

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.07.07

猪支原体肺炎疫苗效力检验常见问题与质量控制

刘 博,魏 津,马 欣,王 甲,赵浩然,刘 燕,姚文生,罗玉峰*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-11-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 07-0051-05 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为了更规范、标准地评价猪支原体肺炎疫苗,本研究对近年来猪支原体肺炎疫苗检验进行了系统性分析。结果发现,效力检验作为疫苗质量的核心内容,是检验中最易出现问题参数。对效力检验相关方法、常见问题进行分析,有助于研发过程中规避问题,提高疫苗质量继而保障养殖业发展。

[关键词] 猪支原体肺炎疫苗;效力检验;替代方法

General Issues and Quality Control of Potency Test of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Vaccines

LIU Bo, WEI Jin, MA Xin, WANG Jia, ZHAO Hao-ran, LIU Yan,

LUO Yu-feng*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Corresponding author: LUO Yu-feng, E-mail: luoyufengmy@163.com

Abstract: In order to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in a more consistent and standard way, this study systematically analyzed the testing of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in recent years. It was found that potency test, as the core component of vaccine quality, is the most problematic parameter in the test. The analysis of the methods and general issues related to potency test can help veterinary biologics enterprises avoid problems in the development process and improve vaccine quality to finally safeguard the farming industry.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines; Potency test; Alternative methods.

猪肺炎支原体是一类直径小(400-1200 纳米),基因组小(893-920 kb)且缺乏细胞壁的细菌^[1]。其引起的猪支原体肺炎是一种高度传染性慢性疾病^[2],在全世界范围内流行,几乎每个猪群中都

可检测到病原^[3]。对该疾病的治疗仅限于抗生素,但抗生素并不能完全消除感染。疫苗可以降低该病的严重程度,但不能完全预防感染的发生^[4]。近年来,猪支原体肺炎疫苗是猪用疫苗的一个研发热点,

基金项目: 中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”-猪、鸡支原体生产/检验用菌种标准的修订(GY202007)

作者简介: 刘 博,助理研究员,硕士,从事细菌类生物制品的检测及相关科研工作。

通讯作者: 罗玉峰。E-mail: luoyufengmy@163.com

本文通过对检验过程中发现的问题进行系统分析,旨在帮助研发企业规避常见问题,提高猪支原体肺炎疫苗的质量,为疫病的预防提供保障。

1 猪肺炎支原体生物制品的发展现状

猪肺炎支原体生物制品主要涉及诊断制品与疫苗。

1.1 猪支原体肺炎诊断制品 目前国内已经注册的诊断制品有猪支原体肺炎微量间接血凝试验(IHA)诊断试剂、猪肺炎支原体等温扩增检测试剂盒、猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒以及猪肺炎支原体 ELISA 抗体(sIgA)检测试剂盒。其中,IHA 诊断试剂是将肺炎支原体抗原附着于红细胞表面,成为致敏的载体,随后与待检血清反应,如果血清抗体阳性则出现可见的凝集反应^[5]。猪肺炎支原体等温扩增检测试剂盒是通过环介导等温扩增反应(lamp)对样品中支原体核酸进行检测,待检样本通常为鼻咽拭子^[6]。ELISA 抗体检测试剂盒有针对性 IgG、也有针对支原体粘膜免疫 sIgA 进行检测的,检测样本为血清^[7]。在国内注册的进口试剂盒目前只有 idexx 的 ELISA 抗体检测试剂盒。

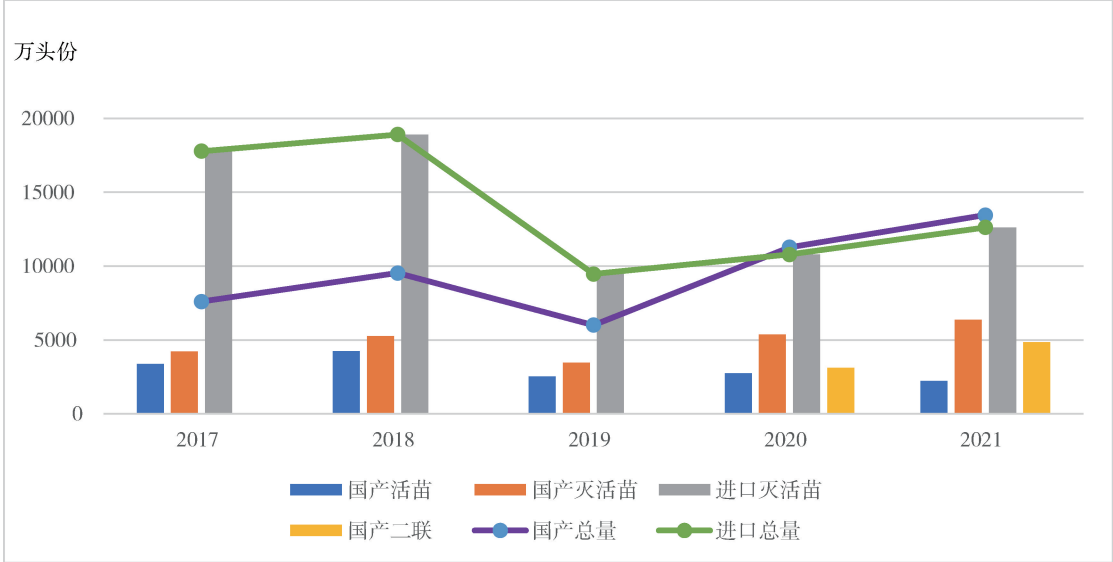
1.2 猪肺炎支原体疫苗 目前已注册的猪肺炎支原体相关疫苗,活疫苗有 3 个均为国产苗,灭活单苗国产 7 个,进口 7 个。其中猪支原体肺炎活疫苗

