

lapinised vaccine virus were obtained with RT-PCR. 211 bp of each of these segments were sequenced by DNA star Highly homologous of the coding sequence of these segments were observed The identity of nucleotide sequences and amino acid sequences were 98.1% ~ 100%, that of 9 batches of these vaccine identified completely. These results confirmed that the molecular structure of the hog cholera lapinised vaccine strain is highly stable

Key words: Hog cholera live vaccine; Hog cholera lapinised virus; sequence analysis; identical; variation

禽流感(H9 亚型)油乳剂灭活疫苗的研究

韩正博, 刘芳悦, 郭兴福, 马世华, 邬立权, 李宝臣, 胡海军, 戴秀莉, 潘兴广

(黑龙江省生物制品一厂, 黑龙江哈尔滨 150069)

[收稿日期] 2001204216 [文献标识码] A [文章编号] 100221280(2001)2062004204 [中图分类号] S8591797

[摘要] 将H9亚型禽流感病毒尿囊液,经甲醛灭活,以矿物油为佐剂制成油乳剂灭活疫苗。疫苗物理性状良好,接种鸡无不良反应,接种疫苗后14d,禽流感病毒HI GMT(Log2)为7.7~7.8,21d为8.9~9.3,于接种疫苗后14、21、30、60d攻击同型禽流感病毒,接种疫苗鸡全部获得保护。現地实验取得了良好地免疫效果,证明制备的油乳剂灭活疫苗安全,免疫原性良好。

[关键词] 禽流感; 灭活疫苗; H9亚型

禽流感是由正粘病毒科中的A型流感病毒(A2vian Influenza Virus, AIV)引起的一种重要禽类传染病。感染禽主要出现呼吸道症状,产蛋量下降,腹泻及急性死亡等多种临床表现,对养禽业危害极大,因此,必须采取有效的综合性防制措施,良好地控制禽流感的流行和蔓延。

目前在控制禽流感流行的各项措施中,一些国家采用接种油乳剂灭活疫苗,成功地控制了禽流感的发生和流行。结合我国当前禽流感防制的实际,我们用低毒力H9亚型AIV株,试制了若干批AIV油乳剂灭活疫苗,经过疫苗安全性和免疫原性测定,并在一定范围内试用,制备的灭活疫苗安全可靠,免疫原性良好。现将主要试验情况报告如下。

1 材料与方 法

1.1 制苗用毒种 H9亚型低毒力毒株,该毒株的红细胞凝集试验(HA)滴度为1/320~1/280,ED₅₀为10^{8.15},MDT 90h,ICPI 1.15,IVPI 1.05,致病力测定结果表明,属于中等毒力以下毒株。

1.2 试验鸡 试验中使用的鸡只大部分为AIV抗体阴性的健康鸡,少数为本厂提供的SPF鸡。

1.3 制备疫苗

1.3.1 制苗方法 取9~11日龄SPF鸡胚,尿囊腔接种10⁻³~10⁻⁴稀释的种毒0.2ml后,置37~

38 孵育,收取接种后48~120h死胚和活胚的尿囊液,经检测HA滴度在1/320以上时,以0.3%甲醛于37 灭活24h,再按一定比例加入灭菌备用的10号白油、司盘85、硬脂酸铝和吐温280,按常规方法乳化,制成油包水型油乳剂灭活疫苗,置4~8保存。

1.3.2 不同接毒量对鸡胚血凝活性的影响 为了测定不同接毒量对鸡胚繁殖病毒的影响,选择如下滴度:10⁻²、10⁻³、2×10⁻⁴、10⁻⁴、10⁻⁵,每胚接种0.2ml,收取接毒后48~96h死胚的尿囊液,测定HA效价。另外,以种毒的10⁻³稀释液,按每胚0.1ml和0.2ml,各接种50枚鸡胚,收取接毒后48~96h死胚的尿囊液,以红细胞凝集试验,测定血凝效价。

