

第十二辑

VOLUME 12

研究报告汇编

COLLECTED PAPERS OF VETERINARY RESEARCH

中国兽药监察所

THE NATIONAL CONTROL INSTITUTE OF
VETERINARY BIOPRODUCTS AND PHARMACEUTICALS
BEIJING CHINA

1990—1991

研究报告汇编 第十二辑

目 录

猪瘟单克隆抗体诊断试剂的研究.....	(1)
利用单克隆抗体检测猪瘟疫苗抗体的酶联免疫吸附试验.....	(12)
山羊痘弱毒疫苗的研究 (第四报)	
山羊痘弱毒疫苗免疫绵羊抗绵羊痘试验.....	(17)
狂犬病ERA株弱毒的复制及生物学性质的初步研究.....	(22)
狂犬病 (ERA/BHK ₂₁) 疫苗的试制.....	(29)
狂犬病 (ERA/BHK ₂₁) 疫苗的免疫期试验.....	(34)
仔猪大肠杆菌腹泻三价灭活疫苗的研究	
I. 菌种的分离和筛选.....	(40)
II. 抗原培养与浓缩方法试验.....	(44)
III. 实验室制苗及其田间试验观察.....	(49)
IV. 中间试产和区域试验.....	(54)
V. 用反向间接血凝技术进行效力检验.....	(59)
波摩那型钩端螺旋体浓缩油佐剂苗免疫效力试验.....	(63)
波摩那型犬型钩端螺旋体浓缩油佐剂苗对猪的免疫期测定.....	(70)
波、犬二型钩端螺旋体浓缩油佐剂苗的田间试验.....	(75)
波摩那型犬型钩端螺旋体浓缩油佐剂苗保存期试验.....	(80)
鸡毒支原体弱毒疫苗的研究 (第一报)	
鸡毒支原体弱毒株 F株对鸡致病性测定.....	(83)
鸡毒支原体弱毒疫苗的研究 (第二报)	
鸡毒支原体弱毒株 F株免疫效力的测定.....	(90)
硕士研究生论文	
火鸡疱疹病毒FC126变异克隆株的研究.....	(96)
支原体感染与禽用疫苗株病毒的增殖及其与鸡体新城疫免疫应答关系的研究.....	(113)
猪细小病毒结构蛋白免疫原性研究.....	(129)
抗猪细小病毒单克隆抗体及其初步应用的研究.....	(139)
鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 分离株结构蛋白和抗原特性的比较研究.....	(154)
巴氏杆菌 DNA 同源性的研究.....	(167)

CONTENTS

Studies on Monoclonal Antibodies Diagnosis Reagents Against Hog Cholera Virus	(11)
An Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies Specific For C Strain to Detect Antibodies to C Strain of Hog Cholera Virus.....	(16)
Studies on Attenuated Goat Pox Virus Vaccine The Immunization of Sheep With Goat Pox Vaccine.....	(21)
Replication of Live Attenuated ERA Strain of Rabies Virus and Initial Study on Its Biological Characteristics	(28)
Studies on the Production of Live Attenuated Rabies Vaccine (ERA/BHK21)	(33)
Studies on the Immunity Duration of Rabies Live Vaccine (ERA/BHK21)	(39)
Studies on an Inactivated Trivalent Vaccine Against Piglet E.Coli Diarrhea I. Isolation and Screening of Seed Beed Bacteria.....	(43)
Studies on an Inactivated Trivalent Vaccine Against Piglet E.Coli Diarrhea II. Bacterium Culture and Concentrating Method.....	(48)
Studies on an Inactivated Trivalent Vaccine Against Piglet E.Coli Diarrhea III. Vaccine Preparation and Initial Field Trial.....	(53)
Studies on an Inactivated Trivalent Vaccine Against Piglet E.Coli Diarrhea IV. Extensive Field Trial.....	(58)
Studies on an Inactivated Trivalent Vaccine Against Piglet E.Coli Diarrhea V. The Efficacy Test By Reverse Indirect Hemagglutination.....	(62)
The Efficacy of Oil-emulsion Leptospira Pomona Vaccine on Pigs.....	(68)
Determination of the Duration of the Immunity Produced in Pigs by Vaccination with Oil-emulsion Bivalent Leptospira Vaccine.....	(74)
Preventive effect of Oil-emulsion Bivalent Leptospira Vaccine in the Field.....	(79)
The Preservation Periods of Oil-emulsion Bivalent Leptospira Vaccine.....	(82)
Live Vaccine Against Mycoplasma Gallisepticum Infection in Chickens I. Evaluation of Pathogenicity of F Strain of M.Gallisepticum.....	(89)

