

不同免疫程序对猪瘟活疫苗免疫效果的研究

卫选智¹,张付华²,王新平³,欧阳红生¹,郭昌明^{1,3*}

(1. 吉林大学动物科学学院, 长春 130061; 2. 九江市畜牧兽医局, 江西九江 332000; 3. 吉林大学动物医学学院, 长春 130061)

[收稿日期] 2017-01-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0007-06 [中图分类号] S852.651

[摘要] 为了解规模化猪场猪瘟疫苗免疫情况和猪瘟病毒感染情况,采用商业化 ELISA 试剂盒,对大庆市某规模化猪场 530 份血清样品分别进行猪瘟抗体水平和猪瘟病毒抗原检测。试验结果表明:经过二次免疫的猪群,猪瘟抗体阳性率为 95.0% (115/121),比一次免疫的抗体阳性率 66.1% (74/112) 提高了 28.9%,而且抗体水平整齐度较一次免疫显著提高。在 530 份受检猪只中,利用 ELISA 试剂盒检测血清中的猪瘟抗原,阳性检出率为 0%,表明该猪场猪瘟病毒感染风险较低,对 18 份可疑样品用 RT-PCR 检测,没有检测出猪瘟病毒。研究表明,对当前的猪场仅仅实施一次免疫是不够的,只有实施二次免疫,才能获得较高的免疫抗体水平,有效地防控猪瘟疫病的发生。

[关键词] 猪瘟病毒;猪瘟病毒活疫苗;猪瘟抗原;猪瘟抗体;免疫程序

Research about Different Immunization Procedures on the Immune Effect of CSFV Live Vaccine

WEI Xuan-zhi¹, ZHANG Fu-hua², WANG Xin-ping³, OUYANG Hong-sheng¹, GUO Chang-ming^{1,3*}

(1. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130061, China;

2. Jiujiang Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Jiujiang, Jiangxi 332000, China;

3. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130061, China)

Abstract: To get better understanding of the immunization and infection status of CSFV, a total of 530 serum samples from a industrialized pig farm were collected, and ELISA method was used to detect carry out the CSFV antibody and antigen serology survey, respectively. The result showed that the positive rate of CSFV antibody after twice inoculation reached 95.0% (115/121), which was 28.9% higher than it after the first inoculation. And high uniformity was found in twice inoculation than in one inoculation. No positive serum for CSFV antigen were detected (0/530), indicating that the risk of CSFV remained low in this farm. Eighteen ambiguous samples were also analyzed, and no CSFV antigen was found by RT-PCR. The result indicated that one time of vaccination is not sufficient, and only the implementation of twice inoculation induced higher titre antibodies, which could effectively prevent and control the occurrence of swine plague.

Key words: CSFV; CSFV live vaccine; CSFV antigen; CSFV antibody; immune procedure

作者简介: 卫选智, 在读硕士, 从事猪病毒与宿主相互作用研究。

通讯作者: 郭昌明。E-mail: guochm1980@163.com

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种高度传染性疫病,以急性、热性以及高度接触性为特征^[1]。猪瘟曾在世界各国广泛流行,世界动物卫生组织将其列为必须通报 A 类传染病^[2-4]。在我国临床诊断中,猪瘟的发生率平均可占门诊总量的 30%,有时可高达 50%,是影响养猪业最严重的传染病之一。历史上,猪瘟给我国养猪业造成了巨大损失。1954 年后,我国采用猪瘟活疫苗对猪进行免疫接种,有效地控制了猪瘟的流行,但是目前仍有零星病例的发生^[5]。近些年出现的非典型温和型猪瘟与传统猪瘟相比,在病原学、流行病学及临床表现诸多方面均发生变化,对养猪业的发展和本病防控都带来了诸多困难^[5-6]。应用 ELISA 方法定期对疫苗免疫猪群猪瘟抗体进行检测来评估猪瘟活疫苗对猪群免疫效果^[7],可为生产实践提供科学证据,能有效地指导猪瘟的防控。

1 材料

1.1 疫苗 猪瘟活疫苗(细胞源),批准文号:兽药生字(2013)060131084,生产批号:201426,有效期二年,储存于 -20℃ 冰箱备用,由某生物股份有限公司提供。

