

猪乙型脑炎病毒3种灭活疫苗的 制备及免疫效果比较

乔进平[†], 赵明秋[†], 张学涛, 李银光, 李姗姗, 刘 薇, 陈金顶
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以 GZ0409-31 株乙脑强毒株作为抗原与白油佐剂、蜂胶佐剂、603 纳米佐剂制备灭活疫苗,并对疫苗做了无菌检验和安全检验,灭活疫苗接种小鼠后均未出现不良反应,安全性良好.将制备的乙脑灭活疫苗免疫小鼠,并且与市售乙脑弱毒活苗作对比.结果显示,白油佐剂灭活苗组和 603 纳米佐剂灭活苗组在第 90 d 抗体效价还维持在较高的水平,同期的弱毒活苗组抗体较低;弱毒活苗组 IFN- γ 含量较灭活苗组高,其中 603 纳米佐剂灭活苗组 IFN- γ 含量较其他灭活苗组高.用乙脑病毒强毒对免疫小鼠进行感染,白油佐剂灭活苗和 603 纳米佐剂灭活苗对小鼠的保护率均为 100% (10/10),蜂胶佐剂灭活苗对小鼠的保护率为 70% (7/10),对照组市售乙脑弱毒活苗对小鼠的保护率为 100% (10/10).表明制备白油佐剂灭活苗和 603 纳米佐剂灭活苗对小鼠的保护率高,无排毒散毒危险.

关键词:乙脑病毒; 灭活疫苗; 佐剂; 免疫效果

中图分类号:S855.3

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)02-0085-04

Preparation and Comparison of Three Different Adjuvant Inactivated Vaccines of Japanese Encephalitis Virus from Swine

QIAO Jin-ping[†], ZHAO Ming-qiu[†], ZHANG Xue-tao, LI Yin-guang, LI Shan-shan, LIU Wei, CHEN Jin-ding
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The oil-emulsion, propolis and 603 nanometer inactivated vaccines of Japanese encephalitis virus GZ0409-31 strain from swine were prepared and compared by sterility and safety test. Mice immunized with these inactivated vaccines displayed effective immune protection that testifies their safety. The groups of mice immunized with the oil-emulsion and 603 nanometer inactivated vaccines had higher antibody titer until 90 days post inoculation whereas the group of mice immunized with attenuated Japanese encephalitis vaccine had lower antibody titer. In addition the level of IFN- γ was higher in the group of mice immunized with attenuated Japanese encephalitis vaccine than those groups with inactivated Japanese encephalitis vaccines. The group of mice immunized with 603 nanometer inactivated Japanese encephalitis vaccines expressed higher level of IFN- γ than those other inactivated Japanese encephalitis vaccines. Mouse immunized with the oil-emulsion, propolis and 603 nanometer inactivated vaccines could be protected from the infection of GZ0409-31 Japanese encephalitis virus with 100% protection rate in case of oil-emulsion and 603 nanometer inactivated vaccines immunized groups but remained 70% in propolis inactivated vaccines immunized groups. The attenuated Japanese encephalitis vaccine also provided 100% (10/10) protection rate. The oil propolis and 603 nanometer inactivated GZ0409-31 Japanese encephalitis vaccines were prepared and found to be safe and effective.

Key words: Japanese encephalitis virus; inactivated vaccine; adjuvant; the effect of the immune

收稿日期:2010-11-01

作者简介:乔进平(1984—),男,硕士研究生;赵明秋(1965—),女,助理研究员;[†]:对本文贡献相同;通信作者:陈金顶(1964—),男,教授,博士, E-mail:jdchen@scau.edu.cn

基金项目:农业公益性行业科研专项(200803015);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638);教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(TRT0723)

