

ELISA间接法检测猪瘟抗体的研究

于 涟 刘锦海** 邵明芳 李雪梅***
(浙江农业大学畜牧兽医系)

摘 要

本文介绍了以中国株猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干疫苗为原料提取猪瘟抗原, 以酶标葡萄球菌蛋白A (PPA) 代替酶标抗猪IgG, 建立ELISA间接法检测猪瘟抗体的方法。该方法与血清兔体中和试验对73份猪血清进行检测猪瘟抗体的同步试验, 结果基本一致 ($P > 0.05$)。敏感性、特异性及准确性分别为100%、92.16%及94.52%。用该方法对1528头份猪血清及36头份猪扁桃体浸出液进行猪瘟抗体测定, 结果稳定, 重复性好。

猪瘟是猪的一种高度传染病, 因其传染性强, 病死率高, 严重威胁着养猪业的发展。我国的猪瘟兔化弱毒疫苗免疫原性好, 效果确实, 安全可靠, 在控制猪瘟流行和防制本病中起了重要作用。但, 因缺乏简便而有效的免疫监测手段, 往往使免疫程序的制定缺少依据, 造成低免疫猪群的存在以及母源抗体的保护与初次免疫的脱节; 常常使防疫注射质量的检查缺少客观标准, 致使免疫空白得以存在。这些环节直接影响猪瘟防疫工作的顺利展开。

Saunders (1974) [1]用PK15细胞繁殖猪瘟病毒, 研究了酶标记抗体微量技术检测猪瘟抗体。接着, 他(1977) [2]发表了肯定性报告, 证明该法与血清中和试验的符合率在99%以上。Have (1984) [3]报道了在PK细胞上用Alfost株瘟病毒生产抗原检测猪瘟抗体的方法, 表明ELISA结果与猪瘟病毒感染后的早期中和抗体应答呈密切的平行关系。

在研究旨在以中国株猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干疫苗为原料提取猪瘟抗原, 以酶标葡萄球菌蛋白A (PPA) 代替酶标抗猪IgG, 建立猪瘟抗体的准确、特异、敏感的ELISA检测法, 进而用于免疫监测。

材 料 和 方 法

一、材料

(一) 固相载体: 40孔TC型聚苯乙烯微量反应板(上海塑料三厂), 使用前经0.75%鞣酸处理。

(二) 酶标测定仪: S-833型(四平无线电厂)。

(三) 抗原: 中国株猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干疫苗(杭州药厂)经充分透析, 反

* 本研究得到北京农大郭玉璞教授, 哈兽研马思奇所长, 浙江省农科院何秉耀副研究员, 中蓝所邵操华同志, 浙江省农业厅赵国源同志, 浙江农大陈慧珍讲师的大力支持和协助, 特此致谢。*** 宁波免疫试剂厂。*** 杭州种猪试验场。

**** 本文于1987年1月19日收稿。

复冻融,以超声波粉碎,差速离心,经Sephadex G-200柱层析,浓缩定氮,-18℃保存备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳呈一条带,对流免疫电泳效价1:32以上。

(四)酶标记物:辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白A(PPA)(宁波免疫试剂厂)辣根过氧化物酶与葡萄球菌蛋白A的交联采用改良的过碘酸钠氧化法。

(五)参比血清:1.阳性参比血清系成都药械厂产治疗用抗猪瘟血清(批号8317),经中和试验确认为阳性。2.阴性参比血清系经中和试验选为猪瘟兔化弱毒疫苗安检用猪之多头份混合血清(南京药械厂)。

(六)溶液:1.包被液为pH9.6 0.05M碳酸盐缓冲液。2.稀释液、洗净液均为pH7.4磷酸盐缓冲液(含0.5%吐温20)。3.底物液为邻苯二胺底物溶液。4.终止液为2M硫酸。

