

猪蓝耳病活疫苗中猪瘟外源病毒检测

袁建琴¹ 高斌战² 宋宝敏² 孔艳彪¹ 张卓¹ 周小霞¹

1.山西农业大学生命科学学院,山西太谷 030801; 2.山西省兽用生物制品试验推广中心,
山西太谷 030800

摘要 试验采用 IFA 法对 2 批随机抽样的 PRRS 活疫苗(每批 4 瓶)、阳性对照(CSFV)、阴性对照(未被 CSFV 污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV))和特异性试验检测病毒(猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2 type,PCV-2))接种于生长良好的 PK-15 细胞进行间接免疫荧光染色检测 CSFV,以期建立快速、准确的间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay,IFA)调查猪蓝耳病活疫苗中猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)的污染情况;在不同时间、相同试验条件下,相同批次的疫苗被重复检测了 3 次。试验结果表明:阳性对照接种的 PK-15 细胞出现特异性黄绿色荧光,阴性对照、PCV-2 和待检样品接种的 PK-15 细胞均未出现特异性黄绿色荧光,即待检 2 批 PRRS 活疫苗未被 CSFV 污染;通过 3 次重复操作,最终的检测结果一致,说明 IFA 检测猪瘟病毒包涵体的特异性强、敏感性高。

关键词 猪;蓝耳病;猪瘟病毒;PK-15 细胞;间接免疫荧光法;外源病毒检测

猪蓝耳病,又称猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS),是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)感染引起的^[1-4]。该病是一种接触性传染病,具有发病率和死亡率高以及发病急等特点,同时也能够引起免疫抑制从而引发猪多种其他疾病^[1]。PRRS 能够造成怀孕母猪繁殖方面的障碍,如流产、木乃伊胎、死胎以及弱仔等,病猪出现严重的呼吸困难和呼吸急促^[2,5-10]。为了防控该疾病,目前主要的手段是依赖于疫苗^[11-13]。但在我国猪用疫苗中,外源病毒污染情况经常发生,这将直接影响到疫苗的安全性。间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay,IFA)是先用一抗与待检测的样品反应,用 PBS 洗去未与样品结合的一抗,再用二抗与样品和一抗的复合物反应,再洗去未结合的二抗,然后在荧光倒置显微镜下观察染色结果;在荧光显微镜下,发光的位置表示了待

测物质存在的部位;发光的强度表示了待测物质含量的多少;不同颜色的发光可以表示不同的待测物质^[4]。这种方法价格低廉,操作简单^[15]。PK-15 细胞是猪肾细胞,其细胞系对猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)等一些猪源病毒都特别敏感。CSFV 在疫苗中的污染被认为是 PRRS 疫苗污染的途径之一,去除疫苗毒种中 CSFV 的污染是生产合格疫苗的前提。本试验通过 IFA 检测 PRRS 活疫苗的安全性,有助于对疫苗中污染 CSFV 等外源病毒污染危害的控制。

1 材料与方法

1.1 病毒

未被 CSFV 污染的 PRRSV(已被相应的特异性抗血清中和)、CSFV、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2 type,PCV-2),均由山西隆克尔生物制药有限公司提供。

收稿日期:2020-01-10

基金项目:山西省重点研发计划项目(201903D321108);山西省高等学校教学改革创新项目(J2018079);山西农业大学科技创新基金(2016ZZ09)

袁建琴,女,1970 生,博士,副教授。

1.2 细胞

PK-15 细胞由山西隆克尔生物制药有限公司提供。

1.3 疫苗

试验使用 2 批 PRRS 活疫苗, 批次分别为 201901001、201901002, 由山西隆克尔生物制药有限公司生产。

1.4 主要试剂

MEM 培养液, 购自北京北方同正生物技术发展有限公司; PBS 磷酸缓冲液 (pH 值为 7.2), 购自北京博奥拓达 (Biotopped) 科技有限公司; 新生牛血清, 由济南劲牛生物材料有限公司生产; CSFV 间接免疫荧光染色检测试剂盒, 购自中国兽医药品监察所; 特异性抗血清, 由山西隆克尔生物制药有限公司提供。

