

唐波,张道华,张雪花,等. 1 株猪源乙型脑炎病毒株的免疫原性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):306-308.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.097

1 株猪源乙型脑炎病毒株的免疫原性研究

唐波,张道华,张雪花,常晨,刘国阳,华涛,侯继波

(江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省农业科学院兽医研究所/
农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:将从江苏地区筛选出的 1 株增殖性能稳定猪源 JEV JS01 毒株作为疫苗,用毒株制备灭活疫苗进行免疫原性研究。试验采用经过细胞传代获得 JEV JS01 病毒液($1 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀/mL),以甲醛灭活后加入油佐剂,制备猪源乙型脑炎灭活疫苗。腹腔免疫 9~12 g 小鼠,攻毒保护结果显示对照组小鼠全部死亡,免疫组 90% 以上健活。分别肌肉注射免疫仔猪及后备母猪,不同时间采集血清测定 JEV ELISA 抗体。检测结果显示,免疫后试验猪血清抗体效价较免疫前均有显著提高,后备母猪免疫 8 个月后抗体仍全部为阳性,抗体水平与免疫剂量呈正相关性。试验表明该猪源乙型脑炎病毒 JS01 毒株具有良好的免疫原性,可以用作疫苗用毒株。

关键词:猪源乙型脑炎病毒;免疫原性;灭活疫苗

中图分类号: S855.99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0306-02

流行性乙型脑炎病是由乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)引起的一种人兽共患传染病^[1]。人感染后主要表现为脑炎神经症状,但并不传播。猪乙型脑炎病主要表现为公猪睾丸炎、母猪繁殖障碍等,多数猪呈隐性感染并表现病毒血症的形式^[2]。患乙型脑炎病以及隐性感染的猪在病毒血症阶段都可成为最主要的传染源,在自然界总构成猪→蚊→人的链式传播^[3]。该病的流行给养猪业带来巨大经济损失,每年给我国养猪业造成的经济损失达数十亿元^[4]。鉴于感染乙型脑炎的猪是人类乙型脑炎的重要传染源,因此猪乙型脑炎的防治在公共卫生方面也具有极其重要的意义^[5]。

目前防治猪乙型脑炎病最经济有效的方法仍是接种疫苗^[6]。我国预防猪群流行性乙型脑炎与人乙脑防控应用的是同一弱毒株 SA₁₄₋₁₄₋₂ 株弱毒活疫苗,虽然已证实该毒株在人类应用的安全性和有效性^[7-8],但是在猪群中广泛接种人用乙脑减毒活疫苗的合理性、潜在的危害性还是越来越引起人们关注。本研究用经过传代筛选获得 1 株增殖性能稳定的猪源 JEV 毒株作为疫苗候选株进行相关免疫原性研究,为研制高效、安全的 BHK-21 传代细胞系猪源乙型脑炎灭活疫苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及毒株

BHK-21 细胞系购买自 ATCC,JEV JS01 毒株由江苏省农业科学院分离、鉴定和保存。

收稿日期:2015-05-28

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(11)2047];江苏省科技支撑计划(编号:BE2012370)。

作者简介:唐波(1982—),男,江苏海安人,硕士,助理研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。Tel:(025)84392058;E-mail:2005107058@163.com。

通信作者:张道华,研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。Tel:(025)84392058;E-mail:zhangdh2005@163.com。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司;猪乙型脑炎病毒 ELISA 抗体检测试剂盒购自武汉科前动物生物制品有限责任公司;乙型脑炎弱毒活疫苗购自上海海利生物药品有限公司。

1.3 病毒培养及含量测定

将细胞生长覆盖率达 80% 的 BHK21 细胞培养物,去生长液。按感染复数为 0.2%~0.5% 接种 JEV-JS 株 F₄ 代病毒液,加入含 2% FBS 的 DMEM 液,35℃ 培养。当显微镜下观察到细胞达 75% CPE(细胞病变)时,冻融收获病毒液。96 孔板测定病毒滴度,将病毒液用 DMEM 液作 10 倍系列稀释,取 10^{-1} ~ 10^{-7} 稀释度分别接种,每孔接种量为 0.1 mL,同时设立 DMEM 液阴性对照孔。35℃ 下培养,观察 CPE,计算 TCID₅₀。

1.4 灭活疫苗的制备

在病毒液中加入终浓度达到 0.1% 甲醛,于 37℃ 作用 48 h,其间每隔 6 h 搅拌或振摇 1 次,获得灭活后的病毒液。将灭活后的病毒液进行灭活检验,用 DMEM 液 1:10 稀释后,接种细胞同时设立阴性对照孔,37℃ 下培养,观察细胞病变(CPE)。盲传 3 代,如果无细胞病变(CPE)则表明灭活完全。由灭菌的吐温-80 与灭活病毒液按体积比例 4:96 混合均匀组成水相。按照体积比为 3:1 将油相和水相进行混合并乳化,制备灭活疫苗。

