

不同方法对夏南牛口蹄疫免疫抗体水平检测的比对试验

石先华¹, 张成峰², 李静², 柏中锋², 孙秀玉³, 王之保^{3*}

(1. 泌阳县动物疫病预防控制中心, 河南 泌阳 463700; 2. 泌阳县动物卫生监督所, 河南 泌阳 463700;
3. 泌阳县夏南牛研究推广中心, 河南 泌阳 463700)

摘要: [目的] 为探索中小规模养牛场自繁自育条件下, 繁殖母牛(指经产 1 胎以上的母牛, 下同)、断奶犊牛(指 4 月龄以上的犊牛, 下同)口蹄疫适宜的免疫时间, 检测口蹄疫免疫的效果, 为中小规模养牛场制定科学的口蹄疫免疫程序提供参考数据, 开展本试验。 [方法] 采用液相阻断 ELISA、固相竞争 ELISA 两种检测方法进行比对试验。 [结果] 采用液相阻断 ELISA 试验结果显示: 繁殖母牛抗体效价, 在免疫后 30 d, 60 d, 90 d 和 120 d 时免疫抗体合格率分别为 65.6%, 87.5%, 78.1% 和 46.8%; 断奶犊牛在免疫后 10 d, 40 d, 70 d, 100 d 时免疫抗体合格率分别为 75%, 100%, 83.3%, 41.6%。采用固相竞争 ELISA 试验结果显示: 繁殖母牛抗体效价, 在免疫后 30 d, 60 d, 90 d, 120 d 时免疫抗体合格性率分别为 78.1%, 100%, 100%, 75%; 断奶犊牛在免疫后 10 d, 40 d, 70 d, 100 d 时免疫抗体合格率分别为 83.3%, 100%, 100%, 75%。 [结论] 从试验结果来看, 固相竞争 ELISA 试验检测只能判定结果是抗体阳性、或抗体阴性, 试验操作简单方便, 结果判定也容易辨别, 但与液相阻断 ELISA 试验结果相比, 抗体水平检测有一定的误差。

关键词: 口蹄疫; 抗体检测; 方法比对

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2020)04-0027-03

长期以来“北繁南育”一直是我国肉牛养殖的主流模式, 这种模式是造成我国肉牛疫病流行的主要原因之一, 同时运输应激也为肉牛育肥企业带来了较大损失。近年来随着肉牛价格的持续攀升, 肉牛育肥利润空间的增大, 作为夏南牛主产区的河南省泌阳县, 过去一些以饲养繁殖母牛为主的养殖场、特别是一些中小规模的养殖场户逐步向自繁自育转型。目前受饲养条件、饲养方式、从业人员文化素质、技术人才缺乏、管理水平等因素的影响, 口蹄疫仍然是制约中小规模养殖场户发展的重要瓶颈之一。为探索中小规模养牛场自繁自育条件下, 繁殖母牛、断奶犊牛口蹄疫适宜的免疫时间, 检测口蹄疫免疫的效果, 为中小规模养牛场制定科学的口蹄疫免疫程序提供参考数据, 河南省肉牛产业技术体系泌阳综合试验站, 在河南省现代农业产业技术体系专项经费支持下, 开展了《不同方法对夏南牛口蹄疫免疫抗体水平检测的比对试验》。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验牛 试验牛来自泌阳县羊册镇保才养

牛场饲养的 32 头夏南牛繁殖母牛和 12 头断奶犊牛, 繁殖母牛在免疫后 30 d, 60 d, 90 d, 120 d 采集血样; 断奶犊牛在免疫后 10 d, 40 d, 70 d, 100 d 采集血样, 疫苗为国家招标采购的口蹄疫 O 型灭活疫苗(OHM/02 株), 每头牛 2 mL, 肌肉注射。

1.1.2 采血器材 采血器材有采样箱、试管架、一次性离心管、5 mL 注射器、酒精棉球、干棉球、记号笔、牛鼻钳或绳子、不干胶标签、签字笔、采样单、乳胶手套、一次性鞋帽、口罩、一次性防护服等。

1.1.3 检测试剂与设备 口蹄疫 O 型抗体检测 LB-ELISA 试剂盒(新模式, 生产批号: E190704, 生产日期: 20190724), 生产厂家为: 洛阳莱普生信息科技有限公司; 口蹄疫 O 型抗体检测固相竞争 ELISA 试剂盒(生产批号: 20190726)生产厂家为: 内蒙古金迈诗生物科技有限公司。检测仪器为美国伯腾全自动酶标仪, 型号 ELX-800。

