

# 兔体中和试验用猪瘟病毒阴、阳性血清 国家参考品的研制

戴志红, 蒋 卉, 关孚时, 孙海燕, 李 翠, 张秀英, 张瑞婷, 张立春, 王在时\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-08-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0013-04 [中图分类号] S852.651

**[摘 要]** 为制备和标定兔体中和试验用猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品, 本试验制备了猪瘟病毒阴性、弱阳性和强阳性血清, 通过过滤、分装、冻干、熔封, 获得 3 亚批候选物, 并进行了检验、协作标定和定值。结果显示: 物理性状、无菌检验、安全检验、支原体检验、真空度测定、均匀性检验和保存有效期试验均合格; 剩余水分均小于 4%; 特异性检验结果均为口蹄疫、伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒病、牛病毒性腹泻/粘膜病抗体阴性, 并且弱阳性和强阳性血清能中和猪瘟兔化弱毒而阴性血清不能中和; 残余猪瘟病毒免疫荧光和套式 RT-PCR 核酸检测结果均为阴性; 经协作标定定值, 其兔体中和效价分别为: 阴性、 $1:10^{0.928 \pm 0.103}$ 、 $1:10^{2.928 \pm 0.103}$ , 表明该候选物可以作为国家参考品。

**[关键词]** 猪瘟病毒; 血清; 国家参考品; 兔体中和试验

## Preparation of National Reference Materials for Negative and Positive Sera of Classical Swine Fever Virus for Neutralization Test in Rabbits

DAI Zhi-hong, JIANG Hui, GUAN Fu-shi, SUN Hai-yan, LI Cui, ZHANG Xiu-ying,  
ZHANG Rui-ting, ZHANG Li-chun, WANG Zai-shi\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To prepare and characterize national reference materials for negative and positive sera of classical swine fever virus (CSFV) for neutralization test in rabbits, negative, weak and strong positive sera of CSFV were prepared, collected, filtrated, filled, freeze-dried, and sealed. The three sub-batches of candidates were tested, collaborative studied and characterized. The results were as follows. Character, sterility, safety, mycoplasmas, vacuum degree, homogeneity and storage: the candidates passed all the examinations. Residual moisture: all less than 4%. Specific: antibodies against foot and mouth disease, pseudorabies, porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine parvovirus and bovine viral diarrhoea-mucosal disease were all negative; while weak and strong positive antisera of CSFV could neutralize CSFV (lapinized strain), but negative antisera could not. Remainder of CSFV: IFA and nested RT-PCR results were all negative. Collaborative study and characterization: neutralization titers tested in rabbits were negative,  $1:10^{0.928 \pm 0.103}$  and  $1:10^{2.928 \pm 0.103}$ . It could be concluded that the candidates could be used as national reference materials.

**Key words:** classical swine fever virus; serum; national reference materials; neutralization test in rabbits

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD06A10); 农业部农产品质量安全监管专项(2130109)

作者简介: 戴志红, 博士, 助理研究员, 从事兽药标准物质及分子病毒学与免疫学研究。E-mail: daizhihong@ivdc.gov.cn

通讯作者: 王在时。E-mail: wangzaishi@ivdc.gov.cn

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)引起的一种高度接触性、致死性的猪传染病,在世界上很多国家和地区均有发生<sup>[1-2]</sup>,给畜牧业生产带来了严重的经济损失。世界动物卫生组织(OIE)将猪瘟列为法定通报性疫病<sup>[3]</sup>,我国将其划为一类动物传染病<sup>[4]</sup>,并纳入重大动物疫病防控计划。兔体中和试验是我国检测猪瘟病毒抗体检测的重要法定方法之一,猪瘟兔化弱毒种毒特异性检验和猪瘟活疫苗鉴别检验的法定方法也是兔体中和试验<sup>[5-6]</sup>,但该试验的敏感度、准确性易受人员、试剂、实验动物等诸多因素的影响。而兔体中和试验用猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品则是控制和校准该试验的实物“标尺”。因此,需及时研制该国家参考品。

根据WHO<sup>[7]</sup>和国家一级标准物质技术规范<sup>[8]</sup>规定,标准物质的定值方式有4种:绝对测量法、用两种不同原理的可靠方法测量法、溯源法、多个实验室协作标定定值法。本研究按照相关程序和要求制备兔体中和试验用猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品,并进行了协作标定定值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 种毒和细胞 CSFV 石门株(F114)、猪瘟兔化弱毒种毒(F480)、PK-15 细胞(F145),由中国兽医药品监察所鉴定、保存。

