

王宇,熊博,彭清洁,等.山羊痘弱毒疫苗(AV41株)接种途径和剂量对牛抗体反应的影响[J].华中农业大学学报,2023,42(2):24-31.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.004

## 山羊痘弱毒疫苗(AV41株)接种途径 和剂量对牛抗体反应的影响

王宇<sup>1,2</sup>,熊博<sup>1,2</sup>,彭清洁<sup>3</sup>,项志杰<sup>1,2</sup>,袁歆玮<sup>1,2</sup>,  
王艳<sup>1</sup>,邹良勋<sup>4</sup>,陈颖钰<sup>1,2</sup>,郭爱珍<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学动物医学院/农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室,武汉 430070;  
2. 湖北洪山实验室,武汉 430070; 3. 安琪酵母股份有限公司,宜昌 443001;  
4. 湖北良友金牛畜牧科技有限公司,襄阳 441034

**摘要** 为评估山羊痘弱毒疫苗(AV41株)经皮下和皮内接种牛体后的抗体产生规律,优化牛体免疫程序,选取25头健康成年肉牛分为5组,每组5头,标准单头份剂量为含量 $1.0 \times 10^{3.5}$ TCID<sub>50</sub> AV41株,分别以5倍和10倍羊用剂量进行皮下和皮内免疫,于接种后0、15、30、45和60 d,利用病毒中和试验(VNT)和ELISA试剂盒检测血清抗体水平。结果显示:鼻咽拭子和血液PCR结果均为阴性,未出现排毒;VNT与ELISA抗体检测结果相似,免疫后第30天,皮下接种5倍剂量组中有60%牛抗体转阳,中和抗体滴度最高达1:640。同时,皮内和皮下10倍剂量组各有40%牛抗体转阳,皮内5倍剂量组有20%牛抗体转阳。VNT中和指数与ELISA的S/P值呈现显著正相关。上述结果表明,类似于国际上相关疫苗的接种途径和剂量,皮下注射5倍羊头份剂量山羊痘弱毒疫苗是安全和有效的,可作为临床预防牛结节性皮肤病的免疫接种方案。

**关键词** 牛结节性皮肤病;山羊痘弱毒疫苗(AV41株);免疫剂量;免疫途径;抗体监测;健康养殖

**中图分类号** S852.65+3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0024-08

牛结节性皮肤病(lumpy skin disease, LSD),又称牛结节疹、牛结节性皮肤病或牛疙瘩皮肤病,该病是由痘病毒科、山羊痘病毒属牛结节性皮肤病病毒(LSD virus, LSDV)引起的一种牛的传染性疾病。发病牛主要以发热、全身性皮肤、黏膜和内脏出现结节性病灶为主要特征<sup>[1]</sup>,造成牛产奶量下降、生长发育受阻、母牛流产、公牛短暂性或终身性不育、皮革损伤,甚至死亡,对养牛业产生了重大经济影响<sup>[2]</sup>。该病被世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, WOA)列入必须通报疾病名录<sup>[3]</sup>,我国农业农村部将其规定为二类动物疫病。LSDV主要通过节肢动物媒介传播,直接接触也能引起该病的传播<sup>[4-5]</sup>。LSD起源于非洲赞比亚,在20世纪以前主要在非洲地区呈地方性流行,2012年先后传入希腊和俄罗斯等欧洲国家<sup>[1]</sup>。2019年8月首次在我国新疆伊犁州地区发生<sup>[6]</sup>,之后向全国不同地区传播。截至2021年9月,农业农村部通报了全国15个省市的41起疫情,并有进一步扩散的风险。

山羊痘和绵羊痘病毒与LSDV同属山羊痘病毒属病毒,基因组高度同源,抗原的相似性很高,具有交叉保护作用,因此,国际上常使用山羊痘与绵羊痘弱毒疫苗控制LSD<sup>[7]</sup>。农业农村部在《牛结节性皮肤病防治技术规范》中规定,采用皮内注射5头份羊剂量的山羊痘弱毒活疫苗对风险地区进行全群牛紧急免疫([http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202008/202010/t20201020\\_6354665.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202008/202010/t20201020_6354665.htm))。但临床上皮内接种操作困难,改用更加便捷的接种方式能否产生较好或类似的免疫效果,尚需要试验研究,本研究山羊痘弱毒疫苗(AV41株)经皮下和皮内接种牛体后的抗体产生规律进行评估,以便能为免疫程序的优化提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及分组方案

25头12~18月龄西门塔尔牛来自于未发生过

收稿日期:2022-04-22

基金项目:国家现代农业(肉牛/牦牛)产业技术体系专项(CARS-37)

王宇,E-mail:yu.wang1009@hotmail.com

通信作者:郭爱珍,E-mail:aizhen@mail.hzau.edu.cn

LSD疫情的湖北良友金牛畜牧科技有限公司,牛群临床上无临床可见异常,健康状况良好,利用PCR检测与血清抗体检测证实没有LSDV感染。按照免疫

剂量与接种途径共设置A、B、C、D、E(对照组)5组,每组5头牛。A、B组分别接种5头份羊剂量,C、D组分别接种10头份羊剂量,疫苗接种详细方案见表1。

表1 山羊痘病毒弱毒疫苗接种牛体实验方案

Table 1 Experimental protocol for inoculation of attenuated goat pox vaccine in cattle

