

绿兴猪场猪瘟抗体研究

李军成, 路彩霞, 林美娟 (广西农业职业技术学院, 广西南宁 530007)

摘要 为了探索绿兴种猪场的猪群猪瘟抗体水平, 于2009~2012年用正向间接血凝试验试剂盒对绿兴种猪场的猪群进行猪瘟抗体水平检测, 同时对3年的检测结果进行比较。结果表明, 该猪场2009~2012年整体抗体水平差异显著($P < 0.05$), 抗体保护价逐年提升, 猪瘟抗体保护水平都达到1:16效价的为100%, 每年半数以上的猪只抗体效价达到了1:64, 表明该猪场整体的猪瘟保护水平很高。3个班的检测结果差异不显著($P > 0.05$), 结果可信、准确。该研究为各规模化猪场采用正向间接血凝试验监测猪群的猪瘟免疫抗体水平提高借鉴。

关键词 猪瘟; 正向间接血凝试验; 抗体水平; 检测

中图分类号 S852.65⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01557-03

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是猪的一种重要的病毒性传染病, 给养猪业造成巨大的经济损失。近20年来, 由于诸多因素的存在, 我国猪瘟的流行出现许多新特点, 表现出非典型性猪瘟、温和性猪瘟、种猪持续性感染与繁殖障碍及仔猪先天感染与免疫失败等, 给该病的控制带来新的难题。有效地防控猪瘟是提高猪场经济效益的关键技术措施^[1-3]。猪瘟, 又称猪霍乱, 是由黄病毒科、猪瘟病毒属的猪瘟病毒引起的一种急性、发热、接触性传染病, 具有高度传染性和致死性^[4]。控制该病最有效的方式是建立合理的免疫程序, 而免疫效果直接影响该病的发生和发展。因此, 对猪群进行抗体水平监测有利于监控该病疫情, 做好猪瘟的防控工作是非常必要的^[5]。目前, 有效的防制方法是疫苗注射^[6-7], 尤其仔猪的超前免疫最为重要。为检测南宁绿兴种猪场猪瘟的免疫效果, 笔者于2009年3月~2012年3月对南宁绿兴种猪场血清通过正向间接血凝试验检测了猪瘟免疫抗体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验条件。南宁绿兴种猪场, 试验期为2009年3月~2012年10月, 试验用猪基础日粮及营养水平, 各组相同, 饲养管理按照《规模化猪场生产技术规程》进行。选择30窝不同阶段的猪进行采血。

1.1.2 实验动物。空腹颈静脉采集绿兴种猪场不同阶段母猪与仔猪血样共360份; 分离后冷藏保存待用。

1.1.3 药品。猪瘟正向间接血凝诊断液(包括阴性、阳性血清、稀释液及抗原诊断液), 购自中国农业学院兰州兽医研究所, 批号为20111001。

1.1.4 仪器。96孔110~120°V型医用血凝板; 10~100 μ l可调微量移液器等。

1.2 试验方法

1.2.1 采血方法。采用耳静脉采血方法。保定绳环套在鼻上方, 由助手拉紧或拴在猪栏上, 其高度最好与猪高度相同或稍高些, 然后用酒精棉球用力擦拭耳背大静脉, 同时助手

用手指强压耳基部静脉, 使血管鼓起, 接着采血者左手持真空管并牵拉耳朵, 右手持采血针采血。

1.2.2 血清分离方法。用一次性注射器抽取5 ml静脉血, 抽好后静置2 h 抽出血清注入清洁干燥离心管或普通试管内。

1.2.3 血清的稀释。①待检血清的稀释。首先给每排1~6孔加稀释液50 μ l, 取1号待检血清50 μ l加入第1块血凝板第1排第1孔, 混匀, 取出50 μ l移入第2孔, 混匀后取出50 μ l移入第3孔, 依次类推, 直到第6孔混匀后取出50 μ l弃去。第1块血凝板第1排1~6孔待检, 经1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64倍稀释的血清稀释。取2号待检血清加入第1块血凝板第2排, 取3号待检血清加入第3排, 依次类推, 剩余29份血清均按照上述倍比稀释法去稀释。每取1份血清, 必须更换吸头1个。②阴性对照血清的稀释。在血凝板上的阴性对照组1排的第1孔加阴性血清50 μ l, 倍比稀释至第6孔, 混匀后从该孔取出50 μ l加入第1块血凝板的第8孔, 此时阴性血清对照孔稀释度为1:64。③阳性对照血清的稀释。在血凝板上阳性对照组1排的第1孔加入阳性血清50 μ l, 倍比稀释至第9孔, 混匀后从该孔取出50 μ l加入第1块血凝板的第9孔, 此时阳性血清对照孔稀释度为1:512。④稀释液空白对照组直接加入第1块血凝板的第10孔。

