

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.03

# 2016 – 2018 年吉林地区猪流行性腹泻 仔猪小肠组织灭活液免疫效果研究

沙万里<sup>1,2</sup>, 闫满<sup>1</sup>, 丛薇<sup>3</sup>, 刘东旭<sup>1,2</sup>, 尹柏双<sup>1,2</sup>, 李国江<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林省预防兽医学重点实验室, 吉林吉林 132101;

3. 永吉县动物疫病预防控制中心, 吉林吉林 132100)

[收稿日期] 2019-06-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019)11-0016-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为分析吉林地区猪流行性腹泻(PED)流行与爆发原因及采取有效紧急防治措施, 试验选取吉林地区 150 份疑似 PEDV 阳性样本, 结合临床症状与病理剖检变化、胶体金试纸及 RT-PCR 检测等方法综合判定并筛选阳性样本, 通过抗原灭活制备小肠组织灭活液, 将 72 头产前 90 d 妊娠母猪分成原疫苗组和组织灭活液组, 组织灭活液组分别于产前 70 d 和 35 d 后背穴注射灭活液 4 mL/头, 与原疫苗组对比分析免疫效果。结果显示, 三个试验场组织灭活液组比原疫苗组发病率分别从 68.5%、71.4%、58.7% 下降到 8.5%、16.1%、7.7%; 死亡率从 60.1%、68.3%、53.1% 下降到 8.5%、16.1%、7.7%。结果表明, PEDV 阳性场两种免疫制剂阳性率均达到 83% 以上, 但试验制备的猪流行性腹泻仔猪小肠组织灭活液具有较好的综合免疫效果。

**[关键词]** 猪流行性腹泻; 组织灭活; 免疫效果

## Study on Immune Effect of Inactivated Solution in Small Intestine of Piglets with Epidemic Diarrhea in Jilin Area from 2016 to 2018

SHA Wan-li<sup>1,2</sup>, YAN Man<sup>1</sup>, CONG Wei<sup>3</sup>, LIU Dong-xu<sup>1,2</sup>, YIN Bai-shuang<sup>1,2</sup>, LI Guo-jiang<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101, China;

2. Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Jilin Province, Jilin, Jilin 132101, China;

3. Yongji County Animal Disease Prevention and Control Center, Jilin, Jilin 132100, China)

Corresponding author: LI Guo-jiang, E-mail: jlliguojiang@126.com

**Abstract:** In order to analyze the causes of epidemic and outbreak of pig epidemic diarrhea (PED) in Jilin area and thus take effective emergency prevention and control measures, 150 suspected PEDV positive samples were selected in this experiment, combined with clinical symptoms and pathological changes, colloidal gold test paper

基金项目: 吉林市科技创新发展计划项目资助(201750218); 校企横向课题(横 20190026)

作者简介: 沙万里, 硕士, 从事动物微生态与黏膜免疫研究。

通讯作者: 李国江。E-mail: jlliguojiang@126.com

and RT-PCR detection. The positive samples were comprehensively identified and screened. The inactivated solution of small intestine tissue was prepared by antigen inactivation. 72 pregnant sows at 90 days before delivery were divided into original vaccine group and tissue inactivated solution group. The inactivated liquid 4 mL/head was injected into Haiacupoint 70 days and 35 days before delivery, respectively. The immune effect was compared with that of the original vaccine group. The results showed that the incidence of inactivated fluid group decreased from 68.5%, 71.4%, 58.7% to 8.5%, 16.1%, 7.7%, and the mortality rate decreased from 60.1%, 68.3%, 53.1% to 8.5%, 16.1% and 7.7%, respectively. The results showed that the positive rate of the two kinds of immune preparations in the positive field of PEDV was higher than 83%. But the small intestinal tissue inactivated liquid of the pig epidemic diarrhea piglets prepared by the test has a better comprehensive immune effect.