组别 Group	数量 Number	接种剂量 <sup>#</sup> Inoculation dose	接种方式 Inoculation route	接种部位 Inoculation place	稀释体积/mL Dilution volume
A	5	$5 \times 10^{3.5}$ TCID <sub>50</sub>	皮下接种 Subcutaneous	颈部 Neck	1.0
B	5	$5 \times 10^{3.5}$ TCID <sub>50</sub>	皮内接种 Intradermal	尾根 Tail head	1.0
C	5	$10 \times 10^{3.5}$ TCID <sub>50</sub>	皮下接种 Subcutaneous	颈部 Neck	1.0
D	5	$10 \times 10^{3.5}$ TCID <sub>50</sub>	皮内接种 Intradermal	尾根 Tail head	1.0
E	5	生理盐水 Normal saline	皮下接种 Subcutaneous	颈部 Neck	1.0

注:#:标准1头份羊剂量含量 $\geq 1.0 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> AV41株;TCID<sub>50</sub>:半数组织培养物感染剂量。Note:#:Standard one goat dose  $\geq 1.0 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> AV41 strain; TCID<sub>50</sub>:Median tissue culture infective dose.

## 1.2 疫苗

山羊痘弱毒活疫苗(CVCC, AV41株)购自吉林正业生物制品股份有限公司。使用前按产品要求将疫苗保存于-20℃条件下。免疫前使用无菌生理盐水对疫苗冻干粉进行对应浓度的稀释,当日即配即用。

## 1.3 样品采集与处理

接种疫苗后每日观察试验牛只精神状态、食欲和体表情情况,并分别于免疫后第0、15、30、45、60天采集所有实验动物的血液和鼻咽拭子样品。每头动物通过尾根静脉采集约10 mL血液,5 mL血液置于无菌真空管中,室温下放置2~3 h,随后3 000 r/min离心10 min提取血清,-20℃条件下保存直至检测。另外5 mL血液置于EDTA抗凝管中用于检测是否存在病毒血症。棉签用无菌生理盐水浸润,之后采集鼻咽拭子,置于3~4 mL生理盐水溶液中,及时送回实验室放置于-80℃保存。全血和鼻咽拭子经过反复冻融3次后用于提取核酸,作为PCR模板。

## 1.4 PCR检测

将处理好的鼻咽拭子以及全血样品,按照北京全式金病毒DNA提取试剂盒(EasyPure<sup>®</sup> Viral DNA Kit, No.ER201)说明书进行病毒核酸提取。采用《WOAH陆生动物诊断试验和疫苗手册》推荐PCR方法扩增LSDV核酸<sup>[3,8]</sup>。PCR针对的靶基因是LSDV074基因中一段保守序列,扩增产物片段的大小为192 bp。引物序列如下:Forward primer 5'-TCC-GAG-CTC-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3',Reverse primer 5'-TAT-GGT-ACC-TAA-ATT-ATA-TAC-GTA-AAT-AAC-3'。引物由北京擎科生物科技有限公司(武汉分公司)合成。

## 1.5 免疫后抗体反应监测

分别采用法国IDVet公司生产的双抗原夹心ELISA试剂盒(ID Screen<sup>®</sup> Capripox Double Antigen Multi-species ELISA Kit, No. CPVDA-5P)以及病毒细胞中和试验法测定抗体。试剂盒由深圳市青珊瑚科技有限公司馈赠。ELISA抗体检测按该试剂盒说明书进行操作并对结果进行解读,S/P值大于或等于30%判定为阳性,S/P值小于30%判定为阴性。

病毒中和试验(virus neutralisation test, VNT)按照文献<sup>[3]</sup>的操作步骤进行,首先对血清样品从1:5倍开始,进行2倍系列稀释至640倍,共8个稀释度。使用Vero细胞和已滴定毒价的山羊痘弱毒活疫苗(AV41株)对待检血清进行检测,阴阳性对照血清为事先滴定的已知背景血清。从第4天起开始观测每个细胞孔中细胞病变情况(CPE),连续观测至第9天。检测结果按中和指数(neutralisation index, NI)进行判定,NI为阴性血清和试验血清中病毒滴度之间的对数滴度差,NI $\geq 1.5$ 判定为阳性,NI $< 1.5$ 判定为阴性<sup>[3]</sup>;同时利用Reed-Muench方法计算血清中和抗体滴度<sup>[9]</sup>,抗体稀释度 $\geq 1:20$ 判定为阳性, $< 1:20$ 则为阴性。

