

柳州黑山羊不同首免日龄接种小反刍兽疫弱毒疫苗田间试验

覃 维¹ 韦玉庆² 黄小武^{3*} 韦 钰⁴ 曾庆伦⁴ 贺 春⁵

1.广西柳州市城中区动物疫病预防控制中心,广西柳州 545006;2.广西鹿寨县动物疫病预防控制中心,广西鹿寨 545600;3.广西柳州市动物疫病预防控制中心,广西柳州 545006;4.广西融水县动物疫病预防控制中心,广西融水 545300;5.广西融安县动物疫病预防控制中心,广西融安 545400

摘要 本试验对不同日龄段(30~44日龄、45~54日龄、55~64日龄、65~80日龄)山羊组群接种小反刍兽疫弱毒疫苗,分别于接种疫苗后第28天、第120天和第180天采集血样,分离血清,应用阻断ELISA方法检测血清抗体,以期评估柳州本地黑山羊羔羊不同首免日龄接种小反刍兽疫弱毒疫苗的免疫效果。试验结果显示,以35~44日龄为首免日龄接种疫苗的免疫效果不理想,以45~54日龄、55~64日龄和65~80日龄为首免日龄接种疫苗取得了良好免疫效果,但后者免疫效果更优。建议选择55~64日龄段为柳州当地黑山羊接种小反刍兽疫疫苗的首免日龄。

关键词 小反刍兽疫;首免日龄;免疫试验;黑山羊

小反刍兽疫于2007年首次传入我国西藏阿里地区^[1];2013年11月底再次传入我国并不断蔓延,对养羊业造成巨大经济损失^[2]。接种小反刍兽疫弱毒疫苗是防控该病重要措施之一。羔羊小反刍兽疫疫苗的首免日龄尚无统一标准,各地养殖状况存在明显差异,优化或完善免疫程序是全面深入推进小反刍兽疫防控的重要内容。本试验旨在评估当地黑山羊不同首免日龄接种小反刍兽疫弱毒疫苗的免疫效果,为优化当地小反刍兽疫免疫程序提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)试验疫苗。小反刍兽疫弱毒疫苗,新疆天康畜牧生物技术股份有限公司生产,规格:50头份/瓶,批号:2016044-2,每头份疫苗含有的小反刍兽疫弱毒病毒至少为 1×10^3 TCID₅₀。按瓶签注明头份,

用灭菌生理盐水将疫苗稀释至每毫升含有1头份,充分混合均匀,冷藏保存备用,稀释后的疫苗在3h内用完。

2)诊断试剂。

①羊小反刍兽疫抗体检测试剂盒(酶联免疫法):购自北京勤邦生物技术有限公司,批号为20170802。

②小反刍兽疫病毒实时荧光RT-PCR检测试剂盒:购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司,批号:PPR20161010。

3)仪器。Multiskan FC酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司),荧光PCR仪(CFX96 Touch)(美国BIO-RAD(伯乐)),可调移液器,恒温培养箱。

4)试验动物。选取接种过小反刍兽疫弱毒疫苗的母羊所产后代,且未接种过小反刍兽疫弱毒疫苗、临床检查健康、30~80日龄的柳州本地黑山羊80只。

收稿日期:2020-07-21

* 通讯作者

覃 维,男,1980年生,兽医师。

1.2 试验方法

1)疫苗的接种。试验时间为 2016 年 9 月-2017 年 3 月, 将试验山羊随机分为 A (30~44 日龄)、B (45~54 日龄)、C(55~64 日龄)、D(65~80 日龄)4 个试验组, 每组 20 只, 采集棉拭子样品后每只山羊颈后皮下注射试验疫苗 1 头份, 在未改变原有条件下饲养。

2)样品的采集。

①棉拭子。免疫前, 逐头采集试验组山羊的眼拭子、鼻拭子样品。

②血清。分别于接种疫苗后第 28、120、180 天颈静脉采血, 每份不少于 3 mL/次, 分离血清不少于 1 mL/份, 血清清亮、无溶血、无污染, 于-20 ℃以下保存待检。

3)病原核酸的检测。采用荧光 RT-PCR 方法检测小反刍兽疫病毒核酸, 具体操作参照说明书。结果判定: 阳性对照 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线, 实验室结果成立; 被检样品 Ct 值≤30 并出现扩增曲线为阳性, 30 < Ct < 37 并出现扩增曲线为可疑, 重新抽提检测仍为可疑, 可判阳性; 被检样品 Ct ≥37, 判定为阴性。

4)血清抗体的测定。采用阻断 ELISA 方法检测 PPR 血清抗体, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。以 OD_{450 nm} 吸光值为判定标准。试验正常情况下, 阴性对照吸光值 ≥1.0, 阳性对照吸光值 ≤ 阴性对照吸光值×50%。按照公式计算阻断率(PI): PI(阻

