

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.08.01

猪丹毒灭活疫苗效力检验血清学方法建立

张媛,王甲,张一帜,李建,赵浩然,李巧玲,王秀丽,
刘元杰,冯妍,李旭妮,彭国瑞,李俊平*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 08-0001-11 [中图分类号] S859.797

[摘要] 建立了猪丹毒丝菌抗体竞争 ELISA 检测方法,用于猪丹毒疫苗效力检验。用 SpaA 蛋白(纯度 90%)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的 SpaA 蛋白单克隆抗体,建立猪丹毒丝菌竞争 ELISA 抗体检测方法,确定检测结果的判定标准,并对该方法的特异性、敏感性、重复性(批间重复性和批内重复性)等进行评价。建立效力检验血清学方法与免疫攻毒法的平行关系,并对两种方法符合率进行评价。结果表明,SpaA 的最佳包被浓度为 2.0 ng/ μ L,阴阳性对照血清的最佳稀释倍数为 1:75,HRP 标记的单克隆抗体的最佳工作浓度为 0.2 ng/ μ L。ELISA 结果判定标准为血清样本抑制率 $PI \geq 8.0\%$ 时判定为阳性, $PI < 8.0\%$ 判定为阴性。该方法特异性良好,与空白小鼠阴性血清及 A 型和 B 型猪多杀性巴氏杆菌阳性血清均不发生交叉反应;敏感性良好,与敏感性血清样品可呈现不同梯度抑制率;重复性良好,批内重复和批间重复性试验结果变异系数均小于 10%;与效力检验免疫攻毒法具备平行关系,小鼠血清效价 $\geq 1:100$ 时可抵抗 1000 MLD 强毒攻击;对用不同冻干代次菌种制备的 4 批猪丹毒丝菌灭活抗原和来自 4 家企业的 7 批猪丹毒灭活疫苗进行检测并与免疫攻毒实验结果比较,总符合率为 100%。建立的猪丹毒丝菌抗体竞争 ELISA 检测方法可以作为猪丹毒疫苗的效力检验方法。

[关键词] 猪丹毒;疫苗;效力检验;竞争 ELISA

Establishment of Serological Method for Efficacy Test of Inactivated Swine Erysipelas Vaccine

ZHANG Yuan, WANG Jia, ZHANG Yi-zhi, LI Jian, ZHAO Hao-ran, LI Qiao-lin, WANG Xiu-li,
LIU Yuan-jie, FENG Yan, LI Xu-ni, PENG Guo-rui, LI Jun-ping*

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

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

基金项目: 兽药行业公益性重点专项“猪丹毒灭活疫苗生产用菌株检定标准再评价及疫苗效力检验替代方法研究”(GY202006)

作者简介: 张媛,正高级兽医师,从事细菌类生物制品的检测工作。

通讯作者: 李俊平。E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: To establish a competitive ELISA method for detection of antibodies against *Erysipelothrix rhusiopathiae* for the efficacy test of swine erysipelas vaccine. The SpaA protein (purity 90%) and monoclonal antibody against SpaA protein labeled with horseradish peroxidase (HRP) were used to establish a competitive ELISA antibody detection method for *Erysipelothrix rhusiopathiae*. To determine the criteria for detection results, the specificity, sensitivity, and repeatability (inter batch repeatability and intra batch repeatability) of the method were evaluated. Establish the parallel relationship between the serological method of efficacy test and the immune challenge method, and the coincidence rate of the two methods was evaluated. The results showed that the optimum coating concentration of SpaA was 2.0 ng/ μ L, the optimal dilution ratio of the negative and positive control serum was 1:75, and the optimal working concentration of HRP labeled monoclonal antibody was 0.2 ng/ μ L. The ELISA results were determined as positive when the inhibition rate of serum samples $PI \geq 8.0\%$, and negative when $PI < 8.0\%$. The specificity results indicated this method did not cross react with the negative serum and the positive serum of type A and B *Pasteurella multocida* derived from pigs; The sensitivity was qualified and showed different gradient inhibition rates employed with the sensitive serum samples; The repeatability was good, intra and inter batch repeatability test results showed the coefficient of variation was less than 10%; It had a parallel relationship with the potency test immune challenge method, when the mouse serum titer was $\geq 1:100$, it could resist 1000 MLD virulent challenge; Four batches of inactivated antigens of *Erysipelothrix rhusiopathiae* prepared by different freeze-dried strains and seven batches of inactivated swine erysipelas vaccines from four enterprises were tested and compared with the results of immune challenge test, the total coincidence rate was 100%. The established competitive ELISA method for detection of antibodies against *Erysipelothrix rhusiopathiae* can be used to test the efficacy of swine erysipelas vaccine.