乙型脑炎又称日本乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE), 简称乙脑, 是严重威胁人畜健康的一种中枢神经系统的急性传染病。多种动物和人都可感染, 易感动物主要是猪, 其次是马、牛、羊, 家禽主要是鸡、鸭、鹅, 以及野生动物如猴、田鼠、蝙蝠、蛇等。不同年龄、性别和品种的猪都可感染, 一般呈散发型, 隐性感染者居多。本病季节性强, 每年6—10月份多发, 蚊虫是本病的主要传播媒介, 通过猪-蚊-猪/人的基本传播途径传播病毒^[1]。猪感染后大多数突然发病, 体温高达41℃左右。公猪感染后发生睾丸炎; 怀孕母猪表现为流产、死胎或早产, 胎儿多是死胎或木乃伊胎, 同胎流产的胎儿大小差别明显; 仔猪感染后可发生神经症状, 如磨牙、口流白沫、转圈、视力障碍、盲目冲撞, 严重者倒地不起而死亡。对乙脑防控尚无特效药物, 因此免疫预防是控制该病的重要措施^[2-4]。现在用于预防猪乙脑用的是弱毒活疫苗, 由于弱毒疫苗存在病毒毒力返强的危险, 应用乙脑灭活疫苗更有利于猪乙脑的防控。本研究应用猪源乙脑病毒 GZ0409-31 株与不同佐剂制备灭活疫苗免疫动物, 并与上海海利生物药品有限公司生产的兽用乙脑弱毒活苗作对比, 研究猪乙脑灭活疫苗的免疫效力, 为猪乙脑灭活疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和试验动物

乙脑病毒 GZ0904-31 株和 BHK-21 细胞由华南农业大学兽医学院微生物教研室保存。3 周龄雌性清洁级 BALB/c 小白鼠购自南方医科大学动物实验中心。

1.2 主要试剂

猪乙脑弱毒活苗为上海海利生物药品有限公司产品; 乙脑抗体的 ELISA 检测试剂盒为武汉科前公司产品; IFN- γ 的 ELISA 检测试剂盒为美国 RD 公司产品; DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品; 白油为杭州炼油厂产品; 硬脂酸铝为温州市化学用料厂产品; 司本 80 和吐温 80 为上海申宇医药化工有限公司产品; 603 纳米佐剂为北京生泰尔生物科技有限公司产品。

1.3 病毒的培养及 TCID₅₀ 的测定

将乙脑病毒 GZ0904-31 株接种于 BHK-21 细胞, 37℃ 培养 96 h 后收获, -80℃ 保存。用 DMEM 培养基将病毒作连续 10 倍稀释, 每个稀释度取 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度作 8 个重复, 并设空白细胞培养对照。放置体积分数为 5% CO₂ 培

养箱中 37℃ 继续培养, 逐日观察细胞病变, 并记录细胞病变孔数, 直到细胞病变孔数不再增多。用 Karber 氏法^[5] 计算病毒的 TCID₅₀。

1.4 病毒灭活条件的筛选及病毒的灭活

甲醛体积分数为 0.15%、0.25%、0.35%、0.45%, 灭活时间分别为 6、12、18、24、30、36 h。在到达灭活时间后, 加入 1 滴体积分数为 0.02% 硫代硫酸钠, 终止灭活, 然后将灭活的病毒液接种 BHK-21 细胞, 观察有无细胞病变。筛选出对乙脑 GZ0409-31 株进行灭活的合适条件。

1.5 猪乙脑灭活疫苗的制备

1.5.1 猪乙脑白油佐剂灭活疫苗的制备 将已灭活的 GZ0409-31 株病毒液与一定量的司本 80、吐温 80 和白油等成分按一定比例混合, 经匀浆机高速搅拌混合即成白色乳状油包水型乙脑灭活疫苗^[6-8], 置 4℃ 保存。

1.5.2 猪乙脑蜂胶佐剂灭活疫苗的制备 将制备的蜂胶佐剂按一定比例加入到已灭活的 GZ0409-31 株病毒液中, 搅拌使佐剂与乙型脑炎病毒培养液充分混匀, 制备出蜂胶乙脑灭活疫苗。

1.5.3 猪乙脑 603 纳米佐剂灭活疫苗的制备 等体积已灭活的乙型脑炎病毒培养液与 603 纳米佐剂混匀, 制备成 603 纳米乙脑灭活疫苗。

1.6 猪乙脑灭活疫苗的质量检验

1.6.1 物理性状检验 按农业部颁布的兽用生物制品规程规定的方法进行疫苗外观检查、稳定性检测、剂型检测和粘度检查。

1.6.2 细菌学检验 将上述制备的乙脑灭活疫苗和弱毒活苗分别接种硫乙醇酸盐培养基 (T·G)、酪胺琼脂 (G·A) 及葡萄糖蛋白胨汤 (G·P) 培养基中, 37℃ 培养 96 h 后进行细菌学检验^[9]。

