

ELISA 法检测种蛋卵黄中 禽网状内皮组织增生症病毒抗体的研究

黄小洁,姚文生,杨承槐,孙莹,安肖,任小侠,李慧姣*,李俊平*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2015-09-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 02-0007-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究种蛋卵黄中禽网状内皮组织增生症病毒(REV)抗体的检测方法,运用 IDEXX 公司的 REV 抗体 ELISA 检测试剂盒,比较了不同提取方法、不同稀释倍数、不同洗液对卵黄中 REV 抗体检测结果的影响。结果显示:当用直接提取的卵黄液做 300 倍稀释检测,用含 0.05% 吐温-20 的蒸馏水洗涤时,卵黄抗体的 S/P 比值与相应鸡群的血清抗体的 S/P 比值吻合度最高。应用本方法分别对 50 枚 SPF 种蛋和 50 枚普通鸡蛋进行检测,SPF 种蛋均为 REV 抗体阴性;普通鸡蛋有 4 枚为 REV 抗体阳性,阳性率为 8%。实验表明,种蛋卵黄 ELISA 抗体检测法可以代替传统血清抗体检测,为 SPF 鸡群的 REV 感染监测奠定了基础。

[关键词] 网状内皮组织增生症病毒;ELISA;卵黄抗体

Study on the ELISA Detection for Avian Reticuloendotheliosis Virus Antibody in Egg Yolk

HUANG Xiao-jie, YAO Wen-sheng, YANG Cheng-huai, SUN Ying,

AN Xiao, REN Xiao-xia, LI Hui-jiao*, LI Jun-ping*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to detect avian reticuloendotheliosis virus antibody in egg yolk, the IDEXX ELISA kit for REV antibody detection was used, and the effects of different extraction methods, different dilution ratios and different distill water of egg yolk on detection results were compared. The result showed that the S/P ratio of egg yolk antibody was closer to that of serum ELISA antibody of the same chicken group when the egg yolk antibody was directly extracted from eggs and was diluted into 1:300, and distill water containing 0.05% Tween-20 was used. Using this ELISA method, 50 SPF eggs and 50 ordinary eggs were tested. The result showed that all of SPF eggs were REV antibody negative; four ordinary eggs were REV antibody positive with the positive rate of 8%. This study showed that egg yolk antibody ELISA detection method could replace the traditional serum antibody detection, and would lay the foundation for Rev infection monitoring of SPF chickens.

Key words: REV; ELISA; egg yolk antibody

作者简介: 黄小洁,助理研究员,从事实验动物管理工作。

通讯作者: 李慧姣, E-mail: lihuijiao@ivdc.org.cn; 李俊平, E-mail: lijunping@ivdc.org.cn

禽网状内皮组织增生症(RE)是指由反转录病毒科网状内皮组织增生症病毒(REV)引起的禽类以急性网状细胞肿瘤、生长抑制综合症、淋巴组织和其他组织的慢性肿瘤形成特征的一群病理综合症^[1]。REV不仅能够通过接触水平传播,还能通过鸡胚垂直传播,使用非SPF禽胚制备活疫苗存在污染REV的潜在危险。目前,SPF鸡胚生产企业主要通过检测鸡群血清抗体来确定鸡群的感染状态。然而,血清采集费时费力,还易引起鸡的应激反应,导致鸡只生产性能下降,甚至诱发疾病^[2],并且对于疫苗生产企业而言,送检血清的可靠性和真实性也难以保障^[3]。这些问题的存在促使整个行业不得不考虑能否以种蛋卵黄抗体检测来替代血清抗体检测。

