

胡新岗,黄银云,郭广富,等. 山羊传染性胸膜肺炎自家苗的制备与临床应用[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):236-238.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.069

山羊传染性胸膜肺炎自家苗的制备与临床应用

胡新岗¹,黄银云¹,郭广富¹,田亚军²,朱止南³,许余良⁴

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300;2. 江苏省泰州市高港区胡庄镇畜牧兽医站,江苏泰州 225300;

3. 江苏省泰州市高港区动物卫生监督所,江苏泰州 225300;4. 江苏省泰兴市畜牧兽医技术服务中心,江苏泰兴 225400)

摘要:为临床防控山羊传染性胸膜肺炎,采用常规方法制备山羊传染性胸膜肺炎组织灭活苗,通过自制苗与市售山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝灭活苗进行免疫比较试验,并采用正向间接血凝试验(IHA)方法监测试验羊抗体水平,试验后开展临床实践。结果表明,自家苗用于羊场山羊传染性胸膜肺炎的紧急免疫接种是可行的。

关键词:山羊传染性胸膜肺炎;自家苗;制备;临床应用;效果

中图分类号: S851.35;S858.27 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0236-03

山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)俗称烂肺病,是由山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)、丝状支原体山羊亚种(Mmc)、绵羊肺炎支原体(Movi)等多种致病支原体引起的山羊呼吸道传染病,被世界动物卫生组织(OIE)确定为法定报告的山羊传染病之一。该病呈急性或慢性高度接触性传染,主要症状是发热、咳嗽、气喘,病变以纤维素性肺炎和胸外膜炎为特征^[1]。由于病原支原体的多样性以及支原体的分离培养与鉴定比较困难,仅靠症状及病变在临床上难以确诊,致使基层兽医人员临床用药针对性不强,误诊误治现象普遍,导致该病在我国长期存在。作为世界上养羊数量最多的国家和最大的羊肉出口国,山羊传染性胸膜肺炎对我国山羊养殖业造成了非常大的危害。目前,山羊传染性胸膜肺炎的免疫预防主要靠接种山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝灭活苗,但它是用丝状支原体山羊亚种C87-1株制备,由于临床上多种支原体性病原的存在,该疫苗预防山羊传染性胸膜肺炎的效果还不大理想^[2]。因此,加强山羊传染性胸膜肺炎的防控研究、减少该病对地方养羊业的侵扰,对于促进养羊场(户)的增效增收具有重要意义。为了解决泰州地区山羊传染性胸膜肺炎的防控难题,江苏农牧科技职业学院羊病研究课题组联合行业企业,开展用自家苗防治山羊传染病胸膜肺炎的研究,通过血清学方法测定其抗体效价,并与国产疫苗预防效果相比较,以期科学防控山羊传染病胸膜肺炎提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与设备

主要仪器与设备有:无菌操作台、洁净组织捣碎机、匀浆机、37℃恒温培养箱、低温冰箱、微生物学试验常规仪器等。

收稿日期:2014-11-25

基金项目:江苏省高校“青蓝工程”[编号:苏教师(2014)23号];江苏农牧科技职业学院重点科研项目(编号:NSFZD1303)。

作者简介:胡新岗(1974—),男,安徽宿州人,硕士,副教授,从事动物医学专业教学、科研及高职教育管理工作。Tel:(0523)86158089; E-mail:gxh008@qq.com。

1.2 试验试剂

山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝灭活苗苗(以下简称商品苗,哈药集团生物疫苗有限公司生产),皮下或肌内注射(6个月以下的山羊3 mL/只,6个月以上的山羊5 mL/只);中国农业科学院兰州兽医研究所研制的山羊支原体山羊肺炎亚种MCCP正向间接血凝诊断试剂盒、丝状支原体山羊亚种MMC正向间接血凝诊断试剂盒、绵羊肺炎支原体MO正向间接血凝诊断试剂盒;普通琼脂培养基;甲醛溶液;双抗(青霉素、链霉素)等。

1.3 病料

从江苏省泰兴市未免疫山羊传染性胸膜肺炎的A羊场选择病程较长或濒临死亡的临床症状典型的病羊,由颈静脉采血并分离血清,经山羊支原体正向间接血凝诊断[被检血清抗体滴度 $\geq 1:8$ (++)判为阳性、血清抗体滴度 $\leq 1:4$ (++)判为阴性]确诊后,扑杀患羊,无菌采集病羊肺脏典型肝变组织、纵隔淋巴结,无菌穿刺采取胸腔液。将采集的病料迅速置于0~4℃保存备用,同时取血液、胸腔液接种至普通琼脂培养基上,其间应无杂菌生长。