Key words: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; vaccine efficacy test; competitive ELISA

猪丹毒是一种严重威胁养猪业的重要传染病,同时丹毒也是一种人和其它多种动物都能感染的共患病,具有重要的公共卫生学意义。免疫接种猪丹毒疫苗是有效防控该病的重要手段,我国对于猪丹毒疫苗的效力目前是通过小鼠或猪的免疫攻毒实验来予以评价^[1]。SpaA 蛋白被认为是猪丹毒丝菌最主要的保护性抗原^[2-4],本研究试图建立一种以 SpaA 蛋白(纯度 90%)作为包被抗原,利用抗 SpaA 蛋白的特异性单克隆抗体为竞争抗体,用于猪丹毒抗体检测的竞争 ELISA 方法。

采用纯化的 SpaA 蛋白作为包被抗原,确定包被抗原的最佳浓度为 2.0 ng/ μ L,阴阳性对照血清的稀释度为 1:75,HRP 标记的单克隆抗体的最佳工作浓度为 0.2 ng/ μ L。通过控制单一变量法对封闭条件,反应条件,显色条件等进行优化,最终选择用 0.4% 的明胶 37 °C 封闭 120 min,待检血清及

HRP 标记的单克隆抗体 37 °C 孵育 30 min,显色条件选择 TMB 在室温下避光显色 15 min。用所确定的竞争 ELISA 反应条件对已知背景的小鼠血清进行检测,确定小鼠阳性结果判定的临界值为 $PI \geq 8.0\%$ 。当小鼠血清抗体效价不低于 1:100 时,小鼠攻毒保护率为 100%。

对 4 批猪丹毒灭活抗原和来自 4 家企业的 7 批猪丹毒灭活疫苗采用竞争 ELISA 方法进行检测并与免疫攻毒实验结果比较,总符合率为 100%。猪丹毒灭活疫苗效力检验血清学方法的建立,不仅可以缩减检验成本,提升检验效率,而且是降低生物安全风险和提高动物福利的一项举措。

1 材料与方法

1.1 菌株 猪丹毒丝菌 CVCC43008 株(1 型)、CVCC43006 株(2 型)、CVCC43005 株(2 型),多杀性巴氏杆菌 P71 株(A 型)、CVCC44401 株(B 型)。

1.2 培养基及试剂 猪丹毒培养基,购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。TSA、TSB 培养基,购自 BD 公司。PBS(0.01 mol/L,pH7.2),购自北京中海动物保健科技公司。马血清,购自 gbico 公司。明胶,购自 Sigma 公司。脱脂奶粉,购自 OXOID 公司。羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体,购自北京普利莱基因技术有限公司。ELISA TMB 显色液试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。ELISA 终止液,购自 Solarbio 公司。SpaA 蛋白(1.4 mg/mL,纯度 90%),HRP 标记的 SpaA 蛋白单克隆抗体(Merinton SMA4000 微量紫外分光光度计测定浓度为 0.7 mg/mL),均由中监所提供。

1.3 疫苗 猪丹毒灭活疫苗,猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗(679-230 株),猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗(CA 株),均为已注册上市产品。

1.4 实验动物 ICR 小鼠,SPF 级,16~18 g,雌性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.5 阴、阳性对照血清的制备 取 140 只 16~18 g SPF 级小白鼠随机分为 8 组。第 1 组 50 只,第 2~3 组每组 10 只,分别皮下注射 SpaA 蛋白 0.8 μg ;第 4 组 50 只,不注射疫苗;第 5~8 组,每组 5 只,不注射疫苗,作为对照组。免疫 21 d 后,第 1 组 50 只免疫小鼠采血,提取的血清混合后作为阳性对照血清;第 4 组 50 只空白小鼠采血,提取的血清混合后作为阴性对照血清;第 2 组 10 只免疫小鼠,连同第 5 组 5 只对照小鼠各注射 1000 MLD (Minimum Lethal Dose,最小致死量) CVCC43008 强毒菌液,另取第 6 组 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43008 强毒菌液;第 3 组 10 只免疫小鼠,连同第 7 组 5 只对照小鼠各注射 1000 MLD CVCC43006 强毒菌液,另取第 8 组 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43006 强毒菌液。攻毒后观察 10 d,统计保护率。

1.6 阴、阳性对照血清及阴、阳性血清盘的检验 进行性状、无菌检验及效价测定。性状,肉眼观察。无菌检验,取血清 10 μL 接种肉肝胃酶消化汤 10 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,逐日观察。效价测定采用试管凝集方法进行。

1.7 最佳抗原包被浓度的确立 用 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)将纯化且已知浓度的

SpaA 蛋白做横向 2 倍倍比稀释,设置 6 个梯度,依次为 0.125、0.25、0.5、1、2、4 ng/ μL 。同时用含 0.05% 吐温-20 0.1 mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBST)制备的 1% 脱脂乳将 HRP 标记的单克隆抗体稀释至 5 ng/ μL 。

抗原用 CBS 倍比系列稀释后 100 μL /孔包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h,用 200 μL /孔含 0.05% 吐温-20 的生理盐水洗板 4 次,5 min/次;洗板后加入 100 μL /孔 0.4% 的明胶,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,同上洗板,取 HRP 标记的单克隆抗体按 100 μL /孔加入到 ELISA 板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,同上洗板;加入 100 μL /孔 TMB 显色液室温下(25 $^{\circ}\text{C}$)避光显色 15 min;按 50 μL /孔加入 ELISA 终止液终止反应。

每个反应重复 2 孔,测 OD_{450nm} 值,2 孔平均值最大的反应孔中使用的抗原包被浓度即为最佳使用浓度。

1.8 HRP 标记的单克隆抗体最佳工作浓度的确立 用 CBS 将 SpaA 蛋白稀释至最佳包被浓度。用 1% 脱脂乳将 HRP 标记的单克隆抗体作系列稀释,设置 8 个梯度,依次为 0.04、0.08、0.16、0.3、0.6、1.25、2.5、5 ng/ μL 。抗原 100 μL /孔包被酶标板,与各浓度的 HRP 标记单克隆抗体进行直接 ELISA 反应,每个反应重复 2 孔,测 OD_{450nm} 值,选取 OD_{450nm} 值接近 1.0 所对应的单克隆抗体浓度为 HRP 标记的单克隆抗体最佳工作浓度。

