

# 规模猪场 O 型口蹄疫春秋两防 免疫抗体监测及野毒检测

熊胜利<sup>1</sup> 龙清孟<sup>1</sup> 杨昌芬<sup>2</sup>

1. 贵州省种畜禽种质测定中心, 贵阳 550018;

2. 贵州省东南州凯里市龙场镇农业服务中心, 贵州凯里 556007

**摘要** 贵州省某规模猪场 2013 年春秋两防后, 对基础母猪群、基础公猪群和育成猪群(保育猪群、哺乳仔猪群均按滚动免疫程序执行免疫, 不参与春秋两防) 3 个猪群进行随机抽样采集血清样本, O 型口蹄疫春防满 4 个月时采样 345 头份、满 6 个月时采样 295 头份, 秋防满 3 个月时采样 318 头份, 共计 958 头份; 采用间接血凝试验进行口蹄疫免疫抗体监测, 用 NS 单抗竞争 ELISA 检测口蹄疫野毒感染抗体。结果表明该场口蹄疫秋防满 3 个月时口蹄疫免疫抗体合格率为 75.2%, 其中母猪群合格率为 83.0%、公猪群合格率为 86.7%、育成群合格率为 70.4%, 只有公猪群与母猪群的抗体合格率达到农业部要求的标准(大于等于 75%)。而春防口蹄疫疫苗免疫后 4 个月时, 抗体水平已下降, 抗体合格率低于 60%; 到 6 个月时, 抗体合格率低于 40%, 均未达到农业部规定的标准。所有血清样品中均未检测出口蹄疫野毒感染。

**关键词** O 型口蹄疫疫苗; 春秋两防; 免疫抗体; 野毒感染; 检测分析

养猪主要疾病有口蹄疫、猪瘟、猪蓝耳病、猪伪狂犬病、猪丹毒、猪肺疫、猪传染性胸膜肺炎、猪萎缩性鼻炎等, 其中猪瘟和口蹄疫被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病, 被我国农业部列为一类

动物疫病, 是养猪场的强制免疫项目。口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病, 临床上以口腔黏膜、舌

收稿日期: 2014-02-23

基金项目: 贵州省农业攻关项目(黔科合 NY 字[2012]3061 号)

通讯作者: 龙清孟

熊胜利, 男, 1967 年生, 本科, 高级畜牧师。

表 1 牛、羊 O 型口蹄疫免疫注射后不同时期正向间接血凝试验结果

项目	牛			羊		
	免疫后 30 d	免疫后 60 d	免疫后 120 d	免疫后 30 d	免疫后 60 d	免疫后 120 d
检测头数	20	19	19	20	20	19
合格头数	18	16	13	17	16	12
合格率/%	90.0	84.2	68.4	85.0	80.0	63.1
平均抗体滴度	1:190	1:128	1:50	1:128	1:90	1:32

1.5 个滴度, 下降幅度明显。

### 3 讨论

1) 牛、羊在注射 O 型口蹄疫疫苗后 120 d 时群体免疫合格率均达不到防疫要求(群体免疫合格率 < 70%), 增加了患病风险。

2) 每年的 12 月份和翌年的 1 月份、2 月份为口蹄疫易发季节, 但按常规免疫时间(9 月份)免疫后, 1 月份时抗体效价已经大幅下降, 达不到防疫要求(群体免疫合格率 ≥ 70%)。为在口蹄疫易发季节保持较高的抗体效价, 可在 11 月份至 12 月份加强免疫 1 次。

面、鼻镜、蹄部、乳房皮肤发生水泡和溃烂为特征。由于该病的发生会造成严重的经济损失和政治影响,因此受到世界各国政府的高度重视。贵州省某规模猪场在春秋两防时跟踪抽样检测口蹄疫抗体水平及野毒感染情况,监测报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间及地点

