



EGGS
PROGRAM

第8期/2013年4月

家禽业中血清学检测服务

Vincent TURBLIN 博士, 法国诗华动物保健公司亚太区家禽事业部市场经理

在禽病诊断中, 我们经常面临的挑战是对当前死亡或发病的鸡群如何做出明确的、快速的诊断。如果我们能通过更具预防性或流行病学的方法来应对这些疾病, 那么诊断的速度以及结果准确性会有个基本保障。至少有4种主要信息可以用来帮助我们分析可能存在的家禽传染病。

- 生产数据的记录与分析(死亡率、增重情况和产蛋情况);
- 有关疾病发生的记录与分析(临床症状、大体病变);
- 血清学检测结果;
- 病原的分离与鉴定。

如果想将我们在疫病检测方面的投入效益最大化, 那么清楚地理解检测结果意味着什么是非常重要的。换句话说, 对所用检测方法理论基础的理解和检测频率的要求都至关重要。还有, 我们还必须明白一点, 任何血清学阳性反应虽然可以确定鸡只曾经被某些微生物感染过, 但仍不能肯定这个病原就是本次疾病的致病原因。出于诊断的需要, 在鸡群正常生长期间或疫病爆发时, 应该定期采用适当的微生物学检测方法进行系统监测。普遍存在一个错误的认识, 以为采用的检测方法越昂贵, 对于诊断来说就越有帮助, 但实际上可能恰恰相反, 因为一旦意识到检测的成本高, 人们往往会人为地减少检测的样本数量, 使得检测的意义下降。另外, 没有一个检测方法是完美的, 任何的检测系统都有其不足之处。

1 样品的采集

1.1 采样的统计学基础

我们可使用少量样品的检测结果来推断整个鸡群的情况, 对于某个特定检测目的, 统计学原理会要求检测样品的最低数量。再者, 采集样本的数目有时也会考虑到经济性和可操作性方面的因素。

首先, 采样通常应分多个层次。例如, 如果我们想要评估整个养鸡场的情况, 那么每个鸡舍都应进行采样, 而不应仅仅对第一个鸡舍的第一栏进行采样。另一方面, 如果我们正在调查某个特定的问题, 偏向性采样有时也是必要的, 甚至是必须的, 例如, 我们调查种鸡发生瘫痪的病因, 那么我们不应把检测重点放在毫无症状的鸡只上。

采样数量应根据鸡群中鸡只数量的不同而随之变动。在实际生产中, 对大多数检测来说, 通常每个鸡舍可抽取12~24份样品。如检测某些完全不允许存在的病原(支原体、肠炎沙门氏菌)时, 建议每个鸡舍采样60份。

需要注意的是, 虽然有时可以将样品合并后进行检测, 但这样做会降低检测的敏感性。

1.2 样品采集和盛装的容器

我们采样的基本要求是获得无菌、无溶血, 且足够保证重复进行1次检测(如果有必要)的血清。

玻璃或塑料瓶是盛装血样的传统容器(玻璃瓶5mL, 塑料瓶1.5mL)。采血后血样应立即密封, 如果可能, 应近似水平放置以促进形成长条形凝血块而有利于血清的析出。



EGGS PROGRAM

血样应保存在室温下至血液凝结，然后冷藏并迅速送至实验室，或在送达实验室之前，可将血清分离至干净的小瓶。每一个生产单元应确保有人得到这方面的培训，一旦需要时随时可以正确完成采样工作。

1.3 卵黄样品的制备

鸡只会传递大量的抗体到卵黄，因此卵黄提取物可代替血清样品用于血清学检测，其优点和不足详见表1。许多学者对NDV、IBV和IBDV，以及腺病毒、呼肠孤病毒和沙门氏菌（肠炎和鼠伤寒）的血清抗体和卵黄抗体之间的关系进行了研究，研究表明，卵黄抗体滴度与血清抗体滴度呈高度相关性（相关系数为0.84~0.97）。然而，由于卵黄是在7天内形成的一层层同心环，因此在对卵黄取样前应彻底混匀。

有两种最常见的卵黄样品制备方法。

- 🔗 一是简单地加入磷酸缓冲液（PBS），然后将该混合物代替血清用于检测；
- 🔗 二是向第一种方法制得的混合物中加入氯仿（通常为30%~50%），以去除其中的脂类，但成本非常高，因此较少用到。

