

不同动物高免血清对猪肺炎支原体的代谢抑制作用研究

孙亚波¹, 魏晶晶¹, 刘富东¹, 王芳², 宁宜宝², 孙晔^{1,2}, 王凤霞¹, 沈青春^{1,2*}

(1. 北京中海生物科技有限公司, 北京 100081; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2016-09-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 12-0000-00 [中图分类号] S858.28

[摘要] 选用猪、兔、鸡、小鼠和豚鼠 5 种试验动物分别制备猪肺炎支原体高免阳性血清, 并测定了其猪肺炎支原体的代谢抑制效价。再从兔高免血清中纯化特异性抗体, 比较抗体纯化前后的代谢抑制效价是否发生变化。结果表明, 5 种试验动物高免血清对猪肺炎支原体的代谢抑制价分别为 0、 10^4 、 10^3 、 10^5 、 10^2 , 纯化后的抗体仍可抑制猪肺炎支原体的生长, 代谢抑制价没有明显变化。由此可见, 不同动物来源的高免血清对猪肺炎支原体的代谢抑制价不同, 代谢抑制作用的主要作用物质为特异性抗体; 首次证明病原靶动物——猪的高免抗血清对猪肺炎支原体没有代谢抑制作用, 其他支原体是否也表现为对靶动物(或人)抗血清的耐受性还有待进一步的研究。

[关键词] 猪肺炎支原体; 代谢抑制作用; 高免血清

Metabolic Inhibition Studies on Different Animal Hyperimmune Antiserum against *Mycoplasma hyopneumoniae*

SUN Ya-bo¹, WEI Jing-jing¹, LIU Fu-dong¹, WANG Fang², NING Yi-bao²,

SUN Ye^{1,2}, WANG Feng-xia¹, SHEN Qing-chun^{1,2*}

(1. Beijing Zhonghai Biotech Co. Ltd., Beijing 100081, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Five kinds of experimental animals, including pig, rabbit, chicken, mice and guinea pig were immunized repeatedly to prepare hyperimmune serum against *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), and the metabolic inhibition potency of the sera were determined. The purified specific antibody from rabbit hyperimmune sera was used for the potency determination, too. The results showed that the metabolic inhibitory potency to Mhp of the hyperimmune sera from five kinds of animals were 0, 10^4 , 10^3 , 10^5 and 10^2 , respectively. The purified specific antibody could inhibit the growth of Mhp, and the potency was 10^4 . Therefore, the metabolic inhibitory potency against Mhp of the hyperimmune serum from different animals was different. The main effective material of metabolic inhibition was the specific antibody. The agent target animal —— pig's hyperimmune antiserum against Mhp could not inhibit the growth of Mhp. Whether or not the other mycoplasma has the tolerance to antiserum from target animals (or human) needs to be further studied.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; metabolic inhibition; hyperimmune antiserum

作者简介: 孙亚波, 本科, 从事兽用生物制品的研制工作。

通讯作者: 沈青春。E-mail: shenqingchun@ivdc.org.cn

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 是引起猪地方流行性肺炎 (Swine enzootic pneumoniae, SEP) 的病原,国内称为“猪喘气病”。该病广泛流行于世界各地,是严重危害全球养猪业健康发展的慢性疾病之一^[1]。

支原体具有类似于病毒中和作用的代谢抑制 (Metabolic inhibition, MI) 特性,是细菌所不具有的特殊性质^[2]。该特性具有很强的种属特异性,即抗一种支原体的高免血清只能抑制该种支原体的生长繁殖,而对其他种类的支原体不具有抑制作用,因而以该特性为基础的代谢抑制试验和生长抑制试验已成为支原体鉴定的金标准^[3-5]。本实验室研究工作中发现,猪抗 Mhp 的高免血清对 Mhp 似乎不具有代谢抑制作用,而兔抗 Mhp 的高免血清则抑制作用较强,有关不同动物的抗血清对支原体的代谢抑制作用的相关问题,在国内外还没有任何报道,甚至代谢抑制相关研究也仅有早期的少量报道。为了调查几种常见试验动物抗 Mhp 高免血清的代谢抑制作用情况,本实验选用了 5 种试验动物进行了免疫和代谢抑制效价测定及相关研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌毒种 猪肺炎支原体 232 株,来自中国兽医药品监察所。