1.3.3 接毒孵育后死胚及活胚的血凝价测定 以10⁻³稀释的种毒,按每胚接种0.2ml,收集接毒后48~96h的死胚及96h的活胚,以红细胞凝集试验测定尿囊液的血凝价。

1.4 灭活疫苗的物理性状检查 按文献[1]所列的方法进行外观检查、稳定性检测、剂型检测及粘度检查。另将制备的油乳剂灭活疫苗分别接种硫乙醇酸盐(T、G)培养基,酪胺琼脂(G、A)及葡萄糖蛋白胨(G、P)汤培养基中,37 培养96h进行无菌检验。

1.5 疫苗安全性检验

1.5.1 动物实验 取6只4~6周龄试验鸡, 颈部皮下接种2ml制备的油乳剂灭活疫苗, 观察21d, 检查接种疫苗鸡的局部及全身反应。

1.5.2 灭活效果检查 取10日龄SPF鸡胚6只, 每个注射灭活胚液0.2ml, 每天照蛋2次, 观察5d, 鸡胚意外死亡不应超过10%, 对所有胚液分别测血凝价, 无血凝出现, 认为灭活完全。

1.6 效力试验

1.6.1 抗体的检测 取40只不同日龄的禽流感非免疫鸡, 颈部皮下接种0.3ml油乳剂灭活苗, 分别于接种后的14、21、30和60d, 采集血清, 测定血清中抗A/V红血细胞凝集抑制试验(HI)抗体效价。为了检验产蛋鸡的免疫效果, 每只鸡接种0.5ml疫苗后, 于不同间隔时间收集所产的鸡蛋, 按文献[2]的方法提取卵黄抗体, 测定抗A/V HI抗体效价。

1.6.2 攻毒试验 取1~2月龄禽流感非免疫鸡, 皮下接种0.3ml油乳剂灭活疫苗, 间隔一定时间取接种疫苗鸡攻击H9亚型A/V。攻击用病毒的标准是: 接种鸡出现精神沉郁、呼吸道症状、腹泻、产蛋下降等症状, 病毒致病力试验^[3]死亡6只以下。

1.6.3 现地免疫效果观察 选择2个养鸡场, 一个饲养雏鸡, 另外一个为蛋鸡场, 雏鸡于10~15日龄之间, 每只鸡颈部皮下接种0.2ml油乳剂灭活疫苗; 蛋鸡场的鸡群正在发病, 病鸡表现流泪、流鼻涕, 呼吸困难等呼吸道症状, 产蛋量下降, 并有少量鸡死亡, 经采血分离血清, 进行禽流感琼脂扩散试验, 结果为阳性, 认定该场为禽流感感染鸡场。对该场的每

只蛋鸡胸部肌注0.5ml油乳剂灭活疫苗, 间隔不同时间收集蛋鸡所产的蛋, 按文献[2]方法提取卵黄抗体, 测定抗A/V HI抗体效价, 并观察注苗后的反应及疫情控制情况。

2 结果

2.1 疫苗物理性状

2.1.1 外观检测 疫苗外观呈白色均质乳剂。

2.1.2 剂型检查 疫苗滴于冷水中后, 呈圆的油滴状不分散。

2.1.3 稳定性检测 疫苗经3000r/min离心15min后或置疫苗在37℃左右条件下放置21d, 无分层或破乳。

2.1.4 粘度检查 在25℃左右室温, 用1ml吸管, 出口内径1.2mm, 吸取疫苗1ml, 令其垂直流出, 流出0.4ml所需时间为5s+0.5s。

2.2 疫苗的无菌检验 疫苗接种上述3种培养基后, 经培养检查, 均无细菌生长。

2.3 疫苗安全性检验 选择6只安检鸡, 每只接种2ml油乳剂灭活苗后, 注苗鸡精神、食欲良好, 未见不良反应, 接种疫苗的局部皮下组织吸收良好。灭活效果检查时, 接种灭活尿囊液的鸡胚, 未见致死鸡胚及有血凝活性。