1.2.4 凝集反应。待检血清各孔、阴性对照血清孔、阳性对照血清孔、稀释液空白对照孔均各加入25 μ l血凝试验的抗原诊断液, 初步混匀后, 置于微量振荡器上振荡1 min。盖上玻板, 室温下静置1.5~2 h或次日判定结果。

1.2.5 判定方法和标准。若红细胞集聚于孔中央, 周围光滑者为阴性; 红细胞平铺孔底或周边稍有皱褶者为100%凝集(++++)。平铺孔底, 但是孔中心稍有红细胞集聚者为75%凝集(+++)。孔周边凝集, 孔中央红细胞集聚相当于阴性对照孔红细胞圆点1:2左右者为50%凝集(++)。移去玻板, 将血凝板放在白纸上, 先观察阴性血清对照孔和稀释液空白对照孔, 应无凝集现象, 或呈25%凝集(+)。阳性血清对照孔呈75%凝集(+++)为凝集合格。待检血清在第4孔, 即1:16稀释度出现50%凝集(++)为免疫合格。猪场猪群对猪瘟的抗体效价达到1:16或以上者为免疫合格。判断依据为GB/T16551-2008, 判断标准参照《2010年国家动物疫病监测计划》。

基金项目 2012年广西农业职业技术学院学生科技创新重点课题项目(桂农职院研7)。

作者简介 李军成(1963-), 男, 甘肃静宁人, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事畜牧兽医教学与科研工作。

收稿日期 2013-01-04

2 结果与分析

2.1 猪瘟疫抗体水平 2009~2012 年选择猪场不同阶段的猪群进行采血,对南宁绿兴种猪场共 360 份血清用正向间接血凝试验检测的猪瘟疫抗体效价。由表 1 可知,在 360 份血清样品中,1:16 稀释,抗体效价为 +0 份、抗体效价为 +4

份、抗体效价为 + + +8 份、抗体效价 + + + +8 份;1:32 稀释,抗体效价 +20 份、抗体效价 + + +19 份、抗体效价 + + +33 份、抗体效价 + + + +34 份;1:64 稀释,抗体效价 +44 份、抗体效价 + +30 份、抗体效价 + + +54 份、抗体效价 + + + +106 份。

表 1 2009~2012 年猪瘟疫抗体水平

年份	1:16				1:32				1:64				总数
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	
2009	0	2	4	3	7	5	8	7	10	5	11	28	90
2010	0	0	1	2	9	6	9	8	13	7	10	25	90
2011	0	0	0	1	1	2	10	12	12	10	16	26	90
2012	0	2	3	2	3	6	6	7	9	8	17	27	90
合计	0	4	8	8	20	19	33	34	44	30	54	106	360

2.2 猪瘟疫免疫效价 2012 级 1~3 班重复检测猪场猪群的 30 份血清样品的猪瘟疫抗体效价。2012 年 101~103 班检测的 90 份血清样品中,1:16 稀释时,抗体效价 +0 份、抗体效价 + +3 份、抗体效价 + + +2 份、抗体效价 + + + +2 份;

1:32 稀释时,抗体效价 +4 份、抗体效价 + +5 份、抗体效价 + + +7 份、抗体效价 + + + +8 份;1:64 稀释,抗体效价 +11 份、抗体效价 + +8 份、抗体效价 + + +16 份、抗体效价 + + + +26 份(表 2)。

表 2 2012 级 1~3 班重复 30 份样品猪瘟疫抗体水平

项目	1:16				1:32				1:64			
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
101 班	0	1	2	2	2	2	3	2	4	1	2	9
102 班	0	2	0	0	1	1	1	1	4	3	8	9
103 班	0	0	0	0	1	2	3	3	3	4	6	8
合计	0	3	2	2	4	5	7	6	11	8	16	26

2009~2012 年检测的 360 份血清样品中,整体抗体水平经 χ^2 检验,差异显著 ($P < 0.05$),抗体保护价逐年提升,猪瘟疫抗体保护水平都达到 1:16 效价的为 100%,每年半数以上的猪抗体效价达到了 1:64,表明该猪场整体的猪瘟疫保护水平很高,从 2009 至 2012 年猪瘟疫抗体合格率呈逐年上升趋势,表明该猪场这 4 年间对猪群猪瘟疫的免疫情况存在较大差异(表 3)。