1.9 血清样品最佳稀释倍数的确立 用 CBS 将 SpaA 蛋白稀释至最佳包被浓度,用 1% 脱脂乳将 HRP 标记的单克隆抗体稀释至最佳工作浓度。用 1% 脱脂乳将阴、阳性对照血清进行稀释,稀释倍数依次为 1:300、1:150、1:75、1:50。抗原 100 μL /孔包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h;洗板后加入 100 μL /孔 0.4% 的明胶,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;洗板,加入不同稀释度的阴、阳性对照血清 100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;洗板,取最佳工作浓度的 HRP 标记的单克隆抗体按 100 μL /孔加入到 ELISA 板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;洗板,加入 100 μL /孔 TMB 显色液室温下(25 $^{\circ}\text{C}$)避光显色 15 min;按 50 μL /孔加入 ELISA 终止液终止反应,测定 OD_{450nm} 值。计算抑制率

(percentage inhibition, PI), $PI(\%) = (1 - P/N) \times 100\%$, P 代表阳性血清 OD_{450nm} 值, N 代表阴性血清 OD_{450nm} 值, 选取 PI 最高值所对应的血清稀释倍数为血清样品最佳稀释倍数。

1.10 竞争 ELISA 相关反应条件的优化 确定最佳抗原包被浓度和单克隆抗体最佳稀释倍数后, 按照控制单一变量法比较抗原包被 4 ℃ 过夜、37 ℃ 1 h、37 ℃ 2 h、37 ℃ 3 h 的差异; 比较用 PBST 制备的 3% 脱脂乳、5% 脱脂乳、0.4% 明胶、5% 兔血清, 在 37 ℃ 封闭 150、120、90、60、30、15 min 的封闭效果; 比较待检血清和单克隆抗体在 37 ℃ 60、45、30、20、10、5 min 不同的孵育时间下作用的差异; 比较显色液室温(25 ℃)作用 5、8、10、15、20、30 min 的显色情况, 最终筛选出最佳的反应条件, 确定该系统的最终反应程序。测 OD_{450nm} 值, 计算 $PI(\%) = (1 - P/N) \times 100\%$ 。每个反应均取 PI 最高值所对应的反应条件为最佳反应条件。

1.11 血清阴阳性临界值的确立 50 份已知阴性血清和 90 份已知阳性血清, 按照 1.7 项 ~ 1.10 项建立的 ELISA 反应条件进行实验操作, 阴、阳性对照血清重复 18 孔, 测定 OD_{450nm} 值, 用阴性对照血清 18 次测定值的平均值作为 N 值, 将阳性对照血清和阴、阳性血清盘的 OD_{450nm} 值作为 S 值, 计算 $PI(\%) = (1 - S/N) \times 100\%$, 根据阳性对照血清 PI 值的平均值 ± 标准差作为对照成立的条件。用 SPSS 软件进行 ROC 曲线分析, 确定临界值, 当待检血清 PI 高于或等于临界值则视为阳性血清, 若待测血清 PI 低于临界值则视为阴性血清。

1.12 竞争 ELISA 检测方法效果评价

1.12.1 特异性检验 用 A 型猪多杀性巴氏杆菌活疫苗(CA 株)、B 型猪多杀性巴氏杆菌活疫苗(679-230 株)各 1 批分别皮下免疫 15 只小鼠, CA 株疫苗每只小鼠接种 1/100 头份剂量, 679-230 株疫苗每只小鼠接种 1/150 头份剂量, 免疫 14 日后随机抽取两种疫苗免疫小鼠各 5 只采血、提取血清。CA 株疫苗剩余 10 只免疫小鼠连同 10 只空白小鼠皮下注射 2 MLD P71 株强毒菌液, 观察 10 日, 记录小鼠死亡情况。679-230 株疫苗剩余 10

只免疫小鼠连同 3 只空白小鼠皮下注射 30 MLD CVCC44401 株强毒菌液, 另 3 只空白小鼠皮下注射 1 MLD CVCC44401 株强毒菌液, 观察 10 日, 记录小鼠死亡情况。5 份 CA 株疫苗免疫小鼠血清、5 份 679-230 株疫苗免疫小鼠血清, 连同 10 份阴性血清, 共同组成特异性血清盘。与 1.5 项制备的阴、阳性对照血清一起用建立的竞争 ELISA 方法进行检测, 验证所建立方法的特异性。

1.12.2 敏感性检验 用阴性血清将阳性对照血清进行 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍稀释, 将阳性对照血清原液、2 倍稀释液、4 倍稀释液、8 倍稀释液、16 倍稀释液组成敏感性血清盘。与 1.5 项制备的阴、阳性对照血清一起用建立的竞争 ELISA 方法进行检测, 验证所建立方法的敏感性。

1.12.3 重复性检验 批内重复性: 用 01 批包被的酶标板对 4 份敏感性血清样品进行检测, 每个样品重复检测 6 次, 计算同一批包被的酶标板检测同一份血清 PI 值的变异系数, 根据变异系数的大小来判断批内重复性, 若变异系数 < 10%, 则重复性好。变异系数 = 标准差/平均值 × 100%。批间重复性: 用 01、02、03 不同批次包被的酶标板对 4 份敏感性血清样品进行检测, 计算 3 批包被酶标板检测同一份血清 PI 值的变异系数, 分析批间重复性效果。

