

猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)的最小免疫剂量测定及活菌滴度与免疫保护率平行关系试验

沈青春, 吴思杰, 范学政, 张广川, 高和义, 宁宜宝*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2014-09-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0001-04 [中图分类号] S852.62

[摘要] 为确定猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)的最小免疫剂量, 使用两批该疫苗(活菌滴度均为 10^8 CCU/mL)分别用原倍、10倍、100倍和1000倍稀释, 以胸腔注射和鼻腔接种两种方式各免疫4头仔猪, 45 d后攻毒, 70 d后剖杀观察结果。结果表明其中一批疫苗4个稀释度胸腔注射组的攻毒保护率分别为78%、77.6%、68.8%和55.2%, 鼻腔接种组分别为70.6%、68.1%、58.4%和18.4%;另一批的胸腔注射组攻毒保护率分别为80.6%、78.8%、67.6%和52.4%, 鼻腔接种组分别为71.6%、68.4%、53.5%和28.4%。按照判定标准, 可将该疫苗的胸腔注射接种最小免疫剂量确定为 10^6 CCU/头, 鼻腔接种最小免疫剂量确定 10^7 CCU/头, 同时结果也证明免疫保护率与活菌滴度间在测定范围内具有很好的平行关系。

[关键词] 猪肺炎支原体; 活疫苗; 最小免疫剂量; 活菌滴度; 免疫保护率; 平行关系

The Minimum Immune Dose Measure of *Mycoplasma hyopneumoniae* Live Vaccine (RM48 Strain) and the Parallel Assay of Vaccine CCU Titer and Potency

SHEN Qing-chun, WU Si-jie, FAN Xue-zheng, ZHANG Guang-chuan, GAO He-yi, NING Yi-bao*

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

Abstract: In order to determine the minimum immune dose of the *Mycoplasma hyopneumoniae* live vaccine (RM48 strain), 2 batches of the vaccine (titer = 10^8 CCU/mL) were used to inoculated piglets with two methods, include the pleural cavity injection and intranasal inoculation, after diluted to 10^8 , 10^7 , 10^6 and 10^5 CCU/mL. 45 days later, the piglets were charged with *Mycoplasma hyopneumoniae* virulent strain, and autopsied for lung damage evaluation at the 70th day after the immunization. The results showed the immune efficacy of the four dilutions of one batch were 78%, 77.6%, 68.8% and 55.2% with pleural cavity injection, 70.6%, 68.1%, 58.4% and 18.4% with intranasal inoculation; for the other batch of vaccine, the the immune efficacy were 80.6%, 78.8%, 67.6% and 52.4% with pleural cavity injection, 71.6%, 68.4%, 53.5% and 28.4% with intranasal inoculation, which indicated that minimum immune dose of the vaccine was 10^6 CCU/piglet by pleural inoculation and 10^7 CCU/piglet by intranasal inoculation, and the live bacteria titer was parallel with the vaccine efficacy well in the measurement range.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; live vaccine; minimum immune dose; viable bacteria title; immune protection rate; parallel

作者简介: 沈青春, 副研究员, 博士, 从事兽用生物制品的科研和管理工作。

通讯作者: 宁宜宝。E-mail: ningyibao@ivdc.gov.cn

猪支原体肺炎(*Mycoplasmal pneumonia of swine*, MPS)是猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)引起的一种猪的慢性呼吸系统疾病,是造成我国养猪业经济损失最重要的疾病之一^[1]。在欧美发达国家,该病的危害性也被广泛让同和重视,其疫苗产销量近几年来一直高居动物疫苗榜首。该病发病率高、发病慢、病程长,以冬春寒冷季节较为多发。发病猪主要表现为咳嗽、气喘等,俗称猪喘气病。如果没有继发感染,一般不引起猪死亡,但饲料转化率低,生产明显受阻,药物疗效不显著,停药后易复发^[2-3]。

猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)是最新研制用于预防猪支原体肺炎的活疫苗,具有良好的免疫效力,并可采用鼻腔接种的免疫方式,打破了当前活疫苗仅可通过胸腔注射的免疫途径。对于活疫苗来说,疫苗的活菌滴度与免疫保护率一般在一定范围内呈正相关,即免疫的活菌数越多,保护率就越高,反之就越低,因而当二者正相关性明显时,即将疫苗的活菌滴数作为疫苗效力检验的指标^[4]。本试验通过不同滴度的Mhp活菌免疫健康仔猪,测定攻毒保护率以确定疫苗的最小免疫剂量,为下一步疫苗制定标准提供依据,同时试验数据也可用于验证疫苗的活菌滴度与免疫保护力的相关性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 疫苗 猪支原体肺炎培养基活疫苗2批(批号:20040913、20041101,均为2 mL/瓶,活菌数 10^8 CCU/mL)。

