

## 2型鸭疫里氏杆菌抗体间接ELISA检测方法的建立与应用

程龙飞<sup>1,2</sup>, 施少华<sup>1</sup>, 傅光华<sup>1</sup>, 李文杨<sup>1</sup>, 彭春香<sup>1</sup>, 黄瑜<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>2</sup>

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;  
2. 南京农业大学, 农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 以2型鸭疫里氏杆菌裂解物作为包被抗原, 以辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭IgG抗体为第二抗体, 以TMB为显色剂, 成功地建立了检测鸭血清中2型鸭疫里氏杆菌抗体的间接ELISA方法。经检测表明该方法特异性强, 敏感性比常规的试管凝集试验高320倍。以该方法对免疫2型鸭疫里氏杆菌灭活油乳剂疫苗的试验鸭进行抗体水平的跟踪测定, 发现试验鸭于免疫后7d开始产生抗体, 28d达到最高峰, 然后开始下降, 于免疫后56d其抗体水平仍高于免疫后14d的水平。

**关键词:** 2型鸭疫里氏杆菌; 抗体检测; 间接酶联免疫吸附试验

**中图分类号:** S 854.43

**文献标识码:** A

### Detection of the antibody against *Riemerella anatipestifer* Serotype 2 by indirect enzyme-linked immunosorbent assay

CHENG Long-fei<sup>1,2</sup>, SHI Shao-hua<sup>1</sup>, FU Guang-hua<sup>1</sup>, LI Wen-yang<sup>1</sup>, PENG Chun-xiang<sup>1</sup>,  
HUANG Yu<sup>1</sup>, CHEN Pu-yan<sup>2</sup>

(1. Animal Husbandry and Veterinary Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** The *Riemerella anatipestifer* (RA) Serotype 2 treated with ultrasonic cracking was used as coated antigen, horseradish peroxidase-labelled rabbit-anti-duck IgG was taken as the second antibody, Tetramethyl Benzidine dihydrochloride (TMB) was used as coloring agent in this test. The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection of antibody against RA Serotype 2. This method was proved to be very specific, sensitive and repetitive. The result showed that the ducks treated with inactivated vaccine of RA Serotype 2 had specific antibody in their sera detected with indirect ELISA on the 7th day after vaccination. The titre of the antibody was up to peak on the 28th day after vaccination, and then declines, the titre of the antibody on the 56th day after vaccination was higher than that on the 14th day after vaccination.

**Key words:** *Riemerella anatipestifer* Serotype 2; antibody detection; indirect ELISA

鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 可侵害雏鸭, 引起急性、高度致死性的败血症。临诊表现纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎、关节炎等病变, 造成严重的直接经济损失, 还导致僵鸭增多、淘汰率高、饲料转化率降低、生长发育迟缓等间接经济损失。我国各地均有该病的流行, 严重影响养鸭业的发展。

目前检测鸭血清中鸭疫里氏杆菌抗体的方法有平板凝集试验、试管凝集试验、琼脂扩散试验和ELISA方法等。平板凝集试验操作简单, 能在短时

间内判断结果, 适合基层单位应用, 但与试管凝集和琼脂扩散试验一样均存在敏感性低、影响因素多等缺点。张鹤晓等<sup>[1]</sup>、苏敬良等<sup>[2]</sup>、程安春等<sup>[3]</sup>分别建立了检测1型、1型、4型鸭疫里氏杆菌抗体的酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法。Huang等<sup>[4]</sup>用rP<sub>45</sub>N' (RA表面抗原P<sub>45</sub>的末端片段41 KDa重组蛋白) 建立了间接ELISA, 成功地检测到1、10、15、9型和ATCC11845菌株免疫过鸭的P<sub>45</sub>抗体。ELISA主要是基于抗原或抗体能吸附到固相载体的表面并保持