Live Vaccine Against Mycoplasma Gallisepticum Infection in Chickens	
II. Evaluation of Immunogenicity of F Strain of M. Gallisepticum.....	(95)
The Research on Variant Clones of HVT Fc126.....	(111)
Effects of Mycoplasma Infection on Multiplication of Some Avian	
Vaccine Virus Strains in Vitro and Immune Response to NDV LaSota	
Strain in Vivo.....	(127)
Studies on Immunogenic Properties of Structural Proteins of	
Porcine Parvovirus.....	(138)
Studies on Monoclonal Antibodies Against Porcine Parvovirus and	
Availability of Monoclonal Antibodies in Detecting Antibody to	
Porcine Parvovirus on ELISA.....	(153)
Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Four	
Isolates of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV).....	(165)
Deoxyribonucleic Acid Homologies Among Organisms in the Genus	
Pasteurella	(175)

猪瘟单克隆抗体诊断试剂的研究

丘惠深 王在时 廖国安

(中国兽药监察所)

摘 要

应用淋巴细胞杂交瘤技术,研究出可以鉴别猪瘟兔化弱毒、强毒、牛病毒性腹泻病毒及绵羊边界病毒的特异性猪瘟兔化弱毒单抗及石门系强毒单抗。用亲和层析法制成单抗酶联试剂后,可区分疫苗注射血清、强毒感染血清、混合血清和猪瘟阴性血清。用强、弱毒单抗试剂分别对强、弱毒血清测得的结果与用荧光血清中和试验所得的结果基本一致。以弱毒单抗试剂测定弱毒猪血清的结果与用兔体血清中和试验所得的结果基本相符。田间应用试验结果也表明了这些单抗试剂的鉴别能力。

前 言

猪瘟的诊断对控制猪瘟的流行、减少经济损失极为重要。猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒以及羊边界病毒同属于披盖病毒科的瘟病毒属。Wensvoort, G.等报道,在野外条件下,牛病毒性腹泻病毒以及羊边界病毒也可感染猪⁽¹⁾。由于瘟病毒属病毒的共同抗原性,抗任何一种病毒的抗血清均与其他两种病毒产生交叉反应。因此,用常规方法制备的多克隆抗体血清,无法用于鉴别。在欧洲一些国家曾把猪的牛病毒性腹泻病毒感染误诊为猪瘟而加以扑杀。对猪瘟强毒自然感染与疫苗免疫血清抗体的区别也是研究者们力图解决的难题之一。采用淋巴细胞杂交瘤技术,生产出特异性的抗猪瘟单抗便可达到鉴别诊断的目的,可用于区分抗原和抗体,为配合控制与消灭猪瘟提供特异性的诊断试剂与方法,具有一定的理论意义与实用价值。

荷兰Wensvoort, G.等曾获13株抗Brescia株猪瘟病毒单抗,其中两株已用作猪瘟野毒株、中国疫苗株和牛病毒性腹泻病毒感染的实验室诊断⁽²⁾。德国Hess, R.G.等曾获得2株抗Alfort187株猪瘟病毒的单抗与2株抗NADL株牛病毒性腹泻病毒的单抗,可用于区分猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒⁽³⁾。在我国,我们先后报道了建立抗猪瘟兔化弱毒⁽⁴⁾和石门系猪瘟强毒⁽⁵⁾杂交瘤单抗的文章。尔后,周宗安等报道过建立抗猪瘟兔化弱毒杂交瘤单抗的文章⁽⁶⁾。

参加试验工作的还有金银珍同志,罗天赐同志参加部分试验工作。

材料与方法

(一) 抗猪瘟兔化弱毒单抗的制备与特异性鉴定

以经PEG浓缩及蔗糖密度梯度离心提纯的猪瘟兔化弱毒抗原免疫BALB/c小鼠。取免疫鼠脾细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞融合。用有限稀释法作3—4次克隆及ELISA方法筛选。将杂交瘤注入小鼠腹腔而产生腹水抗体。

以间接ELISA方法将11株单抗与猪瘟兔化弱毒、Thiverval株、猪瘟强毒株或分离物、牛病毒性腹泻病毒株及绵羊边界病病毒共14种样品进行试验。

(二) 抗石门系猪瘟强毒单抗的制备及特异性鉴定

用经PEG及差速离心浓缩、纯化的石门系猪瘟强毒免疫BALB/c小鼠。取免疫鼠脾细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞融合。以有限稀释法克隆並以ELISA法筛选。将杂交瘤细胞注入小鼠腹腔而产生腹水抗体。