1.2 试验猪 来自黑龙江省大庆市某规模化猪场。临床健康仔猪在产房哺乳至 25~35 日龄断奶,进行第一次接种免疫,于颈后部肌肉注射猪瘟活疫苗每只 2 头份/只。然后母猪转到种母舍饲养,仔猪转入保育舍,在育仔栏中饲养至 70 日龄,每个育仔栏饲养仔猪约 30~40 头,在 60~70 日龄时进行第二次免疫,免疫间隔期为 35 d,于颈后部肌肉注射猪瘟活疫苗 2 头份/只,然后转入育肥舍。从 71 日龄入舍分别在育肥舍饲养至 180 日龄出栏。初进猪圈的猪可划分 15~20 头为一个单元,饲养后期可根据生长情况逐渐分栏,每栏可饲养 5~6 头至出栏。各组试验猪,在免疫分组前均精神状态良好、饮食欲正常,抽查体温无明显升高,无明显腹泻、拉稀状态。

1.3 血清样品 来自上述试验猪,用一次性无菌采血器以无菌方式前腔静脉采血,3000 r/min 离心

10 min,取上清保存于无菌的 1.5 mL 离心管中,储存于 -20℃ 冰箱备用。共收集有效血清 530 份。

1.4 试剂盒 猪瘟抗原 ELISA 检测试剂盒(美国 IDEXX 公司,批号:C841);猪瘟抗体 ELISA 检测试剂盒(美国 IDEXX 公司,批号:D631);猪瘟病毒通用型 RT-PCR 检测试剂盒(批号:CSF20150812P),购于北京世纪元亨动物防疫技术有限公司。

1.5 主要仪器与试剂 全波长酶标仪 M200 PRO,瑞士 TECAN 公司;37℃ 恒温箱,10 μL、50 μL、200 μL 及 1000 μL 的单道移液器,200 μL 和 300 μL 的 8 道移液器,分析天平、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪、DEPC 处理的无菌 1.5 mL 离心管、吸头及湿盒等,购自长春市美迪斯达医疗器械有限公司。

2 方法

2.1 试验分组 试验 A 组:随机选取临床健康猪只 145 头猪,分别于 25~35 日龄进行猪瘟活疫苗的第一次免疫接种(简称“一免(A1 组)”)和 60~70 日龄,免疫间隔期为 35 d,进行猪瘟活疫苗第二次免疫接种(简称“二免(A2 组)”),一、二次免疫均为每头猪于颈后部肌肉注射猪瘟活疫苗 2 头份;B、C、D 组则为与 A 组不同时间同年内不同批次的仔猪,免疫方法同上,每组 150 头左右。A 组采集一免后和二免后血清样品,B、C、D 组则采集二免后血清样品,所有样品均为免疫后第 28 天,以无菌方式前腔静脉采血分离的血清进行抗体水平检测。

2.2 样品检测方法

2.2.1 血清中猪瘟抗体水平的 ELISA 检测方法 按照试剂盒使用说明书进行操作。结果判定:以阻断率为标准,阻断率 = (阴性对照孔平均 OD 值 - 样品孔平均 OD 值) / 阴性对照孔平均 OD 值 × 100%。若阴性对照均值 > 0.500 且阳性对照的阻断率 > 50%,则说明结果有效,可对样品进行判定;样品阻断率 ≥ 40% 判定为阳性,即有 CSFV 抗体存在;样品阻断率 ≤ 30% 判定为阴性,即无 CSFV 抗体存在;样品阻断率在 30%~40% 之间,判定为可疑。

2.2.2 血清中猪瘟抗原水平的 ELISA 检测方法

按照试剂盒使用说明书进行操作。结果判定:阳性对照孔 OD 的平均值为 P,阴性对照 OD 的平均值为 N,样品的 OD 平均值为 S;仅当 $P - N \geq 0.15$ 且 $N \leq 0.25$ 时说明结果有效,可对样品进行判定。 $S - N > 0.300$ 时,判为猪瘟病毒抗原阳性; $S - N \leq 0.100$ 时,判为猪瘟病毒抗原阴性; $0.100 < S - N \leq 0.300$ 时,判为可疑。对抗原阳性或者可疑样品,采用 RT-PCR 方法进行进一步的检测。

