

## 生猪伪狂犬病毒 gB 抗体与中和抗体的相关性分析

杨涛涛, 刘崇灵, 刘晓波, 赵墩, 余兴龙\*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 为探索生猪伪狂犬病毒 gB-ELISA 抗体水平的高低与中和抗体效价的相关性, 运用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法对 177 份生猪血清进行了伪狂犬病毒 gB 抗体的检测, 同时, 用中和试验对上述血清样品进行了伪狂犬病毒中和抗体的测定。试验结果通过生物统计学分析, gE 抗体阴性血清的 gB 抗体平均 *S/P* 值和中和抗体效价 (*SN* 效价) 倒数平均值的相关系数为 0.926, 说明 gB 免疫抗体 *S/P* 值与其中和抗体效价有很好的相关性。中和抗体水平的高低一般与免疫保护力呈正相关, 研究结果表明 gB-ELISA 抗体水平可以用来评估生猪对当前流行 PRV 毒株的相对免疫保护力。

**关键词:** 猪; 伪狂犬病毒; gB 抗体; 中和抗体; 酶联免疫吸附测定

中图分类号: S852.4<sup>+</sup>3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0303-04

## Correlation analysis of PRV gB-antibody and neutralizing antibody

Yang Taotao, Liu Chongling, Liu Xiaobo, Zhao Dun, Yu Xinglong\*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The PRV gB-antibody value from 177 serum samples were detected using the approach of ELISA and the PRV neutralizing antibody titer in the same samples were measured through neutralization test to discuss their relationship. The result from biostatistics showed that the correlation coefficient between mean *S/P* value of gB-antibody and neutralizing antibody titer in negative serum of gE-antibody was 0.926, which indicated that *S/P* value of gB-antibody and neutralizing antibody titer in immune serums have a good correlation. Generally speaking, neutralizing antibody titer had a positive correlation with protective immunity, which showed that *S/P* value of gB-antibody could act as an index to evaluate the porcine protective immunity for the current epidemic PRV.

**Keywords:** pig; pseudorabiesvirus (PRV); gB-antibody; neutralizing antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

猪、牛、羊、鸡等多种家畜、家禽及野生动物的伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病毒 (pseudorabiesvirus, PRV) 引起的一种以发热、奇痒 (猪除外)、呼吸和神经系统疾病为特征的急性传染病, 又称奥耶斯基氏病。猪是 PRV 的天然宿主、贮存者和传染源。猪感染伪狂犬病毒后的症状因日龄不同而异, 哺乳仔猪和断奶仔猪感染后死亡率很高, 可达 100%。妊娠母猪感染后可引起流产, 产木乃伊胎和死胎。成年猪一般为隐性感染, 不表现临床症状 (妊娠母猪除外), 但病毒可在动物体内保存很长时间<sup>[1]</sup>。

随着 20 世纪 60 年代 PRV 强毒株的出现, 伪狂犬病在世界范围内频繁暴发, 已遍及欧洲、东南亚、南美洲及非洲等地区。据邓仕伟等<sup>[2]</sup>在 2006 年的统计, 在中国, 猪伪狂犬病已在包括香港、台湾在内的 31 个省市发生。2007 年以前, PRV 的危害较大, 中国种猪的带毒率在 15% 以上<sup>[3]</sup>, 但自 2007 年后其危害下降, 至 2010 年时, 人们普遍认为 PRV 已不再对养猪业造成危害或该病已得到有效控制<sup>[4]</sup>。2011 年以后, 该病的危害出现严重反弹, 从河南开

始,然后是河北、山东<sup>[5]</sup>,2012年扩展到了南方省份<sup>[6]</sup>,少数猪场种猪的带毒率从1%以下(甚至是0)上升到100%,并出现仔猪和育肥猪的大量死亡<sup>[7]</sup>。有人怀疑2011年后猪伪狂犬病的反弹是因为现有的疫苗免疫不能够产生对当前流行毒株有效的保护力。如何有效评估生猪抵抗PRV的能力,成为当前控制PRV急需解决的难题。病毒中和试验一直以来是最有效的免疫评估方法。由于中和试验所需时间较长且操作复杂,不便于临床人员执行<sup>[8]</sup>,而ELISA试验虽然操作简便,易于执行,但gB抗体水平的高低与中和保护性抗体水平的相关性如何尚不清楚。为了弄清这个问题,笔者对采集的生猪血清进行伪狂犬病毒gB抗体、gE抗体检测,并利用湖南农业大学分子生物与免疫学实验室分离的PRV湘A株<sup>[9]</sup>,采用中和试验对采集血清样品进行伪狂犬病毒中和抗体的检测,旨在探索中和抗体效价值和gB-ELISA抗体S/P值之间的相关性,为评估生猪对当前流行PRV毒株的抵抗力提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒和细胞

