

禽流感双乳相灭活疫苗的研究*

黄建文¹, 姜艳芬¹, 何维明¹, 马秋明¹, 朱旭东¹, 罗文焕², 刘备战³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 陕西省泾阳县畜牧兽医站, 陕西 泾阳 713700;

3 陕西省三原县畜牧兽医站, 陕西 三原 713800)

[摘要] 用A_{IV}H₅N₁和H₉N₂毒株作抗原, 采取分步乳化法制成双乳相灭活疫苗。经无菌检验、稳定性和安全性试验, 疫苗A和C符合兽用生物药品规程的要求, 经免疫效力和保护力测定, 疫苗可于免疫后3~5 d产生HI抗体, 9~14 d抗体达峰值, 其中H₅N₁的HI抗体可达9 log₂以上, H₉N₂可达11 log₂以上, 疫苗保护力与常规疫苗相近, 但产生保护力的时间明显提前; 疫苗在4℃条件下, 保存期可达1年, 免疫期为6~9个月。

[关键词] 禽流感; 双相疫苗; 灭活疫苗

[中图分类号] S858.315.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0043-04

禽流感(AI)是由A型流感病毒引起的禽类急性传染病, A_{IV}血清亚型众多, 变异频繁, 给世界部分国家养禽业造成巨大的经济损失^[1,2]。A_{IV}可通过抗原漂移、转换、基因重组等发生抗原变异, 当开始传播至高密度饲养区时, 容易从弱毒变异成高致病力毒株, 发病率明显上升^[3], 显然, 弱毒疫苗不宜使用。在临床症状和病理解剖学病变上, AI易与新城疫、大肠杆菌并发或继发感染, 给诊断和治疗带来较大难度, 目前国内外尚无有效的防治措施。

迄今已有多种不同类型AI疫苗的研制试用报道。如文献[4~6]报道, 经β丙内酯灭活的A_{IV}鸡胚尿囊液接种成年来航鸡, 可对其产生保护力。用甲醛灭活的油佐剂疫苗, 在12和20周龄免疫商品白来航蛋鸡, 免疫4周后90%~100%的鸡都可抵抗强毒攻击。用动植物油代替矿物油, 并加入蜂蜡作佐剂, 仍有较好的免疫效果。1995年, 墨西哥暴发流行AI, 3年共用油乳剂灭活疫苗接种8.5亿羽鸡, 对预防AI起到了较好的效果^[7]。由此可见, AI疫苗有较好的免疫原性。目前, 基因工程疫苗仍在研究之中, 若在生产中应用, 国内外均有一段距离。

对AI的预防, 国内外多采用油乳剂灭活疫苗, 且国内的AI疫苗多处在研制、试验阶段。油乳剂灭活疫苗吸收及抗原释放缓慢, 但同时又有刺激机体产生抗体较迟的缺点。尤其在用于AI的紧急预防接种时, 更是显露出来。双乳相油乳灭活疫苗具有粘度高、在注射部位易分散、极易吸收、局部反应轻

微、佐剂效应仍相当良好、刺激机体较早产生抗体、达峰值时间提前、较早产生保护力等优点。关于AI双乳相疫苗国内外尚未见报道。因此, 本研究进行了此项工作, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

种毒和种蛋 A_{IV}种毒(A/Chicken/Shaanxi/2/99/H₅N₂)鸡胚尿囊液5代种毒, -40℃保存, HA价1640以上, 由西北农林科技大学畜牧兽医研究所禽流感项目组分离鉴定^[8]; A_I/H₅N₁鸡胚尿囊液4代种毒, -40℃保存, HA价1640以上, 由中国医学科学院病毒研究所国家流感中心等提供。种蛋购自陕西临潼隔离山区专用非免疫种蛋。

抗原 AIHA抗原, 本室自制。AI制苗用抗原, H₅N₁和H₉N₂本室自制(HA效价1640以上)。

试剂 7#白油, 批号980621, 杭州炼油厂; 司盘-80, 批号970628, 上海大众制药厂; 吐温-80, 批号961013, 洛阳市化学试剂厂; 硬脂酸铝, 批号980701, 天津天大化工实验厂。

