

3 种血清学试验检测鸡血清中新城疫抗体的比较研究

程太平, 师丽敏, 姬茜茜

(长江大学动物科学学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 以鸡胚中和试验 (NT)、血凝抑制试验 (HI) 和琼脂免疫扩散试验 (AGID) 分别检测相同 36 份鸡血清样品。将每个样品的抗体滴度转化为 $-\log X$ 后进行统计分析。对 3 种血清学试验所得到的 3 组数据进行方差分析及相关关系的检验。经方差分析, NT 组与 AGID 组、HI 组与 AGID 组之间差异极显著; NT 组与 HI 组之间差异不显著。相关关系检验, NT 组与 HI 组、NT 组与 AGID 组、HI 组与 AGID 组的相关系数分别为 0.973 1、0.843 1、0.884 8, 3 组之间的差异均极显著。结果表明, 免疫接种后一段时间内, 鸡体内疫苗诱导的中和抗体滴度与 HI 抗体滴度基本相平行; AGID 检出的抗体滴度与 NT 检出的中和抗体滴度及与 HI 试验检出的 HI 抗体滴度有密切的线性关系。AGID 检测的 NDV 抗体平均滴度比 NT、HI 检测的分别低 $1.640\ 8(1/2^{5.45}) - 1.471\ 1(1/2^{4.89})$ 、 $1.731\ 8(1/2^{5.69}) - 1.509\ 5(1/2^{5.01})$ 。

关键词: 新城疫; 鸡胚中和试验; 血凝抑制试验; 琼脂免疫扩散试验

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)02-0128-03

在接种新城疫疫苗或受到新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 野毒攻击后一段时间内, 鸡体内会产生中和性抗体和血凝抑制抗体。多种血清学试验可用于检测鸡血清中的这些抗 NDV 抗体, 有单向辐射免疫扩散试验^[1]、单向辐射溶血试验^[2]、琼脂扩散试验^[3]、血凝抑制试验、鸡胚中和试验^[4]、蚀斑中和试验^[5] 和酶联免疫吸附试验^[6]。这些试验在检测敏感性、操作简便性、试剂经济性及抗体针对性等方面差异较大。在我国, 多以中和试验和血凝抑制试验检测抽样的鸡血清, 将检测结果用于评价疫苗接种是否成功、疫苗品质、鸡群的免疫状态及分析鸡群是否受到野毒攻击。由于接种新城疫油剂疫苗或野毒攻击后鸡体内产生的抗体水平相当高, 即使以敏感性不够高的琼脂免疫扩散试验检测鸡血清, 也可能得到较为真实的结果。本研究的目的是探讨中和试验、血凝抑制试验和琼脂免疫扩散试验检测鸡血清的相关关系及其敏感性。

1 材料与方法

1.1 毒株和血清

NDV 标准毒株 I 系 (即 Mukteswer 株) 和 IV 系

(LaSota 株), NDV 阳性抗血清和阴性血清, 购自中国兽医药品监察所。待测鸡血清样品 36 份, 采自某种鸡场的产蛋种鸡群, 此次采血前 41 d, 该鸡群免疫接种过新城疫油乳剂疫苗。

1.2 以鸡胚病毒中和试验检测鸡血清样品

选购本地鸡蛋时, 这些本地鸡没接种过任何新城疫疫苗, 也没发生过新城疫, 并经血凝抑制试验抽样检测其卵黄, NDV 抗体阴性。将合格鸡蛋孵化, 至 9~10 日龄, 用灭菌 PBS (0.1 mol/L, pH 值 7.2, 含 8.5 g/L NaCl) 10 倍递增稀释 NDV I 系, 8 个组对应于 10^{-5} ~ 10^{-12} 8 个稀释度, 每组接种 8 个鸡胚, 0.1 ml/胚, 尿囊腔接种。观察 7 d, 统计 24~120 h 内死亡鸡胚数, 计算鸡胚半数致死量 (ELD₅₀)。

