

奶山羊布鲁氏菌病抗原与抗体双检测的效果分析

董丽娟¹, 杨少华², 王 广³, 沙日阿康³, 屈颖新³, 任新阳³, 党彬州⁴, 李 广^{3,*}

(1. 陕西陇县畜牧工作站, 陕西 陇县 721200; 2. 陇县兽医工作站;

3. 西北农林科技大学动物科技学院; 4. 陇县固关镇畜牧兽医站)

摘要: 为了有效检测净化奶山羊布鲁氏菌病群体, 加快奶山羊产业健康稳步发展。本文采用布鲁氏菌病抗原与抗体双检测方法对陕西某奶山羊场进行了检测分析。结果表明, 在某奶山羊场引入羊时, 采用抗体单一检测发现全群 228 只羊感染了 36 只, 感染率达到 15.79%, 发现感染后对本群感染羊进行了无害化处理和圈舍清洗消毒, 3 个月后对剩余的 192 只羊有进行了一次全群检测, 结果检测出 18 只阳性羊, 与上一次的净化方式一样处理后, 同样又在 3 个月后对剩余的 174 只羊采用抗原与抗体双检测方法, 布病抗体检测卡检测出 8 只羊, 布病抗原检测卡检测出 10 只羊, 而且用布病抗体检测卡和布病抗原检测卡检测出来的羊只编号完全不同, 3 个月后对剩余的 156 只羊进行同样的方法进行检测, 结果仅检查出 1 只阳性羊, 6 个月后对剩余的 155 只羊进行同样的方法进行检测, 未发现布病阳性羊只。利用抗原与抗体双检测继续在 3 个月、6 个月进行检测均未发现阳性羊只。本试验得出结论, 相比于抗体单一的布鲁氏菌病检测法, 抗原抗体共同使用的检测方法布病阳性率明显的降低, 且能短期内达到预期净化的效果, 说明双抗使用在羊布鲁氏菌病检测中效果更好, 更具有推广使用的意义。

关键词: 奶山羊; 布鲁氏菌病; 抗原; 抗体双检测

[中图分类号] S853.31 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)05-0118-04

Analysis on the Effect of Double Detection of Antigen and Antibody of Brucellosis in Milk Goats

DONG Lijuan¹, YANG Shaohua², WANG Guang³, SHA Riakang³, QU Yingxin³, REN Xinyang³, DANG Binzhou⁴, LI Guang^{3,*}

(1. Shaanxi Longxian animal husbandry workstation, Longxian Shaanxi 721200, China; 2. Long County Veterinary Workstation;

3. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University; 4. Guguang Town Animal Husbandry and Veterinary Station)

Abstract: In order to effectively detect and purify the brucellosis population of dairy goats and accelerate the healthy and steady development of the dairy goat industry, this paper used the dual detection method of brucellosis antigen and antibody to detect and analyze a dairy goat farm in Shaanxi. The results showed that when sheep were introduced into a dairy goat farm, 36 of the 228 sheep in the whole flock were infected by single antibody detection, and the infection rate reached 15.79%. disinfect. Three months later, a whole-group test was carried out on the remaining 192 sheep, and 18 positive sheep were detected. After the same purification method as last time, the antigen and antibody double detection method was used for the remaining 174 sheep 3 months later. Eight sheep were detected by the brucellosis antibody detection card, and 8 sheep were detected by the brucellosis antigen detection card. 10 sheep, and the numbers of the sheep detected by the brucellosis antibody test card and the brucellosis antigen test card are completely different. Three months later, the remaining 156 sheep were tested by the

same method, and only one positive sheep was detected. After 6 months, the remaining 155 sheep were tested by the same method, and no brucellosis-positive sheep were found. The use of antigen and antibody double detection continued to detect positive sheep at 3 months and 6 months. The conclusion of this experiment is that compared with the brucellosis detection method with a single antibody, the detection method using both antigen and antibody has a significantly

