

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.04.02

猪细小病毒血凝抑制试验抗原、 阳性血清与阴性血清的制备与鉴定

李 琰, 李佳昕, 李芳韬, 李 琪, 吴睿智, 朱元源, 徐 璐*, 刘业兵*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心);国家/WOAH 猪瘟参考实验室,北京 100081)

[收稿日期] 2023-11-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2024)04-0014-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)血凝抑制试验抗原、阳性血清和阴性血清在猪细小病毒制品的效力检验中不可或缺,对猪细小病毒相关生物制品的质量控制至关重要。试验采用 PPV 7909 株病毒同步接种 PK-15 细胞制备血凝抑制试验抗原,用制备的抗原乳化后免疫豚鼠制备阳性血清,同时用未免疫的阴性豚鼠制备阴性血清。对抗原、阳性血清和阴性血清进行鉴定,结果表明,制备的 PPV 血凝抑制试验抗原 HA 效价达 1:512;阳性血清 HI 效价达 1:1024;阴性血清 HI 效价小于 1:8,且特异性均良好。用制备的 HI 试验抗原与不同 PPV 疫苗株的阳性血清进行 HI 试验,同时,用制备的阳性血清、阴性血清与不同 PPV 疫苗株的灭活抗原进行 HI 试验。结果表明,制备的抗原与阳性血清具备良好的血清学交叉反应性,制备的阴性血清与不同疫苗株抗原均呈阴性反应,可用于 PPV 制品的统一评价。

[关键词] 猪细小病毒;血凝抑制试验抗原;阳性血清;生物制品;检验

Preparation and Identification of Porcine Parvovirus Hemagglutination Inhibition Test Antigen, Positive Serum and Negative Serum

LI Yan, LI Jia-xin, LI Fang-tao, LI Qi, WU Rui-zhi,

ZHU Yuan-yuan, XU Lu*, LIU Ye-bing*

(China Institute of Veterinary Drug Control; National/WOAH Reference Laboratory for Classical Swine Fever, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: XU Lu, E-mail: xulu777_ivdc@163.com; LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

Abstract: Porcine parvovirus (PPV) hemagglutination inhibition test antigen, positive serum and negative serum are indispensable for the efficacy test of PPV products, and it is very important for the quality control of PPV related biological products. The hemagglutination inhibition test antigen was prepared by simultaneous inoculation of PPV 7909 strain with PK-15 cells. The positive serum was prepared by emulsifying the antigens and

基金项目: 中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心)兽药行业公益性重点专项(GY202102)

作者简介: 李 琰, 助理研究员, 从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 徐 璐, E-mail: xulu777_ivdc@163.com; 刘业兵, E-mail: zjsliuyebing@163.com

immunizing guinea pigs, and the negative serum was prepared by non-immunized negative guinea pigs. Antigen, positive serum and negative serum are identified, the results show that the PPV hemagglutination inhibition test antigen HA titer was 1:512; the positive serum HI titer was 1:1024; and the negative serum HI titer < 1:8, all of the preparation have good specificity. Cross-reaction test was conducted by using the prepared hemagglutination inhibition test antigen, positive serum and the inactivated antigen, positive serum of different PPV vaccine strains, the results showed that the antigen and positive serum had good serological cross-reaction and could be used for unified evaluation of PPV products.

Key words: porcine parvovirus; hemagglutination inhibition test antigen; positive serum; biological products; test

猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)属于细小病毒科细小病毒属,病毒粒子无囊膜,呈圆形或六角形,直径约为 22 nm,其基因组为长度约 4~6.3 kb 的单股负链 DNA^[1-3],可引起母猪繁殖障碍,造成怀孕母猪尤其是初产母猪出现流产、死胎、畸形胎、木乃伊胎及病弱仔猪等现象,严重危害我国养猪业^[4-6]。PPV 的主要传染源是带毒猪,感染猪排毒周期长,部分存活下来的仔猪可能终生带毒排毒,使得该病毒在猪群中很难被清除^[7]。近年随着规模化养殖场的增多扩大,猪细小病毒病在我国呈上升流行趋势^[8]。目前,国内外主要采用灭活疫苗接种的方法来预防 PPV 感染^[9]。我国已批准注册的 PPV 疫苗共涉及 10 个毒株,大多通过血凝抑制(HI)试验测定免疫豚鼠的 PPV HI 抗体效价作为评价 PPV 灭活疫苗效力的替代方法。然而,我国现在无统一的 PPV HI 试验抗原、阳性血清与阴性血清,导致该病灭活疫苗血清学效力检验方法仍未形成通用标准,无法统一评价该类疫苗质量,给该类制品的注册、检验和评价工作带来严重影响。因此,特异性强、交叉反应好的 PPV HI 试验抗原、阳性血清与阴性血清的研制对我国 PPV 相关制品的质量控制具有重要的意义。

1 材料

1.1 毒种和细胞 PPV 7909 株,由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(CVCC)保藏,编号为 AV30。PK-15 细胞由中国兽医药品监察所保存。

1.2 实验动物 350~400 g 健康豚鼠(PPV HI 抗体效价不高于 1:8),购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂 PPV NJ 株、CP-99 株、WH-1 株、BJ-2 株、L 株、S-1 株、CG05 株、SC1 株灭活抗原及阳性血清由相关生产单位提供,随机标记为 A~H;猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV) H1 亚型抗原及阳性血清、SIV H3 亚型抗原、PPV 阳性对照血清及阴性对照血清、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)阳性血清、猪伪狂犬病病毒(Pseudorabiesvirus, PRV)阳性血清、猪阴性血清、豚鼠阴性血清和 25% 白陶土悬液,均由本实验室制备并保存;MEM 细胞培养液、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 PAN 公司;青霉素和链霉素溶液购自 Hyclone 公司; β -丙内酯购自 SERVA;弗氏佐剂购自 Sigma 公司;阿氏液、PBS (0.01 mol/L, pH7.2)购自北京中海生物科技有限公司。

1.4 主要仪器 生物安全柜(型号为 HS 15),购自 Kendro 公司;二氧化碳培养箱(型号为 MCO-18AIC),购自 SANYO 公司。

1.5 溶液的配制 豚鼠红细胞悬液的配制:采取 2~4 只 350 g 以上健康豚鼠(PPV HI 抗体效价不高于 1:8)血液与等量的阿氏液混合,用 PBS 反复洗涤 3 次,每次以 1500 r/min 离心 10 min,最后一次洗涤后,将沉积的红细胞用 PBS 分别配成 20% 及 1% 悬液备用。

2 方法

2.1 血凝(HA)试验及 HI 试验

2.1.1 待检血清的处理 取 100 μ L 待检血清,56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min 后,加入 300 μ L 25% 白陶土

悬液,混匀,置室温下作用 30 min;以 10000 r/min 离心 10 min,吸取上清,加入 100 μ L 20% 的豚鼠红细胞泥,振荡混匀后 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h;以 4000 r/min 离心 10 min,收集上清,即为 1:4 稀释的血清样品。

2.1.2 试验操作 参考《中国兽药典》2020 年版

三部^[10]附录 3403 中 96 孔微量板法开展 HA 试验(操作术式见表 1),当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果,以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

表 1 HA 试验术式

Tab 1 Operation of hemagglutination test									mL
孔号	1	2	3	4	5	6	7	8……	对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256……	
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘弃 0.025	
样品(抗原)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
1% 红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

参考《中国兽药典》2020 年版三部^[10]附录 3404 中 96 孔微量板法开展 HI 试验(操作术式见表 2),当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果,阴性对照血清 HI 效价不高于 1:8、阳性对照

血清 HI 效价与标称效价相比误差不高于 1 个滴度时,试验方可成立。以能完全抑制红细胞凝集的血清最高稀释倍数为被检血清 HI 抗体效价。

表 2 HI 试验术式

Tab 2 Operation of hemagglutination inhibition test									抗原对照	红细胞对照
孔号	1	2	3	4	5	6	7	8……		
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256……		
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘弃 0.025		
样品(血清)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025		
4HA 单位抗原	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1% 红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

