

奶水牛新型可视孕检技术的应用

陈明棠¹, 李辉¹, 黄健¹, 谭正准¹, 赵朝步¹, 钟华配¹, 曾咏芳^{2*} (1. 中国农业科学院广西水牛研究所, 农业农村部(广西)水牛遗传繁育重点实验室, 广西南宁 530001; 2. 南宁市阮升贸易有限公司, 广西南宁 530021)

摘要 为了缩短奶水牛的产犊间隔, 提高繁殖效率和养殖效益, 利用酶联免疫反应原理采用一种快速可视孕检试剂盒对配种后 28 d 以上的试验母牛进行检测。对 429 例已配种母牛进行检测, 其中阴性(空怀)265 例, 阳性(怀孕)164 例, 验证检查阴性 265 例, 阳性 160 例, 试剂盒检测的阴性准确率为 100%, 阳性准确率为 97.56%, 可见该试剂盒可用于水牛的早期孕检。

关键词 奶水牛; 早期孕检; 酶联免疫反应试剂盒; 产犊间隔

中图分类号 S823.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)17-0098-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.028

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Application of New Visual Pregnancy Test Technology in Dairy Buffalo

CHEN Ming-tang, LI Hui, HUANG Jian et al (Guangxi Buffalo Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Key Laboratory of Buffalo Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract In order to shorten the calving interval of dairy buffalo and improve the efficiency of breeding and raising efficiency, we used enzyme-linked immune reaction principle, adopted a quick and visual pregnancy test kit to make early pregnancy test on experimental cows more than 28 days after mating. 429 cases of mated cows were detected, the results showed that 265 cows were negative (empty), 164 cows were positive (pregnant), and 265 cows were negative by validation check and 160 cows were positive by validation check. The negative accuracy was 100% and the positive accuracy was 97.56% by ELISA kit. Therefore, this kit was suitable for early pregnancy test of buffalo.

Key words Dairy buffalo; Early pregnancy test; ELISA kit; Calving interval

及早对配种母牛进行准确的怀孕检查, 可以查找出尚未怀孕的牛, 方便观察和重配空怀奶牛, 以缩短产犊间隔, 减少无效饲养, 从而提高养殖效益。国内外开展的早期妊娠诊断研究很多, 主要包括外部观察法、直肠检查法、超声波扫描和实验室检查(阴道黏液、尿液、乳汁、血液)等, 其中直肠触诊和 B 超诊断在生产上应用较多, 而实验室检查方法比较繁琐, 准确性也偏低, 在生产上应用较少。在实验室检测方面, Butler 等^[1]从牛胎盘提取物中首次发现妊娠特异性蛋白质 B (pregnancy specific protein B, PSP-B); Zoli 等^[2]采用相同方法从牛胎盘组织中完全分离出妊娠相关糖蛋白(pregnancy-associated glycoprotein, PAG), 后来证实 PAG 即为 PSP-B。此后, 人们对 PAG 的分子结构和作用机制进行了深入研究, 发现 PAG 主要来源于胎盘, 是胎盘功能的标志, 并在妊娠过程中起着免疫保护作用, 它可以进入母体的外周血液循环, 为早期妊娠诊断开辟新的途径并进行商业开发。“IDEXX”(爱德士)牛快速可视孕检试剂盒通过检测外周血液中 PAG, 配种后 28 d 就可以判断牛是否怀孕。笔者利用酶联免疫反应原理采用一种快速可视孕检试剂盒对配种后 28 d 以上的试验母牛进行了检测。

1 材料与方法

1.1 试验地点 试验在广西 6 个奶水场和 1 个奶水牛养殖大县进行。

1.2 试验对象与试剂 试验对象为产后 60 d 以上且配种

28 d 以上的奶水牛, 检测的水牛品种包括摩拉水牛、尼里/拉菲水牛、地中海水牛 3 种河流型水牛以及 3 个品种与我国沼泽型水牛杂交的后代。

检测物为全血或血清, 试剂为中美合作北京爱德士元享生物科技有限公司提供的“IDEXX”牛快速可视孕检试剂盒。检测前所有的试剂盒组分从冷藏状态下复温至 18~26 ℃。将试剂轻轻旋转, 使其混合均匀, 检测不同样品时需要更换吸头。