表 3 2009~2012 年猪瘟疫抗体水平

年份	1:16	1:32	1:64	总计
2009	9	27	54	90
2010	3	32	55	90
2011	1	25	64	90
2012	7	22	61	90
合计	20	106	234	360

2012 级 101~103 班检测的 30 份血清样品中,经 χ^2 检验,3 个班级的检测结果差异不显著 ($P > 0.05$),表明 3 个班级之间试验操作差异不大,都能严格按照试验的规范操作规程进行操作,结果可信,准确(表 4)。

表 4 2012 级 1~3 班样本检测情况

项目	1:16	1:32	1:64	总计
101 班	5	9	16	30
102 班	2	5	24	30
103 班	0	9	21	30
χ^2 值	0.325	0.994	0.627	-

3 讨论与结论

3.1 4 年间的整体抗体水平差异显著 ($P < 0.05$),抗体保护价逐年提升,4 年的猪瘟疫抗体保护水平都达到 1:16 效价的为 100%,每年中猪瘟疫抗体效价达到 1:64 的猪占 50% 以上。

(1) 免疫剂量。我国目前使用的免疫剂量是以防止猪瘟疫临床感染而制定的每猪 1 头份,而要有效防止猪瘟疫亚临床感染,免疫剂量应不低于 2~3 头份^[8]。从 2009 年至 2012 年监测情况来看,2~3 头份的免疫剂量达到了国家要求的免疫保护率。

(2) 免疫程序。国内目前推荐使用的仔猪免疫程序有 3 种:第 1 种是仔猪断奶后到 65 日龄一次性免疫 2~4 头份;第 2 种是 20 日龄首免 2 头份,60 日龄加大免疫剂量。另外,也要结合地区情况调整,不是无限制的加大剂量就能起到免疫保护作用,剂量过大会造成免疫麻痹^[9]。

(3) 由于采样监测时间在实际操作过程中与要求的时间存在差距,监测结果不能真实反映抗体效价。因此,在实际工作中要严格按照国家动物免疫计划中要求的时间进行监测,以免影响检测结果。

(4) 疫苗运输和贮存规范。猪瘟疫疫苗于 -15℃ 条件下保存,有效期为 1 年;0~8℃ 冷暗干燥处保存,有效期为 6 个月;8~25℃ 有效期仅为 10 d。

(5) 稀释使用规范。稀释后疫苗搁置时间不宜太长:猪瘟疫疫苗气温在 15~30℃ 时,3 h 后可能失效。

(6) 操作规范。预防注射应严格按照操作规程,用前稀

释液置于4~8℃冰箱内预冷,稀释后的疫苗同样放于有冰块的保温箱内,并在1~2 h内用完。

(7) 针头消毒规范。免疫注射前应对针头进行蒸汽消毒,注射时应1头猪1个针头。

(8) 免疫接种时间。各猪场应根据实际情况选择恰当的免疫时间,不宜过早也不宜太晚。

(9) 及时进行第2次免疫。首免由于母源抗体的干扰或免疫质量差,抗体上升很少、很快消失的情况下,要及时进行第2次免疫,防止出现免疫空档^[10]。

3.2 3个班级间的检测结果差异不显著($P>0.05$)。

该试验结果表明,2009~2012年的整体抗体水平差异显著($P<0.05$),抗体保护价逐年提升,4年的猪瘟抗体保护水平都达到1:16 效价的为100%,每年中各效价水平相比可知,半数以上的猪只抗体效价达到了1:64,表明该猪场整体的猪瘟保护水平很高。3个班级之间的检测结果差异不显著($P>0.05$),结果可信,准确。

(上接第1543页)

养密度高,卫生条件差,不定期消毒和不定期免疫的猪场多发,特别是先从农村散养户开始发病,由于其对病死猪的处理不当,逐渐向中、小型养猪场和规模化养猪场传播;该病流行速度快,呈爆发性;发病猪无性别与品种差异,发病有一定的年龄性,多见于10~25周龄的生长猪和育肥猪,母猪、哺乳仔猪和刚断奶仔猪发病率低;该病发生后,药物治疗的效果并不理想,滥用或大量使用抗生素和退烧药会导致猪死亡率增高。

