

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.09

# 犬腺病毒(Ⅱ型)阳性血清的研制及应用

赵 炜, 孙 淼, 薛青红, 陈延飞, 韩 爽, 印春生\*

(中国兽医药品监察所, 北京 10081)

[收稿日期] 2018-09-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0054-07 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为研制犬腺病毒相关制品的检验用阳性血清,以健康易感山羊为免疫靶动物,深入优化免疫原和免疫程序,无菌采血后分离血清,并分装冻干。通过常规检验方法进行纯净性检测、特异性检测、抗体效价测定和中和指数测定,并将其应用于代表性的含犬腺病毒组分的活疫苗制品的外源病毒检验和鉴别检验等。结果显示,该批血清的纯净性检验和特异性满足要求,中和抗体效价为 1:9364,中和指数 $>10^{6.0}$ 。结果表明,该血清对犬腺病毒具有良好的中和作用,能够应用于犬腺病毒相关制品的外源病毒检验和特异性检验等,是兽用生物制品国家标准物质的重要候选标准品。

**[关键词]** 犬腺病毒;阳性血清;标准物质。

## Preparation and Application of Goat Anti-Canine Adenovirus Virus Polyclonal Antiserum

ZHAO Wei, SUN Miao, XUE Qing-hong, CHEN Yan-fei, HAN Shuang, YIN Chun-sheng\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YIN Chun-sheng, E-mail: zjs62158844@sohu.com

**Abstract:** For the inspection of relevant biological products of canine adenovirus virus, CAV positive serum were designed and prepared in this assay. Healthy and susceptible goats were immunized with optimized immunogen by improved immunization program, taken sterile blood and separated blood serum. The freeze-dried canine antiserum was tested of purity, specificity, antibody titer and neutralization index by regular test method and applied to extraneous virus and identity test in CAV live vaccines. The results showed that purity and specificity of the antiserum was in compliance with drafted standard, the neutralization antibody titer reached 1:9364, and the neutralization index was higher than  $10^{6.0}$ . The study indicates that the antiserum has a fine neutralizing capacity for various CAV strains and can be competent for extraneous virus test and identity test in the inspection of relevant biological products of CAV. It's a fine candidate of national standard substance for veterinary biological products.

**Key words:** canine adenovirus; positive serum; standard substance

作者简介: 赵 炜, 助理研究员, 从事兽用生物制品检验及检测技术研究工作。

通讯作者: 印春生。E-mail: zjs62158844@sohu.com

犬腺病毒(canine adenovirus, CAV)属于腺病毒科哺乳动物病毒属,犬腺病毒是哺乳动物中致病性最强的病毒之一,分为两型, I 型犬腺病毒引起犬传染性肝炎和狐狸脑炎, II 型犬腺病毒引起犬传染性喉气管炎和肠炎<sup>[1]</sup>。在我国犬腺病毒病感染十分普遍,犬不分品种、年龄和性别均可发生,犬科其它动物感染也十分广泛,如狐狸、狼等。

近几年我国新研制并批准了多个不同毒株生产的犬腺病毒相关兽用弱毒活疫苗,如犬五联活疫苗、狐狸脑炎活疫苗等。上述含犬腺病毒组分的兽用弱毒活疫苗产品的质量检验(外源病毒检验、鉴别检验、效力检验等)均需使用犬腺病毒阳性血清<sup>[2-3]</sup>。但是,目前我国尚无标准化、商品化的犬腺病毒阳性血清供应,评价机构和生产企业均使用非标定、非标准、非商品化的犬腺病毒阳性血清进行质量检验,给疫苗的质量安全带来了极大隐患。开展标准化的犬腺病毒阳性血清研究非常重要。

中国兽医药品监察所以自身鉴定和保存的犬腺病毒 II 型弱毒(BJ 株)的 MDCK 细胞适应毒为材料,对免疫动物、免疫佐剂和免疫程序进行深入优化和创新,成功研制犬腺病毒(II 型)阳性血清,并对其实际应用场景进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒 犬腺病毒 II 型弱毒(2RZ 株)由山东齐鲁动物保健品有限公司提供,犬腺病毒 II 型弱毒(XN3 株)由杨凌绿方生物工程有限公司提供,犬腺病毒 I 型病毒、犬腺病毒 II 型病毒、犬细小病毒、犬瘟热病毒、犬副流感病毒、狂犬病病毒,牛病毒性腹泻/黏膜病病毒,均由中国兽医药品监察所鉴定、保存。