## 1.6 统计分析

本研究所有数据存储于Excel表格中,随后导入R软件(version 4.1.2, R Development Core Team, 2022)进行数据分析和可视化。检测方法之间的符合率、敏感性、特异性、阳性和阴性预测率采用Dohoo等<sup>[10]</sup>的介绍计算;利用皮尔逊相关性检验(Pearson's correlation)对NI与log<sub>10</sub>转换的S/P值进行相关性分析。由于存在较多阴性抗体NI值为0的干扰,去除NI值为0的样品后进行简单线性回归拟合。epiR包<sup>[11]</sup>用于计算以上各参数及其95%置信区间(confi-

dence intervals, CI), ggplot2包<sup>[12]</sup>用于本研究中箱线图和散点图的绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床症状观测

在A组(皮下接种5头份羊剂量)的5头牛中,2头牛在疫苗注射后第10天,在背部、肋部和肩部等区域皮肤表面出现少量直径5~20 mm不等的皮肤结节,其他部位未见皮肤结节(图1)。随后皮肤结节逐渐消退,免疫后20 d皮肤凸起消失。其他组试验牛未见明显临床症状。

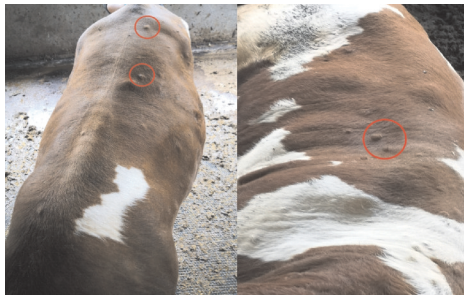
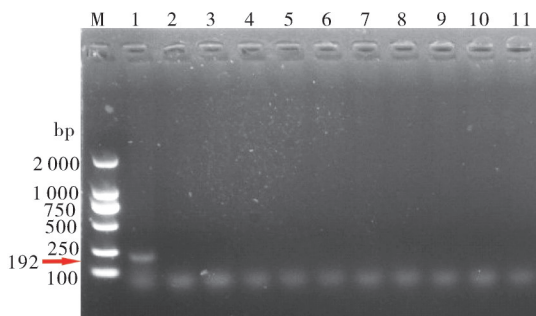


图1 皮下注射5头份羊剂量组牛免疫后第10天皮肤结节症状

Fig.1 Skin nodules on 10<sup>th</sup> day postvaccination of vaccinated cattle in 5-times dose by subcutaneous inoculation

### 2.2 PCR检测结果

免疫后第0、15、30、45、60天,所有试验组牛与对照组牛的鼻咽拭子及血液样品进行常规PCR检测,结果均为阴性(图2)。



M:DL2000 DNA marker; 1:阳性对照(疫苗株AV41株);2:阴性对照(无菌水);3~7分别为A~E组鼻咽拭子;8~11分别为A~D组血液。M: DL2000 DNA marker; 1: Positive control (AV41 strain); 2: Negative control (sterile water); 3-7: Nasopharyngeal swab samples of groups A, B, C, D and E; 8-11: Blood samples of groups A, B, C and D.

图2 部分鼻咽拭子与全血LSDV的PCR检测电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of partial nasopharyngeal swabs and whole blood with LSDV PCR test

### 2.3 免疫抗体监测结果

免疫后0~60 d内,用ELISA和VNT检测血清抗体水平,结果如表2和图3所示。皮下接种组抗体反应高于皮内接种组,表现为抗体反应产生较早,且抗体水平较高。免疫后第0天5个组25头牛ELISA与VNT检测均为阴性。皮下5倍羊剂量组(A组)免疫后第15天,2头出现轻微皮肤症状的牛转为ELISA和VNT双阳性,中和抗体效价均为1:640。自免疫后30 d起,各组均有3头牛VNT检测阳性,转阳率达60%,中和抗体效价在观察期内始终维持在较高水平( $\geq 1:40$ 倍);而ELISA抗体检测结果则由2头阳性增长至3头阳性。皮内接种5倍羊剂量组(B组)在免疫第15天起始终有1头牛呈VNT抗体阳性,转阳率仅为20%,中和抗体效价维持在1:320及以上;而ELISA抗体弱于中和抗体反应,自免疫后第30天起仅1头牛为阳性。皮下接种10倍羊剂量组(C组)自第15天起ELISA抗体检测结果均为1头阳性,第15和30天VNT抗体阳性牛均有2头,转阳率为40%,中和抗体效价分别为1:40和1:640,自45 d后阳性牛降至1头。皮内接种10倍羊剂量组(D组)在第15天均为阴性,自免疫后第30天起有2头牛呈ELISA和VNT抗体双阳性,中和抗体效价均维持在1:40倍以上。对照组(E组)在监测期内始终保持ELISA和VNT抗体双阴性。综上所述,皮下接种5倍羊剂量试验组(A组)产生了最强的抗体反应。

### 2.4 VNT与ELISA相关性分析

VNT与ELISA检测结果如表3所示,总符合率为95.2% (95% CI: 89.8~98.2),阳性符合率为87.5% (95% CI: 74.8~95.3),阴性符合率97.0% (95% CI: 93.4~98.9),Kappa值为0.846 (95% CI: 0.673~1.02,  $P < 0.001$ )。与VNT相比,ELISA敏感性和特异性分别为77.8% (95% CI: 57.7~91.4)和100% (95% CI: 96.3~100.0),阳性预测率和阴性预测率分别为100.0% (95% CI: 83.9~100.0)和94.2% (95% CI: 87.9~97.9)。

