

## 猪流行性腹泻胶体金抗体检测技术的建立及其应用

张利勃,周铁忠,王 珅,高慎阳

(辽宁医学院畜牧兽医学院重点实验室,辽宁锦州 121001)

**摘要:**为建立一种高效、经济、简便适用于基层防疫检疫人员使用的猪流行性腹泻(PED)疾病的检测方法,参考已知的胶体金免疫层析法(GICA)工作原理基础之上,将葡萄球菌蛋白 A(SPA)进胶体金标记作为指示介质,将基因工程表达 PEDV M 蛋白抗原和自制的抗 SPA 多抗血清包被硝酸纤维素膜(NCM) 分别作为检测线和质控线,由此制成一种检测 PEDV 血清抗体的快速诊断试纸。其特异性、敏感性试验与 ELISA 进行比较。结果表明该 GICA 与参考检测方法 ELISA 具有相近的灵敏度,在二者检测的 75 份临床样本中有 65 份共同检测为阳性结果,7 份共同检测为阴性结果,其符合率达 96%。说明该 GICA 检测技术的建立为检测 PEDV 抗体提供了一种快速简便的方法。

**关键词:**猪流行性腹泻;胶体金免疫层析测定;酶联免疫吸附测定;葡萄球菌蛋白 A

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

论文编号:2010-2557

### Development and Preliminary Application of a Gold-Immunoassay for PED

Zang Libo, Zhou Tiezhong, Wang Shen, Gao Shenyang

(Key Laboratory of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou Liaoning 121001)

**Abstract:** To establish a highly efficient, cost-effective and handily detection method for the diagnosis of porcine epidemic diarrhea. Based on the well known working principle of Gold-Immunoassay (GICA), a batch of in-house GICA test strips were made by assembling the following elements, which were included the protein SPA labeled with HAuCl<sub>4</sub> as indicating reagent as well as the recombinant PEDV M protein and multiple anti-SPA serum coated onto the NC membrane as detective line and control line respectively. Compared with the reference ELISA method, the established GICA shared the similar test sensitivity. Especially, the clinical test agreement rate of both methods reached 96%, which was calculated by the sum percent of positive (65) and negative (7) samples among total 75 clinical samples. This GICA method provided the most rapid and convenient means for detection of PEDV infection in field.

**Key words:** PEDV; GICA; ELISA; SPA

### 0 引言

猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhoea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起猪呕吐、腹泻和脱水为主要临床症状特征的猪肠道传染病<sup>[1-2]</sup>。中国从 1976 年开始就陆续有 PED 的报道<sup>[3-4]</sup>。该病已成为重要的猪病毒性腹泻病之一。由于 PED 与猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE)在流行病学、

临床症状、病理剖检等变化上非常相似,这给该病的快速诊断带来了一定困难,尚需结合试验室诊断方法进行确诊。目前主要的实验室诊断方法有免疫电镜法(IEM)、免疫荧光法(IF)、微量血清中和试验、ELISA 法、RT-PCR 法等。其中除 RT-PCR 方法外其它诊断方法多以全病毒制备的抗原或抗体作为基础的诊断试剂。另外,由于 PEDV 适应细胞培养难度高而且以病

**基金项目:**辽宁省教育厅高等学校科学研究项目“猪流行性腹泻免疫金标试纸条的研制及其应用”(2009A447)。

**第一作者简介:**张利勃,男,1974 年出生,硕士,讲师,研究方向为微生物学与免疫学。通信地址:121001 锦州市古塔区人民街五段 48 号辽宁医学院畜牧兽医学院。Tel: 0416-4672104, E-mail: gordon402@163.com。

**通讯作者:**高慎阳,男,1979 年出生,黑龙江大连池人,硕士,讲师,研究方向为分子病毒学与免疫学。通信地址:121001 锦州市古塔区人民街五段 48 号辽宁医学院畜牧兽医学院, E-mail: gordon402@126.com。

**收稿日期:**2010-08-30, **修回日期:**2010-09-20。

毒制备的抗原存在潜在的排散危险,因而目前常规诊断PED的诊断试剂只限于实验室中而未能适用于临床实践<sup>[5-7]</sup>。自Faulk和Taylor在1971年首先将胶体金引入免疫学以来,经过不断的技术革新改进现已发展成为一种成熟的被广泛应用于生物医学各领域的新方法,即胶体金免疫层析诊断法(Gold-Immunochromatography Assay, GICA)<sup>[8]</sup>。近年来中国的食品安全问题(如药残、食品添加剂)日益复杂,在控制食品供应源头上如畜禽疾病的诊断监测环节,目前急需一大批具有灵敏、快速、简便、经济等优点且适合于广大基层检疫人员操作的快速检测手段。免疫胶体金技术虽然起步晚但作为免疫标记技术的后起之秀完全满足以上提到这些优点,现已不仅仅局限于人类的疾病、孕情、毒品等方面的检测应用,在畜禽疾病诊断疫情监测方面亦具有巨大的发展潜力和应用前景<sup>[9]</sup>。目前国内尚未有关于应用该技术进行PED诊断的报道,所以针对PED免疫胶体金抗体检测技术进行探索,并以辽宁地方猪场为小范围试点进行初步应用研究将具有重要的示范作用和实用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 抗原与血清抗体 PEDV膜蛋白(M蛋白)表达抗原按之前报道方法制备<sup>[10]</sup>。病毒血清:猪流行性腹泻病毒(PEDV)阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)阳性血清、猪轮状病毒(PRoV)阳性血清、伪狂犬病毒(PRV)阳性血清、猪细小病毒(PPV)阳性血清,均为参照样品。以自制的金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)阳性高免血清作为质控血清。