1.4 自家苗的制备

将采集的病变肺脏、淋巴结组织研磨,经组织捣碎机碎化后与胸腔液混合,按1:4的比例加入灭菌生理盐水进行稀释调兑,经1次双层、2次4层无菌医用纱布过滤后,加甲醛至其浓度为0.1%,经1h摇匀后放入37℃恒温培养箱中灭活,灭活时间48h,其间每8h摇动1次,每次30min。分装前加入双抗(青霉素1000 IU/mL、链霉素500 IU/mL);分装后封口,置于2~8℃冷暗处存放。安全性检验:选用约1.5~2.0kg健康家兔和400g左右豚鼠各2只,每只肌肉注射2mL自家苗,10d内均健活;挑选健康易感山羊2只,各于颈侧皮下注射5mL,观察7d无不良反应;普通培养基培养24h无杂菌生长^[3]。

1.5 试验羊只及分组

从A羊场随机选取90只临检未发病、2月龄、体质量相近的杂交波尔山羊,随机分成商品苗组、自家苗组、空白对照组,每组30只,登记耳标号,分栏统一饲养。接种分首免、二免(加强免疫),二免在首免后21d进行。商品苗组每只每次

皮下接种 3 mL 商品苗;自家苗组每只每次皮下接种 3 mL 自家苗;空白对照组每只每次注射 3 mL 生理盐水。

1.6 待测血清的制备

分别于首免前 3 d,首免后 14 d,二免后 10、30、60、90、120 d 空腹颈静脉采血 3~5 mL,常温析出血清,按组别耳标号编号,-20℃保存备测。

1.7 试验羊只的观察记录

试验开始后每天专人观察各组羊只的采食、表现、生长及发病情况,并予以详细记录,以判断不同疫苗对山羊传染性胸膜肺炎的预防效果。

1.8 抗体的检测与统计分析

采用正向间接血凝试验(IHA)方法对采集的血清样品进行山羊传染性胸膜肺炎抗体检测,按编号逐只记录血清抗体的 IHA 效价,差异显著性按统计学方法进行比较^[4]。

1.9 自家苗的临床应用

选择泰兴、高港、姜堰、海陵及开发区的 5 家发病的养羊场(户),初诊后通过正向间接血凝试验予以确诊,按本试验方法制备各场(户)自家苗,进行本场的紧急免疫接种,统计

预防有效率。

2 结果与分析

2.1 抗体阳性率及对羊增质量的影响

所有试验羊在首免前测定表明,山羊传染性胸膜肺炎抗体均为阴性。通过表 1 对免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体阳性数、阳性率的比较可以看出:商品苗组、自家苗组在首免后 14 d 抗体阳性率均处于较低水平,差异不明显;二免后 10 d,2 组的抗体阳性率均大幅提高;二免后 30 d,2 组抗体阳性率持平;直到二免后 60 d,2 组抗体阳性率均上升为 100%;二免后 90~120 d,商品苗组阳性率持续下降,自家苗组则至 120 d 时才出现下降,但在二免后 90 d 时即高于商品苗组,说明自家苗组的抗体衰退速度慢于商品苗组。由表 1 还可以看出,2 组羊群抗体的产生都是持续的,而二免能使羊产生较高水平且持续稳定的保护抗体;空白对照组在整个监测过程均未出现山羊传染性胸膜肺炎抗体阳性羊,说明无论是商品苗组还是自家苗组的免疫,对于预防山羊传染性胸膜肺炎均是有积极意义的。

表 1 免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体阳性数、阳性率的比较

组别	首免前 3 d			首免后 14 d			二免后 10 d			二免后 30 d			二免后 60 d			二免后 90 d			二免后 120 d		
	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性
	数	数	率	数	数	率	数	数	率	数	数	率	数	数	率	数	数	率	数	数	率
商品苗组	30	0	0	26	4	13	6	24	80	0	29	97	0	30	100	1	29	97	2	28	93
自家苗组	30	0	0	27	3	10	8	22	73	1	29	97	0	30	100	0	30	100	1	29	96
空白对照组	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	29	0	0	29	0	0	19	0	0