1.5 主要仪器

超净工作台 (型号为 BCM-1000A), 由江苏净集团有限公司生产; 二氧化碳培养箱 (型号为 HF90), 购自上海力申科学仪器有限公司; 研究级倒置显微镜 (型号为 OLYMPUS IX73), 购自成贯仪器 (上海) 有限公司; 生物安全柜 (型号为 BSC-1300 II A2), 由苏州安泰空气技术有限公司生产。

1.6 方法

1) PK-15 细胞的传代与培养。准备好传代所需要的所有器材, 打开超净工作台中的紫外灯, 在试验前先照射 30 min; 从二氧化碳培养箱中取出 1 瓶生长良好的 PK-15 细胞培养瓶 (培养面积 75 cm²), 用装有 75% 乙醇的喷壶给手和培养瓶进行消毒; 点燃酒精灯, 倒掉原培养液, 此过程及以下的各个步骤均要在酒精灯附近进行。

用 PBS 液洗涤细胞培养瓶, 洗掉细胞代谢废物, 倒掉 PBS, 重复 2 次; 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶液 (含 EDTA), 沿瓶壁缓缓转动, 使其充分接触长有细胞的细胞培养瓶瓶壁; 将培养瓶放入培养箱中, 消化大约 3 min, 使细胞消化分离开来; 将细胞培养瓶从细胞培养箱中取出来, 然后倒掉胰酶, 加入 MEM 约 10 mL, 用带洗耳球的移液管反复吹打 (约 30 次), 将培养瓶壁上的细胞吹打下来, 并将溶液中的细胞吹打下来; 吹打完毕后, 在培养瓶中留 3 mL 细胞液, 然后用 MEM 加到约 40 mL, 再次吹打细胞和 MEM 的混合液, 使其混匀; 将一部分液体

倒入平板槽内, 用排枪取槽内的混合液, 以每孔 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板内, 将铺好细胞的培养板盖好、封口, 并做好标记; 将含有剩余培养液的细胞培养瓶和铺好的 96 孔细胞培养板放到 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待 3 d 后用于下一步的试验。

2) 接种。将随机选择的 8 瓶 (每批次 4 瓶, 2 个批次共 8 瓶样苗) 待检测的 PRRS 疫苗从冰箱中取出, 解冻、复苏, 在灭菌后的生物安全柜内用含 3% 新生牛血清的 MEM 培养液在 EP 管内进行适当稀释, 然后在小型振荡器上震荡混匀。每个 EP 管用相应的特异性抗血清中和。

将稀释后待检测的样品加入已长成良好单层的 PK-15 细胞的 96 孔细胞培养板 (接毒前在倒置显微镜下先拍照并保存) 对应的孔内, 每瓶疫苗设置 4 个复孔, 每孔 100 μ L 液体; 同时设置阳性对照 (CSFV) 和阴性对照 (未被 CSFV 污染的 PRRSV)。注意与 96 孔细胞培养板上先前标志的序号相对应, 之后封口。将接种后的 PK-15 细胞培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养, 培养 3 d 后用于免疫荧光检测。

3) 免疫检测。使用 CSFV 间接免疫荧光染色检测试剂盒时, 先要检查内容物组分、保质期, 用记号笔在盒子上标记开启时间等信息; 将试剂盒中的 PBS 以 1:10 的工作浓度进行稀释; 取 CSFV 间接免疫荧光染色检测试剂盒中的一抗 (CSFV 特异性抗体) 于 EP 管中, 用 PBS 以 1:300 的工作浓度进行稀释; 取 CSFV 间接免疫荧光染色检测试剂盒中的二抗 (FITC 标记的兔抗猪 IgG) 于 EP 管中, 用 PBS 以 1:500 的工作浓度进行稀释; 将稀释后的一抗和二抗在振荡器上充分搅拌均匀, 避免反复冻融, 4 $^{\circ}$ C 保存, 尽快使用, 二抗应在避光条件下使用。