病毒中和试验采用终点法中和试验-固定病毒稀释血清法。用灭菌 PBS 4 倍递增稀释待测鸡血清样品, 稀释度分别为 $1/4$ 、 $1/4^2$ 、 $1/4^3$ 、 $1/4^4$ 、 $1/4^5$, 每组接种 8 个鸡胚。将 0.1 ml 200 ELD₅₀ NDV I 系与 0.1 ml 已稀释待测血清混合, 37℃ 孵育 30 min, 尿囊腔接种, 0.1 ml/胚。观察 7 d, 统计 24~120 h 内死亡鸡胚数, 按 Reed-Muench 公式计算血清样品的中和价 (PD₅₀)。将每个样品的中和价转化为 $-\log X$ 后进行统计分析。

1.3 以血凝抑制试验检测鸡血清样品

鸡血液采自没接种过任何新城疫疫苗的健康本地鸡, 经玻璃珠脱纤, 纱布过滤, 用 PBS 洗脱 3 次, 按红细胞压积/PBS 体积为 1.0/99.0 配成红细胞悬

收稿日期: 2006-08-30

作者简介: 程太平 (1962—), 男, 湖北天门人, 副教授, 主要从事禽病学和动物免疫学的教学和研究工作。Tel: (0716) 8453531;

E-mail: chengtaiping333@163.com。

液。将 NDV LaSota 株接种 5 个 10 日龄鸡胚,再孵化 5 d,收获尿囊液,混合即得 NDV 抗原。以血凝试验测定 NDV 抗原的凝集价。将待测血清样品 2 倍递增稀释,采用 V 形孔反应板以微量法进行血凝抑制试验,操作方法参照文献[7]。以 $-\log X$ 记录血清样品的抗 NDV 抗体的血凝抑制效价, X 为血清稀释度。

1.4 以琼脂免疫扩散试验检测鸡血清样品

将 1.3 中制备的 NDV 抗原稀释到凝集价为 $1/2^7$,作为琼脂免疫扩散试验的抗原。将待测血清样品 2 倍递增稀释,稀释度分别为 $1/1$ 、 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/8$ 、 $1/16$ 、 $1/32$,加新城疫病毒阳性抗血清和阴性血清作为对照孔,以培养皿做凝胶板,操作方法参照文献[7]。以 $-\log X$ 记录血清样品抗 NDV 抗体的血凝抑制效价, X 为血清稀释度。

1.5 数据统计分析

将 36 份鸡血清样品经中和试验、血凝抑制试验及琼脂免疫扩散试验检测得到的 3 组数据进行方差分析及相关关系的检验。

2 结果

3 组数据经方差分析,病毒中和试验结果与琼脂免疫扩散试验结果、血凝抑制试验结果与琼脂免疫扩散试验结果之间 $P < 0.01$,差异极显著;病毒中和试验结果与血凝抑制试验结果之间, $P > 0.05$,差异不显著。相关关系检验,病毒中和试验结果与血凝抑制试验结果之间的相关系数为 0.973 1, $t > t_{0.01}$, $P < 0.01$,差异极显著;病毒中和试验结果与琼脂免疫扩散试验结果之间的相关系数为 0.843 1, $t > t_{0.01}$, $P < 0.01$,差异极显著;血凝抑制试验结果与琼脂免疫扩散试验结果之间的相关系数为 0.884 8, $t > t_{0.01}$, $P < 0.01$,差异极显著(表 1)。

3 讨论

鸡体内的抗 NDV 中和抗体主要是由 NDV 表面的融合(F)蛋白诱导的,但 NDV 表面的 HN 蛋白诱导的抗体也具有部分中和作用。抗功能性表面糖蛋白 HN 或 F 的抗体均可中和 NDV^[8],但抗 F 多肽上特异性表位的单克隆抗体的中和作用比抗 HN 抗体的要强^[9]。依靠单一的 HI 试验结果来评估疫苗的保护水平及鸡群的免疫力状态是不够全面的^[9]。中和抗体滴度似乎与 HI 抗体滴度相平行,特别是在免疫接种之后^[6],因此 HI 试验可用于检测保护性