2.4 鸡胚中影响病毒繁殖因素的测定

2.4.1 不同接毒量对鸡胚血凝活性的影响 将种毒做 10^{-2} 、 10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 等不同稀释, 每胚接种0.2ml, 分别接种一定数量的鸡胚, 收获含毒尿囊液, 并测定尿囊液血凝滴度, 结果见表1。

表1 不同接毒量鸡胚血凝价测定结果

试验次数	稀释度	剂量(ml)	鸡胚总数	接毒后死胚数(只)										活胚数	血凝价				
				48h	54h	60h	66h	72h	78h	84h	90h	96h	小计		死胚	活胚			
1	2×10^{-2}	0.2	10										9		9	1	1	160	
	10^{-2}	0.2	10										8	1	9	1	1	320	
	2×10^{-2}	0.2	30															80	
2	10^{-2}	0.2	27															160	
	2×10^{-3}	0.2	15															320	
	10^{-3}	0.2	15															> 1:320	
3	10^{-2}	0.2	300		2	2	20	14	31	43	100	7	219	46	1	1	320	1	160
	10^{-3}	0.2	300		1	4	12	10	33	56	92	16	224	47	1	1	320	1	160
4	10^{-2}	0.2	906	4	9	13	9	10	20	84	220	125	494	300	1	1	640	1	160
	10^{-3}	0.2	1110	3	21	20	10	5	28	87	310	221	705	390	1	1	320	1	160
5	10^{-3}	0.2															640		
	10^{-3}	0.1															640		
6	10^{-3}	0.2	20				3	2						7	12	1	640	1	320
	10^{-4}	0.2	20					2	1	4				7	12	1	640	1	320
	10^{-5}	0.2	20							1				1	18	1	640	1	320

2.4.2 接毒鸡胚的血凝价测定 按一定剂量给鸡胚接种毒种以后, 弃去接毒后24h以前死亡的鸡胚,

从48h开始, 间隔6h检查一次鸡胚, 观察结果表明, 鸡胚多在接毒后72~90h之间死亡, 其余时间死亡

鸡胚较少。分别收获死胚和活胚的含毒尿囊液, 以常规的微量法测定血凝价, 结果死胚的血凝价可达 1 320~ 1 640, 活胚的血凝滴度较低, 一般在 1 160 左右, 详细结果见表 1。

2.5 效力试验

2.5.1 抗体效价测定 选择的疫苗接种鸡, 间隔不

同时间, 以微量法测定血清中的血凝抑制抗体(HI)效价, 结果见表 2。

2.5.2 攻毒试验 随机选取 2 批疫苗, 各接种一定数量的雏鸡, 间隔一定时间, 攻击 H9 亚型病毒, 观察试验鸡死亡情况, 并于攻毒后 5d, 采集肛门拭子, 分离 H9 亚型 A/V, 详细结果见表 3。

表 2 血清中 HI 抗体效价测定结果

疫苗批号	鸡数	日龄	剂量 (ml)	接种后 GMT (Log2)						
				14d	21d	30d	40d	50d	60d	90d
2001	10	42	0.3	7.8	8.9	8.3	8.7	8.5	8.4	8
2102	15	10~15	0.2	7.7	9.3	8.8	8.7	8.4	7.9	
2105	15	50	0.3		9.2	9.5			9.1	

表 3 免疫鸡攻毒试验结果

疫苗批号	免疫剂量 (ml)	鸡数	攻毒后时间(d)	免疫组		对照组	
				健活数	分毒阳性数	健活数	死亡或分毒阳性数
2002	0.3	10	14	10/10	1/10	4/5	5/5
	10	21	10/10	0/10	5/5	5/5	
	10	30	10/10	0/10	4/5	5/5	
	10	60	10/10	0/10	5/5	5/5	
2003	0.3	10	14	10/10	2/10	4/5	5/5
	10	21	10/10	0/10	5/5	5/5	
	10	30	10/10	0/10	5/5	5/5	
	10	60	10/10	0/10	4/5	5/5	

