

网络出版时间: 2019-9-19 10:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.031.html>

◇技术与方法◇

灭活处理鸡新城疫疫苗替代流感病毒血凝及血凝抑制实验教学效果分析

胡涛 张文昌 程正阳 李群 王明丽

摘要 比较灭活处理鸡新城疫疫苗株(La Sota株,简称鸡新城疫疫苗)替代流感病毒疫苗株(H_9N_2 株,简称流感疫苗)的血凝(HA)及血凝抑制(HI)试验在实验教学中的应用。采用0.25%甲醛溶液灭活处理鸡新城疫疫苗后,分别对该疫苗的安全性及稳定性进行逐一检测,并与流感病毒同时进行HA及HI试验,以评价该灭活疫苗的相应HA及HI试验效果及两种病毒株试验结果的符合率。灭活处理的鸡新城疫疫苗安全性符合国家药典规定。该疫苗的血凝效价及其免疫血清的血凝抑制实验效价稳定。通过分批次抽取样品进行检验显示,抽检符合率为100%;教学实践中教学符合率>90%;符合替代流感病毒HA及HI试验的要求。采用0.25%甲醛溶液灭活处理后的鸡新城疫疫苗替代流感病毒的HA及HI试验,具有安全、稳定、易保存的特征;两者相应HA及HI试验结果一致,可作为相应微生物学实验教学替代材料。

关键词 流感病毒;鸡新城疫疫苗株;血凝及血凝抑制试验;甲醛灭活;教学效果

中图分类号 R 373.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1817-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.031

血凝(hemagglutination assay, HA)和血凝抑制(hemagglutination inhibition assay, HI)试验是目前我国对流感和禽流感等病毒性疾病进行流行病学调查、疫病诊断、防疫检测和免疫程序制定等工作进行检测和监测的主要试验技术,是医学微生物学实验课教学中本科生和研究生的常规性操作内容^[1]。由于流感病毒属于生物安全第二类病原微生物,具有较高的生物危害风险,对研究者乃至公众健康都会造成威胁。国家主管部门要求开展流感病毒相关科学实验必须在生物安全三级实验室进行^[2],不准在开放性实验室用于实验教学。研究^[3]发现鸡新

城疫病毒也具有典型的HA和HI现象,而且该病毒感染具有种属特异性,一般不感染人类。采用鸡新城疫疫苗替代流感病毒进行HA及HI试验进行实验教学,可有效降低感染风险,并解决后者不能直接用于开放性实验室实验教学的难题。该研究采用国家批准的低毒力鸡新城疫疫苗(La Sota株)替代流感 H_9N_2 株疫苗株,并用0.25%甲醛溶液再处理已减毒的鸡新城疫La Sota株活疫苗;经安全检验及对比试验,已获得可靠可信的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗株 鸡新城疫低毒力活疫苗(La Sota株)购自齐鲁动物保健品有限公司,批准文号:兽药生字150252007;流感病毒(H_9N_2)疫苗株,扬州大学兽医学院惠赠,作为试验对照病毒株。

1.1.2 鸡胚 SPF鸡胚购自安徽天长威格尔科技有限公司。

1.1.3 试剂 甲醛溶液购自上海国药集团化学试剂公司,批号:090918,含量38%~40%。

1.1.4 设备 BHC-1300HA2型Ⅱ级生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);96孔V形微量血凝板(康宁公司)。

1.2 方法

1.2.1 安全检验^[4] 用鸡胚检验,将鸡新城疫低毒力活疫苗10倍稀释后接种于40只鸡胚,每胚接种0.1 ml,接种后密封针孔,置37℃孵育,鸡胚接种后,每日检卵照室观察2次。接种后24~72 h内鸡胚死亡率≤20%,判为合格;若2次检验结果均在接种后48 h内全部死亡,则判为不安全,疫苗不可用。收获鸡胚尿囊液病毒。流感 H_9N_2 疫苗株的检验方法同上。

