

乳胶凝集法快速检测猪圆环病毒 2 型

张慧敏 杨利 李广良 王琳 盛宗海 韩鹤友*

(华中农业大学理学院, 农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 发展了一种简单、快速、灵敏的乳胶凝集法用于猪圆环病毒 2 型的检测。合成了带有磺酸基的三元聚合物乳胶微球, 通过静电相互作用, 将猪圆环病毒 2 型单克隆抗体吸附到乳胶微球表面, 形成乳胶抗体复合物诊断试剂。乳胶抗体复合物诊断试剂表面抗体与病毒表面抗原发生特异性反应, 促使分散的乳胶微球凝集在一起, 出现肉眼可见的凝集现象, 而与去离子水、磷酸盐缓冲液、猪圆环病毒 1 型、猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒、猪细小病毒、猪传染性胃肠炎病毒不出现凝集现象。在最优化条件下, 病毒浓度检测范围为 $3.1 \times 10^5 \sim 8.00 \times 10^7$ copy/mL, 检出限为 1.0×10^5 copy/mL。采用本方法与 PCR 方法检测了 34 份临床血清样本, 结果的符合率达到 94.1%, 敏感性为 89.5%, 特异性达到了 100%。结果表明, 本方法可用于临床血清样品的检测, 在猪圆环病毒 2 型的检测中表现出良好的应用前景。

关键词 猪圆环病毒 2 型; 单克隆抗体; 乳胶凝集

1 引言

动物疾病不仅会造成巨大的经济损失, 而且会威胁人类的健康。猪圆环病毒(PCV) 属于圆环病毒, 是一种小的无囊膜的单链环状 DNA 病毒, DNA 大小为 1.76 kb, 平均直径约 17 nm, 是已知的最小的动物病毒之一^[1]。PCV 根据其基因组和抗原性分为两种类型: 猪圆环病毒 1 型(PCV1) 和 2 型(PCV2)^[2]。实验证明, PCV1 对猪没有危害, 而 PCV2 是断奶仔猪多系统衰竭综合症、猪呼吸道病综合症、猪皮炎肾病综合症的病原^[3,4]。在 2008 年第二十届世界猪病大会上, PCV 相关的疾病被列为危害养猪业的头号疾病。目前, PCV 相关疾病的诊断是通过检测 PCV2 的抗体实现的, 使用的方法有酶联免疫法、间接免疫荧光法、免疫过氧化物酶单层试验、胶体金免疫层析法等^[5-7]。然而, 动物是否患病可以更直接通过检测病毒判断^[8]。常用的检测 PCV2 的方法有聚合酶链式反应(PCR) 技术、病毒分离技术、原位杂交技术、免疫组化法及免疫荧光技术^[9,10]。但是这些方法目前仅限于实验室操作, 需要专业技术, 存在检测成本高、费时、易出现假阳性等缺点, 难以大范围推广。因此发展一种简便、快速的新方法对早期检测 PCV2 具有重要意义。

乳胶凝集试验(Latex agglutination test, LAT) 具有独特优点: 不需要特殊仪器、肉眼判断、操作简便、不需要专门培训; 检测时间短, 一般为 2 min; 价格低廉, 检测单份血清样品的成本比其它血清学和病原学方法低得多; 适于现场检测等, 在临床检验中被广泛应用^[11]。普通聚苯乙烯乳胶和抗体的结合是无选择性的物理静电吸附, 抗体很难结合到乳胶表面, 即使致敏上的抗体也容易从乳胶微球上脱落或者变性失活, 而使用多肽缩合剂或交联剂则操作过程繁琐、耗时^[12]。为此, 本实验以带有磺酸基的三元聚合物乳胶微球为载体, 获得单分散性好的乳胶, 通过调节 pH 值后乳胶微球表面带有较多的电荷, 易吸附抗体。将单克隆抗体吸附到乳胶表面, 制备乳胶抗体复合物诊断试剂。这种方法克服了普通乳胶致敏抗体的缺点, 不需使用交联剂, 提高了抗体的结合效率, 而且致敏上的抗体不容易从乳胶上脱落, 进而提高乳胶的敏感性和保质期, 适合产品开发和大规模生产的要求。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

LDZ4-0.8 型低速平衡微型离心机(北京医用离心机厂)。

2010-10-09 收稿; 2011-03-13 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20975042)、华中农业大学自主创新重大培育专项基金(No. 2010 PY 009)、国家大学生创新实验计划(No. 091050426) 资助