[收稿日期] 2023-04-20

[基金项目] 陕西省农业协同创新与推广联盟[LMZD202002]; 陕西省农业科技创新驱动项目合同[NYKJ-2021-ST-03]; 陕西省技术创新引导专项[2022QFY11-01]

[作者简介] 董丽娟(1985-), 女, 陕西宝鸡人, 本科, 畜牧师, 助理兽医师, 研究方向: 动物营养与饲料研究, Email: donglijuan@163.com

* [通信作者] 李广(1965-), 男, 陕西蒲城人, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 奶山羊生殖生理学研究, Email: liguangdky@163.com

lower positive rate of brucellosis, and can achieve the expected purification effect in a short period of time. This shows that the use of double antibodies is more effective in the detection of sheep brucellosis, and it has more significance for popularization.

Key words: dairy goat; brucellosis; antigen; antibody double detection

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的人畜共患疾病,被列为人类和动物的第二类感染。家畜中牛、羊等动物流动性较其它动物强,临床特征是主要侵害家畜的生殖系统。对母畜来说,该病的潜伏期为 14~180 d,母畜最显著的症状是流产,发生时间不固定,常发生于第六到第八个月,大多数在第一次流产后则不再流产,公畜则多出现睾丸炎,此病严重危害人和动物健康,被 OIE 列为 B 类动物疫病。该病在世界各地流行范围十分广泛,在很多国家和地区的家畜中广泛报道,其中 100 多个国家和地区有人感染布氏杆菌病。我国多年坚持检疫和淘汰扑杀措施,使该病曾一度得到控制,但由于该病传染性强,且养殖人员防护意识较低,防控体系较薄弱,资金方面也是一笔不小的数目,所以当前我国布病防控形势依旧十分严峻。另一个新的流行病学趋势是布鲁氏菌病从牧区向农区蔓延,以点状散发或点状暴发的形式流行。国外的布病检测最早是在 1976 年 Garin-Bastuji 等首次用 ELISA 检测布鲁杆菌抗体,并发现其敏感性比试管凝集反应要高 10~100 倍,在此基础上,后面的研究者不断地推出新的检测方法和检测工具。近年来,许多地区人畜间布病的发病率也呈现上升趋势。人类是布氏杆菌的终末宿主,可通过喝生乳,吃生肉或半熟的肉感染,或者饮用被病畜污染的水感染,也会通过吸入空气中带有布氏杆菌的尘埃,飞沫而感染,还可以通过创伤的皮肤而感染,从而危害人的健康。因此,加强布病的防控势在必行。为了有效防控布病,必须严格执行国家对该病的防控规定:非疫区通过监测方法;稳定控制区采用监测净化的方法;在控制区和疫区采用监测、扑杀和免疫相结合的防控措施。控制本病传染的最好的办法就是坚持自繁自养,若要引入牛羊,一定要加强检疫,避免引进患病牛羊,如果牛羊已经患有布病,应及时进行淘汰,做好消毒措施。疫苗接种也是预防本病的最有效措施。

随着陕西省奶山羊产业的快速发展,奶山羊引进频率不断增加,引入及外购奶山羊是引起本病传播的主要途径,所以引进羊只时必须加强做好布病

检测工作。现行的布病检测还是停留在血清学布鲁氏菌病抗体检测上,羊感染了布鲁氏菌病后机体产生抗体后才能检测出羊是否患有布氏菌病,在产生抗体之前着很长一段时间内很难检测出来,但羊已感染布鲁氏菌病,布鲁氏菌病病菌已在羊群中开始传播,待羊产生抗体再检测出阳性个体,羊群中已感染很多,造成重大经济损失。为此,本研究采用布鲁氏菌病抗原与抗体双检测方法对某地奶山羊场进行了检测分析,为奶山羊布鲁氏菌病的净化与防控相关的工作提供一定的理论和技术依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 在陇县选择 2 家奶山羊养殖户作为试验场,试验用奶山羊 514 只。