表1 卵黄样品代替血清样品优点和不足

优点	不足
1 易于采样	1 根据已公布方法萃取样品比较麻烦
2 样品已经过“包装”	2 不能用于快速平板凝集试验
3 易于存储	3 样品通常无法确定来自哪只鸡
4 避免抓鸡及其造成的应激	4 检测结果并非总是与血清检测结果相等

1.4 血清样品的移交

我们应考虑如何和何时将样品移交至实验室。只要可能，应在能够在24小时内将样品送至实验室的那天进行采样（避免周末）。样品应安全地按类别包好，并注明采样地点（包括哪个鸡舍、哪个鸡栏和鸡只性别等）。应能从试管或包装上正确识别分类。此外，还要标明鸡群的健康状况和免疫程序，以及需要注明的关于样品的其它信息，为此，最好使用实验室提供的送检单（大多数实验室都会为血清样品提供专用的送检单）。

1.5 血清样品的保存

血清样品的存储应考虑易于取放。如果存储时间超过24小时，样品应保存在-20℃条件下。盛装血清小玻璃瓶的大小必须适当，这样既方便，又能减少与空气的接触（以避免血清中水分被冷冻干燥）。

应根据实际情况来调整保存期：

- 🔗 肉鸡的血清样品可保存一个月，以防需要进行重复检测，或需要检测其它疾病；
- 🔗 蛋鸡或种鸡的血清样品保存1年较为合理，以便为例行检测保留样品；
- 🔗 用于流行病学研究的样品需要保存1年以上，血清样品的长期保存确实可提供许多关于疾病流行的有用信息。





EGGS PROGRAM

血清库对于追溯分析实际生产中遇到的问题是非常有用的，尤其是对于蛋鸡来说，因为疫苗接种导致的抗体滴度已经很高了，在某些关键时段通过监测抗体滴度和变异系数可以分析血清学方面发生的变化。

此外，还要根据鸡只品种、来源和日期，对样品进行编号，这可通过手工记录来建立索引，但利用电脑可更方便地保存和查询。

2 血清学检测

实验室可利用血清样品进行的血清学检测主要有以下几种：

- 🔬 血凝试验（HA）
- 🔬 琼脂扩散试验（AGP）
- 🔬 血凝抑制试验（HI）
- 🔬 酶联免疫吸附试验（ELISA）
- 🔬 免疫斑点试验
- 🔬 血清中和试验



2.1 实验室质量控制

同一实验室每次检测所得的结果应始终如一，且不同实验室由同一样品得出的结果也应具有可比性。为做到这一点，必须了解每个检测方法可能导致误差的因素，此外还必须牢记，所有检测都存在非检测性误差，这些因素包括如何进行采样、操作技术、样品保存运输情况、对结果的判定情况，以及报表中出现错误等。

在验证某一项检测时，需要考虑到下列方面：

- 🔬 特异性：特异性高的检测方法出现假阳性的几率低，可以排除一些抗原性接近的病原；
- 🔬 敏感性（能够检测低水平特异性抗体的能力）：不能兼顾的是，往往检测方法敏感性越高，其特异性就越低。在家禽生产中，应首先使用高度敏感的技术作为筛选试验，再用高特异性的检测来对阳性鸡群进行重复抽样检测；
- 🔬 准确性：在定量检测抗体时的准确性；
- 🔬 精确性：是指检测同一样品能始终如一地复制相同结果的能力，用变异系数（%CV）表示。

大量检测所需的验证工作，均已由生产检测试剂盒的生产商完成。建立血清学质量保证（QA）系统的第一步就是要求生产商提供关于板内和板间变异系数的数据，从而使实验室能够利用阳性对照或阴性对照加以校正。一旦一项检测经过验证，那么应利用QA系统来监测之后的检测。

QA系统应包括某个检测方法结果可接受性的标准界定，以及鉴别误差的来源和修正过程的方法：

- 🔬 QA系统的重要一点是重复批间精确性检测；
- 🔬 或是简单地每月计算每个标准对照血清所有检测结果的变异系数，并按时间变化绘出结果曲线图。常规检测的变异系数合理范围为10%~15%。

内部质量评估的首要目的是保证检测结果随着时间变化保持始终如一。为确保结果的一致性，应设立实验室间的质量保证方案。某些认证计划可以更进一步，通过独立检查程序和执行标准，经常是进行定期检查，例如对大多数家禽产品出口国的鸡毒支原体（MG）、鸡滑液囊支原体（MS）和火鸡支原体（MM）的认证计划。