VNT中和抗体指数(NI)与ELISA所得lg(S/P)值在5个试验组的比较结果如图4所示。受VNT中和抗体滴度计算方法所限,多个阴性样品中和抗体指数为0(图4E),对于抗体滴度关系分析存在干扰,去除中和抗体指数为0的值后如图5所示。相关性分析显示,VNT的NI指数与ELISA的lg(S/P)值存在显著的正相关(Pearson's  $\rho = 0.872, P < 0.001$ ,图5)。线性拟合后所得线性方程式为 $NI = 0.558 \times \lg(S/P \text{ value}) + 1.203$ ,调整后 $R^2$ 为0.754,残差符合

表2 免疫后0~60 d中和试验法检测试验牛血清中和抗体结果(滴度)值

Table 2 Neutralising antibody titer level in experimental cattle between 0 and 60 days post vaccination

组别 Group	牛号 Cattle ID	接种后时间/d Time post vaccination				
		0	15	30	45	60
A	1	- (<1:5)	+(1:640)	+(1:640)	+(1:320)	+(1:640)
	2	- (<1:5)	- (<1:5)	-(1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	3	- (<1:5)	-(1:10)	+(1:160)	+(1:40)	+(1:40)
	4	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	5	- (<1:5)	+(1:640)	+(1:640)	+(1:640)	+(1:640)
	6	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
B	7	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	8	- (<1:5)	+(1:320)	+(1:640)	+(1:320)	+(1:320)
	9	- (<1:5)	1:5	-(1:10)	-(1:5)	- (<1:5)
	10	- (<1:5)	+(1:20)	-(1:10)	-(1:5)	- (<1:5)
	11	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
C	12	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	13	- (<1:5)	+(1:40)	+(1:40)	+(1:20)	+(1:20)
	14	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	15	- (<1:5)	+(1:640)	+(1:640)	+(1:320)	+(1:640)
	16	- (<1:5)	- (<1:5)	+(1:40)	+(1:40)	+(1:40)
	17	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
D	18	- (<1:5)	- (<1:5)	-(1:10)	- (<1:5)	- (<1:5)
	19	- (<1:5)	- (<1:5)	+(1:40)	+(1:80)	+(1:320)
	20	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	21	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
E	22	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	23	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	24	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)
	25	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)	- (<1:5)

注:“-”表示中和抗体滴度为阴性(<1:20);“+”表示中和抗体滴度为阳性(≥1:20)。Note:“-” represents that the neutralising antibody titer is negative (<1:20); “+” represents that the neutralising antibody titer is positive (≥1:20).

正态性分布(Shapiro-Wilk test,  $P=0.227$ )。VNT 相较 ELISA 更加敏感,可通过所构建的简单线性方程实现 VNT 与 ELISA 结果的相互转换。

### 3 讨论

鉴于目前 LSD 在我国和周边国家广泛流行的现状,山羊痘弱毒疫苗已成为预防和控制 LSD 的必要且重要手段之一,因此,选择合适的免疫剂量和免疫途径来完善现有的免疫程序已成为养牛者急切关心的问题。

#### 3.1 皮下接种 5 倍羊剂量诱导最强的中和抗体反应

本研究发现,皮下免疫 5 倍羊剂量组诱导的中和抗体反应产生时间早,且抗体滴度明显高于其他组。这与之前国际上的其他研究所报道相似,即:免疫后 10~15 d 开始出现免疫抗体,并于 30 d 后达到顶峰,

随后逐渐下降<sup>[13-14]</sup>。同时我们发现,并不是所有免疫牛都能检测到中和抗体反应,15 d 免疫牛抗体转阳率为 60%(3/5)。据报道,山羊痘和绵羊痘等弱毒疫苗接种牛体后的血清抗体转阳率在 20%~60%<sup>[7]</sup>,与我们的研究结果类似。统计目前国际上使用的 10 余种 LSDV 疫苗,除最近获批的 1 种灭活疫苗外,其余都是弱毒活疫苗,包括山羊痘和绵羊痘弱毒活疫苗和 LSDV 弱毒疫苗(如:Neethling 疫苗)。所有弱毒疫苗均采用皮下注射接种<sup>[15-16]</sup>。综合国际上相关疫苗的免疫程序和本研究的试验结果,牛皮下接种 5 倍羊剂量的免疫程序是可行的。

