

于秋良,潘百明,骆永泉,等.液相阻断酶联免疫和正向间接血凝试验检测猪口蹄疫抗体[J].江苏农业科学,2013,41(8):207-209.

# 液相阻断酶联免疫和正向间接血凝试验 检测猪口蹄疫抗体

于秋良<sup>1</sup>,潘百明<sup>1</sup>,骆永泉<sup>2</sup>,韦金龙<sup>1</sup>

(1.贺州学院,广西贺州 542899; 2.广西壮族自治区贺州市动物疫病预防控制中心,广西贺州 542899)

**摘要:**为分析猪口蹄疫免疫失败原因,建立合理的免疫程序,以广西壮族自治区昭平县莲昌生猪养殖场 36 头仔猪为试验材料,应用 ELISA 和 IHA 检测不同日龄猪口蹄疫抗体水平。结果表明:首免前母源抗体对抗体水平影响很大,由抗体水平低的经产母猪喂养的仔猪,其抗体水平较低;断奶后母源抗体影响逐渐被疫苗免疫取代,而对不同疫苗免疫 10~70 日龄仔猪的抗体变化观察中,2 种疫苗的抗体水平都处在稳定的状态,无较大差别。

**关键词:**口蹄疫;正向间接血凝试验;液相阻断酶联免疫试验;母源抗体

**中图分类号:** S852.52;S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0207-02

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 别称口疮、蹄痂,是由口蹄疫病毒引起的急性、热性、高度接触性传染病,易感动物达 70 多种,主要侵害偶蹄类兽,少见于人<sup>[1]</sup>。临床特征是口腔黏膜、蹄部和乳房皮肤发生水疱性疹。除口腔和蹄部病变外,还可见到食道和瘤胃黏膜有水疱和烂斑;胃肠有出血性炎症;肺呈浆液性浸润;心包内有大量混浊而黏稠的液体。恶性口蹄疫可在心肌切面上见到灰白色或淡黄色条纹与正常心肌相伴而行,如同虎皮状斑纹(别称虎斑心<sup>[2]</sup>)。猪一旦感染口蹄疫,病毒能在数月内保持其传染性;病猪肉食品、奶制品以及它所接触过的饲料、饲具、土壤等都将成为传染源,因此口蹄疫的发生很大程度上难以遏制。目前主要还是通过疫苗的注射,根据疫苗的免疫保护期,制定合理的免疫程序预防猪口蹄疫。然而,并不是注射疫苗在猪体内都能产生免疫力,抗体水平低往往受多种因素影响。

本研究主要以液相阻断酶联免疫(ELISA)和正向间接血凝试验(IHA)对广西壮族自治区昭平县联昌生猪养殖场口蹄疫进行抗体检测,从疫苗和母源抗体水平探究该场仔猪免疫失败原因,为有效预防口蹄疫的发生提供理论参考;同时比较 2 种方法在抗体检测方面的群体相关性,证明正向间接血凝试验检测方法对抗体检测是适用的<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 经产母猪 4 头,仔猪 36 头,由昭平县莲昌生猪养殖场提供。

包被缓冲液(pH 值 9.6):将试剂盒配备的碳酸钠缓冲液

胶囊 1 粒打开,将粉末倒入烧杯中,加入 100 mL 去离子水,配制成包被缓冲液。洗涤液(PAST):取试剂盒配备的 25 倍浓缩 PAST 液 10 mL 倒入烧杯中,加入 250 mL 去离子水作 1:25 稀释(pH 值降低时用 NaOH 调酸碱度到 7.4)。底物溶液:取 1 片柠檬酸-磷酸盐片剂溶于 100 mL 无离子水中,溶化后,取 50 mL 溶液,再加 1 片邻苯二胺(OPD)片剂,充分溶解,分装在 5 mL/瓶的药瓶内,在 -20 °C 避光下保存。

1.1.2 试验试剂 O 型口蹄疫血凝抗原规格效价 1:1 024,批号 20111013,中国农业科学院兰州兽医研究所;O 型口蹄疫阳性对照血清规格效价 1:1 024,批号 20110714,中国农业科学院兰州兽医研究所;O 型口蹄疫阴性对照血清批号 20111006,中国农业科学院兰州兽医研究所;猪口蹄疫 ELISA 试剂盒,荷兰赛迪公司;O 型口蹄疫疫苗,新疆天康畜牧生物科技有限公司;O 型口蹄疫疫苗,中农威特生物科技股份有限公司;200 mL 稀释液,1 L 去离子水,100 mL 稀释液。

