

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.02

兔病毒性出血症灭活疫苗效力检验替代方法研究

高金源, 刘丹*, 陈建, 秦义娴, 郎洪武

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-10-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0009-04 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为了采用血凝抑制(HI)试验方法替代兔病毒性出血症灭活疫苗效力检验的免疫攻毒方法, 试验在制备了 HI 试验用兔出血症病毒血凝(HA)抗原、阳性血清、阴性血清的基础上, 研究了免疫攻毒保护与免疫血清 HI 效价之间的平行关系, 并进行了替代方法的应用。结果表明, 当免疫血清 HI 效价不低于 1:32 时, 两种方法的检验结果符合率为 100%, 证明了该替代方法的可行性, 也为下一步修订兔病毒性出血症灭活疫苗效力检验方法提供了数据支持。

[关键词] 兔病毒性出血症; 灭活疫苗; 效力检验

Research on Alternative Method of Potency Test of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) Inactivated Vaccine

GAO Jin-yuan, LIU Dan*, CHEN Jian, QIN Yi-xian, LANG Hong-wu

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

Corresponding author: LIU Dan, E-mail: liudan@ivdc.org.cn

Abstract: In order to replace existing potency test of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) inactivated vaccine with hemagglutination inhibition (HI) test, on the basis of HI antigen, positive serum and negative serum preparation, a parallel relation test between HI titre and clinical protection of immunization rabbits challenged with RHDV was carried out; While HI test was also applied to potency test of the vaccine. The results show that HI titre of inoculated rabbits should be no less than 1:32, and the coincidence rate of the two methods is 100%, indicating the HI test is feasible. The results also provide data for revising China Veterinary Pharmacopoeia.

Key words: rabbit haemorrhagic disease virus; inactivated vaccine; potency test

兔病毒性出血症 (Rabbit Haemorrhagic Disease, RHD) 是由兔出血症病毒 (RHDV) 引起的一种家兔高发病率、高死亡率的传染性疫病, 临床多表现为发热、精神不振、突然死亡, 疫苗接种仍是预防 RHD 的最有效方法^[1-2]。

在《中国兽药典》2015 年版三部中^[3], RHD 灭活疫苗效力检验采用经典的家兔免疫攻毒方法来评价家兔攻毒后的保护效果。由于该方法需要配备负压动物舍, 攻毒后也需要较长观察时间, 存在试验成本高、周期较长、操作繁琐等缺点。本试验

基金项目: 中国兽医药品监察所级课题 (201505)

作者简介: 高金源, 副研究员, 从事猪用疫苗等检验及相关研究工作。

通讯作者: 刘丹。E-mail: liudan813@163.com

在制备了 HI 试验用 RHDV 血凝(HA)抗原、阳性血清、阴性血清的基础上,确认了免疫攻毒保护与免疫血清 HI 抗体效价之间的平行关系,并采用免疫血清 HI 效价测定方法进行了 RHD 灭活疫苗的效力检验应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 家兔 RHD 血清抗体阴性(HI 价 $<1:8$)的 3 月龄以上健康新西兰兔,由济阳市阳光兔业科技有限公司、济南西岭角养殖繁育中心、四川省实验动物专委会养殖场购入。

1.1.2 RHDV AV34 株肝脏组织毒,由齐鲁动物保健品有限公司(毒价为 $10^{5.0}$ LD₅₀/mL)、华派生物工程集团有限公司(毒价为 $10^{5.1}$ LD₅₀/mL)、山东绿都生物科技有限公司(毒价为 $10^{6.1}$ LD₅₀/mL)及中国兽医药品监察所病毒室(毒价为 $10^{5.5}$ LD₅₀/mL)提供。