#### 3.2 不同剂量和接种途径免疫山羊痘弱毒疫苗的牛体安全性

本研究使用 PCR 检测法未发生病毒血症以及鼻咽腔排毒现象。虽然 5 倍羊剂量皮下免疫组的 2 头牛出现了轻微的皮肤结节反应,但未见全身性反应,

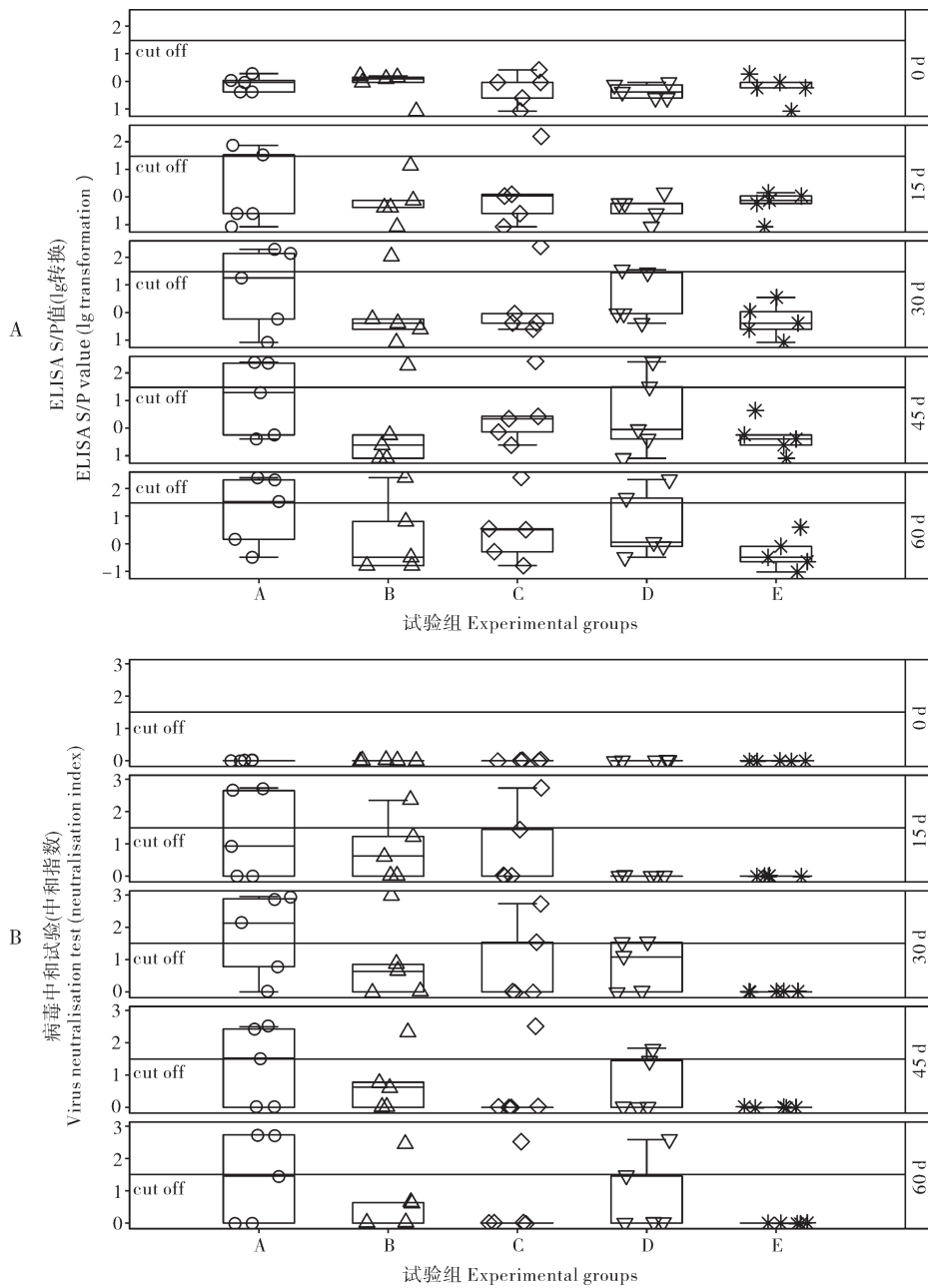


图3 免疫后0~60 d抗体ELISA检测结果(A)及病毒中和试验检测结果(B)比较

Fig. 3 Comparison of antibody ELISA test results (A) and virus neutralisation test results (B) at 0-60 days after immunization

表3 ELISA与病毒中和试验抗体检测结果的比较  
Table 3 The comparison on antibody test between ELISA and virus neutralisation test

病毒中和试验 Virus neutralisation test (VNT)	ELISA	检测数 Count
阳性 Positive	阳性 Positive	21
阳性 Positive	阴性 Negative	6
阴性 Negative	阳性 Positive	0
阴性 Negative	阴性 Negative	98

且这种皮肤反应在出现症状后10 d自愈。这种轻微的疫苗副作用与已报道的其他弱毒绵羊痘和LSDV弱毒疫苗的牛体副作用类似,并且对于免疫后30 d内的产奶量和牛群淘汰率无明显的副作用<sup>[17-18]</sup>。同时,发生皮肤副作用的2头牛产生了更高的中和抗体滴度(中和抗体效价均为1:640),且中和抗体滴度维持时间长,一直持续至免后60 d仍然未见下降。