1.6.3 安全性检验 取制备的白油佐剂灭活苗、603 纳米佐剂灭活苗、蜂胶佐剂灭活苗和弱毒活苗分别接种 3 周龄的 BALB/c 小白鼠, 每只皮下注射 0.1 mL, 连续 14 d 观察小鼠精神状态和健康状况。

1.7 免疫分组和小鼠免疫试验

BALB/c 雌性健康 3 周龄小白鼠 75 只, 随机分成 5 组, 弱毒活苗组、白油佐剂灭活苗组、蜂胶佐剂灭活苗组、603 纳米佐剂灭活苗组、空白对照组, 每组 15 只。每组随机选 2 只小白鼠尾部采血, 检测乙脑抗体全部为阴性时才能免疫。每只小鼠接种疫苗 0.1 mL, 采用皮下多点注射, 分别于第 0 和第 21 d 注射^[10-13], 在第 0、7、14、21、28、43、56 和 90 d 尾部采血 (每次每组随机选 3 只), 分离血清, 进行乙脑抗体及

细胞因子 IFN- γ 的检测。

1.8 乙脑抗体和 IFN- γ 的检测

用武汉科前公司的乙脑抗体 ELISA 检测试剂盒及 RD 公司的 IFN- γ ELISA 检测试剂盒分别对分离的血清进行检测。

1.9 免疫攻毒保护试验

在第2次免疫之后的第14 d 攻毒,每组随机取出10只小鼠腹腔注射 10^5 TCID₅₀/mL 的乙脑病毒 GZ0904-31 株培养液 0.5 mL。隔离饲养观察 14 d, 计算保护率。

2 结果

2.1 乙脑病毒培养液的 TCID₅₀

用 Karber 氏法计算出乙脑病毒 GZ0409-31 株培养液的滴度为 10^5 TCID₅₀/mL。

2.2 病毒灭活条件的筛选及病毒的灭活

根据试验结果,应选择甲醛体积分数较低并且灭活时间不宜太长,所以选择体积分数 0.35% 的甲醛灭活 18 h。

表1 不同时间灭活病毒后接种细胞的病变情况

Tab.1 Cell lesions after inoculation of inactivated virus at different time

φ (甲醛)/ %	不同灭活时间细胞病变					
	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h
0.15	有	有	有	有	有	有
0.25	有	有	有	有	有	无
0.35	有	有	无	无	无	无
0.45	有	有	无	无	无	无

2.3 白油佐剂灭活疫苗物理状态鉴定

白油佐剂灭活苗外观呈白色均质乳剂,滴于冷水表面后,呈圆的油滴状不分散,经 3 000 r/min 离心 15 min 后,无分层和破乳。在室温 25 ℃ 左右,取出口径为 1.2 mm 的吸管吸取疫苗 1 mL,令其垂直流出,6 s 流出 0.4 mL,证明适合注射用。

2.4 无菌检测

将制备的乙脑灭活疫苗和弱毒活苗分别接种在 T·G、G·A 及 G·P 培养基上,经培养检查,均无细菌生长。

2.5 灭活疫苗的安全性

将白油佐剂灭活苗、603 纳米佐剂灭活苗、蜂胶佐剂灭活苗和弱毒活苗免疫小鼠后,经观察小鼠采食及精神状况均正常。

2.6 疫苗免疫的效果

2.6.1 间接 ELISA 检测抗体的试验结果 白油佐剂灭活苗、603 纳米佐剂灭活苗、蜂胶佐剂灭活苗和弱毒活苗在首免后,小鼠均有乙脑抗体产生,但抗体效价不高。在第 21 d 二次免疫后,抗体水平都有大幅度的提升,其中白油灭活苗抗体增长速度最快,表现为相对较陡的上升曲线,抗体效价也是最高,在第 56 d 达到峰值,到第 90 d 还能维持在较高的水平。弱毒活苗和 603 纳米佐剂灭活苗组,在二免后抗体水平也有较大的上升。蜂胶灭活苗产生抗体的速度较慢,表现为平缓的上升曲线,抗体效价相对较低(图 1)。

