

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.02

# 一种猪瘟疫化弱毒活疫苗效力检验方法的研究

郑朝朝<sup>1,2</sup>, 刘云涛<sup>1,2</sup>, 李 倬<sup>3</sup>, 邹立宏<sup>1,2</sup>, 郁宏伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000;

2. 河北省兽医生物技术工程技术研究中心, 河北保定 071000; 3. 吉林省进出口检验检疫局, 长春 130062)

[收稿日期] 2019-07-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 12-0007-05 [中图分类号] S852.65

**[摘 要]** 为克服兔体定型热反应法(RID)检验猪瘟疫活疫苗效力的过程中存在的缺陷,建立了一种快速、准确、稳定检测猪瘟疫病毒含量及疫苗效力的间接免疫荧光法(IFA)。该方法以出现特异性荧光作为检测标准,通过添加促细胞感染剂聚乙二醇 10000(PB)增加特异性荧光数量,可以在 4 d 内检测出猪瘟疫活疫苗成品或半成品效力。该方法检验周期短、结果准确、重复性好,为猪瘟疫活疫苗效力检验方法的完善提供了数据支持。

**[关键词]** 间接免疫荧光;猪瘟疫活疫苗;效力检验

## Study on a Method for Detecting the Titer of Live Attenuated Swine Fever Vaccine

ZHENG Zhao-zhao<sup>1,2</sup>, LIU Yun-tao<sup>1,2</sup>, LI Zhuo<sup>3</sup>, ZOU Li-hong<sup>1,2</sup>, YU Hong-wei<sup>1,2\*</sup>

(1. Ringpu (Baoding) Biological Pharmaceutical Co. Ltd., Baoding, Hebei 071000, China;

2. Hebei Engineering and Technology Research Center of Veterinary Biological Products, Baoding, Hebei 071000, China;

3. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Corresponding author: YU Hong-wei, E-mail: yuhongwei2005@126.com

**Abstract:** In order to overcome the defects of the existing methods for testing the effectiveness of classical swine fever vaccine, a rapid and stable method for detecting the titer of classical swine fever vaccine was established. In this method, specific fluorescence was used as the standard of detection, and the specific fluorescent quantity was increased by adding PB, and titer of swine fever live vaccine could be tested in 4 days. The method established in this study can meet the needs of batch detection, and provide a reference for the further improvement of the detection method.

**Key words:** IFA; classical swine fever vaccine; titer test

---

基金项目: 河北省科技计划项目(16226609D)

作者简介: 郑朝朝, 硕士, 高级兽医师, 从事动物用生物制品研究与开发。

通讯作者: 郁宏伟。E-mail: yuhongwei2005@126.com

猪瘟病毒和猪瘟疫苗效力检验主要依靠兔体定型热反应方法(RID)<sup>[1]</sup>, 试验成本较高、操作繁琐、试验周期较长, 且受实验动物个体差异和环境因素等多方面影响, 检测结果不够准确, 造成疫苗成品质量不稳定<sup>[2-3]</sup>, 甚至免疫失败。

相关文献中有很多关于免疫荧光检测方法(FA)<sup>[4]</sup>、酶联免疫吸附法(ELISA)<sup>[5-6]</sup>、聚合酶链式反应法(PCR)<sup>[7]</sup>和实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)<sup>[8-9]</sup>等检测猪瘟活疫苗效力的报道<sup>[10]</sup>, 但都有各自的缺陷, 如不能有效区分活病毒与失活病毒、重复性差、操作复杂等, 最终未能全面推广。本研究建立了一种快速、准确、稳定检测猪瘟病毒含量及疫苗效力的间接免疫荧光法(IFA), 以便能更加准确评价猪瘟活疫苗效力和猪瘟半成品病毒含量, 满足规模化生产的需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 猪瘟抗体阳性血清(一抗), 购自中国兽医药品监察所, 批号 2009002; FITC 标记的兔抗猪荧光抗体(二抗), 购自 SIGMA 公司, 批号 2015002; 甲醇、丙酮、PB、氯化钾、氯化钠等试剂, 均为分析纯, 购自北京益利化学试剂公司。

