

PPD 批次与注射方式对 PPD 皮内变态反应检疫的影响

张家瑞¹, 张 力², 屈勇刚^{1*}, 连晓春²,

李 静¹, 常军帅¹, 李 岩^{2*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站, 乌鲁木齐 830063)

摘 要: [目的] 为了探究在牛结核病检疫中出现的使用不同批次的 PPD 和皮下注射 PPD 等情况是否会对检疫结果的判定造成干扰。[方法] 试验首次通过在豚鼠背部采用皮下注射法和皮内交替注射同一厂家不同批次的结核菌素提纯蛋白衍化物 (purified protein derivative of tuberculin, PPD) 的方法, 参照《结核菌素提纯蛋白衍化物 (PPD) 制造及检定规程》于每次注射后 24 h、48 h 和 72 h 观察皮试处是否产生迟发型变态反应。[结果] 皮内组 (不同批次 PPD 皮内注射) 和皮下组 (同一批次 PPD 皮下注射) 经 3 次注射后的皮试结果与标准参照组的皮试结果无差异, 且在每次皮试后的 24 h、48 h 和 72 h 皮试处均未出现局部红斑硬结。[结论] 试验证明了 PPD 皮内变态反应检疫结果判定不受 PPD 皮下接种及 PPD 的不同批次的干扰。

关键词: 牛结核病; 结核菌素提纯蛋白衍化物; 豚鼠; 批次; 注射方式; 影响因素

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2021)02-0021-04

牛结核病主要是由牛分枝杆菌引起的一种慢性消耗性人兽共患病。各国通常采用检疫和扑杀的策略来防控牛结核病。但当检疫中出现假阳性牛被扑杀的情况时会造成巨大的经济损失。因此, 人们开始对造成检疫结果出现假阳性的原因进行调查研究^[1]。曾有人研究发现由于规模化养殖的牛群每年需要进行 PPD 皮内变态反应检疫牛结核病, 并且在多次接种 PPD 时常会出现使用不同批次的 PPD 和皮下注射 PPD 等情况, 这时就可能会对 PPD 皮内变态反应检疫造成影响^[2]。为此, 人们对干扰 PPD 皮内变态反应检疫的影响因素进行了许多相关研究。其中, 关于混用不同批次 PPD 进行牛结核病复检时对 PPD 皮内变态反应检疫结果判定是否产生干扰的公开数据是相互矛盾的, 同时也缺乏对牛只进行复检时多次皮下接种 PPD 是否会产生影响的相关数据^[3]。另外, 由于牛模型存在材料昂贵、操作不便等限制, 使得进行该类研究的难度大大增加, 因此对牛分枝杆菌同样敏感, 迟发型变态反应也非常强烈的豚鼠模型被重新利用起来^[4]。本研究首次利用豚鼠作为动物模型探究在牛结核病检疫中出

现的使用不同批次的 PPD 和皮下注射 PPD 等情况是否会对检疫结果的判定造成干扰, 以为建立更简单、安全、可靠的牛结核病检测与净化方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验药品

结核菌素提纯蛋白衍化物 (PPD) (规格: 50 头份/瓶, 批号: 201003、201801) 由哈药集团生物疫苗有限公司生产, 皮试实验前用生理盐水稀释至 50 IU/mL 的皮试浓度。0.9% 氯化钠注射液 (规格: 500 mL, 4.5 g/瓶, 批号: 1908263B) 由西安京西双鹤药业有限公司生产。

1.2 试验动物及分组

清洁级豚鼠 24 只, 雌雄各 12 只, 6~9 周龄, 饲养环境良好, 自由采食和饮水。实验动物生产许可证号: SCXK(新)2020-0003。实验动物饲料生产许可证: 苏饲证(2019)07014。均购自新疆医科大学医学实验动物中心。