1.2.2 灭活处理稳定性试验 向上述收获的鸡胚尿囊液中加入甲醛溶液,使甲醛的终浓度分别为0.1%和0.25%。置4℃灭活处理24 h。并分别在灭活处理后的第1、12、24、36、48、60、72 h取样,测

2019-06-05 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2012ZD08)

作者单位:安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

作者介绍:胡涛,男,实验师;

王明丽,女,教授,责任作者, E-mail: 1952987441@qq.com

定各自标本的血凝效价。期间振摇 3~4 次,分别收获鸡新城疫苗鸡胚尿囊液和流感疫苗鸡胚尿囊液。无菌分装 4℃ 保存备用。

1.2.3 免疫血清制备 选用 5 月龄来航公鸡、体重 2~2.5 kg/只、健壮无感染疾患 10 只,安徽医科大学动物中心提供[SYXK(皖)2017-006],分笼饲养。采用制备的 0.25% 甲醛灭活处理新城疫苗免疫 5 只,流感疫苗免疫 5 只,每周肌注免疫 1 次,每次 1 ml,共免疫 5 周后,心脏抽血,离心、分离血清,收集灭活处理的新城疫苗免疫血清和流感疫苗免疫血清,分装于无菌瓶内 4℃ 保存,在实验教学替代流感疫苗 HI 试验使用。分别作微量 HA 及 HI 试验,检测灭活处理的鸡胚尿囊液中新城疫苗与流感疫苗效价^[5]。

1.2.4 微量 HA 试验 于 96 孔 V 形微量血凝板每孔中滴加磷酸盐缓冲液(PBS) 50 μ l,共滴 2 排,标记为 A。0.25% 甲醛灭活处理鸡新城疫苗 1:5 稀释后加于第 1 列孔,每孔 50 μ l,然后由左至右顺序倍比稀释至第 11 孔,再从第 11 孔各吸取 50 μ l 弃之,最后一列作为 PBS 稀释液对照。于每孔加入 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ l,放室温静置 40 min,判定结果。以出现鸡红细胞完全凝集的灭活处理新城疫苗最大稀释度为该苗的血凝效价。作为阳性对照的流感疫苗共滴 2 排,标记为 B,第 1 列孔为原液,方法同上。

1.2.5 微量 HI 试验 首先配置 4 个血凝单位的鸡新城疫苗悬液。据上述 HA 实验测得病毒的血凝效价为 1:640,根据此效价,计算并将上述鸡新城疫苗悬液作 160 倍稀释后,即为该疫苗悬液稀释液的 4 个血凝单位(4 HAU),然后进行血凝抑制试验。即分别在两排血凝板孔中第 1~11 孔各加入 25 μ l PBS,第 12 孔加入 50 μ l PBS。如在第 1 列孔加入 25 μ l 鸡新城疫苗免疫血清,充分混匀后,移出 25 μ l 加至第 2 孔,依次类推,倍比稀释至第 10 孔,第 10 孔弃去 25 μ l;第 11 孔设为病毒对照,第 12 孔为红细胞对照,共滴 2 排,标记为 A。在第 1~11 孔各加入 25 μ l 4 HAU 混合均匀,依次向各孔加入 0.5% 鸡红细胞悬液 25 μ l,室温静置 40 min 后观察结果。在病毒对照孔的鸡红细胞出现完全凝集的情况下,判读该血清的效价,即血清的最大稀释倍数孔出现鸡红细胞凝集完全被抑制(呈红色原点状)的现象即为该血清的血凝抑制效价。阳性对照的流感疫苗鸡胚尿囊液共滴 4 排,标记为 B,1:10 滴加于第 1 列孔,方法同上。

1.2.6 实验教学与抽检符合率 灭活处理的鸡新城疫苗替代流感病毒 HA 及 HI 试验作为本硕临床医学及其他专业本科微生物实验教学用,测定 HA 及 HI 效价,并分别计算抽检符合率和教学符合率。