1.1.2 试剂和培养基 PPLO、猪血清、马血清等,购自 GIBCO 公司;Lps-5 支原体液体培养基(含 PPLO、葡萄糖、MEM 等)和猪肺炎支原体间接血凝 (IHA) 抗原(批号:201501),北京中海生物科技有限公司自制。IMS 1313 水性佐剂,法国赛比克公司提供。

1.1.3 试验动物 BalB/C 小鼠、豚鼠和清洁级健康家兔,来自北京维通利华实验动物技术有限公司。SPF 鸡购自梅里亚。30~40 日龄健康仔猪,购自保定某商品代猪场,猪肺炎支原体抗原、抗体阴性,猪瘟、猪伪狂犬、猪蓝耳病抗原阴性。

1.2 抗原的制备 开启猪肺炎支原体 232 株冻干菌种,使用 Lps-5 支原体液体培养基,按 1/10 的接种比例扩大繁殖至 5000 mL 菌液,8000 r/min 离心 30 min 后,使用 PBS (pH 7.2 ± 0.1) 100 mL 重悬,灭活后 1313 水性佐剂 100 mL,低剪切力混合 5~10 min,按照现行《中国兽药典》附录要求进行无菌检验后,置 2~8℃ 避光保存备用。

1.3 阳性血清的制备与检测 BalB/C 小鼠、豚

鼠、家兔、SPF 鸡和仔猪 5 种动物的数量分别为 10 只、5 只、3 只、3 只和 2 头,单次免疫剂量分别为 0.2 mL/只、0.5 mL/只、1 mL/只、1 mL/只和 2 mL/头,首次免疫 14 日后,每隔一周使用相同剂量加强免疫一次,5 次免疫后 10 日采血分离血清,进行琼扩效价和 IHA 效价测定。

1.4 活菌滴度测定 取新鲜培养的猪肺炎支原体 232 株培养物,按照 CCU₅₀ 测定方法进行活菌浓度测定^[6],用于代谢抑制试验的培养物 CCU₅₀ 滴度应不低于 10^{-8.0}/mL,置 -70℃ 以下冻存不超过 3 个月。

1.5 代谢抑制试验 使用 Lps-5 支原体液体培养基对经 CCU₅₀ 测定的 Mhp 232 株培养物进行 10 倍比稀释至 10⁻⁸,在 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 三个稀释度各取 1 mL,向其中分别加入 1 mL 含 10% 待测抗 Mhp 阳性血清的液体培养基,充分混匀,取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 三个稀释度各 2 mL 作为对照管。另设 2 mL 液体培养基作空白对照组,于 37℃ 培养 14 日后判定结果。空白对照不变色,对照组 3 个滴度都变黄,试验组至少 10⁻⁷、10⁻⁸ 两个滴度不变色即可判定为猪肺炎支原体可被待测阳性血清所抑制。

1.6 代谢抑制效价测定 采用 1.5 的方法将 Mhp 232 株培养物 10 倍比稀释至 10⁻⁸,取 10⁻¹~10⁻⁸ 七个稀释度各取 1 mL,向其中分别加入 1 mL 含 10% 待测抗 Mhp 阳性血清的液体培养基,充分混匀,取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 三个稀释度各 2 mL 作为对照。另设 2 mL 液体培养基作空白对照组,于 37℃ 培养 14 日后判定结果。空白对照不变色,3 支对照管都变黄,记录实验组最后一支变色小管的滴度,并计算出待测阳性血清的代谢抑制价,如 10⁻¹~10⁻³ 小管变色,10⁻⁴~10⁻⁷ 小管不变色,而测定菌液的 CCU 为 10⁸/mL,则共抑制了 5 个滴度,即待测阳性血清的代谢抑制价为 10⁵。

1.7 代谢抑制作用的机理初步研究

1.7.1 猪高免阳性血清中加入兔阴性血清后的代谢抑制价测定 将兔阴性血清与猪抗 Mhp 阳性血清按 1:1 混合,再按照 1.5 的方法进行代谢抑制试验,以确定兔血清中是否存在某种特殊因子有助于抗体对 Mhp 的代谢抑制作用。