(七)受试血清:1.非免疫健康猪血清45份,经中和试验确认为无猪瘟中和抗体。2.吃初乳前初生仔猪血清144头份。3.屠宰肥猪血清36份,是杭州肉联厂自加兴收购来的免疫猪。4.杭州种猪试验场10头免疫母猪的129头哺乳仔猪分别采集3日龄、7日龄(采血后用猪瘟兔化弱毒疫苗初次免疫)、10日龄、14日龄、20日龄、25日龄、40日龄、45日龄及60日龄的血清。5.免疫架子猪血清124份,采自杭州种猪试验场及浙江农大实验牧场经猪瘟兔化弱毒疫苗免疫后2—4周的架子猪。

(八)受试猪扁桃体浸出液36头份,上述36头屠宰肥猪在采血的同时取扁桃体,用生理盐水制备浸出液。

二、方法

(一)ELISA间接法试验:1.包被:抗原包被量为10μg/0.1ml/孔,置湿盒中37℃温育2小时转入4℃18小时以上。2.洗涤。3.加样:待检血清用稀释液作1:60稀释,每孔0.1ml,每个标本加两孔。每块反应板上设阳性对照、稀释液对照各一孔,阴性对照两孔。置湿盒中37℃温育1小时。4.洗涤。5.加PPA:按工作效价稀释后每孔0.1ml;置湿盒中温育半小时。6.洗涤。7.加底物溶液:每孔0.1ml,置37℃温育10分钟。8.加终止液每孔0.05ml。9.结果判定:(1)肉眼观察:凡呈色深于阴性对照孔者判为阳性。

(2)酶标测定仪测定:取 $\lambda = 492\text{nm}$,用稀释液对照孔调零,分别测定阴性孔、待检孔及阳性孔的A值,计算P/N值。 $P/N = \frac{\text{待检孔A值}}{\text{阴性孔A值}}$,凡 $P/N \geq 2.1$ 者判为阳性, $P/N \leq 1.5$ 者判为阴性, $2.1 > P/N > 1.5$ 者为可疑。

(二)血清兔体中和试验:采用固定兔毒,稀释被检血清方法^[4]。将每毫升含20MID的兔毒与等量的1:32稀释的血清混合,4℃感作2小时后,每兔耳静脉注射1ml,每份血清注射兔两只。同时设对照兔两只(每兔仅耳静脉注射1ml 10MID兔毒)。注射后每六小时测温一次,连续五天,观察其热型。对照兔在注射后出现定型热或轻型热,试验才能成立。

(三)抑制试验:治疗用抗猪瘟血清三份(批号为8012,8317及8301)0.1ml分别与4480MID兔毒(0.1ml)混和,37℃感作2小时,以中和血清中的抗体为抑制组。上述三份血清0.1ml分别加0.1ml稀释液作同样处理为未抑制组。抑制组及未抑制组在同一块反应板上行ELISA测定。

结 果

一、待查血清最适稀释度的选择 经猪瘟兔化弱毒疫苗免疫的健康猪血清（杭州肉联厂采集）以及非免疫健康猪血清（南京药械厂）各取30份混合，用稀释液分别作 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 、 $40\times$ 、 $50\times$ 、 $60\times$ 、 $80\times$ 、 $100\times$ 、 $120\times$ 稀释，在同一块反应板上行ELISA间接法测定。以血清稀释度倒数的自然对数作横座标，相应的A值作纵座标作图1。从图1可知免疫猪血清曲线在血清稀释度为 $1:40-1:80$ 范围内变化率比两端要大，而非免疫猪血清曲线对应区域的A值在血清稀释度为 $1:60$ 处出现极小值，故选用 $1:60$ 为待检血清最适稀释度。

