

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.01

3 种不同类型佐剂的猪圆环病毒 2 型亚单位灭活疫苗免疫效果的比较研究

柴 华,张智明,闫 妍,方 超,孙晓峰,梁宛楠,窦海艳,何世岷

(哈药集团生物疫苗有限公司,哈尔滨 150069)

[收稿日期] 2019-11-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0001-06 [中图分类号] S859.797

[摘 要] 为制备猪圆环病毒 2 型商品化亚单位疫苗选择良好的佐剂,对由水性佐剂 GEL 01、白油佐剂以及氢氧化铝胶佐剂分别制备的 3 种猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗的免疫效果进行比较研究。本实验选取 3~4 周龄猪圆环病毒 2 型抗体阴性猪 30 头,根据试验疫苗接种情况分为 6 组,分别为:3 种不同佐剂制备的亚单位疫苗(A 组、B 组和 C 组)、商品化疫苗(D 组)以及空白对照组和攻毒对照组,然后进行临床观察、抗体水平监测和免疫效力评价,观察各组仔猪的不良反应情况、抗体水平以及攻毒保护情况。结果显示:3 种不同类型佐剂制备的猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗接种猪后均无任何不良反应、能刺激机体产生良好的 ELISA 抗体水平和免疫效果,但水性佐剂 GEL 01 制备的疫苗与另外 2 种佐剂制备的疫苗相比,综合抗体水平、免疫效果等因素,水性佐剂 GEL 01 制备的疫苗在临床使用上更具优势,为商品化亚单位疫苗佐剂的选择提供了重要的数据支持。

[关键词] 佐剂;猪圆环病毒 2 型;亚单位;灭活疫苗;免疫效果

Comparative Study on the Immune Effect of the Porcine Circovirus Type 2 Subunit Vaccines Prepared with Three Different Types of Adjuvants

CHAI Hua,ZHANG Zhi-ming,YAN Yan,FANG Chao,SUN Xiao-feng,

LIANG Wan-nan,DOU hai-yan,HE Shi-min

(Harbin Pharmaceutical Group Bio-vaccine Co Ltd,Harbin 150069,China)

Abstract: In order to select a good adjuvant to prepare the commercial subunit vaccine of porcine circovirus type 2 (PCV 2), the immune effects of three kinds of PCV 2 subunit vaccines prepared by water adjuvant gel 01, white oil adjuvant and aluminum hydroxide gel adjuvant were compared. In this experiment, according to the vaccination conditions, thirty 3~4 weeks-old pigs with seronegative for PCV2 antibodies were divided into 6 groups. They were the group A to group C for the subunit vaccines prepared with three different adjuvants separately, group D for the commercial vaccines, and the control group and the attack control group. Then, the

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GY2018ZB0005)

作者简介: 柴 华,高级兽医师,硕士,从事生物制品的研发。E-mail:asd_zzm1@163.com

clinical observation, antibody level monitoring and immune efficacy evaluation were carried out, and the adverse reactions, antibody levels and the protection of the piglets were observed. The results showed that there were no adverse reactions after vaccination of swine circovirus type 2 subunit vaccine prepared by three different types of adjuvants, which could stimulate the body to produce good ELISA antibody level and immune effect. Furthermore, compared with the vaccines prepared with the other two adjuvants, the vaccines prepared with gel 01 showed better antibody level, immune effect and more advantages in clinical applications. So, it provides important data support for the selection of adjuvants for commercial subunit vaccines.

Key words: adjuvants; porcine circovirus type 2; subunit; inactivated vaccine; immune effect

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV-2) 感染可引起的猪的断奶后多系统衰弱综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎和肾病综合征 (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、母猪繁殖障碍等多种相关疾病^[1-2], 已在我国以及世界其他国家和地区普遍流行, 我国最早则由朗洪武等^[3]于 2001 年报道了 PCV2 的存在。目前我国大部分省市的猪场均有由 PCV2 感染引起的相关疾病的报道, 且该病有不断蔓延趋势^[4-6]。接种相关疫苗是预防由 PCV2 感染引发相关疾病的首要手段。当前, 在国内市场上生产和销售的猪圆环病毒 2 型疫苗的类型主要为全病毒灭活疫苗、基因工程亚单位疫苗等^[7-8], 国外生产和销售则主要为 Cap 亚单位疫苗^[9-11]。亚单位疫苗具有全病毒灭活疫苗和全病毒弱毒活疫苗等不具备的优点: 不会出现散毒、同源重组以及发生变异的可能性^[12-13], 容易制备高纯度和高效价的抗原以及制备的疫苗具有安全、可靠、高效的优点, 近年来成为我国 PCV2 疫苗的研究趋势。而在亚单位疫苗的制备过程中, 佐剂选择的正确与否, 对于疫苗的免疫效力存在着重要的影响。本试验尝试用 3 种不同类型的佐剂制备疫苗, 并对制备的疫苗进行免疫效力的评价, 以期商品化亚单位疫苗佐剂的选择提供重要的数据支持。