1.1.2 实验动物 未免疫过任何腺病毒相关疫苗的 6 月龄健康易感山羊,购自北京门头沟某养殖场。

1.1.3 血清 狂犬病病毒阳性血清、犬瘟热病毒阳性血清、犬副流感病毒阳性血清、犬细小病毒阳性血清,均由中国兽医药品监察所鉴定、保存。

1.1.4 细胞和培养基 猫肾细胞(CRFK)、犬肾细

胞(MDCK)、Vero 细胞、MDBK 细胞均由中国兽医药品监察所提供, MEM 细胞营养液和胎牛血清购自美国 Hyclone 生物化学制品(北京)有限公司。

1.1.5 疫苗 狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株),由山东齐鲁动物保健品有限公司生产,犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒病、细小病毒病五联活疫苗由杨凌绿方生物工程有限公司生产,狐狸脑炎活疫苗(CAV-2C 株)由吉林特研生物技术有限责任公司生产。

1.1.6 其他 15 mL 30 KD 超滤浓缩管购自 Millipore 公司, PEG6000 购自 Merck 公司, Montanide™ Gel 01 ST 佐剂购自法国 Seppic 公司,兔抗羊 IgG H&L (FITC)二抗购自 abcom 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 试验动物的筛选 经颈静脉采集山羊血清,选择犬细小病毒、犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒 I 型、犬腺病毒 II 型、狂犬病病毒抗体均为阴性且无牛病毒性腹泻/黏膜病病毒污染的 6 月龄健康山羊用于血清制备。

#### 1.2.2 病毒液的制备

1.2.2.1 基础病毒液的制备 取犬腺病毒 II 型弱毒(BJ 株)的细胞适应毒接种已长成单层的 MDCK 细胞, 37 °C 培养 96~120 h, 收获病毒液反复冻融三次后,作为生产毒种。将生产毒种按 2% 比例接种 MDCK 细胞单层, 37 °C 吸附 1 h, 补加维持液, 37 °C 连续培养 120 h, 收获后反复冻融 3 次, 12000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片。将病毒液与 50% 的 PEG6000 等体积混合后, 12000 r/min 超滤离心 1 h 后, 将沉淀用原毒液 1/10 体积的 MEM 细胞营养液复溶。用 MDCK 细胞进行病毒含量测定, 按参考文献<sup>[6]</sup>进行。-20 °C 保存, 备用。

1.2.2.2 基础免疫病毒液的制备 将 Montanide™ Gel 01 ST 水性佐剂按 10% 的比例与基础病毒液混合制成基础免疫病毒液, 现用现配。

1.2.2.3 加强免疫病毒液的制备 将  $\beta$ -丙内脂按 1/8000 的比例加入基础病毒液中, 4 °C 过夜灭活病毒。第二日 37 °C 水浴 2 h 灭活  $\beta$ -丙内脂。将

Montanide™ Gel 01 ST 水性佐剂按 10% 的比例与灭活后的基础病毒液混合制成基础免疫病毒液, 4 ℃ 保存, 备用。

1.2.3 免疫和采血 将基础免疫病毒液分别经颈部肌肉注射接种 2 只山羊, 2 mL/只, 进行基础免疫。21 d 后将加强免疫病毒液颈部肌肉注射接种 2 只山羊, 2 mL/只, 进行加强免疫。14 d 后再按照与前次加强免疫相同剂量和接种途径加强免疫一次。14 d 后颈动脉采血致死, 分离血清, 10000 r/min 离心 30 min, 并用 0.45 μm 滤器过滤除菌, 冻干后待检。

#### 1.2.4 血清检定

##### 1.2.4.1 无菌检验、支原体检验、外源病毒检验

按参考文献<sup>[5]</sup>进行。

1.2.4.2 特异性检验 采用微量细胞中和试验法测定抗狂犬病病毒、犬瘟热病毒、犬细小病毒、犬副流感病毒的中和抗体, 按参考文献<sup>[5]</sup>进行。

1.2.4.3 效价测定 采用微量细胞中和试验法测定血清中和抗体效价, 血清制备实验室为主检室, 并组织中国农业科学院特产研究所、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、山东齐鲁动物保健品有限公司三家具有标准物质效价标定经验的实验室参与协作标定, 按参考文献<sup>[5]</sup>进行。将四家实验室测定中和抗体效价计算算术平均值作为该特异性阳性血清的中和抗体效价。