1.1.2 攻毒用强毒株 猪肺炎支原体济南株F65代猪肺组织毒,由中国兽医药品监察所菌种保藏中心提供。

1.1.3 实验动物 72头健康仔猪(35~45日龄左右),购自河北省保定市满城县某猪场,由猪喘气病抗原抗体阴性母猪所产仔猪。品种为杜长大三元猪。

1.1.4 Lps-5液体培养基 由PPLO、葡萄糖、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、MEM、酵母浸出液等按一定比例混合除菌后,加入20%猪肺炎支原体抗体阴性猪血清,调pH值至7.4~7.6,置2~8℃备用。

1.1.5 检测试剂 HI间接血凝试剂盒,由本实验室自制。猪肺炎支原体抗体ELISA检测试剂盒, IDEXX公司生产,批号为06733-WD782。

1.2 试验方法

1.2.1 试验猪的血清检验与试验分组 试验前对所有试验用健康仔猪采血,将分别使用HI间接血

凝试剂盒和IDEXX猪肺炎支原体抗体ELISA检测试剂盒对72头仔猪血清进行检测,两种试剂盒检测结果均为阴性的仔猪即可用于本试验。

将每批疫苗使用32头健康仔猪,分成4个组,每个滴度的疫苗作为一个组,每组疫苗免疫8头猪,再将8头猪分成两小组,4头用作胸腔注射免疫,另4头用作鼻腔接种。两批疫苗共计使用64头健康仔猪。另留8头猪作为对照组。

1.2.2 活菌计数 试验前对20040913、20041101两批猪支原体肺炎冻干活疫苗(RM48株)分别使用Lps-5液体培养基恢复原体积后做活菌计数,即CCU测定,方法如下:取11只无菌小圆底试管,各预先加入1.8 mL Lps-5液体培养基,在第1管中加入0.2 mL待测原菌液,充分混匀后吸出0.2 mL加入第2管,混匀后再吸出0.2 mL加入第3管,依次类推,直到第10管,第11管作为对照,各管培养基放入37℃静置培养,15 d后观察培养基颜色变化单位(CCU)判定结果:从培养基颜色由红变到橘黄(pH下降值 ≥ 0.5)的最后一稀释管作为CCU/mL的终点,如第1~8管发生颜色改变(pH变化值 ≥ 0.5),对照管和其余各管均未变色则待测菌液的活菌数为 10^8 CCU/mL。

1.2.3 免疫接种

1.2.3.1 胸腔注射免疫 将20040913批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)(2 mL/瓶,活菌滴度 10^8 CCU/mL)用PBS(pH 7.2)稀释成 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CCU/mL四组菌液,用于仔猪胸腔注射免疫,免疫方法为从右侧胸腔肩胛骨后缘第二、三肋骨间垂直进针,穿透胸壁后注射即可,1 mL/头,每个滴度组免疫4头。

20041101批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)以同样的方法的稀释和免疫。对照组4头猪,分别胸腔注射1 mL PBS(pH 7.2)。

1.2.3.2 鼻腔接种 将20040913批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)用PBS(pH 7.2)稀释成活菌滴度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CCU/mL的四组菌液,用于仔猪鼻腔接种,免疫方法为在猪吸气时,使用喷枪将疫苗喷入鼻腔深处即可,1 mL/头,每个滴度组免疫4头。

20041101批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)以同样的方法的稀释和免疫。对照组4头猪,分别鼻腔接种1 mL PBS(pH 7.2)。