1.1.2 细胞 猪睾丸细胞(ST), 由瑞普(保定)生物药业有限公司种毒室提供。

1.1.3 样品 瑞普(保定)生物药业有限公司 2013-2014 年生产的猪瘟活疫苗成品 20 批、半成品 90 批。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞复苏、培养 常规方法复苏 ST 细胞, 培养至细胞长成良好单层后用 0.25% 胰酶消化分散, 并用细胞生长液重悬, 接种于 96 孔细胞培养板, 置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h, 备用。

#### 1.2.2 效价检测

1.2.2.1 兔体定型热反应检测 按照国标中猪瘟活疫苗效力检验方法对被检疫苗进行稀释, 用 RID 法检测被检样品的效力。

1.2.2.2 荧光检测 倍比稀释各被检样品, 制备成不同稀释度的病毒液备用。弃去 96 孔板内细胞生长液, 用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗一遍后将 0.1 mL

病毒液与 PB 液(1:1)混匀加入 96 孔培养板, 每个稀释度设 6 个复孔。同时设置不加 PB 液的对照孔及阴性、阳性对照孔。接毒后细胞培养板置于 37 ℃ 孵育 2.5 h, 孵育结束后弃去病毒液, 用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗一遍, 补充维持液继续培养 3 d, 采用 IFA 法检测样品的 TCID<sub>50</sub>。

1.2.3 重复性试验 随机抽取猪瘟活疫苗成品、半成品样品各 5 批次, 应用本研究建立的检测方法和 RID 法进行效力检测, 均重复两次, 统计检测结果。

## 2 结果与分析

2.1 与常规荧光检测方法对比 本研究中 IFA 法检测猪瘟病毒效力时加入了 PB, 明显提高了猪瘟病毒对细胞的感染率: 本法中样品稀释 16000 倍接种 96 孔细胞培养板, 培养 3 d 后, 特异性荧光孔数多, 单孔荧光广泛(图 1), 较常规免疫荧光法(图 2)明显提高。PB 单独处理空白细胞不会产生特异性荧光(图 3)。

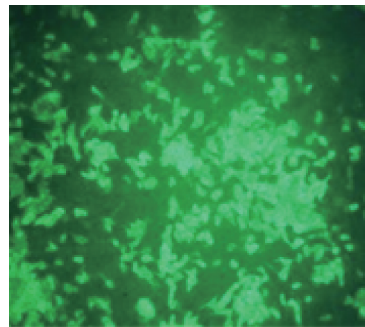


图 1 本研究 IFA 检测结果

Fig 1 Results of IFA detection by this method

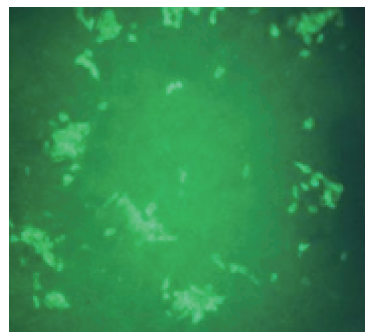


图 2 常规 FA 检测结果

Fig 2 Conventional FA detection results

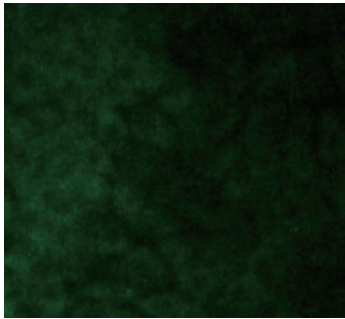


图3 PB处理空白细胞 IFA 结果

Fig 3 IFA results of blank cells treated with PB

2.2 与兔体定型热反应检测法的相关性 通过对 20 个猪瘟活疫苗成品、90 个猪瘟活疫苗半成品的效力检测结果进行统计得出了 IFA 法与 RID 法对应关系图(图 4 和图 5)。