1.3 安全性评估 计算鸡新城疫苗与流感疫苗接种鸡胚后两组的死亡率,并统计差异是否具有统计学意义。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 22.0 进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数表示,两组比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。鸡新城疫苗(La Sota 株)与流感疫苗(H₉N₂ 株)安全性试验中,两组死亡率差异采用 χ^2 检验。灭活处理的鸡新城疫苗替代流感疫苗 HA 及 HI 试验中,本硕临床医学专业教学和其他本科专业教学抽检符合率和教学符合率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 安全检验结果比较 接种后第 24~72 h 内,鸡新城疫苗鸡胚死亡率 5%,判为合格,流感疫苗鸡胚死亡率 7.5%,判为合格,两种疫苗死亡率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 鸡新城疫苗与流感疫苗(H₉N₂)接种鸡胚
24~72 h 内死亡率比较(n)

疫苗株	鸡胚数 (只)	死亡数			死亡率 (%)
		24 h	48 h	72 h	
疫苗 La Sota 株	40	0	0	2	5.0
H ₉ N ₂ 株	40	0	2	1	7.5
χ^2 值		0.213 3			
P 值		0.644 2			

2.2 灭活处理稳定性实验结果比较 分别配置甲醛终浓度为 0.1% 和 0.25% 鸡新城疫苗液 4℃ 灭活处理 24 h。另取未灭活鸡新城疫苗液和流感疫苗液,分别在第 1、12、24、36、48、60、72 h 共计 7 个时间点取样,同时进行 HA 试验,比较 4 种样品血凝效价变化。0.25% 甲醛灭活处理鸡新城疫苗第 72 h 之内其血凝效价不变,始终保持 1:640;0.1% 甲醛灭活处理其血凝效价在第 60 h 之内不变,第 72 h 下降为 1:320。而未处理的鸡新城疫苗从第 36 h 开始下降,第 72 h 下降为 1:160。流感疫苗从第 24 h 开始下降,第 72 h 下降为 1:160。见图 1。

2.3 灭活鸡新城疫苗与流感疫苗微量 HA 及 HI 试验结果比较 测定灭活鸡新城疫苗 HA 试验的血

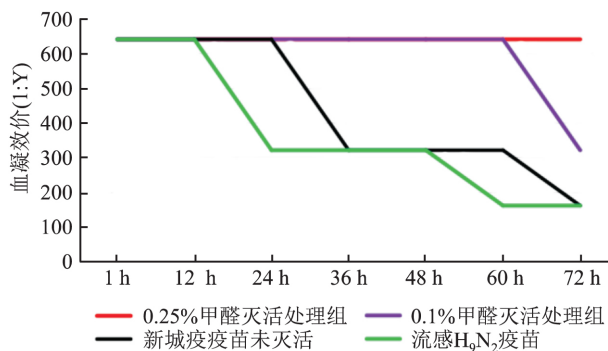


图1 四种不同样品 HA 效价随时间变化趋势图

凝效价为 1 : 640 ,免疫血清 HI 滴度为 1 : 512。对照流感疫苗 HA 试验的血凝效价为 1 : 640 ,免疫血清 HI 滴度为 1 : 512。见图 2、3。

2.4 抽检符合率与实验教学符合率比较 不同年份的灭活鸡新城疫疫苗 HA 和 HI 试验抽检符合率均为 100%。实验教学符合率 > 90%。灭活鸡新城疫疫苗及其免疫血清用于本硕临床医学专业、其他本科专业以及抽检的样品三组之间的符合率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