二、抗原最适包被量的选择 以每孔2、4、6、8、10、12、14、16、18 μg 的抗

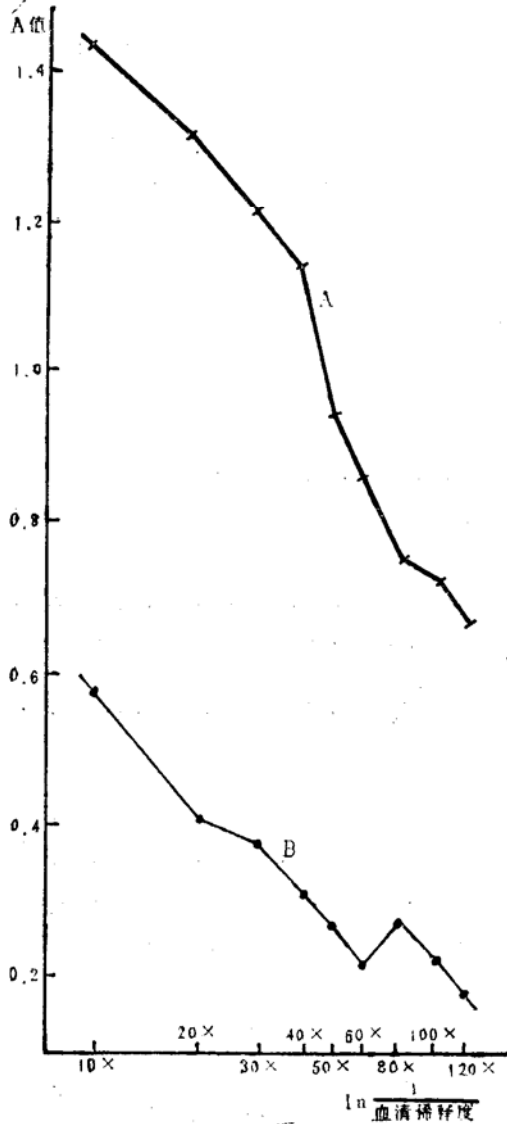


图1 血清稀释度对测定值的影响
A、免疫健康猪血清；
B、非免疫健康猪血清。

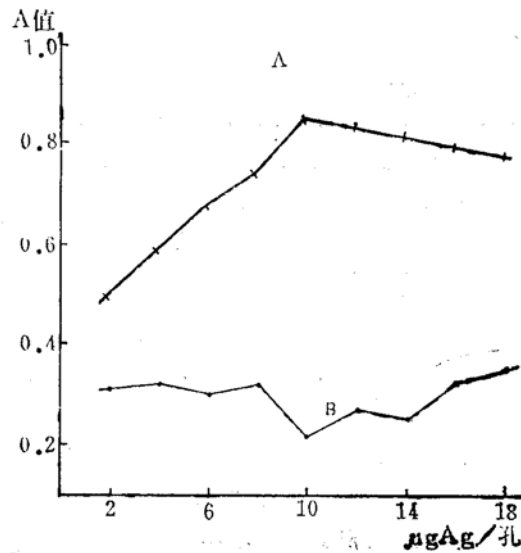


图2 抗原包被量对测定值的影响
A、阳性参比血清；B、阴性参比血清。

原分别包被反应板各列孔。阳性参比血清及阴性参比血清分别作1:60稀释行ELISA间接法测定。以抗原包被量作横座标,相应的A值作纵座标作图2。从图2可知阳性参比血清曲线在抗原包被量为10 μ g/孔处A值出现极大值,而阴性参比血清曲线对应区域A值出现极小值,故选用10 μ g/孔为抗原最适包被量。

三、血清标本温育时间的选择 我们对80个血清标本作了37 $^{\circ}$ C温育1小时及2小时的成对测定。测定之A值经回归分析,得回归方程为:

$Y = 1.022x - 0.022$ (式中x为37 $^{\circ}$ C温育1小时测定之A值, Y为37 $^{\circ}$ C温育2小时测定之A值)

相关系数 $r = 0.9818$ ($P < 0.001$)

示血清标本经37 $^{\circ}$ C温育1小时测定之A值与37 $^{\circ}$ C温育2小时测定之A值呈极显著线性相关。前者测定值略高于后者,但差异幅度不大(+3.7%),故血清标本加入后温育时间选1小时。

