

葡萄球菌A蛋白协同凝集试验 快速检测草鱼出血病病毒*

杨广智 罗毅志 叶雪平

(浙江省淡水水产研究所, 湖州)

提 要 本文报道葡萄球菌A蛋白协同凝集(SPA COA)快速检测草鱼出血病病毒的方法以及对提纯病毒、染毒细胞内病毒和病鱼组织检测的初步结果。并对该方法进行了特异性和敏感性考核以及凝集物的电镜观察。该方法快速、特异、设备简单,适合基层单位检测草鱼出血病病毒,并有可能作为草鱼出血病疫苗质量鉴定的指标之一。

关键词 葡萄球菌, A蛋白, 协同凝集, 草鱼出血病

近十余年来,国内外对葡萄球菌A蛋白(Staphylococcus Protein 简称 SPA)进行了广泛的研究。自1974年Kronvall建立葡萄球菌A蛋白协同凝集试验(SPA coagglutination test 简写 SPA COA)以来,在医学和兽医学中广泛用于细菌、病毒和寄生虫病的快速诊断及病原血清型的鉴定。在鱼类病毒病方面, Takahisa kimura 等1984年报道了应用 SPA COA 鉴定 IPNV 病毒血清型和从病鱼组织中直接检测病毒抗原^[4]。

草鱼出血病是我国危害严重的病毒病,对该病检测方法的研究报道较少,闵淑琴等1986年报道了应用对流免疫电泳(DCIE)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测病毒^[1]。但迄今为止,尚未见应用 SPA COA 法检测病毒报道。由于 SPA COA 法检测不仅快速、特异,而且设备简单,适用于基层单位检测草鱼出血病病毒,这对于草鱼出血病的正确诊断和防治以及病毒血清型的研究有着一定的意义。本文将着重介绍这方面的研究结果。

材 料 和 方 法

(1) 葡萄球菌菌体试剂 冻干葡萄球菌A蛋白(SPA)菌体试剂,购自上海生物制品研究所。

(2) 病毒的提纯和兔抗血清的制备及纯化 从病鱼组织中提取病毒按文献^[1]进行,从染毒的培养细胞中提取病毒按文献^[2]进行。兔抗血清的制备及纯化按文献^[1]进行,以对流电泳测定抗血清效价,为了去除非特异性凝集,抗血清经正常鱼组织悬液、正常培养细胞反复多次处理。正常兔血清也按上述方法纯化和处理。

(3) 待测样品的制备

① 病鱼组织样品的制备 取病鱼的肝、脾、肾、肠和肌肉等组织,各按 1:10(W/V)加 PBS 液匀浆,

* 参加本工作的尚有浙江水产学院实习生蒋天水、杨月萍、黄飞先、张旭武。本所董济海、杨成亮同志提供草鱼肠炎菌、烂鳃菌和兔抗烂鳃菌血清,在此一并致谢。

收稿年月:1990年1月;同年9月修改。

3500rpm 离心 30 分钟,取上清液备用。正常鱼组织按同法制备。

② 染毒培养细胞样品的制备 染毒细胞培养一定时间后,冻融三次,3500rpm 离心 30 分钟,取上清液备用。正常细胞按同法制备。本研究采用本所建立的草鱼吻端细胞(ZC-7901)和草鱼胚胎细胞(CP-80)两种培养细胞。

(4) SPA COA 试验的方法

① 葡萄球菌菌体试剂的致敏 将冻干葡萄球菌菌体试剂悬浮于 1ml 无菌水中,加入 0.1ml 兔抗血清,37°C 水浴温育 30 分钟,用 0.01M, pH7.2 的 PBS 液离心洗涤 3 次,再悬浮于 1ml 同一缓冲液中为标记试剂待用,使用时作 1:6 稀释。

② 测试方法 取待测样品液和标记试剂各一滴(约 20 μ l)在载玻片上,用玻璃棒混匀,3 分钟后肉眼观察凝集反应程度,并按下述标准作为结果判定。

液体透明,试剂凝成粗大颗粒者为“++++”;

液体透明,试剂凝成较大颗粒者为“+++”;

液体稍透明,试剂凝成小颗粒者为“++”;

液体混浊,试剂凝成可见颗粒者为“+”;

液体混浊,试剂无颗粒可见者为“-”。

(5) SPA COA 试验凝集物的电镜观察

用火棉胶覆盖的电镜铜网浸沾经凝集反应后的混合液,室温自然干燥后 2% 磷钨酸负染,干燥后电镜观察。

结 果

(一) SPA COA 试验的特异性

(1) 提纯病毒和细胞毒的 SPA COA 试验 8802 (系从染毒的细胞培养物中提取)和 8901 (系从病鱼组织中提取)两种提纯病毒以及细胞毒(即染毒的细胞培养物)ZCV₆和 CPV₆。与兔抗血清标记 SPA 试剂进行 SPA COA 试验,均为强阳性反应,反应液透明,试剂凝成粗大颗粒(图 1,图 2)。上述病毒与正常兔血清标记 SPA 试剂、未标记 SPA