1.1.2 试剂 胶体金标试纸成套材料均购自上海金标生物科技有限公司产品;金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)为Sigma公司产品;牛血清白蛋白(BSA)和Tris均为Amresco产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgG为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.1.3 临床抽检样品 2010年4月份从锦州的三个规模化猪场共采集了75份产前母猪血液样品,按免疫情况进行编号统计,分离血清于-20℃保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 SPA胶体金标记物的制备 将氯化金配制成0.01%水溶液,取100 mL煮沸2 min后,边搅拌边加入柠檬酸三钠(1%) 2 mL,煮沸至溶液颜色变成酒红色,冷却后加入双蒸水恢复到原体积,用0.2 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调至pH值至5.6,加入0.5 mg SPA混匀结合,室温作用20 min,再加入Tris-HCl(pH 8.0, 20 mmol/L)配制的BSA使终浓度为1%,4℃放置2 h后。经两次超速离

心、过滤纯化后的SPA金标产物置于4℃保存<sup>[11-12]</sup>。

1.2.2 硝酸纤维膜(NCM)的处理 将质控血清、重组表达M蛋白抗原倍比稀释到适宜浓度用自制微量加样笔依次间隔4 mm在NCM上划线,分别作为质控线、检测线,37℃干燥后于3% BSA PBS溶液中37℃封闭15 min,再次干燥后备用。

1.2.3 胶体金检测试纸的制备 将包被有SPA胶体金标记物的玻璃纤维(金标垫)、NCM、吸水滤纸分别固定在粘性PVC板上,依次作为加样垫、检测反应板、吸收垫。然后裁剪成3~4 mm宽的试纸条。

1.2.4 重复性检测与判定标准 将待检血清混入配制好的SPA金标溶液中,取100 μL加样,10 min内观察结果,若出现两条紫红色线,则判为阳性结果;若只有质控线出现紫色则为阴性;若质控线不显色则表明试验无效。重复试验以每批3次进行。

1.2.5 特异性检验 分别将PEDV、TGEV、PRoV、PRV和PPV阳性血清混入配制好的SPA金标溶液中进行特异性检测。

1.2.6 敏感性检验 将PEDV高免血清倍比稀释后,同时进行GICA和ELISA检测比较<sup>[13]</sup>。

1.2.7 临床样品检测 应用免疫胶体金试纸条对从当地猪场采集的血清样品进行GICA和ELISA检测比较<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 各工作液参数的确定

NCM上检测线M蛋白的包被最佳浓度为15 μg/mL,质控线质控血清包被最佳浓度为20 μg/mL(1:200稀释);氯金酸溶液pH值根据SPA等电点PI+0.5确定为5.6<sup>[14]</sup>;金标垫上SPA胶体金标记物的包被浓度为5 μg/mL。

### 2.2 重复性试验结果

取PEDV阳性血清和正常血清各3份,分别进行稀释加样,每份样品重复检测三次。阳性血清点样结果均为阳性,而正常血清均为阴性,证明重复性良好。

### 2.3 特异性试验结果

用TGEV、PRoV、PRV和PPV阳性血清进行GICA检测均为阴性,而PEDV阳性血清和PEDV M蛋白血清的检测结果均为阳性,证明该检测试纸特异性良好与其它腹泻病毒阳性血清无交叉反应,可以进行下一步的测试。

### 2.4 灵敏度检测结果

将PEDV阳性高免血清倍比稀释,同时进行间接ELISA和GICA检测,二者最低检出量均在1:(640~1280)范围内,证明敏感性相近(见表1)。

表1 ELISA与GICA灵敏度检测比较结果

倍比稀释	ELISA		GICA
	平均OD值	结果	结果
1:10	1.685	++++	+++
1:20	1.498	++++	+++
1:40	1.274	+++	+++
1:80	1.045	+++	+++
1:160	0.794	++	+++
1:320	0.56	++	++
1:640	0.374	++	++
1:1280	0.227	+	+
1:2560	0.107	-	-
1:50 <sup>N</sup>	0.103	-	-
1:50 <sup>P</sup>	1.289	+++	+++

注：“++++、+++、++、+”分别代表强阳性、阳性、弱阳性、疑似，“-”代表阴性；ELISA结果判定域值为S/N≥2.1为阳性，其它为阴性；<sup>N</sup>为阴性对照，<sup>P</sup>为阳性对照。

### 2.5 临床样品检测结果

将采集的75份猪血液样品进行GICA和ELISA检测比较结果见表2，两种方法检测的PEDV血清抗体阳性率分别为88.0%和89.3%。以ELISA方法为参考，两种方法的符合率达96%，GICA方法的特异性与敏感性分别为87.5%和97%，证明GICA检测结果可靠。