**Key words:** PED; tissue inactivation; the immune effect

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是导致仔猪腹泻死亡的主要原因之一, 2012-2017 年全国各地区呈爆发趋势且防治效果不明显<sup>[1]</sup>。PED 最明显特点是 3~7 日龄新生仔猪高发, 临床表现为严重腹泻、呕吐、脱水, 是致死率极高的肠道传染病<sup>[2]</sup>。由于猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 为有囊膜不分节段单股正链 RNA 的结构特点<sup>[3]</sup>, 研究发现 S 基因存在核苷酸插入与缺失及氨基酸突变、ORF3 基因存在氨基酸变异<sup>[4-5]</sup>。部分地区 PEDV 流行株调查情况显示, 国内大部分流行株亲缘关系较近, 与疫苗株 CV777、中国早期分离株 CH/S、韩国流行株 DR13、泰国流行株 TH/AY/2.7/12、日本株 14JM/01 等亲缘关系较远<sup>[6]</sup>, 这可能是导致疫苗免疫效果不佳、PED 暴发流行的主要原因。本研究通过 PEDV 胶体金试纸、RT-PCR 检测及临床症状与病理剖检相结合作为诊断方法, 通过筛阳性样本制备小肠组织灭活液, 与原使用疫苗对比, 评价免疫效果, 为进一步验证 PEDV 流行株的遗传变异和分析 PED 的暴发流行及提供紧急防治措施提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 样品来源及实验动物 样品来自 2016 年 1 月-2018 年 5 月间, 分布在吉林市、永吉、桦甸、舒兰、蛟河、磐石地区 3~7 日龄仔猪发生严重腹泻、

呕吐、脱水和死亡的 30 个猪场 150 份完整肠道样本, 保存于吉林农业科技学院 (吉林省猪生态养殖及疫病防控科技创新中心) -80 °C 冰箱; 清洁级昆明鼠 30 只; 产前 90 d 妊娠母猪 72 头 (校企合作产学研基地 PEDV 阳性场)。

1.2 主要试剂 PEDV 胶体金检测卡 (韩国金诺)、组织 DNA/RNA 基因组提取试剂盒 (日本 TaKaRa9766)、反转录试剂盒 (TaKaRa 6210A)、EX Tap 聚合酶 (日本 TaKaRa)、琼脂糖 (西班牙 BIOWEST); PDEV ELISA 抗体检测试剂盒 (北京飞凯)、50 × TAE (北京博奥拓达)、0.9% 生理盐水、0.4% 甲醛、双抗、LB 培养基等均为国产化学试剂。

1.3 PEDV 胶体金试纸检测 将病料置于 4 °C 条件下解冻, 用棉签采集肠内容物放入 PEDV 检测样品稀释管 (含稀释液) 中充分混匀, 吸取上清液 4~5 滴至试纸条加样孔中, 室温条件下 5 min 内观察结果。判定标准: C 处出现红色条带检测卡有效, T 处出现红色线条带判定 PED 阳性。

## 1.4 PEDV RT-PCR 检测

1.4.1 引物设计 参考 GenBank 中公布的 PEDV CV777 毒株全基因序列 (登录号为 AF353511), 通过软件设计 1 对引物用于扩增 ORF3 基因, 将其命名为 PED-ORF3U1/L1, 目的扩增基因片段长度为 792 bp, 引物由博仕生物技术有限公司合成, 引物信息见表 1。

表 1 PEDV CV777 ORF3 引物信息

Tab 1 Primer information of PEDV CV777 ORF3

扩增片段基因	引物名称	引物序列	退火温度/℃	扩增长度/bp
ORF3	PEDV - ORF3U1	5' - TGTGTAGGGGTCTAGACT - 3'	55	792
	PEDV - ORF3L1	5' - GGTGACAAGTGAAGCACAGA - 3'		

1.4.2 病毒 RNA 提取与 cDNA 合成 将保存的病料反复冻融(解冻条件为 4 ℃)三次,取小肠组织及内容物 20 mg,按照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 方法提取样品总 RNA,置于 -80 ℃ 保存。cDNA 的合成体系:Primescript RT Enzyme Mix 1 μL、RT Primer Mix 1 μL、5 × Primescript Buffer 4 μL、RNase Free ddH<sub>2</sub>O 4 μL、总 RNA 产物 10 μL,最终总体系为 20 μL,37 ℃ 孵育 15 min。获得的 cDNA 模板置于 -80 ℃ 保存。

1.4.3 RT-PCR 扩增 以合成的 cDNA 模板进行 PDEV ORF3 基因扩增,根据引物设计预期基因片段长度为 792 bp。PCR 反应体系:Premix Taq DNA 酶 12.5 μL、PEDV - ORF3 U1 2 μL、PEDV - ORF3 L1 2 μL、cDNA 模板 2.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 6 μL,反应总体系为 25 μL。扩增反应条件:45 ℃ 30 min,95 ℃ 2 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ forever。取扩增产物 3 μL 上样 3% 琼脂糖凝胶孔,电泳电压条件 150 V。