1 材料与方法

1.1 佐剂及主要试剂 GEL 01 佐剂购自 Seppic 公司; 白油购自索诺邦公司; 氢氧化铝胶由哈药集团生物疫苗有限公司自制。猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒, 购自北京金诺百特科技有

限公司。钥匙孔血蓝蛋白 (KLH) 购自 Sigma 公司, 巯基乙酸培养基 (Thio)、dNTPs、Taq 酶购自 Promega 公司, 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 疫苗 疫苗 A: 猪圆环病毒 2 型亚单位灭活疫苗 (GEL 01 佐剂); 疫苗 B: 猪圆环病毒 2 型亚单位灭活疫苗 (白油佐剂); 疫苗 C: 猪圆环病毒 2 型亚单位灭活疫苗 (氢氧化铝胶佐剂), 均由哈药集团生物疫苗有限公司提供, 以上 3 种疫苗中猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的含量均为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 疫苗 D: 商品化猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (LG 株) (佐剂为 Seppic 公司的 ISA 15A 佐剂, 水包油型), 由哈药集团生物疫苗有限公司制备, 批号: 201802。

1.3 免疫保护试验 取 30 头 3~4 周龄 PCV2 抗体阴性健康仔猪, 随机分为 6 组, 每组 5 头, 第 1 组接种疫苗 A, 2 mL/头; 第 2 组接种疫苗 B, 2 mL/头; 第 3 组接种疫苗 C, 2 mL/头。第 4 组注射疫苗 D, 2 mL/头。以上疫苗免疫后 21 d, 以相同剂量加强免疫 1 次。第 5 组为攻毒对照组, 第 6 组为空白对照组。免疫后每周采血, 分离血清, 用间接 ELISA 测定 PCV2 抗体。加强免疫后 14 d, 对第 1~5 组用 PCV2 攻毒 (PCV2 LG 株), 5.0 mL/头 ($5 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀), 攻毒后第 4、7 日分别在每头猪的两腋下及臀部 4 点注射用弗氏不完全佐剂乳化的钥匙孔血蓝蛋白 4 mL (2 mg), 并同时腹腔注射 10 mL 巯基乙酸培养基; 第 11、19 日腹腔注射 10 mL 巯基乙酸培养基。隔离饲养, 观察 21 d。攻毒后 1~21 d, 每日观察临床症状, 测量体温; 攻毒前第 1 日和攻毒后第 21 日分别测量猪的体重, 计算相对日增重率 (日增重/原体重); 攻毒后 21 d 采血, 用 PCR 方

法检测病毒血症。攻毒后 21 d 将全部试验猪剖杀,观察主要脏器的病理变化,并取股骨沟淋巴结进行病理切片的分析。

1.4 PCR 检测 参照文献^[14]方法设计 PCV2 的引物序列如下:PCV F 5′ - TTCGGTACCAGCTATGACGTATCCAAG - 3′;PCV R 5′ - GCCAAGCTTTCACCTTCGTAATGGTTTT - 3′。引物由上海生物工程(上海)股份有限公司合成,预期扩增片段大小为 751 bp。采用 25 μL 反应体系:10 × PCR Buffer 2.5 μL,上、下游引物(0.02 mmol)各 1 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,rTaq DNA 聚合酶(2.5U) 0.5 μL,灭菌去离子水补足至 25 μL。PCR 反应参数:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 10 min,结束程序。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪观察结果。

1.5 血清 PCV2 抗体 ELISA 的测定 按照猪圆环病毒 2 型抗体检测试剂盒说明书的方法进行血清抗体的测定,结果判定:样品 A 值 ≥ 0.38 为阳性;样品 A 值在 0.2 ~ 0.38 之间为可疑;样品 A 值

<0.2 为阴性。

2 结果与分析

2.1 不同佐剂疫苗临床症状的观察结果 用 3 种不同佐剂制备的疫苗与商品化疫苗免疫猪后,不同组的免疫猪在精神状态、采食等方面均为正常,注射部位无红、肿等临床症状,无全身不良反应,表明分别用 3 种佐剂制备的疫苗对猪的不良反应与商品化疫苗无显著差异;用 PCV2 LG 株攻毒后,3 种不同佐剂制备的疫苗与商品化疫苗免疫组均未出现厌食、精神不振、进行性消瘦等临床症状;攻毒对照组在攻毒后,有 3 头猪出现厌食、精神不振及进行性消瘦,同时体温出现升高,出现发热的情况;空白对照组在整个试验期间临床症状、体温一直保持正常。

