

单抗夹心 LAB—ELISA 检测猪伪狂犬病病毒的研究

苗得园¹, 杨 兵¹, 李富强², 张培君¹, 龚玉梅¹,
李永清¹, 付 磊³, 高配亮³

(1 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089; 2 内蒙古农业大学, 呼和浩特 010000;
3 山东省临沂市畜牧局, 山东 临沂 276300)

摘要: 在伪狂犬病病毒种特异性单克隆抗体的基础上建立了检测该病毒抗原的单抗夹心 LAB—ELISA 方法。结果表明, 该方法不与其他常见病原体产生交叉反应, 抗原的最低检出含量为 $8.9 \mu\text{g/mL}$ 。检测时最佳采样部位是猪脑及扁桃体。对人工感染兔、自然感染猪以及临床可疑病猪的检出率分别为 75%, 75% 及 72.7%, 因此本方法是一种具有良好特异性及较好敏感性的诊断方法。

关键词: 猪伪狂犬病病毒; LAB—ELISA; 检测; 诊断

中图分类号: S855.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)01-0127-05

猪伪狂犬病是由疱疹病毒引起的严重为害养猪业的重要传染病之一, 常常引起妊娠母猪的繁殖障碍以及仔猪的神经症状和死亡, 仔猪的死亡率可达 100%, 给养猪业造成巨大的经济损失^[1]。为了更快速、更准确地诊断该病, 以便及早采取有效的防治措施, 在伪狂犬病病毒 (PrV) 种特异性单克隆抗体的基础上建立了单抗夹心 LAB—ELISA 方法, 可直接检测材料及病料中的伪狂犬病病毒, 现将有关研究情况报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

伪狂犬病病毒闽 A 株、北京株、Bartha K61、Shope 株均为本实验室保存; 伪狂犬病病毒种特异性单克隆抗体小鼠腹水由中国农业大学李富强博士惠赠; 生物素化羊抗鼠 IgG 以及酶标亲和素为 Bio-rad 产品, SPF 鸡胚购自中国兽药监察所; 酶标板由 Nunc 生产, 一次性细胞培养瓶及 96 孔细胞培养板 (Costar 或 Nunc 产品), 超速离心机 (Beckman, L7—M 型)、高速冷冻离心机 (Sigma, 2K15 型), 超声波裂解仪 (Cole Parmer, W—375 型)、751 型紫外分光光度计。

1.2 病毒的增殖及抗原的制备

将闽 A 毒种接种鸡胚成纤维细胞, 待到细胞出现 75% 以上病变时收集毒液及细胞, 反复冻融 3 次后, 然后将各瓶的毒液混合, 4°C , 10 000 r/min 离心去除细胞碎片, 用聚乙二醇 6000

收稿日期: 1999-12-22

作者简介: 苗得园 (1973—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽疾病的防治研究工作。

浓缩 10 倍, 然后 35 000 r/min 离心 1 h, 收获沉淀病毒, 用 pH 值 7.2 0.01 mol/L 的灭菌 PBS 悬浮。此即为差速离心抗原。差速离心后, 用超声波打开大的病毒团块, 然后用蔗糖梯度 35 000 r/min 离心 2 h, 收集 35% 与 40% 梯度间的病毒带, 此即梯度离心抗原。用紫外吸收法^[2] 分别测定其蛋白含量。

1.3 鸡多克隆抗血清的制备

取 3 月龄健康的来杭蛋鸡, 经琼扩试验检查为伪狂犬病阴性者作为抗血清制备动物, 将差速离心病毒收获物加入 0.5% 的甲醛灭活后 (4 °C 灭活 24 h), 作 1 倍稀释, 分别与等量的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂通过注射器乳化均匀, 制成灭活苗。颈部皮下和腿部肌肉各免疫 1 次 (0.5 mL/只), 间隔 10 d, 然后再于 10, 20 d 后将抗原作 5 倍稀释翅静脉注射 (0.5 mL/只), 末次免疫后 14 d 翅静脉采血分离血清, 并用琼扩试验测定其效价。

1.4 血清的吸附及纯化

将鸡血清按 20:1 用鸡胚成纤维细胞湿细胞 4 °C 吸附 24 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集上层血清。然后参照有关方法^[3] 提取和纯化 IgG。