#### 1.5 小肠组织灭活液免疫效果分析

1.5.1 抗原灭活 按照病料来源分类,选取 PEDV 双鉴定法阳性病料整段小肠及内容物,按照病料重量与无菌生理盐水(0 ℃ 预冷)1:10 比例 5000 r/min 匀浆,16 层纱布无菌条件下过滤 3 次,0.4% 比例加入甲醛充分混匀,37 ℃ 转瓶灭活 48 h,按 1500 UI/mL 体积比加入双抗液(青霉素和链霉素)混匀,分装后 -20 ℃ 保存备用。取上述灭活液

5 μL 分别接种 LB 固、液培养基,37 ℃ 48 h 进行无菌检验。以 0.5 mL、1.5 mL、3 mL 剂量分别注射 5 只昆明鼠,同剂量生理盐水注射组为对照,进行安全性评估。

1.5.2 免疫效果分析 选取 3 个防控无明显效果且准备进行返饲的校企合作产学研基地 PEDV 阳性场,依次命名为 A、B、C,24 头/场,每组 12 头:a1 - 12 原疫苗组、b1 - 12 组织灭活液组。分别于产前 70 d、35 d 后海穴注射 4 mL/头,产前 2 d 采集静脉血,分离血清 -20 ℃ 保存。参照 PDEV ELISA 抗体检测试剂盒说明书进行抗体水平测定,结果判定:OD<sub>阳性对照</sub> ≥ 0.4 试验有效,临界值 = 0.3 \* OD<sub>阳性对照</sub>,OD<sub>样本</sub> ≥ 临界值为阳性。新生仔猪发病率 = (发病数/同组总头数) × 100%、新生仔猪死亡率 = (死亡数/同组总头数) × 100%。

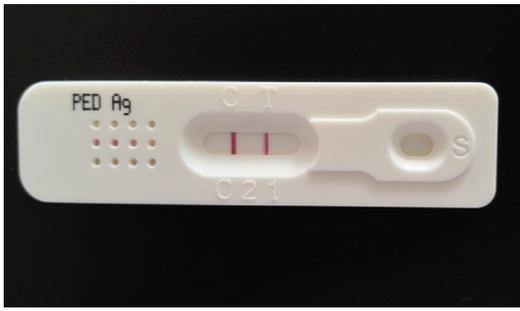
## 2 结果与分析

2.1 PEDV 检测结果 结合临床和病理剖检(图 1)、PEDV 胶体金试纸及 RT-PCR 检测结果综合判定。在试纸卡中 C、T 位置出现红色条带证明 PEDV 阳性(图 2),RT-PCR 扩增产物经凝胶电泳在 792 bp 处出现条带证明 PEDV 阳性(图 3)。疑似 PEDV 感染场采样统计数据见表 2,吉林、永吉、舒兰、磐石、蛟河、桦甸场阳性率依次为 100%、100%、80%、80%、80%、60%,样本阳性率依次为 92%、84%、68%、76%、76%、56%,总体场阳性率 76%,总体样本阳性率 75%。



图 1 临床症状与病理剖检结果

Fig 1 Clinical symptoms and pathological examination results

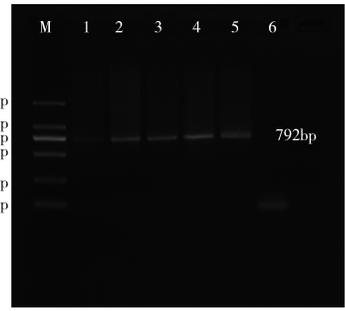


C: 检测对照线; T: 样本检测线

C: Test control line; T: Sample line

图 2 PEDV 胶体金试纸检测结果

Fig 2 Detection results of PEDV colloidal gold dipstick



M: DNA Marker DL 2000; 1 - 6: 检测样本

M: DNA Marker DL 2000; 1 - 6: Test sample

图 3 PEDV 胶体金试纸检测结果

Fig 3 Detection results of PEDV colloidal gold dipstick

表 2 疑似 PEDV 感染场检测结果数据统计

Tab 2 Statistics of detection results of suspected PEDV infection field

地区	采样猪场/个	阳性场/个	场阳性率/%	样品数/个	阳性样品数/个	样阳性率/%
吉林	5	5	100	25	23	92
永吉	5	5	100	25	21	84
舒兰	5	4	80	25	17	68
磐石	5	4	80	25	19	76
蛟河	5	4	80	25	19	76
桦甸	5	3	60	25	14	56
总体	30	23	76	150	113	75