1.2 方法

1.2.1 牛源准备 对被选繁殖母牛、断奶犊牛注射天康生物股份有限公司生产的口蹄疫 O 型灭活疫苗(OHM/02 株) 每头牛 2 mL, 肌肉注射。

收稿日期: 2020-03-19 修回日期: 2020-03-28

基金项目: 河南省现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(Z-2013-08-01)

作者简介: 石先华(1982—), 女, 河南泌阳人, 兽医师, 主要从事动物疫病防控和技术推广工作。

* 通讯作者: 王之保(1964—), 男, 河南泌阳人, 高级兽医师, 主要从事肉牛培育、品种改良和技术推广工作。

在繁殖母牛免疫后 30 d, 60 d, 90 d, 120 d, 断奶犊牛免疫后 10 d, 40 d, 70 d, 100 d 采血 5 mL, 检测口蹄疫抗体效价; 当 O 型口蹄疫抗体效价 $< 1:64$ 时, 视为抗体水平不合格。查找原因, 确定下次免疫时间。

1.2.2 血样制备 母牛采用尾静脉采血, 先将 5 mL 注射器针头换用 9 号针头备用, 固定牛, 使牛尾向上翘。在离尾根 10 cm 左右中点凹陷处, 先用酒精棉球消毒, 然后用换好的注射器垂直刺入约 1 cm 深, 针头触及尾骨后退出 1 mm 进行抽血, 每头牛不少于 3 mL。采血结束, 消毒并用棉球按压止血。

犊牛采用颈静脉采血: 将断奶犊牛保定好, 使其头部稍前伸, 并稍偏向对侧, 对颈静脉局部进行剪毛、消毒, 看清颈静脉后, 采血者用左手拇指或食指与中指, 在采血部位稍下方, 压迫静脉血管、使之充盈怒张。如果不剪毛时用手触摸, 感觉圆滑、有弹性即是血管, 另一手执 5 mL 注射器, 与皮肤成 45° 角。由下方向上方用力刺入皮肤与血管内, 见有血液流出后即可采集血样, 每头牛不少于 3 mL。采血结束, 消毒并用棉球按压止血。

分离血清: 将采集的牛全血倾斜 45° 角, 放置室温静止 1 h 后, 以 4 000 r/min 离心全血 5 min, 取上清液, 并用记号笔对每份样品进行标记, 待备用。

1.2.3 检测方法与判定标准 一是采用液相阻断 ELISA 检测试剂盒 (LB-ELISA), 对制备的牛血清样品进行 O 型口蹄疫抗体检测, 试验操作及抗体效价判定。用液相阻断 ELISA 检测方法, 对牛血清样

品进行稀释度检测。根据抗体试剂盒说明书判定标准: 抗体效价 $\geq 1:128$, 判为阳性; 抗体效价 $< 1:128$, 判为阴性; ELISA 抗体效价与免疫动物攻毒保护关系: 牛、羊抗体效价 $\geq 1:128$, 99% 以上保护; 抗体效价在 $(1:22) \sim (1:90)$ 之间, 50% 保护; 抗体效价 $\leq 1:16$, 不保护。二是采用固相竞争 ELISA 检测试剂盒, 对制备相对应的牛血清样品进行 O 型口蹄疫抗体检测, 试验操作及抗体效价判定, 根据抗体试剂盒说明书的判定标准: 若 S/N 值 ≥ 0.4 , 样品口蹄疫抗体为阳性, 若 S/N 值 < 0.4 , 样品口蹄疫抗体为阴性, 阳性判定为抗体合格、阴性判定为抗体不合格并与液相阻断 ELISA 检测结果进行比对。

2 结果与分析

2.1 繁殖母牛口蹄疫 O 型抗体检测

两种方法检测在繁殖母牛口蹄疫免疫抗体合格率时结果符合度不高。从表 1 可以看出, 从检测的 32 头繁殖母牛血样中, 采用液相阻断 ELISA 检测方法, 在口蹄疫免疫后第 60 天, O 型口蹄疫抗体合格率达 87.5%, 在免疫后 120 d 时抗体合格率达 46.8%。抗体合格率没有达到 100%; 采用固相竞争 ELISA 检测方法, 在口蹄疫免疫后第 60, 90 天时抗体合格率均达到 100%, 在免疫后 120 d 抗体合格率达 75%。