1.1.2 试验试剂 布病抗原、抗体检测卡,由深圳芬德生物技术有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 布鲁氏功病抗原检测卡检测 布病抗原检测卡通过胶体金免疫层析试验(GICA)方法制成,样品加入至加样孔后与胶体金标记物同时沿层析膜下移,若样品中的布病抗原与胶体金标记物和检测线的扑捉物结合从而显示紫红色,若样品中不存在布病抗原,则不产生紫红色反应,布病抗原检测卡主要用于检测血液中的布病抗原。

1.2.2 布鲁氏菌病抗体检测卡检测 布病抗体检测卡利用胶体金免疫试验(GICA)方法制成,样品加入至加样孔后与胶体金标记物同时沿层析膜下移,若样品中布病抗体与胶体金标记物和检测线的抗原结合从而显示紫红色,若样品中不存在布病抗体,则不产生紫红色反应。布病抗体检测卡主要用于检测血清中的布病抗体。

1.3 数据分析方法

统计分析结果采用“平均数±标准差”来表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,具有统计学意义。

2 布鲁氏菌病检测结果与分析

2010 年陕西某养羊场在引入羊只时不慎将布鲁氏菌病羊引入,利用抗体单一布病检测法发检测了全群 228 只羊已感染 36 只,阳性率为 15.79%,并对感染羊只进行了无害化处理,羊场紧急进行了清洗消毒;同时为了有效控制疫病的传播,3 个月后将剩余的 192 只羊有进行了一次全群检测,结果检测出 18 只阳性羊,阳性率为 9.38%,同样又在 6 个

月后对剩余的 174 只羊采用抗原与抗体双检测方法,布病抗体单一检测法检出 8 只阳性羊,阳性率为 4.60%,同样的进行进化消毒;布病抗原检测卡检测检测出 10 只羊,而且用布病抗体检测卡和布病抗原检测卡检测出来的羊只编号完全不同,随将 18 只羊全部进行了无害化处理,6 个月后对剩余的 156 只

羊进行布病抗原与抗体双检测,结果仅检查出 1 只阳性羊,阳性率为 0.64%;6 个月后对剩余的 155 只羊进行同样的方法进行检测,未发现布病阳性羊;继续在 3 个月、6 个月进行检测,均未发现阳性羊。某奶山羊场布病抗体单一检测法和抗原与抗体双检测分析结果见表 1。

表 1 某奶山羊场布病抗体单一检测法与抗原与抗体双检测分析结果

只,%

时间	抗体单一检测法			抗原与抗体双检测方法		
	羊数(只)	阳性个体(只)	阳性率(%)	羊数(只)	阳性个体(只)	阳性率(%)
第 1 天	228	36	15.79 ^a	174	18	10.34 ^b
第 30 天	192	18	9.38 ^a	156	1	0.64 ^b
第 60 天	174	8	4.60 ^a	155	0	0.00 ^b

注:同行数据不同字母肩标表示极显著($P < 0.01$)。

3 布鲁氏菌病检测讨论

世卫组织和联合国粮农组织已经宣布布病是易被忽视的人畜共患疾病之一,全球 100 多个国家每年约有 50 多万新发布病病例。布鲁氏杆菌病一直是我国存在的持续性的人畜共患病之一,也是各地养殖场区突出的公共卫生问题,常年来对牛羊的生长和繁育工作造成了很大的困扰。通过本次试验结果显示,对引进的羊只使用不同方法的布病检测,初次检测的羊中使用双抗结合使用检测的阳性率更低为 10.36%,比单一使用的检测法低了 5.45%,说明后者使用效果显著;同样的方法,在 3 个月后再对剩余的健康羊群做布病检测,结果发现使用双抗检测法阳性检出率降低明显占健康羊只的 0.64%,较抗体单一检测法减少了 8.74%,说明使用双抗结合法检测能对羊群起到较好的检测效果;然后在 6 个月后对第二次健康的羊只进行布病检测发现抗体单一检测法检出了 8 只羊,占全群健康羊只的 4.60%,而使用双抗结合的检测方法没有检出阳性羊只,充分说明了使用双抗检测布病法优于抗体单一检测法,达到了预期净化羊群的目的。羊的布病感染的因素是多方面的,进入 21 世纪以来,随着我国人民生活水平的不断提高,奶羊产业逐渐繁荣起来,便捷的交通使人们可以随处流动,从而导致布病的发病率也随着持续升高。有研究表明,自 2004 年以来,布鲁氏菌病的牲畜阳性率和感染人的数量明显的升高,2014 年达到峰值为 57 222。也有大量的研究发现,羊的布病感染率强于牛的。动物感染布病的途径主要是由于接触感染布氏杆菌的家畜、细菌排泄物或食用被该菌污染的食物,尤其是绵羊和山羊奶制品。Zurong Y 等人的研究表明,气温、日照时间、降雨量、相对湿度等在人间布氏杆菌病传播