2.2 血清学检测 对渭南地区发病猪采集血液样品235份,分离血清,针对引起猪无名高热的病毒性疾病进行血清学检测,结果表明抗体阳性率猪瘟占43.0%,猪繁殖与呼吸障碍综合症占49.4%,猪圆环病毒病占19.6%,猪伪狂犬占7.2%,猪流感占1.7%(表1)。根据血清学检测结果,结合该病的临床症状和剖检变化,推断引起猪无名高热发生的病毒性疾病主要为猪瘟、猪繁殖与呼吸障碍综合症和猪圆环病毒病,其中大多为2种或2种以上的病原混合感染,并继发细菌感染,给临床诊断和治疗都带来了较大困难。

表1 渭南地区猪无名高热的血清学调查

样品来源	样品数/份	猪瘟病毒阳性率//%	猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒阳性率//%	猪圆环病毒阳性率//%	猪流感病毒阳性率//%	猪伪狂犬病毒阳性率//%
临渭区	44	45.5	59.1	18.2	2.3	4.5
大荔	26	42.3	50.0	30.0	-	15.4
韩城	35	42.9	57.1	5.7	5.8	8.6
华县	34	58.8	44.1	23.5	-	-
蒲城	28	32.1	46.4	32.1	-	7.1
澄城	36	27.8	47.2	13.9	-	2.8
白水	32	50.0	37.5	21.9	3.1	15.6
合计	235	43.0	49.4	19.6	1.7	7.2

参考文献

- [1] 修金生,吴顺意,周伦江.等.不同规模猪场猪瘟抗体检测与猪瘟净化[J].福建农业学报,2010,25(2):235-238.
- [2] 乔宏兴,边传周.一起猪场暴发猪瘟的防治[J].中国畜牧兽医,2008(9):42.
- [3] 侯站民,张伊生,路群起.等.猪高热病防治[J].中国畜牧兽医,2007(7):125.
- [4] 姚文生,范学政,王琴.等.我国猪瘟流行现状与防控措施建议[J].中国兽药杂志,2011,45(9):47,55.
- [5] 范雅芬,柳林.规模化猪场猪瘟的预防与控制[J].畜牧与饲料科学,2010,31(10):168-169.
- [6] 谢移权,李进锋.规模化猪场猪瘟抗体水平监测的应用[J].畜业技术-疫病防治,2011(4):102.
- [7] 刘萍.猪瘟疫苗的研究进展[J].中国畜牧兽医,2008(9):123.
- [8] 安回凤,张家峰,田盛林.等.当前猪瘟的治疗方法及其评价[J].中国畜牧兽医,2006(4):63.
- [9] 邱立新,邱美珍,杜丽飞.等.怎样做好正向间接血凝试验[J].湖南畜牧兽医,2010(6):36-38.
- [10] 李军成,路彩霞,蒋垚.等.超免仔猪猪瘟抗体消长规律的研究[J].安徽农业科学,2012,40(33):16165-16166,16335.

3 结论与讨论

综上所述,根据临床症状、剖检变化和血清学检测结果,推断引起渭南地区猪无名高热的病毒性疾病主要为猪繁殖与呼吸障碍综合症、猪瘟、猪圆环病毒病,非传染性因素主要为高温、饲养密度过大、长期饲喂发霉饲料等。另外,可能是免疫程序不合理造成的。由于猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒、猪圆环病毒、霉菌毒素能破坏猪的免疫系统,使猪群的免疫力降低,造成免疫抑制,使猪瘟疫苗和其他一些疫苗免疫不能达到有效保护,所以会造成病毒性混合感染和发病率升高,同时又容易引起一些其他病原(病毒或细菌)继发感染,给该病的诊断和治疗带来了一定的困难,发病后用药效果不明显,导致死亡率升高^[2]。因此,该病防控应坚持以预防为主,防止疫病传入为原则,即加强饲养管理,夏季搞好防暑降温工作,加强消毒卫生,添加药物保健,精心护理易感猪群,同时根据该地区疾病的流行情况结合养殖场实际情况,制定科学合理的疫苗免疫计划,取得良好的疫苗免疫保护效果。对于已发病的地区和猪场,要迅速采取隔离、紧急免疫等措施,对病死猪进行无害化处理,并对垫料、器具等消毒,对于疑似猪采取综合性技术措施,对不同的继发感染症状,针对性采取治疗方案,以降低其发病率和死亡率。

参考文献

- [1] 徐辉,李晓成,陈伟杰,等.“猪高热病”的流行病学调查与主要病因分析[J].中国动物检疫,2007,24(6):19-21.
- [2] 宋战胜,董战礼,吴新宇,等.近期陕西猪病流行情况分析[J].中国畜禽种业,2010(6):104-106.
- [3] 卢绪秀,牛瑞燕.猪高热病的诊断与防控[J].畜牧与饲料科学,2011,32(6):105.