24 只豚鼠随机分为 4 组: 标准参照组 (同一批

收稿日期: 2020-12-24 修回日期: 2020-12-28

基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目 (2020AB015); 八师石河子市促进科技成果转化引导计划项目 (2019ZH05); 石河子大学成果转化与技术推广计划项目 (CGZH201908)

作者简介: 张家瑞 (1995—), 男, 硕士研究生, 主要从事动物传染病诊断与防治研究。

*** 通讯作者:** 屈勇刚 (1971—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动物传染病诊断与防治研究。

李岩 (1966—), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事动物疫病预防控制研究。

次 PPD 皮内注射,批号:201801)、皮内组(不同批次 PPD 皮内注射,批号:201003 和 201801)、皮下组(同一批次 PPD 皮下注射,批号:201801)和生理盐水组(0.9% 氯化钠注射液)。

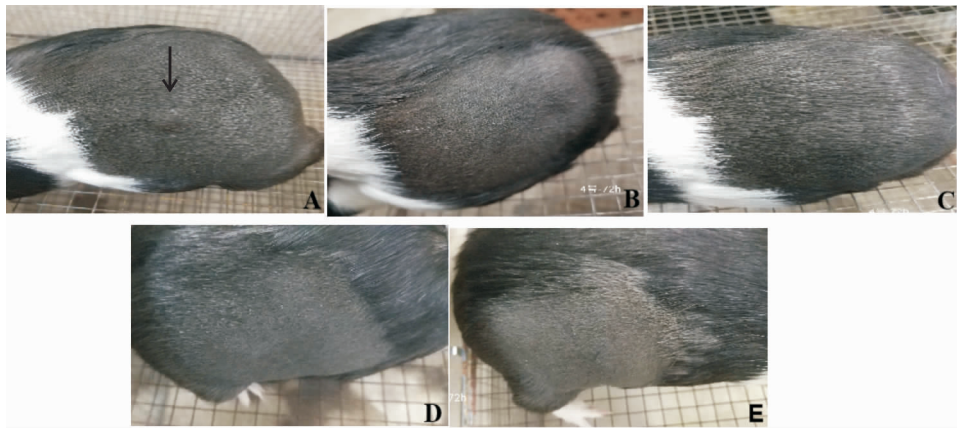
1.3 皮肤试验

参照《结核菌素提纯蛋白衍化物(PPD)制造及检定规程》中的“致敏作用试验”进行部分试验设计。豚鼠经 7 d 适应期后,在试验前对豚鼠一侧背部皮试区进行脱毛处理。皮试前应检查脱毛处皮肤是否存在外伤,若存在外伤将选择另一侧重新脱毛进行试验,并做好相关记录。标准参照组每只皮内注射 0.1 mL(5 IU)的 PPD(批号:201801);皮内组交替注射 2 个批号的 PPD(批号:201003 和 201801);皮下组每只皮下注射 0.1 mL(5 IU)的 PPD(批号:201801)。生理盐水组每只皮内注射 0.1

mL 的 0.9% 氯化钠注射液。各组每隔 2 周进行 1 次皮试,并于每次皮试后 24 h,48 h,72 h 分别观察记录豚鼠皮试部位反应情况,共 3 次。在第 3 次注射的 2 周后所有豚鼠统一注射 PPD(批号:201801)进行皮肤试验,并分别观察记录皮试后 24 h,48 h,72 h 皮试部位反应情况。

2 结果与分析

在本次试验中,阴性组所有豚鼠经 0.9% 氯化钠皮内注射后,注射处(↓)均可见豌豆样肿块,表明皮内注射成功。在试验各阶段均未观察到豚鼠皮试处出现明显异常和皮内变态反应。另在第 3 次皮试前发现部分豚鼠皮肤存在外伤,改为右侧重新脱毛进行试验,见图 1。



注:A 为皮内注射后 0 h;B 为第 1 次皮试 72 h 后;C 为第 2 次皮试 72 h 后;D 为第 3 次皮试 72 h 后;E 为第 4 次皮试 72 h 后。下同。