至于为什么低剂量接种组产生了副反应而高剂

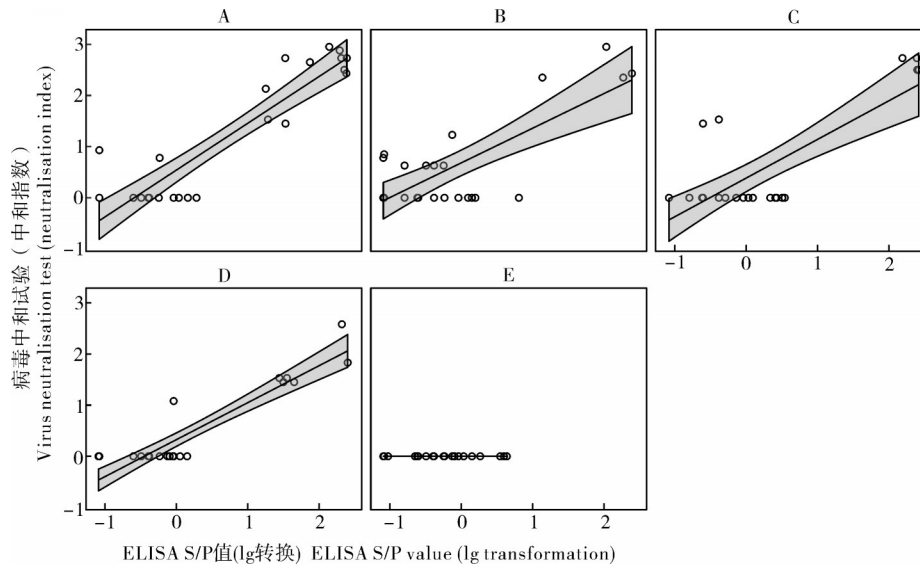


图4 5个试验组的ELISA与病毒中和试验结果散点图

Fig.4 Scatter plot of virus neutralisation test and ELISA results in 5 groups

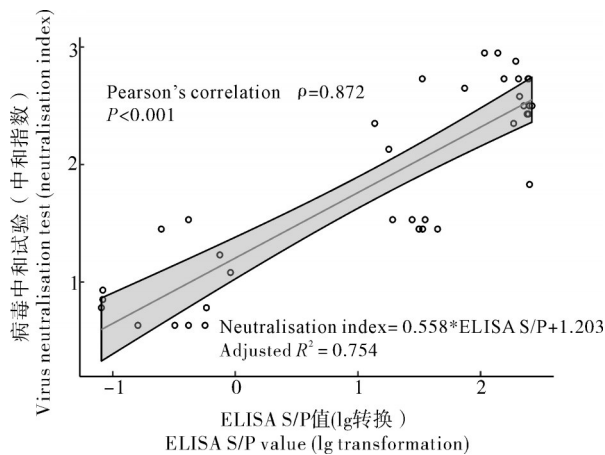


图5 ELISA S/P值与病毒中和试验中和指数相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between neutralisation index of virus neutralisation test and ELISA S/P value

量组却没有,这可能是牛体间的个体差异,确切原因未知。据文献报道,使用5倍与10倍剂量的山羊痘或绵羊痘弱毒疫苗或LSDV弱毒疫苗都有可能不同程度地出现免疫副作用,占接种牛群的0.3%至25%,平均为8%;这种副作用可能与动物的年龄、所使用的疫苗毒株等多种因素相关<sup>[18-19]</sup>;相同剂量下,成年动物发生副作用比例高,约为12%,但犊牛与青年牛均未出现副作用<sup>[18]</sup>。

### 3.3 VNT和ELISA抗体检测呈显著正相关

VNT是WOAH推荐的LSD抗体检测的首选方法<sup>[3]</sup>。本研究证明ELISA与VNT具有很高的符合率(95.2%),相关性检验也显示ELISA的S/P值与VNT的中和指数(NI)间具有高度一致性。同时,鉴

于中和试验操作复杂、耗时长,本研究建立了一个简单线性回归方程实现ELISA的S/P值向VNT中和指数的快速转换,可有效解决临床上使用ELISA替代VNT的结果共享困难的问题。由于本研究所用数据集较少,该模型的预测效果应进一步使用外部测试数据集和野毒感染血清进行优化。

ELISA相对VNT的敏感性偏低。VNT测定的为针对疫苗株全病毒的总抗体,而本研究使用的ELISA试剂盒为双抗原夹心法,检测的是对痘病毒属特定蛋白(P32蛋白)的总抗体<sup>[20]</sup>,这可能是VNT更加敏感的主要原因。鉴于ELISA检测中所使用的靶抗原P32蛋白在LSDV和GTPV中的核苷酸同源率为98.1%,氨基酸同源率为97.2%,因此认为该ELISA的检测结果对LSDV和GTPV两种疫苗毒株的抗体反应的一致性很高。同时,LSDV和GTPV两种病毒基因组的同源性为97%<sup>[21]</sup>,因此利用山羊痘弱毒疫苗株进行的中和试验可以代表基于LSDV的中和试验进行免疫抗体检测。利用强毒力的LSDV进行中和试验,具有散毒风险,所以替代方法具有可操作性。