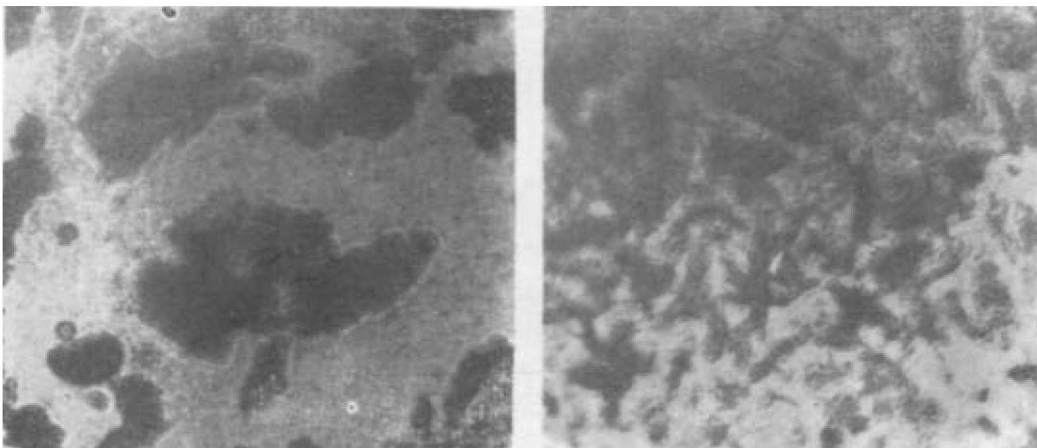


图 1 病毒 8901 的 SPA COA 试验(阳性)

Fig. 1 SPA COA test for the virus 8901 (positive)

图 2 ZCV₆ 的 SPA COA 试验(阳性)

Fig. 2 SPA COA test for the ZCV₆ (positive)

试剂、PBS液、兔抗血清、正常兔血清进行 SPA COA 试验,均呈现阴性反应,反应液混浊,无凝集颗粒。正常鱼组织悬液、正常 ZC-7901 细胞和 CP-80 细胞以及 199 培养液、牛血清与上述各种试剂进行 SPA COA 反应也均呈现阴性(图 3),试验结果详见表 1。

表 1 提纯病毒和细胞毒的 SPA COA 试验结果

Table 1 SPA COA experimental data for the diagnosis of purified and cell-infected virus

试剂 样品	兔抗血清 标记 SPA	正常兔血清 标记 SPA	SPA	PBS 液	兔抗血清	正常兔血清	重 复 测试数
病毒8802	++++	-	-	-	-	-	10
病毒8901	++++	-	-	-	-	-	10
ZCV ₀	+++至++++	-	-	-	-	-	10
CPV ₀	+++至++++	-	-	-	-	-	10
正常鱼组织悬液	-	-	-	-	-	-	10
正常ZC细胞	-	-	-	-	-	-	10
正常 CP 细胞	-	-	-	-	-	-	10
199培养液	-	-	-	-	-	-	8
牛血清	-	-	-	-	-	-	8

(2) SPA COA 的阻断试验 将提纯病毒、细胞毒和组织毒分别与等量兔抗血清混和后,于 37°C 作用 30 分钟, 3000rpm 离心 30 分钟,取上清液(病毒已被中和)再进行 SPA COA 试验,反应结果均呈现阴性,详见表 2。

表 2 SPA COA 阳性结果的阻断试验

Table 2 Blocking effect on SPA COA positive reaction

样 品	SPA COA 试验	
	阻 断 前	阻 断 后
病毒 8802	++++	-
病毒 8901	++++	-
ZCV ₀	++++	-
CPV ₀	+++	-
组织(肝脏)毒 01	++++	-
04	+++	-
08	++	-

(3) 出血病病鱼组织与正常鱼组织的 SPA COA 对比试验 共检测患典型出血病病鱼共 10 尾, SPA COA 试验均为阳性,其中肝脏的阳性率为 100%,脾脏为 90%,肾脏为

表3 病鱼组织与正常鱼组织的 SPA COA 对比试验
 Table 3 Comparison of SPA COA experimental data between
 infected tissue and normal tissue