1.13 血清抗体效价与免疫攻毒保护率平行关系的建立 将猪丹毒灭活疫苗用 40% 铝胶生理盐水进行 3 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍稀释。取 125 只 16 ~ 18 g SPF 级小白鼠随机分为 15 组。第 1 ~ 10 组, 每组 10 只, 分别皮下注射疫苗原液、3 倍稀释液、6 倍稀释液、7 倍稀释液、8 倍稀释液、9 倍稀释液、10 倍稀释液、11 倍稀释液、12 倍稀释液、13 倍稀释液 0.1 mL; 第 11 ~ 15 组, 每组 5 只, 不注射疫苗, 作为对照组。免疫 21 d 所有小鼠采血后, 第 1 ~ 10 组每组随机取 5 只免疫小鼠, 连同第 11 组 5 只对照小鼠各注射 1000 MLD CVCC43008 强毒菌液, 另取第 12 组 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43008 强毒菌液; 第 1 ~ 10 组每组剩余 5 只免疫小鼠, 连同第 13 组 5 只对照小鼠各注射 1000 MLD CVCC43006 强毒菌液, 另取第 14

组 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43006 强毒菌液;第 15 组 5 只对照小鼠注射生理盐水。攻毒后观察 10 d,统计保护率。小鼠血清用建立的竞争 ELISA 检测方法测定血清效价,阴阳性对照血清进行 1: 75 稀释,待检血清进行 1: 25、1: 50、1: 75、1: 100、1: 150、1: 200、1: 300、1: 400 稀释。

1.14 效力检验血清学方法建立 根据 ELISA 反应最优条件及血清抗体效价与免疫攻毒保护率的平行关系建立猪丹毒灭活疫苗效力检验血清学方法。

1.15 两种效力检验方法符合率评价 将 1986 年、1996 年、2006 年、2015 年冻干的 4 个代次猪丹毒丝菌 CVCC43005 株菌种参照《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版^[6]分别制备成氢氧化铝胶灭活抗原。用免疫攻毒法^[1]和建立的血清学方法对此 4 批灭活抗原以及 7 批猪丹毒灭活疫苗进行效力检验。免疫攻毒法 10 只免疫小鼠中至少保护 7 只判定为效力检验结果符合规定,竞

争 ELISA 检测方法 10 只免疫小鼠中至少有 7 只血清抗体呈阳性判定为符合规定。根据检验结果计算出竞争 ELISA 方法与免疫攻毒法的符合率。

2 结果

2.1 阴、阳性对照血清的制备 小鼠免疫 0.8 μg SpaA 蛋白,可以抵抗 1000 MLD CVCC43006 及 CVCC43008 株强毒菌的攻击,两组免疫小鼠均 10/10 健活,免疫小鼠的血清可作为阳性对照血清。对照组小鼠攻击 1000MLD 组均 5/5 死亡,攻击 1MLD 组均 4/5 死亡,对照小鼠的血清可作为阴性对照血清。

2.2 阴、阳性对照血清及阴、阳性血清盘的检验 血清性状为黄色或淡红色澄清液体,在肉肝胃酶消化汤中 37 ℃培养 7 d 均无菌生长,效价测定结果见表 1,阳性对照血清的试管凝集效价为 1: 40,阴性对照血清的效价 < 1: 10,阳性血清盘的血清抗体效价均 ≥ 1: 40,阴性血清盘的血清抗体效价均 < 1: 10,且疫苗中抗原含量与血清抗体效价呈正相关。

表 1 血清效价测定结果及同组小鼠免疫攻毒结果

Tab 1 Results of serum titer determination and mice immune challenge in the same group

免疫疫苗	疫苗稀释倍数	血清抗体效价	几何平均效价	CVCC43006 保护率	CVCC43008 保护率
20200203 批 猪丹毒灭活疫苗	原液	2/15 1: 160	1: 320	100% (10/10)	100% (10/10)
		11/15 1: 320			
		2/15 1: 640			
	2 倍	1/15 1: 80	1: 232	100% (10/10)	100% (10/10)
		5/15 1: 160			
		9/15 1: 320			
	3 倍	1/15 1: 40	1: 133	100% (10/10)	100% (10/10)
		2/15 1: 80			
		12/15 1: 160			
	4 倍	1/15 1: 40	1: 111	100% (10/10)	100% (10/10)
		6/15 1: 80			
		8/15 1: 160			
	5 倍	2/15 1: 40	1: 80	100% (10/10)	100% (10/10)
		11/15 1: 80			
		2/15 1: 160			
	6 倍	6/15 1: 40	1: 63	100% (10/10)	100% (10/10)
		8/15 1: 80			
		1/15 1: 160			
阳性对照血清	SpaA	1: 40	/	100% (10/10)	100% (10/10)
阴性对照血清	/	< 1: 10	/	0% (0/5)	0% (0/5)
空白小鼠	/	50/50 < 1: 10	/	0% (0/5)	0% (0/5)

攻毒剂量为 1000 MLD

2.3 最佳抗原包被浓度的确立 最佳抗原包被浓度为 2 ng/ μ L, 检测结果见表 2。

2.4 最佳单克隆抗体工作浓度的确立 HRP 标记单

抗浓度为 0.16 ng/ μ L 时 OD_{450 nm} 值为 0.733 < 1.0, 浓度为 0.3 ng/ μ L 时 OD_{450 nm} 值为 1.344 > 1.0, 故确定最佳