### 3.4 免疫抗体监测的应用和局限性

由于山羊痘病毒弱毒苗或LSDV弱毒苗产生的免疫保护反应以细胞免疫为主、体液免疫为辅<sup>[7]</sup>,因此,在《WOAH陆生动物诊断试验和疫苗手册》中<sup>[3]</sup>,评价疫苗免疫效力的方法是牛体攻毒法,当免疫牛与非免疫牛所测的病毒毒价相差 $>\lg 2.5$ 以上时,判断为疫苗合格。但攻毒法操作复杂,且必须在生物

安全隔离实验室内完成,只在疫苗种毒效力评价时用。鉴于目前尚没有成熟、标准化、简易、价廉的细胞免疫检测方法,在疫苗接种后的免疫反应状态评价时,WOAH推荐使用中和抗体检测法<sup>[3]</sup>。一些国家在群体检测时,甚至使用奶样替代血样用于奶牛 LSDV 的抗体监测,以提高监测效率和监测成本;同时奶样采集是无损伤采样,能更大程度地保护动物福利<sup>[22]</sup>。

然而,无论是中和抗体反应或 ELISA 抗体反应都只能作为疫苗有效接种的指标,而不能直接作为免疫保护效力高低的评价指标。首先,如前所述,接种牛的血清抗体转阳率达不到 100%,且血清抗体效价衰减周期短。未检测到抗体或抗体转阴的免疫牛,疫苗的免疫保护作用依然存在。据报道,山羊痘弱毒疫苗诱导的免疫力可能持续 3 a 时间,我国使用的免疫程序是 1 a 接种 1 次<sup>[23]</sup>。因此,需要深入研究痘病毒的免疫保护反应规律,筛选免疫保护相关的检测标识,建立简便、适用的免疫保护反应临床监测方法。

目前用于细胞免疫评价较为成熟的方法是外周血 IFN- $\gamma$  体外释放检测法,市场上已有试剂盒供应,用于检测牛结核病。但市场上尚无针对痘病毒属成员的细胞因子检测试剂盒。本研究曾采用 ConA 蛋白与疫苗毒株刺激新鲜外周血,模拟牛结核病 IFN- $\gamma$  检测方法,但未成功(结果未展示),说明反应条件还需优化,或需要筛选更合适的细胞因子标识用作诊断靶标。Gari 等<sup>[24]</sup>曾用超敏反应皮试揭示细胞免疫强的疫苗可对野毒株产生更好的保护作用。

本研究结果证实,山羊痘弱毒疫苗(AV41 株)采用 5 倍羊剂量皮下接种成年肉牛,能诱导良好的抗体反应,血清抗体转阳率达 60%。VNT 与 ELISA 检测抗体具有很高的符合率,通过所建立的回归方程可进行 2 种抗体检测结果的转换。因此,本研究可为牛 LSDV 疫苗免疫程序的优化和评价提供参考依据。

## 参考文献 References

- [1] TUPPURAINEN E S M, LAMIEN C E, DIALLO A. Capripox (lumpy skin disease, sheep pox, and goat pox) [J]. *Veterinary vaccines*, 2021; 383-397.
- [2] CASAL J, ALLEPUZ A, MITEVA A, et al. Economic cost of lumpy skin disease outbreaks in three Balkan countries: Albania, Bulgaria and the Former Yugoslav Republic of Macedonia (2016–2017) [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65(6): 1680-1688.
- [3] WOA. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals - chapter 3.4.12. Lumpy skin disease (version adopted in May 2021) [M]. Paris: World Organisation for Animal Health, 2021.
- [4] SANZ-BERNARDO B, HAGA I R, WIJESIRIWARDANA N, et al. Quantifying and modeling the acquisition and retention of lumpy skin disease virus by hematophagous insects reveals clinically but not subclinically affected cattle are promoters of viral transmission and key targets for control of disease outbreaks [J/OL]. *Journal of virology*, 2021, 95(9): e02239-20 [2022-04-02]. <https://doi.org/10.1128/JVI.02239-20>.
- [5] ALEKSANDR K, OLGA B, DAVID W B, et al. Non-vector-borne transmission of lumpy skin disease virus [J/OL]. *Scientific reports*, 2020, 10: 7436 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64029-w>.
- [6] 刘平, 李金明, 陈荣贵, 等. 我国首例牛结节性皮肤病的紧急流行病学调查 [J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(1): 1-5. LIU P, LI J M, CHEN R G, et al. The first outbreak investigation of lumpy skin disease in China [J]. *China animal inspection*, 2020, 37(1): 1-5 (in Chinese with English abstract).
- [7] TUPPURAINEN E, DIETZE K, WOLFF J, et al. Review: vaccines and vaccination against lumpy skin disease [J/OL]. *Vaccines*, 2021, 9(10): 1136 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101136>.
- [8] IRELAND D C, BINEPAL Y S. Improved detection of capripox-virus in biopsy samples by PCR [J]. *Journal of virological methods*, 1998, 74(1): 1-7.
- [9] LEI C F, YANG J, HU J, et al. On the calculation of TCID<sub>50</sub> for quantitation of virus infectivity [J]. *Virologica sinica*, 2021, 36(1): 141-144.
- [10] DOHOO I R, MARTIN S W, STRYHN H. *Veterinary epidemiologic research* [M]. 2nd ed. Charlotte: VER, Inc., 2009.
- [11] STEVENSON M, SERGEANT E, NUNES T, et al. epiR: tools for the analysis of epidemiological data [CP]. Version 2.0.52, 2022. <https://cran.r-project.org/package=epiR>.
- [12] WICKHAM H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis* [M]. 2nd ed. New York: Springer International Publishing, 2016.
- [13] ABUTARBUSH S M, TUPPURAINEN E S M. Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65(6): 1657-1663.
- [14] MILOVANOVIĆ M, DIETZE K, MILIĆEVIĆ V, et al. Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests [J/OL]. *BMC veterinary research*, 2019, 15(1): 80 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1831-y>.
- [15] MORGENSTERN M, KLEMENT E. The effect of vaccination with live attenuated neethling lumpy skin disease vaccine on milk production and mortality: an analysis of 77 dairy farms in Israel [J/OL]. *Vaccines*, 2020, 8(2): 324 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020324>.
- [16] HAMDI J, BOUMART Z, DAOUAM S, et al. Development and evaluation of an inactivated lumpy skin disease vaccine for cattle [J/OL]. *Veterinary microbiology*, 2020, 245: 108689 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108689>.
- [17] ABUTARBUSH S M, HANANEH W M, RAMADAN W, et al. Adverse reactions to field vaccination against lumpy skin dis-