2.2 PDEV ELISA 抗体检测结果 抗体检测结果如表 3 所示,三个试验场组织灭活液组抗体平均值、标准差、阳性率均高于原疫苗组,而 A 场和 C 场

离散度高于原疫苗组、B 场低于原疫苗组,总体数据折线图(图 4)表明,组织灭活液组抗体平均水平高于原疫苗组。

表 3 PEDV ELISA 抗体检测结果

Tab 3 Results of antibody detection by PEDV ELISA

分组	编号	平均值	标准差/%	离散度/%	阳性率/%
A 原疫苗组	Aa1 - 12	0.95	11.41	12.00	91.67
A 组织灭活组	Ab1 - 12	1.48	34.51	23.28	100
B 原疫苗组	Ba1 - 12	0.89	15.70	17.66	83.33
B 组织灭活组	Bb1 - 12	1.37	18.24	13.37	100
C 原疫苗组	Ca1 - 12	1.01	17.34	17.12	91.67
C 组织灭活组	Cb1 - 12	1.49	32.02	21.47	100
阳性对照			2.596		
阴性对照			0.436		

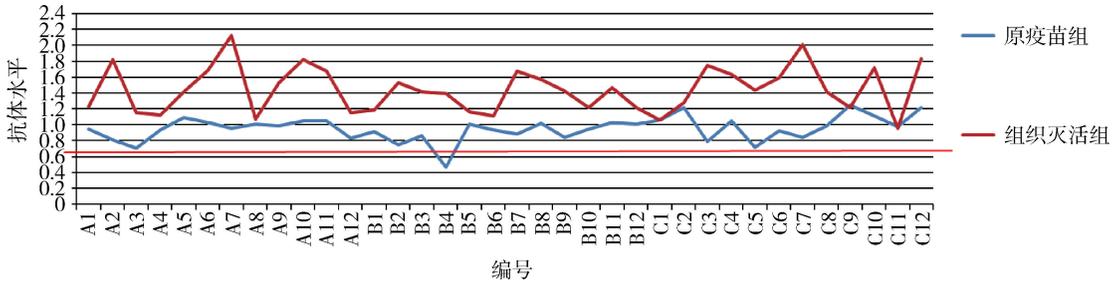


图 4 PEDV 总体抗体水平趋势

Fig 4 All trend of antibody level of PEDV

2.3 预防效果 使用来源于各自养殖场内病料制备的小肠组织灭活液与原疫苗免疫进行对比分析,统计数据表明(表 4),A 场发病率从 68.5% 下降到 8.5%,死亡率从 60.1% 下降到 8.5%;B 场发病率

从 71.4% 下降到 16.1%,死亡率从 68.3% 下降到 16.1%;C 场发病率从 58.7% 下降到 7.7%,死亡率从 53.1% 下降到 7.7%。

表 4 新生仔猪发病率、死亡率

Tab 4 Morbidity and mortality of newborn piglets

试验场	分组	妊娠母猪/头	新生仔猪/头	发病仔猪/头	发病率/%	死亡仔猪/头	死亡率/%
A	原疫苗组	12	143	98	68.5	86	60.1
	组织灭活液组	12	142	12	8.5	12	8.5
B	原疫苗组	12	139	103	74.1	95	68.3
	组织灭活液组	12	143	23	16.1	23	16.1
C	原疫苗组	12	143	84	58.7	76	53.1
	组织灭活液组	12	142	11	7.7	11	7.7

### 3 讨论与结论

仔猪感染 PEDV 在诊断过程中需要综合考虑各种因素。RT-PCR 是目前普遍采用的一种分子生物学检测技术,具有快速、灵敏、特异等优点,但是通过复检各地区部分检测结果时,假阴、阳性的问题一直存在,在该流程中人为操作、主观判断、核酸污染等均可影响结果准确性。目前,胶体金试纸技术非常成熟,在应用过程中具有简便、快速、直观等优势,但与 RT-PCR 检测结果复核时也存在一定差别。PED 临床症状和病理变化<sup>[7]</sup>较为典型,在此基础上结合上述检测方法,可提高 PED 临床诊断准确性,实现及时预警,可有效防控 PED 流行与爆发,减少养殖企业经济损失。