2.2 制备与鉴定

2.2.1 抗原的制备 将 PPV 7909 毒株按 2% 比例同步接种 PK-15 细胞,每日观察,待病变达 80% 左右收获病毒液,反复冻融 3 次,离心后取上清,同步接种 PK-15 细胞,继代 3 次,测定 F4 代 HA 效价,应不低于 1:512。向病毒液中加入终浓度为 0.05% 的 β -丙内酯,置 4 $^{\circ}$ C 灭活 24 h,转入 37 $^{\circ}$ C 2 h 终止灭活。取灭活后的病毒液进行灭活检验,

合格后与冻干保护剂蔗糖凝胶按 8.5:1 (V/V) 的比例混匀,定量分装,进行冷冻真空干燥。

2.2.2 阳性血清的制备 将 2.2.1 中制备的灭活抗原与佐剂乳化后,免疫健康豚鼠(PPV HI 抗体效价不高于 1:8)20 只,每只豚鼠免疫剂量为 0.5 mL,腿部肌肉注射。首免 28 d 后进行二免,免疫剂量为 1.0 mL,免疫途径同首免。二免 28 d 后采血检测 HI 抗体效价,应不低于 1:1024,符合要求后采血制

备血清。若抗体效价未达到要求,则应连续多次加强免疫(同二免),达到要求后方可采血。采血时将豚鼠仰卧保定,用注射器进行心脏采血,将采集的血液静置于 2~8 ℃ 约 16~24 h,充分析出血清后,4 ℃ 条件下 8000 r/min 离心 10 min,分离血清,每 1.0 mL 血清加入各 1000 个单位的青霉素和链霉素后,定量分装,进行冷冻真空干燥。

2.2.3 阴性血清的制备 选取健康豚鼠采血,采血及血清处理方法同 2.2.2。

2.2.4 抗原、阳性血清与阴性血清的鉴定

2.2.4.1 性状、无菌检验、真空度测定、剩余水分测定 随机抽取规定数量的样品,按文献方法^[10]进行检验,应符合规定。

2.2.4.2 效价测定 抗原:用 1% 豚鼠红细胞进行 HA 效价测定,HA 效价应不低于 1:256;阳性血清:与 PPV 抗原进行 HI 试验,HI 效价应不低于 1:512;阴性血清:与 PPV 抗原进行 HI 试验,HI 效价应不高于 1:8。

2.2.4.3 特异性检验 抗原:与 PPV 阳性血清、SIV H1 亚型阳性血清、CSFV 阳性血清、PRRSV 阳性血清、PRV 阳性血清、猪阴性血清、豚鼠阴性血清用 HI 方法进行检验,与 PPV 阳性血清应呈阳性反

应(HI 效价高于 1:8),与其余血清样品均应呈阴性反应(HI 效价不高于 1:8)。

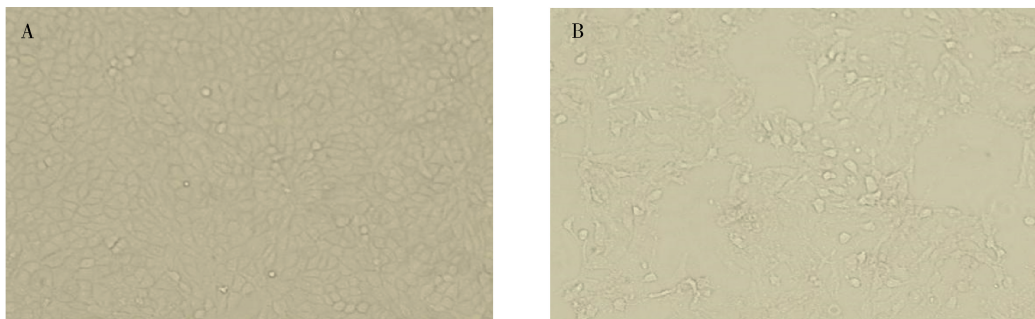
阳性血清:与 SIV H1 亚型抗原、SIV H3 亚型抗原、PPV 抗原用 HI 方法进行检验,与 PPV 抗原应呈阳性反应(HI 效价高于 1:8),与其余抗原样品均应呈阴性反应(HI 效价不高于 1:8)。

