

猪流感 H1 亚型和猪链球菌 2 型 临床分离血清的抗体检测

吴超 夏细枝 康超 杨影 魏燕鸣 金梅林*

华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 以各省份未免疫猪链球菌病疫苗和猪流感疫苗猪场的临床发病猪分离的 4 661 份猪血清作为检测对象,使用猪流感病毒(H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒和猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒分别检测猪流感病毒(H1N1)和猪链球菌 2 型(SS2)的抗体,将检测结果从时间、空间进行分析,以探究猪流感与猪链球菌感染的基本规律,从而为疾病的防治提供借鉴和指导。检测结果表明,初春 4 月左右是猪流感流行的季节,猪流感 H1N1 抗体平均阳性率为 45.19%;猪链球菌一般在 7-11 月流行,猪链球菌 2 型(SS2)抗体平均阳性率为 54.85%,双阳性的血清检出率在 10-12 月最高,双阳性的血清检出率最高的是湖南省。

关键词 猪流感 H1N1;猪链球菌 2 型;酶联免疫吸附试验;相关性

猪流感病是由猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV)引起的猪的一种急性、热性和高度接触性呼吸道传染病^[1]。其临床症状是突发高热、咳嗽、呼吸困难、甚至呼吸衰竭,还可感染相关人员并致其死亡^[2-3],在全世界多次暴发大流行,不仅给养猪业造成重大损失,也对人类公共卫生安全构成重大威胁^[4-5]。猪链球菌 (*Streptococcus suis*, *S.suis*)是一种重要的人畜共患传染病病原^[6-8],其中最常见也是毒力最强的血清型是猪链球菌 2 型^[9-10]。猪链球菌 2 型可引起猪的败血症、关节炎、脑膜脑炎、心内膜炎、肺炎^[11-12]。我国分别于 1998 年、2005 年暴发了 2 次大规模的人感染猪链球菌公共卫生事件,造成多名从业人员感染甚至死亡^[13-14]。

为了分析猪流感 H1 亚型和猪链球菌 2 型的流行规律,笔者将大量临床发病猪分离的猪血清作为检测对象,使用猪流感病毒(H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒和猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒分别检测猪流感病毒(H1N1)和猪链球菌 2 型(SS2)的抗体,将检测结果从时间、空间进行分析,以探究猪流感与猪链球菌感染的基本规律,从而为疾病的防治提供借鉴和指导。

1 材料与方法

1)血清和试剂盒。分离来自河南、湖北、广东、安徽、江西、湖南、浙江、河北等地猪场的临床发病猪全血,共分离血清 4 661 份,-70 °C 冰箱冷冻保存。猪流感病毒(H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒、猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒均购自武汉科前生物股份有限公司。

2)待检血清的抗体检测。使用猪流感病毒(H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒对 4 661 份血清中随机选取的 2 808 份进行猪流感(H1 亚型)抗体检测,分别按时间和地域进行统计分析;使用猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒对 4 661 份血清中随机选取的 4 121 份进行猪链球菌 2 型(SS2)抗体检测,分别按时间和地域进行统计分析;选取 2 268 份血清,对每一份血清同时进行猪流感 H1N1 和猪链球菌 2 型抗体检测,分别从时间和地域对检测结果进行分析。

猪流感病毒 (H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒检测猪血清抗体按试剂盒说明书操作,具体步骤为:使用血清稀释液对待检猪血清按 1 : 40 的比例进行稀释,将稀释好的血清取 100 μL 加入到抗原

收稿日期:2017-10-30

* 通讯作者

吴超,男,1986 年生,硕士。

包被板孔中,同时设 2 孔阴性对照,2 孔阳性对照及 1 孔空白对照,轻轻振荡孔中样品,置 37 °C 下孵育 30 min。甩掉反应孔中的溶液,每孔用 200 μL 洗涤液洗涤 5 次,每次静置 3 min 后倒掉洗涤液,并拍干。每个反应孔加羊抗猪酶标二抗 100 μL,置 37 °C 下孵育 30 min 后洗涤 5 次。每个反应孔加底物液 A 和底物液 B 各 1 滴,混匀,室温避光显色 10 min 后,加终止液 1 滴,混匀后 15 min 内测定结果。结果判定:以空白对照孔调零,在酶标仪上测各孔 OD_{630nm} 值。试验成立的条件是 2 个阳性对照孔的 OD_{630nm} 值相差应 < 0.3,阳性对照孔 OD_{630nm} 值均应 ≥ 0.8,且 < 2.5; 阴性对照孔 OD_{630nm} 值均应 < 0.2。如果 $S \geq P \times 0.25$,判为阳性;如果 $S < P \times 0.25$,判为阴性(S:样品测定孔 OD_{630nm} 值;P:阳性对照孔平均 OD_{630nm} 值)。

猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒检测猪血清抗体按试剂盒说明书操作,具体步骤为:使用血清稀释液对待检猪血清按 1 : 40 的比例进行稀释,将稀释好的血清取 100 μL 加入到抗原包被板孔中,同时设 2 孔阴性对照,2 孔阳性对照及 1 孔空白对照,轻轻振荡孔中样品,置 37 °C 下孵育 30 min。甩掉反应孔中的溶液,每孔用 200 μL 洗涤液洗涤 5 次,每次静置 3 min 后倒掉洗涤液,并拍干。每个反应孔加羊抗猪酶标二抗 100 μL,置 37 °C 下孵育 30 min 后洗涤 5 次。每个反应孔加底物液 A 和底物液 B 各 1 滴,混匀,室温避光显色 10 min 后,加终止液 1 滴,混匀后 10 min 内测定结果。结果判定:在酶标仪上测定各孔 OD_{630nm} 值试验成立的条件是,阳性对照孔 OD_{630nm} 值均应 ≥ 0.8,且 < 2.0; 阴性对照孔 OD_{630nm} 值均应 < 0.3。如果样品 OD_{630nm} 值 ≥ 0.35,判为阳性;如果样品 OD_{630nm} 值 < 0.35,则判为阴性。

2 结果与分析

2.1 猪流感(H1 亚型)抗体检测

使用猪流感病毒(H1 亚型)ELISA 抗体检测试剂盒对 4 661 份血清中随机选取的 2 808 份进行猪流感(H1 亚型)抗体检测,分别按时间和地域进行统计分析,具体分析结果如下。

1)从时间分析猪流感(H1N1)抗体检测结果。检测结果按 12 个月进行统计分析比较。如表 1 所示,全年猪流感抗体的平均阳性率为 45.19%,其中春夏交际 4 月及初冬(10、11、12 月)的阳性率偏高。

2)从区间分析猪流感(H1N1)抗体检测结果。地

域上按 8 个省份进行统计分析比较(表 2),结果表明,8 个地区平均阳性率为 45.19%,湖北、安徽、江西及湖南省高于抗体平均阳性率(45.19%)。

表 1 不同月份猪流感(H1N1)抗体检测结果统计表

月份	血清样	阳性	阳性率 /%
1	91	51	56.04
2	265	144	54.24
3	132	48	36.36
4	126	90	71.43
5	328	123	37.50
6	168	46	27.38
7	488	118	24.18
8	49	13	26.53
9	468	210	44.87
10	254	150	59.06
11	218	139	63.76
12	221	137	61.99
合计	2 808	1 269	45.19

表 2 不同省份猪流感(H1N1)抗体检测结果统计表

地区	血清样	阳性	阳性率 /%
河南	296	69	23.31
湖北	1 239	714	57.63
广东	270	90	33.33
安徽	91	43	47.25
江西	227	146	64.32
湖南	235	129	58.89
浙江	150	28	18.67
河北	300	50	16.67
合计	2 808	1 269	45.19

2.2 猪链球菌 2 型(SS2)ELISA 抗体检测

用猪链球菌 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒对 4 661 份血清中随机选取的 4 121 份进行猪链球菌 2 型(SS2)抗体检测,分别按时间和地域进行分析,结果如下。

1)从时间角度分析检测结果。检测结果从时间上进行统计分析比较(表 3),全年检测平均阳性率为 54.60%,全年中 10 月份阳性率最高,为 72.92%。

2)从区间分析检测结果。检测结果按 8 个省份进行统计分析比较。从检测结果看(表 4),8 个地区平均阳性率为 54.60%,河南、湖北、安徽、江西及湖南省抗体阳性率较高。

2.3 猪流感 H1 亚型与猪链球菌 2 型共感染抗体阳性率分析

选取 2 268 份猪血清,对每一份血清同时进行猪流感 H1N1 和猪链球菌 2 型抗体检测,分别从时间和

表 3 不同月份猪链球菌 2 型(SS2)抗体检测结果统计表

月份	血清样 / 份	阳性 / 份	阳性率 / %
1	174	77	44.25
2	303	152	50.17
3	425	112	26.35
4	525	196	37.33
5	379	188	49.60
6	308	175	56.82
7	1 270	864	68.03
8	116	79	68.10
9	171	121	70.67
10	48	35	72.92
11	193	136	70.47
12	209	115	55.02
合计	4 121	2 250	54.60