PRV湘A株<sup>[9]</sup>和PK-15细胞由湖南农业大学分子生物与免疫学实验室提供。

#### 1.1.2 血清

血清采自长沙市某规模猪场,共177份母猪血清。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

gB-ELISA试剂盒为BioChek公司产品(产品批号:FS5763);gE-ELISA试剂盒为IDEXX公司产品(产品批号:5113.00);改良型RPMI-1640培养基为HyClone公司产品;新生犊牛血清、0.5%Trypsin-EDTA均为Gibco公司产品;细胞培养板为Corning公司产品;配制双抗用青霉素钠(80万单位)为哈药集团制药总厂产品;配制双抗用硫酸链霉素(100万单位)为瑞阳制药有限公司产品;MULTISKAN MK3酶标仪购自Thermo公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 gE-ELISA检测

对采集的177份母猪血清按IDEXX公司产品

说明书进行gE-ELISA检测。PRV-gE抗体检测判定标准: $S/N \geq 0.6$ ,判定为抗体阳性; $0.6 < S/N < 0.7$ ,判定为可疑,样品需重测或过一段时间采血重测; $S/N < 0.6$ ,判定为抗体阴性。

$S/N = \frac{\text{样品的OD值}}{\text{阴性对照平均OD值}}$ (阴性对照平均OD值与阳性对照平均OD值的差大于0.3,结果才有意义)。

### 1.2.2 gB-ELISA检测

对采集的177份母猪血清按照BioChek公司产品说明书进行gB-ELISA操作,测定gB抗体水平。为确保试验有效,阴性对照的平均吸光度应该小于0.35,阳性对照的吸光度平均值和阴性对照的吸光度平均值之差应大于0.15,样品S/P 0.5时判定为阳性。

### 1.2.3 PRV湘A株的TCID<sub>50</sub>测定

培养PK15细胞于96孔细胞板中,待细胞的密度达到培养板的80%后,将PRV湘A株病毒液作10倍连续稀释( $10^1 \sim 10^9$ ),9个稀释度,每个稀释度接种8孔,每孔0.1 mL,阴性对照1列,每列8孔;弃掉96孔板中的原培养液,用灭菌PBS洗涤1遍,加入100  $\mu\text{L}$ 用不含血清的培养液稀释好的不同浓度的病毒液,阴性对照加入100  $\mu\text{L}$ 不含血清的培养液,37  $^{\circ}\text{C}$ 感作1 h;弃掉病毒液,每孔加入100  $\mu\text{L}$ 含2%血清的维持液,于37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养;倒置显微镜观察细胞病变(3~4 d),并作好记录,按Reed-Muench法计算TCID<sub>50</sub>。

### 1.2.4 血清中和试验

中和试验参照固定病毒稀释血清法进行。将被检血清在56  $^{\circ}\text{C}$ 灭活30 min,用不含血清的改良型RPMI-1640培养基稀释成1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128和1/256;取上述不同稀释度的待检血清50  $\mu\text{L}$ ,分别与等体积含200个TCID<sub>50</sub>/0.1 mL病毒液充分混合,37  $^{\circ}\text{C}$ 感作1 h后,接种PK-15单层细胞(弃掉原细胞培养液);同时设待检血清毒性对照,阴性、阳性血清对照,病毒对照和正常细胞对照,其中病毒对照作200个TCID<sub>50</sub>、20个TCID<sub>50</sub>、2个TCID<sub>50</sub>、0.2个TCID<sub>50</sub>等4个不同病毒含量的对照,置37  $^{\circ}\text{C}$ ,5% CO<sub>2</sub>培养箱培养,观察细胞病变(3~4 d),并作好记录,按Reed-Muench两氏法计算中和效价。

### 1.2.5 相关性分析

通过统计学的分析判断伪狂犬病毒 gB-ELISA 抗体  $S/P$  值与中和抗体效价的相关性, 相关系数的计算公式<sup>[10]</sup>如下:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{\sqrt{\left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[ \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}$$

