

# 反向间接血凝法检测 对虾肝胰腺细小病毒的方法学研究

薛清刚\* 钱鸣亮\*\* 王文兴\* 王克行\*\*

(\* 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

(\*\* 青岛海洋大学, 青岛 266003)

**摘 要** 用密度梯度离心纯化的对虾肝胰腺细小病毒(HPV)颗粒免疫家兔制备特异性抗血清,并建立了一种反向间接血凝法以诊断 HPV 感染。该方法的敏感性可达 ng/ml 病毒蛋白的检测限水平。通过对 10 份已固定的患病对虾肝胰腺样品分别取一小部分进行检测,证实反向间接血凝法与组织病理检查的相符性良好,而前者具有方法简便、重复性好、试剂稳定和样品检测可在 1.5—2 小时内完成等特点,适合在现场推广使用。

**关键词** 对虾,肝胰腺细小病毒,反向间接血凝法

对虾肝胰腺细小病毒是 1983 年在中国对虾(*Penaeus chinensis*)中发现的第一种病毒[薛清刚和王文兴,1992a,1992b],后经 Lightner 等人证实,并称之为肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic Parvo-like Virus,HPV)[Lightner 和 Redman,1985]。我们最近对其主要特性的鉴定,已进一步确定了病毒的分类地位(另文报道)。该病毒是一种在中国养殖对虾中感染率高、感染范围广的重要病源体。感染严重者常可造成 50%—90%的养殖对虾死亡[薛清刚、王文兴,1992a,1992b;Lightner 和 Redman,1985]。

由于对病毒感染还没有真正可靠的治疗手段,因此,快速和简便的诊断技术是近年对虾病毒研究领域的重点内容,目的在于通过早期诊断来指导疾病的预防。就 HPV 而言,已经有 SPA 协同凝集试验快速诊断方法的探索[孙修勤等,1992];最近,我们建立了另一种适合在现场推广应用的简便而敏感的反向间接血凝法来检测该病毒。该法无需特殊仪器,易于判读,整个检测在 1.5—2 小时内完成。

## 1 材料和方法

### 1.1 兔抗 HPV 血清的制备

用于制备血清的抗原为经酒石酸钾—甘油密度梯度离心从患病对虾肝胰腺组织中纯化的 HPV,负染后电子显微镜显示为纯净病毒颗粒,毛细管电泳检查则显示为单峰。紫外分光光度测定计算,病毒含量为 0.18mg/ml(以蛋白质计),具体定量方法参照 Dawson 等[1986]。将抗原加等量不完全佐剂混合后,皮下多点、多次注射免疫家兔制备抗血清,具体过程见表 1。最后一次免疫后第 10 天心脏穿刺取血,无菌分离血清。经环状沉淀法鉴定抗血清特异性效价为

1:64。血清加  $\text{NaN}_3$  至 0.1%,分装后置  $-30^\circ\text{C}$  冷冻保存。

表 1 免疫家兔制备抗血清的基本过程

Table 1 Procedure for immunizing rabbits to prepare antiserum

序 数	注射部位	注射剂量	与前次间隔时间(天)
第一次	四肢根部内侧, 双后足垫	0.1ml×6	0
第二次	颈背部皮下	0.3ml×4	21
第三次	腹部皮下	0.3ml×4	10
第四次	背部皮下	0.3ml×4	21

## 1.2 抗血清非特异性成分的吸收与 IgG 分离

参照大白鼠肝粉的制备方法(杜平,1982),用正常野生对虾的肝胰腺组织制备肝粉。按照每 10ml 抗血清加 100mg 肝粉的比例,将血清与肝粉混合,于  $4^\circ\text{C}$  放置 24—36 小时,中间振荡 4—5 次。然后在室温下 3000rpm 离心 20 分钟,弃沉淀。将上清液加到经过酸碱处理后用 0.0175mol/L, pH6.3 磷酸缓冲液(0.0175mol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH6.3, 下称 PB6.3)平衡的 DEAE—纤维素 DE—52 离子交换层析柱上,用 PB6.3 缓慢洗脱,分部收集。测定各收集管在波长 260nm 和 280nm 处的吸光度。有高吸光值,同时经环状沉淀确定有特异活性的部分即为兔抗 HPV IgG。将收集的 IgG 液合并,用紫外分光光度法测定计算抗体蛋白含量。本研究中所用之抗 HPV IgG 原液浓度为 1.5mg/ml。