1.1.3 1%新鲜人“O”型红细胞 由齐鲁动物保健品有限公司、华派生物工程集团有限公司提供。

1.1.4 RHD 灭活疫苗 规格为 20 mL(头份)/瓶,由齐鲁动物保健品有限公司(9 批,批号分别为 1702007、1702008、1704019、1704020、1706023、1706024、1707029、1708037、1708038)、华派生物工程集团有限公司(8 批,批号分别为 2017001~2017008)、山东绿都生物科技有限公司(2 批,批号分别为 1803003、1804004)提供。

1.1.5 RHDV HA 抗原 (HA 价为 $1:128$)、RHD 阳性血清(HI 价为 $1:128$)、RHD 阴性血清(HI 价 $<1:8$)、PBS(0.01 mol/L, pH7.2)、硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基,均由中国兽医药品监察所病毒室提供。

1.2 方 法

1.2.1 RHDV HA 抗原制备 用 RHDV 南京株接种 3 月龄以上的健康易感家兔,无菌采集接种后 24~96 h 濒死或刚死兔的有典型病理变化的肝脏;将肝脏组织用适量的 PBS 进行捣碎,6000 g 离心 15 min,取上清液,制备成 8 倍稀释的病毒悬液;加入 β -丙内酯溶液,使其含量为 $1/4000$,混合均匀,放入 4 ℃ 冰箱作用 24 h,再放入 37 ℃ 水浴水解 2 h,

放入 4 ℃ 冰箱保存。同时进行无菌检验^[2]和 HA 效价测定^[1]。无菌检验结果应无菌生长,灭活病毒 HA 价应不低于 $1:64$ 。

1.2.2 RHD 阳性血清制备 采用常规微量 HI 试验法^[1],选取 RHD 抗体阴性(HI 价 $<1:8$)的 3 月龄以上的健康家兔,先用商品化的 RHD 灭活疫苗进行基础免疫,再用 RHDV 强毒加强免疫 2 次,中间间隔 14 d,最后一次免疫后 21 d,无菌采集血液,提取血清,混合后进行无菌检验和 HI 效价测定。无菌检验结果应无菌生长,HI 价应不低于 $1:128$ 。

1.2.3 RHD 阴性血清制备 采用常规微量 HI 试验法,选取 RHD 抗体阴性(HI 价 $<1:8$)的 3 月龄以上的健康家兔,无菌采集血液,提取血清,混合后进行无菌检验和 HI 效价测定。无菌检验结果应无菌生长,HI 价应小于 $1:8$ 。

1.2.4 疫苗免疫攻毒与血清 HI 效价的平行关系 采用常规微量 HI 试验法,选取 RHD 抗体阴性(HI 价 $<1:8$)的 3 月龄以上的健康家兔 35 只。将 RHD 灭活疫苗摇匀后进行家兔免疫,取 $1/2$ 头份、 $1/4$ 头份、 $1/8$ 头份疫苗各皮下注射家兔 10 只,饲养观察 14 d。同时设立非免疫攻毒对照家兔 5 只。家兔免疫 14 d 后,对所有试验家兔进行采血,每只家兔采血 4.0 mL,提取血清,56 ℃ 灭活 30 min,用于血清 HI 价测定。家兔采血后,对所有家兔进行攻毒,每只家兔皮下注射 RHDV 1 mL(含 1000 LD₅₀/mL)。每日观察家兔健康情况,饲养观察 7 d,记录家兔发病死亡情况;同时,无菌采集免疫攻毒家兔肝脏组织,研磨并稀释 4 倍后,3000 g 离心 15 min 后,取上清液测定血凝情况,以监测 RHDV 兔体内复制增殖情况。攻毒对照家兔应至少死亡 4 只,试验成立。统计不同 HI 效价的攻毒保护情况,当免疫攻毒保护家兔 4 倍肝脏组织液无血凝性时,以免疫攻毒 100% 保护家兔的血清最低 HI 效价作为免疫攻毒保护判定的最低标准。