1.5 纯化小鼠抗 PrV 抗原

按参考文献[4] 的方法进行。

1.6 LAB-ELISA 程序

用包被液 (pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液) 将鸡抗 PrV 多克隆抗体 IgG 稀释至一定浓度, 加入 ELISA 板孔, 每孔 50 μ L。4 °C 包被 12 h 以上。每板留 1 孔只加底物和终止液用以读数时调零。将包被液甩掉, 用洗涤液 (含 0.05% tween-20 的 0.01 mol/L, pH 值 7.2 的 PBS 溶液) 洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后每孔加入 50 μ L 10% 的脱脂奶粉液 (洗涤液配制) 37 °C 封闭 1~2 h, 洗涤同上。分别取 2 孔加入阴、阳性对照 50 μ L/孔, 其余孔加等量待检样品。37 °C 作用 60 min, 洗涤同上。再加入一定稀释的抗 PrV 小鼠单抗 (5% 脱脂奶配制), 50 μ L/孔, 37 °C 作用 60 min, 加入一定稀释的生物素化羊抗小鼠 IgG 酶标抗体, 37 °C 作用 60 min, 洗涤同上。加入一定稀释的酶标亲和素, 37 °C 作用 30 min, 洗涤同上, 加入新鲜底物液 50 μ L/孔, 37 °C 显色 5~15 min, 直至阴性对照孔开始出现颜色时加入 2 mol/L H₂SO₄ 50 μ L/孔终止显色, 并用 ELISA 读数仪读取每孔在 492 nm 处的 OD 值。若样品 OD 值/阴性对照 OD 值 \geq 2.0, 则判为阳性, 否则为阴性。

2 结果与分析

2.1 LAB-ELISA 各成分工作浓度的测定

将鸡抗伪狂犬病毒 IgG、小鼠单抗、生物素化羊抗小鼠 IgG、酶标亲和素作系列稀释, 对伪狂犬病毒细胞培养液和阴性细胞对照进行多重方阵滴定。结果其工作浓度分别为 20 \times , 160 \times , 400 \times , 200 \times 。

2.2 LAB-ELISA 的敏感性与特异性检验

2.2.1 LAB-ELISA 对伪狂犬毒株的检测 用本 LAB-ELISA 方法对猪胸膜肺炎放线杆菌、猪细小病毒、猪瘟病毒、鸡新城疫病毒、副鸡嗜血杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌 (以上材料均由本实验室保存或本所其他课题组提供) 以及猪伪狂犬病毒闽 A 株、北京株、Bartha K61、

Shope 株抗原或培养物进行检测, 结果所有伪狂犬毒株均呈现阳性, 余者均为阴性。

2.2.2 LAB-ELISA 对梯度离心抗原的检测 将梯度离心抗原(其蛋白含量为 5.7 mg/mL)分别作 1×, 10×, 40×, 160×, 640×, 2 560× 系列稀释, 用 LAB-ELISA 进行检测, 结果在做 640× 后仍呈现阳性反应, 最低抗原检出量为 8.9 μg/mL。

2.2.3 LAB-ELISA 对人工感染兔的检测 将病毒培养物反复冻融 3 次, 取 2 mL 分 2~4 点接种 75 日龄兔腹侧皮下, 注射 20 h 后, 病兔表现精神沉郁, 食欲下降, 30 h 后, 病兔不断啃咬注射部位, 注射部皮毛变色, 食欲废绝, 于 72 h 后死亡。取病死兔心、肝、肾、肺、脾、脑等部位, 1:5 加入 0.01 mol/L pH 值 7.2 的 PBS 用研磨器进行研磨成乳剂, 再反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清进行检测。检测结果如表 1 所示。

2.2.4 LAB-ELISA 对自然感染猪的检测 北京某猪场发生母猪流产、死胎以及仔猪死亡为特征的疾病, 取病死仔猪 4 头, 经病毒分离证明为猪伪狂犬病毒感染, 分别取心、肝、肾、肺、脾、扁桃体、脑等组织, 1:5 加入 0.01 mol/L pH 值 7.2 的 PBS 用研磨器进行研磨成乳剂, 再反复冻

表 1 LAB-ELISA 对人工感染兔的检测结果

兔 别	心	肝	肾	脾	肺	脑
感染兔	0/8	0/8	1/8	2/8	4/8	6/8
检出率(%)	0	0	12.5	25	50	75
对照兔	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

融 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清进行检测。检测结果如表 2 所示。

在对人工感染兔和自然感染猪的检测结果中可见, 病毒在兔体内的分布与猪体内的分布动态极其类似, 均以脑的检出率最高(感染猪扁桃体的检出率亦为最高), 然后依次为肺脏和脾脏。因此在对临床病猪的检测中取样部位最好选择脑(或扁桃体)组织。

表 2 自然感染猪各脏器组织 LAB-ELISA 检出结果

脏 器	心	肝	肾	脾	肺	扁桃体	脑
检出数	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	3/4	3/4
检出率(%)	0	0	0	25	50	75	75

2.2.5 LAB-ELISA 对临床可疑病猪的检测 从北京 9 个发生繁殖障碍病的猪场共收集病死仔猪 23 头, 取脑部组织同上磨成乳剂, 冻融离心后对上清进行检测, 结果如表 3 所示。

表 3 LAB-ELISA 对临床可疑病猪的检测

猪 场	猪场 1	猪场 2	猪场 3	猪场 4	猪场 5	猪场 6	猪场 7	猪场 8	猪场 9	合计
检测数	4	3	3	2	2	2	2	2	3	23
阳性数	2	2	0	2	0	0	1	0	0	8
阳性率(%)	50	67	33	100	0	0	50	0	0	34.8

表 3 中共检测可疑猪 23 头, 共来自 9 个猪场, 其中 4 个猪场证明为 PrV 感染, 猪场的感染率为 44%。显然那些具有繁殖障碍症状, 却未有 PrV 检出的猪场可能发生了其他的繁殖障碍疾病, 因此除去 PrV 阴性的猪场, 则对临床可疑病猪的检出率为 72.7%(8/11)。