断率)=(1-样本值/阴性对照孔均值)×100%, 根据 PI 进行结果判定: PI ≥50%为阳性; PI <50%为阴性。

5)数据处理。试验数据处理和结果显著性检验均采用 Excel 软件进行。

2 结果与分析

2.1 试验动物病原核酸检测结果

采用荧光 RT-PCR 方法对采集的 80 份拭子样品进行小反刍兽疫病毒核酸检测, 检测结果全部为阴性(表 1)。

2.2 试验动物血清抗体检测结果

1)第 28 天的检测结果。从表 2 可以看出, 山羊在接种小反刍兽疫弱毒疫苗后的第 28 天各试验组均产生了一定水平的免疫抗体, 抗体阳性率平均值为 77.50%, 其中 A 组免疫抗体阳性率最低为 60%, D 组免疫抗体阳性率最高为 100%。

2)第 120 天的检测结果。由表 3 可知, 山羊在接种小反刍兽疫弱毒疫苗后的第 120 天, 抗体阳性率平均值为 85.00%, 其中 A 和 B 组免疫抗体阳性率均为 70%, C 和 D 组免疫抗体阳性率均为 100%, 与 A、B 组结果存在显著差异。

3)第 180 天的检测结果。由表 4 可知, 山羊在接种小反刍兽疫弱毒疫苗后的第 180 天时, 抗体阳性率平均值为 83.75%, 其中 A 组免疫抗体阳性率为 65%, B 组免疫抗体阳性率为 70%, C 和 D 组免疫抗体阳性率均为 100%, 前二者与后二者组间结果存在显著差异(P<0.05)。

表 1 试验动物病原核酸检测结果

场名	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%
A	20	0	0
B	20	0	0
C	20	0	0
D	20	0	0
合计/平均	80	0	0

表 2 试验动物血清抗体检测结果(第 28 天)

场名	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%
A	20	12	60.00
B	20	13	65.00
C	20	17	85.00
D	20	20	100.00
合计/平均	80	62	77.50

表 3 试验动物血清抗体检测结果(第 120 天)

场名	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%
A	20	14	70.00a
B	20	14	70.00a
C	20	20	100.00b
D	20	20	100.00b
合计/平均	80	68	85.00

注:同列标注的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),下同。

表 4 试验动物血清抗体检测结果(第 180 天)

场名	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%
A	20	13	65.00a
B	20	14	70.00a
C	20	20	100.00b
D	20	20	100.00b
合计/平均	80	67	83.75

2.3 免疫抗体阳性率趋势曲线

曲线图显示,A 组免疫抗体阳性率呈先升高后下降的趋势,B 组、C 组和 D 组免疫抗体阳性率上升后能较长时间维持在一定水平(图 1)。

3 讨论

众多学者研究结果^[3-8]表明,我国当前应用的小反刍兽疫疫苗具有良好的免疫原性,可产生良好的临床免疫效果。该项研究旨在优化当地小反刍兽疫免疫程序,有效提高辖区小反刍兽疫免疫质量,防止疫情发生和扩散,保护当地山羊养殖业健康发展。

试验动物血清抗体检测结果显示,A 组免疫抗

体阳性率呈先升高后下降的趋势,免疫后第 180 天时免疫抗体阳性率为 65%、已经低于 70%,A 组与 C 组、D 组免疫后第 28、120 和 180 天时的免疫抗体阳性率均存在显著差异;B 组、C 组和 D 组免疫抗体阳性率上升后能较长时间维持在一定水平,但 B 组与 C 组、D 组免疫后第 28、120 和 180 天时的免疫抗体阳性率均存在显著差异,造成这些结果原因可能与母源抗体有直接关系,母源抗体对疫苗抗原有部分中和作用。研究^[9-12]证实,免疫母羊后代获得一定水平母源抗体。试验动物病原核酸检测结果显示,采集的 80 份试验动物拭子样品均为阴性,表明试验动物没有感染小反刍兽疫病毒,排除了野毒感染对试验结果的干扰。

