

间接 ELISA检测雏鸡烟曲霉菌抗体的研究

李国勤¹,张雪娟¹,姜艳芬²,曹光荣²

(1.浙江省农业科学院,杭州 310021; 2.西北农林科技大学,陕西杨陵 712100)

摘要: 以烟曲霉菌丝提取物作为包被抗原,建立了检测雏鸡血清中烟曲霉菌抗体的间接 ELISA方法。特异性试验和重复性试验证明该方法特异性高,重复性好,其抗原包被浓度为 $124\mu\text{g/ml}$,血清最适稀释度为 $1:16$,抗原最佳包被时间为 4°C 过夜,血清反应时间为 37°C 作用 1.5h 。对 120 份人工感染烟曲霉菌的雏鸡血清试验发现,间接 ELISA 检出时间比琼脂扩散试验早 7 d 以上,检出率高约 40.8%。表明间接 ELISA 试验是一种特异敏感的雏鸡血清烟曲霉菌抗体检测技术。
关键词: 雏鸡; 烟曲霉菌; 抗体; 酶联免疫吸附试验
中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-1389(2001)04-0006-04

Detection of Antibody to *Aspergillus Fumigatus* in Sera of Chicks with Indirect Elisa

LI Guo-qin, ZHANG Xue-juan, JIANG Yan-fen, CAO Guang-rong

(1. Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China; 2. North west Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract The indirect ELISA with coating mycelial extract antigen of *A. fumigatus* was established to detect specific antibody to *A. fumigatus* in sera of chicks and the assay was confirmed to be specific and reproducible. The concentration of coating antigen was $124\mu\text{g/ml}$ and that of serum samples was $1:16$. The optimum coating time is a night at 4°C . Serum reaction time is 1.5h at 37°C . Experimentally infected chicks were assayed for specific antibody by indirect ELISA and immunodiffusion (ID) methods at the same times and the sensitivities of two methods were compared. The result showed that the positive time of ELISA test was more than 7 days earlier than that of ID and the positive rate was 40.8% higher. All the results further confirmed that indirect ELISA test is a specific and sensitive method to detect *A. fumigatus* antibody.
Key words Chick; *Aspergillus fumigatus*; Antibody; ELISA

禽曲霉菌病是禽类常见的一种真菌病,见于鸡、鸭、鹅等 20 多种禽类,病原主要为烟曲霉菌和黄曲霉菌^[1]。目前公认本病最有前景的诊断方法为测定患禽血清中的曲霉菌抗原或抗体^[2]。本研究旨在建立检测雏鸡血清中烟曲霉菌抗体的间接 ELISA 方法,为禽曲霉菌病的诊断提供一种特异敏感的手段

1 材料与方 法

试验用菌株为烟曲霉菌,本研究室自病鸡肺脏分离并鉴定
烟曲霉菌丝提取物抗原制备参考 Thurston 等^[3]和 Richard 等^[4]的方法。

收稿日期: 2001-05-04
基金项目: 陕西省自然基金项目 (编号: 95SW10) 资助。
作者简介: 李国勤 (1964-), 男, 博士, 副研究员, 河南省卫辉市人, 主要从事兽医真菌病学研究。联系电话: 0571-86400354

试验用血清:① 鸡抗烟曲霉菌阳性血清自制,琼扩滴度达 1∶ 4以上 ② 鸡抗烟曲霉菌抗体阴性血清用烟曲霉菌抗体琼扩试验阴性的非免疫雏鸡血清,按 1∶ 10比例加入裂解菌体抗原,混匀后,37℃作用 1 h,再以 15 000 r/min离心 30 min,取上清液作为阴性血清。③ 待检血清:人工滴鼻感染烟曲霉菌组(A组)和非感染对照组(B组)雏鸡,实验前和实验后每周一次颈静脉或心脏采血一次,分离血清 ④ 其它血清 均为人工感染耐过的鸡血清或临床病例血清