卵黄抗体是指鸡、鸭、鹅等蛋禽卵黄中存在的抗体,也称卵黄免疫球蛋白^[4],本研究利用REV具有可垂直传播的特性,以及ELISA检测方法简便、准确、快捷的优势,研究运用ELISA方法检测卵黄中的REV抗体。美国IDEXX公司生产的REV抗体ELISA检测试剂盒是目前许多疫苗生产企业和研究单位进行REV抗体检测的首选试剂盒,但该ELISA抗体检测试剂盒是用于血清抗体的检测,能否用于卵黄抗体检测有待进一步验证。为此,本试验用该试剂盒对卵黄中REV抗体的ELISA检测方法进行研究,以期代替传统的血清抗体检测的方法用于SPF鸡群的REV感染监测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通产蛋鸡,购自北京某鸡场。

1.1.2 试剂盒 REV抗体ELISA试剂盒,批号GK160,购自IDEXX公司。

1.1.3 其他材料及试剂 SPF鸡蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司,普通鸡蛋购自北京某超市;氯仿、吐温20购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 样品收集血清 REV抗体阳性蛋鸡4只,抗体阴性蛋鸡1只,分别单独隔离饲养,每天收集

种蛋并作好标记,每周采集全血分离血清,连续收集4周。

1.2.2 卵黄抗体提取方法

1.2.2.1 直接提取法^[5] 吸取50 μL 卵黄,加入450 μL 稀释液,吹打混匀,作为被检样品冷冻保存备用。

1.2.2.2 氯仿萃取法^[6] 吸取300 μL 卵黄,加入600 μL 氯仿和900 μL 生理盐水,充分震荡混匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴30 min,期间搅拌2~3次,4000 r/min离心20 min,提取上层水相作为被检样品冷冻保存备用。

1.2.3 卵黄洗涤液的选择 将同一只鸡的血清和鸡蛋一一对应,血清和卵黄均做500倍稀释,每个样品做1个重复,结果取平均值。如果2个孔的读值差异太大,则重复检测。血清检测按REV ELISA抗体检测试剂盒说明书进行;卵黄分别用蒸馏水、含0.05%吐温20的蒸馏水两种洗液洗涤,其余步骤按REV ELISA抗体检测试剂盒说明书操作。

1.2.4 卵黄稀释度的确定 按照已确定的卵黄抗体提取方法和洗涤液,将卵黄做300、400、500、600、700倍稀释,进行ELISA抗体检测,检测结果与血清检测结果进行比较,吻合度最高的稀释度即为最佳卵黄稀释倍数。

2 结果

2.1 卵黄提取方法比较 本次实验抗体阳性组共采集血清样品16份,鸡蛋样品41份;抗体阴性组血清样品4份,鸡蛋样品11份。按照直接提取法和氯仿萃取法提取卵黄抗体,其他操作按试剂盒说明,血清按试剂盒说明检测。将OD值换算成S/P比值,同一次采样的血清抗体和卵黄抗体S/P比值分别取平均值比较。结果表明,不同提取方法阴性对照组血清和卵黄S/P比值均低于0.5,检测结果为阴性。阳性对照组的S/P值用spass软件分析,两种提取方法卵黄抗体S/P比值与血清抗体S/P比值的相关系数分别为0.764、0.946,且直接提取法卵黄抗体S/P比值更接近血清抗体水平(表1、图1)。

表1 血清抗体及不同提取方法卵黄抗体 S/P 比值

样品	处理方法	组别	不同采样点样本数量(n) 及 S/P 平均值							
			第1次		第2次		第3次		第4次	
			n	S/P	n	S/P	n	S/P	n	S/P
血清	/	阳性组	4	5.03	4	4.39	4	4.18	4	3.08
		阴性组	1	0.32	1	0.25	1	0.26	1	0.23
卵黄	氯仿提取法	阳性组	17	2.68	6	3.17	12	2.35	6	1.78
		阴性组	3	0.17	2	0.12	3	0.15	3	0.20
	直接提取法	阳性组	17	4.29	6	4.27	12	3.76	6	2.12
		阴性组	3	0.19	2	0.11	3	0.21	3	0.10