四、特异性考核 按表1数据计算,兔脾淋毒对甲、乙、丙血清的抑制率分别为52.27%、59.54%及61.54%,证明试验结果具有特异性意义。

表1 抑制试验结果

A值	血清				甲(8012)				乙(8317)				丙(8301)			
抑制组	0.37	0.33	0.31	0.30	0.27	0.25	0.26	0.28	0.26	0.24	0.31	0.29				
未抑制组	0.65	0.69	0.74	0.76	0.65	0.65	0.69	0.67	0.71	0.70	0.72	0.73				

五、与血清兔体中和试验比较 73份血清以1:32稀释做血清兔体中和试验,同时

表2 NT和ELISA检测猪瘟抗体的同步试验结果

血清号	NT	ELISA		血清号	NT	ELISA		血清号	NT	ELISA		血清号	NT	ELISA	
		P/N	判定			P/N	判定			P/N	判定			P/N	判定
N 87	-	0.98	-	N 63	-	0.95	-	N 91	-	1.36	-	P 15	+	2.32	+
N 54	-	1.48	-	N 82	-	0.93	-	D417	-	0.79	-	P 23	+	2.19	+
N 75	-	1.43	-	N 72	-	1.43	-	P 16	+	2.45	+	P 3	+	2.39	+
N 76	-	1.39	-	N 93	-	1.34	-	P 12	-	2.32	+	1028	-	2.00	±
N 60	-	1.45	-	N 74	-	1.30	-	P 29	+	2.19	+	P 25	+	2.39	+
N 64	-	1.09	-	N 67	-	0.98	-	1525	+	2.87	+	P 17	+	2.45	+
N 58	-	1.09	-	N 92	-	1.14	-	P 7	+	2.58	+	8012	-	3.53	+
N 57	-	1.16	-	N 95	-	1.05	-	A 10	+	2.66	+	N 50	-	1.45	-
N 83	-	1.39	-	N 69	-	0.98	-	8317	+	3.39	+	N 73	-	0.98	-
N 71	-	0.82	-	N 51	-	1.36	-	P 11	+	2.19	+	N 56	-	1.48	-
N 84	-	1.32	-	N 78	-	1.02	-	P 5	+	2.65	+	N 77	-	1.32	-
N 52	-	1.07	-	N 65	-	1.45	-	P 26	+	2.71	+	8320	+	2.95	+
N 79	-	1.20	-	N 90	-	1.34	-	P 10	+	2.71	+	P 2	+	2.71	+
N 68	-	0.95	-	N 61	-	1.30	-	8301	+	3.67	+				
N 62	-	1.16	-	N 94	-	1.18	-	NO	+	2.56	+				
N 53	-	1.41	-	N 89	-	1.39	-	ZO	+	3.86	+				
N 66	-	1.16	-	N 70	-	1.30	-	P 21	+	2.39	+				
N 81	-	1.07	-	N 86	-	1.20	-	P 9	+	2.39	+				
N 59	-	1.23	-	N 85	-	1.00	-	P 4	-	2.26	+				
N 88	-	1.07	-	N 80	-	1.41	-	8207	-	2.56	+				

注: NT(中和试验),“+”(有猪瘟抗体),“-”(无猪瘟抗体),“±”(可疑)

以 1:60 稀释做 ELISA 间接法测定, 结果如表 2 所示。

从表 2 可知, 血清中和试验阳性的 22 份血清 ELISA 试验全部判为阳性; 中和试验阴性的 51 份血清 ELISA 试验 46 份判为阴性, 1 份判为可疑, 4 份错判为阳性。ELISA 间接法检测猪瘟抗体的敏感性、特异性和准确性分别为 100%、92.16% 及 94.52%。经卡方 ($P > 0.05$) 检验, ELISA 间接法与血清兔体中和试验的结果基本一致。