图 1 阴性对照组皮肤试验结果

2.1 标准参照组试验结果

试验结果显示,通过使用 PPD(批号:201801)对标准参照组豚鼠进行皮内注射后,该组所有豚鼠

注射处(↓)均可见豌豆样肿块,表明皮内注射成功。并于每次皮试后的 24 h,48 h 和 72 h 在皮试部位均未观察到局部红斑硬结,见图 2。

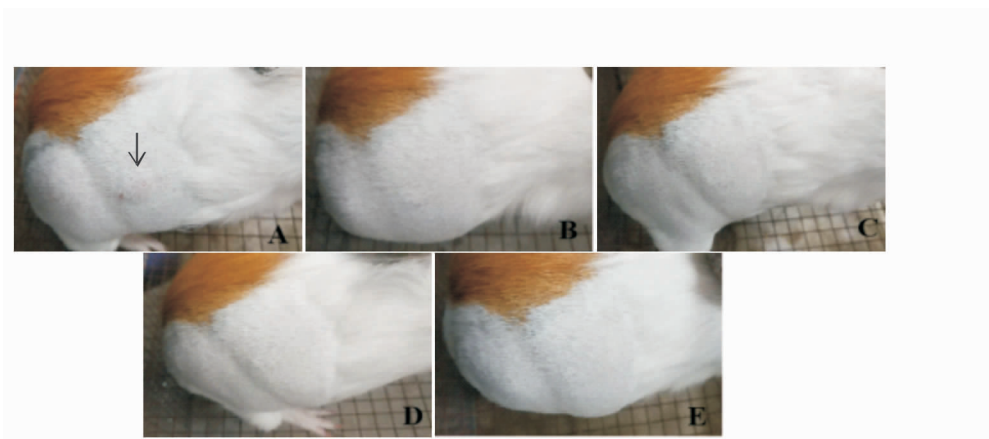


图 2 标准参照组皮肤试验结果

2.2 皮内注射不同批次 PPD 皮肤试验结果

对皮内组所有豚鼠进行皮内多次交替注射不同批次的 PPD(批号:201003 和 201801),注射后该组

所有豚鼠注射处(↓)均可见豌豆样肿块,表明皮内注射成功。并于每次皮试后的 24 h,48 h 和 72 h 在皮试部位均未观察到局部红斑硬结,见图 3。

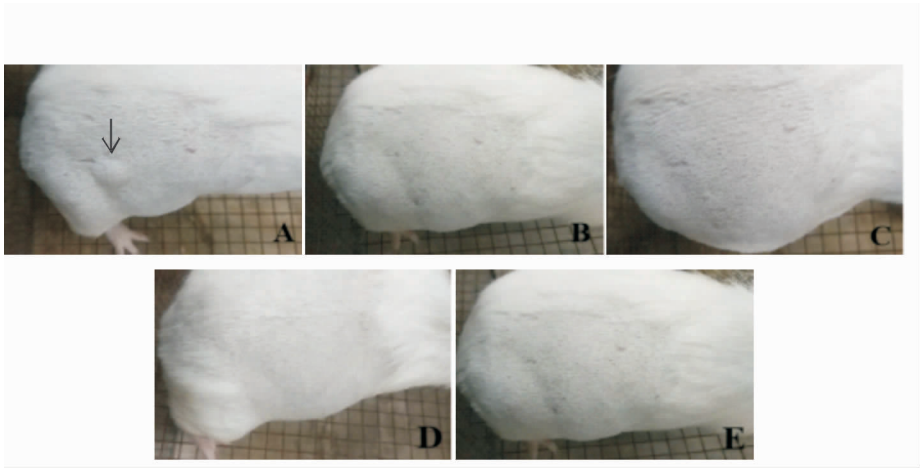


图 3 皮内组皮肤试验结果

2.3 皮下注射同一批次 PPD 皮肤试验结果

使用同一批次的 PPD(批号:201801)通过皮下注射法对豚鼠进行皮试,该组所有豚鼠注射处(↓)均未见豌豆样肿块,表明皮下注射成功。另在第 3

次皮试前发现部分豚鼠皮肤存在外伤,改为右侧重新脱毛进行试验。并于每次皮试后的 24 h,48 h 和 72 h 在皮试部位均未观察到局部红斑硬结,见图 4。

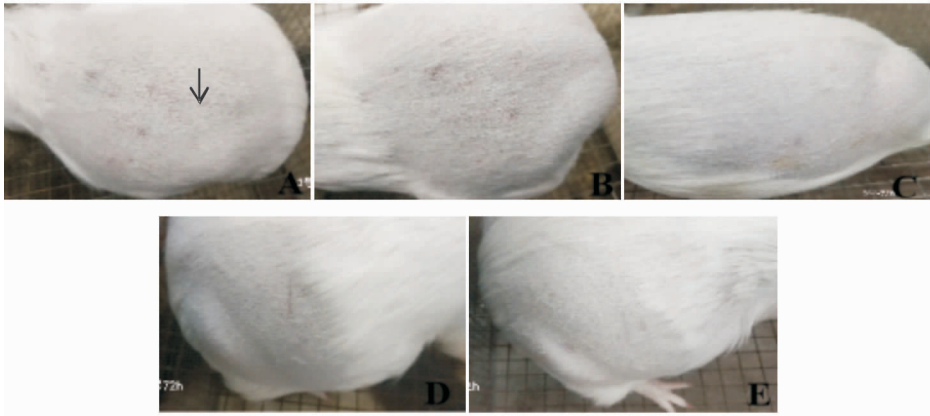


图 4 皮下组皮肤试验结果

3 讨 论

牛结核病是一种关乎人类健康和食品公共安全的人畜共患病。在许多国家,始终认为基于检疫和扑杀的策略能够有效防控牛结核病^[5]。在检疫中主要采用以细胞免疫为基础的检测方法,即 PPD 皮内变态反应试验。PPD 皮内变态反应试验是目前被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health,OIE)认可的监测和控制牛结核病的手段之一^[6]。但随着规模化养殖中检疫的日益频繁,随之而来的关于在检疫中误杀假阳性牛的情况也变得日