2.2.3 猪瘟病毒 RT-PCR 检测 根据文献^[8-9]及试剂盒使用建议,对前述 ELISA 法检测的猪瘟抗原中 18 份可疑血清样品及随机选取的 3 份检测阴性样品,选择商品化试剂盒按其使用说明书进行猪瘟病毒 RT-PCR 检测。

2.2.3.1 样品采集与处理 对采集的每份样品和阳性对照、阴性对照分别处理后,各取 100 μL ,置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.2.3.2 病毒 RNA 的提取 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照,分别加入裂解液 600 μL ,充分颠倒混匀,室温静置 3~5 min。将液体吸入吸附柱中,13000 r/min 离心 30 s。弃去收集管中液体,加入 600 μL 洗液,13000 r/min 离心 30 s。收集管中液体,加入 600 μL 洗液,13000 r/min 离心 30 s。弃去收集管中液体,13000 r/min 空柱离心 2 min,以除去残留的洗涤液。将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管中,向柱中央加入洗脱液 50 μL ,室温静置 1 min,13000 r/min 离心 30 s,离心管中液体即为模

板 RNA。

2.2.3.3 RT-PCR 扩增 每份总体积 20 μL ,含 16.8 μL RT-PCR 反应液(用前混匀),1.2 μL 酶混合液,2 μL 模板 RNA。扩增程序:42 $^{\circ}\text{C}$ 45 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,共 35 次;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.2.3.4 电泳 2% 琼脂糖凝胶上样电泳后观察结果。

2.2.3.5 结果判定 阳性对照出现 235 bp 扩增带、阴性对照无带出现(引物带除外)时,试验结果成立。被检样品出现 235 bp 扩增带为猪瘟病毒阳性,否则为阴性。

3 结果

3.1 同一组猪一免和二免后血清抗体水平的比较

从 A 组 145 头试验猪中采得有效血清 112 份,受检猪只猪瘟抗体阳性检出率为 66.1% (74/112),阴性为 16.1% (18/112),可疑为 17.9% (20/112);阳性抗体平均阻断率为 61.3%,集中在 30%~80% 之间相对均匀分布。二免后抗体阳性率为 95.0% (115/121),较一免提高了 28.9%,一二免间抗体阳性率差异显著 ($P \leq 0.01$);同时阻断率平均值二免 ($76.6\% \pm 15.1\%$) 较一免 ($61.3\% \pm 13.0\%$) 也提高了 15.3%;阴性率比例由 16.1% (18/112) 下降到了 3.3% (4/121);可疑样品的平均阻断率虽然变化不大,但比例由一免的 17.9% (20/112) 下降到二免的 1.7% (4/112),见表 1 和图 1。一免和二免抗体水平差异显著 ($P \leq 0.01$)。

表 1 第一次和第二次免疫猪瘟抗体阻断率分析

组别	合计	阻断率 平均值/%	阳性数	阳性阻断率 平均值/%	阳性 比例/%	阴性数	阴性阻断率 平均值/%	阴性 比例/%	可疑数	可疑阻断率 平均值/%	可疑 比例/%
A1 组	112	49.8 \pm 20.0	74	61.3 \pm 13.0	66.1	18	19.7 \pm 7.5	16.1	20	34.3 \pm 2.7	17.9
A2 组	121	74.3 \pm 17.8	115	76.6 \pm 15.1	95.0	4	28.5 \pm 1.3	3.3	2	34.6 \pm 4.1	1.7

第一次免疫组为 A1 组,第二次免疫组为 A2 组

3.2 不同组猪二免后血清抗体水平的分析 为了进一步分析第二次免疫后猪只血清的抗体水平,选择了同年内不同批次的饲养猪 A2、B、C、D 组共 418 份血清样品,进行抗体水平的分析。其中检出抗体阳性 382 份,占受检猪只的 91.4% (382/418),符合国家农业部要求的 70% 阳性标准;抗体阻断率水

平相对较高,主要分布在 50%~100% 之间,尤其是分布在 60%~90% 之间的样品占总检测样品的 56.7% (表 2、图 2)。仅有 16 份样品抗体水平为阴性,占受检猪只的 3.8% (16/418);20 份为可疑,占受检猪只的 4.8% (20/418)。

