

旋毛虫病 McAb 快速 ELISA 诊断盒的研制与应用

许威光 袁文甫 李春华 王克领

马增全 阎玉河 周光梯

(河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002)

摘 要

本研究建立了 McAb 快速诊断猪旋毛虫病的 ELISA 试剂盒, 应用旋毛虫单克隆抗体体系和层析纯化抗原 (PAA) 与旋毛虫肌幼虫排泄一分泌抗原 (ES) 作常规 ELISA 平行检测 61 头人工感染旋毛虫病猪血样, 阳性率均为 100%, 检测健康猪血样 1082 头, 阴性率也为 100%, 检测疫区自然感染猪血样 1253 头, 阳性率分别为 1.44% 和 1.12%, 随机抽采 175 头猪血样和肉样作旋毛虫病消化法, 常规法和快速法对比试验, 诊断符合率分别为 100%、97.6% 和 95.34%。通过对 25 万多头活猪检测证明, 该诊断盒具有良好的灵敏性、特异性和重复性, 深受广大检疫人员的欢迎。

关键词 旋毛虫病, McAb—PAA, 快速 ELISA 诊断盒

旋毛虫病是人畜共患寄生虫病, 近年来我国部分省区的疫情有上升趋势, 给生猪发展、肉食经营、外贸出口和人体健康造成巨大威胁。因此, 国内外许多学者对本病的生前诊断进行了大量研究。1987 年我们研制成功的诊断方法已于 1988 年被列为国家兽医生物制品和动物检疫规程。随着生物技术的发展, 我们又开展了抗旋毛虫单克隆抗体研究, 建立了抗旋毛虫 McAb 杂交瘤细胞株, 并对其分泌的 McAb 特性作了鉴定。本文主要应用 McAb 亲和层析纯化抗原与快速诊断法进行了研究, 对包被技术、诊断试液和检测方法作了根本改正, 这样建立起来的诊断方法, 不仅提高了检测的灵敏度和特异性, 而且使检测过程缩短为 5~10 分钟, 其阳性检出率和诊断符合率均达到 95% 以上。通过大量流行病学调查和临床应用证明, 本诊断盒使用效果满意, 对防治旋毛虫病具有重要意义, 迄今为止应用 McAb 快速 ELISA 试剂盒诊断旋毛虫病未见报道。

材 料 和 方 法

一、试剂盒材料

(一) McAb 制备: 由接种抗旋毛虫 McAb 杂交瘤细胞 E₂, D₁ 株的 Balb/c 小鼠腹水纯化而得。

(二) 旋毛虫 McAb 亲和层析纯化抗原的制备: 取 Sepharose—4B, 用 10⁻³mol/L pH3.0HCl 处理后, 加入适量 McAb, 再用 0.1mol/L pH8.5 NaHCO₃ 交联, 装柱后计算偶

* 本文于 1991 年 11 月 20 日收到。

联率,并用 1mol/L 乙醇胺封闭,再用 0.1mol/L pH4.0 乙酸缓冲液和 0.1mol/L pH8.0 Tris-HCl 交替洗涤,0.1mol/L pH7.2 PBS平衡后上样(抗原),加0.01mol/L pH8.0 PBS (含 3M KSCN)解离,收集阳性样品,置 0.01mol/L pH7.2 PBS 透析过夜,浓缩、测蛋白量,低温保存,备用。

(三) 检测试剂的制备:主要有 1、2、3、4 号试液,4~8℃保存,备用。

(四) 快速反应板的制备:取40孔聚苯乙烯微量反应板用吸附缓冲液稀释已测定好工作效价的 PAA,每孔 100 μ l,经过孵育、封闭、保护、烘干、质检等工序,最后保存于密封的塑料袋,注明制备日期、批号、数量、4~8℃保存备用。