六、重复性试验 9 个血清标本每次测定做四个重复, 每隔一天重复一次, 共重复实验三次, 结果见表 3。

表3 重复性试验结果

血清 A 做 实验次数	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	1	0.470*	0.435	0.498	0.373	0.325	0.570	0.403	0.343
2	0.538	0.438	0.523	0.363	0.318	0.600	0.380	0.338	0.393
3	0.433	0.423	0.500	0.365	0.313	0.580	0.388	0.350	0.425

*表中数据为四次测定之平均值

板间 $F_A = 0.7882$, 差异不显著。

样品间 $F_B = 44.48$, 差异极显著。

七、方法验证 1. 45 份非免疫健康猪血清测定全部为阴性 ($P/N = 1.21 \pm 0.23$)。2. 144 头份吃初乳前的初生仔猪血清测定全部判为阴性, 其 $P/N = 0.279 \pm 0.138$, 大大低于阴性参比血清 ($P/N = 1$)。其中 30 头仔猪用脐带血与前腔静脉取血之血清同时测定, 其结果完全一致。3. 124 份免疫架子猪血清测定全部为阳性 ($P/N = 4.48 \pm 0.77$)。4. 36 头屠宰肥猪血清及扁桃体浸出液同时测定全部为阳性, 血清抗体水平 $P/N = 10.158 \pm 2.542$, 扁桃体浸出液抗体水平 $P/N = 8.780 \pm 1.384$ 。经回归分析, 示两者存在显著的回归关系 ($P < 0.01$)。回归式 $Y = 0.455x + 4.159$, 相关系数 $r = 0.835$ 。因此, 某些特殊需要时 (如对屠体免疫情况的抽查) 可试用扁桃体浸出液测定。6. 对 10 头免疫母猪

表4 哺乳仔猪血清猪瘟抗体 ELISA 测定

日 龄	3	7	10	14	20	25	40	45	60
\bar{x}	1.004	0.781	0.665	0.551	0.486	0.504	0.570	0.598	0.614
S	0.1733	0.0980	0.0905	0.0945	0.1090	0.0867	0.0651	0.0452	0.1280
CV	17.30%	12.55%	13.60%	17.20%	22.40%	17.20%	11.40%	7.60%	20.80%
n	10	10	10	9	10	10	10	10	10
多重比较结果	a A	b B	c BC	d C	d C	d C	dc C	dc C	dc C

注: \bar{x} (平均A值), S (标准差), CV (变异系数), n (窝数) 多重比较 (Duncan氏新复极差法) (5) 结果表示法:

①无相同大写英文字母者为差异极显著 ($P < 0.01$);

②无相同小写英文字母者为差异显著 ($P < 0.05$)。

的129头哺乳仔猪不同日龄血清猪瘟抗体测定,对所测得A值行统计学处理,归于表4。

经方差分析,日龄间血清猪瘟抗体水平有显著差异。从表4可知,这10窝仔猪的猪瘟母源抗体3日龄—7日龄—10日龄以较快速度降低。由于在7日龄进行了初次免疫致使猪瘟抗体从14日龄—60日龄维持在一个相对稳定的水平上。

讨论和小结

一、ELISA间接法检测猪瘟抗体的敏感性在于它能把阳性标本确定为阳性。血清兔体中和试验为阳性的22份标本,ELISA间接法全部确定为阳性,因而ELISA间接法检测猪瘟抗体有100%的敏感性。本方法的特异性在于能把阴性标本确定为阴性,ELISA间接法的特异性为92.16%,把血清兔体中和试验为阴性的4份血清错判为阳性。试验的准确性是以对未知血清所能揭示的程度来衡量的,ELISA间接法的准确性为94.52%。提示尚需进一步提高包被抗原浓度,减少假阳性反应,提高本法的特异性。

二、ELISA间接法与血清兔体中和试验的同步试验表明,猪血清作1:60稀释用ELISA间接法检测猪瘟抗体判为阳性时,其中和效价为1:32以上,多数能抵御猪瘟强毒的攻击^[4]。本研究比常规的ELISA间接法改进了两点,一是待检血清温育时间缩短为1小时,二是用PPA代替酶标抗猪IgG。从而在保证检测猪瘟抗体特异、敏感、准确的前提下节省了时间,提高了稳定性。