实验动物 雏鸡和90日龄新罗曼蛋鸡, 购自陕西省临潼隔离山区专用非免疫鸡。

1.2 方法

1.2.1 双乳相灭活疫苗的制备 将A_IH₅N₁和H₉N₂抗原, 按一定比例混合, 水相和油相制备参照

* [收稿日期] 2001-11-20

[基金项目] 陕西省科技厅科技攻关项目(99K06-G3); 西北农林科技大学青年科研专项基金资助项目

[作者简介] 黄建文(1969-), 男, 陕西彬县人, 助理研究员, 主要从事预防兽医学研究。

文献 [9] 的方法进行。

分别将内相按表 1 的量在低速 (1 000 r/min) 搅拌下, 缓慢加入油相中, 再高速 (10 000 r/min) 搅拌, 制成油包水型 (W/O) 疫苗 A, B, C 和 D, 然后将制成的 W/O 疫苗加入外相中制成双乳相 (W/O/W) 疫苗。

表 1 不同疫苗各组分含量

Table 1 Ingredient group content of different vaccines

组别 Groups	油相 Oil phase	水相 Water phase	
		内相	外相
		Inside phase	Outside phase
A	250	200	50
B	250	125	125
C	200	200	100
D	200	175	125

1.2.2 疫苗质量检验 无菌检验、粘度测定 (吸管法) 和稳定性试验, 均按兽用生物制品规程^[9]的方法; 安全试验, 按表 2 的方法分别对稳定性较好的 A, C 组疫苗进行试验, 并观察各组鸡的精神、食欲等状况, 连续观察 7 d, 并于接种后第 15 天处死试验鸡, 剖检观察注射部位疫苗吸收情况。

表 2 安全性试验处理方法

Table 2 Methods for safety experiment

日龄 Day age	接种途径 Inoculation route	剂量/mL Dose	试验鸡数 Number of tested chicken
14	颈部皮下注射 Subcutaneous injection	1.5	5
90	胸部肌肉注射 Muscle injection	3.0	5

表 3 疫苗质量检验结果

Table 3 Result of the quality test of the vaccine

组别 Group	无菌检验 Sterile test	粘度试验/s Viscosity test	稳定性试验 Stability test	安全性试验 Safety test	
				精神状态 Vigour condition	吸收情况 Absorption situation
A	合格 Qualified	5 ± 0.2	合格 Qualified	无明显变化 No clear change	1/4 * —
B	合格 Qualified	4 ± 0.5	不合格 Not qualified	—	—
C	合格 Qualified	4 ± 0.2	合格 Qualified	无明显变化 No clear change	0/5
D	合格 Qualified	4 ± 0.2	不合格 Not qualified	—	—

注: * 未作安全性试验; ** 不完全吸收/完全吸收。

Note: * Without safety test; ** Not complete absorption/complete absorption

2.2 免疫效力试验结果

由图 1 可以看出, 试验鸡 A I 双乳相疫苗免疫后, 3~5 d 产生 HI 抗体, 9~14 d 抗体达高峰, 其中 A H₃N₁ 抗体可达 8.83 log₂, H₃N₂ 抗体可达 11 log₂ 以上。其 HI 抗体可在 5 log₂ 以上持续达 9 个月之久。

1.2.3 疫苗免疫效力试验 将 30 日龄健康雏鸡 360 只, 分别随机分为 3 组, 每组 120 只, 隔离饲养。雏鸡颈部皮下分别注射疫苗 A 和 C, 以注射生理盐水作对照, 剂量 0.5 mL/只, 并于接种后的 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 30, 90, 180, 270 和 360 d 时采血, 随机抽样, 每组 10 只, 用微量法测定 A H₃ 和 A H₃H I 抗体。

1.2.4 保护力试验 将上述各组鸡分别于免疫后的 5, 7, 9, 14, 21, 30, 90, 180, 270 和 360 d, 随机抽样, 每组 5 只, 分别用 100 倍 E D₅₀ 的 A I 种毒 (H₃N₁ 和 H₃N₂) 攻击免疫鸡, 观察发病死亡和存活情况, 死亡鸡剖检, 观察病变。

1.2.5 保存期试验 随机抽检 C 组的 3 个不同批次疫苗, 4 静置 6, 9, 12 个月, 观察有无分层破乳现象, 同时用相应的一个批次疫苗免疫 1 月龄试验鸡, 剂量为 0.5 mL/只, 免疫后第 7, 14, 21, 30, 90, 180 和 270 天分别按每组 10 只鸡采血测定 HI 抗体。