组 类 别	组织	肝	脾	肾	肠	肌肉
病 鱼	01	++++	+++	+++	-	++
	02	++++	++	++	+++	-
	03	+++	++	+++	-	-
	04	+++	++	++	+	+
	05	++	+++	++	++	-
	06	++++	++	++	++	++
	07	++	++	-	-	-
	08	++	++	++	++	++
	09	+++	+	++	-	-
	10	++	-	+	+	+
		阳性率(%)	100	90	90	60
正 常 鱼	01	-	-	-	-	-
	02	-	-	-	-	-
	03	-	-	-	-	-
	04	-	-	-	-	-
	05	-	-	-	-	-
	06	-	-	-	-	-
	07	-	-	-	-	-
	08	-	-	-	-	-
	09	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
		阳性率(%)	0	0	0	0

90%，肠道为60%，肌肉为50%。共检测正常鱼10尾，SPA COA 试验均为阴性，详见表3。结果表明 SPA COA 试验与出血病的解剖症状相关，同时提示在进行 SPA COA 试验时，被检材料应以肝、脾、肾等组织为主。

(二) SPA COA 试验的敏感性

将二株提纯病毒 8802 和 8901 以及二种细胞毒 ZCV₁ 和 CPV₁，分别进行二倍连续稀释后进行 SPA COA 试验，结果列于表4。其结果表明 SPA COA 试验的阳性反应随病毒稀释度的提高而逐渐变弱，呈现明显的梯度反应。在本试验中提纯病毒 8802 和 8901

表 4 SPA COA 试验的敏感性测试
Table 4 Sensitive detection for SPA COA test

稀 释 度 病 毒	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
8802	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
8901	++++	++++	+++	+++	++	+	+	-
ZCV ₆	++++	+++	++	++	+	-	-	-
CPV ₆	++++	+++	++	++	+	-	-	-

的敏感度分别为 1:320 和 1:640, 细胞毒 ZCV₆ 和 CPV₆ 均为 1:160。

(三) 带病毒不显症鱼的 SPA COA 检测试验

将提纯病毒 8802 注射感染一令健康草鱼, 在 25—28°C 水池中饲养, 每个水池 10 尾。每天进行 SPA COA 检测, 同时解剖试验鱼是否呈现出血病症, 试验结果列于表 5。试验表明, 草鱼感染病毒后, 第 1—3 天均未出现病死鱼, 且解剖检查的鱼均不显症, 第 4 天有少数鱼显症, 第 5 天开始出现病死鱼, 至第 7 天死鱼达到高峰。SPA COA 检测, 在感染病毒后第 1 天阳性率最低, 为 20%。以后逐日提高, 至第 4 天后阳性率达到 100%, 共检测七天。如此说明 SPA COA 对带病毒而未显症的鱼可以检测, 但检测的阳性率是随着病毒在鱼体内复制量的增加而提高的。此外, 我们还从本所实验场发生出血病的二只池塘中, 各捕起 20 尾一龄草鱼, 解剖检查出显病症比率分别为 30% 和 50%, SPA COA 检测的阳性率分别为 60% 和 80%。说明 SPA COA 检测与解剖检查相比较能较大地提高检测率, 有助于鱼病的正确诊断。

表 5 带病毒不显症鱼的 SPA COA 检测
Table 5 SPA COA test for no sign virus carrier

感 染 天 数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
试验鱼数	10	10	10	10	10	10	10
病死鱼数	0	0	0	0	2	4	5
显症鱼数	0	0	0	4	6	10	10
SPA COA 阳性率(%)	20	50	80	100	100	100	100

(四) SPA COA 试验凝集物的电镜观察

SPA COA 试验凝集物经负染后, 在电镜下可见到菌体胞壁外有一层电子致密区, 在致密区中可见到病毒颗粒, 这是葡萄球菌 A 蛋白与兔抗血清 IgG 的 F_c 段形成的结合层, 而结合层中 IgG 的 F(a, b) 段与病毒颗粒进行特异性的结合(图 4)。