HRP- 鼠抗鸡 IgG由西北农林科技大学预防兽医学研究室惠赠

间接 ELISA方法的操作程序 采用常规间接 ELISA方法程序,即抗原包被⁴C过夜→ 冲洗→ 加血清→ ³⁷C 1. 5 h→ 冲洗→ 加酶标抗体→ 冲洗→ 加底物→ 加 H₂SO₄终止反应→ 测定 OD_{492 nm}值。

ELISA结果的判定: 采用吸光度法,测得 20份阴性血清平均值 *X* 为 0. 253,标准差 *S* 为 0. 014,*X*+ 3*S*= 0. 295 规定 OD值大于或等于 0. 29者判为阳性,否则判为阴性。

特异性试验:① 在同一条件下,对鸡黄曲霉血清、鸡岛青霉菌血清、鸡大肠杆菌血清、鸡新城疫血清、鸡法氏囊病血清和已知烟曲霉菌阳性血

清,作 1∶ 16稀释,进行 ELISA测定,设阴性对照,重复 3次。

② 阻断试验 向阳性及阴性血清中加入等量烟曲霉菌丝提取物抗原 (124^μg/ml),进行 ELISA测定 比较阻断前后这 2份血清的 OD值变化。

ELISA重复性 采用间接 ELISA方法测定效价高、中、低的 3份鸡抗烟曲霉菌血清的板内变异系数与板间变异系数 (*CV*)。

间接 ELISA与琼脂扩散试验的抗体检出敏感性比较采用常规双扩散法与间接 ELISA试验同时进行,检测相同血清

2 结果

2. 1 间接 ELISA方法的建立

2. 1. 1 间接 ELISA最佳反应条件的选择 酶标结合物工作浓度的确定 经测定,HRP酶标鼠抗鸡 IgG的最适稀释度为 1∶ 2 000

2. 1. 2 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的选择 烟曲霉菌丝提取物抗原用 1∶ 5,1∶ 10,1∶ 20,1∶ 40,1∶ 80,1∶ 160,1∶ 320倍比稀释,已知阳性血清、阴性血清 1∶ 2,1∶ 4,1∶ 8,1∶ 16,1∶ 32,1∶ 64,1∶ 128倍比稀释,进行方阵滴定,做 ELISA测定,重复 3次。

表 1 抗原和血清最适浓度的测定

Table 1 Determination of the optimum concentration in antigen and serum

抗原稀释度 Antigen dilution degree	血清稀释度 Serum dilution degree							无血清 No serum
	1∶ 2	1∶ 4	1∶ 8	1∶ 16	1∶ 32	1∶ 64	1∶ 128	
1∶ 5	0. 23	0. 11	0. 32	0. 35	0. 28	0. 15	0. 17	0. 01
1∶ 10	0. 20	0. 24	0. 21	0. 29	0. 30	0. 22	0. 24	0. 01
1∶ 20	0. 31	0. 32	0. 31	0. 32	0. 26	0. 25	0. 23	0. 01
1∶ 40	0. 32	0. 36	0. 44	0. 41	0. 39	0. 37	0. 37	0. 01
1∶ 80	0. 26	0. 29	0. 37	0. 42	0. 31	0. 39	0. 35	0. 01
1∶ 160	0. 19	0. 30	0. 25	0. 31	0. 17	0. 26	0. 20	0. 01
1∶ 320	0. 28	0. 21	0. 19	0. 39	0. 25	0. 14	0. 27	0. 01

表 1列出阳性与阴性血清在不同抗原浓度下的 OD值之差。可以看出,血清 1∶ 16稀释,抗原 1∶ 40稀释时,阴、阳性血清的 OD值差较大。因此,本试验选择 1∶ 40稀释的烟曲霉菌丝抗原为最适包被浓度 (此时抗原蛋白浓度为 124^μg/ml),选择 1∶ 16稀释血清为最适血清稀释度

抗原最佳包被时间的选择 37℃湿盒中包被 2 h 1 h及 4℃过夜,做 ELISA测定。结果 4℃包被过夜,阴、阳性血清 OD值之差较大,故实验选择 4℃包被过夜作为抗原包被时间。