图 4 显示,兔体检测 7500 RID/mL 的样品,荧光检测 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>8.8</sup> 以上;兔体检测 1.5 × 10<sup>4</sup> RID/mL 的样品 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>8.8</sup>至 2<sup>9.8</sup>之间;兔体检测 3.0 × 10<sup>4</sup> RID/mL 的样品 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>9.7</sup> 以上。

图 5 表明,兔体检测 1.0 × 10<sup>5</sup> ~ 3.0 × 10<sup>5</sup> RID/mL 的半成品样品,TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>12.11</sup> 以上, 3.0 × 10<sup>5</sup> ~ 5.0 × 10<sup>5</sup> RID/mL 样品 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>13.03</sup>至 2<sup>13.96</sup>;兔体检测 5.0 × 10<sup>5</sup> ~ 8.0 × 10<sup>5</sup> RID/mL 样品,荧光检测 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>13.34</sup>至 2<sup>14.46</sup>;兔体检测 8.0 × 10<sup>5</sup> RID/mL 以上合格

样品,荧光检测 TCID<sub>50</sub>/0.1mL 集中在 2<sup>14.4</sup> 以上。

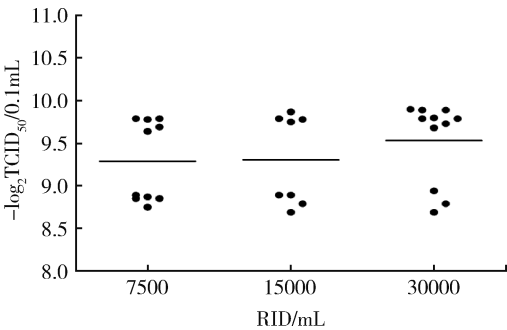


图4 成品检测结果

Fig 4 Results of product

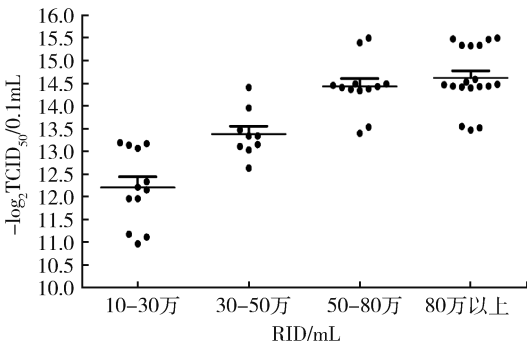


图5 半成品检测结果

Fig 5 Results of Semi-finished product

2.3 重复性试验结果 应用本研究 IFA 法和 RID 法分别对猪瘟活疫苗成品、半成品进行效力检测,统计两次检测结果见表 1 和表 2。

表 1 两种方法检测成品结果比较

Tab 1 Results of product by two detection methods

| 样品批次   | IFA 方法<br>(TCID <sub>50</sub> /0.1mL) |                   | RID 方法(RID/mL) |    |                       |    |                       |    |
|--------|---------------------------------------|-------------------|----------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|
|        |                                       |                   | 7500           |    | 1.5 × 10 <sup>4</sup> |    | 3.0 × 10 <sup>4</sup> |    |
|        | 一检                                    | 二检                | 一检             | 二检 | 一检                    | 二检 | 一检                    | 二检 |
| 131207 | 2 <sup>8.89</sup>                     | 2 <sup>8.89</sup> | √              | √  | ×                     | ×  | ×                     | ×  |
| 140502 | 2 <sup>9.75</sup>                     | 2 <sup>9.79</sup> | ×              | √  | √                     | √  | ×                     | ×  |
| 140703 | 2 <sup>8.89</sup>                     | 2 <sup>8.89</sup> | ×              | ×  | √                     | √  | √                     | √  |
| 141007 | 2 <sup>9.78</sup>                     | 2 <sup>9.73</sup> | √              | √  | √                     | ×  | √                     | √  |
| 141209 | 2 <sup>9.79</sup>                     | 2 <sup>9.79</sup> | √              | √  | √                     | √  | √                     | ×  |
| 复核率    | 100%                                  |                   | 80%            |    |                       |    |                       |    |