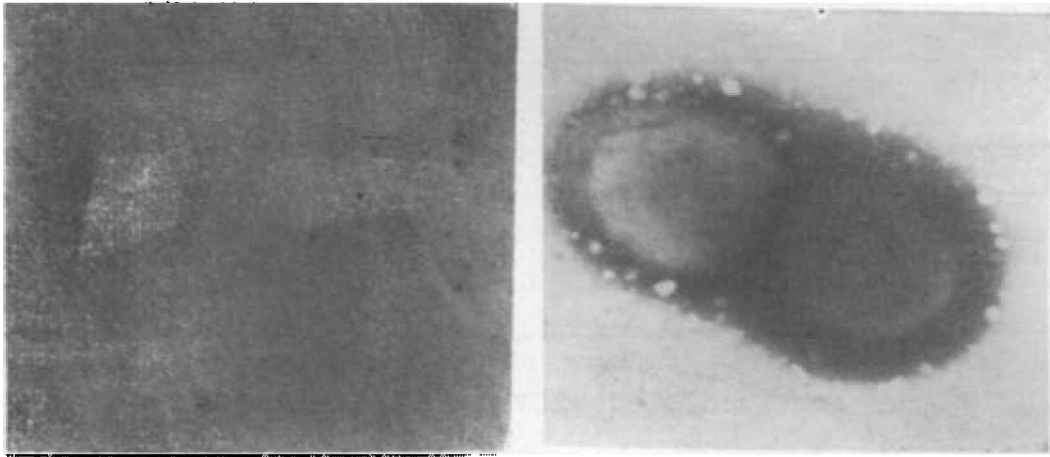


图3 正常鱼组织的 SPA COA 试验(阴性)

Fig. 3 SPA COA test for the normal tissue of grass carp (negative)

图4 凝集物的电镜照片,示菌体四周吸附病毒颗粒($\times 31K$)

Fig. 4 The electron microphotograph of coagulum indicate viral particles around bacteria($\times 31K$)

讨 论

1. SPA COA 试验是利用葡萄球菌细胞壁表面A蛋白与特异性抗体 IgG 的 Fc 段结合,成为吸附了特异性抗体的颗粒载体,该载体上的 IgG 的 F(a、b)段与受检抗原连结而出现凝集现象,使肉眼不可见的病毒抗原与抗体的反应宏观化,这是 SPA COA 试验应用于病毒检测的基本原理。我们的研究表明,SPA COA 试验检测草鱼出血病病毒快速、特异,设备简单,适合基层单位检测病毒。在生产草鱼出血病疫苗时,应用此方法对病毒材料进行质量鉴定,选择抗原性强的材料制作疫苗,这是提高疫苗效价的途径之一。因此,SPA COA 试验具有广阔的应用前景。

2. SPA COA 试验在检测哺乳动物各种粗制组织抗原时,因组织中含有能与A蛋白结合的免疫球蛋白 IgG,预先需用A蛋白处理被检材料,以去除各种非特异性凝集^[2]。在我们的研究过程中曾进行A蛋白处理和未处理被检粗制材料的对比试验,未发现差异和明显的非特异性凝集。这是因为鱼类的免疫球蛋白只有 IgM,没有 IgG。因此被检材料不需预先用A蛋白处理,这使 SPA COA 试验在检测鱼类各种抗原时更为简便。

3. 草鱼出血病常常与细菌性肠炎和烂鳃病并发,且肠炎病的肠道症状易与出血病的肠道出血相混淆。我们通过兔抗出血病血清和兔抗烂鳃菌(G_4)血清分别标记 SPA 后,对出血病病毒、肠炎菌和烂鳃菌(G_4)进行 SPA COA 试验。结果表明,兔抗出血病血清标记 SPA 的试剂只能与出血病病毒产生凝集,兔抗烂鳃菌(G_4)血清标记 SPA 的试剂只能与烂鳃菌(G_4)产生凝集。因此,通过 SPA COA 试验能正确地把这三种病原加以区分,有助于鱼病的正确诊断和防治。关于鱼类致病菌的 SPA COA 试验有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 闵淑琴等, 1986. 鱼呼肠孤病毒(FRV)抗血清的制备及其应用. 水产学报, 10(4): 383-387.
- [2] 范辉宙等, 1989. 用协同凝集试验和 SPA-固相免疫技术检测 EHFV 抗原. 中国免疫学杂志, 5(2): 103-105.
- [3] 殷震等, 1985. 动物病毒学, 260-261. 科学出版社(京).
- [4] Takahisa Kimur *et al.*, 1984. Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci. *Fish Pathology*, 19(1): 25-33.

**RAPID SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF GRASS CARP
HAEMORRHAGIC VIRUS BY COAGGLUTINATION
TEST USING ANTIBODY-SENSITIZED
STAPHYLOCOCCI PROTEIN A**

Yang Guangzhi, Luo Yizhi and Ye Xueping

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou)

ABSTRACT This study deals with the rapid diagnosis of grass carp (*Otenopharyngodon idellus*) haemorrhagic virus by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci protein A (SPA COA), as well as the preliminary experimental data for the diagnosis of purified virus, cell-infected virus and tissues of infected fish. The results obtained from the specific and sensitive detection and the electronic microscopic observation of the coagula, indicate that this rapid and simple method, which requires no special apparatus and easy to perform in the basic unit, is probably one of the valuable indexes for identifying the vaccine quality of grass carp haemorrhage.

KEYWORDS staphylococci, protein A, coagglutination, haemorrhage of grass carp