1.2.5 疫苗效力检验替代方法的应用 与 3 家企业 19 批 RHD 灭活疫苗现行免疫攻毒法同步进行,攻毒前无菌采集免疫家兔血液,提取血清,进行 HI 效价测定,根据 1.2.4 中确定的免疫攻毒保护判定

标准,比较两种方法的效力检验结果,评价 HI 效价测定方法替代现行免疫攻毒法的可行性。

2 结果与分析

2.1 RHDV HA 抗原、阳性血清、阴性血清鉴定结果见表 1。HI 法的各组分鉴定结果均符合其质量标准要求,可以满足 HI 效价测定的需要。

2.2 疫苗免疫血清不同 HI 效价水平的免疫攻毒保护情况统计结果 见表 2。

表 1 HI 法组分鉴定结果

Tab 1 Identification results of HI component

分组	无菌检验	HA 价	HI 价
HA 抗原	-	1 : 128	/
阳性血清	-	/	1 : 128
阴性血清	-	/	1 : 2

“-”:检测结果为阴性;“/”:不涉及
“-”: negative; “/”:unconcerned

表 2 不同 HI 效价水平的攻毒保护结果

Tab 2 Protection rate of rabbits with different HI titre levels

分组	不同 HI 效价水平的攻毒保护比例								
HI 效价	<1 : 2	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
保护比例	0/5-	0	0	0/1-	5/8- (5/5HA-)	9/9- (9/9HA-)	6/6- (6/6HA-)	5/5- (5/5HA-)	1/1- (1/1HA-)

“-”代表保护;“HA-”代表无血凝
“-”protection; “HA-”no hemagglutination

攻毒对照家兔均发病死亡;免疫攻毒获得保护家兔的 4 倍肝脏组织液均无血凝性,显示无明显病毒增殖情况;RHD 灭活疫苗免疫家兔血清 HI 效价低于 1 : 16 时(6 份),对应的攻毒家兔均发病死亡;免疫家兔血清 HI 效价为 1 : 16 时(8 份),对应攻毒家兔 5 只获得保护,而另 3 只均发病死亡;

免疫家兔血清 HI 效价不低于 1 : 32 时(21 份),对应的攻毒家兔均获得保护。

2.3 疫苗效力检验替代方法的应用 疫苗效力检验现行方法(免疫攻毒法)与替代方法(HI 效价测定方法)的应用结果比较见表 3。

表 3 2 种效力检验方法应用结果比较

Tab 3 Comparison of the two methods applied in potency test

生产企业	疫苗批数	接种兔只数	效力检验结果		符合率/%
			保护情况	HI 效价	
齐鲁动保	9	45	45/45 保护	45/45 ≥ 1 : 32	100
华派生物	8	40	40/40 保护	40/40 ≥ 1 : 32	100
山东绿都	2	10	10/10 保护	10/10 ≥ 1 : 32	100
小计	19	95	95/95 保护	95/95 ≥ 1 : 32	100

所有对照组家兔血清 HI 效价不高于 1 : 8,且在攻毒后均死亡;在 19 批 RHD 灭活疫苗效力检验的免疫攻毒方法与血清 HI 效价测定方法的比较应用试验中,替代方法(HI 效价测定方法)与现行方法(免疫攻毒法)检验结果符合率为 100%。

3 结论

RHD 于 1984 年由我国首次报道^[4],随后确认

该疫病由杯状病毒科杯状病毒属的 RHDV 引起。由于 RHDV 只能在兔体内增殖,不能在任何组织细胞上有效增殖^[4],因此,尚未建立在细胞上进行抗体定量检测方法。虽然发现存在无血凝性的毒株^[5],但可以利用具有血凝性的 RHDV 毒株,通过血清 HI 效价的测定对家兔血清抗体进行定量^[1,6-7]。同时,RHD 灭活疫苗免疫血清 HI 效价与 RHDV 的

