

口蹄疫 O 型灭活疫苗对不同母源抗体仔猪血清中抗体及细胞因子水平的影响

刘建奇¹, 齐欢欢¹, 刘玉梅², 杨富贵², 张彦婷², 周雨霞^{1*}, 魏学锋^{2*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 金宇保灵生物制品有限公司, 呼和浩特 010030)

[收稿日期] 2016-01-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 05-0011-04 [中图分类号] S858.2

[摘要] 为了解不同母源抗体水平对仔猪免疫后抗体消长的影响, 以及免疫后细胞因子的变化, 使用口蹄疫 O 型灭活疫苗对 40 头初生仔猪进行免疫, 并于初次免疫后 28 d 二次免疫, 采用液相阻断 ELISA 方法检测血清中抗体滴度, 双抗体夹心 ELISA 法检测血清 IL-8 和 IL-12 水平。结果显示, 母源抗体水平越高对于初次免疫后仔猪抗体影响越大; 二次免疫后抗体水平可长时间维持较高水平。初次免疫后 14 d~28 d, 血清中 IL-8 和 IL-12 水平上升极显著 ($P < 0.01$); 二次免疫后 14~28 d, IL-8 水平上升极显著 ($P < 0.01$), IL-12 水平上升不显著 ($P > 0.01$)。试验表明, 母源抗体水平是影响仔猪免疫后抗体消长的因素之一; 口蹄疫 O 型灭活疫苗能有效提高血清中 IL-8 和 IL-12 水平。

[关键词] 口蹄疫 O 型灭活苗; 母源抗体; 白细胞介素-8; 白细胞介素-12

The Effect of Type O FMD Inactivate Vaccine on Antibody and Cytokine Levels in Serum of Piglets with Different Maternal Antibodies

LIU Jian - qi¹, QI Huan - huan¹, LIU Yu - mei², YANG Fu - gui², ZHANG Yan - ting²,
ZHOU Yu - xia^{1*}, WEI Xue - feng^{2*}

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Jinyu Baoling Biology Science and Technology Co. Ltd, Hohhot 010030, China)

Abstract: In order to study the influence of different maternal antibody levels on the dynamics of antibody and the changes of cytokines after piglet immunization, type O FMD inactivate vaccine was used to immune 40 newly-born piglets, and second immunization on day 28 post primary immunity. The antibody titer in serum was detected by liquid-phase blocking ELISA, the levels of IL-8 and IL-12 in serum were detected by double antibody sandwich ELISA. Results show that the higher maternal antibody level was, the greater effect of antibody on piglets after first immunization, the antibody level can maintain a high level for a long time after booster immunity. 14 to 28 days after first immunity, the levels of IL-8 and IL-12 in serum are greatly significant ($P < 0.01$); 14 days to 28 days after second immunity, the level of IL-8 is greatly significant ($P < 0.01$); the

作者简介: 刘建奇, 硕士, 从事口蹄疫疫苗的研究。

通讯作者: 周雨霞, E-mail: zyx660829@163.com; 魏学锋, E-mail: weixuefeng@jinyubaoling.com.cn

increase of IL-12 level is not significant ($P > 0.05$). Results show that maternal antibody level is one of influencing factors of the dynamics of antibody after piglet immunization; type O FMD inactivate vaccine can effectively enhance the levels of IL-8 and IL-12 in serum.

Key words: type O FMD inactivate vaccine; maternal antibody; IL-8; IL-12

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触传染性的动物疫病^[1],是严重制约养殖业发展的烈性传染病之一^[2]。目前我国流行3个血清型,分别为A型、O型以及Asia I型。近年来,全国各地牛、猪、羊仍然发生以SEA(My98)毒株为主的O型口蹄疫^[2-3]。