2 结果与分析

2.1 疫苗质量检验结果

由表 3 可以看出, 各组疫苗的无菌检验均合格; B, D 两组的稳定性不合格, 表明制备双乳相疫苗时, 各相比比例不恰当, 制成的疫苗稳定性较差。此外亦可看出, 双乳相疫苗粘度低, 易吸收, 注射部位吸收良好。

本试验研制的 A I 双乳相疫苗, 刺激机体产生抗体及抗体达峰时间均较有关资料^[10-13]报道的早, 与其抗体峰值水平和抗体持续时间基本相近。表明双乳相疫苗具有抗原释放快但持续时间不减、刺激机体产生抗体快且达峰值时间较早的优点, 尤其适用于尚无弱毒活疫苗预防情况下的预防接种, 特别

是暴发疫情时, 用于紧急预防接种, 效果更加显著。

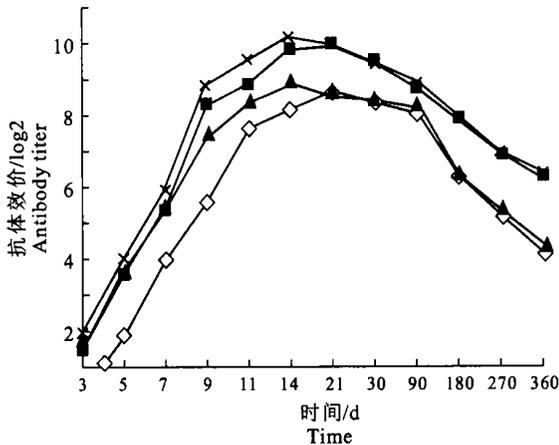


图 1 疫苗免疫后不同时间 HI 抗体效价

—◇—A (H₅N₁); —■—A (H₅N₂); —▲—C (H₅N₁); —×—C (H₅N₂)

Fig. 1 The HI antibody titer at different time after immunized by vaccine

—◇—A (H₅N₁); —■—A (H₅N₂); —▲—C (H₅N₁); —×—C (H₅N₂)

由于 A IV 的致病性主要由于其 HA 抗原决定^[13], 故本试验仅做了 HI 抗体效价的测定。由于

A IV 的血清型较多, 本试验用 H₅N₁ 和 H₅N₂ 毒株中毒, 对于预防高毒力 A I 的突然入侵及地方流行毒株危害均有较为重要的意义。本试验疫苗 A 免疫试验鸡后其抗体水平较 C 低, 可能与疫苗 C 的抗原含量较高有关。

2.3 保护力试验

攻毒后发病鸡主要表现为精神沉郁, 体温升高, 排白色水样稀粪, 饮水增多, 出现呼吸道病状。剖检病变: 腺胃乳头出血, 盲肠扁桃体出血肿大, 喉头及气管粘液增多, 对照鸡正常。

由表 4 可以看出, A I 双乳相疫苗免疫试验鸡后, 5 d 产生免疫力, 7 d 可产生 100% 保护力, 这种保护力可持续 9 个月以上。与有关资料^[8-11]中的油乳剂灭活苗相比, 其免疫力产生和产生 100% 保护力的时间显著提前。结合表 5 中的 HI 效价, 表明强毒株 A I (H₅N₁) HI 抗体效价达 5 log₂ 以上时, 可对机体产生保护力, 与以上报道中结果一致。因此, A I 双乳相疫苗具有为机体更早提供保护的特点。

表 4 攻毒死亡情况

Table 4 Death condition after challenge

种毒 Species strain	攻毒时间/d Time of challenge									
	5	7	9	14	21	30	90	180	270	360
H ₅ N ₁	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H ₅ N ₂	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.4 保存期试验

各批次疫苗均无分层破乳现象, 免疫试验结果见表 5。由 5 可以看出, A I 双乳相疫苗保存 6~12 个月后, 其免疫效力有轻微的下降, 但不明显, 其保存期可以暂定为 9~12 个月, 结合图 1, 表 4 结果, A I 双乳相疫苗的免疫期可以定为 6~9 个月, 这与

上述一些报道的常规油乳灭活疫苗基本一致。表明双乳相疫苗保存简单、方便、效果更优。由于本试验研制的双乳相疫苗中用了 2 种毒株, 而 H₅N₁ 为强毒株, 因此, 在保存期试验中, 为了方便仅对 H₅N₁ 毒株测定了 HI 效价, 也是可行的。