1.2.4 强毒攻击 在免疫后第45 d,分别对各免疫组和对照组试验猪进行强毒攻击。攻毒使用的猪肺炎支原体强毒是济南株F65组织匀浆毒,用磷酸

缓冲盐水(PBS,pH 7.2)50倍稀释后,气管内注射,每头猪攻毒剂量为5 mL。攻毒后每日观察两次临床症状,连续观察25 d后剖杀,并对肺脏进行评分和计算。

1.2.5 结果评定和计算方法^[5-6] 评分标准按照

国外的评判标准,即:左、右心叶和左、右尖叶出现100%病变各记1分,左、右膈叶和中间叶出现100%病变各记0.5分,病变总分为5.5分。根据猪肺脏的病变评分,按以下公式计算疫苗免疫猪的攻毒保护率。

$$\text{保护率} = \frac{\text{对照组每头猪肺脏病变分平均值} - \text{试验组每头猪肺脏病变分平均值}}{\text{对照组每头猪肺脏病变分平均值}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 试验猪血清检验结果 72头健康仔猪血清,经过HI间接血凝试剂盒和IDEXX的猪肺炎制原体抗体ELISA检测试剂盒检测两种方法检测其猪肺炎支原体抗体水平均为阴性,表明该72头健康仔猪均符合本试验要求。

2.2 活菌计数结果 猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)试验苗20040913和20041101批的活菌数计数结果均为 10^8 CCU/mL。

2.3 临床观察结果 攻毒后25 d内, 10^6 CCU/mL以上各滴度疫苗免疫组猪均无临床症状,对照组和 10^5 CCU/mL疫苗免疫组在攻毒10 d后,个别猪出

现咳嗽、气喘症状。

2.4 体温变化 攻毒后1周内的体温测量结果为各组动物体温均无明显升高或降低,在正常范围内,可见攻毒并没有导致动物出现体温上的变化。

2.5 肺脏病变保护结果 将不同接种途径和不同接种剂量的免疫猪于免疫后第45天连同对照猪一起用强毒攻击。攻毒后25 d内对所有试验猪和对照猪宰杀并解剖,观察肺部病变情况,分别对按照1.2.5的方法对每头动物肺脏进行病变评分,计算疫苗的免疫保护率。各胸腔注射免疫组和鼻腔接种免疫组动物的肺脏病变结果与保护率见表1和表2。

表1 两批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)不同剂量胸腔注射免疫攻毒保护率结果

试验组	疫苗批次	疫苗稀释倍数	肺脏病变平均计分	保护率/%
B1	20040913	原倍, 10^8 CCU/头	0.73	78
B2		10×稀释, 10^7 CCU/头	0.74	77.6
B3		100×稀释, 10^6 CCU/头	1.03	68.8
B4		1000×稀释, 10^5 CCU/头	1.48	55.2
B5	20041101	原倍, 10^8 CCU/头	0.64	80.6
B6		10×稀释, 10^7 CCU/头	0.70	78.8
B7		100×稀释, 10^6 CCU/头	1.07	67.6
B8		1000×稀释, 10^5 CCU/头	1.57	52.4
B9	对照组	PBS(pH 7.2)	3.30	/

表2 两批猪支原体肺炎活疫苗(RM48株)不同剂量鼻腔接种攻毒保护率结果

试验组	疫苗批次	疫苗稀释倍数	肺脏病变平均计分	保护率/%
N1	20040913	原倍, 10^8 CCU/头	0.91	70.6
N2		10×稀释, 10^7 CCU/头	0.99	68.1
N3		100×稀释, 10^6 CCU/头	1.29	58.4
N4		1000×稀释, 10^5 CCU/头	2.53	18.4
N5	20041101	原倍, 10^8 CCU/头	0.88	71.6
N6		10×稀释, 10^7 CCU/头	0.98	68.4
N7		100×稀释, 10^6 CCU/头	1.44	53.5
N8		1000×稀释, 10^5 CCU/头	2.22	28.4
N9	对照组	PBS(pH 7.2)	3.10	/

从表 1 和表 2 结果可以看出,按疫苗免疫保护率 60% 为合格来计算,通过胸腔注射免疫的最小免疫剂量为 10^6 CCU/头,而经鼻腔接种的最小免疫剂量为 10^7 CCU/头。

从两批疫苗的两种免疫途径,不同免疫剂量所得到的免疫保护率结果图(图 1)可以看出,接种不同活菌滴度疫苗与免疫效率间具有很好的平行关系,即在所测定的范围内活菌滴度高,免疫效率好。