是我国首个预防猪支原体肺炎的活疫苗,其生产用菌种为猪肺炎支原体兔化弱毒株,该菌株由猪肺炎支原体强毒株经致弱后制成;活疫苗由于免疫的方式原因(胸腔注射),注射技术要求高,在使用环节难以推广,但是免疫保护效果确实,猪支原体肺炎活疫苗在效力检验中免疫组肺炎病变减少率可达到 100%。目前涉及支原体的联苗均为猪圆环支原体二联灭活疫苗,国产 3 个,进口 2 个。首个联苗在国内于 2020 年获批生产及使用。

1.3 猪肺炎支原体疫苗的生产(批签发)情况 从批签发数据来看,2017 年及以前,进口疫苗在我国对猪支原体肺炎的预防中是占据绝对优势的,但是 2017 年以后差距逐年在缩小,2020 年,国产猪肺炎支原体疫苗的批签发量已经实现了反超。至 2021 年,国产苗和进口苗批签发量的差距还在拉大,造成差距的主要原因就是猪圆支二联疫苗,这也是近年来研发注册的一个热门。

产品的研发热是因为市场存在需求,目前国内中大型养殖场对于支原体疫苗的免疫几近 100%(小型养殖场或者散户对于猪肺炎支原体的重视还有待加强)。作为使用者,产品质量过硬可以保证养殖效益;作为研发者和检验人员,确保疫苗的效力对于把控好产品的质量尤其重要。

表 1 2017 - 2021 年猪肺炎支原体疫苗批签发统计
Tab 1 Mycoplasma Hyopneumoniae Vaccine Batch Release Statistics, 2017 - 2021



2 猪支原体肺炎疫苗效力检验常见问题

猪支原体肺炎疫苗的效力检验分为靶动物免疫攻毒法与替代方法,替代方法分别为活菌计数、相对效力检测与血清学方法。

2.1 活菌计数 活菌计数,是通过对活疫苗本身的活菌进行计数,通过抗原含量来评价疫苗的免疫效力。在研发过程中建立好活菌数和疫苗免疫效力的关系。这个方法操作简单成本低。活菌计数结果偏差性较大,因为每一个稀释度只接一个小管,尤其到了高稀释度的时候,本身菌液浓度就已经很低,如果此时稀释取样不均匀,就会直接影响最后的结果。目前部分实验室在研究过程中会引入病毒 TCID₅₀ 测定方法,到了高稀释度时设置重复,再用统计学方法对结果进行统计,以获取更准确的结果。另一个对活菌计数有较大影响的因素是培养基的质量,支原体培养基成分复杂,影响因素较多,企业应建立培养基质量内控方法,用经过品控的培养基保证结果的可信度^[8]。

2.2 相对效力检测 相对效力检测是近年来灭活疫苗常用的效力检验替代方法。这个方法最早出现在进口产品中,目前在国内销售的 7 个进口产品

效力检验均有此方法;国产疫苗近年来也开始针对这个方法展开研究,目前有 3 个产品效力检验用到相对效力检测。这个方法主要是通过 ELISA,对猪肺炎支原体疫苗生产株的某一个保护型抗原含量进行测定,同时和经靶动物免疫攻毒试验检验合格的参考疫苗进行比较,通过软件计算相对的抗原含量,并以此评价疫苗的免疫效力。针对保护性抗原的选择,最重要的原则在于,该保护性抗原和疫苗的效力需要有很好的相关性。具体到每一个产品,由于生产用菌株不同,所以对保护性抗原的选择也有所不同,企业在研发过程中需要进行摸索尝试,建议可以从猪肺炎支原体膜蛋白着手。该方法试验周期短,需对样品进行处理,不同的疫苗在此步差别比较大,部分疫苗需要冻融后经过超声波处理和长时间超速离心,而部分企业由于对实验条件和方法的优化,已经可以将疫苗经过冻融之后直接测定,极大缩短了检验的时间。