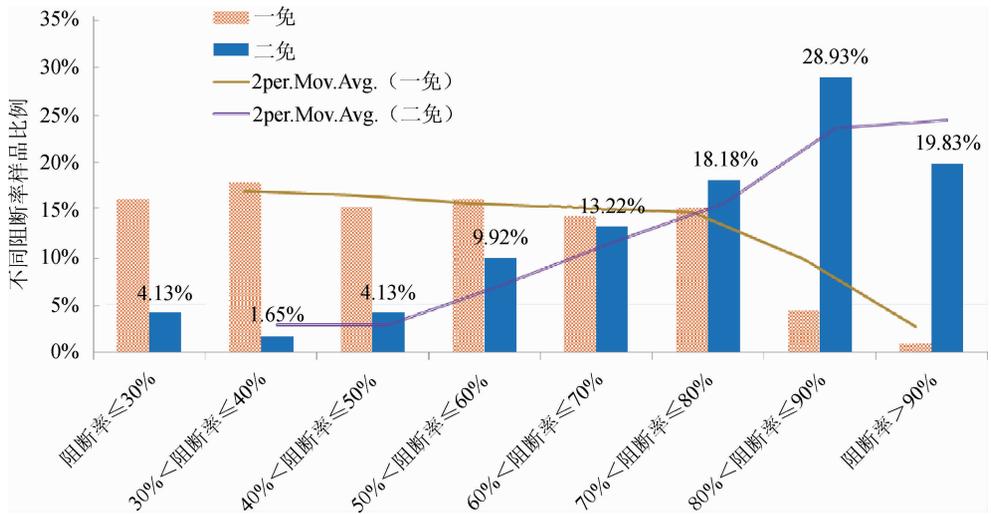


图1 第一次和第二次免疫猪瘟抗体阻断率分析

表2 不同组二次免疫后各组猪瘟抗体水平分析

组别	合计	组阻断率平均值/%	阳性数	阳性阻断率平均值/%	阳性率/%	阴性数	阴性阻断率平均值/%	阴性率	可疑数	可疑阻断率平均值/%	可疑率/%
A2组	121	74.3 ± 17.8	115	76.6 ± 15.1	95.0	4	28.5 ± 1.3	3.3	2	34.6 ± 4.1	1.7
B组	97	59.8 ± 18.9	80	66.1 ± 13.9	82.5	6	23.3 ± 8.0	6.2	11	34.0 ± 2.5	11.3
C组	88	61.7 ± 18.0	77	66.3 ± 13.5	87.5	4	23.9 ± 4.8	4.5	7	33.9 ± 3.1	8.0
D组	112	77.4 ± 16.1	110	78.3 ± 14.5	98.2	2	23.7 ± 1.8	1.8	0	/	/
总计	418	69.1 ± 19.2	382	72.8 ± 15.4	91.4	16	24.0 ± 5.9	3.8	20	34.0 ± 4.8	4.8