单克隆抗体工作浓度为 0.2 ng/ μ L, 检测结果见表 3。

表 2 SpaA 蛋白最佳包被浓度

Tab 2 Optimum coating concentration of SpaA protein

HRP 标记 单抗浓度	不同抗原包被浓度 (ng/ μ L) 检测结果					
	0.125	0.25	0.5	1	2	4
5 ng/ μ L	0.069	0.320	1.158	2.650	2.802	2.403

表 3 HRP 标记单克隆抗体最佳工作浓度

Tab 3 Optimum working concentration of HRP labeled monoclonal antibody

抗原包 被浓度	不同 HRP 标记单抗浓度 (ng/ μ L) 检测结果							
	0.04	0.08	0.16	0.3	0.6	1.25	2.5	5
2 ng/ μ L	0.204	0.388	0.733	1.344	2.112	2.548	2.551	2.802

2.5 血清样品稀释倍数的确立 血清样品稀释倍数为 1:75, 检测结果见表 4。

2.6 竞争 ELISA 相关反应条件的优化

2.6.1 最佳包被时间的确立 最佳抗原包被时间为 37 °C 2 h, 检测结果见表 5。

2.6.2 封闭液的选择 控制其它条件不变, 通过对 3% 脱脂乳、5% 脱脂乳、0.4% 明胶、5% 兔血清, 在 37 °C 封闭 2 h 效果比较, PI 值显示用 0.4% 的明胶封闭效果最好, 结果见表 6。

2.6.3 封闭时间的优化 控制其它条件不变, 通过对 0.4% 明胶在 37 °C 150、120、90、60、30、15 min 6 个封闭条件下进行封闭效果比较, PI 值显示在 37 °C 封闭 120 min 效果最好, 结果见表 7。

表 4 血清样品稀释倍数

Tab 4 Dilution multiple of serum sample

稀释度	PI/%
1:50	49.3
1:75	57.4
1:150	34.3
1:300	18.5

表 5 最佳包被时间

Tab 5 Optimum coating time

封闭液	PI/%
4 °C 过夜	38.1
37 °C 1 h	51.5
37 °C 2 h	55.1
37 °C 3 h	50.3

表 6 最佳封闭液

Tab 6 Optimum blocking buffer

封闭液	PI/%
3% 脱脂乳	34.5
5% 脱脂乳	45.4
0.4% 明胶	52.6
5% 兔血清	44.4

表 7 最佳封闭时间

Tab 7 Optimum blocking time

时间/min	PI/%
15	1.50
30	6.60
60	33.20
90	48.70
120	50.80
150	43.90

2.6.4 待检血清及单克隆抗体孵育时间的选择 将待检血清和单克隆抗体在 37 °C 条件下设置不同孵育时间 60、45、30、20、10、5 min, 按照建立的 ELISA 检测方法操作。表 8 结果表明, 待检血清和单克隆抗体最佳孵育时间为 37 °C 30 min。

2.6.5 最佳显色时间的确立 TMB 底物显色时间为在室温条件下分别作用 5、8、10、15、20、30 min, 反应结束后立即加入终止液终止反应。检测结果见表 9, 在室温 15 min 条件下 PI 值最大, 故该检测方法的最佳底物显色时间为室温 15 min。

表 8 待检血清和单克隆抗体孵育时间

Tab 8 Incubation time of tested serum and monoclonal antibody

时间/min	PI/%
5	23.9
10	34.3
20	36.5
30	45.0
45	43.4
60	41.5

表 9 底物显色时间

Tab 9 Substrate coloration time

时间/min	PI/%
5	35.2
8	36.8
10	39.7
15	45.4
20	36.7
30	34.8

2.7 血清阴阳性临界值的确立 根据本研究已建立的竞争 ELISA 检测方法对 1.5 项制备的阴、阳性对照血清重复进行 18 次检测,阳性对照血清 PI 值的平均值为 52.8%,标准差为 0.081。当阳性对照血清 PI 值在 44.7% ~ 60.9% 范围内时试验成立。从图 1 可知,当敏感性为 100%,特异性为 100% 时,其最优的 cut-off 值为 0.080,当待测血清 PI ≥ 8.0% 时血清抗体为阳性,待测血清 PI < 8.0% 时血清抗体为阴性。

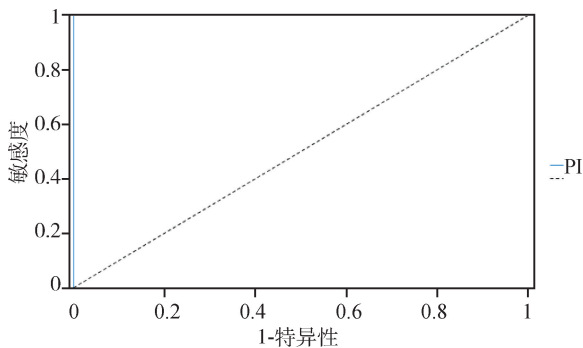


图 1 阴阳性样品临界值的 ROC 曲线分析

Fig 1 Receiver operating characteristic (ROC) analysis of negative and positive sample critical values

2.8 竞争 ELISA 效果评价

2.8.1 特异性分析 CA 株疫苗免疫小鼠 10/10 保护,对照小鼠 10/10 死亡,说明 CA 株疫苗免疫小鼠血清 A 型多杀性巴氏杆菌抗体阳性;679-230 株疫苗免疫小鼠 10/10 保护,对照小鼠 6/6 死亡,说明 679-230 株疫苗免疫小鼠血清 B 型多杀性巴氏杆菌抗体阳性。按照优化的条件同时对特异性血清盘(包括猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗(CA 株)免疫的小鼠血清 5 份、猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗(679-230 株)免疫的小鼠血清 5 份、阴性血清 10 份)进行竞争 ELISA 检测,同时设置阴、阳性对照,阳性对照血清的 PI 值为 47.6%,试验成立。20 份特异性血清的 PI 值均 ≤ 4.7%,符合阴性血清的判定标准。