1.1.2 主要试剂和耗材 猪瘟活疫苗(兔源),由乾元浩生物股份有限公司提供;猪瘟 ELISA 抗体检测试剂盒,Idexx 公司;猪瘟荧光抗体,由中国兽医药品监察所制备;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、RNasin、RNase Free Water、RNA 提取试剂 TRIzol Reagent、反转录酶 SSⅢ, Invitrogen 公司;MEM 培养基、胎牛血清、胰酶, Gibco BRL 公司;48 孔细胞培养板, CoStar 公司。

1.1.3 实验动物 普通健康非免疫猪,20 kg 左右,购于内蒙某猪场,经农业部兽医诊断中心检测为口蹄疫、伪狂犬病、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒病、牛病毒性腹泻/粘膜病病原抗体阴性(病原用 PCR 或 RT-PCR 方法检测,抗体用 ELISA 方法检测),饲养于隔离动物室内待用;18 ~ 22 g 小白鼠、1.5 ~ 3 kg 日本大耳白兔、350 ~ 400 g

豚鼠,均为清洁级,北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫原制备 按文献方法<sup>[5]</sup>在强毒隔离动物室制备, -20 ℃ 以下冻存备用。

#### 1.2.2 候选物制备

1.2.2.1 阴、阳性血清制备 将非免疫猪颈动脉采血致死,按常规方法分离制备阴性血清;将非免疫猪免疫猪瘟兔化弱毒疫苗 2 头份,3 周后采血样分离血清,经猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒检测抗体效价  $\geq 1:2$ ,将其颈动脉采血致死,按常规方法分离制备弱阳性血清;按文献方法<sup>[5]</sup>在强毒隔离动物室强化免疫动物后,将其颈动脉采血致死,按常规方法分离制备强阳性血清。所有血清 -20 ℃ 以下冻存备用。

1.2.2.2 血清过滤、分装、冻干、熔封 将 3 亚批血清分别先经 0.4  $\mu\text{m}$  无菌滤膜加压过滤,再经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜加压过滤;随后用瓶颈分液器(分装精度为  $\pm 0.01 \text{ mL}$ )无菌分装至 1 mL 灭菌长安瓿,分装过程中用搅拌子低速搅拌血清;按常规方法冻干、抽真空、熔封。将阴性、弱阳性、强阳性血清批号分别确定为 200905-1、200905-2、200905-3

### 1.3 候选物检验

1.3.1 物理性状 每亚批随机抽取 5 支样品,观察颜色和形状,再打开安瓿加去离子水(可以低速涡旋或用移液器轻轻吹打),记录溶解所需时间和溶解后性状。

1.3.2 无菌检验、安全检验、支原体检验、真空度测定 随机抽取规定数量的样品,按文献<sup>[6]</sup>中的相应方法进行。

1.3.3 剩余水分测定 采用真空干燥法<sup>[6]</sup>。

1.3.4 均匀性检验 每亚批随机抽取 16 支血清复溶,其中 1 支取样 10 次,其余各支取样 1 次<sup>[9-10]</sup>,用猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒一次检测所有取样的  $OD_{450}$  值,再进行  $t$  检验和  $F$  检验<sup>[11-12]</sup>。

1.3.5 保存有效期试验 按文献<sup>[13-15]</sup>方法进行,随机抽取 40 支血清样品,分别在 25、37、45、56 ℃ 下保温,分别于 0 ~ 24 周随机抽取 1 支样品,按照 1:400、1:450 ~ 1:800 系列稀释,用猪瘟抗体 ELISA 检测试剂盒检测其效价(最大阳性稀释倍

数)。将不同温度下的加速稳定性数据按公式(1): $\ln c = \ln c_0 - kt$  拟合线性回归方程,求出不同温度下的  $k$  值;再将  $k$  值按公式(2): $\ln k = -Ea/RT + \ln A$  拟合线性回归方程,求出  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下的  $k$  值;最后根据  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下的  $k$  值及公式(1),计算出样品效价由初始效价降低到目标效价所需的时间,即贮存有效期。

1.3.6 特异性检测 每亚批随机抽取 5 支样品,同一亚批复溶混合后委托农业部兽医诊断中心进行口蹄疫、伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒病、牛病毒性腹泻/粘膜病抗体检测(均用 ELISA 方法进行)。另外,将 3 亚批血清加 1 mL 生理盐水复溶后,分别加入等量已稀释至 100 兔体感染量(Rabbit infection dose, RID)/mL 的猪瘟兔化弱毒种毒,置  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  中和 2 h,期间振摇 3 次。同时设生理盐水和空白对照。中和结束后,分别接种大耳白兔 2 只,每只耳缘静脉接种 1 mL。按文献方法<sup>[6]</sup>测温 and 判定热反应。