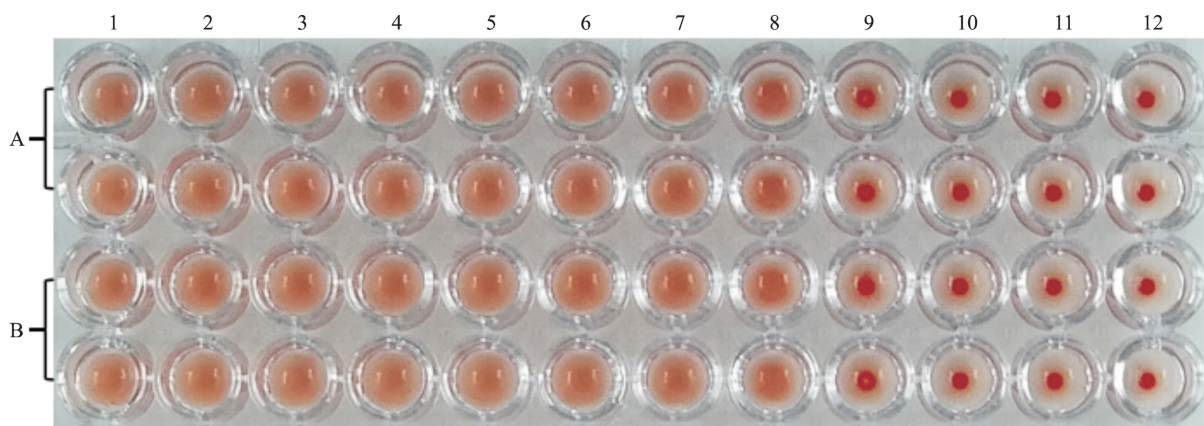


图2 两种疫苗的 HA 试验结果

A: 行为灭活鸡新城疫疫苗; B: 行为流感疫苗; 1 ~ 11: HA 试验组; 12: 红细胞对照组

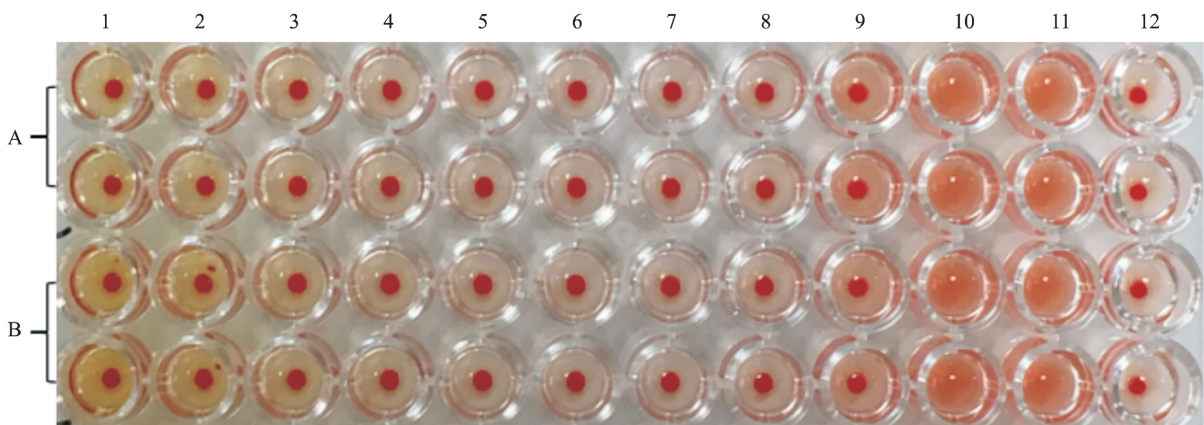


图3 两种疫苗的 HI 试验结果

A: 行为鸡新城疫疫苗; B: 行为流感疫苗; 1 ~ 10: HI 试验组; 11: 病毒对照组; 12: 红细胞对照组

表2 灭活鸡新城疫疫苗 HA 及 HI 试验抽检符合率与实验教学符合率比较

年份	本硕专业教学			本科专业教学			复检数			χ^2 值	P 值
	实验数 (份)	符合数 (份)	符合率 (%)	实验数 (份)	符合数 (份)	符合率 (%)	抽检数 (份)	符合数 (份)	符合率 (%)		
2014	180	162	90.0	880	811	92.2	18	18	100	1.986	0.358
2015	210	193	91.9	960	866	90.2	18	18	100	1.821	0.358
2016	210	189	90.0	1 024	922	90	18	18	100	1.483	0.511
2017	330	307	93.0	1 120	1 030	92	18	18	100	1.187	0.495