表 4 不同地区猪链球菌 2 型(SS2)抗体检测结果统计表

不同省份	血清样	阳性	阳性率 / %
河南省	589	297	50.42
湖北省	2 597	1 534	59.07
广东省	66	23	34.85
安徽省	170	89	52.35
江西省	225	113	50.22
湖南省	358	176	49.16
浙江省	42	8	19.05
河北省	74	10	13.51
合计	4 121	2 250	54.60

地域对检测结果进行分析,结果如下。

1)从时间上分析。对检测的 2 268 份血清从时间上进行分析,H1N1 和 SS2 均为阳性的血清检出率在 10-12 月份最高,其中 11 月份阳性率最高,为 62.69%(表 5)。

表 5 按时间统计同背景血清的猪流感(H1N1)与猪链球菌(SS2)抗体检测结果

月份	样品	H1N1 阳性数	H1N1 阳性率 / %	SS2 阳性数	SS2 阳性率 / %	双阴 / 份	双阴率 / %	双阳 / 份	双阳率 / %
1	91	12	13.19	2	2.20	38	41.76	39	42.86
2	265	57	21.51	3	1.13	118	44.53	87	32.83
3	132	9	6.82	3	2.27	81	61.36	39	29.55
4	126	26	20.63	4	3.17	32	25.40	64	50.79
5	328	8	2.44	41	12.50	164	50.00	115	35.06
6	168	1	0.60	35	20.83	87	51.79	45	26.79
7	488	8	1.64	191	39.14	179	36.68	110	22.54
8	49	2	4.08	27	55.10	9	18.37	11	22.45
9	171	3	1.75	54	31.58	47	27.49	67	39.18
10	48	2	4.17	5	10.42	11	22.92	30	62.50
11	193	18	9.33	15	7.77	35	20.21	121	62.69
12	209	18	8.61	4	1.91	76	36.36	111	53.11
合计	2 268	168	-	384	-	877	-	839	-
平均	-	-	7.23	-	16.93	-	38.67	-	36.84

2)从地域上进行分析。从地域上分析,H1N1 和 SS2 均为阳性的地区中,阳性率最高的为湖南,阳性率为 50.64%,阳性率最低的地区为河北,阳性率为 2.7%。

3 讨论

对未经疫苗免疫的发病猪的血清进行抗体检测,是判定猪发病的有效方法。猪链球菌病和猪流感都是我国广泛流行的重要猪场传染病,对我国养猪业发展有着重要影响^[15-16],本研究对猪链球菌 2 型抗体和猪流感抗体进行研究,从时间、空间上研究流行规律,从而为防控猪链球菌和猪流感提供帮助。同时猪流感的流行特点是致病性较高,致死率较低,但感染猪流感会极大降低猪体免疫力,进而增加猪体对细菌病的继发感染^[17-18]。猪链球菌是一种重要的条件性致病菌^[19],在机体免疫力低下或极端环境情况下,容易激发猪链球菌的致病性,造成宿主感染。因此,对猪链球菌 2 型抗体和猪流感抗体进行共同检测,也会对猪链球菌和猪流感的联合防控提供借鉴和指导。本研究以不同月份和不同省份分离血清进行抗体检测,探究猪链球菌和猪流感感染和混合感染的流行季节和流行地域,为疾病的疫苗防控时间和重点防控地域提供指导。

4 结论

1)对猪流感抗体检测结果表明,在初春 4 月和初冬(10、11、12 月)是猪流感流行的季节,猪流感 H1N1 抗体平均阳性率为 45.19%,湖北、安徽、江西及湖南省高于抗体平均阳性率。鉴于全年较高的抗

表 6 按区间统计同背景血清猪流感(H1N1)与猪链球菌(SS2)的抗体检测结果

地区	样品	H1N1 阳性数	H1N1 阳性率 /%	SS2 阳性数	SS2 阳性率 /%	双阴 / 份	双阴率 /%	双阳 / 份	双阳率 /%	样品
河南	296	3	1.01	55	18.58	172	58.11	66	22.30	296
安徽	91	6	6.59	16	17.58	32	35.16	37	40.66	91
湖北	1 239	140	11.30	210	16.95	319	25.75	570	46.00	1 239
江西	225	0	0.00	77	34.22	118	52.44	30	13.33	225
湖南	235	10	4.26	2	0.85	104	44.26	119	50.64	235
广东	66	1	1.52	10	15.15	42	63.64	13	19.70	66
浙江	42	3	7.14	6	14.29	31	73.81	2	4.76	42
河北	74	1	1.35	8	10.81	63	85.14	2	2.70	74
合计	2 268	164	-	384	-	881	-	839	-	2 268
平均	-	-	7.23	-	16.93	-	38.84	-	36.99	-