试验牛颈部或尾根静脉采血 3~5 mL, 使用血清时 3 500 r/min 离心 4 min 后, 分离血清。

1.3 检测方法 ①用移液器分别吸取 100 μL 的阴性对照和阳性对照加入到标记好的反应孔中。②逐头吸取等量被检样品加入到不同的反应孔中。③在每个反应孔中加入 3 滴试剂 1(检测溶液)。④盖上盖板, 轻弹微量反应板 10 次加以混匀, 18~26 ℃ 下孵育 7 min。⑤孵育完成后, 移除板盖, 快速翻转反应板, 将板孔内液体放入废液缸(或水槽)并用力甩板, 使板孔内液体流出。⑥将每个反应孔加满双蒸水或去离子水, 进行彻底洗板, 确保每个反应孔能被彻底清洗, 并保证洗液充满每一个反应孔。每次洗板后快速翻转反应板, 弃去洗液, 重复 2 次。在最后一次甩板后, 将反应板用力在吸水纸上拍干, 确保每一个反应孔中没有残留的洗液并清除气泡。⑦在每个反应孔中加入 3 滴试剂 2(酶标抗体), 盖上盖板, 轻弹微量反应板 10 次使其混匀, 在 18~26 ℃ 下孵育 7 min。⑧重复步骤⑤和⑥。⑨在每个反应孔加入 3 滴试剂 3(TMB 底物溶液), 盖上盖板, 轻弹微量反应板 10 次使其混匀, 在 18~26 ℃ 下孵育 7 min。⑩在每个反应孔中加入 3 滴试剂 4(终止液), 轻弹微量反应板 10 次使其混匀。⑪将反应板放在一张白纸上, 肉眼进行读板。

1.4 结果判定 ①空怀。样品反应孔中呈现的颜色比阴性

基金项目 广西水产畜牧业科技项目[桂渔牧科(201633012)]; 南宁市科学研究与技术开发计划项目(南科重 20172134-1); 广西科技计划项目(桂科 AB16380040)。

作者简介 陈明棠(1972—), 男, 广西防城港人, 高级畜牧师, 从事动物繁殖研究。*通信作者, 助理兽医师, 硕士, 从事兽医方面的研究。

收稿日期 2019-03-22

对照孔浅或相同,则判定该动物为空怀。②怀孕。样品反应孔中呈现蓝色且比阴性对照孔深,则判定该动物怀孕。③可疑。如果样品孔颜色很难用肉眼分辨,则被认为可疑,需重新采样复检。如果阳性对照孔没有变蓝,则该试验结果无效,需要重做。

1.5 验证复检 配种后 45~60 d 通过直肠触检或 B 超检查验证试剂盒的检测结果。

表 1 不同品种水牛的孕检结果

Table 1 The pregnancy test results of different breeds of buffalo

| 结果 Result | 摩拉水牛 Murrah buffalo//头 | | 尼里/拉菲水牛 Nili-Ravi buffalo//头 | | 地中海水牛 Mediterranean buffalo//头 | | 杂交后代 Hybrid offspring//头 | | 合计 Total//头 | | 准确率 Accuracy % |
|--------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------|
| | 试剂盒检测 Kit detection | 验证试验 Verification test | 试剂盒检测 Kit detection | 验证试验 Verification test | 试剂盒检测 Kit detection | 验证试验 Verification test | 试剂盒检测 Kit detection | 验证试验 Verification test | 试剂盒检测 Kit detection | 验证试验 Verification test | |
| | 阴性 Negative | 45 | 45 | 32 | 32 | 43 | 43 | 145 | 145 | 265 | |
| 阳性 Positive | 28 | 27 | 19 | 19 | 24 | 23 | 93 | 91 | 164 | 160 | 97.56 |

3 讨论

(1) IDEXX 牛快速可视孕检试剂盒用于不同品种奶水牛的孕检,阴性准确率为 100%,阳性准确率为 97.56%,说明该产品适用于水牛的早期孕检,不同品种间差异不显著($P > 0.05$)。