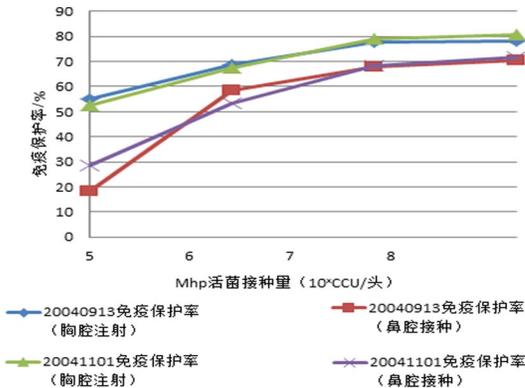


图 1 两批疫苗的免疫保护率与疫苗活菌滴度的平行关系曲线

3 讨论与结论

猪支原体肺炎活疫苗(RM48 株)是在其上一代疫苗猪支原体肺炎鸡胚活疫苗和兔体组织疫苗基础上研制的,该组织疫苗是当时国内外首个猪支原体肺炎弱毒活疫苗,并获农业部科技进步一等奖,但由于生产工艺和原材料及使用方法上的局限性,使大面积推广应用受到了较大限制^[7-8]。我国当前预防猪支原体肺炎的疫苗仍以进口灭活疫苗为主,灭活疫苗使用方便,但价格贵,免疫效力较低,而活疫苗效率较好,价格相对便宜,但疫苗接种方法是采用胸腔免疫注射,由于操作困难,往往不容易被用户接受^[9-10]。为了解决猪肺炎支原体活疫苗在免疫途径上的不足,国内外学者也研究了多种途径^[11],包括腹腔注射免疫^[9]、喷雾免疫^[12]均能取到一定的效果,本试验室通过对多种不同免疫方式的尝试发现,鼻腔接种可以达到很好的免疫效果,但使用量要比胸腔注射免疫高。

本试验的结果表明,无论是胸腔注射免疫,还是鼻腔接种,猪支原体肺炎活疫苗(RM48 株)均能产生良好的免疫保护力。从免疫效率与活菌滴度的平行关系图可以看出,随着疫苗的活菌浓度上升,免疫效率也随之上升,但总体上胸腔注射免疫

接种猪产生的免疫保护力要优于鼻腔接种的保护力。按照保护率达到 60% 以上表明疫苗有效来计算^[13],胸腔注射免疫的最小免疫剂量确定为 10^6 CCU/头、经鼻腔接种的最小免疫剂量确定为 10^7 CCU/头。从免疫效率与接种的 Mhp 活菌量的关系曲线上看,在试验所测定的范围内二者具有良好的平行关系,这就为活菌计数替代动物效率检验提供了依据,为疫苗大规模生产检验提供了方便,有利于疫苗的推广应用。

参考文献:

- [1] 刘洪云. 猪肺炎支原体疫苗免疫的重要性[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2009(3): 60-61.
- [2] 沈青春, 宁宜宝, 覃青松. 猪肺炎支原体的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2003(6): 26-30.
- [3] 李彦伟, 刘茂军, 武昱孜, 等. 猪肺炎支原体致病机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2013(8): 84-88.
- [4] 潘延铤, 赵卓, 张海玲, 等. 猪支原体肺炎灭活疫苗的免疫效果研究[J]. 中国兽药杂志, 2009(8): 22-24.
- [5] Simionatto S, Marchioro S B, Maes D, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development[J]. Vet Microbiol, 2013, 165(3/4): 234-242.
- [6] Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, et al. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight[J]. Vaccine, 2012, 30(52): 7625-7629.
- [7] Kottaridis S D, Dunlop W R, Smith S C. Tissue-culture-propagated mycoplasma for the control of chronic respiratory disease[J]. Avian Dis, 1967, 11(4): 528-531.
- [8] Lloyd L C, Cottew G S, Anderson D A. Protection against enzootic pneumonia of pigs: intraperitoneal inoculation with live LKR strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Aust Vet J, 1989, 66(1): 9-12.
- [9] 金梅林. 腹腔内接种活猪肺炎支原体 LKR 株对猪流行性肺炎的防御作用[J]. 国外医学·预防·诊断·治疗用生物制品分册, 1990, (1): 28.
- [10] 叶宝宏, 杨柳. 猪肺炎支原体的免疫学研究现状[J]. 榆林学院学报, 2009(02): 24-26, 43.
- [11] Feng Z X, Wei Y N, Li G L, et al. Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine[J]. Vet Microbiol, 2013.
- [12] Murphy D, Van Alstine W G, Clark L K, et al. Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Am J Vet Res, 1993, 54(11): 1874-1880.
- [13] Linchevski I, Klement E, Nir-Paz R. *Mycoplasma pneumoniae* vaccine protective efficacy and adverse reactions - systematic review and meta-analysis[J]. Vaccine, 2009, 27(18): 2437-2446.