

传染性法氏囊病重组亚单位疫苗保存期试验

程太平, 荣俊, 王怀林 (1. 长江大学动物科学学院, 湖北荆州 434025; 2. 长江大学生命科学学院; 湖北荆州 434025)

摘要 将14日龄SPF鸡分为5组, A、B和C组分别接种保存期为20、340、370 d的传染性法氏囊病重组亚单位疫苗, D和E组不接种。35日龄时, 对A、B、C、D组的鸡以100倍法氏囊感染剂量的标准强毒株IBDV BC6/85进行滴鼻。攻毒后第4天, 将所有鸡致死, 进行剖检, 观察法氏囊眼观病变, 取法氏囊组织以琼脂免疫扩散试验检测传染性法氏囊病毒抗原。法氏囊未见到明显肿大、变黄或胶冻样渗出物或出血等眼观病变及法氏囊中传染性法氏囊病毒抗原检测阴性判定为受到免疫保护。将各组的试验数据以 χ^2 检验进行统计分析。结果, A、B、C、D组的免疫保护率差别具有统计学意义, A与D组、B与D组、C与D组之间的免疫保护率具有极显著差异。结果表明, 在2~8保存1年该疫苗的稳定性和免疫原性仍然相当好。

关键词 传染性法氏囊病; 基因工程亚单位疫苗; 保存期

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5554-02

Experiment in the Conservative Period of Recombinant Subunit Vaccine for Infectious Bursal Disease

CHENG Tai-ping et al (College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract 14-day-old chickens with specific pathogen free (SPF) were divided into 5 groups. 3 groups (A, B and C) were intramuscularly injected with recombinant subunit vaccine that been conserved for 20 days, 340 days and 370 days for infectious bursal disease (IBD) respectively; and chickens of group D and E were not intramuscularly injected. At the age of 35 days chickens of 4 groups (A, B, C and D) were infected with the nose-drop route with standard challenge virulent strain of IBDV BC6/85 at the dosage of 100 times as much as bursal infectious dose. On 4th day of infection all chickens were killed and the visible pathological changes of bursa Fabricii were examined with the naked eyes. The bursa Fabricii were taken and IBDV antigen was tested in all their bursas with agar gel immune-diffusion test (AGID). Immune protection was evaluated with two judging indexes that remarkable tumescence and xanthochromia or collicidal exudate or hemorrhage were not seen and IBDV antigen was negative in bursa Fabricii. All data were analyzed with χ^2 test (Chi-square Test). The difference of percent of immune protection in 4 groups (A, B, C and D) was statistical significance. The difference of percent of immune protection was very significance between group A and group D, between group B and group D, and between group C and group D. The experimental results showed that the stability and immunogenicity of the vaccine were good when the vaccine was conserved for a year at 2~8.

Key words Infectious bursal disease; Recombinant subunit vaccine; Conservative period

经典传染性法氏囊病病毒强毒株一般感染3~7周龄鸡引起发病和死亡, 而变异毒株和超强毒株的出现, 鸡的感染年龄范围更大, 发病率和死亡率也显著增大。疫苗接种是预防IBD最有效的方法。目前使用的疫苗, 不管是中等毒力活疫苗还是灭活疫苗, 给鸡接种后诱导产生的免疫力都不能使鸡有效地抵抗变异毒株和超强毒株的攻击。现在还难以以变异毒株和超强毒株采用适当的方法来制备灭活苗。而如果将变异毒株和超强毒株进行致弱, 得到的弱毒株的保护性抗原就会发生改变^[1,2]。最佳方法是采用生物工程技术, 将变异毒株和超强毒株的保护性抗原基因(VP2基因)进行克隆, 制成活病毒载体疫苗、活细菌载体疫苗及亚单位疫苗。已经有几种活病毒载体疫苗^[3-6]及亚单位疫苗研制成功^[7]。课题组于2005年以IBDV一超强毒株VP2基因构建原核表达质粒, 在工程菌大肠杆菌内表达, 研制出一种重组亚单位油乳剂疫苗^[6]。现将该疫苗的保存期试验报道如下。