2.2 相对日增重的测定结果 在攻毒前第 1 日和攻毒后第 21 日分别测量猪的体重,计算相对日增重率,结果攻毒对照组在攻毒后出现增重缓慢的情况,与 4 个免疫攻毒组和空白对照组的相对日增重率差异显著;4 个免疫攻毒组与空白对照组的相对日增重率差异不显著,结果见表 1。

表 1 相对日增重率测定结果

Tab 1 The results of relative daily weight gain rate

组别 Group	攻毒前平均体重/kg Average weight before attack/kg	攻毒后 21 d 平均体重/kg Average weight of 21 days after attack/kg	相对日增重率 relative daily weight gain rate
疫苗 A Vaccine A	31.9	47.0	0.0225 ± 0.0013 ^a
疫苗 B Vaccine B	30.8	45.2	0.0223 ± 0.0009 ^a
疫苗 C Vaccine C	32.0	45.9	0.0207 ± 0.0011 ^a
疫苗 D Vaccine D	31.5	46.5	0.0226 ± 0.0010 ^a
攻毒对照组 Challenge control group	32.5	43.3	0.0158 ± 0.0011 ^b
空白对照组 Blank control group	30.2	44.6	0.0227 ± 0.0015 ^a

a 和 b 字母不相同表示差异显著 (P < 0.05); a 和 b 字母相同表示差异不显著 (P > 0.05)
The difference of shoulder mark letters means significant difference (P < 0.05), The same of shoulder mark letters means no significant difference (P > 0.05).

2.3 攻毒后 PCV2 PCR 测定结果 攻毒后 21 d 采血,用 PCR 方法检测 PCV2 病毒核酸。疫苗 A 免疫

组、疫苗 B 免疫组、疫苗 D 免疫组和空白对照组均未检出 PCV2 病毒核酸;疫苗 C 免疫组有 1 头猪检

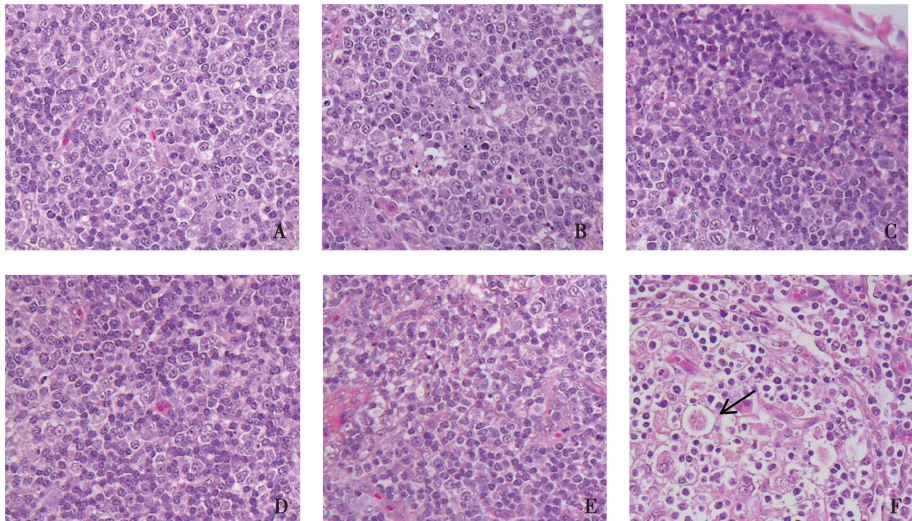
出 PCV2 病毒核酸;攻毒对照组有 4 头猪检出 PCV2 病毒核酸。结果见表 2。

表 2 PCR 法检测病毒血症结果

Tab 2 The results of viremia by PCR assay

组别 Group	病毒核酸检出率 Detection rate of PCV2 nucleic acid
疫苗 A Vaccine A	0/5
疫苗 B Vaccine B	0/5
疫苗 C Vaccine C	1/5
疫苗 D Vaccine D	0/5
攻毒对照组 Challenge control group	4/5
空白对照组 Blank control group	0/5