注:空白对照组在二免后死亡 1 只,出售 10 只。

从表 2 可以看出,与对照组相比,接种商品苗羊只的生长差异不显著,说明接种疫苗不会阻碍动物的生长;而接种自家苗羊的生长在二免后 120 d 与对照组相比差异显著($P <$

0.05),但是否足以说明自家苗能够促进羊只的生长还有待进一步研究。

表 2 免疫前后 3 组试验羊的平均体质量

组别	免疫前后不同监测时间节点的体质量(kg/只)						
	首免前 3 d	首免后 14 d	二免后 10 d	二免后 30 d	二免后 60 d	二免后 90 d	二免后 120 d
商品苗组	10.89	14.26a	17.31a	23.31a	31.72a	38.92a	47.72a
自家苗组	11.45	14.87a	18.45a	23.75a	32.54a	39.75a	49.52b
空白对照组	11.23	14.63a	18.24a	22.59a	32.20a	39.21a	48.15a

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 试验羊的 IHA 抗体水平

从表 3 免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体水平的比较及表 4 免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体平均效价的比较可知,商品苗组、自家苗组在首免后 14 d 抗体水平均较低,低于 2log₂/只,起不到预防作用。二免后 10 d,2 组的抗体水平明显上升,商品苗组、自家苗组的平均抗体效价分别达到 5.83、5.74 log₂/只,免疫合格率均达到了 77%。二免后 30 d,2 组的抗体水平呈快速持续上升趋势。二免后 60 d,2 组的抗体水平分别为 8.68、8.74 log₂/只,均达到顶峰,自家苗组略高于商品苗组,但差异不显著,此时商品苗组 67% 的羊只抗体血凝效价≥1:256,同期自家苗组则有 73% 的羊只抗体血凝效价≥1:256,并且将高水平的保护抗体维持到二免后 90 d,而商品苗组在二免后 90 d 能够维持同样抗体水平的羊只则降至 60%。在免疫合格率方面,自二免后 60 d,2 组免疫合格率

均呈下降趋势,商品苗组下降幅度明显快于自家苗组,表明自家苗组产生抗体的稳定性、持久性优于商品苗组。二免后 120 d,商品苗组、自家苗组的 IHA 抗体平均效价分别为 7.42、8.13 log₂/只,差异明显,表明本试验的自家苗免疫原性优于商品苗。

2.3 自家苗临床紧急免疫接种效果

从表 5 可以看出,参与试验的 5 家羊场(户)采用自家苗二免后,免疫合格率均超过了 80%,达到了理论上的免疫密度要求,能够起到避免群体性发病的作用。二免后山羊传染性胸膜肺炎的临床发病率均低于 10%,大大低于该病的非免疫易感羊群 80% 以上的发病率,说明羊只体内的抗体起到了良好的保护作用;而病死率在 0~50%,符合该病的临床特点。统计 5 家羊场试验羊只的平均日增质量显示,均处于 0.25~0.30 kg/(d·只)之间,符合肉山羊常规饲养的增质量

表 3 免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体水平的比较

组别	监测时间	监测数量 (只)	IHA 血清抗体效价(log ₂ /只)					疫合格率(%)
			≤1:16	1:32	1:64	1:128	≥1:256	
商品苗组	首免前 3d	30	0	0	0	0	0	0
	首免后 14d	30	28	1	1	0	0	6.7
	二免后 10 d	30	7	4	6	10	3	77.0
	二免后 30 d	30	3	2	3	5	17	90.0
	二免后 60 d	30	1	1	2	6	20	97.0
	二免后 90 d	30	2	2	3	5	18	93.0
	二免后 120 d	30	5	3	5	3	15	83.0
自家苗组	首免前 3d	30	0	0	0	0	0	0
	首免后 14d	30	28	2	0	0	0	6.7
	二免后 10 d	30	8	5	5	11	2	77.0
	二免后 30 d	30	2	6	6	12	4	93.0
	二免后 60 d	30	1	1	3	3	22	97.0
	二免后 90 d	30	1	2	3	4	20	97.0
	二免后 120 d	30	3	2	4	5	16	90.0
对照组								