表 1 3 种血清学试验检测鸡血清中新城疫抗体结果

血样编号	$-\log PD_{50}$ (NT)	抑制效价 (HI)	抗体效价 (AGID)
1	2.184	2.107 2	0.602 1
2	2.175	2.107 2	0.602 1
3	2.359	2.408 2	0.602 1
4	2.542	2.709 3	1.204 1
5	2.743	3.010 3	1.204 1
6	2.201	2.107 2	0.602 1
7	2.765	3.010 3	1.204 1
8	2.726	3.010 3	1.204 1
9	2.552	2.709 3	1.204 1
10	2.177	2.107 2	0.602 1
11	2.781	3.010 3	1.204 1
12	2.169	2.107 2	0.602 1
13	2.406	2.408 2	0.903 1
14	2.187	2.107 2	0.602 1
15	2.417	2.408 2	0.903 1
16	2.376	2.408 2	0.602 1
17	2.191	2.107 2	0.602 1
18	2.349	2.408 2	0.602 1
19	2.537	2.709 3	1.204 1
20	2.113	2.107 2	0.301 0
21	2.425	2.408 2	0.903 1
22	2.437	2.408 2	0.903 1
23	2.104	2.107 2	0.301 0
24	2.246	2.408 2	0.602 1
25	2.483	2.709 3	0.903 1
26	2.411	2.408 2	0.903 1
27	2.387	2.408 2	0.903 1
28	2.172	2.107 2	0.602 1
29	2.531	2.709 3	0.903 1
30	2.216	2.408 2	0.602 1
31	1.875	1.806 2	0.301 0
32	2.550	2.709 3	1.204 1
33	2.385	2.408 2	0.903 1
34	2.183	2.107 2	0.602 1
35	2.394	2.408 2	0.903 1
36	2.546	2.709 3	1.204 1

抗体反应。本研究中,36 份鸡血清样品的中和试验的检测数据与 HI 试验的检测数据经方差分析,差异不显著,而相关系数为 0.973 1,表明免疫接种后一段时间内,鸡体内疫苗诱导的中和抗体反应与 HI 抗体反应基本相平行,这一结论与 Adair 等^[6]的研究结果基本一致。NDV 疫苗诱导的中和抗体滴度与 HI 抗体滴度是否总是平行及持续期是否相同还不确定,需要进一步研究。