阴性血清:与 SIV H1 亚型抗原、SIV H3 亚型抗原、PPV 抗原用 HI 方法进行检验,均应呈阴性反应(HI 效价不高于 1:8)。

2.3 血凝抑制试验抗原、阳性血清的交叉反应性研究 用上述制备的 PPV 7909 株 HI 试验抗原与不同疫苗株阳性血清进行 HI 试验,同时用制备的 PPV 7909 株阳性血清与不同疫苗株抗原进行 HI 试验,探究所制备抗原及阳性血清的交叉反应性。

3 结果与分析

3.1 抗原的制备 PPV 7909 株同步接种 PK-15 细胞 24 h 后即可出现典型的细胞病变,细胞呈现圆缩、聚堆、拉网、破碎等,待病变达 80% 时收获细胞(图 1),继代 3 次,收获的病毒液 HA 效价为 1:1024。将病毒液灭活,灭活检验合格,加入冻干保护剂后按 1.0 mL/瓶的分装量进行分装、冻干,以进行下一步鉴定。



A. 正常细胞对照;B. 接种 PPV 7909 株细胞

A. Normal cell control; B. Cells inoculated with PPV 7909 strain

图 1 细胞病变结果(100 ×)

Fig 1 The result of cytopathic(100 ×)

3.2 阳性血清的制备 二免后血清 HI 抗体效价达到 1:2048,满足制备要求。采血分离血清后按 0.5 mL/瓶的分装量进行分装、冻干,以进行下一步鉴定。

3.3 阴性血清的制备 血清 HI 抗体效价小于 1:

8,满足制备要求。采血分离血清后按 0.5 mL/瓶的分装量进行分装、冻干,以进行下一步鉴定。

3.4 抗原、阳性血清与阴性血清的鉴定

3.4.1 性状、无菌检验、真空度测定、剩余水分测定 抗原、阳性血清与阴性血清均为海绵状疏松

团块,易与瓶壁分离,加入稀释液后迅速溶解,其他检验均符合规定。

3.4.2 效价测定 抗原:用1%豚鼠红细胞进行HA效价测定,HA效价为1:512;阳性血清:与PPV抗原进行HI试验,HI效价为1:1024;阴性血清:与PPV抗原进行HI试验,HI效价小于1:8。

3.4.3 特异性检验 抗原:与PPV阳性血清、SIV H1亚型阳性血清、CSFV阳性血清、PRRSV阳性血清、PRV阳性血清、猪阴性血清、豚鼠阴性血清用HI方法进行检验,与PPV阳性血清呈阳性反应(HI效价为1:1024),与其余血清样品均呈阴性反应(HI效价均小于1:8)。

阳性血清:与SIV H1亚型抗原、SIV H3亚型抗原、PPV抗原用HI方法进行检验,与PPV抗原呈阳性反应(HI效价为1:1024),与其余抗原样品均呈阴性反应(HI效价均小于1:8)。

阴性血清:与SIV H1亚型抗原、SIV H3亚型抗原、PPV抗原用HI方法进行检验,均呈阴性反应(HI效价均小于1:8)。

3.5 HI试验抗原、阳性血清与阴性血清的交叉反应性研究

3.5.1 HI试验抗原的交叉反应性研究 用上述制备的PPV 7909株HI试验抗原分别与市面常见疫苗株阳性血清进行HI试验,结果测得的各阳性血清效价与标称效价相比,差异均不超过1个滴度,说明制备的抗原与不同疫苗株阳性血清间具有良好的交叉反应(表3)。

表3 制备抗原与疫苗株阳性血清HI试验结果

Tab 3 HI test results between prepared antigen and vaccine strain positive serums

阳性血清	阳性血清标称效价	阳性血清测得效价
A	1:1024	1:1024
B	1:2048	1:1024
C	1:512	1:512
D	1:256	1:256
E	1:1024	1:512
F	1:512	1:512
G	1:512	1:512
H	1:256	1:256

