减少症病毒(FPV),犬细小病毒(CPV)和鹅细小病毒(GPV)均由南京农业大学兽医系提供。

2. 抗血清及酶标二抗:抗RHDV兔血清及阴性血清由本校兽医微生物组提供;抗MVM豚鼠血清及阴性血清由军事医学科学院提供,抗FPV猫血清及阴性血清、抗MEV猫血清及阴性血清和抗GPV鹅血清及阴性血清由本校传染病组提供;抗CPV犬血清及阴性血清由南京警犬所提供,抗PPV

本文于1991年9月24日收到,1992年2月15日修回。

猪血清及阴性血清由浙江农科院提供；酶标SPA和酶标豚鼠抗鹅IgG由自己制备。

二、方法

1. RHDV的提纯按张全顺^[1]方法进行。

2. 细小病毒的提纯

(1) GPV的提纯：采用郝虹报道的方法^[4]，取感染鹅胚匀浆，氯仿去杂质，硫酸铵沉淀和差速离心即得病毒的粗制剂，再经透析和氯仿去杂质一次，得到纯制剂。

(2) 其它细小病毒的提取：MVM, MEV, PPV细胞培养物反复冻融后，差速离心，再经Sephrose-4B层析即得纯化细小病毒。

3. 间接ELISA交叉试验：按文献(5)方法进行：即经滴定包被抗原和抗体的工作浓度后，滴定甲抗原与甲血清和甲抗原与乙血清的效价。滴定时设阳性血清作质量控制对照及阴性血清对照。判定时，以P/N>2时的血清最高稀释度的倒数为该血清效价。

4. 抗原相关值(R)计算按R值公式进行。

$$R = \sqrt{r_1 \cdot r_2} \times 100\%$$

$$r_1 = \frac{\text{甲抗原对乙血清效价}}{\text{乙抗原对甲血清效价}}, \quad r_2 = \frac{\text{乙抗原对甲血清效价}}{\text{乙抗原对乙血清效价}}$$

5. ELISA交叉阻断试验：按Fiscus^[7]方法进行。

6. 血凝交叉抑制试验：按Parrish等^[8]方法进行。

结 果

一、兔出血症病毒的提纯

病兔肝经匀浆、冻融、氯仿处理、PEG6000沉淀和差速离心，所得粗提病毒的血凝价为 2^{10} 。粗提病毒经Sephrose-4B柱层析，经血凝检测，呈乳白色收集管内含有病毒血凝。将含病毒的前后两管单独分装，其余合并收集，测得HA= 2^{13} 。经紫外分光光度计检测并计算蛋白含量为1.76mg/ml。

二、间接ELISA交叉反应

(一)RHDV与MVM交叉反应

1. RHDV-Ag与RHDV-Ab最适工作浓度的选择及血清效价滴定。

用方阵滴定法：将纯化RHDV-Ag由1:150倍比稀释4个滴定，RHDV-Ab和阴性血清由1:100倍比稀释，酶标SPA工作浓度1:500，分别加入微量滴定板，滴定结果RHDV-Ag和RHDV-Ab的工作浓度分别为1:300和1:400，在此基础上滴定RHDV-Ag和RHDV-Ab的血清效价为1:6400(图1A)。

2. RHDV-Ag与MVM-Ab血清效价滴定

用工作浓度1:300的RHDV-Ag包被反应板，MVM-Ab由1:20倍比稀释，阴性对照亦作相同稀释。设工作浓度1:400 RHDV-Ab 2孔作阳性标准控制对照，空白2孔，酶标SPA工作浓度1:500。滴定结果RHDV-Ag与MVM-Ab的血清效价为1:320(见图1B)。

3. MVM-Ag和MVM-Ab工作浓度选择及血清效价滴定

按前述方法滴定MVM-Ag与MVM-Ab的工作浓度分别为1:80和1:320，在此基础

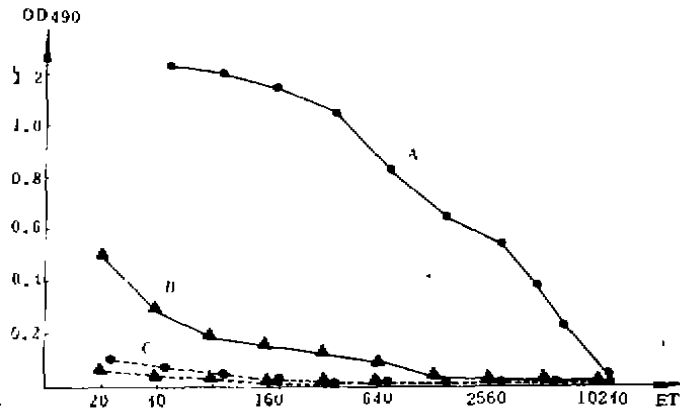


图 1 RHDV与MVM的交叉ELISA滴定—用RHDV抗原包板, 以检测RHDV抗体和MVM抗体。

A. RHDV抗体, B. MVM抗体, C. 阴性血清对照, ET. ELISA滴度

Fig 1. Titration of cross ELISA between RHDV and MVM—detection of RHDV-Ab and MVM-Ab.