1 材料与试验方法

1.1 病毒 IBDV标准强毒株IBDV BC6/85, 购自中国兽医药品监察所。

1.2 转化菌 该转化菌携带IBDV VP2基因的重组质粒, 由课题组研制^[8]。

1.3 试验鸡 SPF种鸡蛋, 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。在实验室以实验用孵化箱进行孵化, 孵出后放入消毒过的隔离室进行饲养和试验。

1.4 琼脂免疫扩散试验 琼脂免疫扩散试验IBD阳性血清

和诊断抗原, 购于中国兽医药品监察所。琼脂免疫扩散试验用于检测转化菌受诱导培养后IBDV VP2的相对表达量, 试验鸡在攻毒前体内IBDV抗体水平和攻毒后法氏囊中IBDV抗原, 其操作方法参考文献[9]。

1.5 IBD亚单位疫苗的制备 在含转化菌纯培养皿上, 挑取单菌落, 转入100 ml LB液体培养基(含硫酸卡那霉素5 ng), 37℃, 振荡培养18~24 h, 作为种子菌液。将种子菌液转接到装有LB液体培养基(含硫酸卡那霉素50 ng/L)的发酵罐或三角瓶中, 37℃, 培养至OD₆₀₀值为0.60~0.75时, 950 ml LB液体培养基加入0.2 ml/dm³-乳糖50 ml, 37℃, 再培养7 h。离心, 收集菌细胞, 称重, 1 g湿菌加4 ml pH值7.2、0.01 ml/dm³ PBS, 超声波破碎。12 000 r/min、离心15 min, 收集上清液, 以琼脂免疫扩散试验测定IBDV VP2相对含量。上清液中IBDV VP2相对含量要求达到1/32, 若低于1/32, 加等量饱和硫酸铵溶液进行盐析浓缩。

食品级10号白油, 杭州炼油厂制造。司本80(span 80)和吐温80(tween-80), 上海申宇医药化工有限公司产品。硬脂酸铝, 上海迈坤化工有限公司产品。取94 ml 10号白油、6 ml 司本80, 混匀, 再加1 g硬脂酸铝, 混匀, 160℃, 加热30 min。冷却至20~30℃。按96/4(V/V)分别取VP2抗原液和吐温80, 充分混匀, 30℃, 静置60 min。将制备好的油乳剂和制备好的抗原液按2/1(V/V)混合, 在乳化机内进行乳化。分装, 2~8保存。按上述方法制备几批次实验室制品, 至试验时分别保存20、340、370 d。

1.6 试验鸡的免疫和攻毒 将试验鸡饲养到14日龄时, 随机分为A、B、C、D、E组。A、B和C组, 各20只, 分别接种保存20、340、370 d的疫苗, 0.25 ml/只, 肌肉注射。D组, 20只; E组(作为空白对照), 10只, 不免疫接种。35日龄时, 对5组的鸡

基金项目 湖北省科技厅重点科技发展项目(992P0706)。

作者简介 程太平(1962-), 男, 湖北天门人, 副教授, 从事禽病学和动物免疫学的教学和研究工作。

收稿日期 2006-08-02

全部采血,分离血清,以琼脂免疫扩散试验检测IBDV 抗体;采血后,A、B、C、D 组的鸡均被攻毒,以100 倍法氏囊感染剂量的标准强毒株IBDV BC6/85 进行滴鼻,0.1 ml/ 只。攻毒后,每天观察鸡只临床表现和死亡情况。攻毒后第4 天,将存活的鸡只致死,剖检,观察法氏囊眼观病变;同时,取法氏囊,制备组织匀浆,以琼脂免疫扩散试验检测IBDV 抗原。

试验鸡只受到免疫保护的判定方法和指标: 眼观病理变化,在法氏囊出现明显的肿大、变黄或胶冻样渗出物或出血等,为未受免疫保护;无上述明显眼观病理变化的,为受到

免疫保护。以琼脂免疫扩散试验检测IBDV 抗原,结果阳性者为未受免疫保护。综合这2 种方法的判定结果,只要其中之一为未受免疫保护,最终结果就为未受免疫保护。

1.7 数据分析 将各组的试验数据以 χ^2 检验进行统计分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,统计分析方法参考文献[10]。