1.7.2 纯化兔特异性抗体的代谢抑制效价测定 家兔高免血清表现出较强的代谢抑制作用,为了确定代谢抑制作用是由特异性抗体的结合引起,还是

与其他因子共同作用的结果,本试验将 20 mL 家兔高免血清经硫酸铵沉淀后用 PBS 复溶,经分子筛过柱后,获得纯化抗体 10 mL(浓度 10.4 mg/mL)。将原倍和倍比稀释物分别替代高免血清按 1.6 项方法进行代谢抑制效价测定。

2 结果

2.1 抗原制备 用于抗原制备的猪肺炎支原体 232 株培养物共计 5000 mL,取 10 mL 分装成 1 mL/支小管,共 10 支,置 -70℃ 以下冻存,用于代谢抑制试验。其余培养物用于制备抗原,共获得抗原 195 mL,无菌检验结果均符合规定。培养物的 CCU₅₀测定结果为 1.72 × 10⁸CCU₅₀/mL。

2.2 阳性血清的制备与检测结果 对制备的 5 种动物的 Mhp 高免阳性血清进行琼扩效价测定,同时按照现行《中国兽药典》进行猪支原体肺炎间接血凝试验,结果表明 5 种高免血清的效价均高于 1:10,即均为猪肺炎支原体阳性,其 IHA 效价和琼扩效价见表 1。

表 1 5 种动物的高免阳性血清制备结果			
动物类别	阳性血清总量/mL	琼扩效价	IHA 效价
BalB/C 小鼠	1.5	1:4	1:2560
豚鼠	23	1:4	1:10240
家兔	30	1:8	1:1280
SPF 鸡	26	1:8	1:320
猪	635	1:8	1:2560

结果显示,不同动物对制备的抗原敏感性不同,琼扩效价与 IHA 效价的一致性不高,即 IHA 效价高的血清,其琼脂扩散试验结果不一定也高,反之亦然,这可能与琼脂扩散试验只以所形成的可见沉淀线为依据有关。

2.3 代谢抑制试验 代谢抑制试验结果表明 BalB/C 小鼠、豚鼠、家兔和 SPF 鸡的高免阳性血清都可以不同程度地抑制猪肺炎支原体的生长,而仔猪高免血清的代谢抑制结果为三个稀释度为均不变色,表现为不抑制,结果见表 2。

表 2 5 种动物的高免阳性血清代谢抑制试验结果				
动物类别	不同稀释度菌液的培养结果			结论
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
BalB/C 小鼠	不变色	不变色	不变色	抑制
豚鼠	变色	不变色	不变色	抑制
家兔	不变色	不变色	不变色	抑制
SPF 鸡	不变色	不变色	不变色	抑制
仔猪	变色	变色	变色	不抑制
培养物对照	变色	变色	变色	/

2.4 代谢抑制价的测定 为进一步确定上述各动物高免血清的代谢抑制能力,对其分别进行代谢抑制价测定,结果见表 3。

结果表明,小鼠的高免血清具有很强的代谢抑

制特性,代谢抑制价最高,达到 10⁵,其次是家兔,可达 10⁴,IHA 抗体效价最高的豚鼠阳性血清的代谢抑制价则比较低,而 IHA 抗体效价次高的仔猪的代谢抑制价结果为 0,即无抑制。

表 3 5 种动物的高免阳性血清代谢抑制价测定结果				
动物类别	血清总量/mL	最后一支变色管稀释度	代谢抑制效价	结论
BalB/C 小鼠	1.5	10 ⁻³	10 ⁵	强
豚鼠	23	10 ⁻⁶	10 ²	较弱
家兔	30	10 ⁻⁴	10 ⁴	强
SPF 鸡	26	10 ⁻⁵	10 ³	较强
仔猪	635	10 ⁻⁸	0	无抑制
培养物对照	/	10 ⁻⁸	/	