通常认为机体抗FMDV感染的免疫反应主要为中和抗体的作用,最后通过巨噬细胞的吞噬作用将病毒清除^[4],然而Barnett等^[5]对紧急疫苗的保护机制进行研究后发现,猪接种紧急疫苗后体内可一直检测到高浓度的IL-6、IL-8及IL-12等细胞因子,Jacquelyn等^[6]研究表明细胞因子在机体抗FMDV感染中发挥重要作用。目前发展中国家主要的防控措施是通过疫苗免疫接种,现今使用最广泛的是灭活疫苗,免疫效果良好^[2]。为初步探究口蹄疫O型灭活苗的免疫机制,本试验用口蹄疫O型灭活苗免疫猪只,采用ELISA检测了不同母源抗体水平猪只抗体消长规律以及血清中细胞因子水平差异,以期为制定合理的免疫程序提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 选择免疫两次口蹄疫O型灭活疫苗初产长白猪所产仔猪50头,购自呼和浩特市某猪场。经检测,产前母猪抗体分别为 $1:2^{10}$ 、 $1:2^{7.5}$ 、 $1:2^{9.5}$ 、 $1:2^{8.5}$ 、 $1:2^{10}$ 。仔猪免疫前后经口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC检测,结果均呈阴性。

1.1.2 疫苗和试剂盒 猪口蹄疫O型灭活疫苗(O/Mya98/XJ/2010株+O/GX/09-7株,抗原含量 $6 \sim 10 \mu\text{g}/\text{头份}$,批号:5235014)和液相阻断ELISA试剂由金宇保灵生物药品有限公司提供。IL-8和IL-12检测试剂盒均购于R&D公司,货号分别为E-50030、E-50023。口蹄疫病毒非结

构蛋白ELISA试剂盒购于中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.2 实验方法 50头仔猪分为5组,1~4组为免疫组,分别于初生49 d、63 d、70 d和49 d初次免疫,此时母源抗体分别为 $1:2^{6.6}$ 、 $1:2^{4.1}$ 、 $1:2^{6.2}$ 和 $1:2^{5.1}$ 。初次免疫28 d后二次免疫,免疫剂量为2 mL/头份。5组为对照组,注射与疫苗剂量相同的生理盐水。各组于初生10~15 d,间隔4~7 d采血,测定血清中抗体滴度及细胞因子水平。

1.2.1 抗体滴度的测定 各组动物从13日龄开始,每隔7 d采用液相阻断ELISA法进行一次血清中口蹄疫病毒抗体滴度的测定,具体方法见参考文献[7]。以抗原抗体对照平均 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 的50%为临界值,被检血清稀释孔 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 的值大于临界值为阳性孔,小于或等于临界值为阴性孔,阳性孔的值所对应的临界值为该份血清的抗体滴度。若临界值处于两个滴度之间,应取中间值。

1.2.2 血清中细胞因子水平测定 分别采集各组动物初次免疫前以及初次免疫后第14、28、42和56天的血清,采用双抗体夹心法测定血清中IL-8和IL-12水平,具体方法参照IL-8和IL-12检测试剂盒使用说明书。

1.2.3 数据处理 对试验数据运用spss17.0进行成对 t 检验分析。

2 结果

2.1 仔猪抗体消长规律 结果见图1。随着仔猪日龄的增加,对照组抗体水平缓慢下降至 $1:2^3$ 以下;与初次免疫前相比,1组、3组和4组初次免疫时抗体滴度 $>1:2^5$,免疫后14 d抗体水平显著上升($P < 0.05$);2组初次免疫时抗体滴度 $<1:2^5$,免疫后7 d抗体水平上升极显著($P < 0.01$)。所有免疫组二次免疫后抗体水平缓慢上升至 $1:2^{10}$ 以上,抗体会长时间维持高水平。

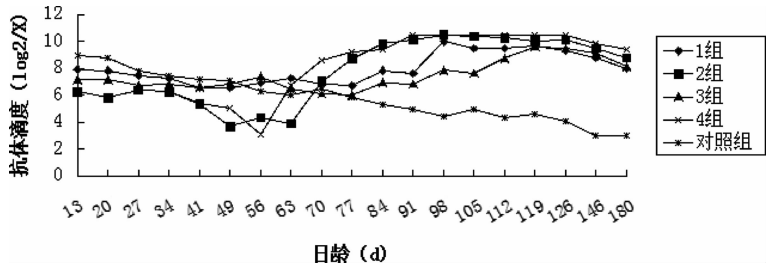
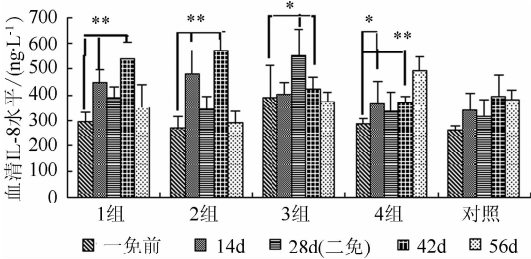