(五) 参考阴、阳性血清:系采自本室旋毛虫感染猪和非疫区健康猪血清,其吸收度值分别为0.8~1.00,0.05~0.08。

二、被检动物

(一) 人工感染旋毛虫病猪:本室人工感染旋毛虫病的实验猪。

(二) 旋毛虫病疫区猪:采自疫区社会农家散养猪。

(三) 健康猪:本所养猪场繁育的健康猪。

三、检测方法与结果判定

(一) 常规 ELISA 法^[1]。

(二) 快速 ELISA 法:按下述操作步骤进行。

1. 在受检猪耳静脉采血二滴,滴于 1 \times 2cm 滤纸片上,将其浸泡于 0.01mol/L pH 7.4PBS 液(含0.05%吐温-20) 1ml,37℃ 2 小时或 4℃过夜,备用。阴、阳性血清作 1:200 稀释。

2. 每孔加检样 2 滴(约 100 μ l),并设阴、阳性血清对照,室温(25℃)静置 2 分钟。

3. 甩掉孔中血样,每孔加一号试液 1 滴(约 40 μ l),室温静置 2 分钟。

4. 甩干孔中试液,每孔加二号试液 1 滴,立即用蒸馏水或自来水反复洗涤各孔 5 次,拍干残液。

5. 每孔先加三号试液 1 滴,加再四号试液 1 滴,混匀,室温静置 2~5 分钟,观察结果。

(三) 结果判定:在白色背景下,蓝色为阳性,吸收度 \geq 0.3,无色为阴性,吸收度 \leq 0.08。

结 果

一、抗原包被最适浓度测定 PAA 用包被液作 0.5、1、2、3、4、5 μ g/ml 稀释后包被,分别用标准血清测定,当吸收度(450nm)为0.8时,抗原最适包被浓度为 2 μ g/ml。

二、PAA 和 ES 抗原敏感性试验 将两种抗原以同样浓度包被,然后用10头份旋毛虫病猪血清等量混合,作为试验用血清,结果表明,其敏感性、PAA 高于 ES1~2 个滴度。

三、PAA 与 ES 抗原临床诊断对比试验 按预先测定好的抗原和酶复合物最适工作浓度,在同一条件下对不同类型的猪血清,分别应用两种抗原作常规 ELISA 法测定,结果

表明,两种抗原对61头人工感染猪和372头健康猪,旋毛虫病诊断符合率均为100%,采自疫区1253份检样中,PAA 检出率较 ES 高0.32%。

四、快速法与常规法、消化法的比较试验 对旋毛虫病疫区随机采集 175头猪血样和肉样作旋毛虫病三种检测方法的对比试验,以验证快速法的阳性检出率和诊断符合率、试验证明,快速法的诊断符合率为95.34%,与常规法和消化法无显著差异 ($P>0.05$)。

五、快速 ELISA 诊断试剂盒的质量鉴定

(一)敏感性:应用研制的成套试剂,用二种方法对不同地区平行检测猪5223头,其中快速法检出阳性猪502头,检出率为9.61%,常规法检出496头,检出率为9.49%,前者较后者高0.12%,证明本法具有较高的敏感性。

(二)特异性:对61头人工感染旋毛虫病猪,7天后可在血样中检出抗体,阳性检出率100%,对疫区自然感染猪,检出率可达95%以上,而对1082头健康猪血样检测则全部呈阴性反应,证明其特异性和重复性良好。用本试剂盒分别与囊虫、细颈囊尾蚴、弓形虫和蛔虫病猪血清作交叉反应试验,均呈阴性反应。

(三)试剂盒中抗原包被板稳定性和保存期试验:对五个不同批号和同一批号内的抗原包被板分别进行多次测定,并将其置于 2~8℃保存,试验表明,批内与批间其稳定性无明显差异 ($P>0.05$),包被板于 2~8℃条件下,有效期达一年。

(四)试剂盒内主要试液稳定性和保存期试验:对六个批次的 1、2、3、4号试液,以液态方式分装后作稳定性和保存期试验,结果表明,试液保存于 2~8℃条件下,有效期达一年。

六、快速 ELISA 诊断试剂盒的应用

1989~1991年生产试剂盒12批,计27万头份,先在河南、湖北的重点疫区进行田间试验,后又在这类疫区进行了大面积的中间试验,共检测各种活猪25万头份,1991年先后有新疆、青海、广东、海南、贵州、河北、上海等单位应用本诊断盒进行旋毛虫病流行病学调查,均取得了满意结果。