春防猪 O 型口蹄疫时间为 2013 年 3 月 4 日,7 月 4 日抽样采血 345 头份,7 月 5 日做抗体及野毒检测;9 月 4 日抽样采血 298 头份,9 月 5 日做抗体及野毒检测。秋防猪 O 型口蹄疫时间为 2013 年 9 月 10 日,12 月 10 日抽样采血 318 头份,12 月 11 日做抗体及野毒检测。

试验地点为贵州省某规模猪场。

### 1.2 检测试剂

猪口蹄疫 NS 单抗竞争 ELISA 检测试剂盒,购自农业部兽医诊断中心;猪 O 型口蹄疫抗体检测试剂盒,购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

### 1.3 仪器设备

微量移液器(0.1~10.0  $\mu\text{L}$ 、10~100  $\mu\text{L}$ 、100~1 000  $\mu\text{L}$ ),购自芬兰;八道微量移液器(100  $\mu\text{L}$ 、300  $\mu\text{L}$ ),购自芬兰;37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育箱、自动蒸馏水器(SYZ-A 型)、自动洗板系统及酶标仪(AC100-120),购自上海亚荣生化仪器厂;微量振荡器(MM-1 型),购自江苏医疗仪器厂;高速冷冻离心机,购自德国 Sigma 公司。

### 1.4 免疫接种

1) 接种疫苗。猪 O 型口蹄疫灭活疫苗(浓缩苗,政府采购苗),购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

2) 免疫剂量及方式。后备母猪及种母猪接种剂量为 4.0~4.5 mL/头;后备公猪及种公猪接种剂量为 4.5~5.5 mL/头,育成猪接种剂量为 3.5~4.0 mL/头。免疫方式为颈部肌肉注射。

### 1.5 制备待检血清

采用前腔静脉法随机抽样采血,高速冷冻离心机分离制备血清,放入冰箱 1~4  $^{\circ}\text{C}$ 保鲜层过夜,次日进行实验室抗体及野毒检测。

### 1.6 口蹄疫抗体检测

1) 在凝集试验反应板中,每孔加入稀释液 50  $\mu\text{L}$ ,每个样品加至第 10 孔。

2) 在每排第一孔加入相应的待检血清 50  $\mu\text{L}$ ,

然后依次作倍比稀释,最后一孔弃去 50  $\mu\text{L}$ 。每板均设阴、阳性对照及空白对照。

3) 将诊断液摇匀,每孔加入 25  $\mu\text{L}$ ,加液完毕后将反应板置振荡器上 2~4 min,取下反应板,盖上一块玻璃板,置 30  $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h 后观察结果。

结果判定:在满足阳性对照血清效价不低于 10log<sub>2</sub>、阴性对照血清和空白对照均为“—”的条件下,对待检血清作出判定。抗体滴度  $\geq 7\log_2$ (或 1:2<sup>7</sup>) 时,判为合格;抗体滴度  $< 7\log_2$  时,判为不合格。为避免判断误差,对抗体滴度处于临界值的血样,均重复检测 1 次。

### 1.7 用 NS 单抗竞争 ELISA 检测口蹄疫野毒感染

1) 操作步骤。取包被 ELISA 板记录阴、阳性对照;加入阴性对照样本原液(2 孔)、阳性对照样本原液(3 孔)和已作处理的待检血清各 100  $\mu\text{L}$ ,混匀后贴膜,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min;用缓冲液重复洗涤 5 次后,分别加入酶结合物液 100  $\mu\text{L}$ ,贴膜后置 37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min;再重复洗涤 5 次,加入底物液 A 50  $\mu\text{L}$ ,再加底物液 B 50  $\mu\text{L}$ ,轻振混匀,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光显色 10 min,加入 1.25 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液 50  $\mu\text{L}$ ,轻振混匀后于酶标仪中在 450 nm 处进行检测并记录。