2.4 病理切片分析结果 攻毒后 21 d 扑杀所有试验猪,剖检观察主要脏器的病理变化,并取股骨沟淋巴结进行病理切片分析。剖检结果表明,各疫苗免疫组和空白对照组猪的主要脏器均未出现肉眼可见的病理变化,攻毒对照组有 4/5 的猪腹股沟淋巴结出现肿大、充血等肉眼可见的病理变化。对所取的股骨沟淋巴结,用甲醛固定后制作石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察组织病理变化,疫苗免疫组与空白对照组的病理切片中淋巴小节的淋巴细胞呈蓝染,排列紧密,无坏死,攻毒对照组的病理切片中出现局部淋巴小结的淋巴细胞排列较为松散,出现弥漫性的淋巴细胞减少(图 1)。



A:疫苗 A 免疫猪;B:疫苗 B 免疫猪;C:疫苗 C 免疫猪;D:疫苗 D 免疫猪;E:空白对照猪;F:攻毒对照猪

A Vaccine A group, B Vaccine B group, C Vaccine C group, D Vaccine D group, E Blank control group, F Challenge control group

图 1 股骨沟淋巴结病理切片(100 ×)

Fig. 1 Pathological section of femoral groove lymph node(100 ×)

2.5 PCV2 血清抗体 ELISA 测定结果 免疫后每周采血,用间接 ELISA 测定 PCV2 抗体。不同佐剂制备的疫苗免疫猪后 PCV2 抗体产生的时间不同,疫苗 A 和疫苗 D 在免疫后 7 d,即可检测到 ELISA 抗体,疫苗 B、疫苗 C 则在免疫后第 2 周可检测到 ELISA 抗体,二免后,所有疫苗免疫组 PCV2 血清 ELISA 抗体水平明显升高,结果见图 2 所示。

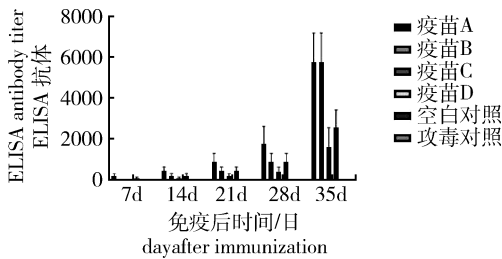


图 2 免疫后不同时间 PCV2 血清 ELISA 抗体检测结果

Fig 2 The results of PCV2 antibody at different time after immunization

3 讨论与结论

PCV2 的主要结构蛋白和抗原表位是由 ORF2 表达所产生的 Cap 蛋白,目前,各研究机构将其作为制备亚单位疫苗目标抗原。在工业化生产 Cap 蛋白的工艺,存在原核表达系统和真核表达系统,而采用真核表达系统——昆虫杆状病毒表达系统该蛋白时,可以对表达的蛋白进行翻译后修饰,使表达的产物更接近天然蛋白,其优越性远超过细菌表达体系。目前,国外多个公司已相继研究开发成功 PCV2 灭活疫苗或 Cap 蛋白重组亚蛋白疫苗,可用于有效预防 PCV2 感染^[15-16]。表达的 PCV2 Cap 蛋白分子量比较小,在没有免疫佐剂的协同刺激下,免疫原性也较差,因此,常常在制备疫苗时选择合适的佐剂来增强免疫效果。目前,制备此类疫苗的佐剂一般包括弗氏完全/不完全佐剂、铝胶佐剂、水性佐剂、白油佐剂、脂质体、细菌菌影 (Bacterial ghosts, BGs) 等^[17]。因此,本研究为了选择良好的佐剂进行工业化 Cap 蛋白疫苗的制备,选择铝胶佐剂、白油佐剂、水性佐剂 (GEL 01) 等 3 种不同佐剂来制备 PCV2 亚单位灭活疫苗,同时,用 PCV2 强毒对这 3 种疫苗免疫的动物,进行免疫效果的评价。

疫苗免疫后,不同疫苗 PCV2 血清 ELISA 抗体产生的时间不同,水性佐剂制备的疫苗与商品化疫苗在免疫后 7 d 即可检测到,白油佐剂制备的疫苗和铝胶佐剂制备的疫苗在免疫后 14 d 才可检测到;二免后所有疫苗的 PCV2 血清抗体效价均快速升高并达到较高的抗体水平,在攻毒前平均水平均在 1:800 以上,其中水佐剂制备的疫苗与商品化疫苗抗体水平相当,与另外两种佐剂制备的疫苗差异较显著。对于疫苗的免疫效果,本研究采用临床症状、平均日增重、病毒血症以及腹股沟淋巴结的病理切片分析等 4 项指标进行评价。疫苗免疫后,在通针性上仅有白油佐剂制备的疫苗表现较差、临床症状上,也仅有铝胶佐剂制备的疫苗在免疫后有 1 头猪出现一过性的发热现象;疫苗免疫攻毒后,不同佐剂制备的疫苗在本研究中所检测的 4 项指标上均与攻毒对照组所检测的 4 项指标上差异显著,均与空白对照组所检测的 4 项指标上无显著差异,