3 讨论

目前,用于猪伪狂犬病的诊断方法中,间接血凝试验、琼脂扩散试验、间接 ELISA、Dot-ELISA 均为检测特异性抗体的方法,虽然简便易行,但其结果易受其他非感染来源抗体的干扰,且不利于疾病的早期诊断。而在直接检测病原或其成分的方法中,病毒分离鉴定、动物接种试验等方法^[5]费时费力,不易进行且成本较高。免疫荧光染色的非特异性一直是一个很严重的问题,PCR、限制性内切酶分析^[6~9]目前距离临床应用尚有一定距离。检测病毒的多抗夹心 ELISA 虽已有报道^[10],但本研究建立单抗夹心 LAB-ELISA 将种特异性单抗和生物素一亲和素系统引入其中,显然进一步提高和保证了该方法的特异性和敏感性。

本研究对北京地区 9 个有繁殖障碍疾病的猪场进行了 PrV 的检测,结果可疑猪的检出率为 34.8%,猪场的阳性检出率为 44%。虽然本研究受客观条件所限临床取样较少,但仍可说明猪伪狂犬病毒是引起北京地区猪场繁殖障碍性疾病的重要原因。

从结果中可以看出,LAB-ELISA 不与常见的病原体产生交叉反应,只与伪狂犬病病毒各株发生反应,具有良好的种特异性。在对兔体组织的检查中,以脑部的检出率最高,对猪体组织的检查也证明了扁桃体和脑部的较高检出率。因此在使用此方法对可疑病猪进行检测时,脑及扁桃体为最佳采样部位。故在对临床可疑病猪的检测时作者选择了脑部组织,LAB-ELISA 对 PrV 抗原的最低抗原检出量为 $8.9 \mu\text{g/mL}$,对人工感染兔、自然感染猪及临床可疑病猪的检出率也均在 70% 以上,体现出了 LAB-ELISA 较好的敏感性。

总之,该 LAB-ELISA 分别集中了单抗、生物素一亲和素系统和 ELISA 方法的特异和敏感的特点,使之成为一种临床上可以选用的一种较好的猪伪狂犬病诊断方法。

参考文献:

- [1] 熊谷哲夫,波冈茂郎. 豚病学(第 2 版)[M]. 日本东京:近代出版社,1982 310—315.
- [2] 周顺伍. 动物生化实验技术[M]. 北京:北京农业大学出版社,1991. 38—41.
- [3] 于 涟. 免疫学实验技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1992. 11—40.
- [4] 李成文. 免疫化学研究进展[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993. 58—62.
- [5] 莱曼 A G. 猪病学(第 6 版)[M]. 刘文军,张中秋,狄伯雄,等主校译. 北京:北京农业大学出版社,1990. 255—270.
- [6] 冉智光,童光志,孔令达,等. 伪狂犬病弱毒疫苗与野毒株 PCR 鉴别诊断方法的研究[J]. 中国畜禽传染病,1998, 20(2): 108—111.
- [7] 汪铭书. 伪狂犬病毒 DNA 限制性内切酶分析[J]. 畜牧兽医学报,1995, 26(2): 134—138.
- [8] Paul P S, Mengeling W L, Pirtle E C. Differentiation of pseudorabies(Aujeszky's Disease)virus strains by restriction endonuclease analysis[J]. Arch Virology, 1982, 72: 193—198.
- [9] Pirtle E C, Wathen M W, Paul P S. Evolution of field isolates of pseudorabies(Aujeszky's Disease)virus as determined by restriction endonuclease analysis and Hybridization[J]. American Journal of Veterinary Research, 1984, 45(10): 1906—1912.
- [10] 娄高明,陈志荣,郭万柱,等. 双抗体夹心 ELISA 检测伪狂犬病病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病,

1998, 20(4): 236—240

Study of Monoclonal Antibodies Sandwich LAB—ELISA Detecting Pseudorabies Virus

MIAO De-yuan¹, YANG Bing¹, LI Fu-qiang², ZHANG Pei-jun¹,
GONG Yu-mei¹, LI Yong-qing¹, FU Lei³, GAO Pei-liang³

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agricultural and Forestry
Sciences, Beijing 100089, China; 2 Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010000, China;
3 Linyi Bureau of Animal Husbandry of Shandong, Shandong 276300, China)

Abstract: A sandwich LAB—ELISA was developed to detect Pseudorabies virus (PrV) on the basis of species-specific monoclonal antibodies in this study. The results showed that there was no cross-reactions between the PrV and other common pathogens. The minimum concentration of the antigen that could be detected with this assay was $8.9 \mu\text{g/mL}$. The most suitable organ to get samples was brain or tonsil. The positive rates to artificially infected rabbits, naturally infected swine and clinical dubious swine were 75%, 75% and 72.7%. Therefore this assay was a suitable method with good specificity and sensitivity in the diagnosis of Pseudorabies.

Key words: Pseudorabies virus; LAB—ELISA; Detection; Diagnosis