1.1.3 试验设备 5~50  $\mu$ L 移液器、0.2~10  $\mu$ L 移液器、50~200  $\mu$ L 移液器、50~300  $\mu$ L 的 12 道移液器各 1 把;微量振荡器 MH-1,江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司;酶标仪 RT-6100,广东省深圳市雷杜生命科学股份有限公司;电热恒温箱 ZDP-A2080,上海智城分析仪器制造有限公司;吸水纸若干;液体稀释槽 1 个;塑料凹槽  $\times 2$ ;待测血清支架移液器塑嘴若干;96 孔 U 型血凝板  $\times 4$ ;96 孔 ELISA  $\times 2$ ;10 mL 移液管;烧杯若干;200 mL 量筒;吸耳球;封板膜若干。

### 1.2 试验方案

1.2.1 母源抗体干扰规律试验分组 在昭平县莲昌生猪养殖场防疫条件和饲养状况较差猪场进行检测,挑选正常健康经产母猪,产前采血检测口蹄疫抗体,所产仔猪每窝抽取 9 头,根据母猪抗体水平的高低将喂养仔猪分成 2 组进行抗体检测,于 10、20、30、40、50、60、70 日龄时采取血清 5 mL,进行口蹄疫抗体检测;在仔猪 20 日龄时用中农威特股份有限公司的 O 型疫苗<sup>[4]</sup>进行免疫,60 日龄时进行二次免疫,每头 2 mL。

1.2.2 不同疫苗检测抗体试验分组 在昭平县莲昌生猪养殖场防疫条件和饲养状况较差猪场进行检测,挑选正常健康

收稿日期:2013-01-07

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金(编号:2010GXNSFA013104)。

作者简介:于秋良(1968—),女,广西贺州人,实验师,从事微生物学实验教学及研究工作。E-mail:823705186@qq.com。

通信作者:潘百明,教授、兽医师,从事微生物学教学和生物技术应用研究。E-mail:Pbmy5170@163.com。

经产母猪,产前采血检测口蹄疫抗体,所产仔猪每窝抽取9头,根据2种O型口蹄疫疫苗将仔猪分成2组进行抗体检测,于10、20、30、40、50、60、70日龄时采取血清5 mL,进行口蹄疫抗体检测;在仔猪20日龄时分别用新疆天康畜牧有限公司和中农威特有限公司的O型疫苗进行免疫,60日龄时进行二次免疫,每头2 mL。

### 1.3 试验方法

采用《口蹄疫防治技术规范正向间接血凝试验》中的“正向间接血凝试验方法”进行检测,观察阴性对照血清1:16孔,稀释液对照,均应无凝集(血球全部沉入孔底形成边缘整齐的小圆点)或仅出现“+”凝集(血球大部沉于孔底,边缘有少量血球悬浮);阳性血清对照1:2~1:256各孔从“++”凝集变为“+++”凝集为合格(少数血球沉入孔底,大部分血球悬浮于孔内),在对照孔合格的前提下,观察待测血清各孔,结果以1:128(U型板第7孔)出现50%血凝为阳性,否则为阴性。

采用从荷兰赛迪公司进口的O型口蹄疫酶联免疫检测试剂盒进行检测,病毒抗原对照至少2孔的 $D_{492\text{nm}}$ 值为1.0以上;阳性对照抗体滴度应为1:(1 024±1)滴度;阴性对照抗体滴度应大于1:4,阳性孔的 $D_{492\text{nm}}$ 值等于临界值时多对应的稀释度为该份血清的抗体滴度,结果以临界值所对应的滴度≤1:64时99%以上保护为阳性,否则为阴性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同母源抗体对仔猪抗体的影响

以中农威特疫苗免疫对仔猪70日龄免疫程序的控制,采取血样的抗体水平符合免疫程序设计(图1),抗体水平随时间的变化符合免疫程序走势,抗体免疫程序符合标准。2组同时接受初乳,10日龄时测得母源抗体合格喂养组抗体水平的平均值为8 log<sub>2</sub>,母源抗体不合格喂养组抗体水平的平均值为6.5 log<sub>2</sub>,此后呈下降趋势;20日龄注射口蹄疫疫苗,抗体水平有所升高;28日龄后仔猪断奶,检测抗体差距减小,表明母源抗体影响逐渐减弱,疫苗影响逐渐增强,但受到母源抗体的影响,抗体检测合格的母猪所喂养的仔猪抗体检测优于抗体检测不合格的母猪。

