

杨加琼. 免疫程序对猪伪狂犬病毒抗体效价的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 209-210.

免疫程序对猪伪狂犬病毒抗体效价的影响

杨加琼

(眉山职业技术学院, 四川眉山 620036)

摘要:将 22 头 35 日龄健康长白仔猪分为试验组和空白对照组, 试验组 20 头, 空白对照组 2 头。按免疫时间和免疫剂量设计不同的免疫程序并免疫试验组仔猪。采集免疫前和首次免疫 1 个月后试验仔猪前腔静脉血液制备血清, 采用猪伪狂犬病胶乳凝集试剂盒检测各试验猪猪伪狂犬病毒抗体效价, 比较不同免疫程序对猪伪狂犬病毒抗体效价的影响。结果表明, 试验仔猪免疫前后猪伪狂犬病毒抗体效价差异极显著($P < 0.01$), 免疫后伪狂犬病毒抗体效价在试验仔猪各个体间差异极显著($P < 0.01$); 免疫剂量组 A1 与 A2、A3 差异显著($P < 0.05$); 免疫时间组 B1 与 B2、B3 差异显著($P < 0.05$); 采用非配对双样本均值分析, 试验组与空白对照组的抗体效价差异极显著($P < 0.01$)。

关键词:免疫程序; 猪伪狂犬病毒; 抗体效价; 影响; 分析

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0209-02

猪伪狂犬病是由猪伪狂犬病毒引起的猪及其他家畜和野生动物的一种传染病, 以发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为其主要特征, 猪是该病毒的贮存畜主和传染源^[1]。中国自 20 世纪 70 年代发现该病以来, 已扩至全国三十多个省市的猪场, 其感染引起的母猪流产、弱胎、死胎等对养猪业造成严重的经济损失^[2]。接种疫苗是该病的主要防控措施, 但疫苗的安全性及该病毒极易与其野生型毒株重组导致疫苗效果不佳多有报道^[3]; 猪场对经济效益的考虑以及该病毒对母猪繁殖率及仔猪存活率的影响, 为该病的高免血清提供了市场空间。各种猪伪狂犬病疫苗的科学使用相关学者已有研究^[4], 但针对制备该病的高免血清免疫程序及相关研究报道甚少^[5], 本研究通过查阅资料及参照临床经验, 设计系列免疫程序, 探讨其制备猪伪狂犬病高免血清的科学免疫程序, 为研制猪伪狂犬病高免血清提供技术支持, 也为临床防控该病进行免疫提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器和设备 高压灭菌锅; 恒温培养箱; 4℃冰箱; 超净工作台(苏州净化设备有限公司产品); 96 孔 V 型血凝板; 离心机; 10 mL 一次性注射器; 微量移液器等。

1.1.2 主要药品和试剂 猪伪狂犬病活疫苗, 湖南亚华种业股份有限公司生物制药厂生产; 猪伪狂犬病活疫苗稀释液, 湖南亚华种业股份有限公司生物制药厂生产; 伪狂犬病胶凝集试验试剂盒, 武汉科前动物生物制品有限责任公司生产。

1.1.3 猪伪狂犬病待检血清样品 22 头试验仔猪按照免疫程序免疫猪伪狂犬病毒疫苗后所制备的 22 份待检血清样品及免疫前所制备的 22 份血清样品, 共 44 份待检血清样品。

1.2 试验猪场及试验动物

试验猪场为眉山市东坡区一个体养猪场; 试验动物为该

养猪场饲养的 2 窝 22 头(其中, 一窝 12 头, 另一窝 10 头)35 日龄断乳阉割的长白仔猪, 且母猪和仔猪均未免疫过猪伪狂犬病毒疫苗。

1.3 试验时间

2012 年 12 月 10 日至 2013 年 2 月 10 日。

1.4 试验方法

1.4.1 试验分组及免疫 参考查阅的资料, 将 22 头试验仔猪分为试验组和对照组, 试验组 20 头, 包括免疫时间和免疫剂量 2 个大组。空白对照组仔猪 2 头。根据试验分组及设计的免疫程序, 采用颈部肌肉注射途径免疫各组试验仔猪。具体分组及免疫程序见表 1。