1.3.7 残余 CSFV 检测 将 200905-2 和 200905-3 亚批血清各随机抽取 5 支样品,同一批次复溶混合后按文献方法<sup>[16-17]</sup>分别进行免疫荧光和套式 RT-PCR 检测,以 CSFV 兔化弱毒株作阳性对照,以 PBS 作阴性对照。

1.4 协作标定和定值 在本实验室进行 2 次独立试验,同时将样品分发至 5 家单位分别进行 2 次独立试验。将 200905-1 亚批血清不稀释,200905-2 亚批血清 1:4~1:16 倍比稀释,200905-3 亚批血清 1:400~1:1600 倍比稀释,与等量稀释至 100 RID/mL 的猪瘟兔化弱毒种毒混合,置  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  中和 2 h,期间振摇 3 次;同时设立种毒阳性对照(50 RID/mL)、阴性对照(3 亚批血清的所有稀释度)和空白对照(生理盐水)。中和结束后,分别接种大耳白兔 2 只,每只耳缘静脉接种 1 mL。按文献方法<sup>[6]</sup>测温 and 判定热反应,并计算血清的中和效价。回收所有数据,用狄克逊(Dixon)法剔除数据中的异常值<sup>[11]</sup>,再用 Excel 2010 计算几何平均数和标准差。

## 2 结果

2.1 物理性状 所有安瓿内容物均呈灰白色团块,加去离子水后在 10 min 之内溶解,溶解后为淡

黄色澄明液体。

2.2 无菌检验、安全检验、支原体检验、真空度测定、均匀性检验、保存有效期试验 结果均符合规定。

2.3 剩余水分测定 采用真空干燥法对抽取样品进行了剩余水分测定,结果水分含量均低于 4%(表 1)。

| 表 1 血清剩余水分含量 |      |     |     | %   |
|--------------|------|-----|-----|-----|
| 批号           | 测定次数 |     |     |     |
|              | 1    | 2   | 3   | 4   |
| 200905-1     | 1.8  | 1.9 | 2.0 | 2.2 |
| 200905-2     | 2.1  | 1.6 | 1.2 | 1.2 |
| 200905-3     | 2.9  | 2.7 | 2.6 | 3.9 |

2.4 特异性检验 3 亚批样品经农业部兽医诊断中心检测,结果口蹄疫、伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒病、牛病毒性腹泻/粘膜病 ELISA 抗体均为阴性。除 200905-1 血清与种毒中和后引起家兔体温反应外,200905-2、200905-3 血清与种毒中和后均不引起家兔体温反应。

2.5 残余 CSFV 检测 将样品复溶后分别接种 PK-15 细胞并盲传 3 代,再进行免疫荧光染色,结果均为阴性;将样品复溶后进行套式 RT-PCR 核算检测,结果均为阴性(图 1)。

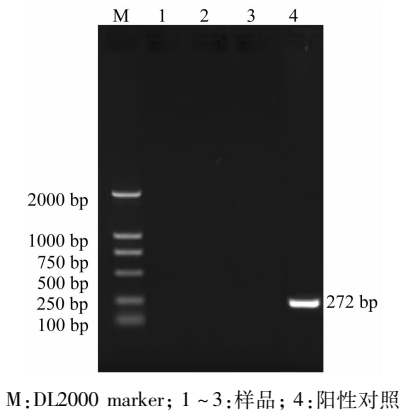


图 1 套式 RT-PCR 扩增结果

2.6 协作标定 回收所有数据,分别计算血清效价,经狄克逊(Dixon)检验,所有数据均保留(表 2)。

## 3 讨论

兔体中和试验影响因素较多,试验结果易存在较大误差,有时为获得满意结果不得不重复进行实验。兔体中和试验用猪瘟阴、阳性血清国家参考品的使用,则有助于使用单位控制和校准该试验,分析和查找各自试验的不稳定因素,提高该试验的能力和水平。目前我国猪瘟活疫苗的效力检验是用

