

免疫微球凝集试验技术及其对猪旋毛虫病的快速诊断研究

郭成留 孙春青 李学伍 王南文 曾贤湘

(河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州)

摘 要

本研究以旋毛虫可溶性抗原作诊断抗原, 聚苯乙烯微球为抗原载体, 通过碳化二亚胺反应把旋毛虫抗原共价偶联到聚苯乙烯载体微球上, 制备了用于检测猪旋毛虫病血清抗体的免疫微球诊断试剂。从平板凝聚试验技术对 117 份实验感染旋毛虫病的猪、兔、大白鼠的血清抗体和疫区猪血清抗体进行了检测。试验结果, 免疫微球凝集试验对实验感染旋毛虫病动物血清抗体检测的敏感性和特异性均为 100%。在检测的敏感性上, 免疫微球凝集试验比人工消化检查法高 9.17%, 比压片镜检法高 25.26%。在阳性符合率上, 与压片镜检相比为 100%, 与人工消化检查相比为 97.25%。试验结果表明, 免疫微球凝集试验技术对猪旋毛虫病是一简便、快速和可靠的诊断方法。

关键词 旋毛虫 猪旋毛虫病 免疫微球 可溶性抗原 碳化二亚胺反应
共价偶联

前 言

免疫微球凝集试验技术用于人、畜疾病的诊断是近年发展起来的免疫学新技术。免疫微球是采用人工合成的高分子材料, 制备成通常在 $0.2 - 0.8 \mu\text{m}$ 之间带有活性基团的球形颗粒, 作为携带配基的载体, 再通过化学交联剂稳固地把具有免疫活性的配基即抗原或抗体交联到微球上, 而成为带有特异性配基的载体微球, 这种具有免疫活性的配基—微球复合物就叫免疫微球。而后, 借助于凝集反应来检测血清抗体或抗原成份以达到诊断疾病的目的。

旋毛虫病是严重危害人类健康的人、畜互通的寄生虫病。研究和探讨对猪旋毛虫病的简便、快速而又可靠的诊断方法, 在开展猪旋毛虫病综合防治中具有十分重要的意义和较大的使用价值。我们以聚苯乙烯微球为抗原载体, 通过碳化二亚胺反应把旋毛虫抗原连接到微球上, 成功地制备了带旋毛虫抗原的免疫微球。经对猪等动物的旋毛虫病的试验检测和在疫区应用, 取得了较为满意的效果。现将其试验及应用结果报告如下。

材料与方 法

一、旋毛虫可溶性抗原的制备

1. 旋毛虫虫体的获取 体重200—250 g健康大白鼠, 每只实验感染旋毛虫1500—2500条。于感染后的第35—40天剖杀, 弃头、皮、内脏和脂肪, 留肌肉以绞肉机绞碎。按10克肌肉100 ml 1%胃蛋白酶—盐酸人工胃液的比例, 在39℃下消化4—6小时。以网筛过滤消化物, 生理盐水充分洗涤、自然沉降, 得到纯净的虫体。虫体经冷冻干燥后于低温冰箱-20℃保存。

2. 可溶性抗原的制备 冻干虫体100 mg加5 ml 0.1 M、pH 7.40 PBS于玻璃组织研磨器内充分研磨, 破碎物反复冻融三次, 超声波裂解, 冰箱4℃过夜, 4℃15000转高速离心1小时, 上清液加0.1%叠氮钠-20℃保存备用。凯氏微量定氮法测蛋白含量。用时以0.1 M、pH 7.40 PBS调整蛋白浓度。

二、试验用血清的种类及其来源

1. 实验感染旋毛虫病的动物阳性血清 ①实验感染旋毛虫病的猪血清。体重15—30 Kg健康仔猪, 每Kg体重人工感染旋毛虫500—5000条, 感染后35—40天采血分离血清; ②实验感染旋毛虫病的兔血清。体重1.5—2.0 Kg健康兔, 每只人工感染旋毛虫100—5000条, 感染后5天半—98天采血分离血清; ③实验感染旋毛虫病的大白鼠血清。体重200—250 g健康大白鼠, 每只人工饲喂旋毛虫1500—2500条, 感染后35—40天采血分离血清。

2. 疫区猪只血清 宰前采血分离血清, 宰后按四部规程压片镜检并以人工胃液消化检查, 根据压片和消化检查结果定性。

3. 猪囊虫病猪阳性血清 宰后按四部规程检验发现有囊尾蚴寄生的猪血清。

4. 猪蛔虫感染的猪血清 宰后在小肠部位发现有猪蛔虫寄生的猪血清。

5. 非旋毛虫病的猪、兔、大白鼠阴性血清 经压片镜检和消化检查均未发现旋毛虫寄生的猪、兔、大白鼠血清。

以上各种血清的来源分别为: 实验感染旋毛虫病动物的阳性血清为本室人工感染的动物血清; 疫区猪只血清和猪蛔虫感染的猪血清、猪囊虫感染的猪血清、非旋毛虫病猪血清均采自不同的肉联厂; 非旋毛虫病兔、大白鼠血清采自本室自养的实验动物。