1.5 JEV JS01 免疫原性研究

1.5.1 小鼠免疫原性试验 9~11 g 清洁级健康小鼠 90 只,随机分成 9 组,每组 10 只。1 组为对照组,注射无菌 PBS 缓冲液;4 组为弱毒活疫苗组,分别取弱毒活疫苗 10^{-1} ~ 10^{-4} 4 个稀释度腹腔注射 0.1 头份/只;另外 4 组腹腔接种猪乙型脑炎灭活疫苗,接种剂量分别为 0.1、0.05、0.025、0.0125 mL/只,间隔 7 d 后用同等剂量加强免疫 1 次;加强免疫 7 d 后用病毒含量为 2×10^3 LD₅₀/0.2 mL 的 JEV-JS01 株病毒液进行强毒腹腔接种攻击。自攻毒之日起逐日观察至

14 d 判定结果(3 d 内死亡不计)。

1.5.2 仔猪免疫原性评价 用猪乙型脑炎灭活疫苗肌肉注射 40 日龄健康仔猪,分 0.5、1.0、2.0 mL/头共 3 个剂量组,每组 4 头;另设对照组 3 头,注射生理盐水 2 mL/头。免疫后 1、2、3、4 周分别采血分离血清,用猪乙型脑炎病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测血清 ELISA 抗体的, $D_{630\text{ nm}} > 0.32$ 为阳性。

1.5.3 后备母猪免疫期及抗体消长规律研究 将健康易感后备母猪 20 头进行分组试验,分为 4 组,每组 5 头。其中 1 组为对照组,其他 3 组为免疫组。免疫组在配种前 45 d 肌注猪乙型脑炎灭活疫苗,接种剂量分别 0.5、1.0、2.0 mL/头,间隔 2 周后分别用同等剂量疫苗加强免疫 1 次。对照组,注射生理盐水 2 mL/头。免疫后 2 周、4 周、2 月、4 月、6 月、8 月分别采血分离血清,用猪乙型脑炎病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测 ELISA 抗体, $D_{630\text{ nm}} > 0.32$ 为阳性。

2 结果

2.1 病毒培养及滴度测定

病毒接种细胞 72 h 后(观察 CPE 达 75% 时)冻融收获病毒液,测定病毒滴度。用 Karber 氏法计算出乙脑病毒 JS01 株 F_5 代病毒含量达到 $1 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀/mL。

2.2 小鼠免疫原性试验

在第 2 次免疫后第 7 天攻毒,逐日观察至第 14 天。攻毒后空白对照组的小鼠从第 6 天开始表现出神经症状逐渐全部死亡,活疫苗各剂量免疫组对小鼠的保护率均为 100% (10/10),灭活疫苗各剂量组总健活率为 92.5%。结果表明,该病毒制备的白油佐剂灭活疫苗也可以刺激机体产生较好的免疫应答,对小鼠的保护率高(表 1)。

表 1 JEV JS01 株攻击免疫小鼠的保护率

组别	免疫剂量	保护率 (%)
空白对照		0
弱毒活疫苗	10^{-1}	100
	10^{-2}	100
	10^{-3}	100
	10^{-4}	100
灭活疫苗	0.1 mL	100
	0.05 mL	100
	0.025 mL	90
	0.012 5 mL	80

2.3 仔猪 JEV ELISA 抗体检测结果

疫苗免疫仔猪后 JEV ELISA 抗体检测结果表明,所有剂量组仔猪免疫后免疫 1 周抗体全部转阳,随后抗体效价逐步增高,免疫后 2~4 周抗体效价均维持较高水平(图 1)。表明该 JEV JS01 株对仔猪具有良好的免疫原性,能够较好地刺激机体产生免疫作用,免疫后仔猪抗体产生快、效价高。

2.4 后备母猪免疫期及抗体消长规律

免疫后 2 周、4 周、2 月、4 月、6 月、8 月分别采血分离血清测定抗体,结果见图 2。不同剂量组疫苗免疫后备母猪 2 周后 ELISA 抗体全部转阳,第 14 天二次免疫后抗体水平均有大幅度的提升。抗体效价在免疫后 2 周至 6 个月均能维持在较高的水平,免疫后 8 个月所有剂量组母猪抗体仍全部为阳性。该结果表明 JEV JS01 株具有较好的免疫原性,免疫后抗