取单层的待检细胞, 阴性对照和阳性对照在倒置显微镜下拍照并保存, 后甩掉 96 孔细胞培养板维持液, 用 PBS 洗涤 2 次 (每次洗涤时, 每孔加入 200 μ L PBS, 室温条件下孵育 5 min, 要严格控制孵育的时间, 不可随便增加或减少, 然后弃去 PBS); 固定, 每孔加入 100 μ L 80% 冷丙酮溶液, 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min, 然后弃去丙酮, 自然晾干; 加一抗, 用 PBS 洗涤细胞面 1 次, 然后每孔加入用 PBS 适当稀释后的 CSFV 特异性抗体 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 1 h; 洗

涤,甩掉里面的液体,每孔加入 200 μL PBS。室温下孵育 5 min,弃去 PBS,洗涤细胞面 2 次;加二抗,每孔加入 50 μL 用 PBS 稀释后的 FITC 标记的兔抗猪 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒作用 1 h;洗涤,甩掉里面的液体,每孔加入 200 μL PBS。室温下孵育 5 min,甩掉 PBS,洗涤 2 次;观察,在倒置显微镜下用蓝色激发光(波长 490 nm)观察;采集照片,并进行分析。

4)特异性试验检测。将 PCV-2 稀释,加入到相应的 96 孔细胞培养板内,培养 3 d 后进行 IFA 检测。

5)重复性试验。为了验证此检测方法的稳定性和重复性,保证结果的可靠性,再次培养 PK-15 细胞,进行 1.6 方法中 1)、2)、3)、4)所述的相关操作与检测。在不同时间(分别在 3 周内进行试验)、相同试验条件下共重复 3 次,所用的一抗和二抗是相同批次。

2 结果与分析

2.1 接毒前 PK-15 细胞的形态观察

PK-15 细胞铺板培养 3 d 后,在倒置显微镜下观察细胞的形态(图 1)。由图 1 可见,细胞生长良好,细胞大小基本均一,形成致密单层,呈现较好的贴壁生长状态,可用于下一步试验。

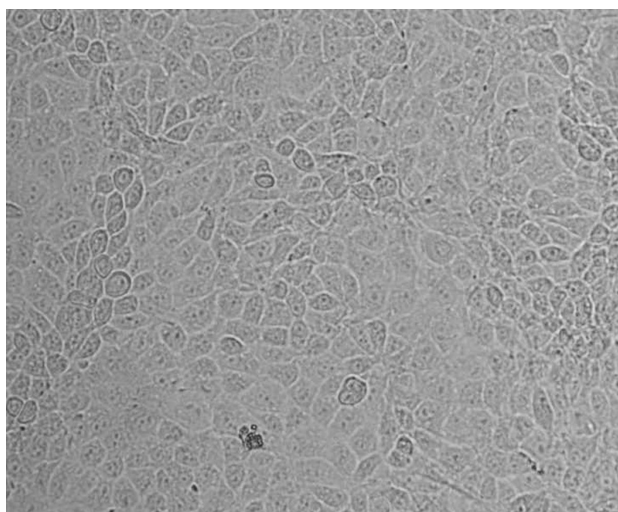


图 1 正常的 PK-15 细胞(40 \times)

2.2 接种病毒后荧光染色前观察

接种病毒 3 d 后,在荧光染色之前用在倒置显微镜下观察细胞的形态,接种用抗血清中和后的确定未被 CSFV 污染的 PRRSV 的阴性对照组 PK-15 细胞呈现出如图 2 所示的形态。接种 CSFV 的阳性

对照组 PK-15 细胞呈现出如图 3 所示的形态。从图中可以看出,阳性对照和阴性对照的细胞形态都没有发生明显变化,说明 CSFV 不会使 PK-15 细胞产生明显的病变。