三、Фесенко(1980)^[6]的研究确定,吃初乳前的仔猪血清中没有IgG及IgM。国内郭玉璞(1981)^[7]也认为大多数未吃初乳的初生仔猪血浆中检不出免疫球蛋白。我们对144头份吃初乳前的初生仔猪血清的测定也证实了这一点。

四、本试验对45份非免疫健康猪血清全部判为阴性;对36头屠宰肥猪、124头免疫架子猪血清的测定均为阳性,10头免疫母猪所产129头哺乳仔猪不同日龄血清的测定结果显示猪瘟抗体的动态变化,说明用ELISA间接法能有效而简便地进行猪瘟抗体的检测。又由于包被抗原系用中国株猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干疫苗提取,制备和测试过程均不会污染环境。ELISA间接法检测猪瘟抗体便于在猪群的免疫监测及防疫注射质量的抽样检查中推广应用。

参 考 文 献

- [1] Saunders, G.C. et al., 1974. Disease screening with enzyme-labeled antibodies. *J. Infect. Disease.* 129: 362~364.
- [2] Saunders, G.C., 1977. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for the rapid detection of Hog Cholera antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 38: 21~25.
- [3] Have, P., 1984. Detection of antibodies against swine fever virus by ELISA. *Acta Vet. Scand.* 25: 462~465.
- [4] 门常平等, 1982, 猪瘟兔化弱毒冻干疫苗免疫程序的研究. *中国兽医杂志*, 8(9): 2~5.
- [5] 马育华, 1979, 田间试验和统计方法, 91~94. 北京, 农业出版社.
- [6] Фесенко, 1980. Возрастная динамика иммуноглобулинов у свиней. *доклады ВАСХНИЛ.* 11: 35.
- [7] 郭玉璞, 1981, 猪的免疫. *中国兽医杂志*, 7(5): 37~43.

A STUDY ON DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST SWINE FEVER VIRUS (SFV) BY INDIRECT ELISA

Yu Lian, Liu Jinhai, Shao Mingfang, Li Xuemei

(Dept. of Animal Science & Veterinary Medicine,
Zhejiang Agricultural University)

Abstract

An indirect ELISA has been developed for detection of antibodies against SFV using the lyophilized vaccine prepared from the sucking-rabbits infected with the Chinese strain of lapinized SFV. Horseradish Peroxidase Staphylococcal protein A (PPA) was used in the test instead of horseradish peroxidase anti-swine IgG. A synchronized trial with 73 samples of porcine serum was made and the results of the indirect ELISA were in agreement with that of the rabbit serum neutralization test ($P > 0.05$), and its sensitivity, specificity and accuracy were 100%, 92.16% and 94.52%, respectively. The method developed was employed to determine the SFV antibodies of 1528 serum samples and 36 tonsil extract samples collected from swine, the results were satisfactory in high stability and repeatability.

中国畜牧兽医学会全国理事会暨秘书长 工作座谈会会议在厦门召开

1988年6月9—13日,中国畜牧兽医学会全国理事会暨秘书长工作座谈会,在陈凌风理事长主持下在厦门顺利召开。农业部畜牧局邱振远副局长在会上讲了话,福建省农业厅厅长尤珩和厦门市农业局李生地副局长致了贺词。到会代表共118人,共提供了33篇论文和报告。徐砚、蒋次升、于船、王前等同志分别主持了大会,共有22篇论文在会议上进行了交流。甘孟侯教授在会上传达了中国科协陈绳武秘书长的讲话,会上作了认真的讨论。

学报负责人在会上汇报了学报的改进情况,并向全国代表和研究会提出供稿要求。代表就陈绳武同志关于学术期刊是否收刊载费问题进行了讨论。

大会分别按地区组及理事组和秘书长组进行讨论。陈凌风同志作了总结报告,杨忠源同志宣布大会顺利结束。

(陈幼春供稿)