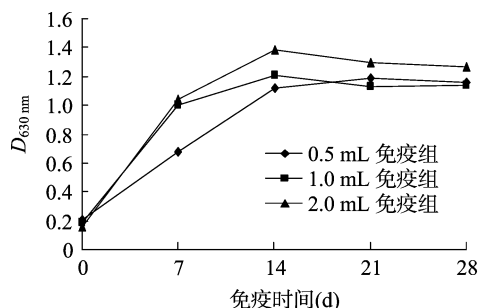


图 1 仔猪免疫后 JEV ELISA 抗体检测结果

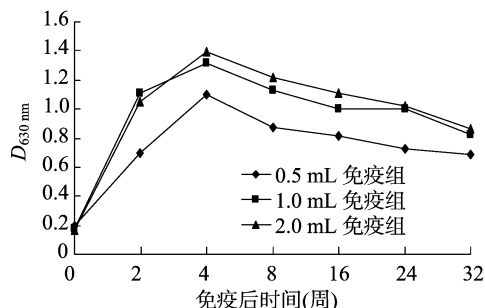


图 2 后备母猪 JEV ELISA 抗体消长规律曲线图

体水平高且持续时间长。

3 讨论

一直以来我国对 JEV 的研究大多集中在人源和蚊源株,对猪源性 JEV 的研究重视不够,对猪源乙脑毒株相关免疫原性的研究很少。近年来,国内外学者陆续从猪体中分离出多株乙脑病毒,关于猪源 JEV 的报道越来越多^[9-10]。然而有研究表明,一些猪源性分离毒株在分子特征上更接近现行弱毒株 SA₁₄₋₁₄₋₂,进化树分析表明这些分离株与疫苗株的亲缘关系更近,可能是疫苗株在自然界发生毒力返强或者是与其他毒株在猪体内发生重组所致^[11-12]。因此,加大对猪源乙脑炎病毒灭活疫苗的开发研究,对解决乙脑减毒活疫苗在猪群中使用的潜在危害具有重大意义。

近年来,国内外学者陆续开展了猪源乙型脑炎病毒灭活疫苗的研究工作。乔进平等应用猪源乙脑病毒株 GZ0409-31 制备灭活疫苗免疫动物,结果表明该病毒制备的灭活疫苗可以刺激机体产生免疫应答和免疫保护性抗体^[13]。Yang 等应用猪源乙脑病毒 KV1899 制备灭活疫苗免疫母猪也可以刺激机体产生免疫保护性抗体^[14]。良好的灭活疫苗需要有良好的抗原作为基础才能使机体获得最佳的保护性免疫。国内目前尚无商品化的猪源乙脑灭活疫苗。本研究选用免疫原性良好的猪源乙脑病毒研究疫苗的免疫效力,为研制高效、安全的猪乙脑灭活疫苗奠定基础。

本研究选用经 BHK-21 细胞培养增殖性能稳定 JS01 株猪源乙脑病毒作为疫苗用毒株,制备的灭活疫苗可以刺激机体产生很好的免疫应答,对小鼠具有较高保护率。所有剂量组疫苗免疫仔猪后 1 周抗体全部转阳,抗体产生快、效价高。后备母猪免疫后抗体效价在免疫后 6 个月均能维持在较高的水平,免疫后 8 个月所有剂量组抗体仍全部为阳性,抗体水平与免疫剂量呈正相关性。免疫试验结果证明该 JEV JS01 株具有较好的免疫原性,该病毒制备的灭活疫苗能够刺激机体

梁勤朗,吴宗文,李杰,等.中性电化水对泥鳅卵孵化的影响[J].江苏农业科学,2015,43(11):308-313.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.098

中性电化水对泥鳅卵孵化的影响

梁勤朗,吴宗文,李杰,王尚文,鲍斌,蒋礼平,黄平

(通威股份有限公司,四川成都 610041)

摘要:制备有杀菌效力、高氧化还原电位的中性杀菌电化水,并采用不同浓度电化水组(以池塘水孵化为对照组)进行孵化试验。结果表明,15.00%~24.27%中性电化水能有效提高泥鳅卵孵化率,其中24.27%浓度组孵化率为82.9%,比对照组高9.7个百分点。通过显微拍摄对照电化水组 and 对照组泥鳅卵典型胚胎发育阶段可知,电化水不影响泥鳅卵的胚胎发育。说明中性电化水可代替化学药品应用于泥鳅卵孵化,有效提高泥鳅卵孵化率,有较大的应用潜力。

