

牛副结核ELISA诊断方法研究

何昭阳 韩有库 顾万钧 钱爱东 李卯年

(吉林农业大学)

摘 要

本文建立了牛副结核病ELISA诊断方法。采用亲和层析抗原。被检血清以高压粉碎草分枝杆菌吸收原进行吸收。该方法的敏感性76%，特异性97%，通过对2483头奶牛进行检测，检出率为6.1%，并与常规的补反和变态反应进行了比较。作者认为：牛副结核ELISA可以替代补反，做为检测牛副结核的一种有力手段。

关键词 牛副结核病, ELISA, 亲和抗原

牛副结核病是由副结核分枝杆菌引起的一种以反刍兽为主的慢性传染病，又叫Johnes病。目前对该病尚无有效的治疗办法，根除此病的唯一办法是检出、隔离或淘汰病畜。目前本病的检疫主要依靠补反和变态反应。但二者都有一定的局限性。1978年Jorgensen首先采用ELISA诊断牛副结核^[1]，此后Merkal、Abbas和Yokomizo等均进行了研究^[2~4]。我国韩有库^[5]1973年首先研究此病，并首次在我国分离出牛副结核分枝杆菌。国内对牛副结核ELISA的研究除杨晓林有过部分报道外^[6]，其它均无报道。我们于1985年开始进行牛副结核ELISA研究，经过四年的时间，建立了牛副结核ELISA的诊断方法。此法具有较好的敏感性、特异性和实用性。

材 料 与 方 法

一、菌株：采用国际标准副结核菌株P₁₈和国内自行分离株C₂。其它分枝杆菌菌株均购自卫生部药品生物制品检定所。

二、副结核阳性血清采自临床症状明显、检菌、补反和剖检均为阳性的牛血清。阴性血清采自临床、补反、变态反应和检菌均阴性的健牛血清。被检血清采自东北、华北地区近十个奶牛场的牛血清。

三、亲和抗原的制备，按何昭阳报道的方法进行^[7]。

四、被检血清的非特异性吸收：将牛、禽草分枝杆菌及副结核分枝杆菌分别制成菌体吸收原吸收副结核菌高免血清，然后进行ELISA，以观察其吸收效果。

五、牛副结核ELISA酶标抗体按常规法制备。

六、ELISA程序：采用间接法。亲和抗原按4-6μg/孔包被，被检血清以1:100*稀释加入。各成分加入量均为0.1ml。最后以DG-3022酶联免疫检测仪测其OD值(490nm)。同时设阴、阳性血清、抗原、抗体和酶标抗体对照。

七、补反和变态反应检测，按常规法进行。补反抗原为禽结核脂多糖抗原，变态反

* 本文于1989年1月6日收稿。

应原为副结核PPD。

结 果

一、抗原特异性比较结果 用已知的副结核阳性血清和阴性血清分别以亲和层析抗原、未亲和的洗脱抗原和Sephadex G₂₀₀凝胶柱抗原进行ELISA检测,以比较它们的OD值。结果表明亲和抗原对阳性血清的OD值最高,而对阴性血清的OD值最低。

二、被检血清的非特异性吸收 用牛副结核分枝杆菌、结核杆菌、牛、禽和草分枝杆菌的原生质抗原分别检测已知的牛副结核免疫血清,结果五种抗原均与副结核免疫血清出现明显反应。当该免疫血清分别以五种抗原吸收,再进行ELISA,结果除了副结核抗原能将免疫血清吸收干净外,其它四种抗原均不能完全吸收掉。这说明副结核分枝杆菌除了与上述四种吸收原有类属抗原外,还有其特异性的抗原成份。考虑到草分枝杆菌生长速度快,又是非病原菌,因此首选为副结核ELISA的血清吸收原。在血清未采用草分枝杆菌吸收时,阳性血清和阴性血清的OD值均较高,反差不明显。而吸收后,阳性血清的OD值仍较高,但阴性血清的OD值则明显下降,降至临界值以下。

三、ELISA各要素的最适浓度测定结果 亲和抗原的最适包被量为4~6 μg/孔,被检血清的最适稀释度为1:100,吸收原为50~100mg/ml。本试验检测942头健牛血清,经统计学处理,其平均OD值为0.23,以 $\bar{x} + 3SD$ 做判定标准,即 $OD \geq 0.50$,则判为阳性。

四、牛副结核ELISA敏感性与特异性测定 取已知阳性牛血清71头份,ELISA检出54头,敏感性为76%。取副结核阴性牛血清99头份,ELISA阳性3头,其中两头为结核阳性牛,均分离出牛型分枝杆菌。所以本试验特异性为97%。采用结核、布病、牛白血病、牛鼻气管炎、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌等非副结核血清进行检测,除部分结核血清干扰外,均呈阴性反应。副结核阳性血清加入过量的副结核抗原吸收后,其OD值降至阴性平均值以下。这表明牛副结核ELISA是抗原抗体的特异性反应。

五、ELISA、补反和变态反应的比较检测结果 采用这三种方法对2483头检测,检出率分别为6.1%、2.3%和3.7%(见表1)。

表1 ELISA与补反、变态反应比较检测

比较项	检测方法 结果	ELISA		补 反			变态反应		
		+	-	检头数	+	-	检头数	+	-
ELISA	+	150		150	54	96	92	51	41
	-		2333	2333	2	2331	2391	42	2349
检出率(%)		6.1		2.3			3.7		

对49头粪检菌阳性牛,这三种方法与粪检的阳性符合率分别为93.9%、57.1%和52.9%。对临床上出现腹泻、消瘦怀疑是副结核病牛的16头,应用这三种方法进行比较检测,其检出率分别为87.5%、50%和25%(表2)。