## 1.3 载体血细胞的处理

取枸橼酸抗凝的人“O”型血提取血浆后的红细胞,用 0.05mol/L, pH7.2 的磷酸盐缓冲液(0.05mol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.2, 0.15mol/L NaCl; 下称 PBS)洗 3 次。用 PBS 配制的 1%戊二醛溶液将最后一次沉积的红细胞配成 3%悬液,  $4^\circ\text{C}$  冰箱放置 50 分钟,期间不时摇动。然后,在室温下将悬液以 1500rpm 离心 10 分钟,弃上清。沉积细胞用 0.9%NaCl 溶液和双蒸水各洗 5 次。最后,用 0.9%NaCl 溶液配成 10%悬液,即为醛化红细胞。加  $\text{NaN}_3$  至 0.1%,  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。在制备致敏血细胞前,取少量醛化红细胞用 PBS 洗 1 次后配成 5%悬液,然后加等容积新鲜配制的 0.005%鞣酸水溶液混匀,  $37^\circ\text{C}$  水浴中温育 40 分钟,期间振荡数次,以防血细胞沉积自凝。最后,用 PBS 洗 2 次,再用 0.2mol/L, pH6.4 磷酸缓冲液配成 2.5%悬液,即为待致敏血细胞。

## 1.4 致敏血细胞的制备

将兔抗 HPV 原液用 0.2mol/L, pH6.4 磷酸缓冲液稀释成 0.3mg/ml 的浓度,与等体积的待致敏血细胞混合,  $37^\circ\text{C}$  水浴 45 分钟,不时摇动以制备致敏血细胞。同时,用 2% 明胶替代抗 HPV IgG,按前述过程制备对照血细胞。反应后,将悬液用 PBS 洗 3 次,最后一次沉积的血细胞用 0.4%明胶—PBS 液配成 2.5%悬液,即为致敏血细胞或对照血细胞。制备好的血细

(1)杜平,1982。《医用实验病毒学》,131。上海微生物学会。

胞,一部分加  $\text{NaN}_3$  至 0.1%, 4℃ 保存,另一部分则加蔗糖至 10%, 真空冷冻干燥后保存。另外,为考察方法的特异性,我们还按前述相同过程分别用正常兔 IgG、正常对虾肝胰腺组织悬液和未经肝粉吸收血清分离的 IgG 分别包被待致敏血细胞以制备相应包被血细胞。

### 1.5 反向间接血凝检测 HPV 的基本过程

将经连续对倍稀释的标准抗原或适当处理的待检样品加入“V”型孔血凝反应板内, 25 $\mu\text{l}$ /孔, 然后加入致敏血细胞, 25 $\mu\text{l}$ /孔, 混匀, 37℃ 温育 30 分钟, 再次混匀, 置室温下 30 分钟, 观察结果。以孔底出现片状沉集为阳性。每一样品或标准抗原稀释度均设非致敏血细胞的平行对照。每一反应板以适当稀释的标准抗原对致敏血细胞作阳性对照, 以正常对虾肝胰腺悬液代替标准抗原作阴性对照, 以标准抗原对对照血细胞作血细胞非特异性对照。

### 1.6 方法学指标的确定

由于本反向间接血凝法的主要目标是 HPV 感染的早期定性诊断, 所以方法的敏感性只以标准抗原显示阳性反应的最高对倍稀释度推算出相应的抗原浓度, 并以此作为检测限来作判断。将同批稀释的标准抗原对同一批致敏血球在不同反应板和不同时间作检测试验, 根据推算的检测限值计算批内变异系数; 将标准抗原用不同的稀释条件作不同批稀释后进行检测, 以各批检测限均数计算批间变异系数, 然后, 根据变异系数的大小判断方法的稳定性。通过对 4℃ 保存的致敏血细胞进行连续 2 个月的活性监测、对冻干保存的致敏血细胞作冻干前后的活性比较及连续 3 个月的活性观察结果, 分析诊断试剂的稳定性。对于方法的特异性, 除每一反应板均设阳性、阴性和血细胞对照外, 还用未吸收血清分离的 IgG 致敏血细胞、正常对虾肝胰腺组织悬液包被血细胞及正常兔 IgG 包被血细胞、分别与抗原、正常肝胰腺组织液交叉进行反应, 以确定有无非特异性凝集的存在。另外, 对 10 份经组织切片已证实有 HPV 感染的固定肝胰腺组织进行检测, 以判断方法的准确性。