在本研究中,琼脂免疫扩散试验(AGID)所使用的抗原物质是全病毒,包括 NDV 的表面糖蛋白 F 和 HN,都是可溶性的。只要抗 F 和抗 HN 的抗体达到

AGID 的检测敏感度就会被检出。36 份鸡血清,中和试验的检测数据与 AGID 的检测数据的相关关系极显著,相关系数为 0.843 1;HI 试验的检测数据与 AGID 的检测数据的差异也极显著,相关系数为 0.884 8。这些结果表明,AGID 检出的可溶性抗体滴度与中和试验检出的中和抗体滴度及与 HI 试验检出的 HI 抗体滴度有密切的线性关系。依此,似乎可以用 AGID 检测的 NDV 抗体滴度来评估鸡群的免疫力。36 份鸡血清中,中和试验、HI 试验、AGID 检出的抗 NDV 抗体的平均滴度分别为 $2.369 3 \pm 0.034 9$ (转换为 $1/234.05 = 1/2^{7.87}$,下同)、 $2.425 0 \pm 0.052 2$ ($1/266.01 = 1/2^{8.06}$)、 $0.811 1 \pm 0.047 7$ ($1/6.47 = 1/2^{2.69}$)。AGID 检测的 NDV 抗体平均滴度比前两者的分别低 $1.640 8$ ($1/2^{5.45}$) - $1.471 1$ ($1/2^{4.89}$)、 $1.731 8$ ($1/2^{5.69}$) - $1.509 5$ ($1/2^{5.01}$),这显然表明 AGID 的敏感性较低。由此推测,HI 的抗 NDV 抗体滴度达到 $1/2^6$ 的血清样品,AGID 检测的阳性率达 100%;达 $1/2^5$ 的血清样品,AGID 只能检出部分为阳性;低于 $1/2^4$ 的可能均为阴性。达 $1/2^5$ 的血清样品,AGID 检测阳性率有多高,还需进一步研究。而白文彬等^[7]指出,HI 抗体达 $1/2^5$ 的血清,AGID 检测全部为阳性;达 $1/2^4$ 的,AGID 检测部分为阳性;低于 $1/2^4$ 的,AGID 检测全部为阴性。这相应地比本试验中要低一个稀释度。李慧姣等^[10]研究得出,ND 灭活疫苗免疫后,HI 抗体滴度与攻毒保护率呈正相关,HI 抗体滴度为 $3 \log_2$ 、 $4 \log_2$ 、 $5 \log_2$ 、 $\geq 6 \log_2$,其相应的攻毒保护率分别为 16.1%、86.7%、97.2%、100.0%。将其与本研究结论比较,AGID 检测结果为阴性的被检鸡只也受到保护,原因可能是局部免疫的作用。另外,本研究中 HI 试验的结果与白文彬等^[7]和李慧姣等^[10] HI 试验的结果可能存在小的差异,因为不同实验室 HI 试验结果并非总是有很好的重复性^[11]。

虽然 AGID 的敏感性较低,但其操作简便、试剂价廉、试验重复性好,也可用于非典型新城疫的诊

断。发生非典型新城疫的鸡群中,发病鸡的血清 NDV 抗体水平一般可达到 $1/2^9$,而有部分鸡的血清 NDV 抗体低于 $1/2^5$ 。取部分病鸡及部分健康鸡采血,以 AGID 检测,结果部分病鸡的抗体滴度高,而健康鸡的抗体滴度较低或为阴性并参差不齐,则可作出诊断。

参考文献:

- [1] Chu H P, Snell G, Alexander D J, et al. A single radial immunodiffusion test for antibodies to Newcastle disease virus [J]. Avian Pathol, 1982, 11: 227 - 234.
- [2] Hari Babu Y. The use of a single radial haemolysis technique for the measurement of antibodies to Newcastle disease virus [J]. Indian Vet J, 1986, 63: 982 - 984.
- [3] Gelb J, Cianci C G. Detergent - treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitin test antigen [J]. Poult Sci, 1987, 66: 845 - 853.
- [4] Beard C W. Serologic Procedures [M] // Hitchner S B, Domermuth C H, Purchase H G, et al. Isolation and Identification of Avian Pathogens. Kennett Square PA: American Association of Avian Pathologists, 1980: 129 - 135.
- [5] Beard C W, Hanson R P. Newcastle Disease [M] // Hofstad M S, Barnes H J, Calnek B W, et al. Disease of Poultry. 8th ed. Ames IA: Iowa State University Press, 1984: 452 - 470.
- [6] Adair B M, McNulty M S, Todd D, et al. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA [J]. Avian Pathol, 1989, 18: 175 - 192.
- [7] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 225 - 226; 140 - 142; 228.
- [8] Russel P H. Monoclonal antibodies in research, diagnosis and epidemiology of Newcastle disease [M] // Alexander D J (ed.). Newcastle disease. Boston MA: Kluwer Academic Publishers, 1988: 131 - 146.
- [9] Meulemans G, Gonze M, Carlier M C, et al. Protective effects of HN and F glycoprotein - specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease [J]. Avian Pathol, 1986, 15: 761 - 768.
- [10] 李慧姣, 蒋桃珍, 李启红, 等. 鸡新城疫灭活疫苗免疫攻毒试验与血清学 (HI) 试验的平行关系研究 [J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(8): 5 - 8.
- [11] Beard C W, Wilkes W J. A comparison of Newcastle disease hemagglutination - inhibition test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States [J]. Avian Dis, 1985, 29: 1048 - 1056.