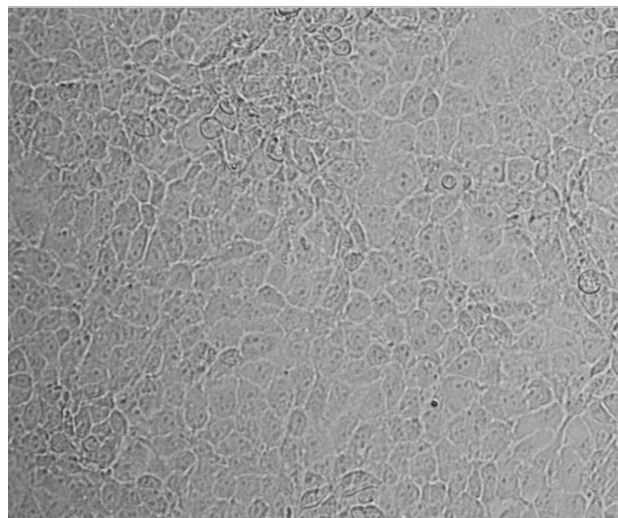


图 2 荧光染色前的阴性对照(40 \times)

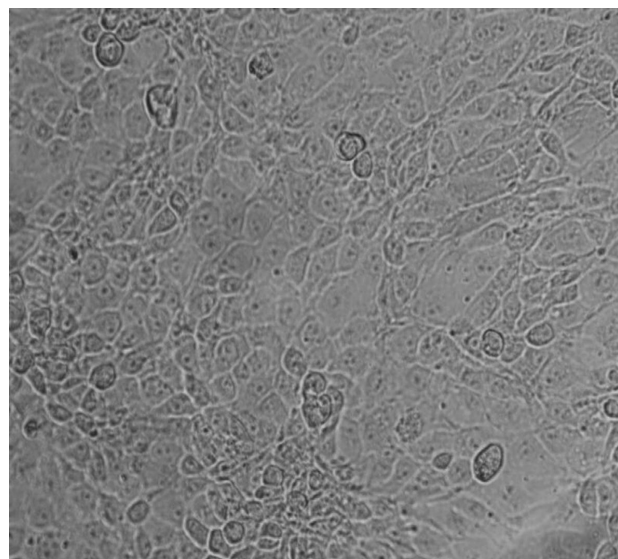


图 3 荧光染色前的阳性对照(40 \times)

2.3 荧光染色后倒置显微镜下观察

在形态学观察后进行荧光染色,在倒置荧光显微镜下观察,根据视野下观察到的黄绿色荧光的有无进行判定。在倒置荧光显微镜下,阳性对照的细胞孔内观察到明显的黄绿色荧光(图 4),阴性对照的细胞孔内没有观察到黄绿色荧光(图 5),说明试验成功。待检样品的细胞孔内均未出现特异性黄绿色荧光(图 5),则 2 批 PRRS 疫苗都判为 CSFV 样品检测阴性。

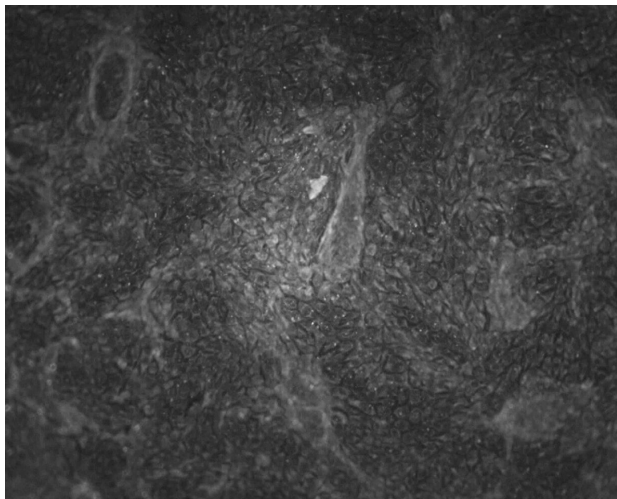


图 4 荧光染色后的阳性对照(20×)

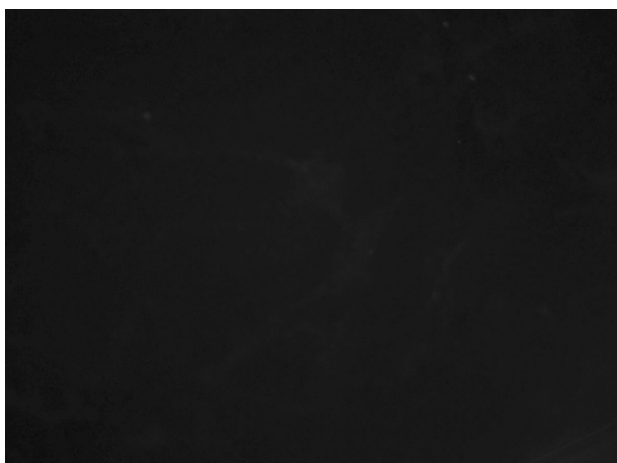


图 5 荧光染色后的阴性对照(20×)