### 1.7 被检肝胰腺组织样品的处理

将固定在 Davidson 固定液中的对虾肝胰腺组织剪取一小部分, 用双蒸水充分浸泡清洗以尽可能除去固定液后, 每一组织各加入 PBS 缓冲液 0.2ml, 用组织研磨器充分研磨成匀浆, 3000rpm 离心 10 分钟, 上清液即为待检样品。

## 2 结果

### 2.1 方法的检测限和可重复性

表 2 是对标准抗原用不同条件稀释后多次检测的结果。从表中可以看出, 反向间接血凝法检测 HPV 的检测限为  $<0.14\mu\text{g}/\text{ml}$ , 平均值在  $0.12\sim 0.13\mu\text{g}/\text{ml}$ , 即方法的总体敏感性平均可达  $0.127\mu\text{g}/\text{ml}$  的检测限水平。

由不同稀释条件得出的检测限值均数计算的批间变异系数为 3.7%, 但批内检测限变异系数远高于批间, 达 17.6~24.7%。仔细分析各检测限值可以发现, 最高值与最低值之间总是 2 倍之差, 这是由抗原对倍稀释造成的, 同样, 也造成了批内变异系数偏大。

## 2.2 方法的特异性

将用不同致敏或包被血细胞与不同样品之间反应的结果列于表 3。从表中可以看出,HPV 标准抗原与吸收后血清分离的 IgG 和未吸收血清 IgG 致敏的血细胞均发生凝集反应,而正常肝胰腺组织悬液与未吸收血清分离的 IgG 所致敏血细胞及未吸收抗血清 IgG 与正常肝胰腺悬液包被的血细胞之间也出现阳性反应,只是反应强度远低于标准抗原与抗血清之间的反应。换言之,吸收后抗血清分离的 IgG 致敏血细胞只与 HPV 产生凝集,而未吸收血清 IgG 除与 HPV 反应外,与正常肝胰腺组织在悬液稀释度 $<1:80\sim 160$ 时有部分交叉反应。正常兔血清与 HPV 和对虾肝胰腺之间、未经特异性 IgG 致敏的血细胞与 HPV 和组织悬液之间均无凝集,说明上述各种成分之间不存在非特异性反应。

表 2 反向间接血凝法检测 HPV 标准抗原的最高稀释度

Table 2 The results of the RIHA for detecting the standard HPV antigen

稀释条件	检测限值( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )								平均 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
PBS	0.14	0.07	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	17.6
1%明胶—PBS	0.14	0.07	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	17.6
虾肝—PBS	0.14	0.14	0.07	0.07	0.14	0.14	0.14	0.14	0.12	24.6
pH4.3	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.07	0.07	0.14	0.12	14.6
pH7.6	0.07	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	17.6
pH9.6	0.14	0.14	0.14	0.07	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	17.6
均数 CV * (%)									37	

注:“CV”即变异系数,其中 CV 指批内变异系数;均数 CV 指批间变异系数;计算公式:CV (%)=(标准差/均数) $\times 100$ 。

表 3 反向间接血凝洗的特异性考察

Table 3 Inspection of the specificity of RIHA

样 品	致敏或正常包被血球				
	吸收 IgG	未吸收 IgG	正常 IgG	肝悬液	明胶
HPV 标准抗原	1:1280	1:1280	—	—	—
正常肝悬液	—	1:80	—	0	—
未吸收 IgG	0	0	—	1:16	—
正常兔血清	0	0	0	—	—
PBS	—	—	—	—	—

注:“吸收 IgG”指吸收后血清分离的 IgG;“未吸收 IgG”指未吸收抗血清分离的 IgG;“正常 IgG”为正常兔血清分离的 IgG;肝悬液指正常对虾肝胰腺悬液;“—”为反应阴性;“0”为进行相应反应;所列数值是出现凝集反应的最高稀释度。