3 讨论

流感病毒主要通过其表面的血凝素蛋白感染宿主易感细胞;而血凝素蛋白可以与脊椎动物红细胞表面的唾液酸受体结合,从而使红细胞之间发生凝集。当足量的特异性抗体与病毒预先处理后,病毒表面的血凝素蛋白被特异的抗体封闭,便失去 HA 活性,此种现象称之为 HI 现象^[5]。近年来,国内外曾经发生过人体“非典”病毒实验室内感染的事件,使得实验室生物安全管理与控制显得尤为突出^[6]。我们经过多年来不断探索改良实验技术与方法,通过向鸡新城疫低毒力活疫苗(La Sota 株)中添加 0.25% 甲醛从而达到灭活低毒力活疫苗,使其失去感染能力但是不损害病毒血凝素分子的血凝活性。甲醛灭活可使活疫苗蛋白的高级结构受到破坏,失去生物活性,病毒失去感染性和致病性。但灭活过程不影响疫苗蛋白的一级结构,血凝素蛋白的序列无变化^[7-8]。本实验结果表明,0.25% 甲醛溶液在 4℃ 灭活处理鸡新城疫低毒力活疫苗 24 h 后,血凝效价稳定,安全检验鸡胚死亡率≤5%,试剂合格,达到实验教学替代流感疫苗 HA 及 HI 试验用标准要求。而且灭活处理鸡新城疫活疫苗 HA 及 HI 试验直观、安全、可靠和稳定。从 2014~2017 年本硕临床医学及其他专业本科专业和微生物实验教学中,抽检符合率达 100%,教学符合率在 90% 以上,效果

显著,从未发生过实验室感染事件。这种确保教学质量和实验室生物安全的实验室试验材料的“替代”是微生物实验教学不可缺少的一部分,值得进一步推广应用。

参考文献

- [1] 李明远,徐志凯,江丽芳. 医学微生物学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2013:293.
- [2] 甘露,邱云志,毕雪娜,等. 流感病毒常用检测技术及实验室要求[J]. 医学动物防制,2014,30(11):1293-6.
- [3] Abbas T, Rizvi S S, Naqvi S B. Stability of local and imported NDV vaccine under different storage conditions[J]. Pak J Pharm Sci, 2003,16(2):59-68.
- [4] 陈竺,邵明立,陈新年. 中华人民共和国药典(2015 版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:190.
- [5] Onodera H, Urayama T, Hirota K, et al. Neutralizing activities against seasonal influenza viruses in human intravenous immunoglobulin[J]. Biologics, 2017,11:23-30.
- [6] 刘晓宇,鹿双双,池宏伟,等. 流感病毒动物实验生物安全实践与探讨[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(6):68-71.
- [7] Wang X, Wang X, Jia Y, et al. Adenoviral-expressed recombinant granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) enhances protective immunity induced by inactivated newcastle disease virus (NDV) vaccine[J]. Antiviral Res, 2017,144:322-9.
- [8] McGinnes L W, Gravel K A, Finberg R W, et al. Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins[J]. J Virol, 2011,85(1):366-77.

Study on the effect of inactivated new Newcastle vaccine serving as substitution of influenza virus on the hemagglutination assay and hemagglutination inhibition assay in experiment teaching

Hu Tao, Zhang Wenchang, Cheng Zhengyang, et al

(School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Substitution of influenza virus vaccine with inactivated Newcastle disease virus vaccine(La Sota Strain) in Hemagglutination assay and Hemagglutination inhibition assay, which were normal experiments in medical undergraduate training. The safety and stability of inactivated Newcastle disease virus was tested by inoculated chicken embryonated eggs and hemagglutination assay respectively. The inactivated Newcastle disease virus vaccine was safety, stable and was consistent to influenza virus in Hemagglutination assay and Hemagglutination inhibition assay with sampling compliance rate of 100% and teaching coincidence rate of more than 90%. Inactivated Newcastle disease virus with 0.25% formalin is safety, stability, excellent result and easy to save. It is an important substitution of influenza virus in microbiology teaching experiment.

Key words flu virus; Newcastle vaccine strain; blood coagulation and hemagglutination inhibition test; formaldehyde inactivation; teaching effectiveness