2 结果与分析

试验鸡攻毒前的血清IBDV 抗体的检测结果,攻毒后的法氏囊眼观病变的检查和IBDV 抗原的检测结果见表1。

表1 攻毒前试验鸡的血清IBDV 抗体的检测结果

组别	鸡只数	攻毒前		攻毒后		
		血清IBDV 抗体阳性数	血清抗体阳性率 %	正常的法氏囊数	IBDV 抗原阳性数	总免疫保护率 %
A	20	20	100	20	0	100
B	20	20	100	19	1	95
C	20	20	100	19	1	95
D	20	0	0	0	20	0
E	10	0	0			

对攻毒后的A、B、C 组数据经 χ^2 检验,统计分析结果,A、B、C 组的总免疫保护率差别具有统计学意义;再将3 组进行两两比较,A 与 C 组、B 与 C 组之间的总免疫保护率具有极显著差异,A 与 B 组之间差异不显著。

3 讨论

(1) 试验结果表明,在实验室制备的IBD 基因工程重组亚单位油乳剂疫苗稳定性好,在2~8 保存1 年后其免疫原性和免疫效力不会下降,达到了畜禽用油乳剂疫苗的保存期要求。

(2) 攻毒前采血检测IBDV 抗体,A、B、C 组血清抗体阳性率均为100%,而攻毒后的总免疫保护率,A、B、C 组分别为100%、95%、95%。可以看出,同组的血清抗体阳性率比总免疫保护率高,这说明有少量鸡只虽然体内有IBDV 抗体,但不能抵抗100 倍法氏囊感染剂量的标准强毒株IBDV BC6/85 的攻击,可能是体内IBDV 抗体水平较低,达不到抗一定水平IBDV 强毒攻击的最低滴度,因此,不能仅依据鸡只血清IBDV 抗体阳性率来判定其免疫保护率;如要,必须结合其IBDV 抗体滴度。

(3) 试验采用法氏囊出现明显的、特征的眼观病理变化以及用琼脂免疫扩散试验检测IBDV 抗原来判定鸡只是否受到免疫保护。前一种方法简便、具有直观性和客观性,后一种方法具有较高的真实性和准确性。将2 种方法结合起来,得到总免疫保护率的准确性就会更高。虽然以琼脂免疫扩散试验检测法氏囊中IBDV 抗原不及ELISA 的敏感性高,但

前者检测结果为阴性,足以表明法氏囊中IBDV 极少,鸡只已具有抵抗感染的能力。

参考文献

- [1] HASSAN MK,SAF Y M. Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus[J]. *Aian Dis*,1996,40(3):553-561.
- [2] 刘伯华,李健强,刘湘涛,等. 传染性法氏囊病病毒X 毒株不同代次的致病性及VP2 可变区序列分析[J]. *中国兽医学报*,2001,21(1):1-5.
- [3] BAYLISS C D,PETERS R W,COOK J K,et al. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus[J]. *Arch Viro*,1991,120:193-205.
- [4] DARIEL R,BUBLOT M,LAPLACE E,et al. Herpesvirus of turkey recombinant virus expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens[J]. *Virology*,1995,211:481-490.
- [5] TSUKAMOTO K,KOJIMA C,KOMORI Y,et al. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2[J]. *Virology*,1999,257:352-362.
- [6] HUANG Z,ELANKUMARANS, YUNUS AS, et al. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDM[J]. *J Viro*,2004,78(18):10054-10063.
- [7] HETCOVSKI J,GUTTER B,GALLI G,et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens[J]. *Vaccine*,2003,21:4736-4743.
- [8] RONG J,CHENG T,LIU X,et al. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens[J]. *Vaccine*,2005,23(40):4844-4851.
- [9] 白文彬,于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京:中国农业出版社,2002:138-142.
- [10] 马斌荣. 医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:77-96.