

兔病毒性出血症 4 种灭活疫苗的研制及效果比较

权英存¹, 刘虎守² (1. 青海省大通县元朔兽医站, 青海大通 810100; 2. 青海省大通县农牧局, 青海大通 810100)

摘要 [目的] 研制兔病毒性出血症新型疫苗。[方法] 分别以黄芪多糖、蜂胶、铝胶、生理盐水为佐剂, 研制兔病毒性出血症黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂、铝胶佐剂以及常规灭活疫苗, 并从安全、免疫效果等方面对这 4 种疫苗进行比较。[结果] 4 种疫苗均有良好的安全性。免疫后 7 d 4 种疫苗产生的特异性抗体效价均逐步升高, 攻毒保护率均达到 100%。免疫后 14 d 黄芪多糖佐剂抗体效价显著高于蜂胶佐剂、铝胶佐剂以及常规灭活疫苗。免疫后 180 d 黄芪多糖佐剂疫苗的保护率达 75%, 蜂胶佐剂与铝胶佐剂可达到 50%, 常规灭活疫苗的保护率达 25%。[结论] 这 4 种疫苗均具有良好的安全性和免疫原性, 其中黄芪多糖灭活疫苗的免疫效果最好。

关键词 兔病毒性出血症; 黄芪多糖; 蜂胶; 铝胶; 灭活疫苗; 免疫效果

中图分类号 S829.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03573-03

Development and Efficacy Comparison of Four Kinds of Inactivated Vaccines against Rabbit Hemorrhagic Disease

QUAN Ying-cun et al (Yuanshuo Veterinary Station in Datong County of Qinghai Province, Datong, Qinghai 810100)

Abstract [Objective] The research aimed to develop new vaccine against rabbit hemorrhagic disease. [Method] Using Astragalus polysaccharides, propolis, alumina gel, physiological saline as adjuvants, Astragalus polysaccharide adjuvant, propolis adjuvant, alumina gel adjuvant and conventional inactivated vaccines against rabbit hemorrhagic disease were prepared, and the safety and immunity effect of these four kinds of vaccines were compared. [Result] These four kinds of vaccine all had good safety. On the 7th day after immunization, the specific antibody titers produced by four kinds of vaccines were gradually increased and their immunoprotective rate reached 100%. On the 14th day after immunization, the antibody titer of astragalus polysaccharide adjuvant was significantly higher than that of propolis adjuvant, alumina gel adjuvant and conventional inactivated vaccine. On the 180th day after immunization, the protection rate of astragalus polysaccharide adjuvant vaccine reached 75%, and that of propolis adjuvant and alumina gel could reach 50%, while the protection rate of conventional inactivated vaccine rate was only 25%. [Conclusion] These four kinds of vaccines showed good safety and immunogenicity and the immune effect of astragalus polysaccharide inactivated vaccine was better.

Key words Rabbit haemorrhagic disease; Astragalus polysaccharides; Propolis; Alumina gel; Inactivated vaccine; Immune effect

兔病毒性出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)俗称兔瘟,是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起兔的一种急性、烈性、高度接触性传染病^[1-2],该疾病传播速度快、发病率和死亡率均较高,兔群一旦感染该病,将造成毁灭性灾难,是危害养兔业健康发展的头号杀手^[3]。该病首次爆发于我国江苏地区^[4],现已呈世界范围内流行,给全球的养兔业带来了巨大的经济损失^[5-7]。目前,国内对该病的防控主要使用常规灭活疫苗进行免疫接种,随着对动物免疫增强剂研究的不断深入,黄芪多糖、蜂胶等具有抗菌、消炎、增强机体免疫功能等生物学功能的纯天然药物不断得到开发和应用^[8-11]。笔者用黄芪多糖和蜂胶作为疫苗佐剂,制备 RHDV 灭活疫苗,并比较 RHDV 黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂、铝胶佐剂以及常规灭活疫苗的免疫效果,以期黄芪多糖和蜂胶在动物疫苗佐剂中的开发和应用奠定基础,为 RHDV 新型疫苗的研制开发和应用提供科学依据。