2.4 特异性试验

PCV-2 接种的 PK-15 细胞均未出现特异性黄绿色荧光(图 5),判为阴性,说明试剂盒特异性强,仅用于 CSFV 的检测。

2.5 重复性试验

通过 3 次重复的操作,最终的检测结果一致(见图 1~图 5),说明本试验方法可重复、稳定和可靠。

3 讨 论

疫苗污染是许多疾病在猪群中传播的重要途径之一,养猪场通过使用污染了的活疫苗可能使阴性猪变为阳性猪,会给养猪场带来严重的经济损失,所以保证使用疫苗的安全性极其重要。运用免疫荧光技术检测病毒抗原已经有 20 多年^[16],本试验运用 IFA 检测 CSFV,与实验室其他检测方法相比,具有灵敏度高、直观、经济、特异、快速、简单和可重

复等优点,是对 CSFV 进行检测的良好方法^[14]。而且,此方法在一般的实验室均可进行,在荧光倒置显微镜下观察检测结果,更容易对结果进行判读,因而被广泛应用^[14-15]。通常,用 IFA 来检测病毒抗原涉及很多影响因素,如抗体浓度、不同来源的血清、孵育时间、孵育温度和固定剂的选择等^[17],都可能会导致不同的试验结果。在本研究中,PRRSV 对温度和酸碱度都很敏感,很容易受到它们的影响^[17]。因此在试验时,必须设置严格的阳性对照、阴性对照以及特异性试验,并在适宜的试验条件下进行,从而保证试验结果的准确、可靠和特异性。

一般来说,试验的成功与原材料的选择密不可分。PK-15 细胞对 CSFV、PRRSV、PCV-2 都很敏感,是用来检测和培养猪源性病毒的良好材料。在本研究中,培养的 PK-15 细胞生长状态良好,细胞边缘清晰干净,胞体透明(图 1),为试验的成功打下了良好的基础。

在形态学观察时,研究发现阳性对照和阴性对照的 PK-15 细胞形态没有发生明显变化,说明 CSFV 不会使 PK-15 细胞产生明显的病变(如图 2 和图 3 所示)。形态学观察和 IFA 比较,形态学观察灵敏度低,在病毒含量很少时,不易于观察,所以本研究采用 IFA 来进一步检测 CSFV。

此外,IFA 检测细胞是胞浆着色,而核不着色。在免疫检测过程中,如果有 CSFV 抗原存在,就会和相应的一抗、被标记的二抗形成三者的复合物,细胞孔就会出现特异性胞浆内黄绿色荧光。本研究中,阳性对照孔细胞出现黄绿色荧光(图 4),阴性对照孔细胞和接种待检疫苗的细胞孔均未出现特异性胞浆内黄绿色荧光,则都判为阴性(图 5),说明被检测 PRRS 疫苗均未被 CSFV 污染。

本研究建立重复性试验的目的是为了保证试验结果的准确性和可靠性。一个具有说服力的检测方法一定具有可重复性,在不同的时间、不同的地点、相同的试验条件下都可以进行,最终得出相同的结果。本研究中,通过 3 次重复的操作,在不同时间(分别在 3 周内进行试验)、相同试验条件下最终的检测结果一致,说明本检测方法可重复、稳定和可靠。综上所述,本研究建立的 IFA 检测 PRRS 活疫苗中 CSFV 的方法获得了理想结果,阳性对照和阴性对照对比明显,所有待检 2 批 PRRS 活疫苗均没有被 CSFV 污染。