表 1 试验分组及免疫程序的设计

组别	处理	试验头数	免疫程序(头份)			
			首免	二免	三免	四免
免疫剂量	A1	4	1		1	2
	A2	3	2		2	1
	A3	3	3		1	0
免疫时间	B1	4	1	2		
	B2	3	1		2	
	B3	3	1			2
对照组		2				

注: 首免与二免、二免与三免、三免与四免间隔时间均为 1 周。

1.4.2 血样的采集及血清制备 采取前腔静脉采血法。对所有试验仔猪于免疫前及免疫结束后按 1 头 5 mL 用 10 mL 规格一次注射器采集血液, 其中, 免疫前直接采集, 免疫后按免疫程序免疫结束后 1 周时从前腔静脉采集血液。于 4℃冰箱自然沉析, 取上清液, 低速离心, 用移液管吸取上清液置 1.5 mL 离心管中, 贴标签编号, 制备出免疫前及免疫后各试验仔猪的待检血清样品, -20℃冷藏备用。

1.4.3 免疫前及免疫结束后试验仔猪伪狂犬病毒抗体效价的测定 采用猪伪狂犬病胶乳凝集试验试剂盒对免疫前及免疫后各试验仔猪的 44 份血清样品进行猪伪狂犬病毒血清效价的检测。根据试剂盒说明书, 先将制备的被测血清样品在微量反应板上用稀释液作 2 倍系列稀释, 各取 1 滴(约

收稿日期: 2013-12-24

作者简介: 杨加琼(1970—), 女, 四川犍为人, 副教授, 研究方向为畜牧兽医和水产。E-mail: yjq5360409@163.com。

20 μL)依次滴加于玻片上,同时设阴性血清和阳性血清对照,随后各加胶乳抗原 1 滴,混匀,搅拌并摇动 1~2 min,在 3~5 min内观察。达到阳性凝集反应的血清最高稀释倍数,即为血清的抗体效价。阳性对照:将阳性血清进行 2 倍系列稀释,取 20 μL 与等量胶乳抗原进行胶乳凝集试验,胶乳抗原与 1:64 稀释的阳性血清应出现“++”凝集反应。阴性对照:阴性血清加抗原后,应不发生凝集反应。

2 结果

2.1 免疫前及免疫后各试验仔猪猪伪狂犬病毒抗体效价

对采集的免疫前及免疫后各 44 份待检血清样品用猪伪狂犬病胶乳凝集试剂盒进行检测,测得各试验仔猪免疫前后的猪伪狂犬病毒血清抗体效价(表 2)。结果表明,试验前各仔猪均未检测出抗体效价,个体间差异不显著;免疫后,试验个体间猪伪狂犬病毒抗体效价差异极显著($P<0.01$);免疫前与免疫后相比,抗体效价差异极显著($P<0.01$)。

表 2 免疫后试验仔猪猪伪狂犬病毒抗体水平

组别	总数(头)	耳号	免疫前效价	免疫后效价
免疫剂量组 A1	4	04242110	0	1:64
		04259385	0	1:128
		04259365	0	1:128
		04259348	0	1:128
免疫剂量组 A2	3	04259393	0	1:64
		04259437	0	1:64
		04259394	0	1:32
免疫剂量组 A3	3	04242177	0	1:64
		04252360	0	1:64
		04259351	0	1:32
免疫时间组 B1	4	04259399	0	1:16
		04242079	0	1:16
		04259414	0	1:8
		04259394	0	1:16
免疫时间组 B2	3	04259396	0	1:32
		04259366	0	1:32
		04259367	0	1:64
免疫时间组 B3	3	04259374	0	1:32
		04259358	0	1:64
		04259387	0	1:32
对照组	2	04259354	0	1:2
		04259391	0	1:1