益严重。同时,由于规模化养殖的牛群每年多次接种 PPD 进行牛结核病检疫间隔较长,不能保证每次检疫都使用同一批次的 PPD 以及出现未严格按照规范的要求进行皮内接种,而将 PPD 注射到皮下的情况。于是便有人质疑在 PPD 皮内变态反应检疫过程中使用不同批次的 PPD 和皮下注射 PPD 这类人为因素,可能会干扰 PPD 皮内变态反应检疫结果的判定^[7]。同时,重复该类研究存在着试验动物的耗资大的问题。所以,人们开始选用一些高效低价的动物模型来降低成本。豚鼠便成为了评价和验证多种免疫试验的首选模型之一。由于豚鼠的迟发型

变态反应强烈,常常被应用于结核相关检测生物制剂和新型检测方法的评价试验,同时也已成为 PPD 皮内变态反应试验效能评定的金标准^[8]。

因此,本研究为了探究在牛结核病检疫中出现的使用不同批次的 PPD 和皮下注射 PPD 等情况是否会对检疫结果的判定造成干扰,选用同样可产生强烈迟发型变态反应的豚鼠作为试验模型,并参照《结核菌素提纯蛋白衍化物(PPD)制造及检定规程》中的“致敏作用试验”进行部分试验设计^[9]。本试验通过对豚鼠背部经过多次皮内注射同一批次的标准结核菌素后观察到每次皮试后 24 h,48 h 和 72 h 均未出现迟发型变态反应,该试验结果同上述规程中的结果一致,证明使用质量合格的同一批次的 PPD 多次进行 PPD 皮内变态反应检疫时不会干扰检疫结果的判定。该结果与 Gormley 等人^[10]的部分试验结论相符合,对人工感染牛分枝杆菌前的牛只进行多次颈部皮内变态反应检测时,虽然会在皮试试验期间出现皮厚差稍有增加的情况,但与整个试验的结果比较无差异。

