

常州地区猪传染性胃肠炎和呼吸道冠状病毒病血清学调查

罗坚强 柴文娴 王 姣 奚德华

常州市动物疫病预防控制中心, 江苏常州 213002

摘要 为了解本地区猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和呼吸道冠状病毒(PRCV)感染情况,采集生猪规模养殖场、散养户和不同来源的(本地和省外)屠宰场血清样品共 308 份,用 TGEV 和 PRCV 抗体鉴别诊断 ELISA 试剂盒进行检测。检测结果显示,TGEV 抗体阳性率为 2.92%, 阳性样品都来自一个规模猪场, 并与疫苗免疫有关; PRCV 抗体总阳性率为 27.92%, 其中规模场阳性率 11.93%, 散养户阳性率 35.96%, 本地来源的屠宰场样品阳性率 28%, 省外来源的屠宰场样品阳性率 45%。

关键词 猪传染性胃肠炎病毒;猪呼吸道冠状病毒;抗体;酶联免疫吸附试验;阳性率

传染性胃肠炎(TGE)是一种高度传染性病毒性肠道疾病,其特征为引起 2 周龄以下仔猪呕吐、严重腹泻和高死亡率(通常 100%)。20 世纪 80 年代,能感染呼吸系统的 TGE 病毒基因缺失变异株,即猪呼吸道冠状病毒(PRCV)出现并广泛流行,由于两者存在共同的抗原位点,PRCV 改变了 TGEV 临床传播和发病状况。TGEV 和 PRCV 对各年龄段的猪都易感,但 TGEV 对超过 5 周龄的猪群死亡率很低,而 PRCV 一般呈亚临床感染。

由于 TGEV 和 PRCV 存在抗体交叉反应,猪体内的 PRCV 的感染抗体可中和 TGEV 病毒,同时也干扰了用血清学方法诊断和鉴别 TGEV 和 PRCV 感染^[1]。对于 TGEV 和 PRCV 阴性的猪场,一旦发生 TGEV,就会造成很大的损失;而对于 PRCV 阳性的猪场,则可能形成各年龄段猪 TGEV 温和型发病,掩盖了 TGEV 的感染^[2]。本调查使用 TGEV 和 PRCV 抗体鉴别试剂盒,试图了解本地区生猪 TGEV 和 PRCV 感染情况。

1 试验材料

1)样品:采自养殖场、屠宰场猪血清共 308 份,其中规模养猪场(存栏≥500 头)109 份,散养户(存栏<500 头)89 份,养殖场采样群生猪日龄在 60 ~

90 d 之间。屠宰场样品来自本市 3 个屠宰场的 10 批待宰猪,其中来源地为本市养殖场的 50 份,来源地为外省养殖场的 60 份。

2)试剂:INGENASA TGEV 和 PRCV 抗体鉴别 ELISA 试剂盒,购自某公司,批号:280113。

3)仪器设备:Bio680 酶标仪,Eppendorf 移液器一套,Tecan 洗板机等。

2 试验方法

对所有样品用 ELISA 方法检测 TGEV 和 PRCV 抗体。

2.1 操作过程

所有试剂和待检血清检测前恢复到室温(18 ~ 25 °C);25 倍稀释洗涤液;每孔加样品稀释液 50 μL;A1、A2 孔加 PRCV 阳性对照血清 50 μL,B1、B2 孔加 TGEV 阳性对照血清 50 μL,C1、C2、D1、D2 孔加阴性对照血清 50 μL;待检样品每个样加并排两个孔,如第 1 个样为 E1、E2,第 2 个样为 F1、F2,依此类推;封板,37 °C 孵育 1 h;洗板 3 次;将酶结合物 A 加到板上的奇数排,酶结合物 B 加到板上的偶数排;37 °C 孵育 30 min;洗板 6 次;每孔加入 100 μL 底物,暗室室温放置 10 min;每孔加入 100 μL 终止液,5 min 内酶标仪 450 nm 波

长读数。

2.2 试验有效性判断

本试剂盒要求符合以下条件:TGEV 阳性对照酶结合物 A 孔 OD 值 <0.3,酶结合物 B 孔 OD 值 <0.3;PRCV 阳性对照酶结合物 A 孔 OD 值 <0.3,酶结合物 B 孔 OD 值 >0.7;阴性对照酶结合物 A 孔 OD 值 >1.0,酶结合物 B 孔 OD 值 >1.0。