* E-mail: hyhan@mail.hzau.edu.cn

猪圆环病毒2型单克隆抗体、临床血清样本(华中农业大学动物科学技术学院提供)、苯乙烯(ST)、甲基丙烯酸甲酯(MMA)、甲基丙烯酸丙基磺酸钾(SPMAP)、 NH_4HCO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (分析纯,上海国药集团)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)其它试剂均为分析纯,实验用水均为超纯水。

猪圆环病毒2型毒株(PCV2)、猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒毒株(PRRSV)、猪细小病毒毒株(PPV)、猪传染性胃肠炎病毒毒株(TGEV)均由华中农业大学动物科学技术学院提供。

2.2 实验方法

2.2.1 苯乙烯-甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸丙基磺酸钾(ST-MMA-SPMAP) 乳胶的制备 参考文献[13]的方法,并进行改进。ST和MMA使用前减压蒸馏,除去阻聚剂。取14.10 mL ST、0.78 mL MMA、100 mL去离子水于250 mL三口瓶中,混合均匀,通氮气保护。待瓶中液体温度升至70℃时,将第一批混合液(0.438 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0.3 g NH_4HCO_3 , 0.1 g SPMAP, 10 mL H_2O)快速加入瓶中,在70℃聚合4 h后,加入第二批混合液(2.81 mL St, 0.16 mL MMA, 0.5 g SPMAP, 0.1 g NH_4HCO_3 , 10 mL H_2O)再聚合6 h。

2.2.2 乳胶抗体复合物诊断试剂的制备 取制备好的乳胶,以10000 r/min离心10 min,去掉上清液,用PBS重悬沉淀物至原体积的10倍;加入适量PCV2单克隆抗体,室温下孵育一定的时间,形成乳胶抗体复合物诊断试剂。制备好的乳胶呈现出均一的乳白色,图1为本实验方法合成的乳胶微球透射电镜图,可见乳胶微球粒径均匀且分散性很好,粒径约为160 nm。

2.2.3 LAT 操作程序和结果的判定 乳胶抗体复合物诊断试剂与待检血清中特异性抗原(即PCV2)相遇时,PCV2与乳胶微球表面抗体特异性结合,促使分散的乳胶微球凝集在一起,在玻片上形成肉眼明显可见的乳胶微球凝集块,即为阳性反应,如仍为均匀混浊的乳状悬液,则为阴性反应。具体操作步骤:在一块洁净载玻片上加一滴乳胶抗体复合物诊断试剂,再加一滴待检血清,用竹签迅速搅动混匀,在3~5 min内判定结果,5 min后的结果不作为判定依据。其凝集强度大致可分为以下几种:“++++”大量乳胶凝集,即100%凝集,颗粒聚于液滴的边缘,中间呈透明状;“+++”颗粒明显,液体几乎全透明,约75%乳胶凝集;“++”颗粒较小,约50%乳胶凝集;“+”液体呈浑浊,有较少的细小颗粒,约25%凝集;“-”液滴呈原有的均匀乳状,未凝集。

临床诊断时,阴性血清对照为“-”,以出现“++”者判为血清阳性,出现一个“+”号者判为可疑,对可疑的血清可进一步用PCR方法进行验证。

3 结果与讨论

3.1 乳胶偶联抗体条件的优化

3.1.1 最佳偶联抗体量的选择 将单克隆抗体(浓度为2.65 g/L)用PBS倍比稀释(1:1, 1:2, 1:4和1:8)在稀释好的乳胶中,各加入10 μL 不同浓度的单克隆抗体(抗体的加入量分别为26.5, 13.3, 6.6和3.3 μg)室温下反应1 h。反应完后与PCV2反应,观察凝集现象,结果见表1。实验表明,当抗体稀释2倍,即加入量为13.3 μg 时,偶联效果最佳。

表1 抗体加入量对检测结果的影响

Table 1 Influence of monoclonal antibody amount on detection results

抗体加入量 Antibody added (μg)	26.5	13.3	6.6	3.3
检测结果 Detection results	+++	++++	+++	++

+ : 25%的乳胶凝集; ++ : 50%的乳胶凝集; +++ : 75%的乳胶凝集; ++++ : 100%乳胶凝集; - : 未出现凝集。+ : latex agglutination 25%; ++ : latex agglutination 50%; +++ : latex agglutination 75%; ++++ : latex agglutination 100%; - : no latex agglutination.