2.8.2 敏感性分析 阳性对照血清的 PI 值为 50.7%,试验成立。将阳性对照血清原液、2 倍稀释液、4 倍稀释液、8 倍稀释液、16 倍稀释液重复检测 6 次,根据 6 次检测的平均值和标准差确定敏感性血清的判定标准见表 10。

表 10 敏感性血清判定标准

Tab 10 Criteria for serum sensitivity

敏感性血清盘	PI 值范围
阳性对照血清原液	44.7% ~ 60.9%
阳性对照血清 2 倍稀释液	34.4% ~ 44.6%
阳性对照血清 4 倍稀释液	14.0% ~ 34.3%
阳性对照血清 8 倍稀释液	8.0% ~ 14.0%
阳性对照血清 16 倍稀释液	< 8.0%

2.8.3 重复性分析 根据公式变异系数 = 标准差/平均值 × 100%,计算同一批次包被的 ELISA 反应板以及不同批次包被的 ELISA 反应板的批内和批间变异系数来判断该检测方法的重复性。结果如表 11 所示:批内、批间变异系数均小于 10%,重复性较好。

2.9 血清抗体效价与免疫攻毒保护率平行关系的建立 对照组小鼠攻击 1000 MLD 组均 5/5 死亡,攻击 1 MLD 组均 5/5 死亡,生理盐水注射组 5/5 健活。免疫小鼠血清抗体效价与免疫攻毒结果相关性见表 12,当小鼠血清抗体效价不低于 1:100 时,小鼠攻毒保护率为 100%。

表 11 重复性分析

Tab 11 Repeatability analysis

敏感性血清盘	批内重复性			批间重复性		
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数
阳性对照血清原液	52.4%	0.0345	6.6%	54.0%	0.0510	9.4%
阳性对照血清 2 倍稀释液	39.5%	0.0233	5.9%	41.1%	0.0268	6.5%
阳性对照血清 4 倍稀释液	33.1%	0.0292	8.8%	25.7%	0.0123	4.8%
阳性对照血清 8 倍稀释液	12.4%	0.0036	2.9%	10.0%	0.0074	7.3%

表 12 小鼠血清抗体检测和攻毒后免疫保护结果

Tab 12 Results of serum antibody detection and immune protection after challenge in mice

血清抗体效价	CVCC43006 保护率	CVCC43008 保护率	总保护率
<1:25	0% (0/11 保护)	0% (0/9 保护)	0% (0/20 保护)
1:25	0% (0/10 保护)	0% (0/12 保护)	0% (0/22 保护)
1:50	0% (0/4 保护)	0% (0/4 保护)	0% (0/8 保护)
1:75	75% (3/4 保护)	71.4% (5/7 保护)	72.7% (8/11 保护)
1:100	100% (10/10 保护)	100% (7/7 保护)	100% (17/17 保护)
1:150	100% (6/6 保护)	100% (6/6 保护)	100% (12/12 保护)
1:200	100% (3/3 保护)	100% (1/1 保护)	100% (4/4 保护)
1:300	100% (2/2 保护)	100% (2/2 保护)	100% (4/4 保护)
1:400	/	100% (2/2 保护)	100% (2/2 保护)

2.10 效力检验血清学方法建立 根据 ELISA 反应最优条件及血清抗体效价与免疫攻毒保护率的平行关系建立猪丹毒灭活疫苗效力检验血清学方法。用体重 16~18 g 小白鼠 10 只,分成 2 组,第 1 组各皮下注射疫苗 0.1 mL,第 2 组各皮下注射用 1 份疫苗加 3 份 40% 氢氧化铝胶生理盐水稀释的疫苗 0.2 mL,21 日后连同条件相同的对照小白鼠 5 只,采血,分离血清,按下述方法进行血清抗体检测,5 只对照小鼠血清 PI_5 值应全部 < 8.0%,10 只免疫小鼠中应至少有 7 只血清 PI_5 值 \geq 8.0%。

2.10.1 样品处理 取小鼠全血,待血液凝固后,5000 r/min 离心 15 min,分离血清,血清应清亮,无溶血。

2.10.2 待检血清和对照血清的稀释 在血清稀释板中将阴性对照血清和阳性对照血清用 1% 脱脂乳作 1:75 稀释;将待检血清作 1:100 稀释。

2.10.3 包被 用 CBS 将 SpaA 蛋白稀释至 2 ng/ μ L,充分混匀,加入酶标板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 包被 2 h。

2.10.4 洗板 将板中液体弃去,每孔加入 200 μ L 含 0.05% 吐温-20 的生理盐水,洗板 4 次,5 min/次,每次均将孔内液体弃去后,在干净吸水纸上拍干。

2.10.5 封闭 每孔加入 0.4% 的明胶溶液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。

2.10.6 洗板 同 2.10.4 项。

2.10.7 加样 将稀释好的待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到 ELISA 板中,100 μ L/孔,其中待检血清加 1 孔、阳性对照血清和阴性对照血清各加 2 孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.10.8 洗板 同 2.10.4 项。