$x$  为血清样本中和抗体效价平均值的倒数;  $y$  为血清样本 gB-ELISA 抗体平均  $S/P$  值;  $n$  为 gB-ELISA 抗体  $S/P$  值分段组。如果  $r > 0$ , 表示其为正相关;  $r < 0$ , 表示其为负相关。一般来说, 取绝对值后, 0~0.09 为没有相关性, 0.1~0.3 为弱相关,  $> 0.3 \sim 0.5$  为中等相关,  $> 0.5 \sim 1.0$  为强相关<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 伪狂犬病毒 gE-ELISA 试剂盒和 gB-ELISA 试剂盒检测结果

在检测的 177 份血清中, gE 抗体阳性血清有 42 份, gE 抗体阳性率为 23.73%; 177 份血清全部呈 gB 抗体阳性, gB 抗体阳性率为 100%。

### 2.2 PRV 湘 A 株 $TCID_{50}$ 的测定结果

根据 Reed-Muench 法计算 PRV 湘 A 株在 PK-15 细胞上的  $TCID_{50}$  为  $10^{-7.55}$ /mL。

### 2.3 血清中和抗体效价与 gB 抗体检测结果

由表 1 可知, 在 135 份 gE 抗体阴性血清中, gB 抗体  $S/P$  值大于 3.0 的 28 份血清平均  $S/P$  值为 3.115, 相应的血清中和抗体效价倒数平均值为 49.57; gB 抗体  $S/P$  值在 2.5~3.0 (不包括 2.5) 间的 56 份血清平均  $S/P$  值为 2.792, 相应的血清中和抗体效价倒数平均值为 41.46; gB 抗体  $S/P$  值在 2.0~2.5 的 29 份血清平均  $S/P$  值为 2.251, 相应的血清中和抗体效价倒数平均值为 9.86; gB 抗体  $S/P$  值小于 2.0 的 22 份血清平均  $S/P$  值为 1.470, 相应的血清中和抗体效价倒数平均值为 5.82, 结果表明血清中和抗体效价随 gB 抗体  $S/P$  值下降而下降。42 份 gE 抗体阳性血清的中和抗体效价与 gB 抗体检测结果也表明血清中和抗体效价随 gB 抗体  $S/P$  值下降而下降。

表 1 gB 抗体平均  $S/P$  值和中和抗体效价倒数平均值

Table 1 Mean of the gB-antibody and the reciprocals of neutralizing antibody titer

血清类型	gB 抗体 $S/P$ 值	血清份数	gB 抗体平均 $S/P$ 值	中和抗体效价倒数平均值
gE 抗体阴性血清	> 3.0	28	3.115	49.57
	> 2.5~3.0	56	2.792	41.46
	2.0~2.5	29	2.251	9.86
	< 2.0	22	1.470	5.82
gE 抗体阳性血清	> 5.0	9	5.500	248.89
	> 4.5~5.0	9	4.652	79.11
	> 4.0~4.5	9	4.240	44.89
	3.0~4.0	10	3.595	24.00
	< 3.0	5	1.712	8.00

### 2.4 血清中和抗体效价与 gB 抗体的相关性分析

通过生物学分析发现, gE 抗体阴性血清及 gE 抗体阳性血清的 gB 抗体平均  $S/P$  值和  $SN$  效价倒数平均值成正相关, 相关系数分别为 0.926、0.777, 具有较好的相关性。

## 3 结论与讨论

本研究中对 177 份血清进行了伪狂犬病毒 gE 抗体的检测, 筛选出了 135 份 gE 阴性血清和 42 份 gE 抗体阳性血清, 然后分别对 135 份 gE 阴性血清和 42 份 gE 抗体阳性血清进行伪狂犬病毒 gB 抗体和中和抗体的检测。通过统计学分析发现, gE 抗体阴性血清及 gE 抗体阳性血清 gB 抗体平均  $S/P$  值和  $SN$  效价倒数平均值成正相关, 且具有较好的相关性。邹浩勇等<sup>[11]</sup>用 IDEXX 公司的 gB-ELISA 试剂盒检测的 217 份中和抗体阳性血清结果显示, 中和抗体效价与阻断率呈正相关, 但未涉及到 gB 免疫抗体水平与中和保护性抗体水平相关性的研究。Banks 等<sup>[8]</sup>研究认为中和抗体效价大于 1 2 时, PRV 抗体为阳性。一般来说, 中和抗体水平越高, 保护力越强。笔者研究了 gB 免疫抗体  $S/P$  值与其中和抗体效价的相关性, 以通过检测 gB 免疫抗体  $S/P$  值来衡量生猪对当前流行 PRV 毒株的抵抗力强弱。gE 抗体阴性血清  $SN$  效价值与 gB 抗体  $S/P$  值相关系数达到 0.926, 说明 gB 免疫抗体  $S/P$  值与其中和抗体效价有很好的相关性, 该研究结果可以作为通过检测 gB 抗体  $S/P$  值来衡量生猪对当前流行 PRV 毒株的抵抗力的理论依据。gE 抗体阳性血清  $SN$  值与 gB 抗体  $S/P$  值相关系数为 0.777, 说明由