这种替代方法,出现过本参数合格的情况下存在免疫攻毒法不合格的情况。研究单位在选择适合的保护性抗原建立平行关系的时候,参考疫苗的质量也非常重要。只有确保参考疫苗本身可通过靶动物免疫攻毒法检测的情况下,结果才有意义。

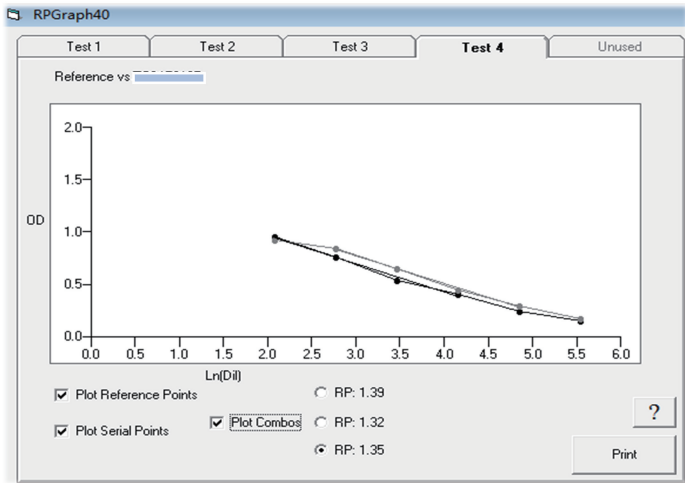


图 1 相对效力检测结果

Fig 1. Result Layout of Relative Potency Test

2.3 血清学方法 血清学方法,是猪肺炎支原体疫苗效力检验最常见的一种替代方法。具体检验

时,实验动物以兔最为常见,也有用小鼠、豚鼠和猪的,免疫后采血通过 IHA 测定血清效价。这个方法

在国内相对主流一些,国产疫苗有 5 个均使用此方法作为效检替代方法,进口产品中有一个使用血清学方法,但未采用间接血凝,而是用的竞争 ELISA。因为不用攻毒,而且替代动物比较好获取,所以本方法试验周期短、成本低。IHA 方法存在两个主要问题,一是近年来的检验工作中,经常出现生产企业提供的 IHA 试剂质量不稳定,具体体现在抗原容易出现自凝;另外一个问题是,出现过血清学方法保护,但是本动物免疫攻毒法不保护的结果。

在研发过程中,研究单位应该一方面重点注意 IHA 试剂的稳定性,另一方面进一步研究平行关系的建立。

2.4 免疫攻毒法 免疫攻毒法通过对健康易感猪进行免疫攻毒试验,在试验周期结束后对实验猪进行剖检和肺脏病变评分,计算免疫组的相对保护率。该方法经济成本高,周期长,却是评价产品质量最具说服力的方法。效力检验免疫攻毒法也是近年来不合格项出现最多的参数,常见不合格项就是免疫组保护率不符合要求。通过对近年来注册的产品进行系统梳理,该方法存在的主要问题有 4 点:分别是健康易感猪的标准不统一,攻毒菌株的毒力标准不统一,对照成立条件不统一,产品间保护率差距大(62~90%)。

具体来说,①健康易感猪的标准,有一些制品尤其是部分圆支二联苗,对猪的要求非常高,导致健康动物的筛选非常困难,然而也有一些圆支二联苗,对于健康猪筛选只要求猪肺炎支原体抗体阴性。通常猪背景越干净,判定的时候越简单,因为这类肺脏不易出现继发感染一类影响判定的情况。因此在一定程度合理把控健康易感猪的标准,是有必要的,应当对处于流行态势的呼吸道病原进行筛选。②针对攻毒菌株的毒力标准不统一,在近年来注册的产品中,大部分以最小感染剂量 MID 为单位来确定攻毒剂量;也有部分企业,在质量标准中单纯用肺组织克数确定攻毒剂量。对于肺组织克重确定毒力的情况,存在的主要问题为批次间差异较大。动物的个体差异极易导致相同克重下毒力的差异。从检验的角度来说我们更提倡测定 MID,并