2.2 猪伪狂犬病不同免疫剂量抗体效价的差异性

免疫剂量组 A1 与 A2、A3 差异显著($P<0.05$),A2 与 A3 组差异不显著,且 A1 组的抗体效价最高。

2.3 猪伪狂犬病不同免疫时间抗体效价的差异性

免疫时间组 B1 与 B2、B3 差异显著($P<0.05$),B2 与 B3 组差异不显著,且 B2、B3 组抗体效价较高。

2.4 对照组和试验组猪伪狂犬病抗体效价的差异性

采用非配对双样本均值分析,试验组与对照组仔猪的抗体效价差异极显著($P<0.01$)。试验组猪伪狂犬病毒的抗体效价明显高于未免疫的对照组。

3 讨论

供试仔猪因母猪和仔猪均未注射过猪伪狂犬疫苗,且最

近并未发生过猪伪狂犬病,在检测中也未检测出猪伪狂犬病毒抗体效价,表明供试猪无母源抗体影响,适用于本试验要求;在免疫后,除对照组外,其余试验猪抗体效价均有不同程度的升高,表明所作免疫是成功的。

在免疫剂量 3 个处理组中,A1 组的 4 头试验仔猪的抗体效价均达到了 1:64 以上的水平,表现出了较高的抗体水平,而 A2、A3 组的试验猪抗体效价虽比免疫前有了较大提高,但与 A1 组相比至少低 1 个梯度。因 A1 组试验猪在最后一次免疫时剂量加倍,且在 1 周后就采血,是否说明经多次免疫后,在最后一次免疫加大剂量对抗体效价提升有很大影响将进一步验证。

在免疫时间组的 3 个处理中,B2、B3 组的试验猪抗体水平均较 B1 组高,说明本次试验 B2、B3 组的免疫程序效果较好。

试验仔猪在免疫后与免疫前,无论是免疫剂量组还是免疫时间组其猪伪狂犬病毒的抗体水平差异极显著,但是免疫剂量组抗体平均水平与免疫时间组抗体水平相比,免疫剂量组抗体水平明显高于免疫时间组的平均水平。因免疫剂量组做了 3 次免疫,而免疫时间组只做了 2 次免疫,这是否说明免疫次数增多会提高抗体效价,或者制作高免血清至少要进行多少次免疫才行,对猪伪狂犬高免血清的制作是一个很好的思考,这方面有待进一步验证。但至少说明,仔猪只进行 1 次免疫,其效果很不理想,平均抗体效价水平较低,起不到保护作用,所以必须进行加强免疫,达到免疫保护目的。

由于免疫时间组和免疫剂量组的试验是分开来做的,而且是不同窝的仔猪,并不能很明确地说明本次试验的最佳免疫剂量程序和最佳免疫时间程序的简单叠加就是最好的免疫程序,但为以后的相关研究提供了一个很好的基础。

猪伪狂犬疫苗有弱毒苗、灭活苗、基因缺失疫苗、亚单位疫苗等多种类型,而本次试验采用的是猪伪狂犬病活疫苗,究竟哪种类型的疫苗进行免疫后能得到更高的抗体水平,本试验没有研究,但这也是制作高免血清和提升临床免疫抗体效价的一个重要影响因素。由于本次采用的是猪伪狂犬病毒胶乳凝集试验检测试剂盒进行抗体检测,判定结果时不一定十分精确,而且究竟什么样的抗体水平才达到了高免血清的用药要求,并没有具体参考文献,只是表明本次试验的部分试验猪抗体效价较高,有待采用 ELISA 检测方法检测,并参考相关资料文献和具体试验,判定是否为合格的临床使用高免血清。

参考文献:

[1]蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2001: 207-209.
[2]赵东升,刘有昌,安福生. 近年来我国猪伪狂犬病的流行状况和分析[J]. 今日养猪业,2008(6):26-28.
[3]芦惟本,黄 川. 进口伪狂犬弱毒疫苗引发伪狂犬病流行的报道[J]. 今日养猪业,2009(4):15-16.
[4]曾智勇,汤德元,郭万柱. 伪狂犬病疫苗的研究[J]. 世界农业, 2007(10):66-69.
[5]孔令达,符 芳,于 辉,等. 猪伪狂犬病高免血清的制作与初步应用[J]. 中国预防兽医学报,2004,26(5):359-362.