2) 成立条件。阴性对照 OD<sub>450</sub> 平均值与阳性对照 OD<sub>450</sub> 平均值的差应大于等于 0.6,同时阳性对照阻断率均大于等于 55%。阻断率(lnh%)=(阴性对照 OD<sub>450</sub> 均值-待检样品 OD<sub>450</sub> 值)÷阴性对照 OD<sub>450</sub> 均值×100%。

3) 结果判定。待检样品 lnh%  $\geq 30\%$ ,判为 FMDV-NS 抗体阳性;20%  $\leq$  待检样品 lnh%  $< 30\%$ ,判为 FMDV-NS 抗体可疑;待检样品 lnh%  $< 20\%$ ,判为 FMDV-NS 抗体阴性。

## 2 结果与分析

### 2.1 口蹄疫抗体监测结果

从表 1 可知,春防 O 型口蹄疫疫苗免疫 4 个月及 6 个月时,所检测猪群的 O 型口蹄疫免疫抗体合格率分别为 59.4%、39.7%,达不到农业部要求的合格标准(阳性率  $\geq 75\%$ )。秋防 O 型口蹄疫疫苗免疫 3 个月时,母猪群、公猪群的抗体合格率均在 80.0% 及以上;而育成猪群的抗体合格率为 70.4%,未达到农业部的要求,因此建议口蹄疫疫苗每间隔 3 个月免疫 1 次。

表 1 该猪场春、秋两防 O 型口蹄疫疫苗免疫抗体检测结果

项目	种母猪	种公猪	育成猪	合计
春防 4 个月时采样头份	148	15	182	345
抗体合格头份	104	10	91	205
抗体合格率/%	70.3	66.7	50.0	59.4
春防 6 个月时采样头份	100	15	180	295
抗体合格头份	45	7	65	117
抗体合格率/%	45.0	46.7	36.1	39.7
秋防 3 个月时采样头份	100	15	203	318
抗体合格头份	83	13	143	239
抗体合格率/%	83.0	86.7	70.4	75.2

表 2 该猪场猪口蹄疫感染抗体检测结果

项目	种母猪	种公猪	育成猪	合计
春防 4 个月采样头份	148	15	182	345
野毒抗体头份	0	0	0	0
野毒感染率/%	0.0	0.0	0.0	0.0
春防 6 个月采样头份	100	15	180	295
野毒抗体头份	0	0	0	0
野毒感染率/%	0.0	0.0	0.0	0.0
秋防 3 个月采样头份	100	15	203	318
野毒抗体头份	0	0	0	0
野毒感染率/%	0.0	0.0	0.0	0.0

### 2.2 口蹄疫野毒感染检测结果

从表 2 可知,在该规模养猪场的基础母猪群、基础公猪群和育成猪群中,均未检测到口蹄疫野毒感染。

## 3 讨论

预防口蹄疫的最有效手段是根据免疫程序定期进行免疫接种,因此规模化养猪场结合本场的实际情况科学合理地制定一套免疫程序是做好口蹄疫预防的关键。猪场科学免疫程序制定的有力依据是定期跟踪不同猪群作抗体动态监测及口蹄疫野毒感染检测,及时掌握不同时期不同猪群的抗体水平及健康状况。对口蹄疫野毒携带者及时采取淘汰

净化处理;对抗体水平偏低的猪只,采取补免措施;对补免仍然不产生理想抗体水平的猪只,考虑先天感染或者出现免疫耐受,及时淘汰处理。另外,对猪群跟踪做抗体动态监测的数据,还可作为猪场调整免疫程序的重要依据。

从该场抗体检测的结果可知,该场猪群在免疫口蹄疫疫苗满 4 个月时,其抗体水平已下降,总体合格率 59.4%,已达不到农业部要求标准。可见,该场对 O 型口蹄疫疫苗采用每年春秋两防各免疫一次的方案已经不适用。因此,建议基础母猪群、基础公猪群及育成猪群的口蹄疫疫苗每间隔 3 个月免疫 1 次。