血清反应时间的选择 测定加入阴、阳性血清,37℃作用 1 h 1. 5 h和 2 h后的 OD值,发现血清最佳反应时间为 1. 5 h

2. 1. 3 特异性试验 不同血清检测结果由表 2可见,此方法是特异的,除少数 (5/20)黄曲霉菌血清与极少数 (2/17)岛青霉菌血清外,与其它血清均无交叉反应

2. 1. 4 阻断试验 结果见表 3 一般认为,抗体 (或抗原)被抗原 (或抗体)中和后,吸收值降低 50%以上,即为阻断试验阳性

表 2 间接 ELISA方法对不同血清的检测结果
Table 2 Detecting results of different sera by ELISA

血清 Serum	检测份数 Number of sample	阳性份数 Positive number	阳性率 Positive rate	血清 Serum	检测份数 Number of sam ple	阳性份数 Positive num ber	阳性率 Positiv e rate
鸡黄曲霉菌血清 A . flavus serum	20	5	25%	鸡新城疫血清 ND serum	14	0	0
鸡岛青天霉菌血清 P. islandicum serum	17	2	11. 8%	鸡法氏囊病血清 IBD serum	19	0	0
鸡大肠杆菌血清 E. coli serum	25	0	0	鸡烟曲霉菌血 A. fumigatus serum	20	18	90%

2.1.5 重复性试验 板内与板间变异系数(CV, 是个体参数的标准差与平均数的比率)如表 4 可见本试验的板内、板间变异系数均小于 10%,说明试验的重复性好。

表 3 阻断试验结果
Table 3 Results of stopping tests

血 清 Serum	稀释度 Dilution degree	未阻断 Pre- stopping	阻断后 Post- stopping	判 定 Judgment
阳性血清 Positiv e serum	1: 16	0. 74	0. 32	+
阴性血清 Negative serum	1: 16	0. 19	0. 12	-

表 4 ELISA的重复性
Table 4 ELISA reproductivity

血清效价 Serum titre	板内变异系数 Variable coefficient within plate (CV%)	板间变异系数 Variable coefficient among plates (CV%)
高 High	6. 15	8. 12
中 Midle	5. 86	9. 13
低 Low	6. 31	8. 27

2.2 间接 ELISA与琼脂扩散试验的敏感性比较
如图 1所示,经 ELISA检测在感染后 7 d有 85%左右鸡出现阳性,14 d达高峰,而琼扩试验在 14 d仅有 10%鸡出现阳性

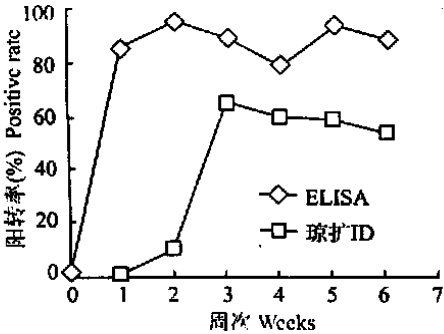


图 1 ELISA与琼扩结果比较

Fig. 1 Comparison of ELISA and ID

共对 120 份被检鸡血清同时进行间接 ELISA试验和琼脂扩散试验。由表 5可见,2种方法检出阳性数分别为 107份和 58份,阴性分别为 13和 62份。阴、阳性两者符合数之和占被检总数

的 59%, ELISA比琼扩阳性检出率高约 40. 8%。

表 5 ELISA与 ID检查烟曲霉菌感染血清抗体对比
Table 5 Comparation between ELISA and ID in
detecting A. fumigatus antibody

检查方法 Method	ELISA		小 计 Total
	+	-	
ID琼 +	58	0	58
扩 -	49	13	62
小计 Total	107	13	120

3 讨论

3.1 本试验证明,间接 ELISA在雏鸡烟曲霉菌抗体检测中具有特异、方便、快速的特点。其灵敏性远高于其它血清免疫学诊断方法^[5],人工感染后 7天即可检出雏鸡血清中的烟曲霉菌抗体。