- ease in Jordan [J/OL]. *Transboundary and emerging diseases*, 2016, 63(2): e213-e219 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1111/tbed.12257>.
- [18] KATSOULOS P D, CHAINTOUITIS S C, DOVAS C I, et al. Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65(1): 174-185.
- [19] European Food Safety Authority (EFSA), CALISTRIS P, DECLERCQ K, et al. Lumpy skin disease [J/OL]. *EFSA journal*, 2019, 17(3): e05638 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.2903/j.efs.2019.5638>.
- [20] HEINE H G, STEVENS M P, FOORD A J, et al. A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene [J]. 1999, 227(1/2): 187-196.
- [21] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses [J]. *Journal of virology*, 2002, 76(12): 6054-6061.
- [22] MILOVANOVIĆ M, MILIĆEVIĆ V, RADOJIČIĆ S, et al. Suitability of individual and bulk milk samples to investigate the humoral immune response to lumpy skin disease vaccination by ELISA [J/OL]. *Virology journal*, 2020, 17(1): 28 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01298-x>.
- [23] 景志忠, 何小兵, 陈国华, 等. 牛结节性皮肤病防控技术研究现状及其策略 [J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(2): 205-214. JING Z Z, HE X B, CHEN G H, et al. Development status of prevention and control technology to bovine lumpy skin disease and its strategy in China [J]. *Chinese veterinary science*, 2020, 50(2): 205-214 (in Chinese with English abstract).
- [24] GARI G, ABIE G, GIZAW D, et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus [J]. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3256-3261.

## Effects of inoculation routes and doses of attenuated goat pox vaccine (AV41 strain) on antibody response in cattle

WANG Yu<sup>1,2</sup>, XIONG Bo<sup>1,2</sup>, PENG Qingjie<sup>3</sup>, XIANG Zhijie<sup>1,2</sup>, YUAN Xinwei<sup>1,2</sup>,  
WANG Yan<sup>1</sup>, ZOU Liangxun<sup>4</sup>, CHEN Yingyu<sup>1,2</sup>, GUO Aizhen<sup>1,2</sup>

1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University/  
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 3. Angel Yeast Co., Ltd, Yichang 443001, China;

4. Hubei Liangyou Jinniu Animal Husbandry Technology Co., Ltd, Xiangyang 441034, China

**Abstract** To evaluate the dynamics of antibodies production after subcutaneous and intradermal inoculation of attenuated goat pox vaccine (AV41 strain) in cattle and optimize the immunization program of cattle, 25 healthy beef cattle were randomly assigned into 5 groups and inoculated subcutaneously and intradermally at 5 and 10 times of goat dose, respectively. The standard single dose was  $1.0 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> AV41 strain. At 0, 15, 30, 45 and 60 days post vaccination, the serum antibody level was detected by both virus neutralisation test (VNT) and a commercial ELISA kit. The PCR results of nasopharyngeal swabs and blood were negative without shedding vaccine strain. The results of VNT and ELISA antibody detection were similar, 60% of the cattle in the subcutaneous inoculation with 5 times dose group seroconverted on day 30 post vaccination, with the maximum neutralising antibody titer of 1:640, followed by the intradermal inoculation with 10 times dose group and subcutaneous inoculation with 10 times dose group (40%), while only 20% seroconverted in the intradermal inoculation with 5 times dose group. The neutralisation index of VNT was significantly positively correlated with the S/P value of ELISA. The above results suggest that similar to the inoculation route and dose of relevant international vaccines, subcutaneous inoculation of AV41 at a 5 times goat dose is safe and effective and can be used as a clinical vaccination protocol for lumpy skin disease.

**Keywords** lumpy skin disease; attenuated goat pox vaccine (AV41 strain); vaccination dose; inoculation route; antibody detection; healthy breeding

(责任编辑:边书京)