2.3 临界值(cut off)的计算

PRCV 阴性 / 阳性临界值 $cut\ off(1)=0.6 \times$ 阴性对照在酶结合物 A 孔的 OD 值;TGEV 阳性临界值 $cut\ off(2)=0.6 \times$ PRCV 阳性对照在酶结合物 B 孔的 OD 值;TGEV 阴性临界值 $cut\ off(3)=0.6 \times$ PRCV 阳性对照在酶结合物 B 孔的 OD 值。

2.4 结果判定

分 2 步:第 1 步,如果样品在酶结合物 A 孔的 OD 值高于 $cut\ off(1)$,则该样品 TGEV 和 PRCV 均为阴性,其他样品进入第 2 步判定。第 2 步,如果样品在酶结合物 B 孔的 OD 值低于 $cut\ off(2)$,则判定为 TGEV 阳性;高于 $cut\ off(3)$,则判定为 PRCV 阳性;在 $cut\ off(2)$ 和 $cut\ off(3)$ 之间,则判为可疑样品。

3 结果

1) 来自养殖场和屠宰场的共 308 份血清,经 ELISA 方法检测其 TGEV 和 PRCV 抗体,结果见表 1。根据表 1 结果可知,共检出 TGEV 阳性样品 9 份,全部来自同一养殖场;检出 PRCV 抗体阳性样

表 1 TGEV 和 PRCV 抗体检测结果

场点和批次	样品数	TGEV 阳性数	TGEV 阳性率 /%	PRCV 阳性数	PRCV 阳性率 /%	结果可疑样品数
规模场	109	9	8.26	13	11.93	1
规模场 1	15	9	60	5	33.33	1
规模场 2	15	0	0	8	53.33	0
规模场 3	10	0	0	0	0	0
规模场 4	10	0	0	0	0	0
规模场 5	9	0	0	0	0	0
规模场 6	15	0	0	0	0	0
规模场 7	15	0	0	0	0	0
规模场 8	20	0	0	0	0	0
散养户	89	0	0	32	35.96	0
散养户 1	15	0	0	13	86.67	0
散养户 2	15	0	0	7	46.67	0
散养户 3	15	0	0	7	46.67	0
散养户 4	9	0	0	5	55.56	0
散养户 5	15	0	0	0	0	0
散养户 6	5	0	0	0	0	0
散养户 7	15	0	0	0	0	0
屠宰场(本地)	50	0	0	14	28	0
屠宰场(本地)1	10	0	0	10	100	0
屠宰场(本地)2	10	0	0	4	40	0
屠宰场(本地)3	20	0	0	0	0	0
屠宰场(本地)4	10	0	0	0	0	0
屠宰场(外省)	60	0	0	27	45	0
屠宰场(外省)1	10	0	0	10	100	0
屠宰场(外省)2	10	0	0	10	100	0
屠宰场(外省)3	10	0	0	7	70	0
屠宰场(外省)4	10	0	0	0	0	0
屠宰场(外省)5	10	0	0	0	0	0
屠宰场(外省)6	10	0	0	0	0	0
合计	308	9	2.92%	86	27.92	1

注:屠宰场序号代表不同来源地的猪的批次。

品 86 份,规模养殖场、散养户、屠宰场均有阳性样品检出。TGEV 抗体阳性率为 2.92%,PRCV 抗体阳性率为 27.92%。

2)TGEV 和 PRCV 阳性场和批次统计见表 2。由表 2 可知,没有检出仅 TGEV 阳性的场或批次;仅 PRCV 阳性的场和批次中,规模场比例最少(1/8),散养场其次(4/7),屠宰场本地和外地猪均为 50%;有 1 个规模养殖场同时感染 TGEV 和 PRCV。

表 2 TGEV 和 PRCV 阳性场和批次统计

场点类型	数量或 批次	仅 TGEV 阳性	仅 PRCV 阳性	TGEV 和 PRCV 均阳性
规模场	8	0	1	1
散养户	7	0	4	0
屠宰场(本地)	4	0	2	0
屠宰场(外省)	6	0	3	0