2.2 ELISA 洗涤液的确定 直接稀释的卵黄进行 ELISA 抗体检测, 分别用蒸馏水及含 0.05% 吐温-20 的蒸馏水两种洗涤液洗涤, 其他操作按试剂盒说明进行。结果蒸馏水及含 0.05% 吐温-20

的蒸馏水两种洗涤液卵黄抗体与血清抗体 S/P 值相关系数分别为 0.936, 0.997, 且用含 0.05% 吐温-20 的蒸馏水洗涤, 卵黄抗体 S/P 比值更接近血清抗体(表 2 和图 2)。

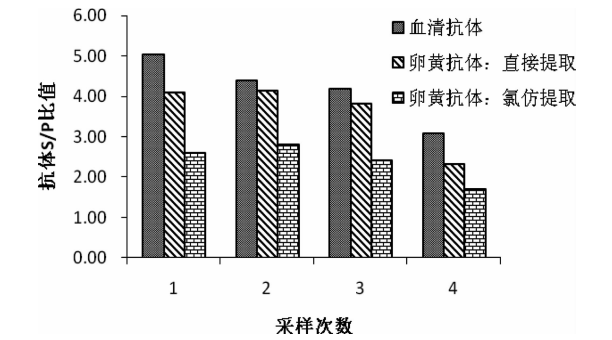


图1 阳性组不同提取方法卵黄抗体与血清抗体 S/P 比值比较

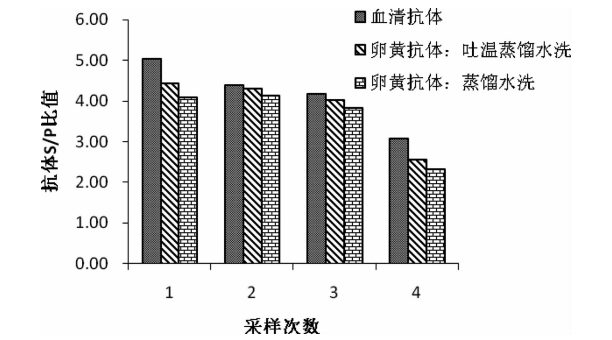


图2 阳性组不同洗涤液洗涤卵黄抗体与血清抗体 S/P 比值比较

表2 血清抗体及不同洗涤液洗涤卵黄抗体 S/P 比值

样品	处理方法	组别	不同采样点样本数量(n) 及 S/P 平均值							
			第1次		第2次		第3次		第4次	
			n	S/P	n	S/P	n	S/P	n	S/P
血清	/	阳性组	4	5.03	4	4.39	4	4.18	4	3.08
		阴性组	1	0.32	1	0.25	1	0.26	1	0.23
卵黄	蒸馏水洗涤	阳性组	17	4.29	6	4.27	12	3.76	6	2.12
		阴性组	3	0.19	2	0.11	3	0.21	3	0.10
	加 0.05% 吐温 20 蒸馏水洗涤	阳性组	17	4.45	6	4.49	12	3.87	6	2.63
		阴性组	3	0.20	2	0.20	3	0.17	3	0.19

2.3 卵黄样品稀释度的确定 按已确定的提取方法和洗涤液对 300、400、500、600、700 倍稀释的卵黄进行测定, 各稀释度卵黄与血清抗体相关系数依次为 0.961、0.851、0.724、0.595、0.476。结果表