(2) Ledezma-Torres 等^[6]报道,可将配种后第 21 天绵羊血浆中 PAG 浓度是否高于 1 ng/mL 作为判定是否妊娠的依据,第 21 天判定怀孕准确率为 100%,判定未孕准确率为 98.7%。吕莲^[7]运用半定量 PCR 技术和 mRNA 差异显示技术研究了以奶牛血液中 PAG 基因的表达量为依据的早期妊娠诊断方法以及空怀牛和妊娠牛血液相关基因表达的差异,结果显示空怀牛和怀孕 21 d 的妊娠牛血液中 PAG 基因均有表达,后者 PAG 基因表达量略高于前者,但二者差异不显著,说明配种后 21 d 奶牛血液中 PAG 基因的表达量不能被作为妊娠早期诊断的依据。IDEXX 牛快速可视孕检检测试剂盒是根据酶联免疫反应原理设计的,推荐检测对象为产后 60 d 且配种 28 d 以上的母牛,以避免出现假阳性。奶牛妊娠 30 d 内的胚胎死亡率可达 38%^[8],胚胎早期死亡数约为配种数的 8.89%^[9],PAG 的半衰期约为 9 d^[10],在胚胎死亡早期 PAG 会在母牛体内循环,因此使用 IDEXX 牛快速可视孕检检测试剂盒检测出现一定比例的假阳性属于正常现象,处理方法是在一段时间后重新采样进行怀孕复检,也可采用其他怀孕检测方法确认。

(3) 该产品在技术层面上是可行的,检测结果也是可靠的,但每头约 40 元的检测成本略贵,而且批次头数越少,检测成本越高(每批次需耗费 4 个对照反应孔)。与 B 超检查法相比,技术熟练的检测人员使用 B 超检测法也可在母牛配种后第二情期来临之前(配种后 35~40 d)对配孕情况进行确诊,2 种检测方法均不影响对第二情期的观察和配种,但 B 超的检测成本更低。与直肠检查法相比,如果技术人员熟练

2 结果与分析

试验检测总头数为 429 头,其中孕检试剂盒检测阴性 265 头,阳性 164 头;以直肠触检或 B 超检查进行验证检测阴性 265 头,阳性 160 头。以验证检测准确率为 100%来计算孕检试剂盒检测的准确率,则孕检试剂盒检测阴性准确率为 100%,阳性准确率为 97.56%(表 1),与连晓春等^[3]、张红英^[4]、温富勇等^[5]使用该试剂盒检测奶牛的结果基本一致。

掌握直肠检查法,则检查成本几乎可以忽略不计,但其缺点是从配种到确定怀孕的时间稍长,比前 2 种方法要多损失 1 个情期(21 d),不利于成本控制和效益提升。对于规模化牛场而言,如果采用直肠检查法进行孕检,存在每头母牛 21 d 的无效饲养和繁殖率降低的风险,因此 IDEXX 牛快速可视孕检试剂盒具有较大的推广应用前景。目前市售商品对原产品进行了优化,孵育时间从原来的 30 min 缩短到 7 min,洗涤液也可用饮用纯净水代替,省去了配液环节,操作更为简便,有利于产品在基层的推广应用。

4 结论

IDEXX 牛快速可视孕检试剂盒在奶水牛的早期孕检中,阴性准确率为 100%,阳性准确率为 97.56%。该方法准确率高,怀孕确诊时间早,操作较为简便,可在生产上推广应用。

参考文献

- [1] BUTLER J E, HAMILTON W C, SASSER R G, et al. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins [J]. *Biol Reprod*, 1982, 26(5): 925-933.
- [2] ZOLI A P, BECKERS J F, WOUTERS-BALLMAN P, et al. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein [J]. *Biol Reprod*, 1991, 45(1): 1-10.
- [3] 连晓春, 王学进, 杨峻. 奶牛 28 天可视孕检试验应用报告 [J]. *今日畜牧兽医*, 2014(8): 58-60.
- [4] 张红英, 爱德华. 28 天牛可视孕检试剂盒临床应用观察 [J]. *广西畜牧兽医*, 2015, 31(6): 310-312.
- [5] 温富勇, 桂芳, 赵海明, 等. 奶牛早期孕检技术对缩短胎间距提高受胎率的影响 [J]. *当代畜牧*, 2015(21): 23-24.
- [6] LEDEZMA-TORRES R A, BECKERS J F, HOLTZ W. Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG₅₅₊₅₉) RIA and its potential for diagnosing pregnancy [J]. *Theriogenology*, 2006, 66: 906-912.
- [7] 吕莲. 奶牛妊娠早期血液中 PAG 及相关基因表达的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2009: 20.
- [8] 杜立银, 孙树民, 姜鹏, 等. 影响奶牛早期胚胎死亡的病因探析 [J]. *动物保健*, 2004(1): 7-9.
- [9] 陈会新, 石放雄, 吴兰生, 等. 奶牛脱脂乳孕酮水平与繁殖状态的监控 [J]. *浙江农业大学学报*, 1989, 15(2): 188-192.
- [10] ROBERTS R M, XIE S, MATHIALAGAN N. Materanl recognition of pregnancy [J]. *Biol Reprod*, 1996, 54: 294-302.