A. RHDV-Ab, B. MVM-Ab, C. Negative serum control, ET. ELISA titer

上滴定MVM-Ag和MVM-Ab的血清效价为1:10240 (图2A)。

4. MVM-Ag与RHDV-Ab血清效价的滴定

用工作浓度1:80的纯化MVM-Ag包被反应板, 设2孔1:320MVM-Ab作标准阳性对照, 空白2孔。RHDV-Ab和阴性血清均由1:10倍比稀释, 酶标SPA工作浓度1:500稀释。测得MVM-Ag与RHDV-Ab的血清效价为1:640 (见图2B)。

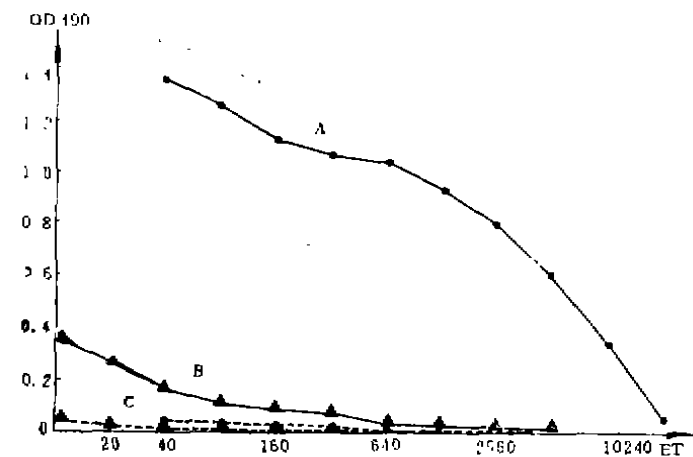


图 2. RHDV与MVM的交叉ELISA滴定—用MVM抗原包板以检测MVM抗体和RHDV抗体

A. MVM抗体, B. RHDV抗体, C. 阴性血清对照, ET. ELISA滴度

Fig 2. Titration of cross ELISA between RHDV and MVM—detection of MVM-Ab and RHDV-Ab using MVM-Ag coating

A. MVM-Ab, B. RHDV-Ab, C. Negative serum control, ET. ELISA titer

5. RHDV与MVM抗原相关值计算: RHDV与MVM交叉ELISA效价如下:

RHDV-Ag对RHDV-Ab 6400

RHDV-Ag对MVM-Ab 640

MVM-Ag对MVM-Ab 10240

MVM-Ag对RHDV-Ab 320

按R值公式: $R = \sqrt{r_1 \cdot r_2} \times 100\%$

$$R = \sqrt{\frac{640}{6400} \times \frac{320}{10240}} \times 100\% = 5.59\%$$

测得RHDV与MVM的抗原相关值为5.59%

(二)RHDV与GPV、MEM、PPV的交叉反应:

具体方法参照前述有关部分。通过对各自工作浓度的滴定和交叉试验,将所测得的12个数据,按上式计算各自R值,测得RHDV与GPV、MEM和PPV的抗原相关值分别为:3.54%、0.7%和1.76%。

(三)细小病毒之间的ELISA交叉反应

参照前述方法进行了MEV与PPV、MVM和GPV与MEV、PPV、MVM的ELISA交叉反应。测得MEM与PPV、MVM的抗原相关值分别为31.6%和35.36%;而GPV与MEV、PPV、MVM的抗原相关值均为0,即无相关性。

表 1. RHDV与细小病毒间的抗原相关值

Table 1. Correlation value of antigenicity between RHDV and parvoviruses

	RHDV	MVM	GPV	PPV	MEV
RHDV	100				
MVM	5.59	100			
GPV	3.54	0	100		
PPV	1.76	NT	0	100	
MEV	0.70	35.35	0	31.60	100

总结以上试验结果,将RHDV与4种细小病毒的抗原相关值列于表1。

三、ELISA交叉阻断法

用RHDV-Ag包被反应板,以含RHDV肝悬液上清与RHDV-Ab预反应后加入反应板,试验结果与HA相比较,表

明此法比HA敏感。

用RHDV-Ag包被反应板的ELESIA交叉阻断滴定结果为PPV、CPV、MEV、FPV这四种细小病毒均不能阻断RHDV-Ab与RHDV-Ag的结合,即阻断率为零,只有GPV能轻度地阻断RHDV-Ab与RHDV-Ag结合的作用,最大阻断率为40%。以阻断率50%以上为阳性标准,上述结果表明RHDV与细小病毒的交叉反应均为阴性。

四、交叉血凝抑制试验

通过RHDV、CPV、MEV、PPV之间相互进行交叉血凝抑制试验,结果见表2。

RHDV与上述3种细小病毒交叉血凝抑制几乎均为0,而细小病毒间的交叉相当高。

据上表计算它们之间的R值见表3。

RHDV与以上3种细小病毒的HI相关值均为0,而3种细小病毒间的HI相关值均为50%。

表 2. RHDV与细小病毒间交叉血凝抑制测定
Table 2. Titration of cross HI between RHDV and parvoviruses