其免疫活性, 抗原或抗体与酶形成的酶结合物仍保持其免疫活性和酶催化活性的基本原理, 将酶化学反应的敏感性和抗原抗体反应的特异性结合起来, 用于细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的所在部位, 或在微克、纳克水平上测定抗原或抗体的含量。该方法特异性强、敏感性高, 是当前应用最广、发展最快的一项新技术。本研究针对我省主要流行的2型RA, 建立检测其抗体的间接ELISA方法, 用于检测2型RA疫苗免疫后抗体的消长情况, 为制订最佳免疫程序提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 2型RA菌株 福建省农科院牧医所禽病室分离、鉴定并保存的菌株。

1.1.2 辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭IgG抗体(简称酶标二抗) 南京农业大学动物医学院张炜博士惠赠。

1.1.3 强阳性血清、阴性血清和待检血清 按常规方法制备强阳性血清和阴性血清。

选择7日龄健康北京鸭20羽, 用2型鸭疫里氏杆菌灭活油乳剂疫苗免疫后, 于3d、7d及其后每隔7d采血1次, 每次随机挑选4羽, 共采血9次, 分别分离血清, 冻存备用。

1.1.4 试剂 参照文献[5]方法配制。选择PBS配制的0.5%牛血清白蛋白为封闭液, 底物用四甲基联苯胺(TMB)。

### 1.2 方法

1.2.1 间接ELISA方法的建立 建立间接ELISA方法, 试验完成后置酶标仪中读取405 nm的吸光度(Absorbence,  $A_{405}$ )。同时以鸭阴性血清为阴性对照, 以强阳性血清为阳性对照, 以抗体稀释液代替待检血清为空白对照, 所有值必须减去空白对照的 $A_{405}$ 值。

1.2.2 酶标二抗工作浓度的测定 鸭IgG按参考文献[6]方法提取。用包被液稀释至 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 包被酶标板, 以100~6 400倍稀释的酶标二抗作ELISA, 设底物溶液加终止液为空白对照孔。以能产生 $A_{405}$ 值为1时的稀释度为酶标抗体的最佳使用浓度。

### 1.2.3 包被抗原的制备及最佳浓度的确定

1.2.3.1 2型RA抗原的制备 将2型RA菌泥用灭菌生理盐水洗涤直至上清液完全透明, 然后用少量包被液重悬, 用超声波裂解器充分裂解, 后再以 $2000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min除去大的细菌碎片。测

定蛋白含量, 将制备好的抗原分装,  $-20^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2.3.2 包被抗原最佳浓度的确定 采用棋盘滴定法, 选择强阳性血清的 $A_{405}$ 值大于0.8、阴性血清的 $A_{405}$ 值小于0.1的包被抗原的稀释度作为工作浓度。

1.2.4 2型RA灭活疫苗免疫后维鸭血清中的抗体消长规律测定 根据上述预试验的结果, 将20份阴性血清1:100稀释后做ELISA, 求 $A_{405}$ 的平均值, 加上2倍的标准差, 定为规定吸收值。将待检血清以抗体稀释液稀释100倍后倍比稀释, 做ELISA, 测出 $A_{405}$ 值。每份血清的效价定为 $A_{405}$ 值大于规定吸收值的血清最高稀释度。同一天4份血清的效价平均后为该天的抗体效价。

1.2.5 ELISA的特异性试验 将禽霍乱多杀性巴氏杆菌、鸭源大肠杆菌以超声波裂解器处理后代替上述包被抗原, 做ELISA, 测 $A_{405}$ 值。以鸡血清、鸽血清代替鸭抗鸭疫里氏杆菌血清, 做ELISA, 测 $A_{405}$ 值。

1.2.6 ELISA的重复性试验 取不同滴度的待检血清3份, 在同一块酶标板上各重复6次, 做ELISA, 测 $A_{405}$ 值。计算每份血清的板内变异系数。取上述待检血清3份, 分别在6块酶标板上做ELISA, 测 $A_{405}$ 值。计算每份血清的板间变异系数。