以间接ELISA法与猪瘟强毒、兔化弱毒、牛病毒性腹泻病毒和绵羊边界病病毒等11种样品作用检查单抗与这些病毒的反应性。

(三) 抗猪瘟单抗酶联试剂的制备

分别将经硫酸铵沉淀浓缩的猪瘟弱毒单抗和强毒单抗结合于活化的 Sepharose 4B中, 装入柱后, 分别加入经PEG浓缩及超声波裂解的猪瘟弱毒及石门系猪瘟强毒进行处理。经单抗处理的样品, 作为抗猪瘟兔化弱毒及石门系强毒单抗试剂。

(四) 抗猪瘟单抗酶联试剂的测定方法

- 1、以pH9.6的碳酸盐缓冲液将单抗试剂作200倍稀释后包被于40孔酶联板的孔中, 每孔100 μ l;
- 2、用PBS—T缓冲液洗涤3次;
- 3、加入经400倍稀释的被检血清100 μ l, 同时设阳性及阴性血清对照, 37℃培育1.5—2小时;
- 4、用PBS—T缓冲液洗涤3次;
- 5、加入100倍稀释的兔抗猪IgG—过氧化物酶结合物100 μ l, 37℃培育1.5—2小时;
- 6、用PBS—T缓冲液洗涤3次;
- 7、加入邻苯二胺—过氧化氢底物液100 μ l, 显色并用2M H₂SO₄终止反应后, 以MR600型酶联读数仪测定490nm波长的OD值。

(五) 标准猪血清的制备

1、抗猪瘟兔化弱毒猪血清: 用本所自繁60日龄的同窝健康仔猪4头, 第1次以1头剂的猪瘟兔化弱毒免疫, 9周后以6头剂作第2次免疫。第1次免疫前采血, 免疫后每周采血1次, 直至第12周。

2、抗石门系猪瘟强毒猪血清: 用与1项相同的猪4头, 第1次接种0.5头剂的石门系猪瘟结晶紫苗, 第3、6、8及11周接种大剂量的石门系猪瘟血毒。接种前及接种后每周采

血,直至第13周。

3、抗猪瘟兔化弱毒、石门系猪瘟强毒混合猪血清:以1项的1头(1号)免疫猪,于第12周接种2头剂的石门系猪瘟强毒,每周采血1次,第17周放血,收集的血清为先免疫后攻毒的猪血清。

同样,以2项的1头(10号)接种强毒猪,于第13周接种20头剂的兔化弱毒。每周采血,第20周放血,制备的血清为先接种强毒后接种弱毒的混合血清。

4、未吸初乳猪血清:自本所未吸初乳健康仔猪4头及北京某猪场未吸初乳仔猪8头所采的血清。

(六) 猪瘟单抗酶联试剂对标准猪血清的鉴别试验

用抗猪瘟兔化弱毒及石门系强毒单抗试剂按上述测定程序对以上4种标准猪血清进行测定,观察其鉴别能力。

(七) 抗猪瘟单抗酶联试剂测定的符合试验

1、与荧光血清中和的比较:以弱毒单抗试剂测定2头兔化弱毒免疫猪的系列血清;以强毒单抗试剂测定2头接种猪瘟强毒的系列猪血清。血清抗体水平以OD值表示。

将弱毒免疫猪和强毒感染猪系列血清作倍数系列稀释,与固定量的猪瘟病毒中和后加到单层细胞片中,观察荧光斑的形成而确定血清抗体滴度。

2、与兔体血清中和试验的比较:以抗弱毒单抗酶联试剂测定弱毒免疫猪的系列血清,其抗体水平以OD值表示。同时用生理盐水对这些血清作适当的稀释,分别与等量的含100个家兔最小感染量的猪瘟兔化毒悬液混合中和后各注射家兔2只,设对照2只,观察体温反应测定血清滴度。将兔体血清中和试验的结果与弱毒单抗酶联测定的结果进行比较。

以相同方法比较广东、广西两生物药厂的235份猪瘟疫苗安全检验用猪血清样品。

(八) 抗猪瘟单抗酶联试剂的田间应用试验

分别用强、弱毒单抗酶联试剂同时检查从北京地区及广东省采集的猪血清2230份,以观察田间材料中各种抗体的分布情况。

结 果

(一) 抗猪瘟兔化弱毒单抗的产生与特异性

6次融合共获29株阳性杂交瘤,经克隆后筛选出17株杂交瘤并制成腹水抗体。

间接ELISA方法测定其中的11株单抗,有2株(MAb24及25)与所有被试的毒株或分离物反应,属群特异性。其余9株几乎均与被试的牛睾丸、羊肾、猪肾细胞兔化毒反应而不与石门系强毒株、Thiverval毒株反应,也不与光明农场、辽宁、郑州、79105分离毒株反应,更不与牛病毒性腹泻的Singer、Oregon、NADL株病毒、牦牛分离毒株以及绵羊边界病病毒反应。其中MAb10、11、18、20、21及22等6株单抗只与被试的14种瘟病毒样品中的兔化弱毒反应,属猪瘟兔化弱毒特异性单抗(见表1),并将MAb11用于制备单抗试剂。