4 讨 论

TGEV 与 PRCV 抗原关系密切,产生的抗体存在交叉反应,常规的血清学检测方法难以鉴别。但 PRCV 的 S 蛋白存在 1 或 2 个抗原位点的缺失,所以,使用针对 PRCV 的 S 缺失区的抗原位点的单克隆抗体建立的阻断 ELISA,可从血清学上区分 PRCV 和 TGEV 感染猪^[3]。本检测试剂盒中,酶结合物 A 含有两个病毒共同保守位点的酶标单抗,只要感染了任何一种病毒的猪血清都会阻断其与包被的病毒蛋白结合;而酶结合物 B 只含有针对 TGEV 特有位点的酶标单抗,只有含 TGEV 抗体的猪血清与其竞争,从而区分血清中包含的 TGEV 和 PRCV 抗体。该方法操作简便,广泛用于目前的 TGEV 和 PRCV 血清学检测。

本次调查中,TGEV 血清阳性样品全部来自同一养殖场,其 TGEV 阳性率达到 60%。经核实,该场每年冬春 TGEV 高发季节对仔猪进行 TGEV 疫苗免疫,本次采样群也进行了免疫,该场 TGEV 阳性与免疫有关;但 PRCV 抗体阳性率达 33%,表明该场猪群存在 PRCV 感染。在 PRCV 阳性场进行 TGEV 疫苗免疫,是否会对 TGEV 血清转化和 PRCV 的感染率产生影响,需要进一步研究,但无论如何,TGEV 疫苗抗体和 PRCV 感染抗体一起对 TGEV 形成了保护^[4],虽然这种保护并不完全^[5]。

近年来,国内陆续开展了一些 TGEV 和 PRCV

血清学调查工作。蒋静等^[6]对上海、安徽等 4 省调查显示,猪 TGEV 抗体阳性率为 6.8%,且都与免疫有关;PRCV 抗体阳性率为 18.7%。洪尼宁等^[7]调查显示,贵州省猪 TGEV 血清阳性率为 0.41%,PRCV 血清阳性率为 1.51%。陈小丽等^[8]对福建省三明地区规模猪场的调查结果显示,猪 TGEV 血清学阳性率为 19.8%,PRCV 血清学阳性率为 25.9%。以上 3 个地区的调查结果存在较大的差异,其原因需要进一步研究,而本次调查结果排除屠宰场数据后,与蒋静等的调查结果基本一致。

本次调查还显示,散养户生猪 PRCV 感染率是规模场的 3 倍,考虑到 PRCV 高传播性导致的阳性场的高感染率^[9],可认为主要与散养户中阳性场比例高于规模场有关;而屠宰场(本地)样品的 PRCV 阳性率(28%)略高于养殖场(22.73%),可能与屠宰场生猪生长期较长、累积的感染几率大有关。

PRCV 在提供对 TGEV 感染的交叉保护的同时,还能作为猪呼吸道疾病综合征(PRDC)的病原之一,参与多因素呼吸道疾病的发生,造成经济损失^[9],因此,各养殖场要根据实际情况,去弊存利,做好 TGEV 和 PRCV 的防控工作。

参 考 文 献

- [1] LAUDE H,VAN REETH,PENSAERL M.Porcine respiratory coronavirus:Molecular features and virus-host interactions[J].Vet Res,1993(24):125-150.
- [2] KIM L,HAYES J,LEWIS P,et al.Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus(TGEV) and Porcine respiratory coronavirus(PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd[J].Arch Virol,2000(145):1133-1147.
- [3] 李焕荣,张春叶,林祥梅,等.猪呼吸道冠状病毒及实验室诊断方法研究进展[J].北京农学院学报,2007(2):78-80.
- [4] PENSAERL MB,COX E.Porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus [J].Agri-Pract,1989(10):17-20.
- [5] 房红莹,窦守强,罗满林.猪呼吸道冠状病毒研究进展[J].中国兽药杂志,2007,41(5):40-43.
- [6] 蒋静,李健,胡永强,等.上海等 4 省市动物冠状病毒的流行病学调查[J].畜牧与兽医,2007(12):50-52.
- [7] 洪尼宁,张登祥,李涛,等.贵州省猪传染性胃肠炎及呼吸冠状病毒血清学调查[J].中国畜牧兽医,2010,37(12):180-182.
- [8] 陈小丽,吴德喜.三明地区规模猪场传染性胃肠炎和呼吸冠状病毒病血清学调查[J].福建畜牧兽医,2013,35(2):20-21.