上述结果表明,不同动物的高免阳性血清对 Mhp 的代谢抑制能力不同,琼扩效价和 IHA 效价均不能很好地反映血清的代谢抑制能力,而本动物 - - 猪高免血清没有表现出代谢抑制能力。出现上述结果是否与支原体的免疫逃避机制^[7-8] 有关需要进一步的研究。

2.5 代谢抑制作用的机理初步研究

2.5.1 混合血清的代谢抑制效价测定 家兔高免血清表现出较强的代谢抑制作用,而猪的高免血清尽管琼扩效价和 IHA 效价均高,但代谢抑制价测定结果为 0,是否说明代谢抑制作用不仅仅与抗体有关,还与存在于兔血清中的其他因子参与其中,本实验将猪阳性血清等比例混合兔阴性血清后进行代谢抑制价测定,结果见表 4。

表 4 猪、兔混合血清的代谢抑制价测定结果

抗血清动物类别	最后一支变色管稀释度	代谢抑制效价	备注
家兔	10 ⁻⁴	10 ⁴	强
仔猪 + 家兔	10 ⁻⁸	0	无抑制
仔猪	10 ⁻⁸	0	无抑制
培养物对照	10 ⁻⁸	/	/

结果表明,兔阴性血清并没有改变仔猪高免阳性血清的代谢抑制效价,由此可见兔阴性血清中不含与代谢抑制有关的成分。

2.6 纯化的兔特异性抗体的代谢抑制效价测定 本试验共获得纯化抗体 10 mL(浓度 10.4 mg/mL)。将原倍和倍比稀释物的纯化家兔特异性抗体分别替代高免血清按 1.6 项方法进行代谢抑制效价测定,结果见表 5。

结果表明,兔抗猪肺炎支原体抗体可独立抑制猪肺炎支原体的生长,抑制作用的强弱与抗体浓度直接相关,抗体浓度降低一半后,代谢抑制作用下降了 2 个滴度,由此可见二者似乎不呈线性关系。

表 5 兔纯化抗体的代谢抑制价测定结果

抑制物类别	最后一支变色管稀释度	代谢抑制效价	备注
兔抗 Mhp 纯化抗体 (10.4mg/mL)	10 ⁻⁴	10 ⁴	强
兔抗 Mhp 纯化抗体 (5.2mg/mL)	10 ⁻⁶	10 ²	较弱
兔抗 Mhp 高免血清	10 ⁻⁴	10 ⁴	强
培养物对照	10 ⁻⁸	/	/

3 讨论与结论

支原体是自然中能独立生长繁殖的最小生物,其结构简单,无细胞壁。其代谢抑制特性是在病毒的抗体中和作用之后发现的,美国科学家 1958 年首次发现用柯赛基病毒 B 组抗体可抑制该病毒的感染,即病毒中和作用^[9]。1966 年, Purcell R H 等首次发现兔抗支原体高免血清对相应支原体具有显著抑制其生长繁殖的作用^[2,10]。

本研究需要对不同动物高免血清对支原体的代谢抑制作用的强弱进行评价,首次引入了“代谢抑制效价”的概念及其测定方法,而此前国内外还没有任何支原体抗血清的代谢抑制强弱及其评价方法的报道,实验证明“代谢抑制效价”能很好地评价各血清样品的代谢抑制作用强弱,而且测定方法较为简单。一直以来国内外用于代谢抑制试验所用的抗血清多采用兔高免血清,而这可能与家兔容易饲养,并能得到足够量的血清有关,本研究结果表明在所制备的猪肺炎支原体的高免血清中,鼠高免血清相比兔具有更强的代谢抑制效价,但相比家兔小鼠血清制备较为困难,单只所得血清量少。

病毒的中和试验基本原理是特异性抗体主要通过封闭病毒与细胞的结合受体使其失去感染性^[11]。支原体的代谢抑制特性是否与病毒的中和特性相似? 本研究采用了纯化后的兔源特异性抗体进行试验,发现其可以抑制猪肺炎支原体的生长,但为何猪的高免血清对 Mhp 又不具有代谢抑制作用? 是因为不同动物抗体在种属特异性结构上的差异,还是其他原因造成这样的结果,还需要进一步的实验研究予以解答。