明, 卵黄抗体进行 300 倍稀释时 S/P 比值最接近血清抗体水平, 并且随着稀释倍数的增加, 与血清抗体的 S/P 比值偏差增大(表 3、图 3)。

表3 血清抗体与不同稀释度卵黄抗体 S/P 比值

样品	处理方法	组别	不同采样点样本数量(n) 及 S/P 平均值							
			第1次		第2次		第3次		第4次	
			n	S/P	n	S/P	n	S/P	n	S/P
血清	/	阳性组	4	5.03	4	4.39	4	4.18	4	3.08
		阴性组	1	0.32	1	0.25	1	0.26	1	0.23
卵黄	300 倍稀释	阳性组	17	4.56	6	4.34	12	3.62	6	2.80
		阴性组	3	0.23	2	0.24	3	0.19	3	0.16
	400 倍稀释	阳性组	17	3.55	6	3.08	12	2.71	6	2.67
		阴性组	3	0.21	2	0.19	3	0.19	3	0.16
	500 倍稀释	阳性组	17	3.14	6	2.91	12	2.54	6	2.58
		阴性组	3	0.20	2	0.20	3	0.17	3	0.19
	600 倍稀释	阳性组	17	2.97	6	2.52	12	2.21	6	2.45
		阴性组	3	0.22	2	0.30	3	0.16	3	0.18
	700 倍稀释	阳性组	17	2.77	6	2.37	12	2.10	6	2.39
		阴性组	3	0.26	2	0.29	3	0.23	3	0.17

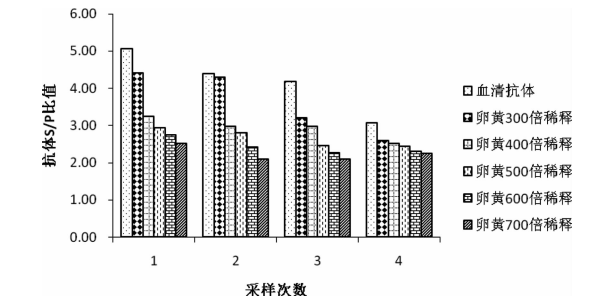


图3 阳性组不同稀释度卵黄抗体与血清抗体 S/P 比值比较

2.4 SPF 鸡蛋和普通鸡蛋样品检测结果 对 50 枚 SPF 种蛋和 50 枚普通鸡蛋进行检测,并经两次重复实验验证,SPF 鸡蛋均为 REV 抗体阴性,普通鸡蛋有 4 枚检测结果为 REV 抗体阳性,阳性率 8%。

3 小结与讨论

GB/T 17999-2008 规定 SPF 鸡群 REV 的监测采用琼脂扩散方法 (AGP) 或 ELISA 方法^[7]。AGP 既能够用于 REV 抗原检测,又能用于 REV 抗体检测,方法简便、快捷,但敏感性较低,且需要大量的纯化抗原或特异性血清^[8],因此在 SPF 鸡群的 REV 感染监测中大多使用 ELISA 方法检测血清抗体。但血清检测存在诸多技术问题,加之政策上 SPF 鸡(蛋)管理的认证、检测、使用等各个环节又是脱节的,疫苗生产行业对 SPF 鸡(蛋)使用量大但缺少有效的监控手段,疫苗生产企业与国内 SPF

鸡生产企业之间缺乏信赖,又无法获得可靠血清用于检测 SPF 鸡质量,如果能通过检测 SPF 种蛋卵黄抗体来替代血清抗体,这些问题将迎刃而解。

本试验结果表明,直接提取卵黄抗体的方法优于氯仿萃取方法,原因可能是在萃取的过程中会损失部分抗体,导致抗体检测 S/P 值降低。直接吸取卵黄检测抗体时,卵黄粘稠性大,使用冻融的方法能够降低卵黄的粘稠度。洗涤液中添加吐温能使洗涤更彻底,减少非特异性吸附,降低了背景值。不同卵黄稀释倍数的检测结果显示,稀释 300 倍时卵黄抗体与血清抗体的 S/P 比值最接近,卵黄稀释度过高,容易出现假阴性;而如果稀释度太低,容易出现非特异性吸附,产生假阳性。运用本研究确定的方法检测的 50 枚 SPF 鸡蛋均为 REV 抗体阴性,而普通鸡蛋则检测出了抗体,证实我国商品鸡群中有感染 REV 的情况。

本实验确定了卵黄抗体样品的处理方法、洗涤液的选择及最佳卵黄稀释倍数,通过现有 REV 抗体 ELISA 检测试剂盒,对种蛋卵黄 REV 抗体进行检测的方法可代替血清抗体检测,从而为监测 SPF 鸡群感染 REV 状况奠定了基础。

参考文献:

[1] Saif Y M. 禽病学[M]. 北京:中国农业出版社,2012.
[2] 杨百亮,郭羽. 琼扩试验检测鸡传染性法氏囊病卵黄抗体的研究[J]. 天津农学院学报,2004,11(4):27-29.