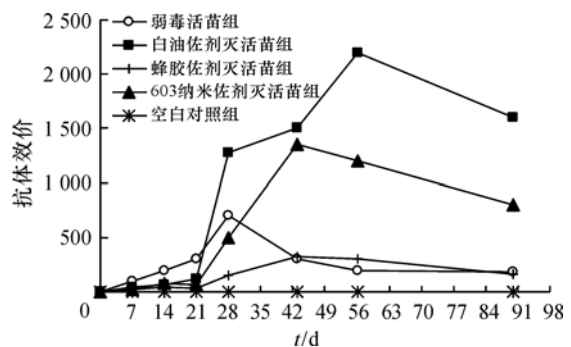
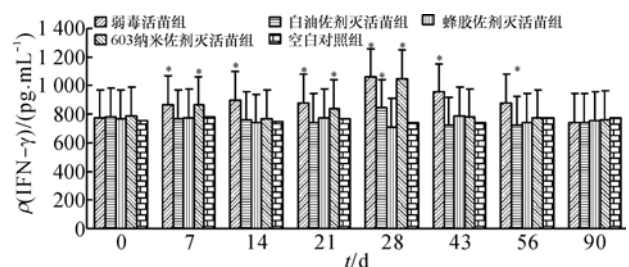


图1 小鼠免疫后 ELISA 抗体水平检测结果

Fig.1 Detection of ELISA antibody post immunization

2.6.2 间接 ELISA 检测 IFN- γ 的试验结果 应用 RD 公司 IFN- γ 的 ELISA 检测试剂盒对免疫小鼠的血清进行检测。从图 2 可知,免疫之前各组小鼠 IFN- γ 质量浓度在 753 ~ 787 pg/mL,没有显著差异;弱毒活苗组小鼠 IFN- γ 质量浓度在 7 ~ 56 d 均较高,与空白组有显著差异,在第 28 d 小鼠 IFN- γ 值达到高峰 1 060 pg/mL;白油佐剂灭活苗仅在第 28 d IFN- γ 的质量浓度与空白组相比有显著差异,其他时间白油佐剂灭活苗组和蜂胶佐剂灭活苗组小鼠 IFN- γ 的质量浓度与空白组相比没有显著差异;603 纳米佐剂灭活苗组在第 7、21、28 d IFN- γ 质量浓度分别为 864、839、1 051 pg/mL,与空白组有显著差异,说明这种新型纳米佐剂有较好的刺激机体细胞免疫的作用。



* 表示与空白对照组差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)。

图2 小鼠免疫后 IFN- γ 检测结果

Fig.2 The results of IFN- γ in mice immunized

2.7 免疫攻毒保护试验结果

在第2次免疫之后的第14 d攻毒,攻毒后空白对照组的小鼠从第5 d开始表现出神经症状,第6 d死亡3只.第7 d空白对照组小鼠全部死亡.蜂胶灭活疫苗免疫组在第7 d死亡3只,其他疫苗免疫组小鼠均正常.结果显示,白油佐剂灭活苗和603纳米佐剂灭活苗对小鼠的保护率均为100% (10/10),蜂胶佐剂灭活苗对小鼠的保护率为70% (7/10),对照州市售乙脑弱毒活苗对小鼠的保护率为100% (10/10).

3 结论

乙脑是当今危害养猪业较严重的一种病毒病,尤其是近年来乙脑病毒和其他一些病原体的混合感染更加重了此病的发生,给养猪业造成重大损失,目前尚无治疗本病的有效药物,主要依靠疫苗防控,而疫苗是否具有有良好的实际防疫效果,在很大程度上取决于制毒毒株与流行毒株的抗原关系是否密切.现在猪乙脑防控应用的乙脑弱毒活疫苗与人的乙脑防控应用的是同一弱毒株,而本研究制备的乙脑灭活苗的特点是选用免疫原性良好的猪源乙脑病毒.