三、免疫微球的制备

1. 载体微球的合成 以苯乙烯为单体, 在其乳液聚合过程中引入丙烯酸单体, 得到表面带有羧基官能团的聚苯乙烯微球。

2. 微球衍生物的制备 于4℃通过碳化二亚胺反应把 ϵ -氨基己酸的氨基与微球表面上的羧基相连接, 成为末端带有羧基的微球衍生物。

3. 旋毛虫抗原与微球衍生物的偶联 于4℃通过碳化二亚胺反应把旋毛虫抗原的氨基与微球衍生物末端的羧基偶联, 经离心洗涤后稀释成一定浓度的悬液就得到带有旋毛虫抗原的免疫微球诊断试剂。

四、免疫微球凝集试验操作方法

先用牙签或火柴棒蘸取待检血清一小滴 (约 4—8 μl), 置黑底玻璃片上, 再滴加一滴 (约 40—50 μl) 带有旋毛虫抗原的免疫微球悬液。用牙签或火柴棒将血清和免疫微球悬液搅拌均匀成直径 2 cm 左右的圆圈, 轻轻旋转摇动玻板 1—2 分钟, 使其充分混合均匀。在 10 分钟内, 以肉眼观察凝集反应的程度来判定结果。判定标准: 在判定时间内, 呈现明显而清晰可见的凝集颗粒者为阳性; 未见凝集颗粒出现, 仍为均匀一致乳液状态者为阴性。每次试验时均应用阳性和阴性血清作参考对照。

结果与分析

一、对实验感染旋毛虫病动物血清的检测

1. 试验的敏感性与特异性 经对实验感染旋毛虫病的 8 头猪、14 只兔、85 只大白鼠共 117 份阳性血清抗体检测结果, 所有动物的全部血清都呈现阳性凝集反应。检测的敏感性和特异性均为 100%。经对压片镜检和人工胃液消化均未发现旋毛虫的 16 只兔、70 只大白鼠非旋毛虫病血清的检测, 全部呈现阴性反应。将 8 份实验感染旋毛虫病的猪、兔血清稀释后, 测得其血清抗体凝集滴度为 1:100—1280。通过对 34 份猪囊虫感染的猪血清和 2 份猪蛔虫感染的猪血清检验, 均无交叉反应出现。

2. 对实验感染旋毛虫病动物血清抗体的检出最早时间 10 只 1.5—2.0 Kg 体重健康兔, 实验感染前心脏采血分离血清, 经免疫微球凝集试验测试全为阴性。将试验兔分作 5 组, 每组 2 只。第 1 组每只人工感染旋毛虫 100 条; 第 2 组每只人工感染 500 条; 第 3 组每只人工感染旋毛虫 1000 条; 第 4 组每只人工感染旋毛虫 2000 条; 第 5 组每只人工感染旋毛虫 5000 条。于人工感染后第 3、5.5、8、12、15、21、30、60、98 天分别采血, 作免疫微球凝集试验。结果从感染后的第 5 天半起, 感染 100 条组 1 只、感染 500 条组 1 只、感染 1000 条组 2 只和感染 5000 条组 1 只共 5 只兔的血清出现了阳性凝集反应。人工感染后的第 12 天, 全部试验兔的血清都出现了阳性凝集反应。到人工感染后的第 98 天, 各种动物的血清仍呈阳性凝集反应。结果表明, 免疫微球凝集试验对动物旋毛虫病的血清抗体最早在感染后的第 5 天半就可检测出来。

二、对疫区猪只血清的检测

应用免疫微球凝集试验技术对疫区商品活猪进行检测, 阳性率为 11.08%; 人工胃液消化法阳性检出率为 11.98%; 压片镜检法阳性检出率为 10.44%。免疫微球凝集试验比人工胃液消化法检查的阳性检出率提高了 9.17%, 比压片镜检法检查的阳性检出率提高了 25.26%。经人工胃液消化, 发现旋毛虫的猪血清中, 有 97.2% 与免疫微球凝集试验的阳性符合, 2.8% 呈阴性反应。压片镜检法发现的旋毛虫猪血清, 免疫微球凝集试验全呈阳性反应。免疫微球凝集试验与压片镜检的阳性符合率为 100%; 与人工胃液消化检查的阳性符合率为 97.25%。免疫微球凝集试验与人工胃液消化检查的阴性符合率为 98.75%。

三、免疫微球凝集阻断试验

取凝集滴度 1:60—480 的疫区自然感染旋毛虫猪的阳性血清 6 份, 分别加入 0.5、1.0、2.0、2.5、4.0 倍量的旋毛虫抗原, 37℃ 中和 1 个半小时后再进行免疫微球凝集试验, 2.5 倍量抗原以上中和的旋毛虫病猪血清的凝集反应消失, 而未加抗原的空白血清和加