1 材料与方

1.1 病毒与试验兔 兔病毒性出血症病毒(组织毒)由青海畜牧兽医职业技术学院实验室分离并保存;未免疫过兔病毒性出血症病毒疫苗的健康易感兔购自青海民和绿之苑兔业有限公司下属养殖场。

1.2 佐剂 黄芪多糖购自西安康威生物工程有限公司;蜂胶购自青海门源蜂产品公司。

1.3 兔病毒性出血症病毒灭活抗原的制备与检验

1.3.1 灭活抗原的制备。将兔病毒性出血症病毒(组织毒)与灭菌生理盐水(质量体积比约为 1:4)充分研磨捣碎,经颈部皮下注射 2 月龄健康易感兔,每只注射 2 ml,无菌取攻毒后 24~72 h 死亡兔的肝脏组织与灭菌生理盐水(质量体积比约为 1:4)充分研磨捣碎,经甲醛灭活后,4℃下保存备用。

1.3.2 灭活抗原的检验。按照《中华人民共和国兽药典》三部 2010 年版中的方法分别进行灭活抗原对人“O”型红细胞凝集效价的测定和细菌、霉菌、支原体的检测。

1.4 4 种佐剂兔病毒性出血症灭活疫苗的制备

1.4.1 蜂胶佐剂灭活疫苗的制备。将蜂胶碾碎过 20 目药筛后,与无水乙醇(质量体积比约为 1:4)充分混合,置于 37℃下作用 48 h,取上清液即为纯化的蜂胶乙醇浸液。将兔病毒性出血症灭活抗原与蜂胶乙醇浸液按等体积充分混合,加入硫柳汞(占总体积的 0.01%),即为兔病毒性出血症蜂胶佐剂灭活疫苗。

1.4.2 黄芪多糖佐剂灭活疫苗的制备。将黄芪多糖用蒸馏水配制成浓度 25 mg/ml 的溶液,高压蒸汽灭菌,即得黄芪多糖佐剂。将兔病毒性出血症灭活抗原与黄芪多糖佐剂按等体积充分混合,加入硫柳汞(占总体积的 0.01%),即为兔病毒性出血症黄芪多糖佐剂灭活疫苗。

1.4.3 铝胶佐剂灭活疫苗的制备。将三氯化铝用蒸馏水配制成 8% 的溶液,加温至 56~60℃,用氢氧化钠溶液缓慢调节 pH 至 5.6~6.0,高压蒸汽灭菌,即得铝胶佐剂。将兔病毒性出血症灭活抗原与铝胶佐剂按等体积充分混合,加入硫柳汞(占总体积的 0.01%),即为兔病毒性出血症铝胶佐剂灭

基金项目 青海省大通县农技推广补助项目。

作者简介 权英存(1983-),女,青海大通人,助理兽医师,从事动物医学方面的研究。

收稿日期 2014-04-11

活疫苗。

1.4.4 常规灭活疫苗的制备。将兔病毒性出血症灭活抗原与灭菌生理盐水等体积充分混合,加入硫柳汞(占总体积的0.01%),即为兔病毒性出血症常规灭活疫苗。

1.5 4种疫苗的物理性状检验 按照《中华人民共和国兽药典》三部2010年版中的方法分别进行兔病毒性出血症蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水佐剂灭活疫苗的剂型、稳定性等物理性状检验。

1.6 4种疫苗无菌检验 按照《中华人民共和国兽药典》三部2010年版中的方法分别进行兔病毒性出血症蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水佐剂灭活疫苗的细菌、霉菌、支原体的检测。

1.7 4种疫苗的安全性检验 分别将兔病毒性出血症蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水佐剂灭活疫苗经颈部皮下各注射健康易感兔10只,注射剂量为4 ml/只,观察10 d,免疫兔无任何不良反应。