Ag	Ab			
	RHDV	CPV	MEV	FPV
RHDV	1024	2	0	0
CPV	0	2048	1024	1024
MEV	2	2048	4096	2048
FPV	0	2048	2048	4096

表 3. RHDV、CPV、MEV和FPV间的HI相关值
Table 3. Correlation values of HI between RHDV, CPV, MEV and FPV

Virus	Virus			
	RHDV	CPV	MEV	FPV
RHDV	100			
CPV	0	100		
MEV	0	50	100	
FPV	0	50	50	100

讨 论

不同病毒之间抗原相关性比较的方法很多,经典的方法是中和试验。鉴于进行本试验时,RHDV的细胞培养还没有完全过关,因而选择了具有灵敏度高,特异性强的ELISA。结果表明,RHDV与MVM、GPV、PPV和MEV之间的抗原相关值分别为:5.59%、3.54%、1.76%和0.7%, r_1 和 r_2 较接近,说明它们是双向交叉。

本研究虽然没有用ELISA进行RHDV与FPV、CPV的交叉试验,但从血凝交叉抑制试验的结果看:MEV、FPV和CPV的R值均为50%,这说明其血清学关系非常密切。C. R. Farrisb等人认为CPV是FPV的一个变异株,而MEV和FPV是同一病毒适应于不同的宿主,只有从核酸方面的分析才证实有微小的差异^[7]。因此可以推测RHDV与这两种细小病毒也必然与MEV一样有轻度的交叉关系。

细小病毒之间,MEV与PPV、MVM的相关系数分别为31.6%和35.35%,而GPV与MEV、PPV和MVM之间无交叉反应。从核酸方面分析证实MEV、PPV和MVM关系较为密切,而BPV、GPV、ADV与其它细小病毒几乎没有同源性^[8],因此细小病毒之间的血清相关性存在有高、中、低或无的三个群,核酸分析表明也存在三个群。从本实验结果看RHDV可能属于低相关的细小病毒,也就是说RHDV与细小病毒的结构多肽之间可能存在低度的同源性。

ELISA阻断试验表明RHDV与细小病毒的交叉反应均为阴性,这是因为RHDV与细小病毒的抗原决定簇只有很少一部分相同,使细小病毒与RHDV-Ab结合力很弱,当RHDV-Ab遇到结合力强的RHDV-Ag时,会引起RHDV-Ab与细小病毒的复合物解离,因而出现了阴性结果。

血凝交叉抑制试验表明RHDV与CPV、MEV、FPV无交叉抑制现象,这说明RHDV的血凝素抗原与细小病毒的血凝素抗原无同源性,而CPV、FPV和MEV之间交叉抑制现象的R值高达50%,说明它们之间的血凝素抗原十分相似。

根据试验结果,在ELISA及其阻断法中,RHDV与多种细小病毒之间存在某种程度的交叉反应,虽然交叉度很低(R值在0.7%~5.59%之间),但这是特异性的。这与李中夏等^[9]从核酸杂交所得结果相一致。鉴于RHDV核酸为ssDNA^[1],结合本试验结果,我们认为在还没有确定其最终分类地位以前,暂时将其归于细小病毒科是合适的。

参 考 文 献

- [1] 杜念兴等, 1991, 中国农业科学, (1): 1—10。
 [2] Volker F. Ohlinger et al., 1990, *J. Virol.*, 7: 3331—3336.
 [3] Zhang Qnanshun et al., 1991, International symposium on RHD, 308—316.
 [4] 郝虹等, 1988, 病毒学报, (1): 28—31。
 [5] 余贺等, 1982, 临床免疫学技术, 上海科学技术出版社, 74—106和201~213。
 [6] 杜念兴主编, 1985, 兽医免疫学, 上海科学技术出版社, 177页。
 [7] Fiscus, S. A et al., 1985, *J. Clin. Micro.* 22: 395—400.
 [8] Parrish, C.R, et al., 1982, *Arch. Virol.* 22: 395—401.
 [9] Li Zhongjun et al., 1991, International symposium on RHD, 358—362.

Antigenic Relationship between Rabbit Hemorrhagic Disease Virus and Parvoviruses

Liu Dian-zhang Xu Wei-yan Du Nian-xing

(Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

Antigenic relationship between rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and six parvoviruses was determined with indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect-ELISA), enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISIA) and hemagglutination inhibition (HI) test. The results by indirect-ELISA showed that the correlation coefficients between RHDV and minute virus of mice (MVM), goose parvovirus (GPV), porcine parvovirus (PPV) and mink enteritis virus (MEV) were 5.59%, 3.54%, 1.76% and 0.7%, respectively, while the correlation coefficients between MEV and PPV was 31.6% and between MVM and MEV was 35.3%. There was no relationship between GPV and other parvoviruses including MVM, MEV and PPV. In ELISA inhibition test relationship did not exist between RHDV and feline parvoviruses (including CPV, MEV and FPV) except GPV whose highest inhibition rate was 40%. There was no evidence of any relationship between RHDV and parvoviruses by HI test. Based on cross reaction, RHDV was correlated with parvoviruses to some extent.

Key words: Rabbit hemorrhagic disease virus Parvovirus Indirect-ELISA HI test