3.2 琼脂扩散试验是曲霉菌抗体检测中常用的方法,此法操作简单,不需要特殊仪器,但不如 ELISA方法敏感。本试验发现间接 ELISA检出时间比琼脂扩散试验早 7 d以上,检出率高约 40. 8%,进一步证明间接 ELISA试验是一种灵敏特异的烟曲霉菌抗体检测方法。

3.3 一般认为,ELISA灵敏度高,对杂质反应的灵敏度也较高,故包被抗原是否纯化直接关系到 ELISA 试验的特异性和灵敏性。然而张月清等^[6]、薛采芳等^[7]、黄仕霞等^[8]和王翠兰等^[9]分别采用破碎的肺吸虫、完整炭疽菌体、沙门氏菌全菌和 A型兔多杀性巴氏杆菌(Pm)全菌作为抗原进行 ELISA试验均取得特异灵敏的结果。本试验也证明采用烟曲霉菌丝提取物抗原可以特异灵敏地检测烟曲菌抗体。表明采用适宜方法制备的粗制抗原仍能取得灵敏特异的结果。

3.4 研究者一致认为,用于 ELISA的抗原最适浓度一般为 0. 5~ 2. 0μg/ml,但也有使用较高浓度的报道,如 Hatfied等^[10]、胡清海等^[10]和张鹤晓等^[11],检测 1型和 2型鸭疫里氏杆菌(R. a)抗体时采用的菌体裂解抗原浓度分别为 62. 5μg/ml、149μg/ml和 70μg/ml。因而认为,本试验烟曲霉

- exposure [J]. Am J Vet Res, 1982, 43 488~ 492.
- [5] Richard J L, Cutlip R C, Thurston J R, *et al.* Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* [J]. Avian Dis, 1981, 25 53~ 67.
- [6] 张月清, 孙家鑫, 王正仪, 等. 采用酶联免疫吸附试验诊断肺吸虫病的观察 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1981, 1 (1): 54~ 60.
- [7] 薛采芳, 许辉, 陈白虹, 等. 用完整菌体抗原作 ELISA 检测抗炭疽荚膜抗体的初步研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1984, 4(6): 375~ 378.
- [8] 黄仕霞, 李毅, 刘秀梵. ELISA 检测鸡沙门氏菌抗体的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1990, (1): 31~ 33.
- [9] 王翠兰, 王西川, 王英厚, 等. 兔多杀巴氏杆菌病的 ELISA 诊断 [J]. 中国畜禽传染病, 1992 (1): 22~ 24.
- [10] 胡清海, 李刚, 郑明球, 等. 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(6): 352~ 356.
- [11] 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.

欢迎订阅 2002年《西北农业学报》

《西北农业学报》是由教育部主管,西北农林科技大学、甘肃、宁夏、青海、新疆农(林、垦)林业科学院和新疆、青海畜牧(兽医)科学院等八院校联合主办的农牧业学术期刊。本刊立足大西北,面向国内外,主要刊载体现西北地方特色的农牧业各专业学科在基础理论研究和应用技术理论研究方面具有创见的学术论文、领先水平的科研成果、学术报告、研究简报,有新意的文献综述及学术动态、科研成果、新品种介绍等。

主要读者对象为国内外农牧业科技人员,农业院校师生及高级农业技术管理和推广人员。

《西北农业学报》1992年创刊,为陕西省优秀科技期刊,已被中国科学引文数据库,《中国学术期刊(光盘版)》和万方数据库等国内外 12家权威性文摘期刊和数据库固定转载或收录。

本刊为季刊,季末月 10 日出版,大 16 开本,104 页,另附进口铜版纸图版。国内外公开发行,邮发代号 52-111;国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱),代号 Q4380 每期定价 8.00 元,全年 32 元。全国各地邮局均可订阅,亦可直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 陕西杨陵 西北农林科技大学西农校区 33信箱

邮政编号: 712100 联系电话: 029- 7091132