的季节波动中起着至关重要的作用。人感染本病主要表现为发热,呈长期低热状态或呈波形热等,急性期患者多汗,最常见症状是全身无力,食欲不振类似于感冒,也会伴随关节炎和生育等问题的出现。布鲁氏菌 SAT 是目前诊断布病的确诊证据之一,但不同实验室检测结果相差较大。

现阶段,我国常用的布氏杆菌检测的方法有 3 种:首先是细菌分离鉴定方法,它是布病诊断的“金标准”,但由于布病的分离培养时间长、检出率低、检测条件高,对试验技术人员的危害较大,存在一定的生物安全隐患。其次是血清学检测方法,当大规模检测布病时,血清学检测是诊断布氏杆菌病的常用方法,其敏感性较差、易受到非特异性抗体干扰,易发生溶血、误差大且操作较为繁琐,易受肉眼观察的主观因素的影响等缺点,且存在假阳性和假阴性,确诊还需要结合其他检测方法。最后是分子生物学检测方法,随着分子检测技术的发展,PCR 技术成为一种快速简便、纯度要求低、特异性强、灵敏度高的体外核酸扩增技术方法,被广泛应用于动物学、生物学、食品卫生等领域。但也存在一些假阴性、假阳性等问题,同时其缺乏规范化的检测方法和判定标准。定量 PCR 易污染、实验成本和实验场所要求较高,限制了其推广和临床应用,还需进一步的优化提升其检测的稳定性和实用性。

4 布鲁氏菌病检测结论

综上所述,在本次试验条件下,使用单一抗原检测发现假阴性率较高,检测的周期也较长,而使用布病抗原检测卡和布病抗体检测卡两者有机的结合的方法,检测出的假阳性率较低,能在较短生长周期内净化羊群,因此,使用后一种方法能较快检出阳性率达到有效净化奶山羊群体的目的,进而对提高奶山羊