1.2.5 血清在含犬腺病毒组分的生物制品及生产用疫苗株检验中的应用试验 使用制备的阳性血清对 2 个不同批次的狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株)、3 个不同批次的犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒病、细小病毒病五联活疫苗和 3 个不同批次的狐狸脑炎活疫苗(CAV-2C 株)共 8 批含犬腺病毒组分的生物制品按照各自的质量标准<sup>[2-4,6]</sup>进行外源病毒检验和与 CAV 血清有关的鉴别检验。使用制备的阳性血清对 3 株犬腺病毒 II 型疫苗株(CAV-II(XN3 株)、CAV-II(BJ 株)和 CAV-II(2RZ 株))分别进行外源病毒检验<sup>[6]</sup>。

1.2.6 血清对不同的犬腺病毒毒株的中和指数测定 对 3 株犬腺病毒 II 型疫苗株(CAV-II(XN3

株)CAV-II(2RZ 株)和 CAV-II(BJ 株)), 各分 2 组进行 10 倍系列稀释, 将其中一组用制备的阳性血清进行中和, 另一组加入等量生理盐水作为对照。接种已长成单层 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板, 每组每个稀释度接种 8 孔, 每孔 100 μL。根据 MDCK 细胞的细胞病变孔数按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>, 并计算中和指数。比较制备的阳性血清对不同犬腺病毒毒株的中和能力。

#### 1.2.7 血清在间接细胞免疫荧光试验中的应用

将 3 株犬腺病毒 II 型疫苗株(CAV-II(XN3 株)、CAV-II(2RZ 株)和 CAV-II(BJ 株))均稀释至 100 TCID<sub>50</sub>, 分别接种已长成单层 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板, 培养 96~120 h 后丙酮固定。将制备的阳性血清进行 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 稀释, 每个稀释度的血清分别加入不同腺病毒疫苗株培养的细胞板作为一抗, 并在孵育兔抗羊 IgG H&L(FITC)二抗后进行荧光观察。

## 2 结果

2.1 免疫程序的探索及抗血清的制备 对生产毒种进行 120 h 连续培养后, 收获病毒液 200 mL。通过离心法去除犬腺病毒 II 型弱毒(BJ 株)的 MDCK 细胞适应毒株基础病毒液中的细胞碎片, 再经超滤浓缩、聚乙二醇沉淀后, 收获 18 mL 基础病毒液, CAV-II 病毒含量达到 10<sup>9.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。制备 10 mL 的基础免疫病毒液和 10 mL 的加强免疫病毒液。选择 2 只健康易感山羊, 进行 1 次基础免疫和 2 次加强免疫后, 犬腺病毒抗血清中和抗体效价达到预期(血清中和抗体效价期望值为 ≥ 1:1024<sup>[2-3]</sup>)。采集血液制备抗血清 3000 mL, 并冻干保存。

2.2 血清特异性检定结果 应用微量细胞中和试验法对制备血清的特异性进行检测, 未检出犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬细小病毒和狂犬病病毒的抗体(表 1), 表明该血清具有良好的特异性。

2.3 血清抗体效价测定结果 血清中和抗体效价测定结果见表 2。根据四家实验室测定结果, 确定血清中和抗体效价平均值为 1:9581。

表 1 血清特异性检验结果

Tab 1 Results of specificity test

待检抗体	检验方法	检验结果
犬瘟热病毒抗体	SN	阴性
犬副流感病毒抗体	SN	阴性
犬细小病毒抗体	SN	阴性
狂犬病病毒抗体	SN	阴性
牛病毒性腹泻/黏膜病病毒抗体	SN	阴性

SN: 血清中和试验

SN: Serum neutralization test

表 2 血清中和抗体效价测定结果

Tab 2 Results of neutralization titer assessment

实验室名称	中和抗体效价
血清制备实验室	1 : 8192
中国农业科学院特产研究所	1 : 8933
齐鲁动物保健品有限公司	1 : 10968
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所	1 : 10232

2.4 血清在检验中的应用结果 分别按照狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株)、犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒病、细小病毒病五联活疫苗和狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株)的质量标准对三种生物制品进行外源病毒检验和鉴别检验中与 CAV 血清有关的部分。按照《中国兽药典》的规定对 CAV- II (XN3 株)、CAV- II (BJ 株)和 CAV- II (2RZ 株)三株疫苗株进行外源病毒检验。结果表明,应用制备的犬腺病毒阳性血清可以很好的应用于三种活疫苗产品和三种生产用疫苗株的质量检验工作。结果见表 3。