良好的灭活疫苗不仅需要有良好的抗原作为基础,还需要辅以良好的佐剂来增强疫苗的免疫效果,理想的佐剂不仅能增强机体的免疫应答,更能使机体获得最佳的保护性免疫.疫苗佐剂能够非特异性地通过物理的或者化学的方式与免疫反应物质结合,从而诱导机体产生长期、高效的特异性免疫应答.本研究主要通过检测体液免疫和细胞免疫的变化情况,探索白油、603纳米佐剂、蜂胶作为GZ0904-31株乙脑病毒灭活疫苗佐剂的效果,并与乙脑弱毒活疫苗比较免疫效果.

本研究选用的GZ0409-31株猪源乙脑病毒经BHK-21细胞培养连续传代后提高了病毒滴度(10^5 TCID₅₀/mL).收获病毒液经甲醛灭活后与白油、603纳米佐剂、蜂胶佐剂制成灭活疫苗.用制备的灭活疫苗免疫小鼠通过测定抗体效价,证明该病毒制备的灭活疫苗可以刺激机体产生免疫应答和免疫保护性抗体,结果说明了所用毒株具有制备疫苗的价值.本研究测定细胞免疫水平方面选择IFN- γ ,是因为IFN- γ 是重要的细胞因子之一,具有广谱抗病毒和双向免疫调节作用.试验结果显示,灭活疫苗刺激机体细胞免疫方面较弱,但是603纳米佐剂灭活苗组和弱毒疫苗组的IFN- γ 含量相对其他组较高,说明这种新型佐剂刺激机体细胞免疫方面也有一定的作用.在对小鼠的攻毒试验中,制备的白油佐剂乙脑

灭活苗和603纳米佐剂乙脑灭活苗对小鼠都能产生100%的保护.

结果表明按本工艺制成乙脑灭活苗免疫原性良好,生产工艺简便,无排毒散毒危险,对小鼠的保护率高,为猪乙脑病毒灭活疫苗的研制应用奠定基础.

参考文献:

- [1] 陈宏.猪乙型脑炎的诊断与综合防控[J].养殖技术顾问,2010(8):158-159.
- [2] 赵以云,王强,左瑞华.猪乙型脑炎的诊断与科学防治[J].畜牧与饲料科学,2009,30(7/8):8-11.
- [3] 李立山,张周.养猪与猪病防治[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [4] FAN J M, LUO J, ZHANG G P, et al. Identification and characterization of Japanese encephalitis virus envelope protein gene from swine[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(1):11-17.
- [5] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997.
- [6] VERMA S K, GUPTA N, PATTNAIK P, et al. Antibodies against refolded recombinant envelope protein (domain III) of Japanese encephalitis virus inhibit the JEV infection to porcine stable kidney cells[J]. Protein and Peptide Letters, 2009, 16(11):1334-1341.
- [7] LITZBA N, KLADE C S, LEDERER S, et al. Evaluation of serological diagnostic test systems assessing the immune response to Japanese encephalitis vaccination[J]. Plos Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(11):1-9.
- [8] 张振兴,姜平.实用兽医生物制品技术[M].北京:中国农业科技出版社,1996.
- [9] 王君玮,刘国庆,丁德鹅,等.猪生殖与呼吸综合征油乳剂灭活疫苗的制备及安全性试验[J].中国动物检疫, 2005, 22(2):28-29.
- [10] 李玉华,李声友,王洪彬,等.乙型脑炎活疫苗与灭活苗诱导小鼠体液和细胞免疫应答的比较[J].中国生物制品学杂志,1999,12(4):229-230.
- [11] CHUNG Y J, NAM J H, BAN S J, et al. Antigenic and genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea[J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 55(1):91-97.
- [12] 董信田,李玉峰,姜平,等.猪圆环病毒2型灭活疫苗的制备与免疫效力研究[J].畜牧兽医学报,2008,39(5):639-644.
- [13] 王星晨,李郁,王桂军,等.猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗的制备及免疫试验[J].中国生物制品学杂志,2010, 23(4):382-384.

【责任编辑 柴 焰】