从图 1 可以看出, 采用液相阻断 ELISA 检测方法抗体衰减时间早于固相竞争 ELISA 检测方法。两种检测方法出现抗体衰减变化规律不一致。

表 1 繁殖母牛口蹄疫 O 型抗体检测结果分析

免疫后		液相阻断 ELISA		固相竞争 ELISA	
监测时间	样品数	合格数	合格率/%	合格数	合格率/%
第 30 天	32	21	65.6	25	78.1
第 60 天	32	28	87.5	32	100
第 90 天	32	25	78.1	32	100
第 120 天	32	15	46.8	24	75

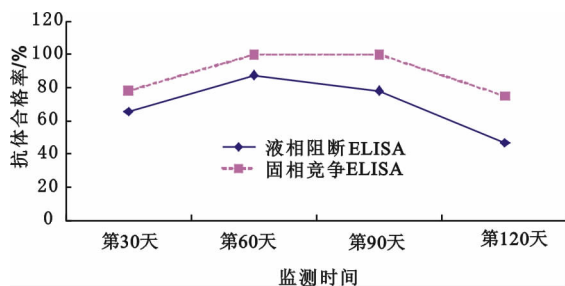


图 1 繁殖母牛口蹄疫 O 型抗体衰减变化

2.2 断奶犊牛口蹄疫 O 型抗体检测结果

两种方法在检测犊牛口蹄疫免疫抗体合格率时表现出一定的一致性。从表 2 中看出, 从检测的 12 头断奶犊牛血样中, 采用液相阻断 ELISA 检测方法, 在免疫后第 40 天时抗体合格率达 100%, 而在免疫后第 100 天, 抗体合格率下降至 41.6%, 已是群体免疫不合格; 采用固相竞争 ELISA 检测方法, 在口蹄疫免疫后第 40, 70 天时抗体合格率均达到 100%, 在免疫后 100 d 抗体合格率达 75%。两种检

测方法在犍牛免疫第40天时,抗体合格率均达到了100%。

从图2可以看出,采用液相阻断ELISA和固相竞争ELISA两种检测方法,在口蹄疫免疫后第40天

时抗体合格率均达到100%检测结果一致;在第70、100天时,液相阻断ELISA检测方法抗体衰减时间早于固相竞争ELISA检测方法。

表2 断奶犍牛口蹄疫O型抗体检测结果分析

免疫后		液相阻断ELISA		固相竞争ELISA	
监测时间	样品数	合格数	合格率/%	合格数	合格率/%
第10天	12	9	75.0	10	83.3
第40天	12	12	100.0	12	100.0
第70天	12	10	83.3	12	100.0
第100天	12	5	41.6	9	75.0

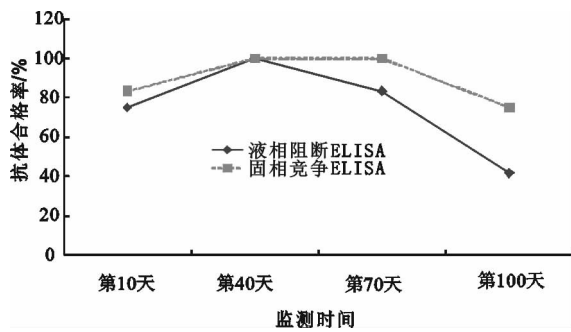


图2 断奶犍牛口蹄疫O型抗体衰减变化

3 结论

(1)在肉牛养殖生产中,检测牛口蹄疫免疫抗体水平时,液相阻断ELISA和固相竞争ELISA两种检测方法均可行。

(2)采用液相阻断ELISA试验结果显示:口蹄疫O型灭活疫苗抗体效价,繁殖母牛在免疫后30d时免疫抗体合格率为65.6%,在免疫后60d时抗体效价最高,免疫抗体合格率为87.5%,在免疫后90d抗体效价开始下降,免疫抗体合格率为78.1%,在免疫后120d时免疫抗体合格率为46.8%;断奶犍牛在免疫后10d时免疫抗体合格率为75%,在免疫后40d时抗体效价最高,免疫抗体合格率为100%,在免疫后70d抗体效价开始下降,免疫抗体合格率为83.3%,在免疫后100d时免疫抗体合格率为41.6%。

(3)采用固相竞争ELISA试验结果显示:口蹄疫O型灭活疫苗抗体效价,繁殖母牛在免疫后30d时免疫抗体合格率为78.1%,在免疫后60d、90d时免疫抗体合格率均为100%,在免疫后120d时免疫抗体合格率为75%;断奶犍牛在免疫后10d时免疫抗体合格率为83.3%,在免疫后40d、70d时免疫抗体合格率均为100%,在免疫后100d时免疫抗体合格率为75%。