(二) 抗石门系猪瘟强毒单抗的产生与特异性

共获41株阳性杂交瘤,经克隆、筛选后获16株单抗。间接ELISA测定结果(见表2)表

表 1 抗猪瘟兔化弱毒单抗与被试瘟病毒属毒株或分离物的反应性

[illegible]

表2 抗石门系猪瘟强毒单抗与被试瘟病毒属病毒的反应性

单 抗	石门系 强毒 CPK	猪 瘟 兔 化 弱 毒						牛病毒性腹泻病毒			绵羊边界病毒 NADC
		南京 猪肾	广东 牛肾	广东 羊肾	南京 牛肾	吉林 牛肾	成都 牛肾	Singer 株	Oregon 株	牦 牛 分离毒	
MAb 41	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
MAb 42	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 43	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MAb 44	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 45	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 46	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 47	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MAb 48	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 49	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MAb 51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MAb 52	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 53	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 54	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 55	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAb 56	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

明,所有16株单抗均与石门系猪瘟强毒产生阳性反应。其中2株(MAb50和51)几乎也与所有被试的兔化弱毒反应。14株单抗几乎均不与各株牛病毒性腹泻病毒及绵羊边界病病毒反应。将MAb56用于制备单抗试剂。

(三) 猪瘟单抗酶联试剂对标准猪血清的鉴别

1、对抗猪瘟兔化弱毒猪血清的鉴别:以抗弱毒单抗酶联试剂测定3头(1、9和13号猪)抗兔化弱毒猪血清的结果见图1的实线。免疫前(0周)抗体为阴性。免疫后3周内抗体水平无明显的增长。3周后显著提高,于5—7周时达到最高值。

以抗强毒单抗酶联试剂测定的结果见图1的虚线。免疫前均为阴性。免疫后也保持在较低水平。

由此可见,弱毒单抗酶联试剂可以识别弱毒猪血清,而强毒单抗酶联试剂则不能识别弱毒猪血清。

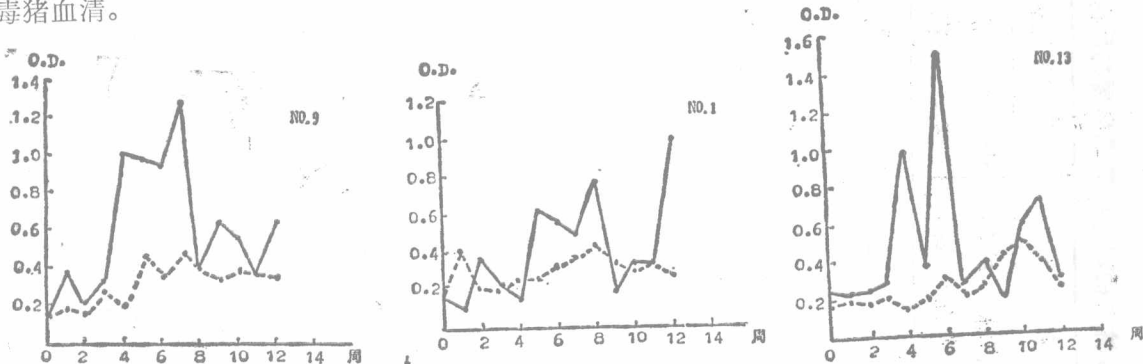


图1 用猪瘟兔化弱毒和强毒单抗酶联试剂测定兔化弱毒免疫猪不同时期的血清抗体

——弱毒单抗测定, ——强毒单抗测定

2、对抗石门系强毒猪血清的鉴别:以抗强毒单抗酶联试剂测定3头(7、8和10号猪)抗强毒猪血清的结果见图2的虚线。接种前(0周)均为阴性。6周前抗体水平较低,6周后上升到较高水平,且可维持到第12周左右。