3.5.2 HI试验阳性血清的交叉反应性研究 用上述制备的PPV 7909株阳性血清分别与疫苗株灭活抗原进行HI试验,结果测得的HI效价与标称效价差异均不超过1个滴度,说明制备的阳性血清与不同疫苗株抗原间具有良好的交叉反应(表4)。

表4 制备的阳性血清与疫苗株灭活抗原HI试验结果

Tab 4 HI test results between prepared positive serum and vaccine strain inactivated antigens

灭活抗原	阳性血清标称效价	阳性血清测得效价
A		1:1024
B		1:1024
C		1:1024
D	1:1024	1:512
E		1:1024
F		1:512
G		1:1024
H		1:512

3.5.3 HI试验阴性血清的交叉反应性研究 用上述制备的阴性血清分别与疫苗株灭活抗原进行HI试验,结果测得的效价均小于1:8,说明制备的阴性血清与不同疫苗株抗原间均呈阴性反应(表5)。

表5 制备的阴性血清与疫苗株灭活抗原HI试验结果

Tab 5 HI test results between prepared negative serum and vaccine strain inactivated antigens

灭活抗原	阴性血清标称效价	阴性血清测得效价
A		<1:8
B		<1:8
C		<1:8
D		<1:8
E	<1:8	<1:8
F		<1:8
G		<1:8
H		<1:8

4 讨论与小结

标准物质在生物制品质量控制中起着非常重要的作用^[11],是检验检测的“标尺”,检验用标准物质的研制和统一将使同类制品的横向评价成为可能,有助于兽用生物制品产业的发展。本研究旨在制备出特异性强、通用性好的PPV HI试验抗原、阳性血清与阴性血清,并将其应用到PPV疫苗质量控

制中,这在相关文献中尚未见报道。

本研究所制备的 PPV HI 试验抗原 HA 效价达 1:512,与不同疫苗株阳性血清交叉反应良好;制备的 PPV 阳性血清 HI 效价达 1:1024,与不同疫苗株灭活抗原均有良好的交叉反应;阴性血清 HI 效价小于 1:8,与不同疫苗株灭活抗原均呈阴性反应,且上述抗原与血清均具备良好的特异性,在 PPV 制品效力评价方面具有较大的应用前景,为制品的评审评价、《中国兽药典》相关通用标准的制定奠定坚实的物质基础。

参考文献:

[1] István M, Ferenc O, Attila C, *et al.* Biology of porcine parvovirus (ungulate parvovirus 1)[J]. *Viruses*, 2017, 9(12): 393–406.

[2] Molitor T W, Joo H S, Collett M S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides[J]. *Journal of Virology*, 1983, 45(2): 842–854.

[3] Laura A S, Karin H, Colin R P, *et al.* Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. [J]. *The Journal of General Virology*, 2007, 88: 3294–3301.

[4] Li X Q, Zhu L, Liu X, *et al.* Differential expression of microRNAs in porcine parvovirus infected porcine cell line[J]. *Virology Journal*, 2015, 20(12): 128–136.

[5] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1145–1155.

Yin Z, Liu J H. *Animal Virology*[M]. The 2 edition. Beijing: Science Press, 1997: 1145–1155.

[6] Prayuth S, Shingo K, Natsuha S, *et al.* Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 77(12): 1581–1586.

[7] Zeeuw E J L, Leinecker N, Herwig V, *et al.* Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(2): 420–427.

[8] Yu H Q, Cai X Q, Lin Z X, *et al.* Rapid and specific detection of porcine parvovirus using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis[J]. *BMC Veterinary Research*, 2015, 11: 1–5.

[9] Ma X, Guo Z H, Shen Z Q, *et al.* The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig[J]. *Cellular Immunology*, 2011, 270(1): 13–18.

[10] 中华人民共和国兽药典三部[S]. 2020. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume III* [S]. 2020.

[11] 李翠,王兆,万建青,等. WHO 国际生物制品标准物质制备指导原则介绍与我国兽用生物制品标准物质制备程序思考[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(5): 72–77.

Li C, Wang Z, Wan J Q, *et al.* Introduction of WHO recommendations for the preparation, characterization and establishment of international biological reference standards[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020, 54(5): 72–77.

(编辑:李文平)