关键词:中性电化水;泥鳅卵;孵化;杀菌

中图分类号: S961.1⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0308-06

泥鳅隶属于鲤形目泥鳅属,其肉质鲜嫩,富含营养价值和药用价值^[1-3],别称“水中人参”,深受国内外消费者的喜爱。近年来泥鳅市场需求量日益增大,因此也带动了泥鳅苗种繁育产业的发展,而孵化用水水质则往往决定其繁育是否成功。关于泥鳅卵孵化过程中由细菌以及剑水蚤、水蚤为代表的浮游动物和水生昆虫导致的孵化率与存活率低、鳅苗活力差等病害时有报道^[4],这已经成为泥鳅规模化人工繁殖技术亟待解决的问题。中性电化水是一种新型的杀菌、灭藻剂,笔者研究发现,中性电化水作用1 min,能完全杀灭菌落对数为7.3 lg (CFU/mL)的金黄色葡萄球菌和7.1 lg (CFU/mL)的

大肠埃希菌。试验结果与武汉工业学院朱玉婵教授等的研究结果相近,其试验结果表明中性电解水能有效杀灭菌落对数为7.8 lg (CFU/mL)的枯草杆菌黑色变种芽孢和8.94 lg (CFU/mL)大肠杆菌^[5],且该项技术成本较低,主要设备为一次性投入,操作简便,根据养殖户实际需求现制现用,减免了运输费用。该技术已逐渐应用于医疗卫生、环保等行业,但在水产养殖行业国内外尚未见相关研究报道。

本研究采用中性杀菌电化水孵化泥鳅卵,以物理方式电絮凝、电离净化过滤水中杂质,通过产生强氧化性物质代替化学药品杀灭细菌、水藻和寄生虫,从食物源头杜绝药物残留,避免造成二次环境污染。通过对照比较泥鳅卵孵化率,确认中性电化水是否有助于鱼卵孵化,且分次试验不同浓度电化水,以期探索最适泥鳅卵孵化的电化水浓度,为该技术在水产养殖中的进一步推广应用提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

1.1.1 试验材料 亲鱼选择四川省双流县万福省级繁育场,

收稿日期:2014-11-24

基金项目:四川省科技成果转化项目(编号:13CGZHZX0191)。

作者简介:梁勤朗(1987—),男,四川邛崃人,硕士,中级工程师,从事设施渔业与养殖技术研究。Tel: (028) 86168114; E-mail: liangql@ tongwei.com。

通信作者:吴宗文(1946—),男,四川安岳人,硕士,研究员,从事设施渔业与养殖技术研究。Tel: (028) 86168116; E-mail: wuzw@ tongwei.com。

产生免疫保护性抗体和长时间免疫应答,可以用作猪源乙脑灭活疫苗用毒株。

参考文献:

- [1]殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997:470-473.
- [2]郑浩,张建功,袁世山. 猪源乙型脑炎病毒的分离鉴定及其E基因分析[J]. 中国兽医科学,2009,39(06):476-482.
- [3]胡勇. 流行性乙型脑炎的病原学和流行病学研究进展[J]. 疾病控制杂志,2005,9(6):619-623.
- [4]李春燕,汤德元,徐健,等. 乙型脑炎的发病机理及毒力致病机理的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2008,42(4):41-43.
- [5]许乐燕. 乙型脑炎病毒及疫苗研究进展[J]. 国际生物制品学杂志,2006,29(6):243-247.
- [6]刘志文,俞永新,张海林,等. 乙型脑炎减毒活疫苗病毒 SA14-14-2 株经三带喙库蚊胸腔接种后的生物学和分子生物学特性[J]. 中国生物制品学杂志,2007,20(6):419-421.

- [7]章域震,张海林,俞永新,等. 三带喙库蚊和致倦库蚊胸腔接种乙型脑炎病毒减毒活疫苗 SA₁₄₋₁₄₋₂ 株的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2005,19(4):344-346.
- [8]张永欣,符芳,宋淑萍,等. 中国东北地区株日本脑炎病毒株的分离鉴定及基因分型[J]. 东北农业大学学报,2009,40(6):73-78.
- [9]袁磊,郑文亚,贾静,等. 两株乙型脑炎病毒的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中国兽医科学,2011,41(11):1134-1139.
- [10]禹乐乐,滕蔓,罗俊,等. 猪源乙型脑炎病毒河南分离株的全基因组测序及进化分析[J]. 华北农学报,2012,27(5):184-190.
- [11]王兴涛,罗俊,滕蔓,等. 猪流行性乙型脑炎病毒种猪精液分离株的鉴定及进化分析[J]. 河南农业科学,2011,40(5):152-157.
- [12]乔进平,赵明秋,张学涛,等. 猪乙型脑炎病毒3种灭活疫苗的制备及免疫效果比较[J]. 华南农业大学学报,2011,32(2):85-88.
- [13]Yang D K, Nak J, Kim H H, et al. Inactivated genotype 1 Japanese encephalitis vaccine for swine [J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2014, 3(2): 212-219.