以抗弱毒单抗酶联试剂测定的结果见图2的实线,接种前均为阴性。接种后直至第13周保持在较低的水平。

由此看出,强毒单抗酶联试剂可识别强毒猪血清,而弱毒单抗酶联试剂则不能识别。

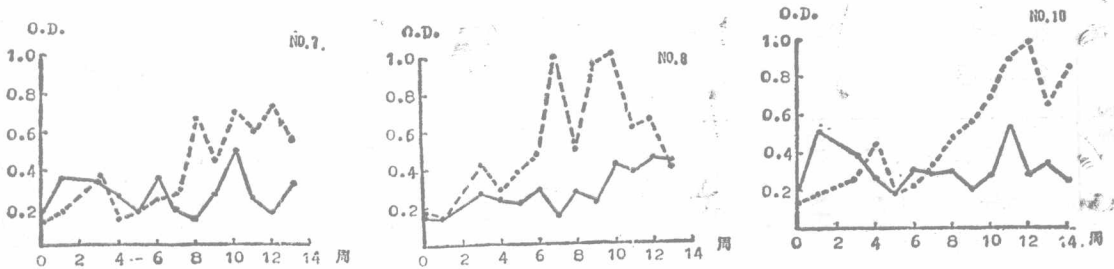


图2 用猪瘟兔化弱毒和强毒单抗酶联试剂测定石门系猪瘟强毒接种猪不同时期的血清抗体

体

——弱毒单抗测定, ——强毒单抗测定

3、对抗猪瘟兔化弱毒、石门系猪瘟强毒混合血清的鉴别：

图3（1号猪）第12周以后所采血清为先免疫弱毒后攻强毒的血清。此时以弱毒单抗酶联试剂测定仍测得高水平抗体（实线所示）。第12周以前由于不存在强毒抗体，故以强毒单抗酶联试剂测定时其值很低。第12周攻毒后，再以强毒单抗试剂便可测得强毒抗体，水平较高，且在攻击强毒1周后便产生（虚线所示）。

图3（10号猪）第13周以后所采的血清为先感染强毒后接种弱毒的血清。用强毒单抗试剂仍测得较高的强毒抗体水平（虚线所示）。第13周接种弱毒后，第14周以弱毒单抗试剂便测得很高的抗体水平（实线所示）。

以上结果，进一步证实了两种单抗酶联试剂识别各自相应抗体的能力。

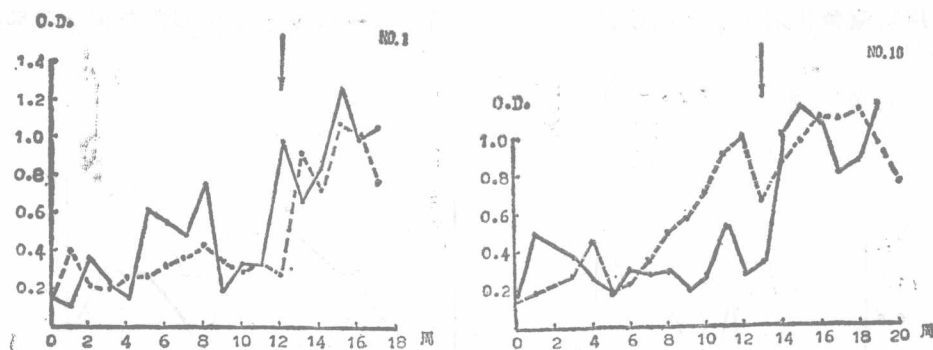


图3 用猪瘟兔化弱毒和强毒单抗酶联试剂测定先弱毒后强毒接种猪（1号猪）和先强毒后弱毒接种猪（10号猪）不同时期的血清抗体

——弱毒单抗测定，——强毒单抗测定，↓表示接种时间

4、对未吸初乳猪血清的鉴别：用强毒单抗酶联试剂测定12份未吸初乳仔猪血清均为阴性；用弱毒单抗酶联试剂测定也为阴性。

（四）抗猪瘟单抗酶联试剂测定的符合试验

1、与荧光血清中和试验的比较：

图4为两头（1与9号猪）猪瘟兔化弱毒免疫猪。实线所示是以弱毒单抗试剂测得的弱毒抗体曲线，虚线为免疫荧光中和试验测得的血清中和滴度。

图5为两头（6与10号猪）接种石门系强毒猪。实线为用强毒单抗试剂测得的结果，虚线为用免疫荧光中和试验测得的血清中和滴度。

从以上结果看，由弱毒单抗试剂测定弱毒血清抗体所得的结果或由强毒单抗试剂测定强毒血清抗体所得结果均与各自荧光血清中和试验所得结果基本一致。

2、与兔体血清中和试验的比较：

图6实线表示弱毒单抗试剂测定弱毒猪血清抗体的结果，虚线表示兔体血清中和试验的结果。从图看出，两种方法所得结果基本相符。

此外，从广东、广西两生物药厂获得235份猪瘟疫苗安全检验用猪血清，经生物药厂用兔体血清中和试验检测，血清抗体阴性207份（占88.1%），阳性28份（占11.9%）。