表 5 不同保存时间对疫苗 (HI) 效价的影响

Table 5 Effect of H₅N₁ Antibody (HI) titer different stocked period

保存时间/月 Stocked period (month)	HI 抗体 HI Antibody titer						
	7 d	14 d	21 d	30 d	3 月	6 月	9 月
6	5.18	8.33	8.23	8.15	7.85	6.23	4.83
9	4.97	8.16	8.18	8.08	7.73	6.12	4.77
12	4.88	8.83	8.03	7.88	7.65	5.98	4.77

3 结 论

双乳相禽流感灭活疫苗与常规油乳剂灭活疫苗相比, 具有粘度低、注射部位易分散、极易吸收、局部及全身反应轻微、佐剂效应较好等优点。免疫 30 日龄新罗曼蛋雏鸡, 免疫后 3~5 d 产生 HI 抗体, 5~7 d 产生保护力, 较常规油乳灭活疫苗明显提前,

而保护力与常规疫苗基本相近。达峰时间出现较早, 而抗体维持在较高水平 (6 log₂) 的时间与常规疫苗相似, 在与普通油乳剂疫苗相同的保存条件下, 12 个月内未见分层破乳现象, 其免疫效能也无明显下降。表明双乳相禽流感灭活疫苗是一种性能良好、免疫效果可靠、保存方便、能迅速产生免疫力及有较高保护作用的生物制品, 具有广阔应用前景。

[参考文献]

- [1] Alexander D J. Control of avian influenza [J]. Veterinary Bulletin, 1982, 52: 241- 359.
- [2] Simonshane Avian influenza: Control and prevent [J]. Poultry Immunization, 1998, 37 (4): 32- 45.
- [3] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 等. 禽流感与养禽业发展和人类健康 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22 (4): 312- 315.
- [4] Wood J M. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in hens [J]. Avian Diseases, 1985, 29: 867- 872.
- [5] Stone H A. Efficacy of experimental and vegetable oil-emulsion vaccines for avian influenza [J]. Avian Disease, 1987, 31: 483- 491.
- [6] Fatumbi O O. Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens [J]. Vaccine, 1992, 10 (2): 623- 626.
- [7] Villareal C L, Flores A O, Simons R D. Proc 4th Intl symp Avi Infl [Z]. Florida: Rose printing Company, 1997. 18- 22.
- [8] 何维明, 姜艳芬, 黄建文, 等. 禽流感流行病学调查及病毒分离鉴定初报 [J]. 西北农业学报, 2001, 10 (3): 16- 19.
- [9] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽医用生物制品规程 [S]. 1992 附录: 40- 41.
- [10] 黄建文, 何维明, 罗文焕, 等. 禽流感油乳剂灭活疫苗的研制及应用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2001, 36 (4): 388- 393.
- [11] 罗开健, 辛朝安, 薛义山, 等. 禽流感油乳剂灭活疫苗的研制 [J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21 (6): 401- 405.
- [12] 唐秀英, 田国斌, 于康震, 等. 禽流感油乳剂灭活疫苗的研究 [J]. 中国兽医杂志, 2001, 37 (4): 401- 405.
- [13] 贾永清, 陈化兰, 邓国华, 等. 禽流感病毒分离株 A/Goose/Guangdong/3/96 (H₅N₁) HA 基因序列分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22 (1): 25- 30.

Study on inactivated biphasic lacteal vaccines against avian influenza

HUANG Jian-wen¹, JIANG Yan-fen¹, HE Wei-ming¹, MA Qiu-ming¹,
ZHU Xu-dong¹, LUO Wen-huan², LIU Bei-zhan³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Jingyang Station of Animal Husbandry and Veterinary, Jingyang, Shaanxi 713700, China;

3 Shaanxi Sanyuan Station of Animal Husbandry and Veterinary, Sanyuan, Shaanxi 713800, China)

Abstract: In this research inactivated biphasic lacteal vaccines was prepared using antigen with avian influenza virus (AIV) H₅N₁ and H₅N₂ subtypes. According to the test of sterility, stability and safety, A and C vaccine measured up to the demands of the rule of animal biological medicine. The result of the test of immunity and protection effect shows, its antibody (HI) could be produced 3- 5 days after immunization, and reached its peaks within 9- 14 days. The antibody (HI) of H₅N₁ could be reached 9 log₂, and H₅N₂ could be reached 11 log₂. Its protection effect was equal to the conventional vaccine, but the time period of protection was advanced. At 4 °C, it could be stocked for one year, and the immune period could last for 6- 9 months.

Key words: avian influenza; biphasic lacteal vaccine; inactivated vaccine