结 论 与 讨 论

一、旋毛虫病是严重危害人畜健康的寄生虫病,近年来由于生猪流动和大量未经检验的猪肉流入市场,造成本病流行蔓延,因此加强对旋毛虫病的快速诊断和病肉的卫生监督,对控制和消灭人畜旋毛虫病具有十分重要的意义。国外已将 ELISA 法作为猪旋毛虫病宰前的常规检查法,而国内应用成套的试剂盒尚未见报道,我们建立的猪旋毛虫病 McAb 快速 ELISA 诊断试剂盒,填补了国内空白,它具有以下优点:(1)灵敏:每克膈肌含 0.05~0.1条肌幼虫,便可在全血或血清中检出抗体。(2)特异:用本试剂盒检验不与猪囊虫,猪细颈囊尾蚴,猪弓形体,猪蛔虫的血清发生交叉反应。(3)简便:只要一滴血,即可在试剂盒进行检测。(4)快速:整个检测过程只需 5~10分钟,便于现场检疫。(5)容易判定:蓝色为阳性,无色为阴性。(6)保存期长:2~8℃保存,有效期一年。

二、我们原来建立的常规间接 ELISA 法,已列入我国生物制品和动物检疫规程,实践证明,这是一种灵敏、特异的诊断方法和进行流行病学调查的重要监测手段,但由于它需要

较长时间和繁琐的操作过程, 不宜应用于野外和现场检疫, 现在我们研制组装的 PAA-ELISA 快速诊断试剂盒, 具有更好的敏感性、特异性和重复性, 实属目前理想的检测方法, 深受广大基层检疫人员的欢迎。

三、近年来, 我们对旋毛虫病大量检测中, 发现其反应强度与荷虫量/克组织呈非线性关系, 一般在重感染时, 即百条虫/克组织以上, O. D 值较高, 但在自然感染猪中, 虫体密度较低, Zimmerman 和 Brandly (1965) 证实, 自然感染动物中, 半数以上膈肌荷虫量少于 1 条/克组织^[3], 所以在目前的压片镜检中, 漏检是难免的, 我们建立的快速诊断法, 其反应灵敏度却达到 0.05 条虫/克组织, 它完全适用于生猪产地检疫, 活猪进出口检疫, 肉联厂屠宰卫生检疫。

参 考 文 献

- [1] 许威光等. 旋毛虫肌幼虫排泄—分泌抗原诊断猪旋毛虫病的研究与应用. 华北农学报, 1989, 4(4): 133~139.
- [2] 袁文甫等. 抗旋毛虫单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立. 华北农学报, 1989, 4(1):126~130.
- [3] Gamble H R. et al. Diagnosis of swine trichinosis by Enzyme-Linked immunosorbent Assay (Elisa) using EXCreTOby-Secretoryqntigen. Veterinary Parasitology, 1983, 13:349~361.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A ELISA KIT WITH McAb FOR RAPID DIAGNOSIS OF SWINE TRICHINOSIS

Xu Weiguang, Yuan Wenfu, Li Chunhua, Wang Keling,
Ma Zengquan, Yan Yuhe, Zhou Guangti
(Animal Husbandry and Veterinary Sciences Institute, Henan
Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, 450002)

Abstract

A ELISA kit for rapid diagnosis of swine trichinosis was developed. Two antigens, McAb-purified affinity Ag and ES Ag, were respectively applied in the routine ELISA to assay the blood samples of 61 pigs infected experimentally with *Trichinella spiralis*, the positive rates with both antigens were 100%. All samples were negative using the same procedure to determine 1082 pigs free from *T. Spiralis*. In an endemic regions, 1253 hogs were determined, the positive rates were 1.44% and 1.12%, respectively. The blood and the meat samples of 175 pigs (random) were simultaneously collected for a compared test of digestive technique, routine and rapid ELISA, the diagnosis agreement rates were 100%, 97.67% and 95.34% respectively. The kit was sensitive, specific and reproducible as indicated in a field test of 250,000 pigs.

Key words Trichinosis, McAb-PAA, A ELISA kit for rapid diagnosis