图1 口蹄疫O型灭活苗免疫后抗体消长规律

2.2 免疫后血清中细胞因子结果

2.2.1 免疫后血清中 IL-8 浓度 结果见图2。

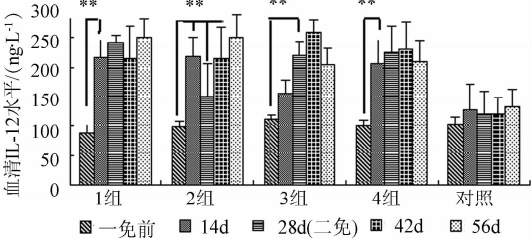


与初免前相比, * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$

图2 口蹄疫O型灭活苗对免疫仔猪血清中 IL-8 水平的影响

对照组 IL-8 水平变化不显著。1 组和 2 组初次免疫 14 d 后 IL-8 水平极显著上升 ($P < 0.01$), 4 组 IL-8 水平显著上升 ($P < 0.05$), 3 组初次免疫 28 d 后 IL-8 水平显著上升 ($P < 0.05$); 1 组、2 组和 4 组二次免疫 14 d 后 IL-8 水平极显著上升 ($P < 0.01$), 3 组 IL-8 水平显著上升 ($P < 0.05$)。综上所述, 各试验组在免疫后 IL-8 水平总体呈上升趋势。

2.2.2 免疫后血清中 IL-12 浓度 结果见图3。



与初免前相比, * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$

图3 口蹄疫O型灭活苗对免疫仔猪血清中 IL-12 水平的影响

对照组 IL-12 水平变化不显著。1 组、2 组和 4 组初次免疫 14 d 后 IL-12 水平上升极显著 ($P < 0.01$), 3 组初次免疫 28 d 后 IL-12 水平上升极显著 ($P < 0.01$); 二次免疫 14 d 后 IL-12 水平除 2 组极显著上升 ($P < 0.01$) 外各试验组变化不显著。

3 讨论与小结

高世杰等^[8]对母源抗体对猪口蹄疫疫苗免疫应答的影响的研究中发现, 母源抗体越高, 对疫苗的免疫效果影响越大。母源抗体的存在既能保护幼龄动物免于病原菌侵袭, 又具有干扰疫苗免疫的副作用。本试验中, 当母源抗体滴度 $> 1:2^5$, 初次免疫后 7 d 抗体滴度呈现下降趋势, 14 d 后抗体滴度显著上升; 当机体母源抗体滴度 $< 1:2^5$ 时, 初次免疫后 7 d 抗体滴度可迅速上升, 因为在初次免疫后, 母源抗体要中和疫苗中的抗原。张玉等^[9]在对猪 O 型口蹄疫免疫抗体检测方法的研究中表明, 血清 FMDV 特异性抗体滴度越高, 保护率就越高。试验结果显示, 初次免疫 21 d 后抗体滴度均大于 $1:2^7$; 在二次免疫 14 ~ 21 d 后抗体滴度均大于 $1:2^9$, 且各组间差异不显著, 并维持很长一段时间。冯杰等^[10]在猪口蹄疫 O 型灭活疫苗免疫效果的研究中显示, 在二次免疫后 10 d 抗体滴度为 $1:2^{6.26}$, 30 d 为 $1:2^{6.8}$, 60 d 为 $1:2^{6.6}$ 。机体中口蹄疫特异性抗体滴度 $\geq 1:2^6$, 99% 保护, 抗体滴度在 $1:2^2 \sim 1:2^{5.5}$, 50% 保护, 抗体滴度 $\leq 1:2^2$, 不保护^[7]。综上所述, 接种疫苗时既要充分考虑母源抗体的干扰, 也要考虑到保护率的高低, 接种疫苗时母源抗体滴度不高于 $1:2^7$, 会影响疫苗的作用, 也不能低