1.8 4种疫苗的效力检验

1.8.1 试验设计与分组。将120只健康易感家兔随机分为5组(对照组、试验I组、试验II组、试验III组、试验IV组),每组24只。试验I组、II组、III组、IV组分别免疫兔病毒性出血症蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水佐剂灭活疫苗,剂量为1 ml/只,对照组免疫灭菌生理盐水。

1.8.2 4种疫苗抗体效价的比较。分别在免疫后7、14、28、60、90、180 d从每组中随机抽取4只试验兔于耳静脉采血后分离血清,通过血凝抑制试验(HI)测定血清中兔病毒性出血症抗体效价。使用SPSS软件对试验数据进行统计与方差分析,结果以“平均值±标准差”表示。

1.8.3 4种疫苗攻毒保护的比较。在7、14、28、60、90、180 d采血后的4只试验兔分别经颈部皮下注射兔病毒性出血症

病毒,剂量为1 ml/只,隔离饲养,观察7 d,记录各组兔的发病和死亡情况,计算各组兔保护率,比较4种疫苗的免疫保护效果。

2 结果与分析

2.1 兔病毒性出血症灭活抗原的检验 采用血凝试验(HA)测定灭活抗原对人“O”型红细胞的凝集效价为1:1 024;按照现行兽药典的方法检验灭活抗原无细菌、霉菌和支原体生长。

2.2 4种疫苗的物理性状检验 按照现行兽药典的方法检验4种灭活疫苗均为均匀混悬液。

2.3 4种疫苗无菌检验 按照现行兽药典的方法检验4种灭活疫苗均无细菌、霉菌、支原体生长。

2.4 4种疫苗的安全性检验 4种灭活疫苗注射的健康易感家兔全部健活,无任何不良反应。

2.5 4种疫苗的效力检验

2.5.1 抗体效价的比较。由表1可知,在免疫后的7 d 4种疫苗RHDV抗体效价均逐步升高,其中以黄芪多糖佐剂灭活疫苗的效价最高,铝胶佐剂灭活疫苗的抗体效价最低,黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂显著高于铝胶佐剂($P < 0.05$);免疫后的14 d,黄芪多糖佐剂灭活疫苗显著高于蜂胶佐剂、铝胶佐剂以及常规灭活疫苗($P < 0.05$);免疫后的28 d,黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂、铝胶佐剂灭活疫苗抗体效价相当,差异不显著($P > 0.05$),均显著高于常规灭活疫苗($P < 0.05$);免疫后的60 d,4种灭活疫苗的RHDV抗体效价仍然维持在较高水平,黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂铝胶佐剂灭活疫苗的抗体效价均显著高于常规灭活疫苗($P < 0.05$);免疫后的120 d,4种灭活疫苗的RHDV抗体效价均有所下降;免疫后的180 d,黄芪多糖佐剂、蜂胶佐剂、铝胶佐剂灭活疫苗抗体效价仍维持在5 log₂以上,其中以黄芪多糖佐剂抗体效价最高,其显著高于常规

表1 4种灭活疫苗RHDV的抗体效价(log₂)

处理	7 d	14 d	28 d	60 d	120 d	180 d
蜂胶佐剂	7.25 ± 0.50 a	8.25 ± 0.50 a	9.25 ± 0.50 a	8.75 ± 0.50 a	7.25 ± 0.50 a	5.50 ± 0.58 ab
黄芪多糖佐剂	7.50 ± 0.58 a	9.25 ± 0.50 b	9.50 ± 0.58 a	8.75 ± 1.26 a	7.50 ± 0.58 a	5.75 ± 0.50 a
铝胶佐剂	6.25 ± 0.50 b	7.75 ± 0.50 a	9.25 ± 0.50 a	8.50 ± 0.58 a	7.00 ± 0.82 ab	5.25 ± 0.50 ab
常规灭活疫苗	6.75 ± 0.50 ab	7.50 ± 0.58 a	8.00 ± 0.82 b	7.25 ± 0.50 b	6.25 ± 0.50 b	4.75 ± 0.50 b
对照组	0	0	0	0	0	0