Mhp 对其靶动物——猪的抗 Mhp 高免血清几乎没有代谢抑制作用的结论,就引出了一个新问题,猪支原体肺炎当前最主要的防治手段是免疫预防,即接种弱毒活疫苗和灭活疫苗,弱毒活疫苗能产生细胞免疫和体液免疫,获得很好的免疫保护力容易理解,而灭活疫苗则主要产生体液免疫,即产生针对 Mhp 的抗体。病毒疫苗的体液免疫主要通过中和作用实现抗感染,而从本文结论可知猪支原体肺炎疫苗似乎不太可能是通过特异性抗体的代谢抑制作用实现抗感染。Mhp 灭活疫苗是当前全球用于预防猪支原体肺炎最主要的工具之一,事实证明可以使猪体产生良好的免疫保护力^[12-13],其产生抗感染的作用的产生可能与代谢抑制没有直接关系,而与细菌疫苗的抗感染作用相似。

猪阳性血清对 Mhp 不具有代谢抑制作用,将对 Mhp 的培养具有很好的应用参考价值,一些文献要求配制用于培养猪肺炎支原体的培养基所使用的猪血清为 Mhp 抗体阴性^[14],而 Mhp 抗体阴性的成年猪极难找到,得到大量阴性血清非常困难^[15]。本研究的结果显示试验 Mhp 抗体阳性的猪血清对 Mhp 不具有代谢抑制作用,因而不影响 Mhp 的生长繁殖,即用于 Mhp 培养的猪血清无要求 Mhp 抗体阴性。

本研究首次报到了 Mhp 的靶动物——猪的抗 Mhp 高免血清对 Mhp 不具有代谢抑制作用,兔抗 Mhp 特异性抗体可独立抑制 Mhp 的生长。其他支原体是否也存在对靶动物(或人)的高免抗血清具有耐受性,该特性是否与代谢抑制作用的机理有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 沈青春, 宁宜宝, 覃青松, 猪肺炎支原体的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(6):26-30.
- [2] Purcell R H, Wong D, Chanock R M, *et al*, Significance of antibody to mycoplasma as measured by metabolic - inhibition techniques[J]. Ann N Y Acad Sci, 1967, 143:664-675.
- [3] Poveda J B, Nicholas R. Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests[J]. Methods Mol Biol, 1998, 104:105-111.
- [4] Poveda J B. Biochemical characteristics in mycoplasma identification[J]. Methods Mol Biol, 1998, 104:69-78.
- [5] Assuncao P, Diaz R, Comas J, *et al*. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* growth by flow cytometry[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98:1047-1054.
- [6] 沈青春, 李聪研, 冯倩倩, 等. 用半数变色单位法精确测定支原体活菌滴度[J]. 微生物学报, 2013, 53(12):1347-1352.

- [7] Bogema D R, Deutscher A T, Woolley L K, *et al*. Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography[J]. mBio, 2012, 3(2):1-11.
- [8] Deutscher A T, Jenkins C, Minion F C, *et al*. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia[J]. Mol Microbiol, 2010, 78:444-458.
- [9] Rogers N G, Bankhead A S, Crawford I P, *et al*. Metabolic inhibition test for determination of antibodies to group B Coxsackie viruses[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1958, 98:227-231.
- [10] Purcell R H, Taylor - Robinson D, Wong D C, *et al*. A color test for the measurement of antibody to the non - acid - forming human *Mycoplasma* species[J]. Am J Epidemiol, 1966, 84:51-66.
- [11] Tebruegge M, Curtis N. Enterovirus infections in neonates[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14:222-227.
- [12] Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, *et al*. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight[J]. Vaccine, 2012, 30(52):7625-7629.
- [13] Simionatto S, Marchioro S B, Maes D, *et al*. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development[J]. Vet Microbiol, 2013, 165:234-242.
- [14] Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, *et al*. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets[J]. Vet Microbiol, 2007, 120:96-104.
- [15] Xiong Q, Wei Y, Feng Z, *et al*. Protective efficacy of a live attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with an ISCOM - matrix adjuvant in pigs[J]. Vet J, 2014, 199:268-274.

(编辑:李文平)