本研究中使用同一厂家不同批次的结核菌素交替皮内接种豚鼠后观察到每次皮试后 24h,48 h 和 72 h 均未出现迟发型变态反应,该结果与标准参照组皮试结果无差异。同时也与王宏伟等人^[11]的研究结论相符合,其试验通过对不同厂家的牛型提纯结核菌素进行一系列临床研究,其结果显示两种出产自不同厂家的 PPD 具有较高阳性符合率,阴性符合率甚至达到了 100%,间接证明了 PPD 的批次不是干扰检测结果判定的因素。但也有与本试验结果存在差异的报道,如卫龙兴等人^[12]通过采用同一厂家的不同批次的结核菌素对存在自然感染的牛群进行结核菌素皮内变态反应后,研究发现使用不同批次 PPD 进行的皮内变态反应结果差异显著。该试验结论虽与本试验结果有所不同,但均未出现假阳性的情况。依然表明了使用不同批次的 PPD 进行 PPD 皮内变态反应检疫时不会对检疫结果判定造成影响。

与此同时,本试验还进行了多次皮下注射同一批次的 PPD,试验结果表明多次皮下注射 PPD 不会引起豚鼠产生特异性迟发型变态反应,该结果与标准参照组皮试结果无差异。本试验结果同时与 Victoria 等人^[13]的验证试验结果相符合,其研究通过对感染过分枝杆菌的儿童同时进行皮内和皮下注射结核菌素,试验发现在同一试验个体的两处皮试处产

生的迟发型变态反应强度无差异,说明结核菌素皮内变态反应试验的注射途径不会干扰变态反应的结果判定。

Coad 等人^[14]还在自然感染牛分枝杆菌的牛中发现,短时间内重复进行皮肤试验可能导致皮肤试验反应性的逐步降低,这对检测存在不确定性的感染动物具有潜在的负面影响。对于假阴性的干扰,由于本研究现阶段存在诸多方面的限制,只能在往后的试验中再进行研究。

参考文献:

- [1] 孙雨,马世春,董浩,等.牛结核病的流行病学特征与实验室诊断技术的研究进展[J].畜牧与兽医,2015,47(10):145-148.
- [2] 王志梅,贾广乐,王建波,等.牛结核病病原体研究进展[J].中国畜牧兽医杂志,2010(3):207-210.
- [3] 卫龙兴,王国贤,盛岳山,等.2种牛型提纯结核菌素变态反应试验结果比较[J].中国兽药杂志,2013,47(12):36-38.
- [4] 汪毅平,张同威,贾赤宇.结核性创面动物模型的研究进展[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2017,12(4):309-311.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第3部[M].北京:中国医药科技出版社,2010:325-327.
- [6] 邓大川.牛源结核分枝杆菌复合群的分离鉴定及其分子进化研究[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [7] 王会敏,张洪军.牛结核净化场多种检测方法的比较[J].今日畜牧兽医,2017(11):4.
- [8] 张昊凌,张志勇.结核分枝杆菌感染动物模型的研究进展[J].微生物与感染,2012(3):184-189.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(三部注释)[M].北京:中国医药科技出版社,2016:70-74.
- [10] GORMLEY E, DOYLE M B, MCGILL K, et al. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004,102(4):413-420.
- [11] 王宏伟,李新萍,史文军.不同厂家牛型结核菌素(PPD)在奶牛结核病检测中的效果对比[J].养殖与饲料,2020(6):88-89.
- [12] 卫龙兴,王国贤,盛岳山,等.同一厂家不同批次 PPD 试验结果比较[J].上海畜牧兽医通讯,2013(5):37-39.
- [13] VICTORIA M S, STEINER P, RAO M. The effect of intradermal and subcutaneous Route of Administration on Variation in PPD Sensitivity[J]. Clinical Pediatrics, 1977, 16(6):514-515.
- [14] COAD M, HEWINSON R G, RHODES S G, et al. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses[J]. Veterinary Research, 2009, 41(2):14.