2.6 现地免疫效果观察 在区试中, 不同年龄的鸡接种疫苗后, 均无任何不良反应。禽流感流行的产蛋鸡场, 接种疫苗后 10 余天, 病鸡死亡停止, 呼吸道症状发病鸡明显减少。2 个月左右, 产蛋量逐渐恢复正常的 50% 左右。并定期随机收集鸡蛋, 检测卵黄抗体中抗 A/V HI 抗体效价, 结果见表 4。

表 4 卵黄中 HI 抗体效价测定结果

疫苗批号	鸡蛋数	疫苗剂量 (ml)	接种后天数		GMT (Log2)
			20	30	
2007	20	0.5	8.1	8.3	8.8

目前已试制疫苗 100 余万 ml, 经在 4 个省区 200 余万只鸡的区域试验证明, 疫苗安全, 免疫原性良好, 有力地控制了禽流感的流行。

3 讨论与小结

3.1 疫苗种毒按 10⁻³~ 10⁻⁴ 稀释接种鸡胚能良好地在鸡胚中复制, 获取的尿囊液具有较高的血凝滴度, 一般死胚尿囊液的滴度在 1 320 以上, 应用该尿囊液能制备出优质的禽流感油乳剂灭活疫苗。

3.2 疫苗物理性状良好, 完全符合《兽用生物制品规程》^[1] 的要求。

3.3 试制的 20 批油乳剂灭活疫苗, 经鸡只的安全性检验和鸡胚的灭活效果检查, 证明制备疫苗用的含毒尿囊液灭活彻底, 完全, 接种鸡安全性良好。

3.4 疫苗的免疫原性良好, 雏鸡接种疫苗后, 能产生高效价的抗体, HI GMT Log2 在 14d 可达 7.7~ 7.8, 21d 为 8.9~ 9.3。攻毒试验结果表明, 接种疫苗鸡能良好地耐受同型病毒攻击。但血清的 A/V HI 抗体监测时间较短, 免疫攻毒试验仅做了 2 次, 今后尚需增加试验批次, 以臻完善有关的实验数据。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部颁, 中华人民共和国兽用生物制品规程一九九二年版[S]. 1992

[2] Pielak T. H., Gulka C. M., Yates V. J. et al Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to New castle disease infections bronchitis and Mycoplasma gallisepticum [J]. Avian Disease 1984; 28(4): 877-883

[3] 农业部畜牧兽医局译 国际兽医局 哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册(第三版) [S]. 1996

Development of Inactivated Oil-Emulsion Against H9 Subtype Avian Influenza

HAN Zhengbo, LU Fangyue, GUO Xingfu, MA Shihua, WU Liqun, LI Baochen, HU Haijun, DAI Xiuli, PAN Xingguang

(The First Bioproductions Manufactory of Heilongjiang Province, Harbin, 150069, China)

Abstract: Inactivated oil emulsion vaccine were prepared using allantoic fluid from embryonated egg where

inoculated with avian influenza virus (A/V) subtype H9 and then inactivated with Formalin. The geometric mean titers (GMT) of hemagglutination inhibition (HI) serum antibody at 14d post immunization was between $7.7 \sim 7.8 \log_2$ and at 21d was between $8.9 \sim 9.3 \log_2$. 100% Protection was achieved the vaccine against the challenge of identical subtype A/V. The test of field experiment showed safe and effect of the vaccine.