4 讨论

(1)固相竞争ELISA试验操作简单方便,而且成本较低,适宜中小规模牧场推广使用;但只能判定结果是抗体阴性,或阳性,并未能检测出精确的抗体滴度。而液相阻断ELISA虽然试验操作时间长、技术要求高、检测成本也较高,但能够检测出准确的抗体滴度,适宜大型规模牧场进行检测。

(2)液相阻断ELISA试验结果显示,繁殖母牛O型口蹄疫抗体在免疫疫苗后120d时,抗体合格率为46.8%;断奶犍牛在免疫疫苗后100d时,抗体合格率为41.6%;远远低于国家规定70%以上的标准,抗体效价已起不到群体保护作用,感染口蹄疫风险较大。

(3)液相阻断ELISA与固相竞争ELISA检测口蹄疫抗体结果有一定的误差,可能是试验人员操作原因,也可能是结果判断不准确的原因造成的,有待后续试验进一步验证。

(4)本试验缺少对参试牛基础免疫的检测数据,试验方案存在不完善的地方,对本试验结果也有一定的影响;同时试验结果仅是本批次试验数据的简单分析,没有重复试验数据做比对,不具有广泛的代表性,仅做参考。

5 建议

本次参试的繁殖母牛采用液相阻断ELISA检测法O型口蹄疫免疫抗体合格率没有达到100%,犍牛虽然在第40天时达到了100%,但迅速衰减。说明该养牛场免疫程序、免疫操作不规范,建议繁殖母牛在免疫120d后进行补免补防,断奶犍牛在免疫100d后进行补免补防。

感谢范秀丽老师免费提供的固相竞争ELISA试剂盒!

(下转第43页)

Analysis of the Relationship Between the Slaughter Rate of Fattened Beef Cattle and the Living and Carcass Prices

TIAN Chun-hua, SHAO Cai-ping

(Animal Husbandry Management Station, Zhangye, Gansu 734000)

Abstract: This paper discusses the relationship between the rate of breeding and fertilizer slaughter and the price of the body in the body, through the assumption of the daily price of the sale of the slaughterhouse. To promote the quality evaluation of beef cattle slaughter processing enterprises.

Key words: slaughter rate of fattened beef cattle; the living prices; the carcass prices

(上接第 29 页)

A Comparative Test of Different Methods for the Detection of Immune Antibody Levels Against Foot and Mouth Disease in Xianan Cattle

SHI Xian-hua¹, ZHANG Cheng-feng², LI Jing²,

BO Zhong-feng², SUN Xiu-yu³, WANG Zhi-bao^{3*}

(1. Animal Disease Prevention and Control Center in Biyang, Biyang, Henan 463700;

2. Animal Health Supervision Institute in Biyang, Biyang, Henan 463700;

3. Xianan Cattle Research and Extension Center in Biyang, Biyang, Henan 463700)

Abstract: [Objective] To explore middle and small scale cattle from numerous bred under the condition of agriculture, breeding cows (refers to the production of more than one child cow, similarly hereinafter), weaning calf (refers to the calf of more than 4 months of age, the same below) of the disease of appropriate immune time, detection of FMD immune, for small and medium-sized cattle science of foot-and-mouth disease immunization programs to provide the reference data, to carry out the test. [Methods] liquid blocking ELISA and solid phase competitive ELISA were used for comparison test. [Results] The results of liquid phase blocking ELISA showed that the qualified rate of antibody was 65.6%, 87.5%, 78.1% and 46.8% at 30, 60, 90 and 120 days after immunization. At 10, 40, 70 and 100 days after immunization, the qualified rate of immune antibody of weaned calves was 75%, 100%, 83.3% and 41.6%, respectively. The results of solid-phase competitive ELISA showed that the qualified rate of antibody was 78.1%, 100%, 100% and 75% at 30, 60, 90 and 120 days after immunization. At 10, 40, 70 and 100 days after immunization, the qualified rate of immune antibody of weaned calves was 83.3%, 100%, 100% and 75%, respectively. [Conclusion] From the test results, the solid phase competitive ELISA test can only determine the antibody positive or negative, the test is easy to operate, the result is easy to distinguish, but compared with the liquid phase blocking ELISA test results, the antibody level detection has a certain error.

Key words: foot-and-mouth disease; antibody detection; method comparison