以此作为标尺对攻毒剂量进行确定。③针对检验过程中对照而言,目前一部分疫苗对于对照成立的条件没有任何规定,一部分疫苗对对照评分的下限做出了规定,少数疫苗对上下限都做出了规定。对照成立条件不统一,对产品质量的横向评价非常不利。在免疫组评分固定的时候,对照的分数直接影响保护率的结果。目前在评审和检验过程中,常见的对照评分为对照组平均评分不低于 10 分(55 分法)以及 8 分(28 分法)。④针对产品间质量差距大,近年来检验发现保护率好的疫苗相对保护率可以达到 90% 以上甚至超过 95%,而保护率一般的疫苗只能刚刚过合格线。企业应当从对生产用菌株的筛选、抗原含量、工艺等多方面进行优化,提高疫苗的保护率。

3 结 语

猪肺炎支原体与其它呼吸道疾病病原的共感染给养殖业造成了巨大的损失^[9]。作为从业人员,生产者需要生产出安全高效的疫苗,检验人员应当通过建立标准方法保证效力检验结果的可靠性从而保障养殖业健康发展。

活疫苗由于可以有效地激活细胞免疫,对于猪肺炎支原体这类通过黏膜感染的胞内寄生菌具有非常好地保护作用,然而存在毒力返强的安全隐患且不利于疫病的净化。灭活疫苗通过激活体液免疫产生高滴度的抗体,然而针对胞内寄生菌,抗体并非是百分之百的保护伞。近年来,有研究人员利用辐照的方法对细菌进行灭活并用于免疫,这类抗原不会增殖,但能保留一定程度的代谢活性且能有效激活细胞免疫,较单纯的化学灭活疫苗而言更具优势,是支原体类疫苗未来可以考虑的一个研究方向^[10, 11, 12]。

对于猪肺炎支原体疫苗效力检验的优化方向,总体来说就是标准化。通过建立质量稳定的 IHA 诊断试剂,解决检验过程中诊断试剂质量不稳定的问题。通过参考疫苗质量评价标准化和攻毒菌株、对照成立条件标准化,解决多菌株疫苗质量难以横向评价的问题。以期在未来可以以更规范更标准的尺度去评价和保障疫苗的质量。

参考文献:

[1]

Tajima M, Yagihashi T. Interaction of Mycoplasma hyopneumoniae with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscope [J]. Infection and Immunity. 1982, 37 (3): 1162 - 9.

[2]

Whittlestone P. The Mycoplasmas, vol. II [M]. New York; Academic Press, Inc. , 1979.

[3]

Minion. Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens [J]. Frontiers in Bioscience. 2002, 7 (1 - 3): d1410 - 22.

[4]

Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? [J]. Veterinary Microbiology. 2004, 100 (3 - 4): 255 - 68.

[5]

农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程,2000 年版[S]. 北京:化学工业出版社,2020.
Veterinary Biological Products Regulations Committee of Ministry of Agriculture. Veterinary Biological Products Regulations of People's Republic of China, 2000 Edition[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2020.

[6]

郭盼盼, 黄书林, 张跃伟, 等. 环介导等温扩增技术快速诊断猪肺炎支原体[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (4), 822 - 826.
Guo P P, Huang S L, Zhang Y W, et al. Loop mediated Isothermal Amplification for Sensitive and Rapid Detection of Mycoplasma hyopneumoniae [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18 (4), 822 - 826.

[7]

农业部公告第 2653 号[S]. 2018.
Announcement No. 2653 of Ministry of Agriculture[S]. 2018.

[8]

张晓亮, 郝华芳, 陈胜利, 等. 支原体营养代谢特征的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(11),1029 - 1036.
Zhang X L, Hao H F, Chen S L, et al. Advances in the characterization of the nutritional metabolism of Mycoplasmas[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2021, 37 (11), 1029 - 1036.

[9]

F J Pallarés, J A Añón, I M Rodríguez - Gómez, et al. Prevalence of mycoplasma - like lung lesions in pigs from commercial farms from Spain and Portugal [J]. Porcine Health Management. 2021, 7;26.

[10]

Bereket D, Molalegne B, Destaw A, et al. Gamma - Irradiated Fowl Cholera Mucosal Vaccine: Potential Vaccine Candidate for Safe and Effective Immunization of Chicken Against Fowl Cholera [J]. Frontiers in Immunology. 2021, Volume 12.

[11]

Hyun J J, Eui - Baek B, Fengjia Ch, et al. Radiation - Inactivated S. gallinarum Vaccine Provides a High Protective Immune Response by Activating Both Humoral and Cellular Immunity [J]. Frontiers in Immunology. 2021, Volume 12.

[12]

Luca P, Johanna B, Richard T. K, et al. Irradiated Non - replicative Lactic Acid Bacteria Preserve Metabolic Activity While Exhibiting Diverse Immune Modulation [J]. Frontiers in Veterinary Science. 2022, Volume 9.

(编辑:陈希)