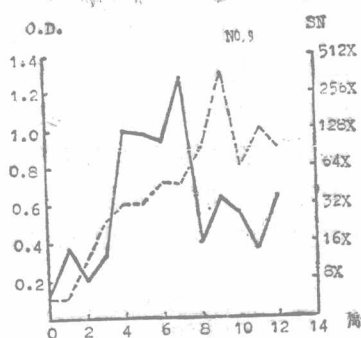
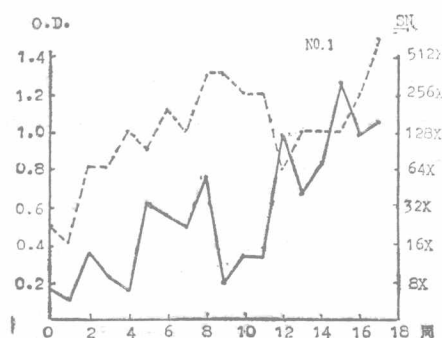


图4 用猪瘟兔化弱毒单抗酶联试剂和荧光血清中和试验测定兔化弱毒免疫猪不同时期的血清抗体

——弱毒单抗测定，——血清中和试验测定

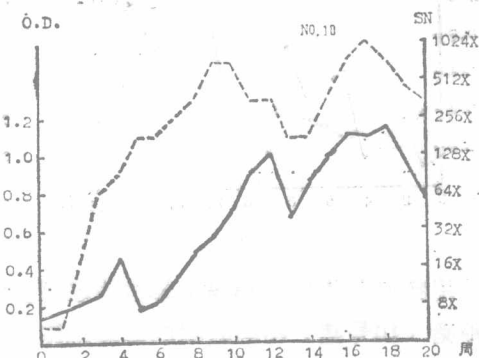
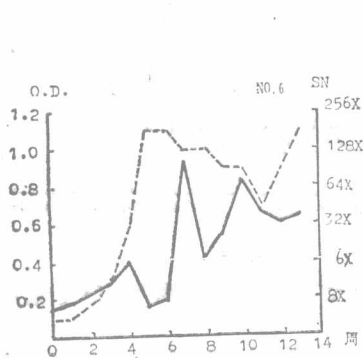


图5 用猪瘟强毒单抗酶联试剂和荧光血清中和试验测定石门系猪瘟强毒接种猪不同时期的血清抗体

——强毒单抗测定，——血清中和试验测定

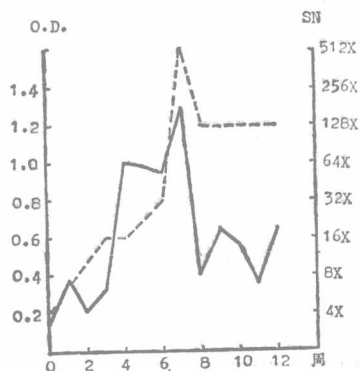


图6 用猪瘟强毒单抗酶联试剂与兔体血清中和试验测定抗猪瘟兔化弱毒血清抗体的比较

——表示猪瘟弱毒单抗酶联试剂测定结果，——表示兔体血清中和试验测定结果

经用猪瘟单抗试剂检测，弱毒抗体阴性血清 163份（占69.4%），阳性血清 72份（占30.6%）。两种方法均检出阴性和阳性的血清共175份（占总数的74.5%），但单抗酶联法比兔体血清中和法多检出44份（占18.7%）阳性血清，表明单抗酶联法的敏感度高于兔体中和法，结果见表3。其中，有8份生药厂检兔体中和阳性血清，用弱毒单抗试剂测定时为阴性；遂将此8份血清重用兔体中和测定全部为阴性；以荧光血清中和测定其中6份血清，也为阴性。

用强毒单抗试剂测定这 235份猪血清，均为阴性（见表4），说明这些猪未感染过猪瘟强毒。

**表3 猪瘟弱毒单抗酶联试剂
与兔体中和测定的结果**

弱毒单抗酶联试剂测定				
		+	-	合计
兔体 SN 测定	+	20	8	28
	-	52	155	207
	合计	72	163	235

**表4 猪瘟强毒单抗酶联试剂
与兔体中和测定结果**

强毒单抗酶联试剂测定				
		+	-	合计
兔体 SN 测定	+	0	28	28
	-	0	207	207
	合计	0	235	235

（五）抗猪瘟单抗酶联试剂的田间应用

检查北京及广东猪血清2230份，其中免疫注射猪血清1661份，占74.5%；自然感染猪血清302份，占13.5%；猪瘟阴性血清267份，占12.0%。用强毒单抗酶联试剂在 1661 份注苗血清中又检出 372 份阳性，属混合血清，占被检总数的16.7%。