1.2.7 ELISA与试管凝集试验的比较 试管凝集试验方法: 参照文献[7]进行, 以PBS洗涤2型鸭疫里氏杆菌菌泥至清亮, 调 $A_{525}$ 值=0.2为抗原。以PBS将血清稀释5倍后倍比稀释, 每试管中加入500  $\mu\text{l}$ , 然后加入等量的抗原, 混匀, 置 $37^{\circ}\text{C}$ 静置18 h后观察结果, 轻轻摇动试管, 有絮状凝集块者为阳性。

取ELISA方法测定血清效价为阳性的待检血清8份, 另取强阳性血清和阴性血清为对照作试管凝集试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶标二抗工作浓度的确定

随着酶标二抗稀释倍数的增加,  $A_{405}$ 值越来越小, 当1:6 400稀释时,  $A_{405}$ 值最接近1.0, 结合棋盘滴定试验, 最终选择1:5 000的稀释度为酶标二抗的工作浓度。

### 2.2 包被抗原最佳浓度的确定

所制备的包被抗原浓度为 $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。当包被抗原1:320稀释即浓度为 $1.87 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 强阳性血清的 $A_{405}$ 值为0.87、阴性血清的 $A_{405}$ 值为0.09(两者均为减去空白对照值后的数值), 符合选择要

求,本试验确定的2型RA包被抗原使用浓度为 $1.87 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

#### 2.3 规定吸收值

20份阴性血清 $1:100$ 稀释后做ELISA,测得的 $A_{405}$ 值,求平均数加上2倍的标准差即本试验的规定吸收值为0.157。

#### 2.4 疫苗免疫后雏鸭血清抗体测定结果

免疫后3d,鸭血清中的抗体为阴性,从免疫后7d开始,血清中的抗体效价逐渐升高,至28d左右时抗体效价最高,然后开始回落,免疫后56d,抗体效价仍高于免疫后14d时的水平。以免疫后天数为横坐标,以抗体效价为纵坐标绘制抗体消长情况(图1)。

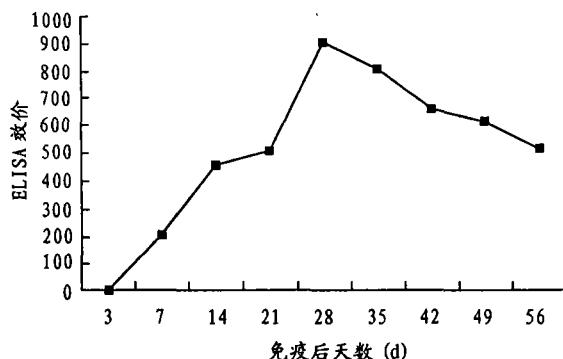


图1 疫苗免疫后鸭血清中的抗体消长情况

Fig. 1 The dynamic change of antibody against RA Serotype 2 in immunized duck

#### 2.5 ELISA 的特异性测定

以禽霍乱多杀性巴氏杆菌和大肠杆菌的裂解抗原作包被抗原,以强阳性血清、疫苗免疫后的鸭阳性血清和阴性血清做ELISA,测定的 $OD_{405}$ 值均小于规定值;以2型鸭疫里氏菌裂解抗原作包被抗原,以鸡血清和鸽子血清作第一抗体做ELISA,测定的 $OD_{405}$ 值也均小于规定值。以上结果表明该方法的特异性好。