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

灭活疫苗差异($P < 0.05$)。

2.5.2 4种疫苗攻毒保护效果的比较。由表2可知,在免疫后7 d,4种灭活疫苗均能有效抵抗兔病毒性出血性病毒的攻击,保护率均达到100%,而未免疫的对照组全部死亡;免疫

后120 d,4种灭活疫苗的抗体滴度虽然已有所下降,但其保护率仍然可达到100%;免疫后180 d,4种灭活疫苗的保护率均下降,其中常规灭活疫苗的保护率最低达25%,蜂胶佐剂与铝胶佐剂可达到50%,黄芪多糖佐剂的保护率最高达75%。

表2 4种灭活疫苗攻毒保护结果(存活数/攻毒数)

处理	7 d	14 d	28 d	60 d	120 d	180 d
蜂胶佐剂	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4
黄芪多糖佐剂	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
铝胶佐剂	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4
常规灭活疫苗	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4
对照组	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

3 讨论

笔者利用实验室近期分离的强毒株分别研制了蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水 4 种灭活疫苗,将 4 种疫苗进行比较,结果表明 4 种疫苗均具有良好的安全性,但免疫效果存在一定的差异,黄芪多糖佐剂灭活疫苗产生抗体最快,在免疫后 7 d 其抗体滴度可以达到 $7.50 \log_2$,在免疫后 14 d 其血清抗体水平显著高于蜂胶苗和铝胶苗,且抗体维持时间较长,在免疫后 180 d 抗体效价仍可以达到 $5.75 \log_2$,保护率达 75%;铝胶佐剂灭活疫苗产生抗体较慢,免疫后 7 d 其抗体滴度达到 $6.25 \log_2$,在免疫后 28 d 其血清抗体水平才达到黄芪多糖苗和蜂胶苗;常规灭活疫苗抗体水平维持时间较短,免疫后 180 d 其抗体效价已降到 $4.75 \log_2$,保护率达 25%;铝胶苗和蜂胶苗抗体维持时间较长,在免疫后 180 d 抗体效价分别为 $5.50 \log_2$ 和 $5.25 \log_2$,攻毒保护达 50%。由此可见,黄芪多糖和蜂胶作为天然的免疫增强剂,具有一定的药理活性和保健功能,以其作为佐剂的 RHDV 灭活疫苗吸收快,抗体产生效价高且维持时间较长,是值得进一步推广应用的新型疫苗;常规灭活疫苗中的组织抗原成分可在短时间内被动物机体大量吸收,产生较高水平的抗体,但维持时间较短。铝胶佐剂由于抗原成分释放缓慢,产生高水平抗体所需时间较长,但其维持时间可与蜂胶佐剂相当。

该研究表明,当 RHDV 抗体效价为 $6.25 \log_2$ 时,可以抵抗 RHDV 强毒的攻击;当抗体效价达 $5.75 \log_2$ 时,不能完全抵抗 RhDV 强毒的攻击,初步确定了 RHDV 血凝抑制抗体效价和攻毒保护率之间的关系。该研究还表明 RHDV 灭

活疫苗免疫 4 个月后 4 种疫苗的保护率均可达到 100%,而免疫 6 个月后 4 种疫苗的保护率均没有达到 100%,因此,确定 RHDV 的免疫期为 4~6 个月,绝对不能超过 6 个月,否则无法有效控制 RHDV 的发生与流行。