2.5 对不同的犬腺病毒毒株的中和指数测定结果 制备的犬腺病毒阳性血清对三株 CAV- II 疫苗株的中和指数分别为  $10^{6.0}$ 、 $10^{6.7}$ 、 $10^{6.0}$ ,表明阳性血清对三株 CAV- II 疫苗株中和能力显著且无明显差异。结果见表 4。

表 3 血清在检验中的应用试验结果

Tab 3 Results of application of antiserum in CAV products inspection

检品名称	检品批号	检验结果	
		鉴别检验	外源病毒检验
狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株)	1705001	Y	Y
	1610001	Y	Y
犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒病、细小病毒病五联活疫苗	20170604	Y	Y
	20170603	Y	Y
	20170402	Y	Y
狐狸脑炎活疫苗(CAV-2C 株)	20180303	Y	Y
	20180302	Y	Y
	20180301	Y	Y
CAV- II (XN3 株)	/	/	Y
CAV- II (2RZ 株)	/	/	Y
CAV- II (BJ 株)	/	/	Y

Y: 按照产品质量标准进行检验,结果符合规定;"/":代表无此项目或未进行此项检验

Y: Test result is in compliance with respective quality standards; /: No this item

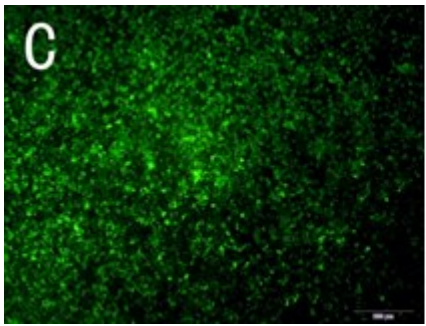
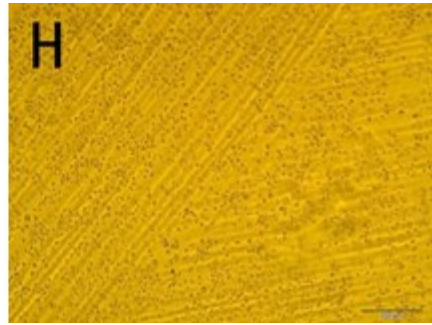
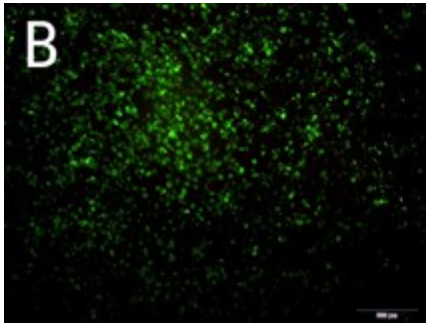
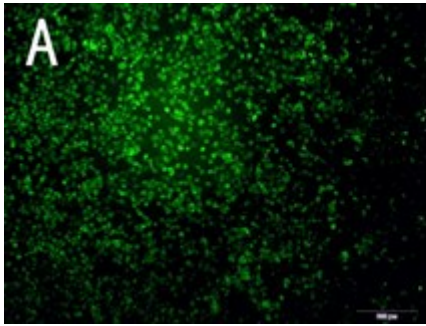
表 4 CAV 毒株的病毒含量测定结果及中和指数计算

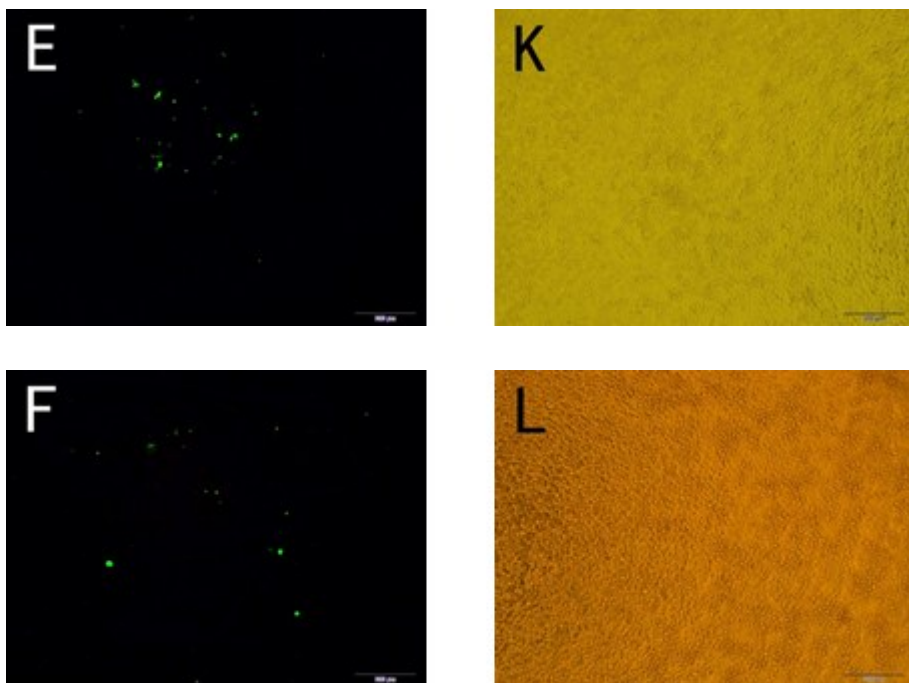
Tab 4 Results of Virus content and neutralization index assessment of various CAV strains