表2 对采集猪血清样品进行GICA和ELISA临床检测比较

GICA	ELISA		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	86.7% (65/75) <sup>A</sup>	1.3% (1/75)	88.0% (66/75)
阴性(-)	2.7% (2/75)	9.3% (7/75) <sup>A</sup>	12.0% (9/75)
合计	89.3% (67/75)	10.7% (8/75)	100% (75/75)

注：以ELISA方法为参考，两种方法的符合率为共同检出的阳性与阴性结果的百分比之和为86.7%+9.3%=96%；GICA方法的特异性=100×(GICA阴性检测结果)/(合计的ELISA阴性结果)，敏感性=100×(GICA阳性结果)/(合计的ELISA阳性结果)。

### 3 讨论

仔猪病毒性腹泻呈世界范围流行，严重危害养猪业发展。据报道中国仔猪腹泻死亡率达40%以上，而PED就是重要“祸首”之一<sup>[15]</sup>。由于缺少可用的简便快速的诊断方法，基层兽医人员仅凭临床经验很难对临床症状和病理特征相近的腹泻性疾病进行鉴别诊断，所以容易导致误诊进而防治不当。国内外报道的有关PED病原的诊断与PED血清抗体的检测方法几

乎都是基于体内或体外增殖手段获得的天然病毒粒子为基础或利用RT-PCR方法<sup>[16]</sup>。但由于分离提取病毒需要一定的专业条件且耗时长不便于基层人员掌握和使用，因而限制了这些方法的推广使用。近年来，基因工程重组技术和免疫胶体金标记技术的不断成熟发展，使PED、TGE等腹泻性疾病的快速诊断试剂的研制与开发成为了可能。为此，辽宁医学院畜牧兽医学院重点实验室据自身已有的PEDV M蛋白的系统研究基础，建立了针对PEDV血清抗体检测的GICA方法并进行了初步临床应用研究。试验结果表明GICA具有准确、快速、简便的优点。与ELISA参考方法相比，二者临床检测结果符合率达96%。而且该试验所需原料均已商品化，容易制成试剂盒用于PED临床监测和诊断。虽然目前只能进行定性检测，但临床应用试验结果表明该方法完全可以作为辅助诊断工具用于腹泻疾病的初筛和免疫水平的监测。这为广大畜主养殖的技术水平的提高，养殖经济的发展提供了一种有利技术保障。另外，在临床检测的75份产前母猪血清样品中PEDV血清抗体阳性率达88.0%~89.3%，说明仍有10%以上免疫空白猪只未得到保护，提示猪场应该提高猪只的免疫密度做好日常防控工作。

### 参考文献

- [1] 殷震,刘景华主编.动物病毒学(第2版)[M].科学出版社,1997,681-688.
- [2] B.E.斯特劳,S.D.阿莱尔,W.L.蒙加林,等.猪病学(第8版)[M].中国农业大学出版社,2000,181-187.
- [3] 蔡宝祥.介绍几种新近发现的猪传染病[J].畜牧与兽医,1982,(5):218-221.
- [4] 倪艳秀,林继煌,何孔旺,等.猪流行性腹泻研究概况[J].畜牧与兽医,2001,33(1):38-40.
- [5] 孙智锋,钱永清,方锡玲.抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的研制及其特性鉴定[J].中国兽医学报,1998,18(2):131-134.
- [6] Rodak L, Valicek L, Smid B, Nevorankova Z. 2005. An ELISA Optimized for Porcine Epidemic Diarrhoea Virus Detection in Faeces[J]. Veterinary Microbiology,105(1):9-17.
- [7] Ogawa H, Taira O, Hirai T, et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections[J]. Journal of Virological Methods,2009,160(1-2):210-214.
- [8] Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for the electron microscope[J]. Immunochemistry,1971,8(11):1081-1083.
- [9] 林彤,独军政,丛国正,等.胶体金标记免疫层析技术的最新应用进展[J].安徽农业科学,2010,16:8429-8431.
- [10] Shenyang G, Enhui Z, Baoxian L, et al. High-level prokaryotic expression of envelope exterior of membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Veterinary Microbiology,2007,123(1-3):

- 187-193.
- [11] 干小仙,王越,杨发柱,等.金标法检测广州管圆线虫特异性IgG抗体的研究[J].中国人兽共患病学报,2007,(4):345-347.
- [12] Slot JW, Geuze HJ. Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy[J]. Journal of Cell Biology,1981,90(2): 533-536.
- [13] 高慎阳,查恩辉,乔薪瑗,等.猪流行性腹泻病毒重组M蛋白膜外区的原核表达及鉴定[J].中国兽医杂志,2007(12):15-16.
- [14] Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali Ch, et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences[J]. Electrophoresis,1993,14:1023-1031.
- [15] 赵青,钟土木,毛方军,等.早期断奶仔猪腹泻病药物防治试验[J].浙江农业学报,2005(2):90-93.
- [16] Sozzi E, Luppi A, Lelli D, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. Research in Veterinary Science,2010,88 (1):166-168.