(下转第 28 页)

Effects of Tethered and Scattered Feeding on the Growth and Development of Simmental Beef Cattle

ZHANG Guo-ping¹, LI Yu-hua¹, XIE Jian-liang¹, YANG Chun-lian¹, WANG Hong¹, LI Hong-wei¹,
HUANG Rui-ping², WANG Xiao-qin¹, LI Cheng-yu³, DONG Biao³, XIN Ya-ping^{4*}

(1. Animal Husbandry Technology Promotion Service Center of Guyuan, Ningxia, Guyuan 756000; 2. Institute of Animal Health Supervision of Guyuan, Guyuan, Ningxia 756000; 3. Guyuan Beef Cattle Breeding Demonstration Park, Guyuan Agricultural Comprehensive Investment Company, Guyuan, Ningxia 756000; 4. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: [Objective] The purpose was to study the effects of tethered and scattered feeding on weight gain, growth and health situation of Simmental cattle. [Method] Group experiment design method was used to carry out two kinds of feeding: Tethered feeding and scattered feeding. [Results] The initial weight, body weight at 2 months of fattening, average daily gain in 2 months, body weight at 3 months of fattening, average daily gain in 3 months were 473.68 kg, 584.20 kg, 1 843.67 g, 631.46 kg and 1 753.11 g, respectively in the control group. The initial weight, body weight at 2 months of fattening, average daily gain in 2 months, body weight at 3 months of fattening, average daily gain in 3 months were 473.80 kg, 581.10 kg, 1 788.33 g, 628.20 kg and 1 715.56 g, respectively. The average drug cost of tethered cattle was 65 yuan per cattle per month, and that of scattered feeding was 30 yuan per cattle per month in this experiment. [Conclusion] The fattening effect of scattered feeding of Simmental bulls was better than that of tethered feeding on the weight gain, growth and health situation of Simmental beef cattle.

Key words: Simmental cattle; tethered feeding; scattered feeding; growth and development

(上接第 24 页)

The Effect of PPD Batch and Injection Method on Tuberculin Intradermal Allergy Test

ZHANG Jia-rui¹, ZHANG Li², QU Yong-gang^{1*}, LIAN Xiao-chun²,
LI Jing¹, CHANG Jun-shuai¹, LI Yan^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003;
2. The General Station of Animal Husbandry and Veterinary of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830063)

Abstract: [Objective] In order to explore whether different batches of PPD and subcutaneous injection of PPD in bovine tuberculosis quarantine interfere with the determination of quarantine results. [Method] Different batches of standard tuberculin (purified protein derivative of tuberculin, PPD) from the same manufacturer were firstly used by subcutaneous injection and intracutaneous injection on the back of guinea pigs. The delayed allergic reaction type was observed at 24 h, 48 h and 72 h after each skin test according to the regulation for manufacture and verification of PPD. [Result] The results showed that there was no difference between the skin test results of the intradermal group (intradermal injection of different batches of PPD) and the subcutaneous group (subcutaneous injection of the same batch of PPD) after three injections and the skin test results of the standard reference group, and there was no local erythema at 24 h, 48 h and 72 h after each skin test. [Conclusion] This experiment proved that the quarantine result of PPD intradermal allergy was not interfered by PPD subcutaneous inoculation and different batches of PPD.

Key words: bovine tuberculosis; PPD; guinea pig; batch; injection mode; influence factor