#### 2.6 ELISA 的重复性检测结果

根据3份待检血清ELISA结果,计算出板内变异系数和板间变异系数(表1),从表中可见,本试验的重复性好。

#### 2.7 ELISA 与试管凝集试验的敏感性比较结果

8份血清的ELISA效价和试管凝集价见表2。从表中可见试管凝集试验阴性的血清,用ELISA方法仍然测得出来,ELISA方法的敏感性比试管凝集试验高出320倍。

表1 重复性试验结果

Table 1 The repetition test of indirect ELISA

血清	板内变异系数 (%)	板间变异系数 (%)
待检血清1	4.05	5.38
待检血清2	4.11	6.15
待检血清3	4.23	5.84

表2 试管凝集试验与ELISA试验比较

Table 2 The comparison between tube agglutination test and indirect ELISA

血清	试管凝集价	ELISA效价
强阳性血清	1:20	1:6400
阴性血清	0	0
待检血清1	0	1:200
待检血清2	0	1:200
待检血清3	0	1:400
待检血清4	0	1:400
待检血清5	0	1:800
待检血清6	0	1:800
待检血清7	1:5	1:1600
待检血清8	1:5	1:1600

### 3 讨论

3.1 本试验以2型鸭疫里氏杆菌裂解物作为包被抗原,以自制的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭IgG抗体为第二抗体,以TMB为显色剂,成功地建立了检测鸭血清中2型鸭疫里氏菌抗体的间接ELISA方法。经试验表明该方法特异性强,重复性好,敏感度比常规试管凝集试验高320倍。

3.2 该方法对免疫过2型鸭疫里氏杆菌灭活油乳剂疫苗的鸭群进行抗体水平的跟踪测定,发现鸭群在免疫后7d开始产生抗体,免疫后28d左右达到最高峰,然后开始下降,免疫后56d抗体水平仍高于免疫后14d的水平。该结果与免疫保护测定试验结果(灭活油乳剂疫苗免疫后9d的保护率高达83.3%,免疫后14d高达100%,免疫后56d保护指数仍可达100%)比较吻合。目前,我国各主要养鸭区鸭疫里氏杆菌病的多发日龄为1~8周龄,可见肉鸭于5~7日龄时免疫1次鸭疫里氏杆菌灭活油乳剂疫苗,即可维持至上市。

3.3 关于包被抗原的浓度,苏敬良等<sup>[2]</sup>报道为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (1型),张鹤晓等<sup>[1]</sup>报道为 $70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (1型),程安春等<sup>[3]</sup>报道为 $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (4型),本

试验确定的包被抗原浓度为  $1.87 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 与程安春等的报道最为接近, 这可能与抗原的制备方法、酶标板的质量、RA 血清型的差异、RA 菌株的免疫原性差异等有关。

3.4 关于 ELISA 方法的敏感性测定, 本试验将其与试管凝集试验(其中的抗原用光密度值来定量)对比, 敏感性高出 320 倍。而程安春等<sup>[3]</sup>建立间接 ELISA 方法测定 4 型 RA 抗体, 比微量凝集试验敏感 50~100 倍, 这可能与微量凝集试验中因抗原未定量而影响试验的准确性和稳定性有关。

#### 参考文献:

- [1] 张鹤晓, 郭玉璞. 间接 ELISA 检测鸭疫里氏杆菌抗体的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20 (3): 183~186.
- [2] 苏敬良, 郭玉璞, 吕艳丽. 鸭疫里氏杆菌免疫原性研究 I. 蛋膜提取物免疫原性测定 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24 (8): 3~5.
- [3] 程安春, 汪铭书, 方鹏飞, 等. 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 4 型鸭疫里氏杆菌抗体的研究 [J]. 中国家禽, 2004, 26 (16): 11~14.
- [4] HUANG B, SUBRAMANIAM S, FREY J, et al. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P<sub>45</sub>N') of *Riemerella anatipestifer* [J]. Vet. Microbiol, 2002, 84 (3): 219~230.
- [5] 何昭阳, 胡桂学, 王春凤. 动物免疫学实验技术 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2002: 97~110.
- [6] 周顺伍. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 10~20.
- [7] 张大丙, 郭玉璞. 我国鸭疫里氏杆菌血清型的鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30 (6): 536~542.

(责任编辑: 周 琼)