表 2 两种方法检测半成品结果比较

Tab 2 Results of Semi – finished product by two detection methods

| 样品批次   | IFA 方法<br>(TCID <sub>50</sub> /0.1 mL) |                    | RID 方法(RID/mL)        |    |                       |    |                       |    |
|--------|----------------------------------------|--------------------|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|
|        |                                        |                    | 3.0 × 10 <sup>5</sup> |    | 5.0 × 10 <sup>5</sup> |    | 8.0 × 10 <sup>5</sup> |    |
|        | 一检                                     | 二检                 | 一检                    | 二检 | 一检                    | 二检 | 一检                    | 二检 |
| 131101 | 2 <sup>13.11</sup>                     | 2 <sup>13.34</sup> | ✓                     | ✓  | ×                     | ×  | ×                     | ×  |
| 140304 | 2 <sup>14.5</sup>                      | 2 <sup>14.4</sup>  | ×                     | ×  | ✓                     | ✓  | ×                     | ×  |
| 140501 | 2 <sup>14.58</sup>                     | 2 <sup>14.49</sup> | ×                     | ×  | ✓                     | ×  | ×                     | ✓  |
| 140901 | 2 <sup>15.55</sup>                     | 2 <sup>15.44</sup> | ×                     | ×  | ✓                     | ×  | ✓                     | ✓  |
| 141102 | 2 <sup>15.32</sup>                     | 2 <sup>15.33</sup> | ✓                     | ✓  | ✓                     | ✓  | ✓                     | ×  |
| 复核率    | 100%                                   |                    | 73%                   |    |                       |    |                       |    |

如表 1 所示,用 IFA 和 RID 两种效力检测方法对 5 个批次的成品进行复核检验,IFA 法两次结果复核率为 100%,而 RID 法两次结果复核率为 80%。

如表 2 所示,用 IFA 和 RID 两种效力检测方法对 5 个批次的半成品进行复核检验,IFA 法两次结果复核率为 100%,而 RID 法两次结果复核率为 73%。

3 讨论与结论

通过上述实验结果可以看出,本研究中所建立的 IFA 法与 RID 法有良好的对应关系,能够准确、快速检测猪瘟疫苗成品、半成品效力。

本研究所建立的 IFA 法较常规免疫荧光法敏感性更高,通过在病毒液中增加促细胞感染剂 PB 定向增加猪瘟病毒与寄主细胞接触面积,从而提高了病毒对细胞的感染率,提高了疫苗检测的敏感性。解决了常规免疫荧光法因细胞感染率不高所导致的不稳定、重复性差的问题,同时避免了 RID 法中因兔体差异、环境因素、操作繁复所造成的误差。

本研究中 IFA 法的建立是以 RID 法为基础,而检测准确度、可重复性高于 RID 法。如 RID 法检测 140703 批成品疫苗时,出现了 7500 RID/mL 两次检测均不合格,而 1.5 × 10<sup>4</sup>、3.0 × 10<sup>4</sup> RID/mL 检测均合格的情况;检测半成品疫苗时,也多次出现了低倍数稀释半成品疫苗效力检验不合格,而高倍数稀释效力检验合格的情况。而 IFA 法检测结果更