养殖经济效益和全群羊只健康指数具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李峰,黄兴军,董炳梅,等.某地区羊布鲁氏菌病血清学调查与 4 种血清学检测方法的比较应用[J].中国草食动物科学,2020,40(2):48-50.
- [2] 李建玲,李爱巧,杨启元,等.乌鲁木齐牛羊布鲁氏菌疫苗免疫效果对比试验[J].中国动物检疫,2013,30(4):47-49.
- [3] 葛慎锋,王虹,刘建文,等.动物布鲁菌病的流行态势与防控策略[J].中国兽医杂志,2012,48(6):90-93.
- [4] GB/T 18646-2018, 动物布鲁氏菌病诊断技术[S].2018.
- [5] PAPPAS G, PAPANITRIOU P, AKRITIDIS N, *et al.* The new global map of human brucellosis[J]. The Lancet Infectious Diseases,2006,6(2):2.
- [6] S L, Z H, W X, *et al.* Changing Epidemiology of Human Brucellosis, China, 1955 - 2014[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(2):184.
- [7] L L, Y G, Z C, *et al.* Epidemiology and the control of disease in China, with emphasis on the Chinese Biobank Study[J]. Public Health,2012,126(3):3.
- [8] R X, C X, W M, *et al.* Correction to: Brucellosis seroprevalence in ovine and caprine flocks in China during 2000-2018: a systematic review and meta-analysis. [J]. BMC veterinary research,2019,15(1):1.
- [9] Y Z, P M, Z Q, *et al.* Spatiotemporal expansion of human brucellosis in Shaanxi Province, Northwestern China and model for risk prediction. [J]. PeerJ, 2020,8.
- [10] ALSUBAIE S, TURKISTANI S, ZEAITER A, *et al.* Lack of correlation of Brucella antibody titers with clinical outcomes and culture positivity of brucellosis[J]. Trop Dis Travel Med Vaccines, 2021, 7(1): 5.
- [11] 蒙晓雷,崔捷.人畜共患布鲁氏菌病的危害与防治[J].畜牧兽医科技信息,2021,534(6):51.
- [12] 梅力,王英超,程汝佳,等.1种布鲁氏菌微滴式数字 PCR 检测方法的建立[J].畜牧兽医学报,2021,52(6):1753-1759.
- [13] 巫秀红,刘庆斌,张永红,等.布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].北京农学院学报,2021,36(3):78-82.
- [14] KILIC B. Brucella melitensis and Brucella abortus genotyping via real-time PCR targeting 21 variable genome loci[J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 180(1):1.
- [15] 李红叶.布鲁氏菌病实验室检测方法研究进展[J].兵团医学,2013,38(04):46-48.
- [16] DOI H, TAKAHARA T, MINAMOTO T, *et al.* Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (PCR) Outperforms Real-Time PCR in the Detection of Environmental DNA from an Invasive Fish Species[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(9): 5601-8.
- [17] 刘志国,王妙,塔娜,等. Nested-PCR 在人间布鲁氏菌病早期快速诊断中的探讨[J]. 中国人兽共患病学报, 2021,37(2):188-192.
- [18] 羊晓萌.布鲁氏菌病及其防控措施[J].福建畜牧兽医,2014,33(3):22-23.
- [19] 徐彬,祁大芊,田发益,等.一例犬乳头瘤病毒的诊断与治疗[J].畜牧兽医杂志,2022,41(6):113-118.
- [20] 孙甲川.一例边境牧羊犬皮肤肥大细胞瘤的诊治[J].畜牧兽医杂志,2022,41(6):119-122,125.
- [21] 李成东,晁娟娟,李宏.汉阴县肉牛(羊)产业现状及发展建议[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):62-64.
- [22] 李莉娜.定西市草畜牧业发展现状与对策[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):74-77.
- [23] 赵崇学,杨彩虹,张啸,等.武威市 2016 年—2020 年活鸡调运现状分析[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):99-102.
- [24] 刘翠.贡觉县畜牧业高效健康发展措施及建议[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):103-106.
- [25] 李宏,晁娟娟,李秀眉.陕西省畜牧技术推广体系发展现状与思考[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):111-113,117.
- [26] 吴雪利,张飞,张津,等.关中地区奶山羊产业高质量发展思路探析[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):114-117.
- [27] 郑爱华,林萌萌,张琰丽.天水市奶牛业发展现状及对策[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):120-122.
- [28] 杨树晶,唐祯勇,鲁岩.四川省牦牛产业发展思考[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):133-134,138.
- [29] 曾存芳,王敏.秦岭山区生态环境保护下生态畜牧业发展的意见和建议[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):135-138.
- [30] 贾文玉,盛学吉,贾晓峰,等.高台县罗城镇农村家庭后院养殖模式探索及推广应用[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):149-150.
- [31] 王自科,李积友,马冬伍.基于甘南牦牛产业提质增效关键环节之探析[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):160-163.
- [32] 曹丽娟,杨伟刚.武威市肉牛产业现状和发展思路[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):164-165.
- [33] 张勃,王俊贤.定西市蛋肉鸡产业调研及发展建议[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):166-169,173.
- [34] 靳新,杨彩虹,李兴荣,等.武威市 2016 年—2020 年活羊调运情况分析[J].畜牧兽医杂志,2022,41(5):189-190,192.