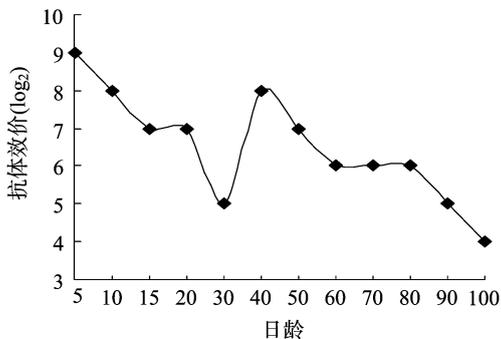


图1 仔猪的母源抗体变化规律

### 2.2 ELISA 和 IHA 重复性比较

对18头70日龄仔猪应用液相阻断酶联免疫和正向间接血凝试验检测抗体,结果见表1。

由表1可见,用ELISA检测猪的合格数为11头,用IHA检测的合格数为12头,抗体检测合格率分别为61.1%和66.7%,

表1 猪场18头70日龄仔猪抗体检测结果

编号	ELISA	结果	IHA	结果
A1	1:96	+	7	+
A2	1:128	+	8	+
A3	1:48	-	7	+
A4	1:24	-	5	-
A5	1:96	+	7	+
A6	1:128	+	7	+
A7	1:768	+	8	+
A8	1:96	+	7	+
A9	1:48	-	7	+
B1	1:96	+	6	-
B2	1:24	-	4	-
B3	1:48	-	5	-
B4	1:320	+	7	+
B5	1:128	+	7	+
B6	1:96	+	7	+
B7	1:48	-	5	-
B8	1:96	+	7	+
B9	1:24	-	5	-

注:“+”为合格,“-”为不合格。

而造成合格率降低的主要是由B1~B9号母源抗体水平低的仔猪抗体检测不合格数较多造成的。表中编号A3、A9、B1所测抗体在定性上个体相关性存在差异。

从表2可见,2种检测方法从18头仔猪中检测出3头具有差异性,经计算,两者符合率为83.3%,符合率较高。2种检测方法在检测过程中存在检测差异,但根本上可表现出检测的准确性。

表2 猪场ELISA和IHA检测结果比较

检测方式	检测数(头)	合格数(头)	合格率(%)
IHA	18	12	66.7
ELISA	18	11	61.1

注:符合率为定性相同血清数与检测总数的比值,2种检测方法的符合率为83.3%。

### 2.3 不同疫苗对抗体的影响

由表3可见,10日龄时2种疫苗抗体检测的阳性数分别为9、8头,合格率都很高;10~20日龄时抗体检测的阳性率变化较大,而20日龄后首次免疫抗体水平消减迅速,这些数据与近期研究的首次免疫不稳定是相符的<sup>[5]</sup>。对2组数据进

表3 注射新疆天康疫苗、中农威特疫苗抗体检测结果

日龄	注射新疆天康疫苗的抗体			注射中农威特疫苗的抗体		
	检测数(头)	阳性数(头)	合格率(%)	检测数(头)	阳性数(头)	合格率(%)
10	9	9	100	9	8	88.9
20	9	5	55.6	9	5	55.6
30	9	7	77.8	9	7	77.8
40	9	8	88.9	9	8	88.9
50	9	6	66.7	9	5	55.6
60	9	5	55.6	9	5	55.6
70	9	7	77.8	9	7	77.8

刘晨, 哈斯亚提·托逊江, 热沙来提汗·买买提, 等. 香梨与牧草套种对产草量及土壤性状的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 209-211.

# 香梨与牧草套种对产草量及土壤性状的影响

刘晨, 哈斯亚提·托逊江, 热沙来提汗·买买提, 万江春, 艾比布拉·伊马木

(新疆农业大学草业与环境科学学院/新疆草地资源与生态重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:**通过在香梨成龄果林行间套种高羊茅、鸭茅、多年生黑麦草和苏丹草, 与不种草对照区比较, 研究果园套种对牧草产量和土壤相关性状的影响。结果表明, 香梨套种高羊茅、鸭茅、多年生黑麦草和苏丹草的年干草产量分别为 5 451.0、4 711.6、3 622.9 与 11 120.0 kg/hm<sup>2</sup>; 供试牧草地下根量的 90% 以上都分布在 0~20 cm 土层, 与对照区相比, 香梨套种高羊茅、鸭茅、多年生黑麦草和苏丹草, 土层 0~30 cm 的土壤含水量增加, 土壤容重降低, 土壤中速效磷、碱解氮和速效钾含量有增加趋势。香梨套种牧草不仅能保证牧草产量和品质, 而且对果园土壤表层的水肥没有负面影响。