A2组为A组试验猪第二次免疫血清样品

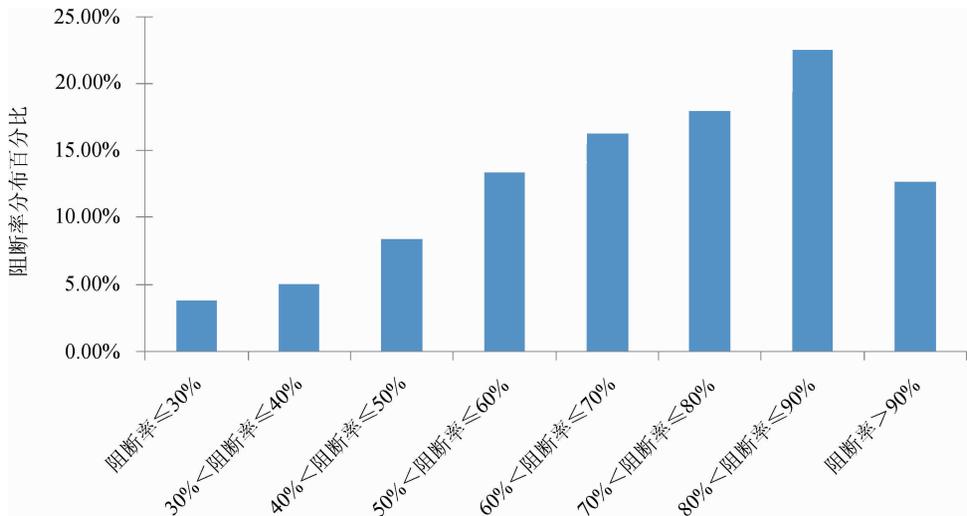


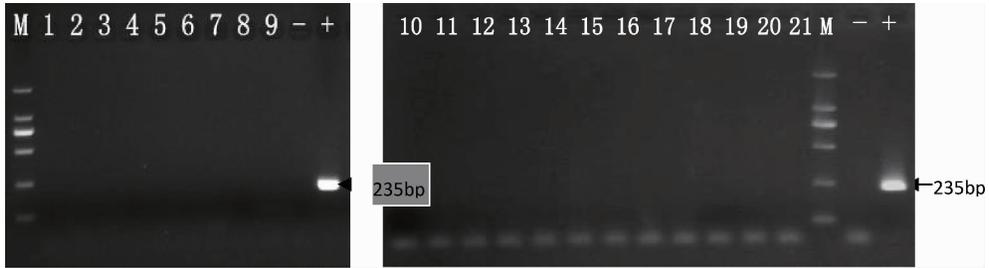
图2 二免后阻断率区间分布

3.3 猪瘟病毒抗原检测结果 在530份受检猪只中,血清中猪瘟抗原阳性检出率为0,可疑检出率为3.4%(18/530),阴性检出率为96.60%(512/530),表明该猪场猪瘟病毒感染风险较低(表3)。对抗原检测结果为可疑的18份样品及随机选择的3份检

测结果为阴性的样品采用RT-PCR方进行病毒核酸检测,21份样品均为阴性。对抗原检测为可疑的样品进行分析,抗体阻断率集中在30%~40%和40%~90%两个区间范围内(图3、表4)。

表3 猪血清样品猪瘟抗原水平统计

项目	合计	阴性数	阴性比例/%	可疑数	可疑比例/%	阳性数	阳性比例/%
A1组	112	104	92.86	8	7.14	0	0.00
A2组	121	118	97.52	3	2.48	0	0.00
B组	97	95	97.94	2	2.06	0	0.00
C组	88	88	100.00	0	0.00	0	0.00
D组	112	107	95.54	5	4.46	0	0.00
总计	530	512	96.60	18	3.40	0	0.00



1-18; ELISA 检测可疑样品; 19-21; ELISA 检测阴性样品;
M; DNA Marker DL2000; “-”: 阴性对照; “+”: 阳性对照

图3 猪血清 CSFV RT-PCR 结果

表4 猪瘟抗原检测为可疑的18份血清样品检测结果统计

序号	原样品编号	ELISA 抗原检测结果	抗体阻断率/%	抗体检测结果	RT-PCR 结果
1	L187	±	34.8	±	-
2	L188	±	38.0	±	-
3	L277	±	48.9	+	-
4	L248	±	78.0	+	-
5	L198	±	87.5	+	-
6	L256	±	30.4	±	-
7	L219	±	21.2	-	-
8	L193	±	35.7	±	-
9	L259	±	21.5	-	-
10	L265	±	12.9	-	-
11	L211	±	70.9	+	-
12	T74	±	33.4	±	-
13	T8	±	33.6	±	-
14	X98	±	22.4	-	-
15	X128	±	83.1	+	-
16	X133	±	87.2	+	-
17	X142	±	52.8	+	-
18	X148	±	87.5	+	-
19	X110	-	47.0	+	-
20	X118	-	72.3	+	-
21	X122	-	70.7	+	-

+ 阳性; - 阴性; ± 可疑, 其中 1-18 号为 ELISA 抗原检测可疑样品; 19-21 号为 ELISA 抗原检测阴性对照样品

4 小结与讨论

本研究利用了市场上使用较多的 ELISA 试剂盒, 通过采集某规模化猪场同年内不同时间、不同批次的猪只血清样品, 研究猪瘟活疫苗一免和二免对血清抗体水平的影响, 以对当前猪瘟活疫苗的免

疫程序进行评价。试验中共检测血清样品 530 份, 其中 A1 组 112 份与 A2 组 121 份的血清抗体检测结果比较表明, 二免后血清抗体的阳性率 (95.0%) 较一免后血清抗体的阳性率 (66.1%) 提高了 28.9%, 抗体平均阻断率二免 (76.6% ± 15.1%) 较