攻毒保护密切相关,但免疫攻毒临床保护的 HI 效价临界值缺少明确一致的数据^[8-10]。目前,RHD 灭活疫苗效力检验的国内外标准方法均为免疫攻毒法^[3,11],虽然攻毒剂量要求不同,但均是通过观察免疫家兔攻毒后是否获得临床保护来判定免疫效果。为了采用免疫血清 HI 效价测定方法替代现有的标准方法,按照《中国兽药典》2015 年版三部的攻毒剂量标准,明确了攻毒临床保护的免疫血清 HI 效价标准应不低于 1:32。同时,与 19 批 RHD 灭活疫苗效力检验免疫攻毒的标准方法进行对比的应用表明,标准方法中免疫攻毒临床保护的家兔,其免疫血清 HI 效价均未低于 1:32。可见,只要免疫血清 HI 效价不低于 1:32,就能够确保免疫家兔攻毒后可获得临床保护,用免疫血清 HI 效价均不低于 1:32 作为 RHD 灭活疫苗效力检验中判定攻毒临床保护的标准确实可行。

在《中国兽药典》2015 年版三部中,RHD 灭活疫苗的安全检验和效力检验均采用 HI 效价测定方法筛选检验用敏感家兔,生产企业熟悉该检测方法。同时,通过免疫家兔血清 HI 效价来评价疫苗免疫效果,疫苗生产企业可以避免使用负压动物舍,缩短检验时间,也可节约检验成本。该研究也可为下一版《中国兽药典》的修订提供数据。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版,北京:科学出版社. 1997,519-530.
Yin Z, Liu J H. Animal Virology [M]. 2th edition, Beijing: Science Press, 1997: 519-530.
- [2] Abrantes J, Van Der Loow, Le Pendu J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review [J]. Vet Res, 2012, 43(1): 12.
- [3] 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. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China volume III 2015 edition [S].
- [4] 刘胜江,薛华平,蒲伯清,等. 兔的一种新病毒病[J]. 畜牧与兽医. 1984, 16(6): 253-255.
Liu S J, Xue H P, Pu B Q, et al. A New Viral Disease in Rabbits [J]. Anim Hus Vet Med, 1984, 16(6): 253-255.
- [5] Capucci L, Chasey D, Lavazza A, et al. Preliminary characterization of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom [J]. Zentralbl Vetnarmed B, 1996, 43(4): 245-250.
- [6] Tang Gui yun. International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease [C]. 1991, 238-247.
- [7] J L Arguello Villares. Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response [J]. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 1991, 10(2): 471-480.
- [8] 刘兴发. 兔病毒性出血症及其研究概况[J]. 中国兽医杂志, 1989, 15(12): 47-48.
Liu X F. Research reviews of rabbit haemorrhagic disease [J]. Chinese Journal of Vet Med, 1989, 15(12): 47-48.
- [9] 权英存,刘虎守. 兔病毒性出血症 4 种灭活疫苗的研制及效果比较[J]. 安徽农业学报, 2014, 42(12): 3573-3575.
Quan Y C, Liu H S. Development and efficacy comparison of four kinds of inactivated vaccines against rabbit hemorrhagic disease [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2014, 42(12): 3573-3575.
- [10] 宁康健,王慧,杨靖松. 兔瘟蜂胶组织灭活疫苗的研制及免疫效果观察[J]. 安徽技术师范学院学报, 2003, 17(2): 112-114.
Ning K J, Wang H, Yang J S. Effect of immunity and development of RHDV propolis inactivated tissue vaccine [J]. Journal of Anhui Technical Teachers College, 2003, 17(2): 112-114.
- [11] 世界动物卫生组织. 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)[S]. 第五版. 农业部兽医局/中国动物卫生与流行病学中心, 译.
Handbook of terrestrial animal diagnostic tests and vaccines (mammals, birds and bees) [S]. 5th edition. Translated by the Veterinary Bureau of the Ministry of Agriculture/China Centre for Animal Health and Epidemiology.

(编辑:李文平)