Key words: Avian influenza; H9 subtype; inactivated vaccines

犬 2 型腺病毒 SY 株的致弱驯化

范泉水¹, 夏咸柱², 邱 薇¹, 黄 耕², 何洪彬³, 余 春⁴,
乔 军⁵, 武银莲², 殷 震²

(11 成都军区联勤部军事医学研究所, 云南昆明 650031; 21 中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所, 吉林长春 130062
31 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030; 41 北京军区军犬队, 北京昌平 100021; 51 塔里木农垦大学, 新疆塔里木 843300)
军队青年基金及全军开放试验室基金课题

[收稿日期] 2001205208 [文献标识码] A [文章编号] 100221280(2001)20620007203 [中图分类号] S8591797

[摘 要] 作者对分离和系统鉴定的一株犬传染性喉气管炎病毒(犬 2 型腺病毒)SY(沈阳)株, 用犬肾传代细胞 MDCK 进行了致弱驯化, 每驯化 15 代做一次初步的犬的安全性试验, 用大剂量不同代次病毒对易感犬进行人工感染试验, 每天观察犬的临床症状及白细胞总数, 并于接毒后的第 5d 安乐死, 作病理解剖学和病理组织学检查。易感犬的感染试验结果表明, SY 株在犬肾细胞上传 15 代时对犬的致病力已降低, 30 代时对犬已不引起发烧、精神沉郁和厌食等症状, 仅引起轻度的鼻炎、中度的咽炎, 剖检肺表现正常, 仅见支气管淋巴结肿大, 45 代时无临床症状, 剖检除扁桃体肿大外没有见到其它症状, 60 代毒已完全失去致病力, 未见任何临床症状及病理变化。

[关键词] 犬 2 型腺病毒; 犬传染性喉气管炎病毒; 传代驯化; 疫苗株

犬腺病毒是已发现的哺乳动物腺病毒属中致病性最强、感染动物最广的单分子、线状、双股 DNA 病毒, 其 1 型(CAV 21)主要引起犬传染性肝炎和熊、狐脑炎; 2 型(CAV 22)主要引起犬科动物传染性喉气管炎和传染性腹泻。犬腺病毒广泛分布于全世界, 犬腺病毒的感染是我国养犬业、毛皮动物养殖业危害最大的疫病之一^[1]。目前我国各研究机构及生产厂家, 用于 CAV 预防所用的疫苗大部分为国外疫苗的复制品, 最初是从国外疫苗中分离的 CAV 21 以及后来的 CAV 22 弱毒苗, 常和犬瘟热、细小病毒等其它弱毒一起制成弱毒联苗进行犬腺病毒免疫的, 虽然取得了一定的效果, 但不能完全控制我国犬腺病毒的流行^[1-4]。这可能是由于从国外疫苗中所分得的毒种, 背景不清或不纯以及在细胞上所传代次数较多, 其免疫原性和安全性均难以保证或者我国流行的毒株与国外差异太大所致。从美国生物制品规程上看, 生产用种毒代次要求严格, 犬用疫苗所

用毒种限定在 5 代左右, 如要从国外疫苗中分离种毒的话, 从克隆筛选到能作生产用毒种都在十多代以上, 其安全性、免疫原性都难于保障。我们在进行犬腺病毒分子流行病学调查过程中, 从沈阳等地送检的腹泻犬病料中分到多株 2 型犬腺病毒强毒, 从其中挑选一株能产生高抗体效价的 CAV 22 SY 株在犬肾细胞上进行了致弱驯化和噬斑克隆, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞 所用 MDCK 细胞从中国兽医药品监察所引进, 按常规消化传代, 37℃ 静置培养。

1.2 病毒 犬腺病毒 SY 株, 是我们分离和系统鉴定的一株犬传染性喉气管炎病毒(犬 2 型腺病毒)的强毒。试验所用毒株为犬肾传代细胞 MDCK 培养的 SY 第 5 代培养物(简称 SY25), 在 MDCK 细胞上的 TCID₅₀ 为 $10^{-5.0} \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 。

1.3 病毒传代驯化的方法 在 MDCK 细胞长成单