全国各地区 PEDV 流行毒株与参考毒株 ORF3

和 S 基因同源性与系统进化研究结果表明,S 基因存在核苷酸缺失、变异及突变,毒株之间存在部分差异<sup>[8-9]</sup>,与本研究中抗体检测结果相互验证,解释了应用参考株疫苗虽然产生了抗体,但达不到预期免疫保护效果,而免疫灭活液却效果显著这一问题。

本试验制备的免疫灭活液是自家苗的一种,具有高度同源性,解决了血清型不同和病原变异这一主要矛盾。当某些种类疫病爆发且无有效防治方法时,自家苗可作为一种紧急防治措施控制疫情。但值得注意的是,虽然临时使用自家苗起到了明显的防治效果,相对于返饲又具有较好的生物安全性,但是自家苗的病毒效价、注射剂量、免疫麻痹、含多种抗原导致的免疫应激、非目标病原以及杂质

废物等对机体的负面影响是需要慎重考虑的。建议在疫病防控中通过基因型比对等方法及时配型,使用标准化商用疫苗实现疫情的有效防控。

本研究结果表明,针对爆发 PED 且无有效防治效果,应用来源于场内小肠组织病料重量与无菌生理盐水(0 ℃ 预冷)1:10 比例、0.4% 甲醛灭活 48 h、1500 UI/mL 双抗制备的灭活液产前 70 d、35 d 后海穴注射 4 mL/头免疫妊娠母猪,可作为紧急防治措施有效防控 PED 疫情。

### 参考文献:

- [1] 牛江婷,伊淑帅,胡桂学,等. 猪流行性腹泻流行病学研究进展[J]. 中国兽医杂志,2018,1(54):69-71.  
Niu J T, Yin S S, Hu G X, *et al.* Advances in epidemiology of PED[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2018,1(54):69-71.
- [2] Pensaert M B, Debouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. Arch Virol,1978,58(3):243-247.
- [3] 张强敏,郭福生,尹燕博,等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学特征[J]. 中国病毒学,2002,17(4):381-384.  
Zhang Q M, Guo F S, Yin H B, *et al.* Molecular biological traits of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virologica Sinica,2002,17(4):381-384.
- [4] 吴旺霞,王一成,吴润,等. 2011-2016 年浙江省猪流行性腹泻病毒 S 基因与 ORF3 基因遗传进化分析[J]. 浙江农业学报,2017,29(3):380-388.  
Wu W X, Wang Y C, Wu R, *et al.* Genetic analysis of S and ORF3 gene in porcine epidemic diarrhea virus during 2011-2016 in Zhejiang Province [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(3): 380-388.
- [5] 朱海侠. 4 株猪流行性腹泻病毒 S1 基因生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医,2016,43(11):3024-3030.

- Zhu H X. Bioinformatics analysis on s1 gene of four porcine epidemic diarrhea virus strains[J]. Veterinary Medicine,2016,43(11):3024-3030.
- [6] 李舜,王爱富,马春全,等. 2015 年-2016 年广东省猪流行性腹泻病毒部分 S1 基因的遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报,2018,3(40):253-255.  
Li S, Wang A F, Ma C Q, *et al.* Genetic evolution analysis for partial S1 gene of porcine epidemic diarrhea virus from 2015-2016 in Guangdong province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2018,3(40):253-255.
- [7] 孙丰廷,史红丽,高小聪,等. 一株猪流行性腹泻病毒的分离鉴定和遗传进化分析[J]. 中国兽药杂志,2016,50(10):10-14.  
Sun F T, Shi H L, Gao X C, *et al.* Isolation and identification of one porcine epidemic diarrhea virus strains and genetic evolution analysis[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2016,50(10):10-14.
- [8] 韩莎莎,张玉娟,陈陆,等. 河南省 2014-2015 年猪流行性腹泻病毒流行株遗传进化分析[J]. 中国兽医学报,2017,6(7):976-983.  
Han S S, Zhang Y J, Chen L, *et al.* Genetic variation of porcine epidemic diarrhea virus prevailing in Henan province during 2014-2015[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2017,6(7):976-983.
- [9] 王恩雨,郜洪泉,孙东波,等. 2015 年黑龙江省猪流行性腹泻病毒 ORF3 和 S1 基因的遗传变异分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(07 上):165-169.  
Wang E Y, Gao H Q, Sun D B, *et al.* Genetic variation analysis of ORF3 and S1 genes of porcine epidemic diarrhea virus in Heilongjiang province in 2015 [J]. Heilongjiang Animal and Veterinary Medicine,2017(07 upper):165-169.

(编辑:李文平)