3.2.2 最佳偶联时间的选择 在稀释好的乳胶中,加入10 μL 一定浓度的单克隆抗体,在室温下反应不同时间,反应完后与PCV2反应,观察凝集现象,结果见表2。实验表明,偶联时间为75 min时,偶联效果最佳。

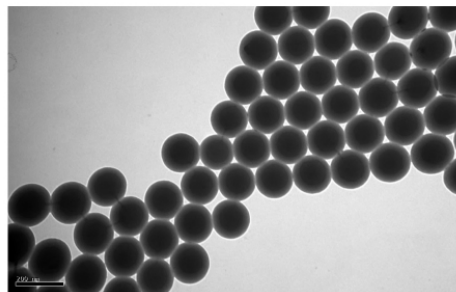


图1 乳胶微球透射电镜图

Fig. 1 TEM image of latex particles

3.2 乳胶抗体复合物诊断试剂自凝检测

致敏好的乳胶抗体复合物诊断试剂同等量去离子水和 PBS 反应, 没有观察到凝集现象, 证明乳胶抗体复合物诊断试剂性质稳定, 不会发生自凝反应。

3.3 LAT 检测结果

致敏好的乳胶抗体复合物诊断试剂不发生自凝现象, 对待检病毒进行 LAT 检测, 结果见图 2。乳胶抗体复合物诊断试剂与阳性血清反应呈现出明显的肉眼可见的凝集现象, 与阴性血清不反应, 仍呈现出原有的均一乳白色。

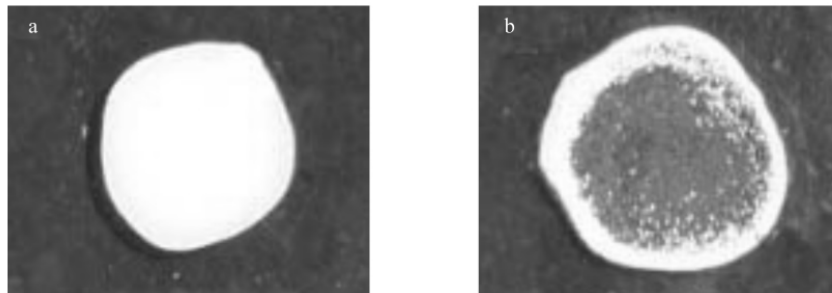


图 2 LAT 检测结果照片

Fig.2 Results of latex agglutination test

A. 乳胶抗体复合物诊断试剂与阴性血清反应结果; B. 乳胶抗体复合物诊断试剂与阳性血清反应结果。

A. Results of latex-antibody diagnostic reagent reacted with negative serum; B. Results of latex-antibody diagnostic reagent reacted with positive serum.

3.4 敏感性实验和特异性实验

将 8×10^7 copy/mL PCV2 依次稀释 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 和 512 倍, 分别用乳胶抗体复合物诊断试剂检测, 结果见表 3。实验表明, 乳胶抗体复合物诊断试剂的敏感性较强, 能与 256 倍稀释(浓度为 3.1×10^5 copy/mL) 的 PCV2 发生反应。

表 3 敏感性实验

Table 3 Sensitivity tests

稀释倍数 Dilution	2	4	8	16	32	64	128	256	512
检测结果 Detection results	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	-

表注同表 1 (Table notes are the same as in Table 1)。

乳胶抗体复合物诊断试剂与 PCV2 反应呈阳性, 与 PCV1, PRRSV, PPV 和 TGEV 等反应均无凝集现象, 特异性很好。

3.5 临床血清样本检测结果

PCR 是公认的检测 PCV2 的标准方法, 因此对 34 份临床血清样本分别进行 LAT 和 PCR 检测。如表 4 所示, 本方法与 PCR 的符合率达到了 94.1% (17 + 15/34), 敏感性为 89.5% (17/19), 特异性达到了 100% (15/15), 假阳性率为 0 (0/15), 假阴性率也在合理的范围内 10.5% (2/19)。