野毒感染产生的 gB 抗体  $S/P$  值与其中和抗体效价也具有较好的相关性,但其相关系数较 gE 抗体阴性血清  $SN$  效价与 gB 抗体  $S/P$  值的相关系数小,主要是因为 gE 抗体阳性血清 gB 抗体  $S/P$  值大于 5.0 的部分血清中和抗体效价太高,平均值达到 1 248.89,与稍低 gB 抗体水平对应的中和抗体效价相距太大。gE 抗体阳性血清 gB 抗体  $S/P$  值大于 5.0 的部分血清中和抗体效价很高,也说明了猪感染 PRV 后,可产生很高水平的保护性中和抗体,这与彭金美等<sup>[12]</sup>研究野外分离毒株免疫猪能够诱导产生较高水平的中和抗体的结果是一致的,通常可以判断这部分血清来源于感染野毒后康复的猪群。在实际生产中,如果检测到很高水平的 gB 抗体,则应怀疑猪群有感染野毒的可能,应进一步对猪群进行感染性抗体的检测。当 gE 抗体阴性血清的  $SN$  效价为 49.57 时,平均  $S/P$  值为 3.115。gE 抗体阳性血清  $SN$  效价与此相当的是 44.89,但相应的平均  $S/P$  值为 4.240,要明显高于 gE 抗体阴性血清的  $SN$  效价,似乎表明当 gE 抗体阳性血清的 gB 抗体水平较低时,其中和能力偏低,这可能是 gE 抗体阳性血清检测数据过少的缘故。

#### 参考文献:

- [1] 宣长和,马春全,陈志宝,等.猪病学[M].北京:中国农业大学出版社,2010:180-198.
- [2] 邓仕伟,汪勇,薛春芳.我国伪狂犬病流行现状及新特点[J].动物医学进展,2006,27(9):105-107.
- [3] 程晶,陈艳红,荫硕焱.2006—2008年中国部分地区规模化猪场 PRV 血清流行病学调查[J].中国动物传染病学报,2009,17(1):67-71.
- [4] 赵东升,刘有昌,安福生.近年来我国猪伪狂犬病的流行状况和分析[J].今日养猪业,2008(6):26-28.
- [5] 常洪涛,刘慧敏,郭占达,等.河南省及周边省份猪群中大面积感染猪伪狂犬病毒的病因分析[J].病毒学报,2014,10(4):442-449.
- [6] 邱美珍,博胜才,杜丽飞,等.湖南省部分规模猪场伪狂犬病野毒血清流行病学系统监测与净化分析[J].养猪,2012(3):89-92.
- [7] 全炎铭.我国猪伪狂犬病的最新流行动态与防控措施[J].北方牧业,2013(12):24-25.
- [8] Banks M, Cartwright S. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus[J]. Veterinary Record, 1983, 113(2):38-41.
- [9] 汤起武,蒋大良,刘崇灵,等.某规模猪场猪伪狂犬病的诊断[J].中国动物检疫,2013,30(9):45-47.
- [10] 明道绪.生物统计附试验设计[M].北京:中国农业出版社,2008:165-167.
- [11] 邹浩勇,陈冬焕,熊金凤,等.伪狂犬病毒中和抗体与 gB-ELISA 抗体阻断率之间的相关性[J].猪业科学,2008,25(5):94-96.
- [12] 彭金美,安同庆,赵鸿远,等.猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J].中国预防兽医学报,2013,35(1):1-4.

责任编辑:苏爱华

英文编辑:王 库