表2 协作标定结果

| 批次       | 协作单位            | 效价                    |                       |
|----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
|          |                 | 1                     | 2                     |
| 200905-1 | 中国兽医药品监察所       | 阴性                    | 阴性                    |
|          | 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 | 阴性                    | 阴性                    |
|          | 金宇保灵生物药品有限公司    | 阴性                    | 阴性                    |
|          | 广西丽原生物股份有限公司    | 阴性                    | 阴性                    |
|          | 福州大北农生物技术有限公司   | 阴性                    | 阴性                    |
|          | 南京天邦生物科技有限公司    | 阴性                    | 阴性                    |
| 200905-2 | 中国兽医药品监察所       | 1:10 <sup>0.978</sup> | 1:10 <sup>0.828</sup> |
|          | 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 | 1:10 <sup>0.978</sup> | 1:10 <sup>0.828</sup> |
|          | 金宇保灵生物药品有限公司    | 1:10 <sup>0.753</sup> | 1:10 <sup>0.753</sup> |
|          | 广西丽原生物股份有限公司    | 1:10 <sup>0.978</sup> | 1:10 <sup>0.978</sup> |
|          | 福州大北农生物技术有限公司   | 1:10 <sup>1.054</sup> | 1:10 <sup>0.978</sup> |
|          | 南京天邦生物科技有限公司    | 1:10 <sup>0.978</sup> | 1:10 <sup>1.054</sup> |
| 200905-3 | 中国兽医药品监察所       | 1:10 <sup>2.978</sup> | 1:10 <sup>2.978</sup> |
|          | 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 | 1:10 <sup>2.828</sup> | 1:10 <sup>2.978</sup> |
|          | 金宇保灵生物药品有限公司    | 1:10 <sup>2.753</sup> | 1:10 <sup>2.978</sup> |
|          | 广西丽原生物股份有限公司    | 1:10 <sup>3.054</sup> | 1:10 <sup>3.054</sup> |
|          | 福州大北农生物技术有限公司   | 1:10 <sup>2.828</sup> | 1:10 <sup>3.054</sup> |
|          | 南京天邦生物科技有限公司    | 1:10 <sup>2.828</sup> | 1:10 <sup>2.828</sup> |

注:200905-1 血清为阴性;经统计计算,200905-2 血清中和效价 1:10<sup>0.928±0.103</sup>;200905-3 血清效价为 1:10<sup>2.928±0.103</sup>。

兔体实验测定兔体感染量来进行的,该试验同样易受人员、环境、动物等因素影响而存在较大误差。若应用该参考品来测定疫苗的兔体感染量,则可以减少误差或校准使用单位的检验体系。此外,该参考品也可以用于实验室能力验证或人员能力比对等。

致谢: 金宇保灵生物药品有限公司赵丹彤、石宝兰、关永梅、张慧芳、哈斯,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所刘景利、马迪杨、李伟杰,福州大北农生物技术有限公司陈庆、张工,南京天邦生物科技有限公司侯军、高云飞、陶庆园、代志新,广西丽原生物股份有限公司黄庆南、肖华春等同志参与了协作标定,在此一并表示谢意!

参考文献:

[1] Edwards S,Fukusho A,Lefèvre P C,*et al.* Classical swine fever; the global situation [J]. Vet Microbiol, 2000, 73 (2/3): 103-119.

[2] Domenech J,Lubroth J,Eddi C,*et al.* Regional and international approaches on prevention and control of animal trans boundary and emerging diseases[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1081:90-107.

[3] [http://www.oie.int/eng/maladies/en\\_classification2010.htm?elid7\[2010-1-4\]](http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2010.htm?elid7[2010-1-4]).

[4] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告(第1125号)[S].

[5] 农业部第四届兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000年版)[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2010年版三部)

[M]. 北京:中国农业出版社,2010.

[7] World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO Technical Report Series, No. 932, 2006.

[8] 国家标准物质管理委员会. 一级标准物质技术规范(JJG1006-94)[S].

[9] VanderVeen A M H,Linsinger T P,Pauwels J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study[J]. Accred Qual Assur,2001,6:26-30.

[10] Linsinger T P,Pauwels J,VanderVeen A M H,*et al.* Homogeneity and stability of reference materials[J]. Accred Qual Assur,2001,6:20-25.

[11] 全浩. 标准物质及其应用技术[M]. 北京:中国标准出版社,2003.

[12] 蒋子刚,顾雪梅. 分析测试中的数理统计与质量保证[M]. 上海:华东化工学院出版社,1991.

[13] Kirkwood T B. Predicting the stability of biological standards and products[J]. Biometrics,1977,33(4):736-742.

[14] Marina C R,Fernando R Q,Luis F,*et al.* Determination of product shelf life and activation energy for tumor necrosis factor-α in cerebrospinal for tumor necrosis factor-α in cerebrospinal fluid samples[J]. Clin Chem,1996,42(5):670-674.

[15] Peleg M,Normand M D,Corradini M G. The arrhenius equation revisited[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2012,52(9):830-851.

[16] 戴志红,赵耘,谢磊,等. 猪瘟病毒检测技术规程[A]. 兽医微生物菌种资源标准化整理整合及共享试点项目组. 兽医微生物菌种资源描述规范及技术规程[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008.

[17] 戴志红,赵耘,宁宜宝,等. 猪瘟病毒 FJFQ-39 株的毒力鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2008,30(9):694-698.

(责任编辑:侯向辉)