表2 三种方法与粪检菌阳性以及检测有症状牛的比较

检测方法	粪检菌阳性(头数)	结果	阳性符合率(%)	有症状牛(头数)	结果	阳性符合率(%)
ELISA	49	+ 46	93.9	16	+ 14	87.5
		- 3			- 2	
补反	49	+ 28	57.1	16	+ 8	50
		- 21			- 8	
变态反应	17	+ 9	52.9	16	+ 4	25
		- 8			- 12	

讨 论

一、1985年Yokomizo Y.首先采用草分枝杆菌热处理抗原对被检血清进行吸收而获得较好的特异性^[4]。本试验也取得类似的结果。我们在Yokomizo的基础上,采用超声粉碎、离心后的吸收抗原,加入血清后不需再离心,结果与全菌体吸收一样,因而大大地简化了程序,缩短了时间,有利于大批检疫。

二、本试验的敏感性为76%,这比Yokomizo^[8]的报道(66%)要高一些。若以临床检测可疑病牛的抗体,则与临床及剖检变化的符合率就更高。本试验已扑杀了ELISA阳性牛9头,均有明显的副结核病变。

三、当动物感染副结核菌后,机体首先产生细胞免疫反应,然后才是体液免疫反应。据报道变态反应与补反的符合率分别为9%和10%^[9],这就是说,这两种方法诊断牛副结核不能互相替代,只能相互补充。本试验对粪检阳性牛,补反和变态反应的符合率分别为57.1%和52.9%,而对有症状的可疑病牛,两者的检出率分别为50%和25%。看来,对有临床症状的病牛,变态反应的检出率明显下降;相反,变态反应检出的阳性牛,补反阳性则很少。

ELISA与变态反应的符合率比补反与变态反应的符合率高,ELISA与变态反应的相互符合率均为55%。在ELISA阳性的150头牛中,补反检出54头,符合率为36%,相反,补反阳性的56头,ELISA阳性54头,ELISA与补反的符合率为98%。这就是说,ELISA几乎能检出补反的全部阳性血清,只有两头补反阳性,ELISA阴性。这两份血清是因两者抗原的不同还是因补反的假阳性或ELISA的假阴性造成的尚需进一步研究。本试验对污染牛群的检测,ELISA的检出率6.1%,补反的检出率2.3%。补反阳性几乎全部包含在ELISA阳性中,因此我们认为ELISA可以替代补反而作为牛副结核的一种检测手段。

四、在本试验中我们采用强、弱两种标准阳性血清做对照,当标阳血清校正到符合规定的OD值时,再判读未知血清,其结果就比较稳定。

结 论

一、建立了ELISA检测牛副结核的程序。通过2483头牛血清的检测,认为该方法

是一种敏感性高、特异性好、稳定、快速的检测手段。

二、采用亲和层析抗原是本试验的较好抗原。待测血清采用高压粉碎的草分枝杆菌吸收，其非特异性反应大为降低，而且省时省力，适于大批样品检测。

三、牛副结核ELISA与补反相比，有敏感性高、特异性相当的特点，它可以做为替代补反检测牛副结核的一种手段。

参 考 文 献

- [1] Jorgensen, J. B. et al., 1978. ELISA for the detection of antibodies to *M. paratuberculosis* in cattle. *Acta Vet. Scand.*, 19: 310~312.
- [2] Merkal, R. S., Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Asso.*, 163: 1100~1102.
- [3] Abbas, B. et al., 1983. Isolation of specific peptides from *M. Paratuberculosis* protoplasm and their use in an ELISA for the detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 2229~2236.
- [4] Yokomizo, Y., 1983. ELISA for detection of bovine immunoglobulin G₁ antibody to a protoplasmic antigen of *M. paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 2205~2207.
- [5] 韩有库, 1980, 牛副结核病. 吉林畜牧兽医(增刊), 1~5.
- [6] 杨晓林等, 1987, 牛副结核病四种血清学诊断方法的比较——初步结果. 畜牧兽医学报, 18(2): 136~140.
- [7] 何昭阳等, 1938, 牛副结核亲和抗原的制备以及其抗原性的比较. 中国畜禽传染病, 5: 55~56.
- [8] Yokomizo, Y. et al., 1985. A method for avoiding false positive reactions in an ELISA for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *JPN. J. Vet. Sci.*, 47: 111~119.
- [9] 李明权, 1981, 牛副结核病补体结合反应诊断法的研究. 家畜传染病, 3.

STUDIES ON THE DIAGNOSTIC METHOD OF BOVINE PARATUBERCULOSIS USING ELISA

He Zhaoyang, Han Youku, Gu Wanjun, Qian Aidong, Li Maonian

(The Animal Science Department of Jilin Agricultural University)

Abstract

An ELISA method was developed for the detection of antibodies to paratuberculosis in bovine sera. The antigen used for ELISA was the immunoaffinity chromatography antigen. The bovine sera detected were absorbed by the antigen of *M. phlei* which was killed by heating and treated in the ultrasonic wave. The ELISA sensitivity was 76%. The specificity was 97%. We determined 2483 sera from the suspected herds by using the ELISA technique. of them, 150 were detected as positive 6.1%. The detection rate of CF test was 2.3% and that of the allergic reaction test was 3.7%.

Among 150 positive sera tested by ELISA, 54 were positive by CF test. And whereas among 56 positive sera by CF test, all but two were positive by ELISA. The ELISA was proposed as an alternative to the CF test for the detection of antibodies against *M. paratuberculosis* in bovine serum.

Key words Paratuberculosis, ELISA, Immunoaffinity chromatography antigen