## 2.3 反向间接血凝法检测肝胰腺组织内 HPV 的结果

对 10 份组织病理检查证实有 HPV 感染的患病对虾肝胰腺组织检测的结果列于表 4。表中显示,在 10 份被检的样品中,有 9 份显示阳性反应,相应的组织块重为 0.041g—0.140g。有 1 份样品呈阴性,其相应的样品重为 0.028g。

## 3 讨论

免疫学方法是各种病毒性疾病快速诊断的主要方法之一,近来也开始应用于对虾病毒性

疾病的诊断。其中在对虾杆状病毒(BP)、斑节对虾杆状病毒(MBV)、中肠腺坏死杆状病毒(BMNV)和HPV等对虾病毒的诊断中,已涉及SPA协同凝集、ELISA和荧光抗体技术等[孙修勤等,1992;Lewis等,1986;Momoyama,1983]。但是,应用反向间接血凝法检测对虾病毒却至今未见报道。

表4 反向间接血凝法检测组织内HPV的结果

Table 4: The result of the detection of HPV in tissue by the method of RIHA

样品编号	病理检查	样品重量(g)	血凝滴度	样品编号	病理检查	样品重量(g)	血凝滴度
01	+	0.058	1:80	07	+	0.117	1:80
02	+	0.081	1:80	08	+	0.076	1:80
03	+	0.140	1:160	09	+	0.120	1:320
04	+	0.028	—	10	+	0.095	1:40
05	+	0.060	1:40	标准抗原			1:1280
06	+	0.041	1:40	正常肝悬液			—

注:所有样品均为固定后作组织切片检查的保留部分;样品重量指双蒸水浸泡后的湿重接近固定前的组织重量;血凝滴度指样品出现阳性反应的最高稀释倍数。

反向间接血凝试验是将特异性抗体连结到适当处理过的哺乳动物红细胞表面,通过抗体与抗原之间的特异性结合反应介导血细胞的凝集,从而达到检测相应抗原的目的的一种简便免疫学诊断技术。除免疫学方法所共有的敏感、特异和间接凝集试验简便、快速等共性外,由于红细胞凝集比其他颗粒凝集更易判断,且试剂稳定易于保存,所以反向间接血凝至今仍作为许多人类病毒性疾​​病和一些动植物病毒感染的最常用诊断方法之一[徐宜为,1991]。本研究将该方法引入HPV的快速诊断也是成功的。

从方法的敏感性看,我们所建立的这种反向间接血凝法检测HPV的检测限已达ng/ml水平,它作为一种定性诊断方法已可满足要求。样品检测的结果,一方面说明反向间接血凝与组织病理检查有良好的相符性,另一方面证实了即使抗原成分被固定而释放困难的条件下,该方法仍可从感染器官的一小部分中检测出HPV,从而进一步显示了敏感性高的特点。至于被检样品中有1份呈现假阴性结果,可能与两方面的原因有关:一是组织块太小,加上样品处理过程中部分病毒丢失,造成待检样品的HPV绝对含量过低;二是组织的感染程度较轻,通过对相应样品的组织病理切片仔细观察,也确证了这一点。以上两方面的因素导致样品中抗原含量低于方法的检测限。总观检测限的变异系数,不同稀释条件下的批间变异系数很小(<5%)说明在一定范围内,该方法的检测效果并不受pH值和其他非特异性成分的干扰。然而,批内接近20%的变异系数,是一比较特殊的现象。简单地看,这说明在相同反应条件下方法的检测限值变异很大,可重复性太差。但是,细分析可以发现,由于检测限的值是根据标准抗原的稀释倍数推算而来,而抗原是对倍方式稀释的,所以,不同检测限值之间的真正差别被夸大了。尽管存在这一现象,我们仍可认为方法的稳定性是良好的。另外,通过对4℃液态和冻干保存的致敏血细胞作连续活性监测证实,40天以内两种方式保存的血细胞均无明显的活性改变,2个月后,有几批液态保存的血细胞活性下降了1~2个对倍稀释度,而冻干保存者在3个月后仍保持原活性。这表明长时间液态保存致敏血细胞会因特异性抗体的脱落而使诊断试剂逐渐失效。如果冻干后保存,不仅有利于长期保持活性,而且便于试剂的保存和运输。特异性是考察一种方法的另一项重要指标。正如前述,除未经肝脾吸收的抗血清与对虾肝胰组织存在部分交叉反应外,没有其他方面的非特异性反应。而交叉反应的根本原因在于抗原的纯度。由于免疫家兔