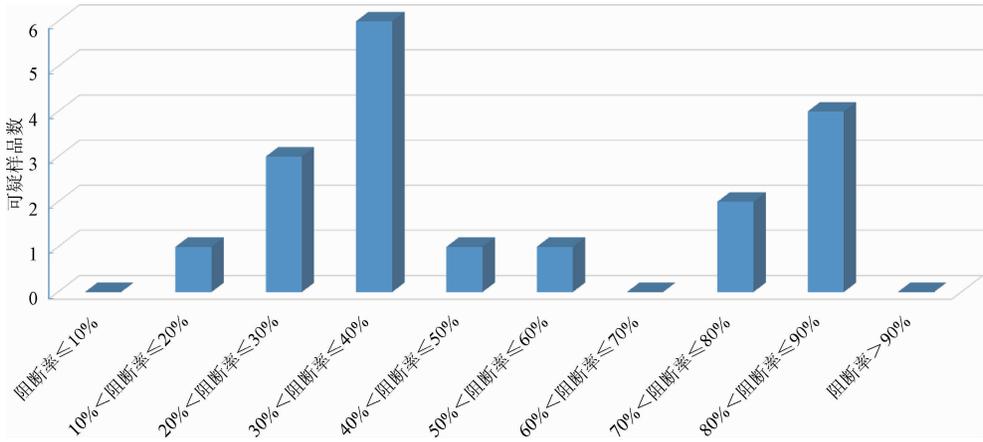


图4 阻断 ELISA 法猪瘟病毒抗原检测可疑样品猪瘟抗体阻断率分布

一免(61.3% ± 13.0%)也提高了 15.3%。表明只有一次免疫猪只抗体水平相对较低,未达到农业部《2013 年国家动物疫病强制免疫计划》中规定的抗体合格率在 70% 以上的要求^[10],而二次免疫后与一次免疫相比,免疫效果有了显著的提高($P \leq 0.01$,差异极显著)。随后对同年内不同批次的 A2、B、C、D 四组猪只二免后的血清进行了检测,在 418 份试验样品中,91.4% 的血清样本(382/418)检出猪瘟抗体阳性,免疫阳性率水平远高于农业部《2013 年国家动物疫病强制免疫计划》规定的抗体合格率在 70% 以上的要求^[10],而且抗体阻断率集中在 60% ~ 90% 之间的占总检测样品的 56.7%,表明有很高的抗体整齐度。在 RT-PCR 试验的所有样品中均未检测到抗原阳性的样品,也说明该猪场猪瘟病毒感染率为 0%,猪瘟疾病控制水平比较稳定。以上分析与王娟萍等^[11]曾根据 ELISA 方法对规模化猪场的猪瘟疫苗免疫效果评估的结论相一致。

本次研究表明,对当前的猪场仅仅实施一次免疫是不够的,只有实施二次免疫,才能使猪瘟活疫苗免疫猪群获得较高和整齐的免疫抗体水平,有效地防控猪瘟疫病的发生。

参考文献:

[1] 杜念兴. 猪瘟的回顾与展望[J]. 中国畜禽传染病,1998,20(5): 317-319.

[2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:中国科学出版社,1997.

[3] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京:中国农业出版社,2014.

[4] 世界动物卫生组织. 陆生动物卫生法典[S]. 第21版. 北京:中国农业出版社,2012:725-739.

[5] 宁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社,2008.

[6] 涂宜强,简永利,白宇,等. 浙江部分地区猪瘟流行现状的调查与分析[J]. 浙江农业学报,2013,25(4): 730-732.

[7] 谢娟. 猪瘟抗原抗体检测方法及其意义的研究[D]. 广西大学,2013.

[8] Yin Shuang-hui, Tian Hong, Shang You-jun, et al. Discrepancy of classical swine fever virus in different tissues by one-step RT-PCR and nested RT-PCR[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2010,2(3): 18-20.

[9] 李韦伟,江红,田东升,等. ELISA 抗原检测与荧光 RT-PCR 快速诊断猪瘟的比较研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2014,39(11): 108-111.

[10] 刘志勇,韩庆安,刘乃强,等. 规模养猪场主要疫病免疫效果评估模型的建立[J]. 中国兽医杂志,2011,47(7): 88-90.

[11] 王娟萍,姚敬明,吴忻,等. 规模化种猪场猪瘟免疫情况调研[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(1): 184-187.

(编辑:李文平)