讨 论

1、本研究筛选的抗石门系猪瘟单抗虽与猪瘟兔化弱毒有交叉反应但不与牛病毒性腹泻病毒及绵羊边界病毒反应，而且所选的抗兔化弱毒单抗具有对兔化弱毒的特异性，两种单抗结合使用仍可区分强、弱毒抗原。

2、在制备标准血清时，有2头猪接种前经兔体中和检查为阴性，但以猪瘟单抗试剂测定为阳性，分别接种兔化弱毒和石门系强毒所制成的抗弱毒和强毒血清抗体，用各自的单抗试剂测定产生交叉反应。

3、健康猪在注射兔化弱毒后3周内，用单抗试剂或兔体中和测得的血清抗体水平虽较低，但此时能耐受强毒的攻击。

4、在检测猪瘟疫苗安全检验用猪血清时，单抗酶联法比兔体中和法多检出18.7%的阳性，说明前法比后法更为灵敏，检出阳性率高，有利于严格选择检验用猪，且单抗酶联法省时、省力、降低费用。

广东生物药厂为本研究提供猪瘟兔化毒培养物及安全检验用猪血清，广西生物药厂提供安全检验用猪血清，广东省兽医防疫检疫站、华南农大兽医学院、北京市诊断所提供田间猪血清样品，一并表示谢意。

主要参考文献

- 1、Wensvoort,G.et al: Veterinary Science, 1988, 45 : 142~148.
- 2、Wensvoort,G.et al: Veterinary Microbiology, 17 (1988) 129~140.
- 3、Hess, R.G.et al: Veterinary Microbiology, 16 (1988) 315~321.
- 4、丘惠深等: 《中国畜禽传染病》生物技术专辑, 1988, P82~85.
- 5、丘惠深等: 《中国畜禽传染病》1990, 1 : 44~45.
- 6、周宗安等: 《兽医大学学报》1989, 3 : 242~246.

STUDIES ON MONOCLONAL ANTIBODIES DIAGNOSIS REAGENTS AGAINST HOG CHOLERA VIRUS

Qiu Huishen Wang Zaishi Liao Guoan

The National Control Institute of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals

Summary:

The monoclonal antibodies specific for C strain and Shimen virulent strain of Hog Cholera Virus (HCV) were prepared by hybridoma technology. The C strain of HCV, Shimen strain of HCV, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and boder disease virus (BDV) can be differentiated by these monoclonal antibodies. The diagnostic antigens against C and virulent strain of HCV respectively were prepared by immuno-affinity purification with the appropriate monoclonal antibodies. These purified antigens can differentiate the swine anti- C strain hyperimmune serum, anti-virulent strain hyperimmune serum, anti- C and virulent strains compound sera and HCV negative serum. The results of swine anti- C strain hyperimmune serum and anti-virulent strain hyperimmune serum examined by the purified antigens coincided with that by IFA-SN test. Similar results were also obtained in SN test in rabbits. The results from field diagnosis also confirmed of these monoclonal antibody diagnosis reagents.

利用单克隆抗体检测猪瘟疫苗 抗体的酶联免疫吸附试验

廖国安 王在时 丘惠深

(中国兽药监察所)

摘 要

本文报道应用抗猪瘟疫兔化弱毒单克隆抗体通过亲和层析法纯化猪瘟疫兔化弱毒抗原建立的酶联免疫吸附试验(简称 HCLV—MAb—ELISA)。利用该法检测了 12 份未吃初乳仔猪血清、235 份安检用猪血清和 226 份免疫前后不同时期的血清抗体,并与兔体血清中和试验(兔体 SN)进行了相关性分析。结果表明,该法敏感性高,特异性强,与兔体 SN 呈显著正相关($r=0.8032$, $P<0.05$)。本法可准确反应免疫猪群的抗体应答水平,且快速简便、易于推广。