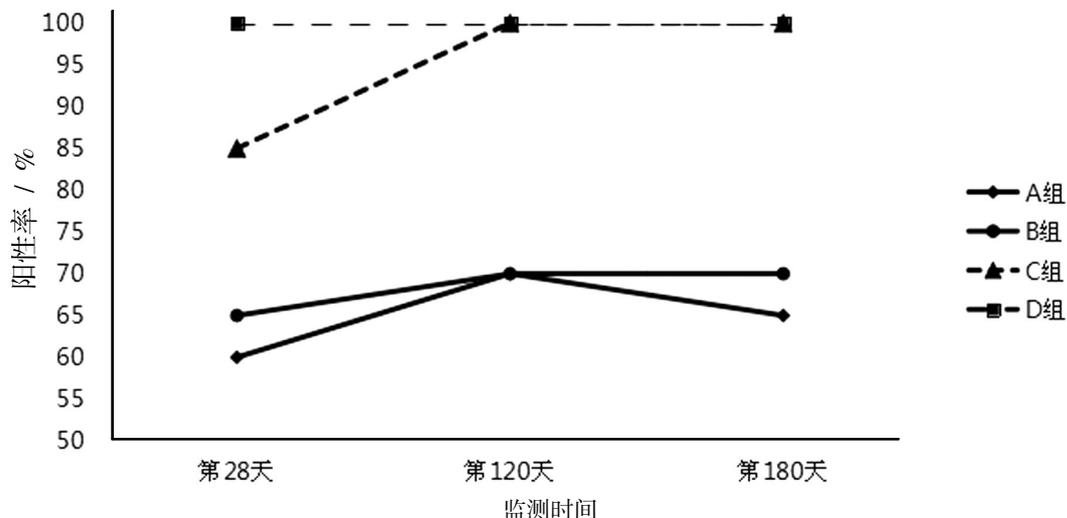


图 1 免疫抗体阳性率趋势曲线

从试验结果看,以 35~44 日龄为首免日龄接种疫苗的免疫效果不理想,以 45~54 日龄、55~64 日龄和 65~80 日龄为首免日龄接种疫苗取得了良好免疫效果。李芳等^[12]研究报道,大部分羔羊 1~2 月龄时母源抗体维持较高水平,2 月龄以后显著下降至 30% 以下。过早接种疫苗易受母源抗体干扰而造成免疫失败,接种疫苗过晚则母源抗体空窗期太长,又会增加 PPRV 侵袭风险。因此,建议选择 55~64 日龄为柳州当地黑山羊接种小反刍兽疫疫苗的首免日龄。

徐雅萍等^[13]研究表明,具有母源抗体的湖羊羔羊的最佳免疫时间为 100 日龄左右,群体保护率高,免疫期长。张子荣等^[9]研究分析,对于经免场 PPR 的最佳免疫时间应选择在断奶后 30 日龄左右,即 60 日龄断奶、90 日龄免疫;90 日龄断奶、120 日龄免疫。免疫抗体受多种因素影响,免疫抗体水平是动态变化过程,各地应当依据实际监测情况来调整或优化当地羔羊首免日龄。该试验样本数量较小,结果存在一定局限性。

4 结 论

建议选择 55~64 日龄段为柳州当地黑山羊接种小反刍兽疫疫苗的首免日龄。我国国土面积辽阔,各地养殖品种、饲养方式和地理条件等存在差异,可以根据实际免疫效果评估来调整或优化当地的羔羊首免日龄,这样可以有效提高免疫质量。养殖场在实施疫苗接种的同时应当高度重视生物安全技术措施的落实,才能最终实现净化和消灭该疫病。

参 考 文 献

- [1] 王志亮,包静月,吴晓东,等.我国首例小反刍兽疫诊断报告[J].中国动物检疫,2007,24(8):24-26.
- [2] 宋建德,袁丽萍,孙洪涛,等.2015-2016 年全球小反刍兽疫流行状况和防控[J].中国兽医杂志,2017,53(12):111-113.
- [3] 印春生,支海兵,王乐元,等.小反刍兽疫活疫苗临床试验研究[J].中国兽药杂志,2010,44(7):1-5.
- [4] 薛青红,印春生,李宁,等.小反刍兽疫活疫苗效力评价[J].中国兽医学报,2011,31(9):1276-1278.
- [5] 何利昆,段亚良,谷志大,等.辽宁省小反刍兽疫疫苗临床免疫效果跟踪试验及抗体水平动态观察[J].现代畜牧兽医,2014(8):14-18.
- [6] 宋跃君,徐玉,张远洲,等.小反刍兽疫疫苗临床免疫效果试验[J].动物医学进展,2016,37(6):77-79.
- [7] 吕嵘,杨耀兰,罗晓燕,等.玉溪市小反刍兽疫疫苗临床免疫效果评估[J].畜牧与兽医,2016,48(6):123-125.
- [8] 游潇倩.小反刍兽疫弱毒疫苗区域免疫试验研究[J].河南农业,2017(10):41-42,44.
- [9] 张子荣,马长宾,崔蕾,等.羔羊小反刍兽疫母源抗体消长规律[J].中国草食动物科学,2014,37(4):43-45.
- [10] 何世成,王昌建,刘文泽,等.小反刍兽疫母源抗体的产生与消长规律[J].中国兽医学报,2017,37(7):1234-1236.
- [11] 郝飞,李文良,毛立,等.不同养殖模式下小反刍兽疫母源抗体消长规律[J].江苏农业科学,2018,46(3):160-162.
- [12] 李芳,黄小武,覃周岚,等.广西柳州市部分山羊规模养殖场小反刍兽疫母源抗体田间检测[J].中国动物检疫,2018,35(10):19-21.
- [13] 徐雅萍,邱寒峰,俞乾挺,等.小反刍兽疫疫苗对不同日龄湖羊的免疫效果研究[J].中国预防兽医学报,2016,38(8):8646-8648.

【责任编辑:胡 敏】