2.10.9 酶标单克隆抗体的稀释 用 1% 脱脂乳将 HRP 标记的单克隆抗体稀释至 0.2 ng/ μ L,充分混匀。

2.10.10 加酶标单抗 将稀释好的 HRP 标记单克隆抗体加入到 ELISA 板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.10.11 洗板 同 2.10.4 项。

2.10.12 显色与终止 将 TMB 显色液 A 和 B 按 1:1(V/V) 混合后,立即加入到 ELISA 反应板中,100 μL/孔,室温避光显色 15 min 后,每孔加 50 μL 终止液终止反应。

2.10.13 结果判定 反应终止后,15 min 内用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。用阴性对照血清和阳性对照血清 OD_{450nm} 值,计算抑制率 $PI_C(\%) = (1 - P/N) \times 100\%$,P 代表阳性对照血清 OD_{450nm} 值的平均值,N 代表阴性对照血清 OD_{450nm} 值的平均值。当

44.7% ≤ PI_C ≤ 60.9% 时,试验成立。用待检血清 OD_{450nm} 值,计算抑制率 $PI_S(\%) = (1 - S/N) \times 100\%$,S 代表待检血清 OD_{450nm} 值,N 代表阴性对照血清 OD_{450nm} 值的平均值。

2.11 两种方法符合率评价 对 4 批猪丹毒灭活抗原和 7 批猪丹毒灭活疫苗同时用血清学方法和免疫攻毒法进行效力检验,检验结果见表 13。效力检验血清学方法与免疫攻毒法的符合率结果如表 14 所示,符合率为 100%。

表 13 两种方法效力检验结果

Tab 13 Efficacy test results of two methods

产品名称	批号	免疫攻毒法		血清学方法	
		结果	结论	结果	结论
猪丹毒灭活抗原	1986 年冻干菌种制备	9/10 保护	符合规定	10/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活抗原	1996 年冻干菌种制备	9/10 保护	符合规定	10/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活抗原	2006 年冻干菌种制备	9/10 保护	符合规定	9/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活抗原	2015 年冻干菌种制备	10/10 保护	符合规定	10/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	20200202	10/10 保护	符合规定	9/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	20200203	10/10 保护	符合规定	10/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	202101	3/10 保护	不符合规定	3/10 阳性	不符合规定
猪丹毒灭活疫苗	2005002	10/10 保护	符合规定	9/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	20201001	10/10 保护	符合规定	8/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	20201002	10/10 保护	符合规定	8/10 阳性	符合规定
猪丹毒灭活疫苗	20201003	9/10 保护	符合规定	8/10 阳性	符合规定

表 14 比对结果

Tab 14 Comparison results

检验结果	免疫攻毒法	竞争 ELISA	总符合率/%
符合规定	10	10	100
不符合规定	1	1	
总计	11	11	

3 讨论

猪丹毒在我国于 20 世纪 80 年代以前多发,在 20 世纪 90 年代后期至 21 世纪初期很少有关于猪丹毒病例的报道,从业人员曾一度认为猪丹毒病已经消失。然而,2010 年开始,我国部分省市就有零星报道猪丹毒病例,到 2012 年猪丹毒的发病比例

相对增多,主要集中在多雨炎热的 4~7 月。以生长育肥猪和怀孕母猪多发,特别是怀孕母猪的发病率和病死率相对较高。在我国广西、广东、四川、福建、江西、湖南、安徽、吉林、黑龙江等多地均有猪丹毒病的发生。2017 年 7 月江西某猪场爆发猪丹毒,造成大批量的保育猪、肥育猪和少量母猪死亡^[7]。2018 年 6 月甘肃省瓜州县南岔镇某规模化猪场存栏的 85 头妊娠母猪发生猪丹毒,导致母猪死亡 5 头,发生流产 6 窝^[8]。2019 年 4 月湖南省双峰县石牛乡^[9]、2019 年 8 月福建省建宁县溪源乡^[10]均有生猪养殖场发生猪丹毒。综上所述,猪丹毒仍是一种发病比较普遍,对养猪业造成较大危害的动物疫病。

控制猪丹毒的发生和流行的重要手段是疫苗免疫。《中国兽药典》2020 年版收录的猪丹毒相关疫苗有猪丹毒活疫苗 (G4T10 株), 猪丹毒活疫苗 (GC42 株), 猪瘟、猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌病三联活疫苗, 猪丹毒灭活疫苗, 猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗共 5 个产品。其中, 猪丹毒灭活疫苗 (C43-5 株) 效力检验采用小鼠和靶动物的免疫攻毒法进行, 此方法不仅需要使用动物, 而且要在检验过程中使用强毒, 需要制备攻毒菌液, 配备负压动物舍, 攻毒后也需要较长观察时间, 存在生物安全风险大、试验成本高、检验周期长、操作繁琐等缺点。而且攻毒剂量不准确是影响检验结果准确性的最重要因素。本研究建立的通过采用竞争 ELISA 技术检测免疫小鼠血清抗体以评价疫苗效力的检验方法, 特异性良好, 与空白小鼠阴性血清及 A 型和 B 型猪多杀性巴氏杆菌阳性血清均不发生交叉反应, 敏感性良好, 与敏感性血清样品可呈现不同梯度抑制率, 重复性良好, 批内重复和批间重复性试验结果变异系数均小于 10%, 可以实现降低检验过程生物安全风险、缩减检验成本、缩短检验周期、提高检验结果准确性的目的。