表明用铝胶佐剂、白油佐剂、水性佐剂制备的疫苗均能取得良好的免疫效果。考虑到 3 种佐剂在通针性、临床表现以及攻毒结果,优选水性佐剂作为将来工业化生产疫苗的佐剂,为 PCV2 亚单位疫苗商用佐剂的选择提供了必要的支撑。

参考文献:

- [1] 王宪文,姚四新,王丽荣,等. 猪圆环病毒 II 型流行病学新特点及致病机理研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(12): 190-194.
Wang X W, Yao S X, Wang L R, *et al.* New epidemiological characteristics and pathogenesis of porcine circovirus type II[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012,39(12): 190-194.
- [2] Mcneilly F, McNair I, Mackie D P, *et al.* Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2[J]. Archives of Virology, 2001,146(5): 909-922.
- [3] 郎洪武,王力,张广川,等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J]. 中国兽医科技, 2001,31(3): 3-4.
Lang H W, Wang L, Zhang G C, *et al.* Isolation and identification of porcine circovirus and diagnosis of Porcine weaning multi-system debilitation syndrome[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2001,31(3): 3-4.
- [4] 吴佳俊,张硕,刘颖昶,等. 我国种猪主要垂直传播性疫病流行态势分析及控制策略探讨[J]. 中国动物检疫,2017, 34(8): 14-16.
Wu J G, Zhang S, Liu Y Y, *et al.* Analysis on the epidemic situation and control strategy of the main vertically transmitted diseases of breeding pigs in China [J]. China Animal Health Inspection, 2017, 34(8): 14-16.
- [5] 胡帅,周庆安,李军,等. 2013-2014 年广西省主要猪病毒性传染病流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2016,43(6): 1618-1623.
Hu S, Zhou Q A, Li J, *et al.* Epidemiological survey of major swine viral infectious diseases in Guangxi Province from 2013 to 2014 [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016,43(6): 1618-1623.
- [6] 曹东阳,王小敏,钱爱东,等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型 (PCV2) 分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390-398.
- [7] Cao D Y, Wang X M, Qian A D, *et al.* Molecular epidemiological investigation of PCV2 in Jiangsu Province and its surrounding

- areas[J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2016, 32(2): 390–398.
- [8] 周绪斌, 许秀梅, 张馨玉, 等. 猪圆环病毒疫苗的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(4): 47–49.
- Zhou X B, Xu X M, Zhang X Y, *et al.* Research progress of porcine circovirus vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43(4): 47–49.
- [9] Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application[J]. *The Veterinary Journal*, 2012, 194(2): 151–157.
- [10] Martelli P, Ferrari L, Morganti M, *et al.* One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions[J]. *Veterinary microbiology*, 2011, 149(3): 339–351.
- [11] Alarcon P, Wieland B, Mateus A L P, *et al.* Pig farmers, perceptions, attitudes, influences and management of information in the decision-making process for disease control[J]. *Preventive veterinary medicine*, 2014, 116(3): 223–242.
- [12] Grgacic E V L, Anderson D A. Virus-like particles: passport to immune recognition[J]. *Methods*, 2006, 40(1): 60–65.
- [13] Staats H F, Jackson R J, Marinaro M, *et al.* Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development[J]. *Current opinion in immunology*, 1994, 6(4): 572–583.
- [14] 先 炜, 姜 平, 李玉峰, 等. 猪圆环病毒 II 型 Cap 蛋白重组腺病毒的构建与鉴定[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(1): 29–33.
- Xian W, Jiang P, Li Y F, *et al.* Construction and identification of recombinant adenovirus of porcine circovirus type II CAP protein[J]. *Virologica Sinica*, 2006, 21(1): 29–33.
- [15] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, *et al.* Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine dreovirus type 2 (pcv2) proteins[J]. *Vaccine*, 2003, 21(31): 4565–4575.
- [16] Siten K, Annette M B, Tine H F, *et al.* Immunization against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice [J]. *Vaccine*, 2004; 22:1358–1361.
- [17] 徐胜奎, 李婷婷, 赵 谦, 等. 以胸膜肺炎放线杆菌菌影作为佐剂的猪圆环病毒亚单位疫苗的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(1): 55–59.
- Xu S K, Li T T, Zhao Q, *et al.* Study on porcine circovirus subunit vaccine with *Actinobacillus pleuropneumoniae* as adjuvant [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(1): 55–59.

(编辑: 侯向辉)