猪囊虫抗原的血清均不被阻断。此外,以旋毛虫抗原和人工感染旋毛虫病猪及大白鼠血清作了琼脂扩散试验,在抗原孔周围都与旋毛虫阳性血清之间出现了明显的抗原抗体沉淀线。以上两种试验结果都表明本试验所制备的旋毛虫抗原具有免疫活性和特异性。

四、免疫微球凝集试验效果的重复性与免疫微球的保存期

1. 试验的重复性 以4批免疫微球对固定的20份旋毛虫病猪的阳性血清和20份非旋毛虫病猪血清进行了重复检测,各批免疫微球的试验结果完全一致。

2. 保存期 免疫微球在普通冰箱4℃保存5个月、12—15℃保存10天,对血清抗体反应的敏感性无显著变化。

结论与讨论

通过应用免疫微球凝集试验技术对人工感染旋毛虫病动物的117份血清抗体检测结果表明,本法对人工感染旋毛虫病动物的血清抗体检测的敏感性和特异性均为100%。对疫区自然感染旋毛虫病猪检测,与压片镜检的阳性检出符合率为100%,与人工胃液消化检查的阳性检出符合率为97.25%。在检出的敏感性上,比人工胃液消化高9.17%;比压片镜检法高25.26%。实验证明了免疫微球凝集试验技术对猪旋毛虫病的检测具有较高的敏感性和特异性。

在疫区人工胃液消化法检出的阳性旋毛虫猪,其中有3头免疫微球凝集试验未能检出。未检出的原因可能是这3头猪感染旋毛虫的量太少。在人工胃液消化法未发现旋毛虫的猪中,免疫微球凝集试验检出10头阳性。推测其原因可能有两种:一是旋毛虫的早期感染,在人工胃液消化肌肉时未能发现虫体,而在血清中已有抗旋毛虫抗体出现,与免疫微球上的旋毛虫抗原发生了抗原抗体反应而呈阳性凝集反应;二是与除猪囊虫和猪蛔虫以外的其它寄生虫感染有交叉反应,这些都是今后需要探讨的问题。

对猪旋毛虫病的血清学诊断方法,试用的有环状沉淀试验、对流免疫电泳、琼脂扩散试验,间接血凝试验和酶联免疫吸附试验等检测技术。在这些方法中,大多因试验操作复杂和需时太久而难以为基层单位所接受,限制了推广应用。免疫微球凝集试验检测旋毛虫病,具有敏感性高、特异性强、出现结果快、操作简便易行等特点,适于基层兽医、卫检人员和活猪收购部门现场检测和猪旋毛虫病的大面积普查。

参 考 文 献

- (1). Rembaum A. et al: Functional Polymeric Microspheres Based on 2—Hydroxyethyl Methacrylate for immunochemical Studies, *Macromolecules*, 9 (2) 1976, 328
- (2). Robert S.: New Immunolatex Spheres, Visual Markers of Antigens on Lymphocytes for Scanning Electron Microscopy, *J. cell Biology*, 1975(64), 75
- (3). Sakota K. et al: Polymerization Behavior and Distribution of Carboxyl Groups in Preparation of Soap—Free Carboxylated Polystyrene Latex, *J. Appl Poly Sci*, 1977(21), 1035
- (4). Thelma F. et al: A Slide Latex—Particle Agglutination Test for Trichinosis. *American*

Journal of Clinical Pathology, 32(1) 1962, 9

(5). 马立人: 免疫微球的制备和性质,《上海免疫学杂志》,2(1)1982, 59

Studies on Immuno-Microsphere Agglutination Test and Its Application to Rapid Detection of Swine Trichinosis

Guo Chengliu Sun Chunqing

Li Xuewu Wang Nanwen Zeng Xianxiang

(Animal Husbandry and Veterinary Science Institute,
Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou)

Abstract

Immuno-microspheres for detection of swine trichinosis had been prepared from soluble antigen of trichinella spiralis covalently bound to polystyrene microspheres by carbodiimide reaction. 117 sera of pigs, rabbits and rats infected experimentally with trichinella spiralis from our Laboratory and sera of pigs from epidemic area were detected with the immuno-microsphere agglutination test. Detecting results showed that the immuno-microsphere agglutination test had a sensitivity of 100% and a specificity of 100% for detection of animal trichinosis infected experimentally. The positive rates of identity of the immuno-microsphere agglutination test were 100% and 97.25% identical with that microscopic section and digestion of muscles for postslaughter respectively. On the positive rates of detection the sensitivity of immuno-microsphere agglutination test increased 9.17% and 25.26% compared with that of digestion and microscopic section of muscles for postslaughter respectively. It has been demonstrated that the immuno-microsphere agglutination test is a simple, quick, sensitive and specific serological method for detection of swine trichinosis.

Key words: Trichinella spiralis; Swine trichinosis; Immuno-microspheres; Soluble antigen; Carbodiimide reaction; Covalent bound