参 考 文 献

- [1] 索朗扎西,许思遥,龚双燕,等.猪高致病性蓝耳病毒与猪圆环病毒混合感染的诊治[J]. 猪业科学, 2016,33(9):76-78.
- [2] 曹百荣.五种猪临床常见病病原体危害及其检测方法研究[J].饲料博览, 2018(3): 49.
- [3] 季程远,覃一峰,黄培超,等.一起猪蓝耳病继发感染传染性胸膜肺炎的诊断与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(12):131-133.
- [4] 王晓坤.猪蓝耳病的流行病学、临床症状及其防控[J].现代畜牧科技,2019,52(4):108-109.
- [5] JEONG J,CHOI K,KANG I,et al.Evaluation of a 20 year old porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)modified live vaccine(Ingelvac® PRRS MLV)against two recent type 2 PRRS virus isolates in South Korea [J].Vet Microbiol,2016 (192):102-109.
- [6] 秦凯,韩洪岩,汤秋萍.猪蓝耳病的防治[J].中国畜禽种业,2018 (11): 85-86.
- [7] 崔金琢. 猪蓝耳病的危害及其综合防控策略 [J]. 畜禽业, 2019,361(6):81.
- [8] 陈小玲,李俊漫.猪蓝耳病的危害及其综合防控策略研究[J].农业与技术,2018,38(16):103.
- [9] 彭彩丽,廖飞,杨胜红,等.猪瘟与猪蓝耳病混合感染的荧光定量 RT-PCR 诊断[J].贵州畜牧兽医,2018,42(6):35-36.
- [10] 周怡,杨美,王柏林,等.猪瘟、猪蓝耳病双重 RT-PCR 检测方法的建与应用[J].黑龙江畜牧兽医,2019(10):81-84.
- [11] 逯海峰.一例育肥猪发生猪蓝耳病的诊治分析[J].畜牧兽医杂志,2019,38(5):94-95.
- [12] 熊忠良,温文生,史小娜,等.养猪场 5 种常见疫苗不同组合的免疫效果研究[J].安徽农业科学,2018,46(33):61-64,70.
- [13] 汤建立,赵善廷.猪繁殖与呼吸综合征及其疫苗的研究现状和防控措施[J].猪业科学,2019,36(6):92-96.
- [14] 宁蓬勃,任敏,梁武龙,等.猪瘟病毒间接免疫荧光检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2013(8): 97-99.
- [15] 马晓莉,舒会友,郑恩琴,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2019 (19):78-81,85,181.
- [16] 程安春,韩晓英,汪铭书,等.用间接免疫荧光染色法检测鸭病毒性肠炎病毒在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律[J].畜牧兽医学报,2007,38(9):942-946.
- [17] 高琦,王琦,倪宏波.猪蓝耳病病毒、圆环病毒和沙门氏菌混合感染的试验室诊断[J]. 现代畜牧兽医,2016(2):36-40.

【责任编辑:胡 敏】

猪饮水不足损失大

首先,饮水不足会导致猪的肠道发病率增高。农村广大农户家庭养猪,多数采用传统的水料一次性供给的饲喂方式,往往不管天气条件、不分饲料种类,均不给饮水。猪由于饮水不足口渴后,特别是炎热的夏季常出现喝脏水等现象,这种现象直接导致猪患多种肠道疾病。据统计,肠道疾病是近几年来猪的多发性疾病,一般占猪发病总数的 76%左右,而在这些肠道疾病中,有不少就是由于猪缺水喝脏水引起的。

其次,饮水不足会导致猪消化率降低,饲养成本提高。目前,农村大多采用圈养猪的饲养方式,每天只饲喂 2~3 次水混料,水分供应极为不足。特别是育肥猪,饲养户对育肥猪每天补饲大量的热能饲料,而这些热能饲料需要吸收大量的水分后才能被猪体消化吸收、输送。饲养户每天只饲喂 2~3 次后就猪圈在狭小圈舍内,使猪形成肠燥热,肠蠕动减缓,营养吸收不全,日食量逐渐减少,消化率降低,生长发育受阻等。经有关部门对 20 户养猪户饲养的 100 头猪的抽样调查表明,在饲喂 1 h 后,口渴急需饮水的猪就有 98 头,占抽查总数的 98%。同时,又以肥壮,喂精料、杂糠、米糠的猪口渴程度深,饮水量较大。

来源:农业科技报