乌鳢舒氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验

齐冬梅¹,徐 蕙¹,易 婷²,王汉清¹,胡文军¹,张 震¹,林旭堃^{1*}

(1. 广东永顺生物制药股份有限公司,广州 511356;2. 广州市黄埔军校纪念中学,广州 510770)

[收稿日期] 2015-10-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 02-0011-04 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 对广东省佛山市某乌鳢养殖鱼场患病的乌鳢进行病原分离,将疑似分离菌 S-1 株进行形态和培养特性、生化特性鉴定、PCR 鉴定、药敏试验和人工感染等试验。结果表明,该分离菌为舒氏气单胞菌。药敏试验结果表明,本分离菌对壮观霉素、米诺环素、庆大霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、头孢类等多种药物敏感。本研究为舒氏气单胞菌病细菌学检测及治疗提供了科学依据。

[关键词] 乌鳢;舒氏气单胞菌;分离鉴定;药敏试验

Isolation, Identification and Drug Susceptibility of *Aeromonas schubertii* in Snakeheaded Fish

QI Dong-mei¹, XU Hui¹, YI Ting², WANG Han-qing¹, HU Wen-jun¹, ZHANG Zhen¹, LIN Xu-ye^{1*}

(1. Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical co., ltd, Guangzhou 511356, China;

2. Guangzhou Whampoa Military Academy Memorial Middle School, Guangzhou 510770, China)

Abstract: Bacterial pathogen was isolated in a snakeheaded fish farm in Foshan, Guangdong province. S-1 strain pathogenic bacterium was isolated from sick snakeheaded fish; the isolated bacterium was identified by morphological characteristics, biochemical characteristics researches, amplification of 16S rRNA by PCR and drug susceptibility test, experimental infection test. The isolated bacterium was confirmed as *Aeromonas schubertii*. Drug susceptibility test results showed that the isolated bacterium were sensitive to spectinomycin, minocycline, gentamycin, ofloxacin, norfloxacin and cephalosporin etc. The results provided scientific bases for detection and treatment of *Aeromonas schubertii*.

Key words: snakehead fish; *Aeromonas schubertii*; isolation and identification; drug susceptibility

作者简介: 齐冬梅,博士,从事微生物学与免疫学研究。

通讯作者: 林旭堃。E-mail: lxy68@21cn.com

[3] 赵 鹏,李德庆,董 宣. SPF 鸡感染禽白血病毒 A/B 亚群后血清抗体与卵黄抗体的变化及其相关性断[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(4): 614-620.

[4] 陈 斌,杨志华. 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的作用机理及应用前景[J]. 浙江畜牧兽医, 2005, (1): 9-10.

[5] 焦玉兰,朱秀同,赵玉龙,等. ELISA 法检测卵黄和血清中禽呼肠孤病毒抗体相关性试验[J]. 中国兽药杂志, 2013, 49

(2): 37-39.

[6] 郑立勇,乔彦良,马凤龙,等. 卵黄抗体不同提取方法的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, (1): 106-107.

[7] 全国动物防疫标准化技术委员会. GB/T 17999-2008 SPF 鸡微生物学监测[S]. 北京: 中国标准出版社.

[8] 庄金秋,梅建国,沈志强. 禽网状内皮组织增生症病毒检测方法研究进展[J]. 家禽科学, 2013, 10: 45-50.

(编辑:李文平)