注:空白对照组在各监测节点血清抗体均为阴性。

表 4 免疫前后 3 组试验羊 IHA 抗体平均效价的比较

组别	免疫前后不同监测时间点 IHA 抗体的平均效价(log ₂ /只)						
	首免前 3 d	首免后 14 d	二免后 10 d	二免后 30 d	二免后 60 d	二免后 90 d	二免后 120 d
商品苗组	0	1.72	5.83	7.79	8.68	8.35	7.42
自家苗组	0	1.58	5.74	7.85	8.74	8.46	8.13
空白对照组	0	0	0	0	0	0	0

表 5 自家苗紧急免疫的接种效果

场别	接种数 (只)	二免后 疫合格 率(%)	二免后 病发数 (只)	二免后 发病率 (%)	二免后 病死数 (只)	二免后 病死率 (%)	平均日增质量 [kg/(d·只)]
泰兴羊场	66	85	5	7.6	2	40	0.30
高港羊场	75	97	2	1.3	1	50	0.25
海陵羊场	43	83	2	4.6	0	0	0.26
姜堰羊场	57	90	3	1.7	1	33	0.27
开发区羊场	34	94	0	0	0	0	0.28

幅度,说明接种自家苗对山羊的日常生长不会造成不利影响。

3 讨论

山羊传染性胸膜肺炎在我国各地广泛流行,该病的病原支原体呈现多样性,各地分离到的病原有单一性也有混合性,这种病原的复杂性以及支原体分离培养难的特点^[5],长期以来给山羊传染性胸膜肺炎的临床诊断与实验室确诊造成了很大困难,困扰着基层兽医工作者甚至是一些专业技术人员,导致较多的临床误诊、误治、延误治疗时机等状况,由此疫病造成的养羊业经济损失十分严重^[6]。因此,寻找针对性强、简便可行的防治方法是很有必要的。

长期以来,由支原体引起的动物呼吸道传染病的预防主要还是靠疫苗免疫。田间试验证实,用山羊传染性胸膜肺炎灭活苗免疫,能有效提升羊体内特异性抗体水平、增强机体的特异性抵抗力、减少或避免发病。试验表明,自家苗免疫过的

羊群,在免疫效果上要优于普通商品苗,作为紧急免疫接种可以尝试采用。这可能是因为自家苗中包含了发病山羊体内的多种抗原成分,对羊群紧急免疫接种后可以对羊体进行全面的诱导,使不同羊只产生不同程度的免疫反应,从而达到预防和抗病的目的,而这一点正好可以弥补山羊传染性胸膜肺炎商品苗菌株单一的不足。本试验证实,加强免疫能够促进动物机体产生高水平抗体,说明对于灭活苗而言,加强免疫十分必要;同时,直到二免后 60 d 抗体水平达到高峰,说明抗体的产生有一定持续的过程。

养殖生产中如果有适宜的商品苗选用,不建议采用自家苗,更不允许本场制备的自家苗在他场应用。一方面,自家苗的制备需要严格的灭活和一定的技术要求,质量不过关有可能导致散毒,过滤不彻底的组织碎质也可能对动物形成较大应激;另一方面,在自家苗的制备过程中,无法准确检测抗原的含量,抗原过多或过少都有可能对羊只免疫耐受。作为救急措施采用时,必须请专业人员帮助制备和应用,同时要配合药物防治、消毒驱虫、加强营养等综合措施,才能真正达到疫病防控的目的。

参考文献:

[1]杨帆,王贵江,吴丽卿,等. 羊传染性胸膜肺炎的综合防治措施[C]//2010 中国羊业进展,2010:354-355.
[2]李昌铭,魏锦龙,程颖璠,等. 山羊传染性胸膜肺炎的调查与防治[J]. 中兽医学杂志,2010(1):20-21.
[3]潘淑惠,万一元,龙鳌,等. 贵州省部分地区山羊传染性胸膜肺炎血清学调查[J]. 中国兽医科技,2002,32(7):38-39.
[4]王华,杨发龙,王永,等. 山羊支原体性肺炎流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(1):210-214.
[5]胡新岗,黄银云. 1 例引入性波尔杂交羊传染性胸膜肺炎的诊治[J]. 江苏农业科学,2013,41(4):189-190.
[6]廖荣斌,赵洪琴. 正确制作、谨慎使用自家苗[J]. 今日畜牧兽医,2012(1):14-17.