自从 Kirchhoff 等首次报道运用 ELISA 技术建立检测猪丹毒抗体的方法^[11]后, 许多学者都开展了相关研究。Yumiko Imada 等将猪丹毒丝菌 SpaA 蛋白分为 5 段进行表达构建 ELISA 方法, 最后筛选丹毒丝菌重组蛋白 SpaA416 建立了一个可特异性检测保护抗体 SpaA 的间接 ELISA 方法^[12]。Giménez - Lirola 等利用重组蛋白 SpaA415 建立了特异性检测猪丹毒丝菌 IgG 抗体的间接 ELISA 方法^[13]。美国猪丹毒灭活疫苗是通过双抗体夹心 ELISA 的方法来进行疫苗中 SpaA 蛋白含量的检测^[14]。国内, 2003 年肖国生建立了 Dot - PPA - ELISA 方法对丹毒弱毒苗和灭活苗检测监控有比较好的效果^[15]。2015 年刘晓波以 Fe - 2 蛋白包被酶标板建立的间接 ELISA 方法可以鉴别诊断猪丹毒丝菌野毒感染抗体与 SpaA 蛋白 N 端免疫猪产生的抗体^[16]。2016 年姚焱彬等建立的以 SpaA 蛋白为抗原的间接 ELISA 方法与美国 TSZ 公司猪丹毒

丝菌抗体检测试剂盒的总符合率为 92.20%, 可用于猪丹毒丝菌的抗体检测及流行病学调查^[17]。本研究建立的竞争 ELISA 方法与评价疫苗效力的金方法 (免疫攻毒法) 具有平行关系, 当小鼠血清抗体效价不低于 1:100 时, 小鼠攻毒保护率为 100%。用此方法与免疫攻毒法同期对 4 批猪丹毒丝菌灭活抗原和来自 4 家企业的 7 批猪丹毒灭活疫苗进行效力检验, 结果符合率为 100%, 此竞争 ELISA 方法可以用于疫苗效力检验。此外, 由于竞争 ELISA 方法相较间接 ELISA 而言, 其检测对象不受宿主限制, 本研究也为后期采用此竞争 ELISA 方法进行猪血清 SpaA 蛋白抗体检测相关研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典二〇二〇年版三部[S].
Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (Volume III, 2020) [S].
- [2] Groschup M H, Cussler K, Weiss R, et al. Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].
Epidemiol Infect, 1991, 107: 637 - 649.
- [3] Ho To, Shinya Nagai. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].
Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14 (7): 813 - 820.
- [4] Makino S, Yamamoto K, Murakami S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].
Microb Pathog, 1998, 25: 101 - 109.
- [5] NY/T 566 - 2019. 猪丹毒诊断技术[S].
NY/T 566 - 2019. Diagnostic techniques of swine erysipelas [S].
- [6] 中华人民共和国兽药生物制品规程二〇〇〇年版[S].
Veterinary biological products regulations of People's Republic of China (2000) [S].
- [7] 曾作财, 陈良荣, 刘平, 等. 江西省某规模化猪场暴发猪丹毒的病例报告[J].
养猪, 2018, 5: 113 - 114.
Zeng Z C, Chen L R, et al. A case report of an outbreak of erysipelas in a large - scale pig farm in Jiangxi Province [J].
Raising pigs, 2018, 5: 113 - 114.
- [8] 张惠婷, 许正新. 一起妊娠母猪发生急性猪丹毒的诊治与体会[J].
畜牧兽医杂志, 2019, 38(2): 88 - 89.

- Zhang H T, Xu Z X. Diagnosis and treatment of acute pig Erysipelas in a pregnant sow [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 38(2): 88-89.
- [9] 罗泽国. 一例猪丹毒诊断与治疗体会[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2021, 1: 47-48.
- Luo Z G. Diagnosis and treatment of a case of swine erysipelas [J]. Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 1: 47-48.
- [10] 曾爱波. 一例猪丹毒诊治报告[J]. 福建畜牧兽医, 2020, 42(5): 58-59.
- Zeng A B. Diagnosis and treatment of a case of swine erysipelas [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 42(5): 58-59.
- [11] Kirchhoff H. Application of the indirect enzyme immunoassay for the detection of antibodies against *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Vet Microbiol, 1985, 10(6): 549-559.
- [12] Imada Y. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5015-5021.
- [13] Giménez-Lirola L G. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant SpaA protein (rSpaA415) for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG antibodies in pigs [J]. J Microbiol Meth, 2012, 91(1): 191-197.
- [14] 美国联邦法规(Code of Federal Regulations, CFR)9 版[S]. Code of Federal Regulations, CFR, 9 Edition[S].
- [15] 肖国生, 曹三杰, 文心田. Dot-PAA-ELISA 快速检测猪丹毒抗体方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(1): 59-62.
- Xiao G S, Cao S J, et al. Establishment and application of a rapid Dot-PAA-ELISA detection method for swine erysipelas antibody[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005, 27(1): 59-62.
- [16] 刘晓波. 猪丹毒丝菌保护性抗原筛选及鉴别诊断 ELISA 方法初步建立[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2015.
- LIU X B. Screening of the protective antigen and developing a differentiating ELISA for antibody of Ery [D]. Hunan: Hunan Agricultural University, 2015.
- [17] 姚焱彬, 李倩文, 杨志鹏, 等. 检测猪丹毒丝菌抗体重组 SpaA ELISA 的建立[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 739-748.
- Yao Y B, Li Q W, Yang Z P, et al. Development of recombinant SpaA-based ELISA for detection of antibodies against swine erysipelas[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 739-748.

(编辑:李文平)