参考文献

- [1] 杨丽梅,马力,王艳萍,等.兔出血症病毒 ZB 株的分离与鉴定[J].家畜生态学报,2013,34(6):62-65.
- [2] OEM J K,LEE K N,ROH I S,et al. Identification and characterization of rabbit hemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea[J]. J Vet Med Sci,2009,71(11):1519-1523.
- [3] 谢金文,王金良,杨慧,等.兔病毒性出血症的诊断[J].畜牧与兽医,2012,44(2):107-108.
- [4] 刘胜江,薛华平,蒲伯清,等.兔的一种新病毒病——兔病毒性出血症[J].畜牧与兽医,1984,16(6):253-255.
- [5] LE GALL-RECULE G,ZWINGELSTEIN F,BOUCHER S,et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. Vet Rec,2011,168(5):137-138.
- [6] 马力,杨丽梅,王艳,等.兔瘟病毒 VP6 蛋白原核表达及其应用[J].家畜生态学报,2013,34(5):67-70.
- [7] BERTO-MORAN A,PACIOS I,SERRANO E,et al. Coccidian and nematode infections influence prevalence of antibody to myxoma and rabbit hemorrhagic disease viruses in European rabbits[J]. J Wildl Dis,2013,49(1):10-17.
- [8] 李荣权,刘明,李东风.两种黄芪多糖药物佐剂对兔瘟免疫效果的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2011(21):133-134.
- [9] GUO L,WANG D,HU Y,et al. Adjuvant activity of compound polysaccharides on chickens against Newcastle disease and avian influenza vaccine[J]. Int J Biol Macromol,2012,50(3):512-517.
- [10] 王宇航,王艳娟,陈昨含,等.禽霍乱蜂胶与氢氧化铝胶灭活疫苗免疫效果比较试验[J].吉林农业科技学院学报,2012,21(2):4-6.
- [11] MA X,GUO Z,SHEN Z,et al. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig[J]. Cell Immunol,2011,270(1):13-18.
- [12] MIAO H X,QIN Y H,SILVA J A T,et al. Identification of differentially expressed genes in pistils from self-incompatible *Citrus reticulata* by suppression subtractive hybridization[J]. Molecular Biology Reporter,2013,40:159-169.
- [13] AL-SHANFARI A B,ABDULLAH S N A,SAUD H M,et al. Differential gene expression identified by suppression subtractive hybridization during late reopening of fruit in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2012,30:768-779.
- [14] XU H N,HE X Z,WANG K,et al. Identification of early nitrate stress response genes in Spinach roots by suppression subtractive hybridization[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2012,30:633-642.
- [15] 钟巍然,柴友荣,张凯,等.苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究[J].安徽农业科学,2008(13):5285-5289.
- [16] 高瑞香,李宁.重组几丁质酶对采后葡萄贮藏过程中抗病效果的研究[J].华北农学报,2012,27(6):158-162.
- [17] 王廷璞,马静静,赵菲佚.β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在农作物病虫害防治中的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(26):14417-14419.
- [18] 余玮,邢虎成,揭雨成,等.苎麻茎皮 EST 数据库构建及肌动蛋白解聚因子(ADF)和雷-tubulin 基因时空表达分析[J].农业生物技术学报,2010,18(2):382-388.
- [19] 林江波,王伟英,邹晖,等.中国水仙肌动蛋白基因的克隆与表达分析[J].福建农业学报,2012,27(9):931-935.
- [19] MARTIN R C,GLOVER-CUTTER K,BALDWIN J C,et al. Identification and characterization of a salt stress-inducible zinc finger protein from *Festuca arundinacea*[J]. BMC Research Notes,2012,5:66.
- [20] 韩欢欢,马韬,谢冰.瓜类蔬菜白粉病抗性诱导及其抗病机制研究进展[J].中国农学通报,2012,28(25):124-128.
- [21] 刘高峰.NO 和钙信使系统在草酸诱导黄瓜叶片抗霜霉病中的作用[J].西北植物学报,2012,32(5):969-974.
- [22] SOHANI M M,SCHENK P M,SCHULTZ C J,et al. Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine synthase-like gene family in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement in plant defence responses[J]. Plant Biology,2009,11(1):105-117.
- [23] SIMON A C,BEN K S,LYN M,et al. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets[J]. Exp Bot,2003,53(384):1045-1056.
- [24] 窦世娟.水稻蛋白激酶底物的筛选和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的生化与表达分析[D].保定:河北农业大学,2011.
- [25] AZAIEZ A,BOYLE B,LEVÉE V,et al. Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi[J]. Mol Plant-Microbe Interact,2009,22:90-100.
- [26] BOYLE B,LEVÉE V,HAMEL L,et al. Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems[J]. Plant Biol,2010,12:364-376.

(上接第 3558 页)