毒株名称	病毒含量/(TCID <sub>50</sub> · 0.1mL <sup>-1</sup> )		中和指数
	中和组	未中和对照组	
CAV- II (XN3 株)	$10^{1.2}$	$10^{7.2}$	$10^{6.0}$
CAV- II (2RZ 株)	$10^{1.1}$	$10^{7.8}$	$10^{6.7}$
CAV- II (BJ 株)	$10^{0.9}$	$10^{6.9}$	$10^{6.0}$

2.6 血清在间接细胞免疫荧光试验中的应用结果  
通过将制备的阳性血清进行不同稀释度的稀释进行间接细胞免疫荧光染色,确定对于不同的犬腺

病毒毒种,制备的阳性血清均在 1 : 800 稀释时可以达到最好的荧光染色效果。结果见图 1。





A,G:CAV-II (XN3 株)组,血清 1 : 800 稀释;B,H:CAV-II (2RZ 株)组,血清 1:800 稀释;C,I:CAV-II (BJ 株)组,血清 1 : 800 稀释;D,J:CAV-II (XN3 株)组,血清 1 : 1600 稀释;E,K:CAV-II (2RZ 株)组,血清 1 : 1600 稀释;F,L:CAV-II (BJ 株)组,血清 1 : 1600 稀释

A、B、C、D、E、F 表示荧光染色;G、H、I、J、K、L 表示细胞固定前普通光学镜观察

A,G:CAV-II (Strain XN3) group,1 : 800 serum dilution;B,H:CAV-II (Strain 2RZ) group,1 : 800 serum dilution; C,I:CAV-II (Strain BJ) group,1 : 800 serum dilution;D,J:CAV-II (Strain XN3) group,1 : 1600 serum dilution; E,K:CAV-II (Strain 2RZ) group,1 : 1600 serum dilution;F,L:CAV-II (Strain BJ) group,1 : 1600 serum dilution

A、B、C、D、E、F represent fluorescent staining;G、H、I、J、K、L represent observation before cell fixation

图 1 MDCK 细胞接种不同犬腺病毒毒种后细胞病变观察及间接免疫荧光观察

Fig 1 CPE and indirect immunofluorescence observation of MDCK cells infected by different CAV-II strain

### 3 讨论与小结

阳性血清是菌毒种及活疫苗检验中最重要的标准物质之一,无论外源病毒检验、特异性检验、鉴别检验、效力检验,特异性均是对阳性血清的首要要求。为了满足特异性要求,制备血清时选择了与犬种属关系较远的山羊作为免疫靶动物,降低了犬源病毒污染的概率,并且在筛选时严格选择无犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬细小病毒、狂犬病病毒等主要犬源病毒血清中和抗体的山羊,在血清制备完成后再次对上述病毒血清中和抗体进行了检定,充分保证了血清优良的特异性。

免疫原处理和免疫程序是获得较高抗体效价的关键。制备血清所使用的犬腺病毒 II 型弱毒(BJ 株)通过 MDCK 细胞连续传代获得了对 MDCK 细胞良好的适应性,并在收获基础病毒液后进行 PEG

沉淀和超滤浓缩,以此确保免疫原的抗原性、稳定性和浓度。使用动物专用的 Montanide™ Gel 01 ST 水性疫苗佐剂,可以极大提高免疫效果<sup>[7]</sup>。在动物免疫阶段,动态监测犬腺病毒 II 型血清中和抗体效价水平,确保血清制备结果可控。三所具有标准物质标定经验的实验室对制备血清协作标定中和抗体效价,证实了远高于期望值的血清效价。