为准确,两次检测结果复核率可达到 100%。

本研究将 IFA 法应用于检测猪瘟活疫苗成品、半成品效力,理论上来说其检测结果(TCID<sub>50</sub>)与疫苗效力应当有良好的直线对应关系,但实际成品检测结果各检测梯度间 TCID<sub>50</sub>相差不大,而半成品检测结果中相邻的检测梯度间也有较大的重叠区,这可能是 RID 法检测各样品时并未检测至终点(疫苗实际效力高于检测值),导致与之对应的 TCID<sub>50</sub>偏高。因此本研究仍需要更多数据建立 IFA 检测结果与疫苗实际效力的直线对应关系,进一步提高检测的准确性。

参考文献:

[1] 祖立闯,谢金文,沈志强,等. 猪瘟疫苗质量的替代检验方法研究进展[J]. 动物医学进展,2015,36(2): 76 – 79.  
Zu L C, Xie J W, Shen Z Q, *et al.* Quality of swine fever vaccine research progress of alternative methods[J]. Progress in Animal Medicine, 2015, 36(2): 76 – 79.

[2] 郑朝朝. 猪瘟活疫苗(传代细胞)质量及免疫效果的影响因素及分析[J]. 兽医导刊, 2015(11): 53 – 54.  
Zheng Z Z. Analysis of factors that affect the quality and immune effect of swine fever vaccine [J]. Veterinary Tribune, 2015 (11): 53 – 54.

[3] 朱庆虎,刘兰刚,康二勇,等. 猪瘟细胞苗生产几点想法[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, 8: 14 – 15.  
Zhu Q H, Liu L G, Kang E Y, *et al.* Some ideas of swine fever vaccine production [J]. Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology Information, 2010, 8: 14 – 15.

- [4] 郑朝朝, 柳珊, 邹立宏, 等. 激流灌注式生物反应器培养猪瘟疫疫苗工艺的研究[J]. 中国动物保健, 2016, 18(2): 62–64.
- Zheng Z Z, Liu S, Zou L H, *et al.* Riptide perfusion type bio-reactor culture research of swine fever vaccine technology [J]. Animal Health in Chinese, 2016, 18(2): 62–64.
- [5] 姚华伟. 猪瘟疫化弱毒疫苗效检替代方法及疫苗中牛病毒性腹泻病毒检测方法的研究[D]. 西南大学硕士学位论文, 2011.
- Yao W H. Study on the alternative method of swine fever vaccine effect and bovine viral diarrhea virus detection methods in vaccine [D]. Southwest University Master's Degree Thesis, 2011.
- [6] 刘艳. 猪瘟细胞苗生产工艺的优化及 ELISA 法在抗原定量测定中的应用[D]. 山东轻工业学院硕士学位论文, 2011.
- Liu Y. Swine fever cell seedling production process optimization and application in the quantitative determination of antigen ELISA method [D]. Master Degree Theses of Master of Shandong Institute of Light Industry, 2011.
- [7] 赵建军. 鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与评价[D]. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.
- Zhao J J. Identify the swine fever virus wild strains and rabbit weak poison vaccine strain of composite of real-time fluorescence quantitative RT-PCR method and evaluation established [D]. Master Degree Theses of Master of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [8] 徐兴然, 郭焕成, 史子学, 等. 通过基因组定量研究猪瘟病毒在细胞中的增殖特性[J]. 微生物学报, 2007(47): 800–804.
- Xu X R, Guo H C, Shi Z X, *et al.* Through the quantitative study of genome characteristics swine fever virus in cell proliferation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007(47): 800–804.
- [9] 王海光, 宁宜宝, 赖月辉, 等. 猪瘟活疫苗效力检验替代方法的研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(3): 1–6.
- Wang H G, Ning Y B, Lai Y H, *et al.* Development of an alternative potency test method for classical swine fever live vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(3): 1–6.
- [10] 梁武, 郑朝朝, 刘云涛, 等. 脾毒保存期对猪瘟病毒增殖的影响[J]. 养猪, 2015(5), 111–112.
- Liang W, Zheng Z Z, Liu Y T, *et al.* The influence of spleen-virus storage life to swine fever virus proliferation [J]. Swine Production, 2015(5): 111–112.

(编辑:李文平)