于 $1:2^5$, 此时保护率较低, 畜群存在感染的隐患。

Barnard 等^[11]对接种紧急疫苗得到临床保护的猪只进行研究时发现, 接种疫苗后产生 Th1 型细胞因子; IL-12 可促进 Th1 细胞增殖, 刺激 NK 细胞和 T 细胞产生 IFN- γ ^[12], 蔡虎等^[13]对 O 型口蹄疫灭活苗研究中发现, 接种疫苗后 28 d, 测定血清中 IL-12 含量后攻毒, 被保护的猪只血清中 IL-12 水平上升极显著, 未被保护的猪只 IL-12 水平变化不显著, 说明 IL-12 可能在机体抗口蹄疫病毒感染起到重要作用。本试验对试验动物血清中 IL-8 和 IL-12 含量进行了测定, 结果表明, IL-8 和 IL-12 均较免疫前显著升高。Barnett 等^[14]在对紧急疫苗的研究中发现接种紧急疫苗后可检测到 IL-8 和 IL-12 等细胞因子。各组免疫后血清中细胞因子水平上升速率不尽一致, 这可能是母源抗体对特异性抗原位点的“封闭”而阻止抗原位点与机体免疫细胞上的相关抗原受体结合^[1,8], 具体机制有待于进一步研究。

本研究表明, 母源抗体是影响初次免疫后抗体滴度的因素; 口蹄疫 O 型灭活苗可激发机体快速产生免疫应答, 产生特异性抗体, 免疫效果确实, 有较长的免疫持续期; 能有效提高血清中 IL-8 和 IL-12 的含量。

参考文献:

- [1] Prasanna K, Channabasavaraj M, Chitattor Natarajan, *et al.* Neutralizing antibody responses to foot – and – mouth disease quadrivalent (type O, A, C and Asia 1) vaccines in growing calves with pre – existing maternal antibodies [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169: 233 – 235.
- [2] 张 雷. 负载口蹄疫病毒 VPI 抗原的树突状细胞启动的 T 细胞应答[D]. 河北农业大学, 2011.
- [3] 吕 律. 口蹄疫病毒 O 型 Mya98 谱系猪源和牛源毒株差异性分析[D]. 中国农业科学院, 2014.
- [4] Quattrocchi V, Langellotti C, Pappalardo J S, *et al.* Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease[J]. *Antiviral Research*, 2011, 92(2): 262 – 270.
- [5] Barnett P V, Cox S J, Aggarwal N, *et al.* Further studies on the early protective responses of pigs following immunization with high potency foot and mouth disease vaccine[J]. *Vaccine*, 2002, 20: 3197 – 3208.
- [6] Jacquelyn Horsington, Zhidong Zhang, Hilary Bittner, *et al.* Early protection in sheep against intratypic heterologous challenge with serotype O foot – and – mouth disease virus using high – potency, emergency vaccine[J]. *Vaccine*, 2015, 33: 422 – 429.
- [7] 李玉文, 李惠兰. 兽用生物制品使用指南[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010: 189 – 192.
- [8] 高世杰, 窦永喜, 程爱华, 等. 母源抗体对猪口蹄疫疫苗免疫应答的影响[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(1): 45 – 48.
- [9] 张 玉, 周金梅, 李丽丽, 等. 猪 O 型口蹄疫免疫抗体检测方法的比较[J]. *畜牧与饲料科学*, 2014, 35(4): 117 – 118.
- [10] 冯 杰, 陈昌海, 姚开宝, 等. 猪口蹄疫 O 型灭活疫苗 (O/MYA98 /BY/2010 株) 的免疫效果[J]. *畜牧与兽医*, 2014, 46(7): 108 – 110.
- [11] Barnard A L, Arriens A, Cox S, *et al.* Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot – and – mouth disease[J]. *Vaccine*, 2005, 23: 1037 – 1047.
- [12] Christoph Holscher. The power of combinational immunology: IL-12 and IL-12 related dimeric cytokines in infectious diseases[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2004, 193: 1 – 17.
- [13] 蔡 虎, 冯 霞, 靳 野, 等. O 型 FMD 灭活疫苗免疫后呈现“灰色区”抗体应答的猪血液 IL-12 水平及淋巴细胞亚群的分析[J]. *中国兽医科学*, 2014, 44(11): 1180 – 1184.
- [14] Barnett P V, Carabin H. A review of emergency foot – and – mouth disease (FMD) vaccine[J]. *Vaccine*, 2002, 20: 1505 – 1514.

(编辑: 李文平)