狐狸脑炎活疫苗(CAV-2RZ 株)、狐狸脑炎活疫苗(CAV-2C 株)和犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒病(XN3 株)、细小病毒病五联活疫苗三种不同的含 CAV-II 型弱毒株组分的活疫苗产品,生产毒株不同且免疫动物种类不同,目前在市场上均已得到普遍应用。鉴于目前绝大多数犬腺病毒活疫苗产品均为 CAV-II 型弱毒活疫苗<sup>[8-9]</sup>,故上述三种活疫苗产品可以很好的代表目前市场上的犬腺病

毒类生物制品。生产用毒株的检验是生产合格的疫苗产品的关键环节,也是生物制品规程的重要规定。因此应用制备的犬腺病毒阳性血清对于上述几种代表性疫苗株和活疫苗产品进行检验并取得理想检验效果,可以很好的验证阳性血清的实际应用性能。中和指数测定也证实,制备的阳性血清不管对制备血清所使用的 CAV-Ⅱ(BJ 株)还是生产活疫苗所使用的 CAV-Ⅱ(XN3 株)和 CAV-Ⅱ(2RZ 株)均具有高效且相似的中和能力。间接细胞免疫荧光试验除了可以佐证血清高效且特异的中和能力外,还可发现在无 CPE 的情况下,仍然可以观察到明显的荧光信号,说明了用制备的阳性血清作为一抗进行 CAV 病毒含量测定或血清的 CAV 中和抗体效价测定等试验,可显著提高试验的灵敏度和精度。

兽用生物制品国家标准物质是国家负责标定和供应的用于兽用生物制品质量检验的标准物质,是提高兽用生物制品检验水平的重要环节。犬腺病毒阳性血清的制备和标定严格按照兽用生物制品国家标准物质相关规定<sup>[5]</sup>进行,并对血清效价这一主要特性值进行了协作标定,为犬腺病毒阳性血清国家标准物质的建立提供了重要基础。

研究表明,紧急预防犬腺病毒感染时可紧急接种高效价免疫血清<sup>[8]</sup>。国内也有应用高免血清进行治疗的报道<sup>[10]</sup>。制备的 CAV 血清中和抗体效价较高,中和能力优秀,能起到预防和治疗的作用,将为犬腺病毒疫区的紧急预防和治疗提供更好的思路。

## 参考文献:

- [1] 钟志宏,夏咸柱,赵奕,等. 狐狸脑炎病毒的分离鉴定和流行病学调查[J]. 兽医大学学报, 1990(02):111-117.  
Zhong Z H, Xia X Z, Zhao Y, *et al.* Isolation and identification of Fox Encephalitis Virus (FEV) and epidemiological survey of the disease[J]. Bulletin of Veterinary College of PLA, 1990, (2):111-117.
- [2] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 2106 号[S].

- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China No.2106 [S].
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 1049 号[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China No.1049 [S].
- [4] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 2372 号[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China No.2372[S].
- [5] 姚火春. 兽医微生物学实验指导[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社,2002.  
Yao H C. Guidance of Veterinary Microbiological Experiment [M]. Second Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2002.
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S].  
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015 Edition, Part 3) [S].
- [7] 刘扶拯,王梦君,李雨轩,等. Montanide™ Gel 01 ST 水性佐剂对猪乙型脑炎活疫苗免疫小鼠后的早期免疫保护效果的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(1): 40-44.  
Liu F Y, Wang M J, Li Y X, *et al.* The Effect of aqueous adjuvant Montanide™ Gel 01 ST on early immune protection of swine Japanese encephalitis live-vaccine in mice[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(1):40-44.
- [8] 殷震. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.  
Yin Z. Animal Virology [M]. Second Edition. Beijing: Science Press, 1997.
- [9] 夏咸柱,武银莲,钟志宏,等. 犬传染性肝炎病原、诊断与实验免疫研究[J]. 中国畜禽传染病, 1990(6):38-40, 48.  
Xia X Z, Wu Y L, Zhong Z H, *et al.* Study of pathogen, diagnosis and immunity of infectious canine hepatitis [J]. China Animal Infectious Disease, 1990(6): 38-40, 48.
- [10] 海曼. 一例犬传染性肝炎的诊断和治疗[J]. 吉林畜牧兽医, 2015, 36(11): 73-74.  
Hai M. Diagnosis and treatment of an infectious canine hepatitis case[J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Science, 2015, 36(11): 73-74.