体阳性率,建议全年进行疫苗免疫,并在 4 月和初冬(10、11、12 月)猪流感流行之前进行疫苗免疫监测,使接种猪群产生免疫保护力,湖北、安徽、江西及湖南省等省份应加强对猪流感的重视程度。

2)猪链球菌一般在 7-11 月流行,猪链球菌 2 型抗体的平均阳性率为 54.85%,河南、湖北、安徽、江西及湖南省抗体阳性率较高。鉴于全年较高的抗体阳性率,建议全年进行疫苗免疫,并在 7 月猪链球菌流行之前进行疫苗免疫监测,使接种猪群产生免疫保护力,河南、湖北、安徽、江西及湖南等省份应加强对猪链球菌病的重视程度。

3)H1N1 和 SS2 均为阳性的血清检出率在 10-12 月最高,其中 11 月阳性率最高为 62.69%;均为阳性的血清检出率最高的为湖南,阳性率为 50.64%。双阳性抗体的高检出率显示猪流感和猪链球菌混合感染非常严重,建议加强对猪流感和猪链球菌的协同防控。

参 考 文 献

[1] 李天芝,于新友,王金良,等.我国猪流感的流行现状及分子生物学诊断方法研究进展[J].养猪,2017(1):125-128.
 [2] GRAY G C,MCCARTHY T,CAPUANO A W,et al.Swine workers and swine influenza virus infections [J].Emerging Infectious Diseases,2007,13(12):1871.
 [3] MYERS K P,OLSEN C W,SETTERQUIST S F,et al.Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus?[J].Clinical Infectious Diseases An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America,2006,42(1):14.
 [4] PAN A H O,ORGANIZATION W H.Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1)virus infection-Mexico,March-April 2009[J].Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report,2009,58(17):467.
 [5] ZU R,DONG L,QI X,et al.Virological and serological study of

human infection with swine influenza A H1N1 virus in China [J].Virology,2013,446(1-2):49-55.
 [6] VECHT U,VAN LEENGOED L A,VERHEIJEN E R.Streptococcus suis infections in pigs in the Netherlands(Part I)[J].Veterinary Quarterly,1985,7(4):315.
 [7] ARENDS J P,ZANEN H C.Meningitis caused by Streptococcus suis in humans[J].Reviews of Infectious Diseases,1988,10(1):131.
 [8] CLIFTON-HADLEY F A. Streptococcus suis type 2 infections [J].British Veterinary Journal,1983,139(1):1.
 [9] ZHU W,WU C,SUN X,et al.Characterization of Streptococcus suis, serotype 2 isolates from China [J].Veterinary Microbiology,2013,166(3/4):527.
 [10] TANG Y,ZHAO H,WU W,et al.Genetic and virulence characterization of Streptococcus suis type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan,China [J].Folia Microbiologica,2011,56(6):541.
 [11] 张安定,金梅林,陈焕春.猪链球菌 2 型研究进展(综述)[J].养殖与饲料,2005(10):13-18.
 [12] FENG P,TAN M Z,CHEN Z H,et al.Clinical features and outcome of infection of type 2 Streptococcus suis in human[J].Medical science edition,2007,38(5):874.
 [13] YU H,JING H,CHEN Z,et al.Human Streptococcus suis outbreak,Sichuan,China [J].Emerging Infectious Diseases,2006,12(6):914.
 [14] 姚火春,陈国强,陆承平.猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定 [J].南京农业大学学报,1999,22(2):67-70.
 [15] ZHU X P,ZU R Q,CHEN Z H,et al.Anlysis on features of dead cases with human Streptococcus suis infections[J].Chinese Journal of Epidemiology,2005,26(26):633-635.
 [16] YE C,ZHENG H,ZHANG J,et al.Clinical,experimental,and genomic differences between intermediately pathogenic,highly pathogenic,and epidemic Streptococcus suis [J].Journal of Infectious Diseases,2009,199(1):97-107.
 [17] GILL J R,SHENG Z M,ELY S F,et al.Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections [J].Archives of Pathology & Laboratory Medicine,2010,134(2):235-243.