用的抗原是从患病组织内提纯的病毒颗粒,尽管经过密度梯度离心,但仍难免有少部分正常组织成分的干扰,并且这种干扰作用的程度与所建立方法的敏感性有关,即方法的敏感性越高,这种交叉反应的干扰作用越强。然而,如果预先用已知的交叉反应成分将相应抗体吸附掉,则保留的就是特异性抗体。理论分析和本项研究结果均说明了这一点。因此,本研究中应用肝粉吸收后血清分离的 IgG 建立方法,充分保证了方法的特异性,并且也被有关的考察结果所证实。

总之,反向间接血凝法检测 HPV 具有简便、快速、敏感、特异、重复性好和试剂稳定等特点,适合在现场推广应用。

本研究系国家自然科学基金资助项目,编号 39000083。

王克行同志现在湛江水产学院工作。

### 参 考 文 献

- [1] 孙修勤等,1992.对虾肝胰腺细小样病毒的免疫诊断研究。鱼类病害研究,14(2):22-26。
- [2] 徐宜为,1991.免疫检测技术(第二版),54.科学出版社(京)。
- [3] 薛清刚、王文兴,1992a.对虾病毒与对虾病毒病的研究现状。鱼类病害研究,14(2):16-21。
- [4] ——,1992b.对虾疾病的病理与诊治,64.青岛海洋大学出版社。
- [5] Dawson, R. M. C. *et al.*,1986. Data for Biochemical Research, Third Edition, 541. Oxford University Press. New York.
- [6] Lewis, D. H. *et al.*,1986. An Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) for Detecting Penaeid Baculovirus. *J. Fish Dis.*, 9: 519-522.
- [7] Lightner, D. V. and R. M. Redman,1985. A Parvo-like Virus Disease of Penaeid Shrimp. *J. Invert. Pathol.*, 45: 47-53.
- [8] Momoyama, K.,1983. Studies on Baculoviral Mid-Gut Gland Necrosis of Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*). III. Presumptive Diagnostic Techniques. *Fish Pathol.*, 17: 263-268.

## METHODOLOGICAL STUDY ON A REVERSE INDIRECT HEMAGGLUTINATION FOR DETECTING THE HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS OF PENAEID SHRIMP

Xue Qinggang \*, Qian Mingliang \*\*, Wang Wenxing \* and Wang Kexing \*\*

(\* First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

(\*\* Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

**ABSTRACT** It is described in this essay that the specific antiserum was prepared by immunizing rabbit with the purified hepatopancreatic parvovirus (HPV) and a reverse indirect hemagglutination (RIHA) method for the diagnosis of the HPV infection was established. The detecting sensitivity of the method is at the ng/ml level of viral proteins. With

the detection of 10 small pieces of specimen from different infected hepatopancreas that had been fixed in fixative, it shows that the RIHA was well in line with histopathological examination, but the former is much simpler and more convenient to perform and repeats well. Owing to that the reagent of the method is very stable and the detecting procedure can be finished within 1.5—2 hours, the method is suitable for application in the field.

**KEYWORDS** penaeid shrimp, hepatopancreatic parvovirus, reverse indirect hemagglutination

## 欢迎订阅 1996 年《淡水渔业》

### ●提高内外质量,保您更加满意

增加彩色版面,扩充“名特优水产品养殖技术”篇幅。刊登内容更加科学、新颖、实用,报道信息更加丰富、及时。

### ●两种订阅办法,任君随意选择

(1)在当地邮局订阅。发行代号:38—32。

(2)直接向编辑部订阅。

1996年每本定价2.50元,全年6期共15.00元。

### ●不论新老读者,都是我刊朋友

如果您缺少哪一期或发现有印刷问题的杂志,请随时告诉我们,我们将免费为您补寄。

●《淡水渔业》编辑部地址:湖北省荆沙市江汉北路,邮政编码:434000,电话:(0716)212277—3073。