表 4 LAT 与 PCR 对临床样本检测结果

Table 4 Comparison of LAT and PCR for detection of clinical samples

	PCR			性能 Comparison		
	阳性 Positive	阴性 Negative	总数 Total	符合率 Efficiency (%)	敏感性 Sensitivity (%)	特异性 Specificity (%)
LAT	阳性 Positive	17	0	94.1	89.5	100
	阴性 Negative	2	15			
	总数 Total	19	15			

实验结果表明,与PCR相比,本方法在实际应用方面具有显著的优势:灵敏度高、特异性强、检测成本低、操作简便、快速、结果稳定。同其它检测方法相比,本方法不需要专业技术,检测耗时短,更适用于PCV2的早期诊断和大规模的临床检测,对减少养猪业的损失意义重大。

References

- 1 Pringle C R. *Archives of Virology*, **1999**, 144(10): 2065 ~ 2070
- 2 Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke E G, Ellis J A, Haines D M, Meehan B M, Adair B M. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **1998**, 10(1): 3 ~ 10
- 3 Chae C. *The Veterinary Journal*, **2005**, 169(3): 326 ~ 336
- 4 Choi J, Stevenson G W, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz C L, Mittal S K. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **2002**, 66(4): 217 ~ 224
- 5 Shang S B, Li Y F, Guo J Q, Wang Z T, Chen Q X, Shen H G, Zhou J Y. *Research in Veterinary Science*, **2008**, 84(1): 150 ~ 157
- 6 Allan G M, McNeilly F, Meehan B M, Kennedy S, Mackie D P, Ellis J A, Clark E G, Espuna E, Saubi N, Riera P, Botner A, Charreyre C E. *Veterinary Microbiology*, **1999**, 66(2): 115 ~ 123
- 7 Lefebvre D J, Costers S, Doorselaere J V, Misinzo G, Delputte P L, Nauwynck H J. *Journal of General Virology*, **2008**, 89(1): 177 ~ 187
- 8 Zhang H M, Li W T, Sheng Z H, Han H Y, He Q G. *Analyst*, **2010**, 135(7): 1680 ~ 1685
- 9 Lyoo K S, Kim H B, Joo H S. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **2008**, 20(3): 283 ~ 288
- 10 Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk L A. *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**, 38(9): 3474 ~ 3477
- 11 HE Qi-Gai, CHEN Huan-Chun, WU Bin, QIU De-Xin, LIU Heng-Gui, PENG Jin-Mei, XU Yin-Di(何启盖, 陈焕春, 吴斌, 邱德新, 刘恒贵, 彭金美, 徐引娣). *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报), **1999**, 21(6): 457 ~ 459
- 12 YANG Li-Li, WANG Zhen-Guo, WANG Ming-Tai, MU Jun, ZOU Ming-Qiang, LI Jin-Feng, WANG Nan, QIAN Ai-Dong (杨丽丽, 王振国, 王明泰, 牟峻, 邹明强, 李锦丰, 王楠, 钱爱东). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 29 ~ 33
- 13 YANG Ling-Lu, CONG Hai-Lin, CAO Wei-Xiao(杨凌露, 丛海林, 曹维孝). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), **2005**, 2: 223 ~ 225

Rapid Detection of Porcine Circovirus Type 2 by Latex Agglutination Test

ZHANG Hui-Min, YANG Li, LI Guang-Liang, WANG Lin, SEHNG Zong-Hai, HAN He-You*

(College of Science, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract A facile, rapid, ultrasensitive and visual method was developed for the determination of porcine circovirus type 2 (PCV2) based on latex agglutination test. Ternary polymer latex particles with sulfonic acid group were synthesized, then the monoclonal antibody of PCV2 bound to latex particles by electrostatic interactions and generated latex-antibody compound. The specific reaction of monoclonal antibody and virus showed visible agglutination phenomenon in the presence of a certain concentration of virus. Latex-antibody compound didn't react with deionized water, phosphoric acid buffer, porcine circovirus type 1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine parvovirus and porcine transmissible gastroenteritis virus. Under the optimized experimental conditions, the detection range of PCV2 was from 3.1×10^5 copy/mL to 8.0×10^7 copy/mL, and the detection limit was 1.0×10^5 copy/mL. Compared with PCR, the proposed method has good efficiency (94.1%), sensitivity (89.5%) and specificity (100%) in 34 serum samples analysis.

Keywords Porcine circovirus type 2; Monoclonal antibody; Latex agglutination

(Received 9 October 2010; accepted 13 March 2011)