在验证和质量保证的每一环节，都需要对检测人员进行培训和激励，这是非常重要的。同等重要的是，对那些判读结果的人员来说，要能理解这些检测方法的固有误差，和能够通过与其它检测方法进行比较来得出结论的水平。因为判读的背后可能就是决定，决定的基础和依据是对各方信息的综合考虑。



EGGS PROGRAM

2.2 检测结果的判读

当结合其它信息时，血清学检测功能最为强大且准确，其它信息主要包括以下几个方面：

- 生产性能数据：死亡和淘汰率、产蛋率、蛋品质、孵化率、生长速度、均匀度，以及饲料转化率等；
- 屠宰时得到的废弃率数据；
- 发病鸡群的临床观察；
- 解剖结果，再辅以适当的微生物检测结果；
- 清洁和消毒后鸡舍的例行拭子检测结果；
- 检查饲料原料、成品料、淘汰鸡只等。

在诊断、计划和执行防控策略时，关键是要各方面人员的通力合作。有效利用血清学检测的关键在于采样的安排，选择检测方法时，必须要符合具体问题或目的需要，采样信息和鸡群的历史信息对血清学检测结果判读都会产生相当大的影响。

两种常用的采集血清样品的策略：

- 定期的例行采样，以检测感染或免疫后的血清学变化；
- 采集双份血样，比如间隔12~21天的采样，以调查某个特定疫病的可能性。

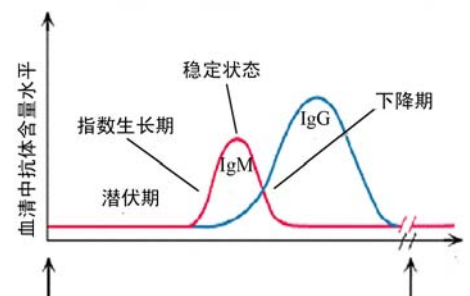


图1 感染或接种后的体液免疫反应变化示意图

2.3 血清学检测的局限性

血清学检测主要是定性或定量检测针对感染源的抗体，然而，大多数血清学检测方法都有一些局限性：

- 鸡只在感染至少4天内呈抗体阴性，实际时间长短还会因为使用的检测方法不同而变化，如果存在潜伏期，这段时间可能会更长（图1）；
- 大多数检测方法只能评估循环抗体，而不涉及粘膜抗体或细胞介导的免疫；
- 不进行再次采样就无法判断抗体水平是处在升高、稳定或在下降通道；
- 在大多数检测方法中，野毒株和疫苗株诱导的抗体无差异，除非使用可区分感染与疫苗的检测方法（DIVA）；
- 由于交叉反应，通常抗体会与病原性相近的致病因子发生反应而使结果混淆；
- 还有假阳性和假阴性的问题，实际上它们是某些检测方法与生俱来的。

然而，通过细心和重复地使用包括验证和校正等简单的技术，能够克服上述大多数的局限性。但是，如果实验室选择的检测方法有误，那么我们不能指望血清学检测会为我们提供正确的答案。



EGGS PROGRAM

2.4 问题的出理

例行检测过程中，当发现免疫鸡群出现不正常的抗体滴度时，以及考虑如何处置这些鸡群时应牢记，鸡只的免疫应答会受到以下3个因素的影响：

- ❶ 疫苗使用的相关因素，如免疫人员的技术、一次性免疫的疫苗数量、免疫途径和干扰因素，如水质差等；
- ❷ 与疫苗相关的因素：如抗原浓度，疫苗株毒力，佐剂的性状和质量；
- ❸ 与鸡只的体质和免疫状态相关的因素：如IBDV、MDV、CIAV、腺病毒、毒素、应激和其它疫病导致的免疫抑制。

3 结论

家禽血清学监测包括一系列经典检测方法，如琼脂扩散试验（AGP）、平板凝集试验、病毒中和试验（VN）、血凝抑制试验（HI）和酶联免疫吸附试验（ELISA）等。虽然大多数这些检测方法都很简单易行，但质量控制却至关重要。

尽管血清学方法当用于疫病诊断和流行病学调查时是一个非常好的工具，但是，我们必须牢记血清学检测只能是整个诊断过程中的一部分，血清学检测结果必须结合其它信息加以综合考虑，病原分离在诊断过程中仍具有决定性意义，尤其是要对分离物进行毒力和致病性的研究时更为重要。还有，PCR、基因测序等分子生物学方法用于病原的鉴定和分类正变得日益广泛。

参考文献（略）