前 言

在猪瘟疫(Hog Cholera)的鉴别诊断和免疫抗体监测上,虽报道过许多方法,如琼脂双扩散试验、补体结合试验、免疫荧光抗体技术、间接过氧化物酶抗体技术、酶联免疫吸附试验等,但由于瘟疫病毒属具有共同的抗原决定簇,在这些方法中往往产生广泛的交叉反应,不能把猪瘟疫强毒感染和免疫接种产生的抗体以及与牛病毒性腹泻病毒(BVDV)抗体或绵羊边界病病毒(BDV)抗体区别开。为了解决这一问题,我们先后研制了抗猪瘟疫兔化弱毒单克隆抗体⁽¹⁾和抗猪瘟疫强毒单克隆抗体⁽²⁾。本文报道利用抗猪瘟疫兔化弱毒单克隆抗体的酶联免疫吸附试验(HCLV—MAb—ELISA)检测猪瘟疫疫苗免疫后的血清抗体,并与常规兔体血清中和试验(兔体 SN)进行了比较。

材料和方法

(一) 抗猪瘟疫兔化弱毒单抗酶联试剂(HCLV—MAb试剂)

HCLV—MAb 试剂是利用抗猪瘟疫弱毒单克隆抗体通过亲和层析法纯化的猪瘟疫弱毒抗原,在本试验中作为包被用抗原。以 UV—02 紫外分光光度计测得蛋白质含量为 0.5mg/ml 。以方阵滴定法测定最适包被浓度。

参加本试验工作的还有金银珍同志。

(二) 兔抗猪IgG—酶结合物制备

兔抗猪IgG为本实验室以前制备。参照郭春祥(1983)⁽³⁾介绍的过碘酸钠法,以辣根过氧化物酶($R_z=3.1$, Sigma)标记兔抗猪IgG。测定最佳工作浓度。

(三) 血清

1、参考阴性血清:采自本所和北京某猪场未吃初乳仔猪血清,共12份。经IFA证实为猪瘟抗体阴性。

2、安检用猪血清235份:由广东、广西生物药品厂提供。经厂方兔体SN检测,阳性血清28份,阴性血清207份。

3、免疫猪系列血清57份:选本所60日龄无母源抗体的同窝健康猪4头,以1个剂量的猪瘟兔化弱毒免疫,9周后加强免疫。免疫前及免疫后每周采血1次,直至第12周,共采集57份。

4、野外血清169份:包括本所喘病实验猪,经猪瘟疫苗免疫后2个月和5.5个月血清20份;北京某猪场免疫猪血清116份,种公猪及临产前、后母猪血清33份。

(四) HCLV—Mab—ELISA检测程序

1、以 $0.05M$ pH9.6碳酸盐缓冲液将HCLV—Mab试剂按最适包被浓度包被于聚苯乙烯微量反应板(40孔)孔中,每孔 $100\mu l$,置湿盒中于 $4^{\circ}C$ 过夜。用PBS(pH7.4)—Tween 20缓冲液洗涤3次,每次间隔3分钟。

2、加入一定稀释度的被检血清 $100\mu l$,同时设阳性、阴性对照。 $37^{\circ}C$ 培育1.5—2小时。同上洗涤。

3、加入一定稀释度的兔抗猪IgG—酶结合物 $100\mu l$, $37^{\circ}C$ 培育1.5—2小时。同上洗涤。

4、加入新鲜配制的邻苯二胺—过氧化氢底物溶液 $100\mu l$ 。室温显色反应约10—30分钟。

5、加入 $2M$ 硫酸 $50\mu l$ 终止反应。用MR600型酶联读数仪测定OD₄₉₀值。

(五) HCLV—Mab—ELISA和兔体SN的相关性分析

选用一头免疫猪(9号)的系列血清(8份),用兔体SN(按《兽医生物制品制造及检验规程》方法)和HCLV—Mab—ELISA测定血清抗体效价,进行相关性分析。

结 果

(一) HCLV—Mab—ELISA法标准化

1、兔抗猪IgG—酶结合物最适工作浓度测定:以碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释猪IgG($50\mu g/ml$)加入ELISA反应板孔中,每孔 $100\mu l$, $4^{\circ}C$ 过液,洗涤。然后按ELISA程序,测定兔抗猪IgG—酶结合物最适工作浓度为1:100,此浓度OD值为1.0左右。

2、HCLV—Mab试剂和血清最适稀释度测定:将HCLV—Mab试剂稀释成100、50、25和 $12.5\mu g$,包被于ELISA反应板孔中,每孔 $100\mu l$ 。将血清按1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600稀释,以ELISA程序用方阵滴定法测定。结果HCLV—Mab试剂最适包被浓度为 $50\mu g$ (约1:200),血清最适稀释度为1:400。

3、HCLV—Mab—ELISA阳性分界值的确定:将207份安检用猪血清(兔体SN为阴