**关键词:** 香梨; 牧草; 套种; 牧草产量; 土壤性状

**中图分类号:** S540.47; S158.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0209-03

随着西部开发战略和优势资源转化战略的实施, 林果业在新疆农业结构战略性调整中得到快速、规模化发展并占据着重要地位。库尔勒香梨是新疆重要的果林之一, 采用大冠稀植栽培方式<sup>[1]</sup>。由于大多成龄香梨已绿树成荫, 树木行间光照不足, 套种小麦、棉花等常规农作物会出现生长不良, 产量低等状况。但是, 牧草及饲草作物主要以地上生物量作为饲料, 草类的生长受光热及水肥的影响相对低于谷类作物和经济作物。果林行间套种牧草, 不仅可以充分利用果地生产牧草饲料, 抑制杂草生长<sup>[2]</sup>, 改善园内的生态环境<sup>[3]</sup>, 而且有利于果园病虫害天敌的繁衍生息<sup>[4]</sup>, 种植多年生牧草还可以节约管理成本。李会科等<sup>[5-7]</sup>研究结果表明果园种草后能够改善表层土壤的物理性状, 降低表层土壤容重, 增加林间土壤的贮水能力, 提高土壤孔隙度, 有利于果园土壤物理性状的持续

改善。李建刚等<sup>[8]</sup>调查发现实行林草间作模式经营具有以短养长的经济效果, 在发挥土地生产潜力的同时也促进了农民生活水平的提高和农村经济的发展。本研究通过在香梨成龄果林行间套种牧草, 观察牧草产量及果林间套种牧草对土壤水分和养分含量的影响, 为成龄果林行间的种草利用, 增加农区饲料资源, 推动畜牧业发展提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验地位于库尔勒市哈拉玉宫乡, 属暖温带大陆性干旱气候, 年均积温( $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 4 200 $^{\circ}\text{C}$ 以上, 总日照数 2 990 h, 无霜期 170~227 d, 年平均气温 11.4 $^{\circ}\text{C}$ , 最低为 -28 $^{\circ}\text{C}$ , 年平均降水量 58.6 mm, 年最大蒸发量为 2 788.2 mm。该乡现有耕地 10 133.2 hm<sup>2</sup>, 其中库尔勒香梨面积达 3 427.2 hm<sup>2</sup>, 多采用宽行[株行距(3~4)m × (5~6)m]栽种方式。本试验使用成龄香梨果园 0.4 hm<sup>2</sup>, 树龄为 17 年, 株行距为 4 m × 6 m。

### 1.2 供试牧草品种及种植方法

依据牧草品种在香梨园内设置 4 块种草试验区, 每块面积 300 m<sup>2</sup>, 试验地先施基肥(其中 N 75 kg/hm<sup>2</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 225 kg/hm<sup>2</sup>, K<sub>2</sub>O 90 kg/hm<sup>2</sup>), 然后用旋耕机旋耕整地。设置

收稿日期: 2013-01-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划(编号: 201231114)。

作者简介: 刘晨(1986—), 男, 湖北宜城人, 硕士研究生, 研究方向为牧草生产与育种。E-mail: liuchen\_maple@163.com。

通信作者: 艾比布拉·伊马木, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: abblymm@hotmail.com。

行比较可以看出, 应用 2 种 O 型口蹄疫疫苗检测出的结果有很大的相似性, 不同的口蹄疫疫苗不是影响抗体变化的主要原因。

## 3 结论

造成昭平县莲昌生猪养殖场免疫失败的主要因素是母源抗体的干扰, 母源抗体能降低疫苗对仔猪的免疫作用。ELISA、IHA 检测都较准确, 但应用 IHA 耗时 2~3 h, 同时试剂盒操作也简单, 而应用 ELISA 需 1 天 1 夜才能出结果, 从经济角度看应用 IHA 优于 ELISA 的检测。抗体水平存在个体差异, 一方面是个体免疫应答存在差异, 另一方面检测方法也会导致数据误差。因此, 建议注重口蹄疫的抗体检测, 根据抗体检测结果合理安排免疫程序, 对免疫低下的猪及时补针, 从

而使猪处于较高的免疫保护。

## 参考文献:

- [1] 甘肃农业大学兽医系. 简明兽医词典[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 刘晓松. 家畜口蹄疫研究概况及防治措施[J]. 内蒙古畜牧科学, 2001, 21(1): 46-48.
- [3] 李金海, 张东, 王泽洲, 等. 用酶联免疫吸附和正向间接血凝试验检测猪瘟疫抗体[J]. 四川畜牧兽医, 2003, 30(7): 24, 27.
- [4] 刘威, 卫广森. 口蹄疫疫苗研究的进展[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(12): 56-69.
- [5] 刘颖, 冉多良, 王香祖. O 型口蹄疫疫苗免疫家畜抗体水平的检测[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 38-41.